

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

**Die Thrombuskomposition bei Tumormikropartikel-assoziiertes
venöser Thrombose**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Tobias Christian Schmidergall

aus
München
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Huss
Prof. Dr. med. Andreas May
PD Dr. med. Thomas Grünewald
Prof. Dr. med. Markus Wörnle

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Konstantin Stark

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2018

Meiner Familie in großer Liebe und Dankbarkeit gewidmet

I. Einleitung.....	1
II. Grundlagen.....	1
1. Venöse Thrombose.....	1
1.1 Epidemiologie, Risikosituationen und -faktoren.....	2
1.2 Pathomechanismus.....	3
1.2.1 Endothelaktivierung und Adhäsion von Immunzellen und Thrombozyten.....	4
1.2.2 Adhäsion und Stimulation von Monozyten.....	6
1.2.3 Tissue Factor.....	7
1.2.4 Mikropartikel.....	9
1.2.5 Adhäsion und Stimulation von neutrophilen Granulozyten.....	11
1.2.6 Adhäsion und Interaktion von Thrombozyten.....	11
1.2.7 Thrombus mit charakteristischer Komposition.....	12
2. Venöse Thrombose im Zusammenhang mit Krebserkrankungen.....	14
2.1 Epidemiologie, spezielle Risikosituationen und -faktoren.....	14
2.2 Assoziation von Tissue Factor positiven Mikropartikeln und venösen Thrombosen...	15
III. Zielsetzung.....	17
IV. Material und Methoden.....	18
1. Mausmodell zur Induktion venöser Thrombosen mittels Flussreduktion.....	18
2. Versuchstiere.....	18
3. Ursprung, Aufbereitung und Markierung der verwendeten Mikropartikel.....	20
4. Antikörper und Inhibitoren.....	21
5. Immunhistologie.....	22
5.1 Anfertigung von Gefrierschnittpräparaten.....	22
5.2 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung.....	22
6. Fluoreszenzmikroskopie.....	26
7.1 Quantifizierung von Leukozyten innerhalb eines Thrombus.....	26
7.2 Quantifizierung von Thrombozyten.....	26
8. Statistische Auswertung.....	29
V. Ergebnisse.....	30
1. Tumoröse L3.6pl-MP führen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer makroskopisch und mikroskopisch veränderten Thrombuskomposition.....	30
2. Die xenogene Abstammung der L3.6pl-MP führt zu keiner Verzerrung der Ergebnisse.	35
3. Die Rolle bekannter zellulärer und molekularer Faktoren in der abweichenden Thrombuskomposition unter Einfluss von L3.6pl-MP.....	37

3.1 GPIb α und Thrombozyten	37
3.2. P-Selektin.....	39
3.3 Neutrophile Granulozyten.....	41
3.4 FXII.....	43
3.5 Tissue Factor auf L3.6pl- Mikropartikel.....	44
3.6 Maus inhärenter Tissue Factor	46
VI. Diskussion	49
1. Die veränderte Thrombuskomposition in L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombosen weist auf einen abweichenden Pathomechanismus hin.....	50
2. Zelluläre und molekulare Einflussfaktoren auf die abweichende Thrombuskomposition	51
2.1 Thrombozyten und GPIb α beeinflussen die Thrombuskomposition, ohne die Thrombusinzidenz zu beeinflussen.....	51
2.2 L3.6pl-MP induzieren venöse Thrombosen unabhängig von P-Selektin.....	53
2.3 Die Entstehung der Tumormikropartikel-assoziierten venösen Thrombose ist unabhängig von myeloiden Leukozyten	54
3. Tissue Factor auf L3.6pl-Mikropartikel beeinflusst maßgeblich die Thrombuskomposition	55
4. Die prothrombotische Wirkung von L3.6pl-MP ist abhängig vom Synergismus zwischen intrinsischem und Tumor-MP Tissue Factor	55
VII. Zusammenfassung.....	57
VIII. Literaturverzeichnis.....	59
IX. Abbildungsverzeichnis.....	72
X. Tabellenverzeichnis	75
XI. Abkürzungsverzeichnis	75
XII. Veröffentlichungen.....	76
XIII. Danksagung.....	77

I. EINLEITUNG

Für eine Reihe von Tumorerkrankungen stellt die venöse Thrombose und ihre Folgen eine häufige Komplikation mit hoher Mortalität dar ¹⁻⁴. Das größte Risiko tragen Patienten, die an Pankreaskrebs erkranken ¹. Vom Tumor selbst abgesehen ist die venöse Thrombose in dieser Population die häufigste Todesursache ⁵. Auf welche Art und Weise maligne Tumore in diesem Maße prokoagulatorisch wirken, ist nach wie vor unklar ⁶. Es bestehen jedoch deutliche Hinweise, dass Tissue Factor tragende Mikropartikel, die von malignen Tumorzellen in die Blutzirkulation abgegeben werden, eine Rolle im Pathomechanismus spielen ⁷⁻¹⁴. Diese Rolle weiter aufzuklären und mögliche Unterschiede zur Immunzell-vermittelten, nicht-tumorassoziierten, venösen Thrombose aufzudecken, ist Ziel der vorliegenden Doktorarbeit. Neue Erkenntnisse sollen insbesondere durch die immunhistochemische Untersuchung von Thromben gewonnen werden, die in einem Stenose-induzierenden Mausmodell unter Einfluss von Tumormikropartikeln entstanden sind. Die Tumormikropartikel stammen dabei von einem hochmalignen Adenokarzinom des Pankreas und wurden der Maus intravenös zugeführt. Als Vergleichsgruppe dienen Mäuse, die Blut-Mikropartikel erhielten.

Die Erforschung der Thrombuskomposition soll in Zusammenschau mit Thrombusinzidenz und Thrombusgewicht dazu beitragen, den Pathomechanismus der tumorassoziierten venösen Thrombose weiter aufzuklären. Denn das detaillierte Verständnis hiervon bietet die Grundlage für neuartige medikamentöse Ansätze, die zielgerichtet wirken und dadurch weniger Nebeneffekte, insbesondere geringere Blutungsneigungen, aufweisen.

II. GRUNDLAGEN

1. Venöse Thrombose

Die venöse Thrombose ist eine das venöse Gefäßsystem betreffende, multikausale Erkrankung. Es kommt zur Bildung eines Blutgerinnsels mit partieller oder vollständiger Einengung einer tiefen, intrafaszialen Vene. Im betroffenen Abschnitt hat dies einen geringeren oder unterbrochenen Blutfluss in Richtung Herz zur Folge ¹⁵.

Postthrombotisches Syndrom, chronisch venöse Insuffizienz und Lungenembolie sind wesentliche Komplikationen, wobei vor allem Letztere für die beträchtliche Mortalität der venösen Thrombose verantwortlich ist ¹⁶.

1.1 Epidemiologie, Risikosituationen und -faktoren

In Europa erkranken pro Jahr 148 von 100.000 Einwohner an einer venösen Thrombose. Die Inzidenz ist mit zunehmendem Alter steigend und abhängig vom individuellen Risikoprofil ¹⁷⁻¹⁹.

Im gesunden Menschen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Gerinnungsneigung und Blutungsneigung. Dieses ist fein abgestimmt und mehrstufig kontrolliert. Bei gewissen, zu Gerinnung neigenden Risikosituationen und -faktoren (Tab. 1) kann dieses Gleichgewicht verschoben sein und zu venöser Thrombose führen.

<u>Thrombophile Risikosituationen</u>	<u>Thrombophile Risikofaktoren</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Alter • Frühere Thrombose oder Lungenembolie • Trauma, Operation • Tumorerkrankungen • Übergewicht • Zentraler Venenkatheter, Vena-cava-Filter • Akute interne Erkrankung (z.B. akuter Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, respiratorische Insuffizienz, Infektionen) • Bettlägerigkeit, Immobilisation, Lähmungen • Lange Reisen in vorwiegend sitzender Haltung • Dyslipoproteinämie • Chronisch entzündliche Darmerkrankungen • Nephrotisches Syndrom 	<ul style="list-style-type: none"> • Prothrombin-G20210A-Mutation • Faktor-V-Leiden-Mutation • Protein-S-Mangel, Protein-C-Mangel • Antithrombinmangel • Lupushemmstoff • Hyperhomozysteinämie • hoher TAFI-Spiegel (»thrombin activatable fibrinolysis inhibitor«) • hohe Plasmaspiegel der Faktoren VIII, IX oder XI • Dysfibrinogenämie; Hyperfibrinogenämie • Plasminogenmangel

- Intravenöser Drogenabusus
- Tamoxifen; Thalidomid
- Chemotherapie
- Heparininduzierte Thrombozytopenie
Typ II
- Kontrazeptiva, orale östrogenhaltige
Hormonersatztherapie
- Schwangerschaft und Wochenbett
- Varizen, oberflächliche
Venenentzündung, Varikophlebitis,
Venenanomalien
- Behçet-Krankheit
- Myeloproliferative Syndrome
- Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie

Tabelle 1: Thrombophile Risikosituationen und -faktoren, modifiziert nach ²⁰

1.2 Pathomechanismus

Der Berliner Pathologe Rudolf Virchow war durch seine Forschung im 19. Jahrhundert wesentlich an der Erkenntnis beteiligt, dass venösen Thrombosen eine Trias aus verlangsamter Blutströmung, Gefäßwandalteration und Veränderungen in der Blutzusammensetzung zu Grunde liegt ^{21,22}. Diese Trias, welche etwa 100 Jahre später als Virchow'sche Trias in die Medizingeschichte Einzug fand, hat zwar immer noch Gültigkeit, das Verständnis vom Entstehungsmechanismus ist heute jedoch wesentlich detaillierter ²³. Nichtsdestotrotz bedarf noch vieles weiterer Aufklärung. Das heutige Verständnis vom Pathomechanismus der venösen Thrombosen ist für diese Doktorarbeit von Bedeutung und wird daher an dieser Stelle genauer dargestellt. Bevor wesentliche Schritte im Detail aufgezeigt werden, soll die folgende Übersicht für eine erste Orientierung sorgen (Abb. 1).



Abbildung 1: vereinfachte Übersicht des Pathomechanismus der venösen Thrombose, modifiziert nach ^{24,25}

Nach der heutigen Auffassung wird intaktes Endothel infolge von Flussreduktion, Hypoxie und/ oder Inflammation aktiviert. Hierdurch werden Immunzellen und Thrombozyten adhären. Bei Monozyten führt diese Adhäsion zu vermehrter Expression von Tissue Factor auf der Zelloberfläche. Tissue Factor aktiviert den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade und ist für die Thrombusentstehung von entscheidender Bedeutung. Auch Mikropartikel, kleine Zellwandausstülpungen von aktivierten oder apoptotischen Zellen können Tissue Factor auf der Zelloberfläche tragen und so die Thrombusentstehung begünstigen. Neutrophile Granulozyten tragen weniger durch Tissue Factor zur Thrombusbildung bei. Sie sind für die Thrombusbildung vielmehr durch ihre Ausbildung von NETs (Neutrophil Extracellular Traps) und einer daraus resultierenden Aktivierung von Faktor XII wichtig. Indem adhärenente Thrombozyten zum einen inorganische Polyphosphate (PolyP) freisetzen ²⁶ und zum anderen mit myeloiden Leukozyten interagieren und so die NETs Bildung fördern, spielen auch sie eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der venösen Thrombose. Die Folge von Zelladhäsion und Aktivierung der Gerinnungskaskade ist die Ausbildung eines Thrombus, der reich an quervernetztem Fibrin, myeloiden Immunzellen, Thrombozyten und Erythrozyten ist.

1.2.1 Endothelaktivierung und Adhäsion von Immunzellen und Thrombozyten

Intaktes Endothel kann infolge von Flussreduktion, Hypoxie und/ oder Inflammation aktiviert werden ^{27,28}. Flussreduktion und ausgeprägte Hypoxie sind beispielsweise an Venenklappen, dem häufigsten Ausgangspunkt von venösen Thrombosen, zu beobachten ²⁹⁻³³ (Abb. 2).

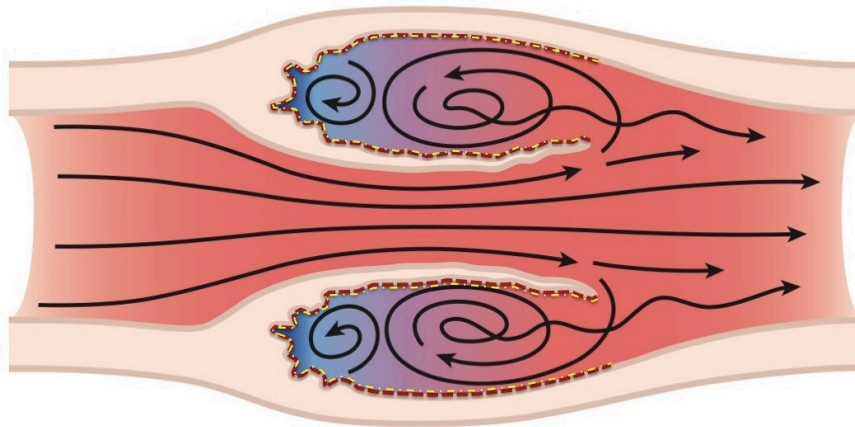


Abbildung 2: Blutströmung und hypoxische Regionen im Bereich von Venenklappen, modifiziert nach ^{23,27}

Die Folge einer verlangsamten Blutströmung sind nicht nur verminderte Scherkräfte und verlängerte Kontaktzeit von prothrombotischen Substanzen mit der Gefäßwand, sondern auch eine zunehmende Entsättigung von Erythrozyten mit hieraus resultierender Hypoxie ^{28,33,34}. In Versuchen von Hamer et al. konnte erstmals nachgewiesen werden, dass bei statischer Blutströmung in den Taschen von Venenklappen Hypoxie vorherrscht. Diese ist in blau dargestellt und steigt mit zunehmender Tiefe innerhalb der Taschen ³². Die rot und gelb gestrichelte Linie soll die Aktivierung des Endothels in vereinfachter Form darstellen, welche sich auf Grund von verlangsamter Blutströmung und Hypoxie in diesen Bereichen entwickelt ²³.

Infolge der Aktivierung werden antikoagulatorische Eigenschaften des Endothels herunter und prokoagulatorische Eigenschaften hochgefahren. Auf antikoagulatorischer Seite stehen Faktoren wie Heparin-ähnliche Proteoglykane, Tissue Factor Pathway Inhibitor, Thrombomodulin und endothelialer Protein C Rezeptor ³⁵ (Abb. 3).

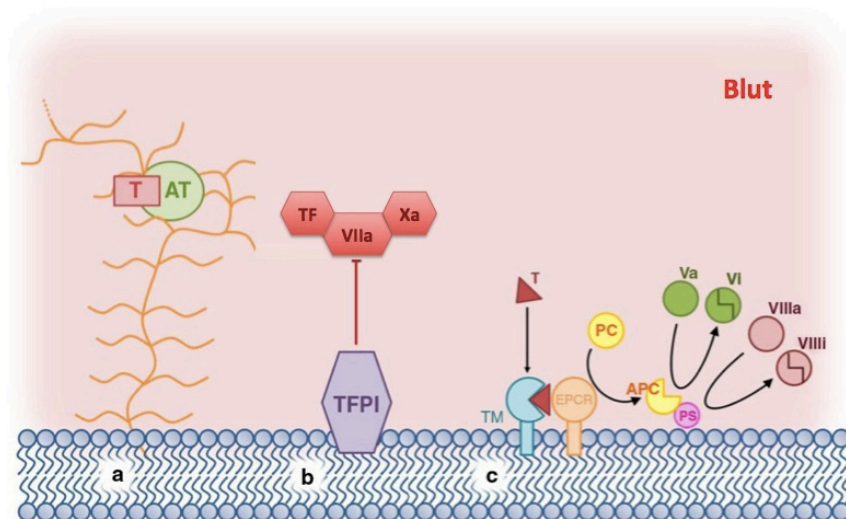


Abbildung 3: Darstellung von antikoagulatorischen Faktoren auf der Oberfläche von Endothelzellen, modifiziert nach ³⁶

a) Heparin ähnliche Proteoglykane, welche die Wirkung von Antithrombin (AT) an Thrombin (T) verstärken können ³⁶ b) Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) bindet abhängig von FXa kompetitiv den Komplex aus TF und FVIIa. Durch diese neutralisierende Bindung wird die Wirkung von Thrombin limitiert ³⁷. c) Thrombomodulin (TM) bindet einerseits Thrombin (T) und führt so zu dessen Inhibierung, andererseits wird in diesem TM-T Komplex die Thrombin abhängige Aktivierung von Protein C um den Faktor 1000 amplifiziert. Eine weitere Amplifikation erfährt diese Aktivierung durch den endothelialen Protein C Rezeptor (EPCR), der zu einer optimierten räumlichen Anordnung der Substrate führt. Aktivierte Protein C wirkt durch seine hochspezifische proteolytische Aktivität für FV/FVa und FVIIIa antikoagulatorisch ³⁸.

Auf prokoagulatorischer Seite finden sich Adhäsionsproteine wie P-Selektin, E-Selektin und von Willebrand Faktor (vWF). Dabei stammen P-Selektin und vWF vor allem aus einer endothelialen Speicherform, den Weibel Palade Körperchen ^{27,39,40}. Infolge dieser Adhäsionsproteine können Immunzellen und Thrombozyten an das aktivierte Endothel binden.

1.2.2 Adhäsion und Stimulation von Monozyten

Monozyten binden über ihren PSGL-1 Rezeptor an P-Selektin auf aktivierten Endothelzellen. Dies führt zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen und vermehrten Expression von Tissue Factor ^{27,41} (Abb. 4).

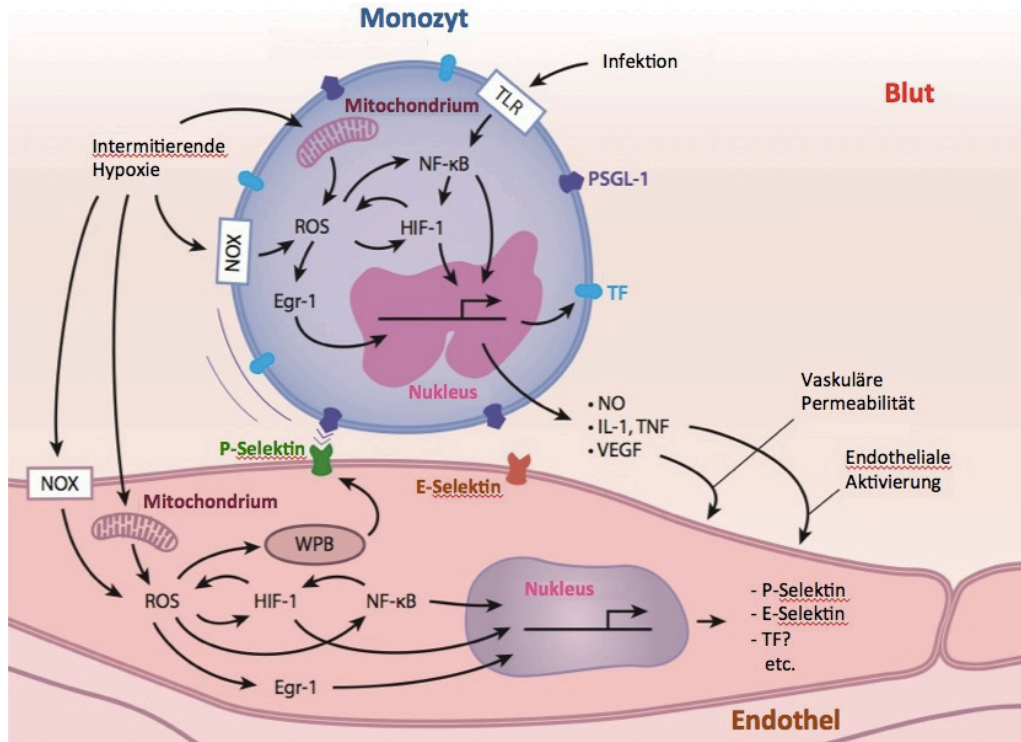


Abbildung 4: Monozytäre und endotheliale Signalwege bei Hypoxie induzierter venöser Thrombose, modifiziert nach ²⁷

Monozyten und Endothelzellen werden durch intermittierende oder chronische Hypoxie aktiviert. ROS (reaktive Sauerstoff Spezies), die entweder von NOX (NADPH Oxidase) oder Mitochondrien produziert werden, nehmen dabei eine besondere Rolle ein. In Monozyten führen diese über Sauerstoff abhängige Transkriptionsfaktoren wie HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1), EGR-1 (Early Growth Factor Response-1) und NF-κB (Nuclear Factor-κB) zur Expression von TF (Tissue Factor) und Zytokinen wie NO (Stickstoff), IL-1 (Interleukin-1), TNF (Tumor Nekrose Faktor) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Neben der prokoagulatorischen Wirkung von Tissue Factor resultiert hieraus eine weitere Aktivierung von Endothelzellen sowie eine gesteigerte Gefäßpermeabilität. In Endothelzellen führen ROS zum sofortigen endothelialen Einbau von P-Selektin aus WPB (Weibel-Palade Körperchen) sowie über zuvor genannte Sauerstoff abhängige Transkriptionsfaktoren zur de novo Synthese von unter anderem P-Selektin und E-Selektin ²⁷. *In vitro* zeigte sich, dass Endothelzellen ebenfalls über ROS und EGR-1 zu einer vermehrten de novo Synthese und Oberflächenexpression von Tissue Factor angeregt werden können ^{42,43}. Die *in vivo* Daten hierzu sind nicht eindeutig. Wobei unter schwerer Sepsis, Tumorbedingungen oder lokalen Flussturbulenzen eine endotheliale Tissue Factor Expression beobachtet werden konnte ^{44,45}.

1.2.3 Tissue Factor

Tissue Factor (TF, syn. Gewebethromboplastin) ist ein transmembranöses Glykoprotein, das als alternativ gespligte Form (asTF) und als full length Tissue Factor (flTF) existiert. Während asTF für die Gerinnung keine Rolle spielt, ist flTF für die Aktivierung der Gerinnungskaskade von entscheidender Bedeutung ⁴⁶. Darüber hinaus hat flTF Einfluss auf Tumorwachstum, Inflammation und Angiogenese ⁴⁷. Die Bezeichnung Tissue Factor bezieht sich daher in der vorliegenden Doktorarbeit stets auf flTF. Dieser kann in zwei Formen vorliegen, einer nicht oder kaum koagulatorischen

(„crypted“) Form und einer koagulatorisch aktiven Form. In Ersterer findet er sich auf der Oberfläche von ruhenden, nicht stimulierten Zellen. In Letztere geht er erst durch Stimulation über und erhält so seine volle prokoagulatorische Aktivität ⁴⁸. Auch wenn noch nicht abschließend geklärt ist, wie dieser Übergang erfolgt, geht man am ehesten von der Proteindisulfidisomerase (PDI) als entscheidenden Faktor aus ^{49,50} (Abb. 5).

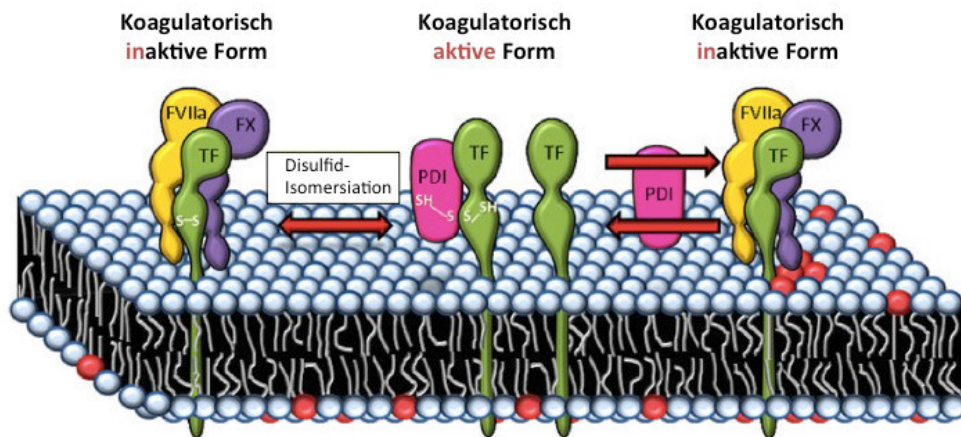


Abbildung 5: Übergang von koagulatorisch inaktivem Tissue Factor zu koagulatorisch aktivem Tissue Factor – vermutlicher Mechanismus unter Einfluss von PDI, modifiziert nach ⁴⁸

In einer Isomerisierungsreaktion durch das Enzym PDI wird die Thiol-Gruppe (-SH) in eine Disulfidbrücke (S-S) umgewandelt. Dies führt zu einer Konformationsänderung, welche die Bindung von FVIIa erlaubt. ⁵¹

PDI wird von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen gebildet und lässt sich auch auf NETs nachweisen (Abb. X) ⁵¹⁻⁵³. In der koagulatorisch aktiven Form bildet Tissue Factor zusammen mit FVIIa einen enzymatischen Komplex, der die Proteinsubstrate FIX und FX aktiviert und damit die Gerinnungskaskade über den extrinsischen Weg in Gang setzt ⁴¹. Tissue Factor wird konstitutiv an Zelloberflächen von unterschiedlichen extravaskulären Zellen, wie Fibroblasten, Perizyten und glatten Muskelzellen gebildet ^{54,55}. Tissue Factor liegt damit in Gefäßwänden und um diese herum vor, so dass bei Gefäßverletzung subendothelial unmittelbar ausreichende Mengen für die Gerinnungsaktivierung vorhanden sind. Intravaskulär hingegen sind im gesunden Organismus nur sehr geringe Mengen an Tissue Factor zu finden. Der größte Teil hiervon scheint auf Mikropartikeln von Thrombozyten und Monozyten, wie auch auf Monozyten selbst vorzuliegen ⁴⁷. Dabei gibt es keine Hinweise, dass der hier zu findende Tissue Factor im gesunden Organismus hämostatisch wirksam ist ⁵⁶. Unter pathologischen Bedingungen lassen sich dagegen intravaskulär signifikant erhöhte

Mengen an koagulatorisch aktivem Tissue Factor finden. Zu diesen Bedingungen zählen kardiovaskuläre Erkrankungen, Inflammation, Sichelzellanämie, aber auch Tumorerkrankungen⁵⁷⁻⁶⁰. Je nach pathologischem Stimulus kann Tissue Factor somit auf Monozyten, Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen oder Tumorzellen zu finden sein⁶¹. Dieser intravaskuläre Pool an Tissue Factor kann deutlich vergrößert werden, indem Zellen wie Monozyten und Tumorzellen Mikropartikel bilden, die ebenfalls Tissue Factor auf der Oberfläche tragen^{62,63}.

1.2.4 Mikropartikel

Mikropartikel sind kleine (100-1000 nm) vesikuläre Membranfragmente, die sich von der Plasmamembran aktivierter oder apoptotischer Zellen ablösen. Sie müssen von Exosomen abgegrenzt werden, welche kleiner (50-100 nm) und endosomalen Ursprungs sind⁶⁴. Die Oberfläche der Mikropartikel ist negativ geladen und reich an anionischen Phospholipiden wie Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin⁶⁵. Zudem besitzen sie Oberflächenrezeptoren und cytoplasmatische wie nukleäre Moleküle ihrer Mutterzelle. Dies erklärt die unterschiedlichen Eigenschaften von Mikropartikeln und erlaubt zudem eine Zuordnung zu ihren ursprünglichen Zellen. Aktivierenden Einfluss auf die Blutgerinnung haben Mikropartikel vor allem durch ihre Phospholipidkomposition und Tissue Factor auf der Oberfläche. Einen Beitrag zur Kommunikation zwischen unterschiedlichen Zellen leisten Mikropartikel, indem sie Oberflächenrezeptoren, mRNA und micro RNA von ihrer Mutterzelle auf Zielzellen übertragen können. Damit wird ihnen auch eine Rolle bei Inflammation, Angiogenese und Immunantworten zugesprochen^{66,67} (Abb. 6).

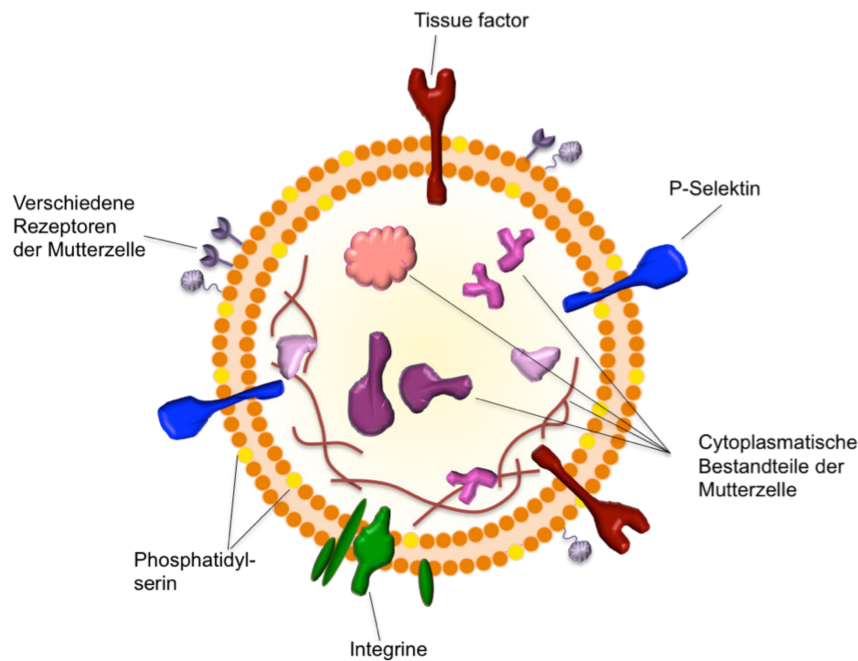


Abbildung 6: Mikropartikel in schematischer Darstellung, mit freundlicher Genehmigung von Dr. Irene Schubert, LMU München

Mikropartikel mit cytoplasmatischen Bestandteilen, Phosphatidyl-reicher Oberfläche, Tissue Factor Rezeptoren der Mutterzelle

Im Blut von gesunden Menschen sind Mikropartikel in geringen Mengen zu finden. Zunächst wurde beschrieben, dass die überwiegende Zahl von Thrombozyten abstammt⁶⁸. Neuere Daten gehen jedoch von Megakaryozyten als Ursprung aus^{68,69}. In deutlich größeren Mengen liegen Mikropartikel unter pathologischen Bedingungen wie kardiovaskulären Erkrankungen, Inflammation, Diabetes mellitus oder Tumorerkrankungen vor. Dabei können sie von Monozyten, Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Erythrozyten, Endothelzellen oder Tumorzellen abstammen⁷⁰⁻⁷². Koagulatorisch aktiver Tissue Factor ist dabei vor allem auf Mikropartikeln von Monozyten und Tumorzellen zu finden^{8,73,74}. Die Mikropartikel von Thrombozyten und Erythrozyten scheinen vor allem durch ihre Faktor XII Aktivierung für die Thrombin-Generierung relevant zu sein⁷³.

Die besondere Rolle der tumorassoziierten Mikropartikel in Bezug auf den Entstehungsmechanismus von venösen Thrombosen ist Teil der vorliegenden Doktorarbeit. Die bisherigen Erkenntnisse zu tumorassoziierten Mikropartikeln werden daher unter dem eigenen Gliederungspunkt 2.2 im Detail dargestellt.

1.2.5 Adhäsion und Stimulation von neutrophilen Granulozyten

Wie Monozyten binden auch neutrophile Granulozyten über PSGL-1 an P-Selektin auf Endothelzellen⁷⁵. Anders als bei Monozyten führt diese Adhäsion jedoch kaum zur Expression von Tissue Factor. Und dennoch spielen sie eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der venösen Thrombose⁵³. Von Bruehl und Kollegen konnten in einem Mausmodell mit Flussreduktion in der Vena cava caudalis zeigen, dass neutrophile Granulozyten NETs (Neutrophil Extracellular Traps) ausbilden und hierdurch zur Thrombusentwicklung beitragen (Abb. 7). NETs können einerseits an vWF binden, TFPI über Neutrophilen Elastase abbauen und die stark durch Thrombomodulin amplifizierte Protein C Aktivierung reduzieren⁷⁶⁻⁷⁹. Andererseits können NETs durch ihre negativ geladene Oberfläche Faktor XII aktivieren und so direkten Einfluss auf die Stabilität des quervernetzten Fibrinnetzwerks nehmen⁵³. Dabei scheint die Aktivierung von Faktor XII weitestgehend unabhängig von Faktor XI der intrinsischen Gerinnungskaskade abzulaufen⁸⁰.

1.2.6 Adhäsion und Interaktion von Thombozyten

Entgegen der früheren Auffassung spielen auch Thombozyten im Pathomechanismus der venösen Thrombose eine wichtige Rolle. So binden sie nicht nur über ihren GPIIb/IIIa Rezeptor an vWF auf aktiviertem Endothel, sondern rekrutieren Monozyten und neutrophile Granulozyten zum wachsenden Thrombus, regen neutrophile Granulozyten zur Ausbildung von NETs an, schütten PDI aus und aktivieren Faktor XII über Polyphosphate (PolyP) (Abb. 7)^{53,81}.

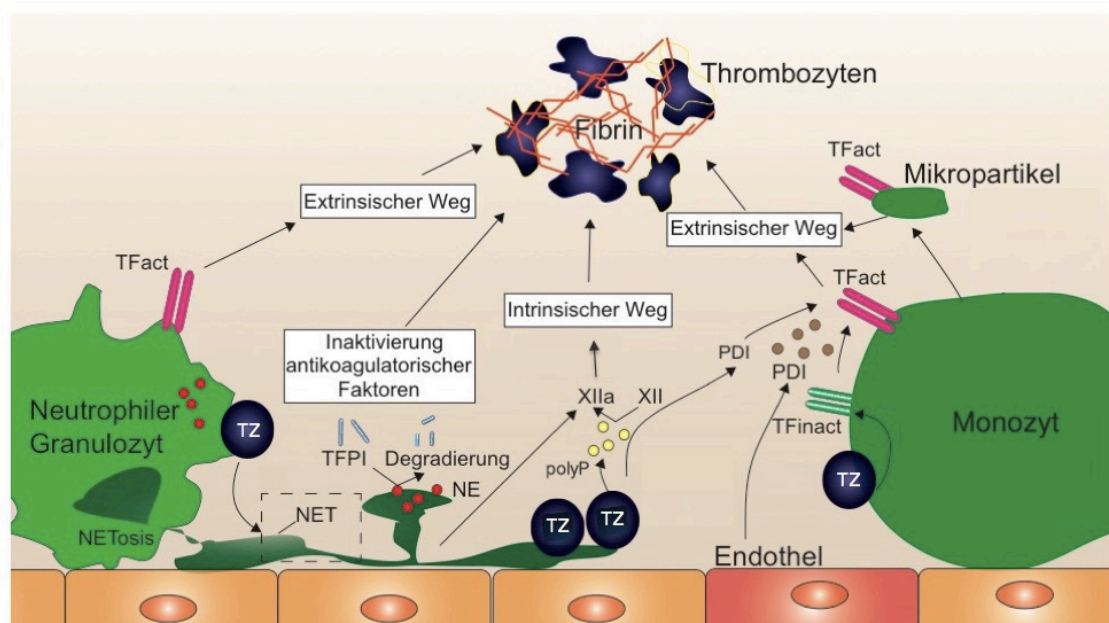


Abbildung 7: Zusammenwirken von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten in der Entstehung venöser Thrombosen, modifiziert nach ⁸¹

1.2.7 Thrombus mit charakteristischer Komposition

Als Folge von beschriebener Zelladhäsion und Gerinnungsaktivierung entsteht ein charakteristischer venöser Thrombus mit laminärer Schichtung und weißen sowie roten Arealen ^{27,31,82}. Die roten Anteile entsprechen vor allem quervernetztem Fibrin und darin eingefangenen Erythrozyten ⁸³. Die weißen Areale sind besonders reich an Thrombozyten ⁸⁴ (Abb. 8).

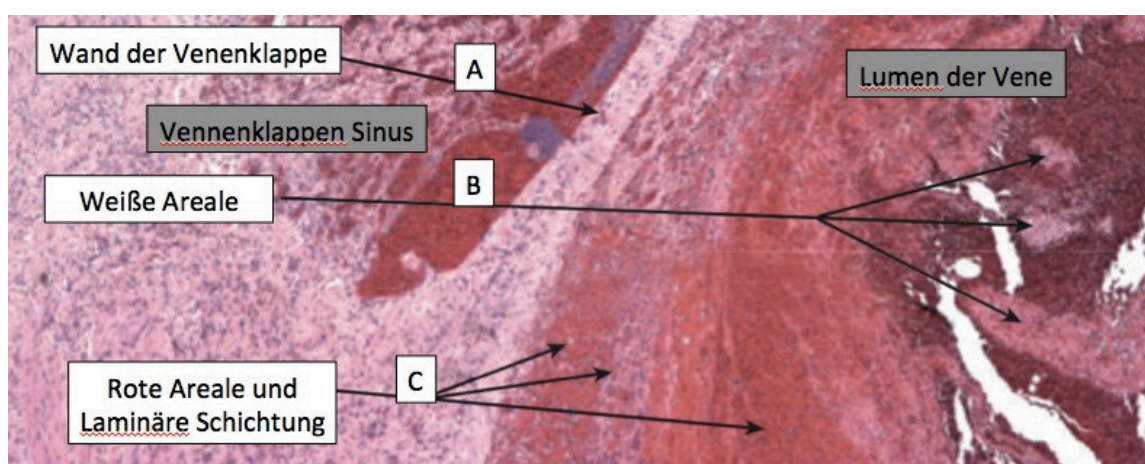


Abbildung 8: Histologischer Schnitt einer Vene mitsamt Venenklappe in HE Färbung, modifiziert nach ²⁷

A zeigt die Wand der Venenklappe zwischen luminaler und sinuidaler Seite. Im Venenklappen Sinus und dem Lumen der Vene zeigt sich ein venöser Thrombus mit charakteristischer Komposition. B zeigt weiße Areale mit hoher Dichte an Thrombozyten. C zeigt neben der laminären Schichtung aus kernlosen und laminierten Schichten

kernhaltigen Bereichen auf rote Areale mit quervernetztem Fibrin und darin eingefangenen Erythrozyten.

Dieser charakteristische Aufbau von humanen, nicht-tumorassoziierten venösen Thrombosen zeigt sich auch in dem Mausmodell, das dieser Doktorarbeit zugrunde liegt ^{53,84} (Abb. 9). In diesem erfolgt eine standardisierte Einengung der Vena cava caudalis der Maus durch partielle Ligatur. Das Endothel bleibt dabei intakt, alleine der Blutfluss ist reduziert. Indem auf diese Weise ein Milieu entsteht, das dem im Sinus von Venenklappen gleicht, entwickelt sich ein Thrombus, der in kinetischen und histologischen Merkmalen spontan entstehenden venösen Thrombosen beim Menschen entspricht ^{53,84}.

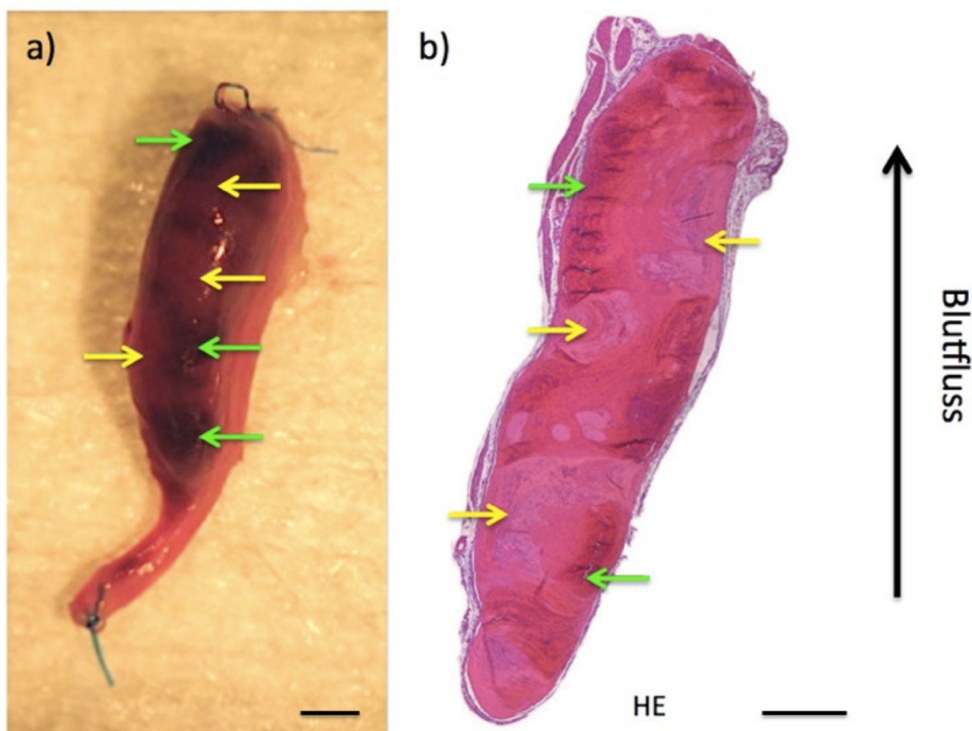


Abbildung 9: Makro- und mikroskopische Ansicht eines venösen Thrombus 48 h nach Ligatur der murinen Vena cava caudalis, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Massberg und Dr. Chandraratne, LMU München

a) Venöser Thrombus nach operativer Entnahme; **b)** Histologischer Längsschnitt in Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung; gelbe Pfeile zeigen auf weiße Areale mit hoher Dichte an Thrombozyten, grüne Pfeile zeigen auf rote Areale mit quervernetztem Fibrin und darin eingefangenen Erythrozyten, Querbalken: 1mm

2. Venöse Thrombose im Zusammenhang mit Krebserkrankungen

Nachdem venöse Thrombosen im Allgemeinen beschrieben und wesentliche Aspekte des Pathomechanismus dargestellt wurden, soll nun auf venöse Thrombosen speziell bei Tumorerkrankungen eingegangen werden. Einer der Ersten, der das Auftreten venöser Thrombosen in Verbindung mit Tumorerkrankungen brachte, war der französische Arzt Armand Trousseau. Er beschrieb im Jahre 1865 einen Zusammenhang von Magenkrebs und venöser Thrombose ⁵.

2.1 Epidemiologie, spezielle Risikosituationen und -faktoren

Aus Studien mit Patientenkollektiven aus Amerika, Holland, Dänemark und England geht hervor, dass Krebspatienten im Vergleich zur Normalbevölkerung ein 4- bis 7-fach erhöhtes Risiko haben, eine venöse Thrombose zu entwickeln ¹⁻⁴. Betrachtet man den Anteil, den Patienten mit Krebserkrankung an der Gesamtmenge von Patienten mit venöser Thrombose ausmachen, so beträgt dieser etwa 15-20 % ⁸⁵. Abhängig von der primären Tumorerkrankung entwickeln etwa 4-20% der Krebspatienten eine symptomatische venöse Thrombose ⁸⁶. Dabei ist die Inzidenz innerhalb der ersten Monate nach Krebsdiagnose am höchsten ^{1,87}. Bei aggressiven Tumoren, die früh metastasieren und mit kurzer Überlebenszeit assoziiert sind, ist das Risiko besonders hoch ⁸⁸. Hierzu zählen allen voran Tumore von Pankreas, Lunge und Magen ¹. Des Weiteren besitzen primäre Tumore von Gehirn, Niere und Ovar sowie Lymphome und Myelome ein erhöhtes Risiko ⁸⁹⁻⁹². Insgesamt stellen venöse Thrombosen und ihre Folgen schwerwiegende Komplikationen bei Krebserkrankung dar. So haben sie nicht nur Einfluss auf die Lebensqualität, sondern sind auch zweithäufigste Todesursache nach der Krebserkrankung selbst ⁵. Bei Patienten mit Krebserkrankung liegen häufig mehrere thrombophile Risikosituationen gleichzeitig vor. Hierzu zählen chirurgische Eingriffe, zentralvenöse Katheter, Chemotherapie und Immobilisation bzw. Bettlägerigkeit ^{93,94}. Je nach Individuum liegen noch weitere Risikosituation und -faktoren vor (Tab. 1). Abgesehen von den genannten Punkten stellt auch der Tumor an sich einen bedeutenden Risikofaktor für das Auftreten von venösen Thrombosen dar ⁹⁵. Dieses Risiko ist zum einen abhängig von der Art, der Lokalisation, der Histologie, der Ausbreitung und dem zeitlichen Bestehen des Tumors ⁹⁶⁻⁹⁸. Zum anderen ist es davon abhängig, welchen Einfluss der Tumor auf den betroffenen Organismus hat und

wie dieser hierauf reagiert ⁹⁴. Obwohl der Zusammenhang von venösen Thrombosen und malignen Erkrankungen bereits im 19. Jahrhundert wahrgenommen wurde, sind die molekularen und zellulären Mechanismen im Detail noch immer unklar.

2.2 Assoziation von Tissue Factor positiven Mikropartikeln und venösen Thrombosen

Auf der Suche nach speziellen Faktoren, die in Tumorpatienten vermehrt zu venöser Thrombose führen, wurden in Forschungen der jüngeren Vergangenheit Mikropartikel von Tumorzellen ausfindig gemacht, die koagulatorisch aktiven Tissue Factor auf der Oberfläche tragen (TF+ MP) (Abb. 10).

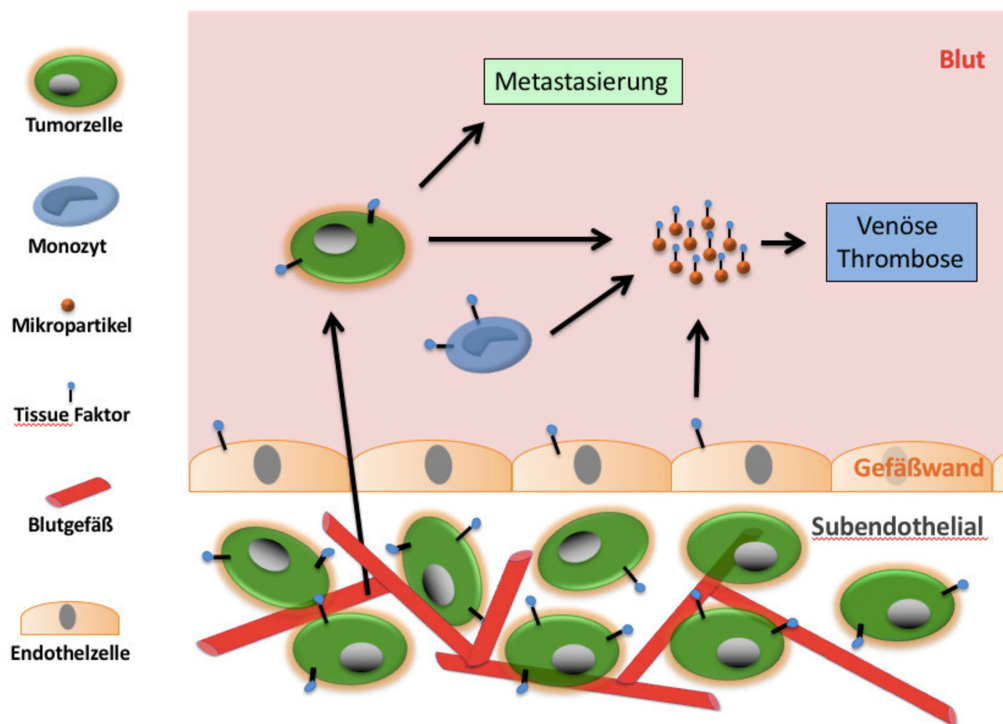


Abbildung 10: Tissue Factor positive Mikropartikel von Tumorzellen und Wirtszellen als mögliche Trigger der tumorassoziierten venösen Thrombose, modifiziert nach ⁷

Hinweise auf Tissue Factor als einen hierbei bedeutsamen Faktor ergaben bereits Untersuchungen von Kakkar et al. aus dem Jahr 1995. Im Plasma von 106 Patienten mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen (davon 27 mit Pankreastumor) wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöhte Plasmaspiegel an Tissue Factor und Faktor VIIa gemessen. Faktor XIIIa war lediglich bei Patienten unter Chemotherapie und in fortgeschrittenem Krebsstadium leicht erhöht messbar ⁹⁹. Auch in histologischen

Untersuchungen von Pankreastumoren konnte die Expression von Tissue Factor nachgewiesen werden. Im gesunden Pankreas hingegen war keine Expression von Tissue Factor nachweisbar¹⁰⁰.

Durch die Erkenntnis, dass Tumorzellen Tissue Factor tragende Mikropartikel bilden können, wurde in zahlreichen Studien untersucht, ob diese in Verbindung mit der Entstehung von venösen Thrombosen bei Tumorpatienten stehen. In retrospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Krebserkrankung im Vergleich zu Gesunden höhere Plasmaspiegel an TF+ MP haben. Dabei ging aus den Untersuchungen von Manly et al. hervor, dass bei Patienten, die an Pankreastumor erkrankt sind, die höchsten Spiegel an TF+ MP vorlagen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Krebserkrankung und vorliegender venöser Thrombose (bzw. ihrer Komplikationen) höhere TF+ MP Spiegel haben als Krebspatienten ohne venöse Thrombose bzw. ihrer Komplikationen⁸⁻¹⁴. Die prospektive Studie von Khorana et al., in die Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Pankreastumor eingeschlossen wurden, deutete ebenfalls auf die Assoziation von TF+ MP und venösen Thrombosen hin. Darüber hinaus gab sie Hinweise, dass erhöhte Plasmaspiegel von TF+ MP sogar einen prädiktiven Wert für das Auftreten von venösen Thrombosen bei Patienten mit Pankreastumor haben können¹⁰¹. Die kürzlich veröffentlichte, prospektive Studie von Woei et al., in die zwischen den Jahren 2000 und 2009 Patienten mit der Diagnose Adenokarzinom des Pankreas eingeschlossen wurden, zeigte, dass die Tissue Factor Aktivität von Mikropartikeln im Plasma von Patienten mit venöser Thrombose im Vergleich zu denjenigen ohne venöse Thrombose deutlich erhöht und darüber hinaus mit dem Ausmaß von thromboembolischen Ereignissen, Metastasierung und kürzerem Überleben korreliert war¹⁰².

Damit liegen mehrfach Hinweise vor, dass TF+ MP von Tumorzellen eine wesentliche Rolle im Entstehungsmechanismus von venösen Thrombosen einnehmen. Die stärkste Assoziation ist dabei für Pankreastumore zu finden^{5,7,73,103}.

III. ZIELSETZUNG

Zahlreiche Studien zeigen auf, dass Tumormikropartikel wesentlich an der Entstehung von venösen Thrombosen bei Tumorpatienten beteiligt sind. Deren genaue Rolle im Pathomechanismus ist jedoch nach wie vor unklar.

Die vorliegende Doktorarbeit soll vor allem durch die immunhistochemische Untersuchung der Thrombuskomposition dazu beitragen, den Pathomechanismus von Tumormikropartikel-assoziiierter venöser Thrombose weiter aufzuklären. Aktuell ist weitestgehend unklar, ob die Mechanismen der tumorassoziierten venösen Thrombose denen der Immunzell-vermittelten, nicht-tumorassoziierten venösen Thrombose gleichen. Pathomechanistische Unterschiede könnten zu neuen pharmakologischen Ansätzen führen, die zielgerichtet Tumorpatienten vor venösen Thrombosen schützen und im Vergleich zur aktuell üblichen Prophylaxe mit weniger nachteiligen Effekten einhergehen.

Die makroskopische und allem voran immunhistochemisch-mikroskopische Untersuchung der Thrombuskomposition erfolgt an Thromben, die unter Einwirkung von Mikropartikeln eines hochmalignen Adenokarzinoms des Pankreas im Stenose-induzierenden Mausmodell entstanden sind. Die Analyse von zellulären und molekularen Bestandteilen innerhalb des Thrombus soll zusätzlich um eine computerbasierte Methode zur quantitativen Bestimmung von Thrombozyten ergänzt werden. Mithilfe von Inhibierungs-, Knock-Out- und Zelldepletionsverfahren soll aufgedeckt werden, welchen Einfluss GPIIb/IIIa, Thrombozyten, P-Selektin, neutrophile Granulozyten, FXII, TF auf Mikropartikeln sowie myeloider TF auf die Thrombuskomposition haben. Schließlich soll diese in Zusammenschau mit Thrombusinzidenz und Thrombusgewicht Rückschlüsse auf den Pathomechanismus der Tumormikropartikel-assoziierten venösen Thrombose zulassen und mögliche Unterschiede zur Immunzell-vermittelten, nicht-tumorassoziierten venösen Thrombose aufzeigen.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Mausmodell zur Induktion venöser Thrombosen mittels Flussreduktion

Das von Brühl et al. etablierte Mausmodell zur Erforschung von Pathomechanismen venöser Thrombosen war auch Grundlage für die Versuche der vorliegenden Doktorarbeit^{53,84}. In diesem führt die Ligatur der Vena cava caudalis kaudal der Mündung der Vena renalis sinistra, abhängig von jeweiliger Standardisierung, zu einer Flussreduktion von 70-80%. Die Seitenäste bleiben dabei stets unangetastet. Tiere mit Anzeichen für eine Blutung werden ausgeschlossen. Als Folge von verlangsamter Blutströmung, Hypoxie und Endothelaktivierung entwickelt sich in etwa 60% Prozent der Tiere innerhalb von 48 Stunden ein venöser Thrombus. Das Milieu, in welchem ein Thrombus in diesem Mausmodell entsteht, ähnelt dem einer Venenklappe und vermag daher replizierbare Thromben zu generieren, welche in zeitlichem Verlauf und histologischem Aufbau dem Großteil spontan entstehender Thromben im humanen Organismus entsprechen⁵³.

Mikropartikel wurden der Maus 6 und 18 Stunden nach Ligatur in die Vena coccygea lateralis injiziert. 48 Stunden nach Ligatur wurde die Vena cava caudalis auf standardisierte Weise entnommen. Im direkten Anschluss erfolgten Gewichtsbestimmung und Einlage in ein longitudinal eröffnetes Stück Plastikschlauch. Dieses wurde mit Tissue Tek (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura, Alphen aan den Rijn, NL) bedeckt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Bearbeitung im Sinne der immunhistologischen Untersuchung wurden diese bei -80° C gefrierkonserviert.

2. Versuchstiere

Bis auf die weiter unten beschriebenen genetisch veränderten Tiere wurden alle Experimente an C57Bl/6 Wildtyp Mäusen bzw. den in ihnen entstandenen Thromben durchgeführt. Herkunft dieser Mäuse war Charles River Laboratories. Das Alter der verwendeten Versuchstiere lag zum Zeitpunkt der Experimente zwischen 10 und 14 Wochen. Sämtliche Mäuse wurden unter speziell pathogenfreien Bedingungen gehalten. Alle mit dieser Doktorarbeit verbundenen Tierversuche waren von der

Regierung von Oberbayern gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2531-144-08 und 55.2-1-54-2531-145-12).

IL4-R/Iba Mäuse konnten von Jerry Ware (Department of Physiology and Biophysics, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, AR, USA) bezogen werden und wurden wie von Kanaji et al. beschrieben generiert ¹⁰⁵. Bei diesen Tieren ist die extrazelluläre Domäne des thrombozytären GPIb α durch die α -Untereinheit des humanen IL-4-Rezeptors ausgetauscht. Auf diese Weise ist eine Interaktion mit vWF, dem Hauptliganden von GPIb α , verhindert ^{106,107}. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass GPIb α auch Bedeutung für die Bindung an P-Selektin auf aktiviertem Endothel, für die Interaktion mit neutrophilen Granulozyten via MAC-1, als auch für Interaktionen mit Thrombin und Kininogen hat ¹⁰⁸. Demnach sind in diesen Versuchstieren auch solche Bindungen und Interaktionen beeinträchtigt.

B6.129s7-Selp (tm1Bay)/J, kurz SELP^{-/-} Mäuse wurden ebenfalls von Charles River bezogen. Deren Generierung erfolgte wie von Mayadas et al. beschrieben ¹⁰⁹. Bei diesen Knock-Out Tieren fehlt der Adhäsionsrezeptor P-Selektin auf Thrombozyten und Endothelzellen.

Low-hTF und HCV Mäuse wurden von Nigel Mackman (Department of Medicine, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, USA) zur Verfügung gestellt und waren wie in den zitierten Veröffentlichungen generiert ^{110,111}. Low-hTF Mäuse exprimieren keinen murinen Tissue Factor, besitzen jedoch gerade so viel humanen Tissue Factor (etwa 1% an murinem Tissue Factor von Wildtyp Mäusen), um nicht an spontaner Blutung zu versterben. HCV Mäuse besitzen ebenfalls keinen murinen Tissue Factor, haben jedoch auf Grund der vollständigen genetischen Information für die Generierung von humanem Tissue Factor, bis auf fehlende kardiale Tissue Factor Expression, keinen Mangel an humanem Tissue Factor ¹¹².

Um LysM^{Cre+} bzw. Cre⁻ TF^{flox/flox} Mäuse zu generieren, wurden LysM^{Cre} Mäuse aus dem Jackson Laboratory mit TF^{flox/flox} Mäusen von Nigel Mackman auf zuvor beschriebene Art und Weise gekreuzt ^{111,113}. In diesen speziellen Knock-Out Mäusen kann mittels Cre

Rekombinase die Expression von Tissue Factor in myeloiden Zellen ermöglicht oder unterbunden werden ¹¹⁴.

3. Ursprung, Aufbereitung und Markierung der verwendeten Mikropartikel

Für die Erforschung der Thrombuskomposition bei Tumormikropartikel-assoziiertes venöser Thrombose wurden Mikropartikel der L3.6pl Zelllinie ausgewählt. Diese entstammt einem humanen, hochmalignen Adenokarzinom des Pankreas ¹¹⁵. Neben L3.6pl-MP wurden Mikropartikel aus Vollblut gesunder humaner Spender und Mikropartikel der murinen KPC Zelllinie eingesetzt. Bei KPC Mäusen handelt es sich um einen genetisch veränderten Mausstamm. In diesem entwickelt sich spontan ein Adenokarzinom des Pankreas, das in seinem genetischem Kompendium humanen Adenokarzinomen des Pankreas ähnelt ¹¹⁶.

Sämtliche Mikropartikel, die im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit zum Einsatz kamen, wurden in der Arbeitsgruppe von Professor Bernd Engelmann am Institut für Laboratoriumsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität wie folgt generiert:

Blut Mikropartikel stammten aus gespendetem Vollblut gesunder Menschen. Nach Entnahme wurde dieses mit Citrat antikoaguliert und hierauf für 15 min bei 160 x g ohne Bremse zentrifugiert. Das zellfreie Plasma wurde zwei weitere Male bei 855 x g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Um letztlich die Mikropartikel zu isolieren, wurde der zuvor gewonnene Überstand für 30 min bei 17740 x g ohne Bremse zentrifugiert. Das die Mikropartikel enthaltene Pellet wurde in PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels kolorimetrischer Methode (Bio Rad - colorimetric protein assay). Angepasst an das hieraus resultierende Ergebnis wurden die Mikropartikelsuspensionen zu Portionen à 150 µg Protein aufbereitet. Bei 8° C war eine Lagerung für ca. eine Woche möglich.

Um L3.6pl-MP und KPC-MP zu gewinnen, wurde der Überstand aus den jeweiligen Zelllinien je zwei Mal für 20 min bei 1430 x g zentrifugiert. Der auf diese Weise entstandene Überstand wurde für 30 min bei 17740 x g ohne Bremse zentrifugiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem der Blut Mikropartikel Gewinnung.

Um die Mikropartikel für die spätere immunhistologische Analyse sichtbar zu machen, wurden diese vor Injektion mit DCF (5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetat) markiert. Das initial farblose DCF vermag es, in Zellen bzw. Mikropartikel zu diffundieren. In Verbindung mit dort vorhandenen Esterasen kommt es zu einer Deacetylierung, woraufhin eine grüne Fluoreszenz bei einem Emissionsmaximum von etwa 530 nm entsteht¹¹⁷. Diese Markierung sah im Detail wie folgt aus: Lichtgeschützt und unter Raumtemperatur wurde das Pellet in PBS Suspension für 2 min mit 5 µl einer 4,48 mM DCF- Lösung inkubiert. Nach Waschung mit PBS erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation mit 17440 x g. Abschließend erfolgte die Resuspension in 200 µl sterilem NaCl.

4. Antikörper und Inhibitoren

Die im Folgenden aufgeführten Antikörper und Inhibitoren wurden in Versuchen mit C57/Bl6 Wildtyp Mäusen angewandt.

Die Depletion von neutrophilen Granulozyten erfolgte mittels Anti-Maus Ly-6G Antikörper (5 mg/kg KG; rat anti-mouse Ly-6G, clone 1A8, eBioscience), die von myeloiden Leukozyten mittels Anti-Maus Gr-1 Antikörper (5 mg/kg KG; rat anti-mouse IgG2b, clone RB6-8C5, eBioscience). Als Kontrolle hierfür dienten jeweils von der Ratte abstammende IgG 2b kappa Isotyp Antikörper (eBioscience).

Die Depletion von Thrombozyten wurde durch die intravenöse Gabe von Anti-Maus GPIIb/IIIa (Ratte Anti-Maus CD42b, 2 mg/kg KG, Emfret analytics) ermöglicht. Als Kontrolle dienten Ratten IgG Antikörper der gleichen Firma⁵³.

Der Erfolg der genannten Depletionen wurde im automatischen Blutzellzählgerät der Firma Sysmex im Citrat Blut bestätigt. Dabei stammte das Blut aus einer kardialen Punktion, die im Rahmen der operativen Entnahme der Vena cava caudalis 48h nach Ligatur erfolgte.

Faktor XII wurde mittels PCK (H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethylketone, Bachem AG, Bubendorf) inhibiert. Dieser wurde unmittelbar vor Induktion der Stenose sowie in Folge alle 24 Stunden in einer Dosierung von 10mg/kg KG intravenös verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten stattdessen jeweils 200 µl Kochsalz.

Durch einstündige Inkubation von L3.6pl-MP mit Anti-TF Antikörper (45 µg/150 µg Protein, Maus anti-human CD142, BD Pharmingen) konnte der Tissue Factor von

Mikropartikeln inhibiert werden. In der Kontrollgruppe wurden Maus IgG1, kappa Isotyp Antikörper (BD Pharmingen) verwendet.

5. Immunhistologie

5.1 Anfertigung von Gefrierschnittpräparaten

Für die immunhistologische Untersuchung des Thrombus wurden Gefrierschnitte von der Vena cava caudalis angefertigt. Die einzelnen Schritte unter Verwendung eines auf -25°C herunter gekühlten Kryostats (CM 1850, Leica, Nussloch) sahen wie folgt aus:

Nachdem die Vena cava caudalis der Gefrierkonservierung bei -80° C entnommen war, wurde das mit Tissue Tek ummantelte Gefäß mit zusätzlichem Tissue Tek auf einem speziellen Haltestempel fixiert. Je nach Achse der Gefäß-Fixierung konnten durch entsprechende Kryostat-Bedienung serielle Quer- oder Längsschnitte von 5 µm Dicke angefertigt werden. Im Anschluss wurden diese auf gekennzeichnete Objektträger mit spezieller Beschichtung (Superfrost Plus, Menzel, Braunschweig) übertragen und bis zur immunhistologischen Färbung bei -20° C lichtgeschützt gelagert. Für Querschnitte lag dabei eine Sortierung in kraniale, mittlere und kaudale Gefäßabschnitte vor.

5.2 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

Zur Aufklärung der Thrombuskomposition galt es, ausgewählte zelluläre und nicht-zelluläre Strukturen zusätzlich zur reinen Vergrößerung am Mikroskop erkennbar zu machen. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung angewandt. Bei diesem Verfahren bindet ein xenogener Antikörper an die gesuchte Zielstruktur. Nachdem durch ein Waschverfahren sämtliche nicht an der Zielstruktur gebundenen Antikörper entfernt werden, kommt ein zweiter Antikörper zum Einsatz. Neben der Eigenschaft durch entsprechende Xenogenität einzig an das Fc-Fragment des Primärantikörpers zu binden, ist an diesem Sekundärantikörper ein fluoreszierendes Molekül gebunden. Unter Verwendung eines Fluoreszenz Mikroskops leuchtet dieses bei geeigneter Wellenlänge auf und macht so die gesuchte Struktur indirekt sichtbar ^{118,119}.

Die Markierung im Sinne der indirekten Immunfluoreszenz wurde nach einem etablierten Protokoll durchgeführt ¹²⁰. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden

dargestellt. Allgemein wurde durch Verwendung spezieller Kammern darauf geachtet, dass die Schnittpräparate bestmöglich vor Lichteinstrahlung und Austrocknung geschützt sind.

Im ersten Schritt wurden die Schnittpräparate auf ihren Objektträgern mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako, Hamburg) mit ausreichendem Abstand umfahren. Auf diese Weise konnte garantiert werden, dass die folgenden Lösungen direkt am Präparat wirken und nicht unkontrolliert auf dem Objektträger verlaufen.

Nach einer 3-minütigen Fixierung bei Raumtemperatur mittels 4% Formalinlösung (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) folgten dreifache Waschvorgänge mit PBS (Invitrogen, Darmstadt) und 0,1% Tween (Tween 20, Sigma- Aldrich, Taufkirchen). Die bereits mit Tween begonnene Blockierung möglicher unspezifischer Bindungen wurde abhängig vom folgenden Primärantikörper um proteasefreie Albuminfraktion (Roth, Karlsruhe), Glycin (Roth, Karlsruhe) oder gegen Fc-Fragmente von Maus Antikörpern gerichtete anti-mouse CD16/32 Antikörper (affinity purified rat anti-mouse CD16/32, Clone 93, eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA) ergänzt (Tab. 2).

	CD45	Ly-6G	F4/80	CD41	Fibrinogen	CD54
Albuminfraktion	3%	3%	3%	-	1%	3%
Glycin	-	-	-	-	2%	-
anti-mouse CD16/32	1:100	1:100	1:100	1:100 ^a	-	-

Tabelle 2: Agenzien bzw. deren Kombination zur Blockierung unspezifischer Bindungen in Abhängigkeit vom folgenden Primärantikörper

Angaben in Prozent beziehen sich auf erzeugte Lösungen in PBS, ^a einzig in PBS gemischt

Nach einer Einwirkzeit von 30 min konnte die Blocklösung vorsichtig abgeklopft und der jeweilige Primärantikörper aufpipetiert werden (Tab. 3-8). Zusätzlich wurde eine entsprechende Isotypkontrolle mit unspezifischem Antikörper derselben Antikörperklasse sowie eine Negativkontrolle mit alleinigem PBS angelegt. Nach einer Einwirkdauer von einer Stunde wurde wie zuvor gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper aufgetragen (Tab. 3-8).

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antigen	CD45	
Spezies	Ratte	Esel anti-Ratte
Konzentration	0,5 mg/ml	2 mg/ml
Verdünnung	1:1000	1:200
Klon / Fluorochrom	30-F11	Alexa 594
Anbieter	eBioscience	Invitrogen

Tabelle 3: Markierung von CD 45

Glykoprotein, das ausgenommen von adulten Erythrozyten und Thrombozyten von allen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird ¹²¹

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antigen	Ly-6G	
Spezies	Ratte	Esel anti-Ratte
Konzentration	0,2 mg/ml	2 mg/ml
Verdünnung	1:500	1:200
Klon / Fluorochrom	1A8	Alexa 594
Anbieter	BD Pharmingen	Invitrogen

Tabelle 4: Markierung von Ly-6G bzw. GR-1

Ausschließlich von neutrophilen Granulozyten exprimiertes Glycosylphosphatidyl Inositol Protein (GPI-Protein) ¹²²

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antigen	F4/80 FITC ^a	
Spezies	Ratte	Ziege anti-Fluorescein ^a
Konzentration	0,5 mg/ml	1 mg/ml
Verdünnung	1:100	1:200
Klon / Fluorochrom	BM8	Alexa 488
Anbieter	eBioscience	Invitrogen

Tabelle 5: Markierung von F4/80

Extrazelluläres Membranmolekül auf adulten Makrophagen ¹²³; ^a Sekundärantikörper bindet hier nicht direkt an das Fc-Fragment des Primärantikörpers, sondern an ein hieran fixiertes fluoreszierendes Molekül, Fluoresceinisothiocyanat, Fluorescein (FITC)

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antigen	CD 41	
Spezies	Ratte	Esel anti-Ratte
Konzentration	0,2 mg/ml	2 mg/ml
Verdünnung	1:25	1:200
Klon / Fluorochrom	MWReg 30	Alexa 594
Anbieter	BD Pharmingen	Invitrogen

Tabelle 6: Markierung von CD 41 bzw. GPIIb

Von Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiertes transmembranes Glycoprotein ¹²⁴

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antigen	Fibrin(-ogen)	
Spezies	Hase	Esel anti-Hase
Konzentration	6 mg/ml	2 mg/ml
Verdünnung	1:300	1:200
Klon / Fluorochrom	A0080	Alexa 594
Anbieter	DAKO	Invitrogen

Tabelle 7: Markierung von Fibrin, Fibrinogen und Fibrinogen Fragment D und E ¹²⁵

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Antigen	CD 54	
Spezies	Ratte	Esel anti-Ratte
Konzentration	0,2 mg/ml	2 mg/ml
Verdünnung	1:100	1:200
Klon / Fluorochrom	YN1/1.7.4	Alexa 594
Anbieter	eBioscience	Invitrogen

Tabelle 8: Markierung von CD 54 bzw. ICAM-1

Von Endothelzellen, Monozyten, Lymphozyten und dendritischen Zellen exprimiertes transmembranes Glycoprotein ¹²⁶

Nach einstündiger Inkubationszeit wurde zur Darstellung der Zellkerne das blau fluoreszierende DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen,

Darmstadt) in einer Verdünnung von 1:3000 für 30 Sekunden hinzugefügt. Nach abschließendem Waschvorgang wurden die Schnittpräparate mit 1-2 Tropfen Eindeckmedium (Mounting Medium, DAKO, Hamburg) bedeckt, mit einem Deckglas versehen und bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung fern von Lichteinfluss aufbewahrt.

6. Fluoreszenzmikroskopie

Die durch indirekte Immunfluoreszenz markierten Schnittpräparate wurden an einem Fluoreszenzmikroskop der Marke Leica (Leica DMRB, Bensheim, Deutschland) mit unterschiedlichen optischen Vergrößerungen analysiert. Mithilfe einer hieran montierten Kamera (AxioCam, Firma Zeiss, Göttingen, Deutschland) konnten digitale Aufnahmen erzeugt und mittels Firmen zugehöriger Software auf einen verbundenen Computer übertragen werden.

7.1 Quantifizierung von Leukozyten innerhalb eines Thrombus

Um Leukozyten im Gesamten und neutrophile Granulozyten sowie Monozyten im Einzelnen innerhalb eines Thrombus quantitativ zu erfassen, wurden jeweils kraniale, mittlere und kaudale Abschnitte eines Thrombus immunhistologisch auf zuvor beschriebene Weise aufbereitet. In der hierauf folgenden fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurde der Thrombus in vier gleich große Bereiche unterteilt. Aus je einem dieser Bereiche wurde eine digitale Überlagerungsaufnahme bei 40-facher Vergrößerung erzeugt. Im Anschluss wurden alle für DAPI und CD45, Ly-6G oder F4/80 positiven Zellen in diesem Bereich ausgezählt. Nachdem der Mittelwert aus den 4 Bereichen erstellt wurde, erfolgte die Umrechnung auf Zellzahl pro mm².

7.2 Quantifizierung von Thrombozyten

Um den Thrombozyten Anteil innerhalb eines Thrombus quantitativ zu erfassen, wurden auch hier jeweils kraniale, mittlere und kaudale Abschnitte eines Thrombus immunhistologisch aufbereitet und entsprechend markiert. Mithilfe des Fluoreszenzmikroskops wurde jeweils eine digitale Übersichtsaufnahme der für CD41 fluoreszierenden Bereiche erstellt. Eine Auszählung wie zur Erfassung von einzelnen

abzugrenzenden Zellen war aufgrund der teils flächenhaften Verteilung von Thrombozyten nicht möglich. Als hierfür geeignet stellte sich das Computerprogramm für wissenschaftliche Bildanalyse „Cap Image“ dar ¹²⁷. Dieses Programm ermöglicht neben der Berechnung von frei definierten Flächen die Bestimmung von einzelnen schwarzen Pixeln innerhalb einer definierten Fläche. Zur Standardisierung der Quantifizierungsmethode wurden Berechnungen anhand des Yin und Yang Symbols vorgenommen (Abb. 11-13). Hier zeigte sich eine Messgenauigkeit von 99,2% was die Eignung des Verfahrens bestätigte.

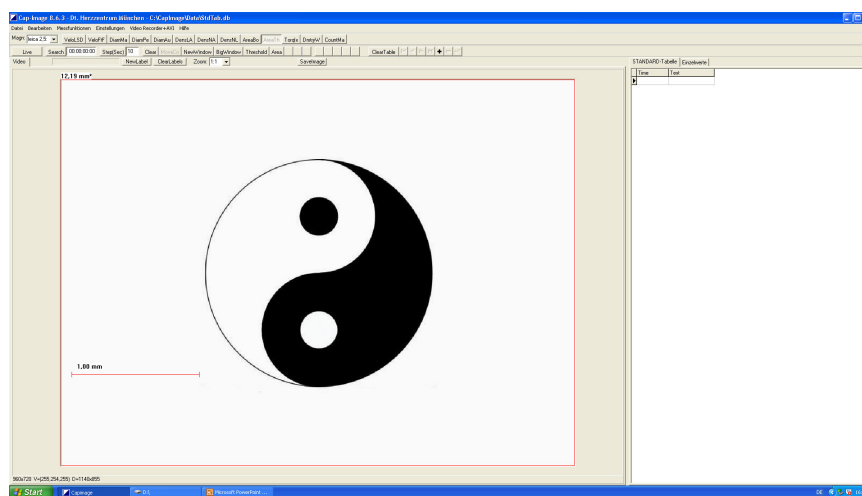


Abbildung 11: Screenshot Cap Image 8.6.3 - Bestimmung der rechteckigen Gesamtfläche
Gesamtfläche (rote Umrandung): 12,9mm²

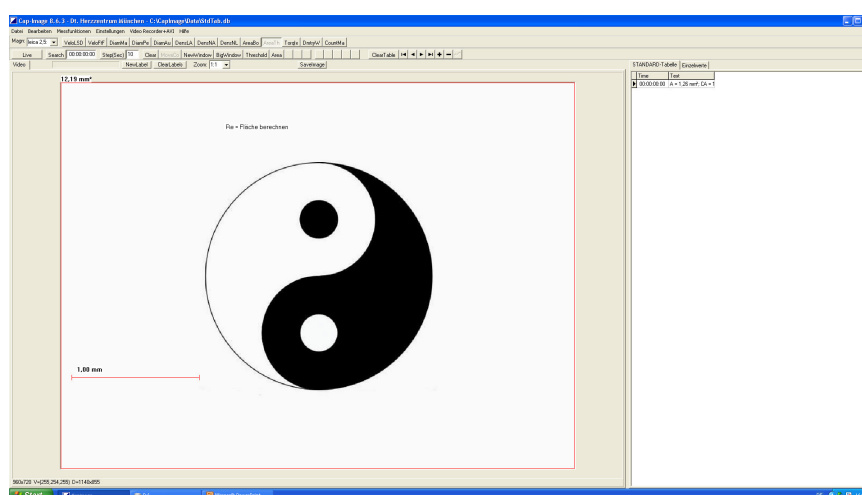


Abbildung 12: Screenshot Cap Image 8.6.3 - Bestimmung aller schwarzen Pixel innerhalb der Gesamtfläche
Ergebnis in Spalte an rechtem Rand: A= 1,26mm²

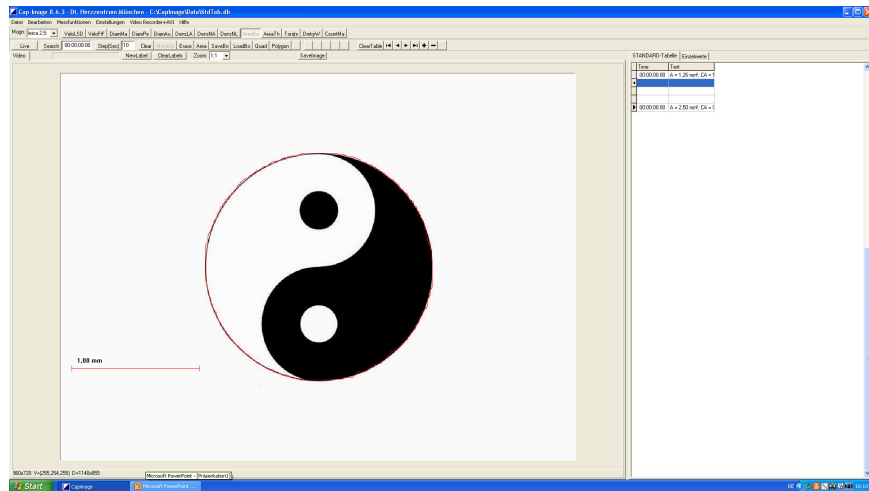


Abbildung 13: Screenshot Cap Image 8.6.3 - Bestimmung der umfahrenen runden Fläche (rote Linie)
Ergebnis in Spalte an rechtem Rand: $A = 2,5\text{mm}^2$

Für die aufgezeigte „Cap Image“ Berechnung wurde die CD41 positive Übersichtsaufnahme mittels „Image J“ Software in schwarz und weiß umgewandelt. Dabei stellte schwarz die für CD41 positiven Bereiche dar (Abb. 14-16).

Die Ergebnisse wurden in Prozent ermittelt, und ein Mittelwert aus kaudalem, mittlerem und kranialem Querschnitt wurde errechnet.

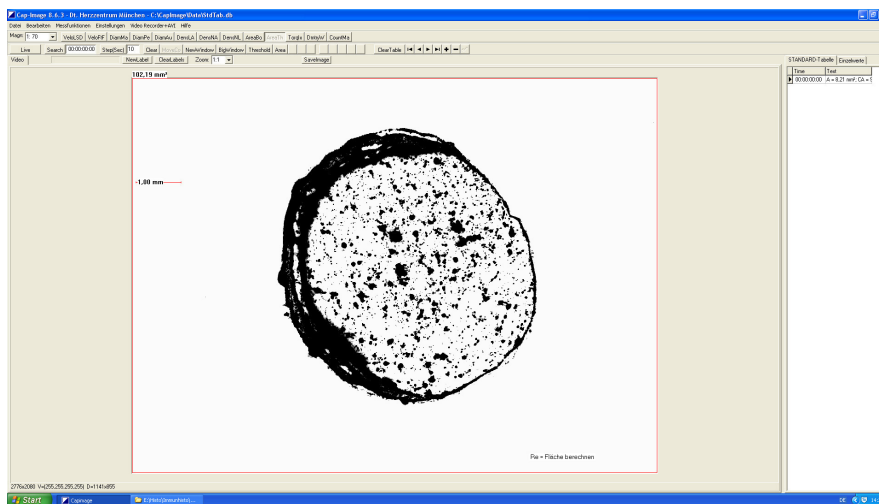


Abbildung 14: Screenshot Cap Image 8.6.3 - Bestimmung der rechteckigen Gesamtfläche
Gesamtfläche (rote Umrandung): $102,19\text{mm}^2$

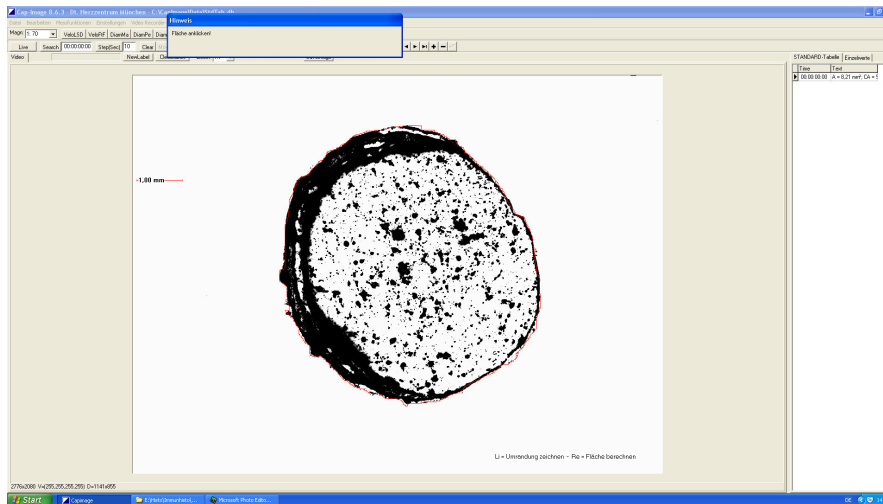


Abbildung 15: Screenshot Cap Image 8.6.3 - Bestimmung von CD41 positiven Bereichen innerhalb der Gesamtfläche

Ergebnis in Spalte an rechtem Rand: $A = 8,21\text{mm}^2$

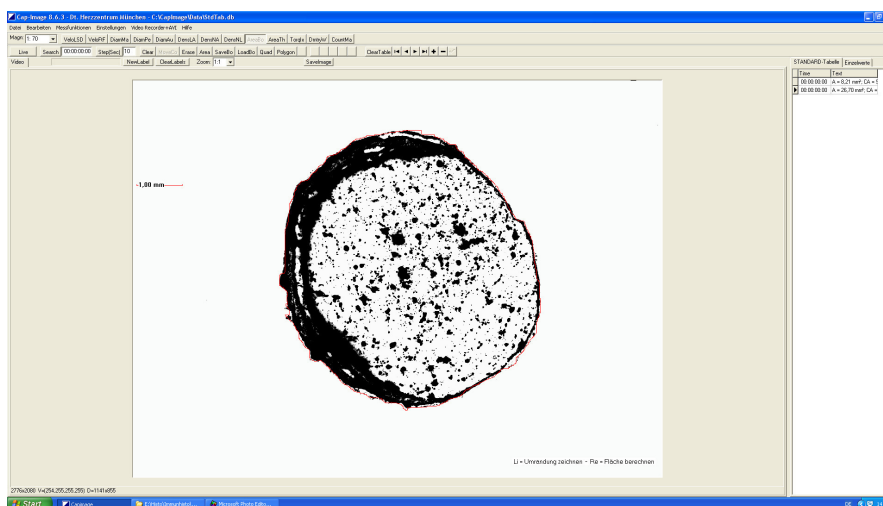


Abbildung 16: Screenshot Cap Image 8.6.3 - Bestimmung der gesamten Fläche des Thrombusquerschnitts (rote Linie)

Ergebnis in Spalte an rechtem Rand: $A = 26,7\text{mm}^2$

8. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde überwiegend das Programm SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc, Chicago, USA) angewandt. Mittels t-Test bzw. Mann-Whitney Rangsummentest wurden jeweils zwei Gruppen auf einen Unterschied miteinander verglichen. Voraussetzung für die Anwendung des t-Tests mit einseitiger Testvariante war eine Normalverteilung nach Shapiro Wilk sowie eine entsprechende Varianzhomogenität. Sofern eines dieser Kriterien nicht erfüllt werden konnte, kam

der Mann-Whitney Rangsummentest zur Anwendung. Mehrere Gruppen wurden mit One Way Anova und Fisher-LSD posthoc Test verglichen.

V. ERGEBNISSE

1. Tumoröse L3.6pl-MP führen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer makroskopisch und mikroskopisch veränderten Thrombuskomposition

In der Untersuchung von Thromben, welche sich 48 Stunden nach Beginn der Flussreduktion und zweizeitiger Schwanzveneninjektion von L3.6pl-MP in C57Bl/6 Mäusen bildeten, ließ sich bereits makroskopisch ein Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (Injektion von humanen und murinen Blut Mikropartikeln) erkennen (Abb. 17). Zum einen waren die Thromben sichtbar größer, zum anderen war keine klare Schichtung in rote und weiße Areale wie in Thromben der Kontrollgruppe mehr zu erkennen. Vielmehr stellte sich eine überwiegend rote Struktur dar.

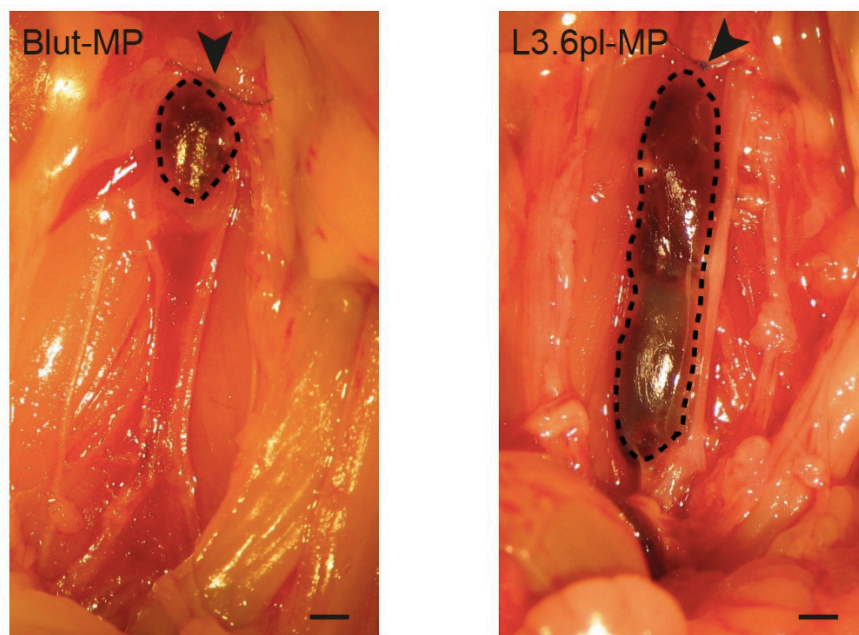


Abbildung 17: Makroskopische Ansicht venöser Thromben in Situ 48h nach Ligatur der Vena cava caudalis unter Einfluss von Blut-MP bzw. L3.6pl-MP
schwarze Pfeile zeigen auf die Ligatur; gestrichelte Linien markieren den jeweiligen Thrombus im Gefäß;
Querbalken: 1 mm

Der makroskopische Unterschied in der Größe der Thromben ging mit den Ergebnissen aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe einher, in denen Mäuse der L3.6pl-MP

Gruppe im Vergleich zur genannten Kontrollgruppe nicht nur eine signifikant höhere Thrombusinzidenz, sondern auch ein signifikant höheres Thrombusgewicht zeigten¹⁰⁴. Der Unterschied im Aufbau der Thromben verdeutlichte sich in der detaillierten mikroskopischen Untersuchung nach immunhistologischer Aufbereitung. So stellte sich in der L3.6pl-MP Gruppe im Vergleich zur Blut-MP Gruppe nicht nur eine signifikant reduzierte Menge an Thrombozyten und Leukozyten bzw. neutrophilen Granulozyten und Monozyten dar (Abb. 18 a,b), sondern auch deren Lokalisation im Thrombus war eine gänzlich andere (Abb. 19).

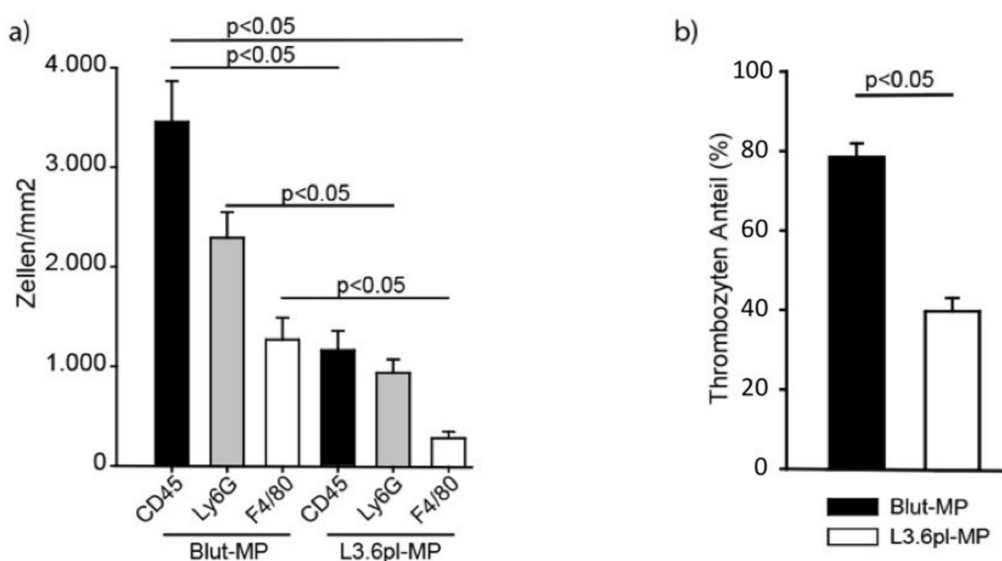


Abbildung 18: Quantitative Auswertung von Leukozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten innerhalb von Blut-MP und L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben

a) Leukozyten (CD45), Monozyten (F4/80) und neutrophile Granulozyten (Ly-6G) pro mm²; b) Thrombozyten Anteil innerhalb der Thromben in Prozent; n= jeweils 5

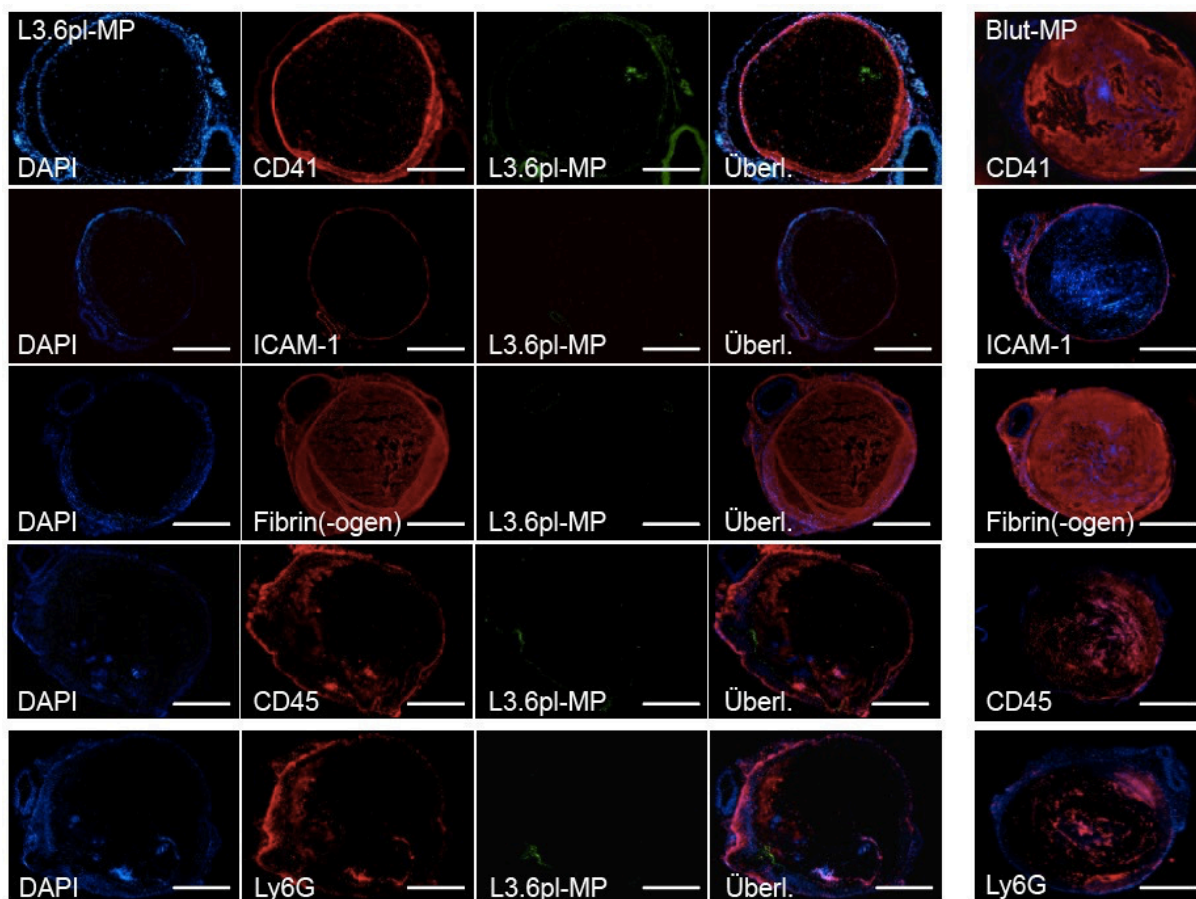


Abbildung 19: Immunhistologische Visualisierung der Thrombuskomposition von L3.6pl-MP und Blut-MP assoziiertem venösen Thrombus

blau: DAPI \equiv Zellkern; rot: CD41 \equiv Thrombozyten, ICAM-1 \equiv Endothel, Fibrin(-ogen) \equiv Fibrin(-ogen), CD45 \equiv Leukozyten, Ly6G \equiv neutrophile Granulozyten; grün: L3.6pl-MP; Überlagerung; n= 3-5; Querbalken: 200 μ m

Wohingegen die Thrombozyten in der Blut-MP Gruppe variabel und ohne klare Anordnung im Thrombus verteilt waren, fanden sich diese in der L3.6.pl-MP Gruppe vor allem als schmale Schicht nahe am Endothel. Diese divergente Anordnung in endothelnahe und luminale Zone war in ähnlicher Art und Weise auch in der Verteilung der Leukozyten zu erkennen. Besonders deutlich wurde diese Aufteilung in der immunhistologischen Färbung auf Fibrin(-ogen). So fand sich in der L3.6.pl-MP Gruppe eine auffällig dichte Fibrin(-ogen) Schicht nahe am Endothel. Luminal erschien diese eher lose und war von der endothelnahe Schicht deutlich abgrenzbar. Interessanterweise ließen sich genau am Übergang der beiden Schichten L3.6pl-MP nachweisen (Abb. 20).

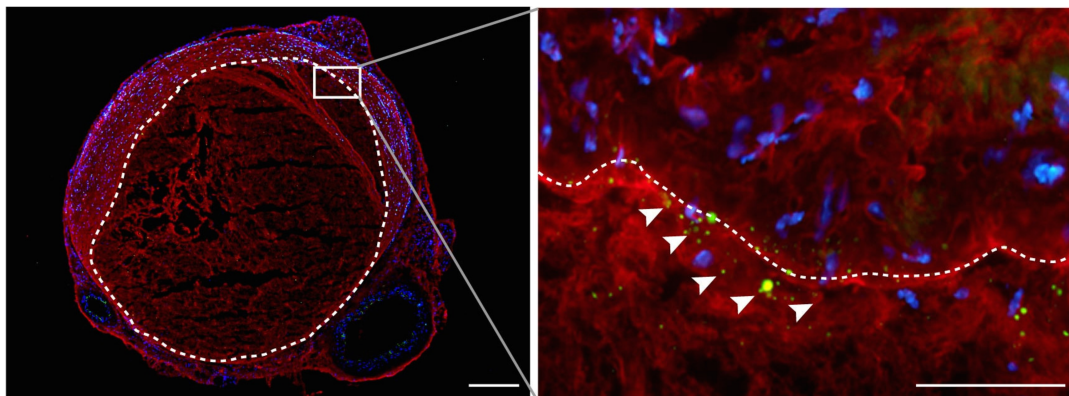


Abbildung 20: Mikropartikel am Übergang von dichter zu loser Fibrin(-ogen) Struktur

Überlagerte Darstellung von Fibrin(-ogen) (rot), DAPI (\cong Zellkern, blau) und L3.6pl-MP (grün) in Übersicht und Ausschnittvergrößerung nach immunhistologischer Färbung eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus; gestrichelte Linie markiert den Übergang von dichter zu loser Fibrin(-ogen) Struktur, weiße Pfeile weisen auf die Mikropartikel an dessen Übergang hin; n = 4; Querbalken: 100 μ m

In der Blut-MP Gruppe fand sich eine derartige Fibrin(-ogen) Verteilung bzw. Struktur dagegen nicht. Fibrin(-ogen) lag hier ubiquitär in teils dichteren, teils lockereren Strukturen vor. Die lockere Struktur war dabei vor allem in leukozytenreichen Regionen zu beobachten.

Die beschriebenen Unterschiede in der Fibrin(-ogen) Verteilung waren nicht nur in den Querschnitten zu erkennen, sondern auch im immunhistologisch markierten Längsschnitt (Abb. 21 und 22).

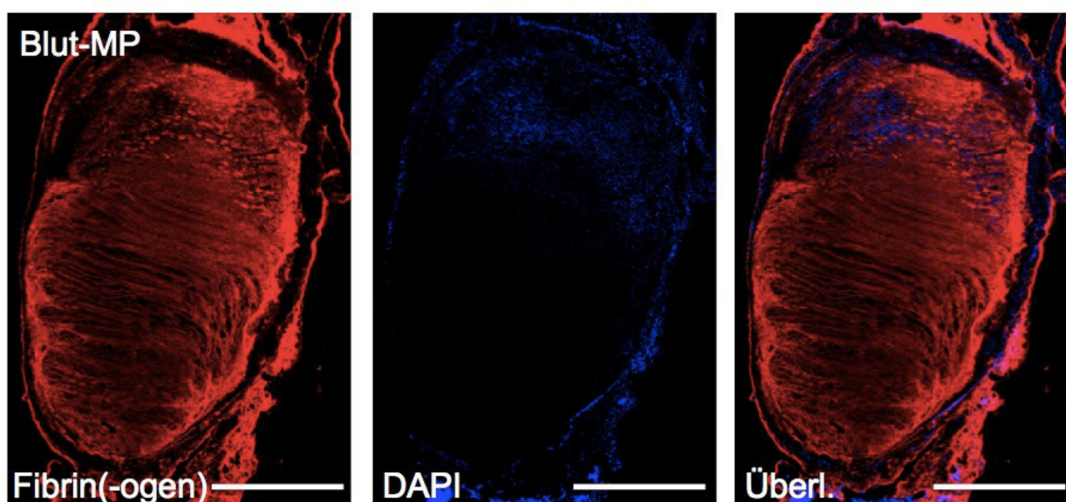


Abbildung 21: Immunhistologische Visualisierung eines venösen Thrombus unter Einfluss von Blut-MP im Längsschnitt

rot: Fibrin(-ogen) \cong Fibrin(-ogen); blau: DAPI \cong Zellkern; Überlagerung; n = 3; Querbalken: 1 mm

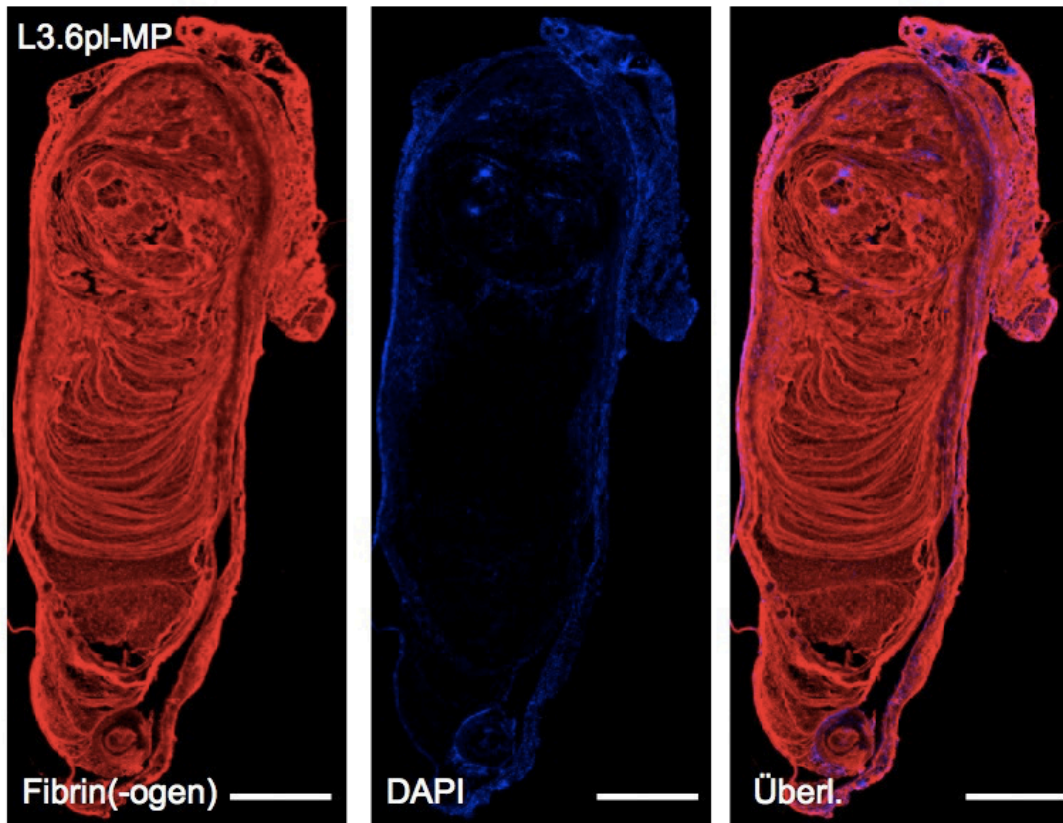


Abbildung 22: Immunhistologische Visualisierung eines L3.6pl-MP induzierten venösen Thrombus im Längsschnitt

rot: Fibrin(-ogen) \cong Fibrin(-ogen); blau: DAPI \cong Zellkern; Überlagerung; n = 3; Querbalken: 1 mm

Um Interaktionen zwischen L3.6pl-MP und zellulären Strukturen zu erkennen, wurde mittels weiterer optischer Vergrößerungen gezielt nach solchen gesucht. Dabei zeigten sich direkte Kontakte zwischen MP und Endothelzellen. Zwischen MP und myeloiden Leukozyten oder Thrombozyten waren dagegen immunhistologisch keine Kontakte zu erkennen (Abb. 23).

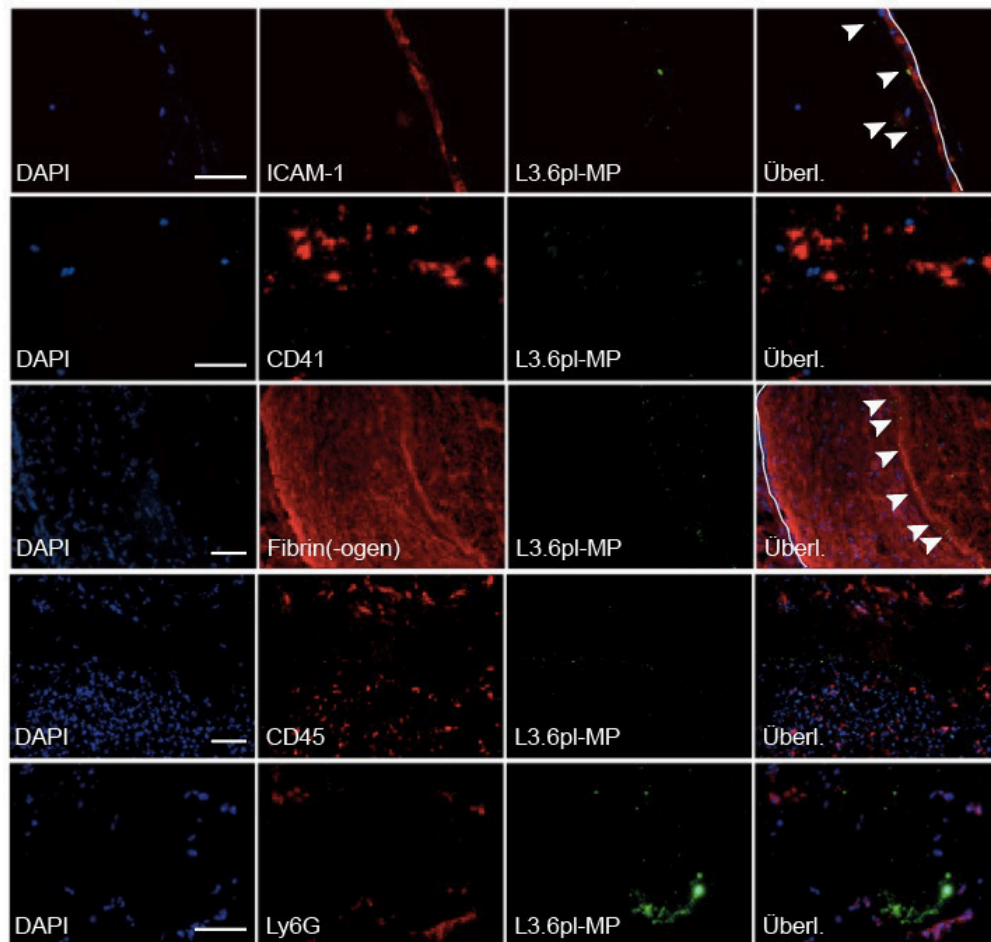


Abbildung 23: Immunhistologische Färbung eines L3.6pl-MP induzierten venösen Thrombus zur Beurteilung der Interaktion von Mikropartikeln mit Endothelzellen, myeloiden Zellen und Thrombozyten

gestrichelte Linie verdeutlicht das Endothel, weiße Pfeile weisen auf Mikropartikel am Übergang von dichter zu loser Fibrin(-ogen) Struktur; blau: DAPI \equiv Zellkern; rot: CD41 \equiv Thrombozyten, ICAM-1 \equiv Endothel, Fibrin(-ogen) \equiv Fibrin(-ogen), CD45 \equiv Leukozyten, Ly6G \equiv neutrophile Granulozyten; grün: L3.6pl-MP; Überlagerung; n = 3-5, Querbalken: 50 μ m

2. Die xenogene Abstammung der L3.6pl-MP führt zu keiner Verzerrung der Ergebnisse

Um zu erkennen, ob die humane Abstammung der L3.6pl-MP für die deutlich abweichende Thrombuskomposition verantwortlich sein könnte, wurde die Auswirkung von Mikropartikeln untersucht, die der murinen Pankreastumor Zelllinie KPC abstammen. In 8 Mäusen je Gruppe konnte im Vergleich zu humanen L3.6.pl-MP kein signifikanter Unterschied hinsichtlich Thrombusinzidenz und -gewicht gemessen werden. Die histologische Struktur von Thromben, die unter Einwirkung von murinen KPC Mikropartikeln entstanden sind, wurde in 4 Tieren untersucht und entsprach

jener, die nach L3.6pl-MP Gabe zu beobachten war (Abb. 24). In ebenfalls 4 Tieren je Gruppe erfolgte die Bestimmung von Leukozytenmengen. Auch hier lag kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor (Abb. 25).

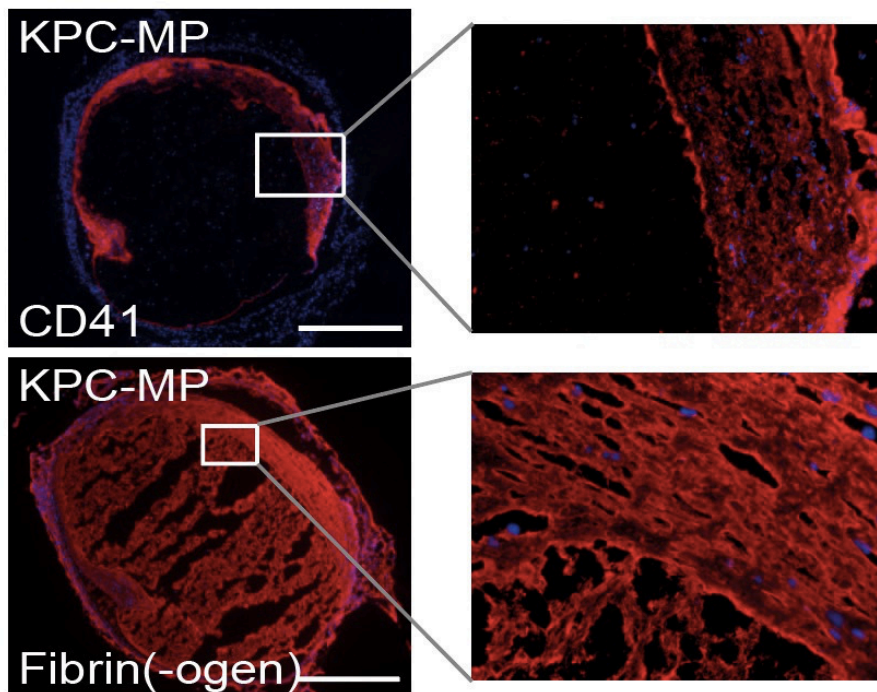


Abbildung 24: Immunhistologische Visualisierung eines KPC-MP assoziierten venösen Thrombus in überlagerter Übersicht und Ausschnittvergrößerung

rot: CD41 \cong Thrombozyten, Fibrin(-ogen) \cong Fibrin(-ogen); blau: DAPI \cong Zellkern; n = 4; Querbalken: 200 μ m

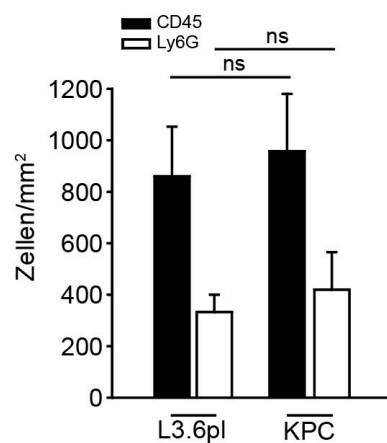


Abbildung 25: Quantitative Auswertung von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten innerhalb von L3.6pl-MP und KPC-MP assoziierten venösen Thromben

Leukozyten (CD45) und neutrophile Granulozyten (Ly-6G) pro mm²; n = 4

3. Die Rolle bekannter zellulärer und molekularer Faktoren in der abweichenden Thrombuskomposition unter Einfluss von L3.6pl-MP

Die aufgezeigten Unterschiede in der Thrombuskomposition ließen vermuten, dass der Thrombusentstehung unter Einfluss von tumorösen L3.6pl-MP ein Pathomechanismus zugrunde liegt, der von der nicht-tumorassoziierten venösen Thrombose abweicht. Um differierende Mechanismen zu erkennen, wurden in den folgenden Versuchsreihen bekannte zelluläre und molekulare Faktoren der nicht-tumorassoziierten venösen Thrombose auf ihre Bedeutung bei der Thrombusentstehung unter L3.6pl-MP Einfluss untersucht. Dabei war aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe bekannt, dass die Depletion von neutrophilen Granulozyten, die Depletion von Thrombozyten, das Fehlen von GPIIb/IIIa, P-Selektin, FXII oder myeloidem TF im Vergleich zu entsprechenden Kontrollgruppen keinen signifikanten Einfluss auf Thrombusinzidenz und -gewicht hatte¹⁰⁴. Signifikanten Einfluss hierauf hatte einzig die Inhibition von TF auf L3.6pl-MP¹⁰⁴.

3.1 GPIIb/IIIa und Thrombozyten

Die immunhistologische Untersuchung der Thromben von GPIIb/IIIa Mäusen ließ erkennen, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger Thrombozyten am Endothel adhären waren, sich aber luminal mehr Thrombozyten fanden (Abb. 26). Die Gesamtmenge an Thrombozyten war im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert. Diese Beobachtung drückte sich auch in der quantitativen Analyse aus (Abb. 27a). Die Gesamtmenge an Leukozyten war hiervon ebenfalls nicht beeinflusst, die Menge an neutrophilen Granulozyten war dagegen signifikant erniedrigt (Abb. 27b). Unbeeinflusst vom Defekt im GPIIb/IIIa Rezeptor blieben die markanten zwei Schichten in der Fibrin(-ogen) Färbung (Abb. 26).

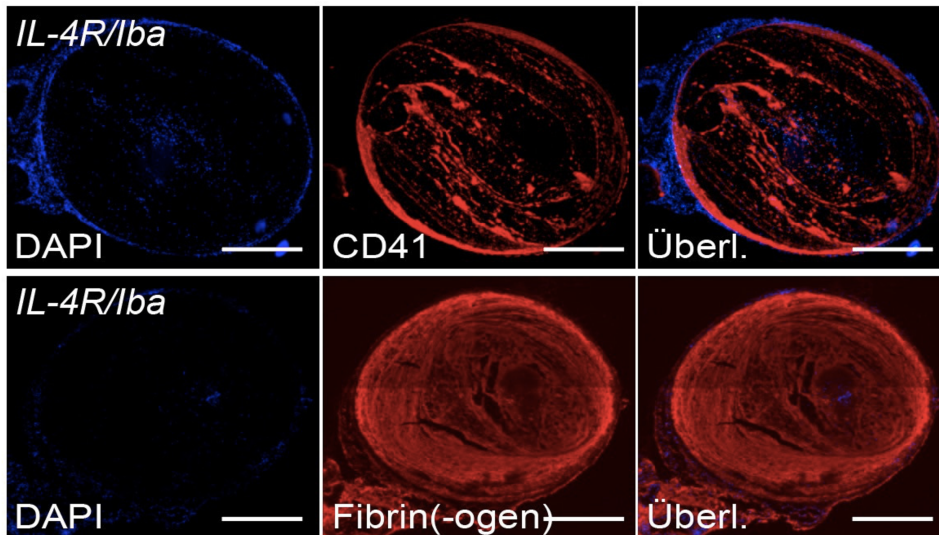


Abbildung 26: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in GPIb/IL-4R Mäusen

rot: CD41 \cong Thrombozyten, Fibrin(-ogen) \cong Fibrin(-ogen); blau: DAPI \cong DNA; Überlagerung; n = 4; Querbalken: 200 μ m

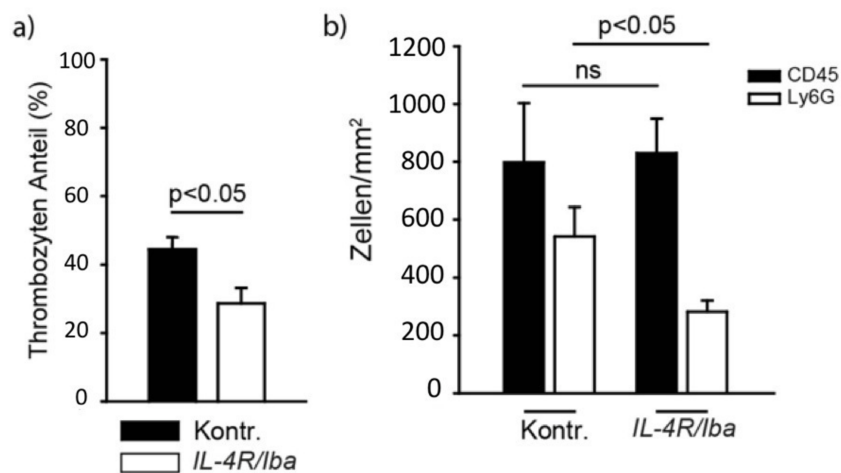


Abbildung 27: Quantitative Auswertung von Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in Kontroll- und GPIb/IL-4R Gruppe

a) Thrombozyten Anteil innerhalb der Thromben in Prozent; b) Leukozyten (CD45) und neutrophile Granulozyten (Ly-6G) pro mm²; n = 4

In der Untersuchung der Thrombuskomposition von Thrombozyten depletierten Tieren waren deutlichere Veränderungen erkennbar. Zum einen bestanden die markanten zwei Schichten in der Fibrin(-ogen) Färbung nicht mehr fort (Abb. 28). Zum anderen war im Vergleich zur Isotyp Kontrollgruppe nicht nur die Akkumulation von

neutrophilen Granulozyten, sondern auch die von Leukozyten im Gesamten signifikant reduziert (Abb. 29).

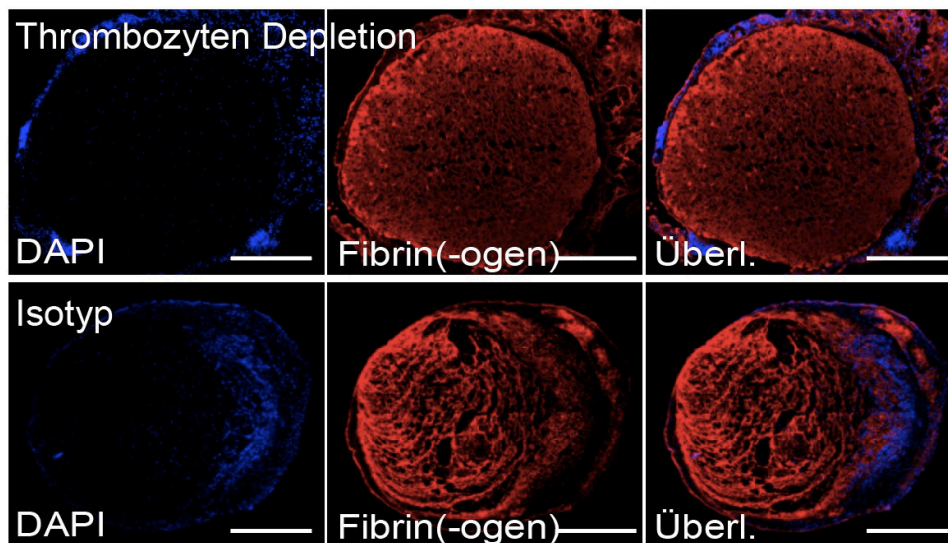


Abbildung 28: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in Thrombozyten depletierten Mäusen und Isotyp Kontrolle

blau: DAPI \cong Zellkern, rot: Fibrin(-ogen) \cong Fibrin(-ogen); Überlagerung; n = 4; Querbalken: 200 μ m

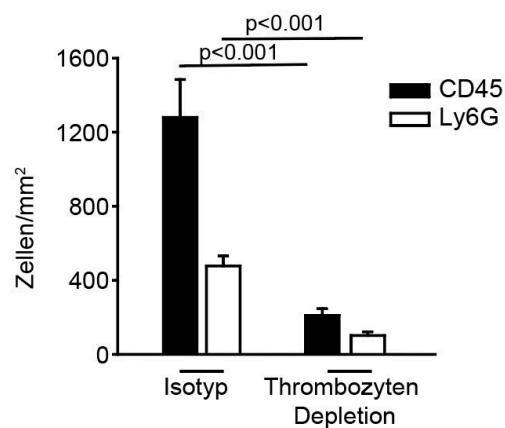


Abbildung 29: Quantitative Auswertung von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in Kontroll- und Thrombozyten depletierter Gruppe
Leukozyten (CD45) und neutrophile Granulozyten (Ly-6G) pro mm^2 ; n = 4

3.2. P-Selektin

Um die Rolle von P-Selektin auf die Thrombuskomposition unter L3.6pl-MP Einfluss zu untersuchen, wurden SELP^{-/-} Mäuse verwendet. Dabei zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe, dass durch das Fehlen von P-Selektin die Akkumulation von myeloiden

Leukozyten am Endothel verringert war. Auch die markanten zwei Schichten in der Fibrin(-ogen) Struktur waren nur noch in abgeschwächter Ausprägung zu erkennen (Abb. 30). Auf die Gesamtmenge an rekrutierten Leukozyten und neutrophilen Granulozyten hatte die Abwesenheit von P-Selektin jedoch keine Auswirkungen (Abb. 31a). Auch die Verteilung und die Gesamtmenge an Thrombozyten blieben im Vergleich zu den Kontrolltieren weitestgehend unbeeinflusst (Abb. 30, 31b).

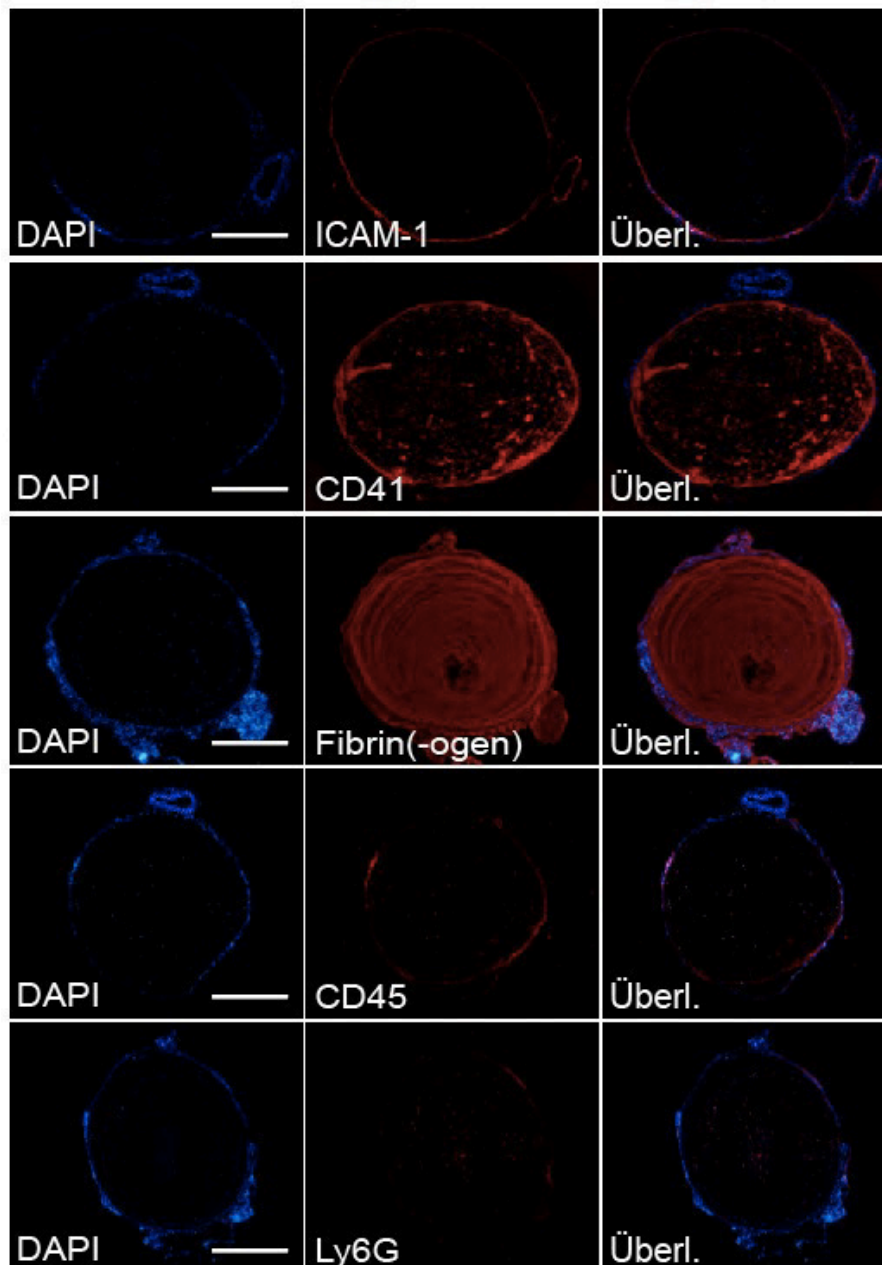


Abbildung 30: Immunhistologische visualisierte Übersicht und Ausschnittvergrößerung von L3.6pl-MP assoziiertem venösen Thrombus in SELP^{-/-} Mäusen

blau: DAPI \equiv Zellkern; rot: ICAM-1 \equiv Endothel, CD41 \equiv Thrombozyten, Fibrin(-ogen) \equiv Fibrin(-ogen), CD45 \equiv Leukozyten, Ly6G \equiv neutrophile Granulozyten; grün: L3.6pl-MP; Überlagerung; n = 4; Querbalken: 200 μ m

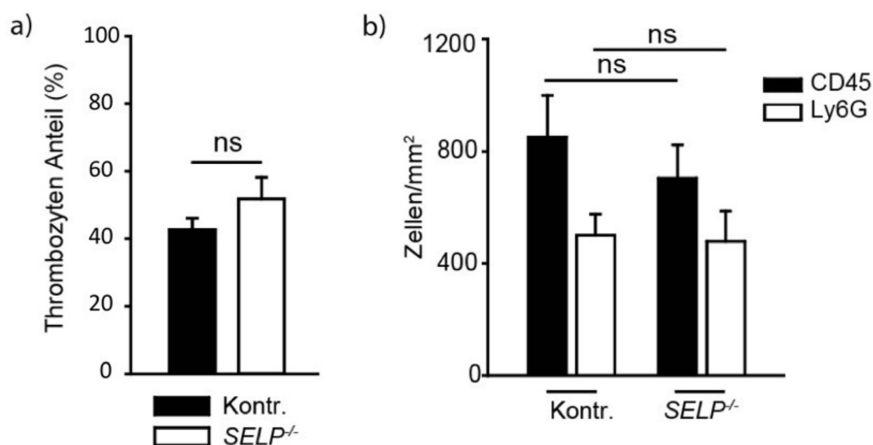


Abbildung 31: Quantitative Auswertung von Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in Kontroll- und SELP^{-/-} Gruppe

a) Thrombozyten Anteil innerhalb der Thromben in Prozent; b) Leukozyten (CD45) und neutrophile Granulozyten (Ly-6G) pro mm²; n = 4

3.3 Neutrophile Granulozyten

Die Thromben von Tieren, deren neutrophile Granulozyten vor Versuchsbeginn depletiert wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant weniger Leukozyten. Die Menge an Thrombozyten war hiervon nicht signifikant beeinflusst (Abb. 32 a,b). In der qualitativen Analyse der Thrombuskomposition waren im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten kaum Auswirkungen zu erkennen. Einzig die Fibrin(-ogen) Struktur luminal imponierte etwas dichter. Die zweischichtige von luminal zu endothelnah deutlich abgrenzbare Fibrin(-ogen) Struktur blieb hiervon unbeeinträchtigt. Auf die Verteilung der Thrombozyten im Thrombus hatte die Depletion der neutrophilen Granulozyten keinen wesentlichen Einfluss (Abb. 33,34).

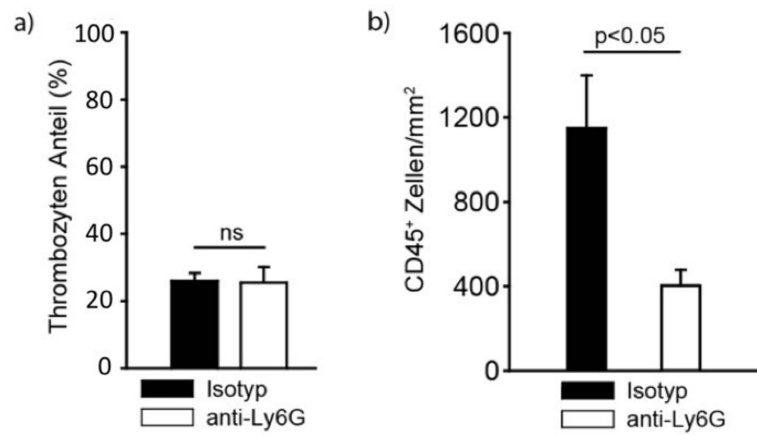


Abbildung 32: Quantitative Auswertung von Thrombozyten und Leukozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in Kontroll- und neutrophilen Granulozyten depletierter Gruppe
 a) Thrombozyten Anteil innerhalb der Thromben in Prozent; b) Leukozyten (CD45) pro mm²; n = 4

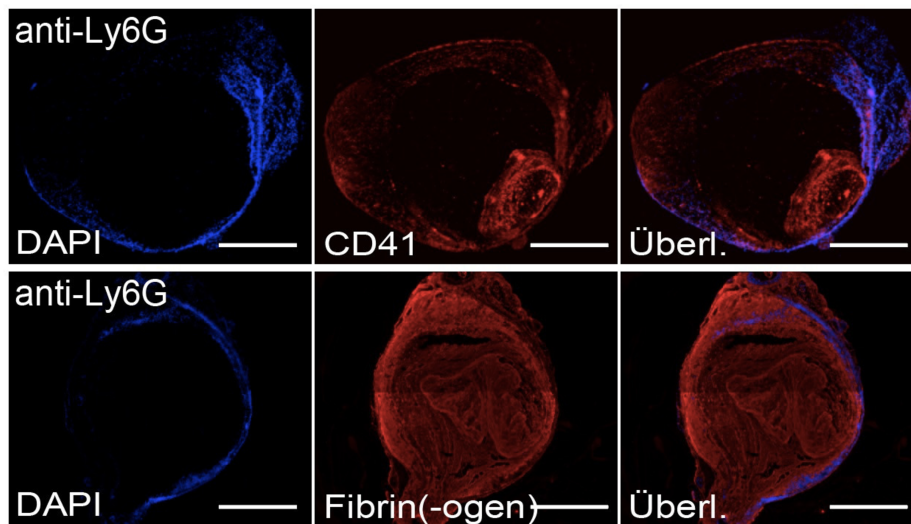


Abbildung 33: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in mit anti-Ly6G Antikörpern behandelten Mäusen
 blau: DAPI \cong Zellkern, rot: CD41 \cong Thrombozyten, Fibrin(-ogen) \cong Fibrin(-ogen); Überlagerung;
 Querbalken: 200 μ m

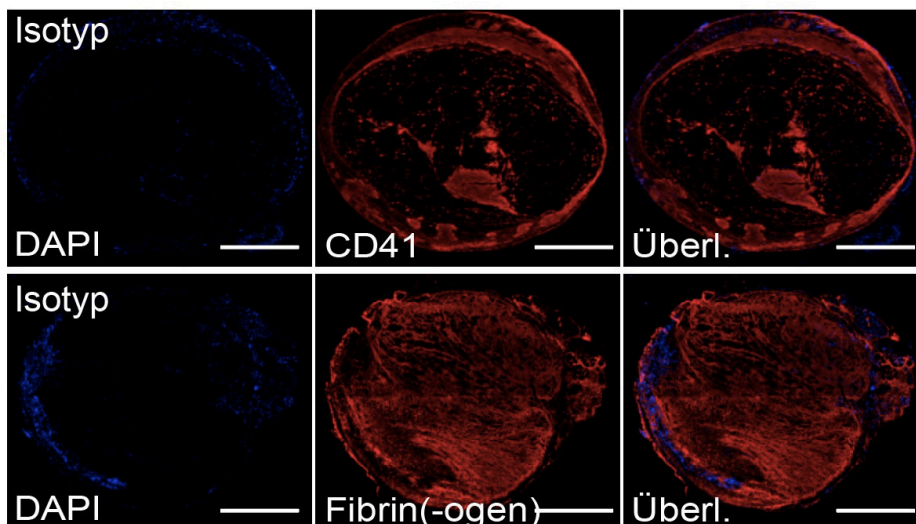


Abbildung 34: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in mit Isotyp Antikörpern behandelten Mäusen

blau: DAPI \cong Zellkern, rot: CD41 \cong Thrombozyten, Fibrin(-ogen) \cong Fibrin(-ogen); Überlagerung; n = 4; Querbalken: 200 μ m

Als Ergänzung zu dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob neben der Exklusion von neutrophilen Granulozyten das zusätzliche Fehlen von Monozyten Einfluss auf die Entstehung von venösen Thrombosen unter Einwirkung von L3.6pl-MP hat. Mittels anti-Gr-1 Antikörpern erfolgte in der Versuchsgruppe mit 6 Mäusen die Depletion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten. In der Kontrollgruppe gleicher Größe wurden Isotyp Antikörper angewandt. In beiden Gruppen entwickelten alle Tiere venöse Thromben. Auch bei der Bestimmung des Thrombusgewichts lag bei einem p-Wert von kleiner 0,05 kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor.

3.4 FXII

Um die Bedeutung von Faktor XII für die Thrombuskomposition unter Einfluss von L3.6pl-MP zu untersuchen, wurde Mäusen nach der Verabreichung von L3.6pl-MP der FXII-Inhibitor PCK injiziert. Dieser Ausschluss von FXII von der Thrombogenese hatte sichtliche Veränderungen im Fibrin(-ogen) Netzwerk zur Folge. Dabei wirkte die endothelnahe Fibrin(-ogen) Struktur nicht nur abgeschwächt, sondern auch die flächige Vernetzung schien in Teilen nicht mehr aufrecht gehalten werden zu können. Die flächige Struktur der Thrombozyten war nahe am Endothel ebenfalls nicht mehr zu beobachten, sondern zeigte sich mehrfach unterteilt (Abb. 35). In der quantitativen

Analyse zeigte sich die Menge an neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert. Die Gesamtmenge an Leukozyten war dagegen nicht signifikant verändert (Abb. 36 a,b).

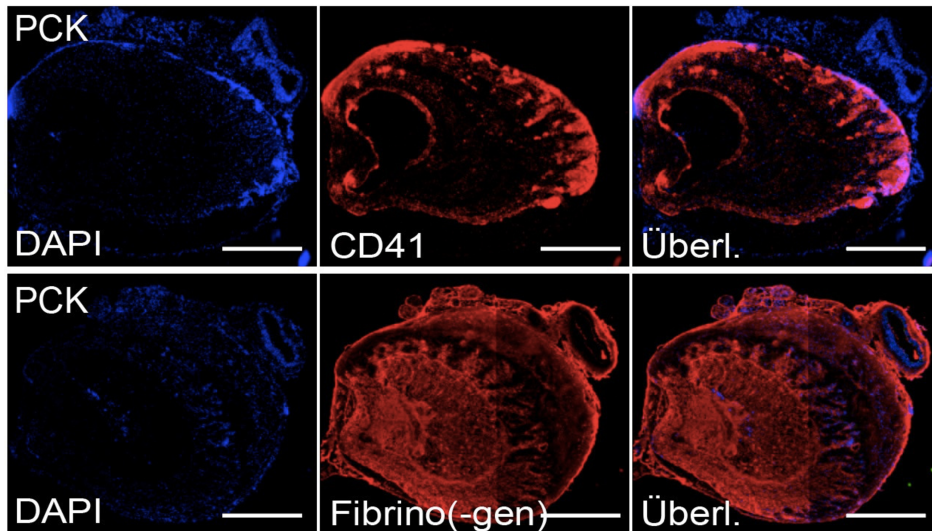


Abbildung 35: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in mit Faktor XII Inhibitor PCK behandelten Mäusen

blau: DAPI \cong Zellkern, rot: CD41 \cong Thrombozyten, Fibrin(-ogen) \cong Fibrin(-ogen); Überlagerung; n = 4; Querbalken: 200 μ m

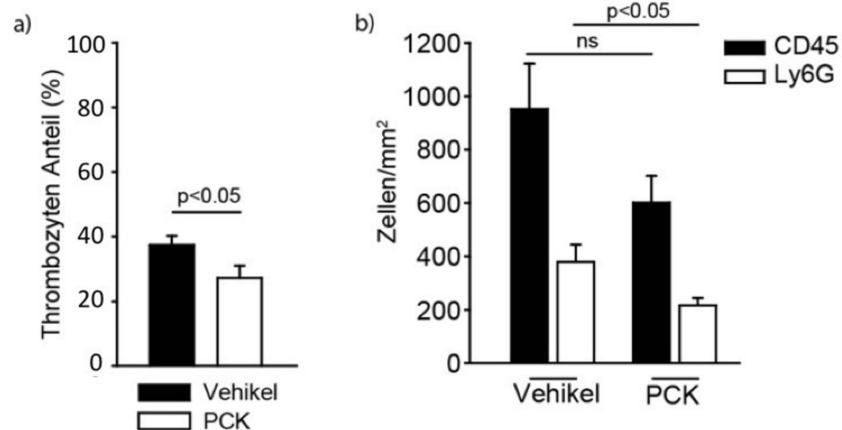


Abbildung 36: Quantitative Auswertung von Thrombozyten, Leukozyten und neutrophilen Granulozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in Kontroll- und PCK Gruppe

a) Thrombozyten Anteil innerhalb der Thromben in Prozent; b) Leukozyten (CD45) und neutrophile Granulozyten (Ly-6G) pro mm²; n = 4

3.5 Tissue Factor auf L3.6pl- Mikropartikel

Welche Rolle dem Tissue Factor auf L3.6pl-MP in der abweichenden Thrombuskomposition zukommt, konnte untersucht werden, indem L3.6pl-MP vor der

Schwanzvenen-Injektion mit Anti-TF Antikörpern preinkubiert wurden. In der Kontrollgruppe erfolgte die Preinkubation mit Isotyp Antikörpern.

Als Folge der Inhibition von TF auf L3.6pl-MP stellte sich nicht nur ein makroskopisch sichtlich kleinerer Thrombus, sondern auch eine deutlich veränderte Thrombuskomposition dar. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war zum einen die zweischichtige Fibrin(-ogen) Struktur nicht mehr erkennbar (Abb. 37). Zum anderen war auch die Menge an myeloiden Leukozyten signifikant erhöht. Die Menge an Thrombozyten war ebenfalls erhöht, diese jedoch nicht in statistisch signifikantem Maße (Abb. 38). Letztlich entsprach die Thrombuskomposition der Versuchstiere nahezu jenen Mäusen, die Blut-Mikropartikel oder keine Mikropartikel erhielten.

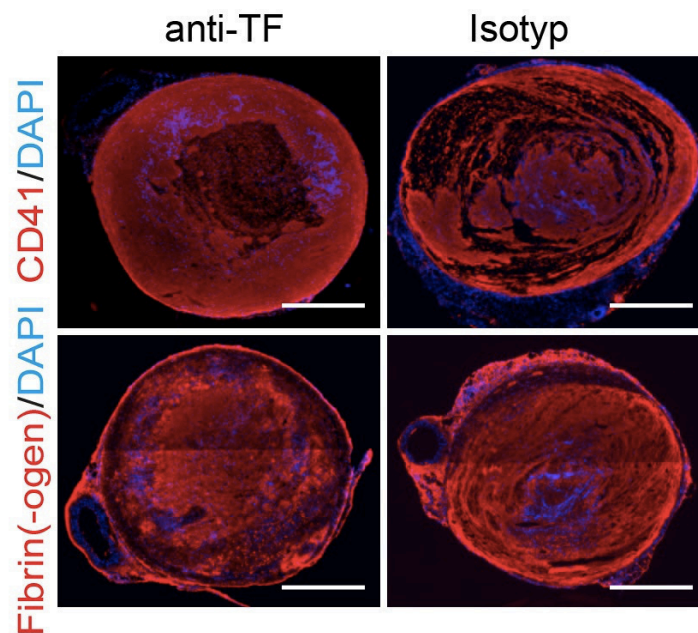


Abbildung 37: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in mit anti-TF und Isotyp Antikörpern behandelten Mäusen

blau: DAPI \cong Zellkern, rot: CD41 \cong Thrombozyten, Fibrin(-ogen) \cong Fibrin(-ogen); Überlagerung; n = 4; Querbalken: 200 μ m

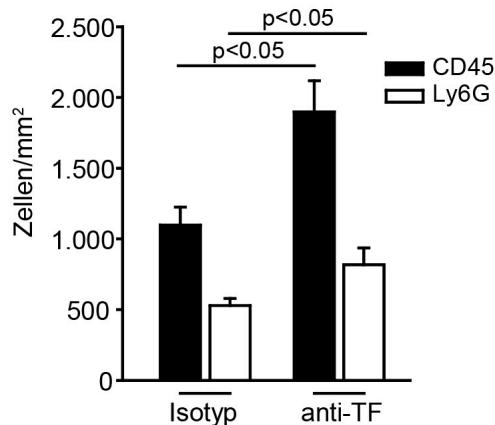


Abbildung 38: Quantitative Auswertung von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in Kontroll- und anti-TF Gruppe
Leukozyten (CD45) und neutrophile Granulozyten (Ly-6G) pro mm²; n = 4

3.6 Maus inhärenter Tissue Factor

Auf Grund der genannten Ergebnisse imponiert der Tissue Factor auf L3.6pl-MP als einzig entscheidender Faktor im Pathomechanismus. Gegen diese Annahme und für einen darüber hinaus bedeutenden Faktor sprachen allerdings die Beobachtungen, dass die Injektion von L3.6pl-MP unmittelbar vor Flussreduktion zu keiner vermehrten Thrombusbildung führt. Folglich galt es zu untersuchen, ob möglicherweise der von der Maus selbst abstammende Tissue Faktor Anteil am Pathomechanismus hat. Hierzu wurden 7 Low-hTF Mäuse in der Versuchsgruppe und 7 HCV Mäuse in der Kontrollgruppe verwendet. In der Versuchsgruppe entwickelten nur 71 Prozent der Tiere venöse Thrombosen. In der Kontrollgruppe waren es dagegen alle Tiere. Auch das Gewicht der Thromben, die in Low-hTF Mäusen entstanden, war im Vergleich zu den Thromben der Kontrolltiere reduziert. Dieser Unterschied war mit einem p-Wert kleiner 0,05 statistisch signifikant. Passend zu den Ergebnissen aus der Gewichtsbestimmung fiel auf, dass die Thromben der Versuchsgruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren makroskopisch kleiner waren. In der immunhistologischen Untersuchung war dagegen keine wesentlich abweichende Thrombuskomposition zu erkennen (Abb. 39). Die an Zellen und Fibrin(-ogen) reiche Schicht an der Gefäßwand war ebenso intakt wie bei den Kontrolltieren. Auch hinsichtlich der Leukozytenzahlen war zwischen beiden Gruppen keine signifikante Differenz vorhanden (Abb. 40).

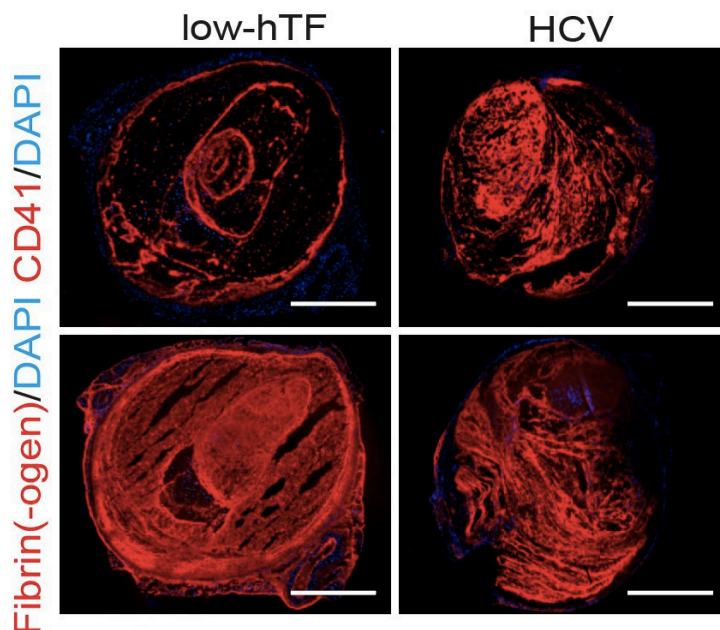


Abbildung 39: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in low-hTF und HCV Mäusen

blau: DAPI \cong Zellkern, rot: CD41 \cong Thrombozyten, Fibrin(-ogen) \cong Fibrin(-ogen); Überlagerung; Querbalken: 200 μ m

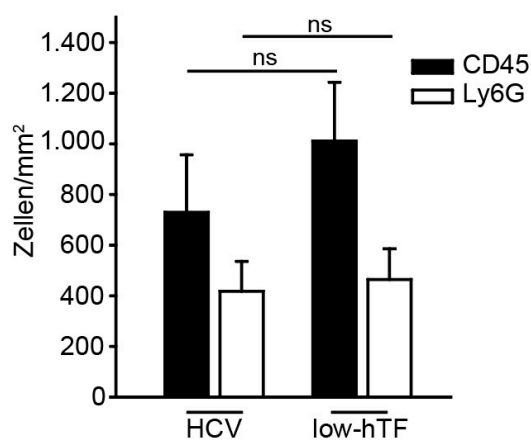


Abbildung 40: Quantitative Auswertung von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in HCV und low hTF Gruppe

Leukozyten (CD45) und neutrophile Granulozyten (Ly-6G) pro mm^2 ; $n = 4$

Die Beobachtungen dieser Versuchsreihe zeigten, dass der Maus inhärente Tissue Factor zwar kaum Bedeutung für die charakteristische Thrombuskomposition hat, für die volle prothrombotische Wirkung der L3.6pl-MP dagegen sehr wohl benötigt wird.

Um herauszufinden, ob der hierfür verantwortliche inhärente Tissue Factor myeloiden Ursprungs ist, wurden spezielle Knock-Out Mäuse eingesetzt. Anhand dieser $\text{LysM}^{\text{Cre}+}$ $\text{TF}^{\text{flox/flox}}$ Mäuse, deren myeloide Zellen keinen Tissue Factor exprimieren, konnte die

Rolle des von Blutzellen abstammenden Tissue Factor auf die Thrombuskomposition unter L3.6pl-MP untersucht werden. Als Kontrolle dienten $\text{LysM}^{\text{Cre-}} \text{TF}^{\text{flox/flox}}$ Mäuse.

In der qualitativen Untersuchung der Thrombuskomposition fielen einzig mehrere Fibrin(-ogen) Schichten auf, zwischen denen sich dünne Schichten von Thrombozyten fanden (Abb. 41). Auf Leukozytenmenge und -verteilung hatte das Fehlen des Tissue Factor von myeloiden Zellen in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Einfluss (Abb. 42).

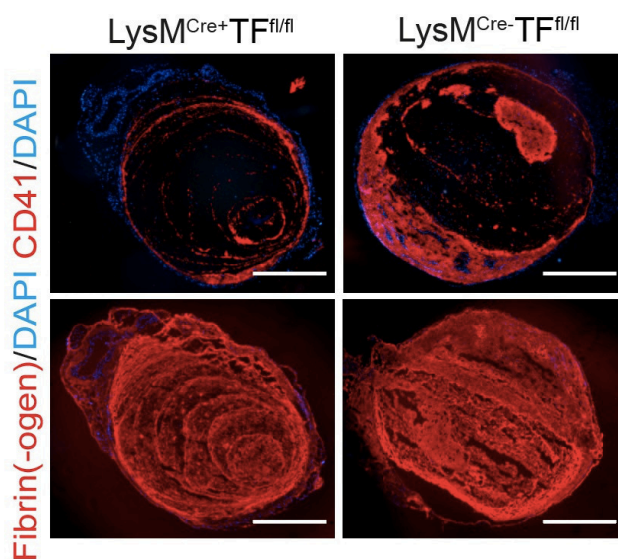


Abbildung 41: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in $\text{LysM}^{\text{Cre-}} \text{TF}^{\text{flox/flox}}$ und $\text{LysM}^{\text{Cre+}} \text{TF}^{\text{flox/flox}}$ Mäusen

blau: DAPI \cong Zellkern, rot: CD41 \cong Thrombozyten, Fibrin(-ogen) \cong Fibrin(-ogen); Überlagerung; Querstrichen: 200 μm

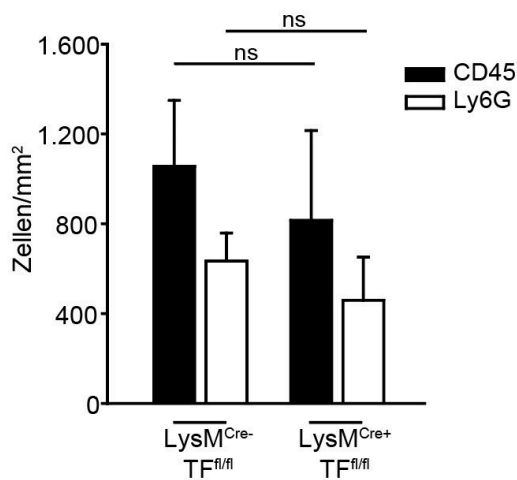


Abbildung 42: Quantitative Auswertung von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in $\text{LysM}^{\text{Cre-}} \text{TF}^{\text{flox/flox}}$ und $\text{LysM}^{\text{Cre+}} \text{TF}^{\text{flox/flox}}$ Mäusen
Leukozyten (CD45) und neutrophile Granulozyten (Ly-6G) pro mm^2 ; n = 4

VI. DISKUSSION

Patienten, die an malignen Tumoren, insbesondere an Adenokarzinomen des Pankreas, erkranken, haben im Vergleich zur Normalbevölkerung ein deutlich erhöhtes Risiko, eine venöse Thrombose zu entwickeln. In dieser Population haben venöse Thrombosen und ihre Folgeerkrankungen beträchtlichen Einfluss auf Morbidität und Mortalität¹⁻⁴. Der Zusammenhang zwischen Tumorerkrankungen und dem Auftreten venöser Thrombosen wurde zwar schon im 19. Jahrhundert erkannt⁵, der hierfür verantwortliche Pathomechanismus ist jedoch nach wie vor unklar⁶. Aus der Forschung der jüngeren Vergangenheit mehren sich die Hinweise, dass Tissue Factor tragende Mikropartikel, die von malignen Tumorzellen in die Blutzirkulation abgegeben werden, eine bedeutende Rolle in diesem Pathomechanismus spielen⁸⁻¹⁴. Zu dieser Forschung zählen auch Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe. Aus diesen ging hervor, dass im Stenose-induzierenden Mausmodell die intravenöse Gabe von MP der humanen Pankreastumor-Zelllinie L3.6pl zu einer deutlich erhöhten Thromboseinzidenz im Vergleich zu Blut-MP führen. Die prothrombotische Wirkung der L3.6pl-MP drückte sich dabei auch in einem signifikant höheren Thrombusgewicht aus¹⁰⁴.

Von diesem Forschungsthema weitestgehend unberücksichtigt blieb bislang die Einbeziehung der Thrombuskomposition jener Tumormikropartikel-assoziierten venösen Thrombosen. In der vorliegenden Arbeit konnte im Stenose-induzierenden Mausmodell gezeigt werden, dass die Thrombuskomposition in diesen Thromben deutlich von der unter Blut-MP Einfluss entstandenen Thromben abweicht. Durch unterschiedliche Inhibitions-, Knock-Out- und Depletionsverfahren wurde aufgedeckt, welchen Anteil etablierte zelluläre und molekulare Faktoren der venösen Thrombose an dieser abweichenden Thrombuskomposition haben. Als entscheidender Faktor im Pathomechanismus stellte sich der Tissue Factor auf L3.6pl-MP heraus. In Zusammenschau mit Daten zu Thrombusinzidenz und -gewicht war darüber hinaus erkennbar, dass dieser erst im Synergismus mit einem der Maus entstammenden Tissue Factor nicht myeloiden Ursprungs, seine volle prothrombotische Potenz entfalten kann. Myeloide Leukozyten, Thrombozyten, FXII und Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin und GPIIb α (allesamt Faktoren, die bei der Entstehung nicht-

tumorassoziierter venöser Thrombosen von wesentlicher Bedeutung sind) spielen bei der Thrombogenese unter L3.6pl-MP Einfluss keine entscheidende Rolle mehr.

1. Die veränderte Thrombuskomposition in L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombosen weist auf einen abweichenden Pathomechanismus hin

Die makroskopisch erkennbaren Unterschiede zwischen Thromben der L3.6pl-MP Gruppe und der Blut-MP Gruppe gaben bereits erste Hinweise, dass der Thrombusbildung unter Einfluss der tumorösen MP ein abweichender Pathomechanismus zugrunde liegen könnte. Die deutlich größeren Thromben der L3.6pl-MP Gruppe mit ihren überwiegend roten und vermindert weißen Arealen deuteten auf eine potenzierte Thrombusbildung mit hohem Anteil an quervernetztem Fibrin(-ogen) und reduzierter Menge an Thrombozyten hin.

Weitaus deutlicher wurden die Unterschiede in der Thrombuskomposition durch die immunhistologische Analyse. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren in Thromben der L3.6pl-MP Gruppe nicht nur signifikant weniger myeloide Leukozyten und Thrombozyten zu finden, sondern auch deren Verteilung im Thrombus war eine gänzlich andere. Während sich Thrombozyten und myeloide Leukozyten in der Blut-MP Gruppe nahezu ubiquitär im Thrombus verteilt fanden, waren diese in der L3.6pl-MP Gruppe vor allem endothelnah und kaum luminal zu finden. Diese abweichende Verteilung war besonders markant in der Fibrin(-ogen) Färbung zu sehen. Interessanterweise fanden sich genau am Übergang dieser zwei Schichten gehäuft L3.6pl-MP. Neben dieser auffälligen Lokalisation waren L3.6pl-MP vereinzelt auch direkt an Endothelzellen zu finden. Unmittelbare Nähe oder direkte Kontakte zu anderen Zellen wie Thrombozyten oder myeloiden Leukozyten stellten sich dagegen nicht dar. Xenogene Effekte auf Grund der humanen Abstammung der L3.6pl-MP konnten für die Abweichungen in der Thrombuskomposition nicht verantwortlich gemacht werden, da murine KCP-MP eine ähnliche Thrombuskomposition aufwiesen und sich auch hinsichtlich Thrombusinzidenz und -gewicht kein signifikanter Unterschied zeigte.

Schließlich legten diese Beobachtungen die Hypothese nahe, dass L3.6pl-MP eine überschießende Fibrin(-ogen) Bildung herbeiführen, die Thrombozyten und myeloide Leukozyten von der weiteren Thrombusbildung ausschließt bzw. ihren Einfluss

entbehrlich macht. Durch Experimente, in denen Inhibitions-, Knock-Out- und Depletionsverfahren zur Anwendung kamen, ließen sich weitere Einsichten im Sinne dieser pathomechanistischen Hypothese gewinnen und deutliche Unterschiede zur nicht-tumorassoziierten venösen Thrombose erkennen.

2. Zelluläre und molekulare Einflussfaktoren auf die abweichende Thrombuskomposition

Aus zurückliegenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe am gleichen Tiermodell lagen Erkenntnisse vor, welche zellulären und molekularen Faktoren für den Pathomechanismus der nicht-tumorassoziierten venösen Thrombose von Bedeutung sind ⁵³. Der Anteil dieser bekannten Faktoren an der abweichenden Thrombuskomposition unter L3.6pl-MP Einfluss konnte durch entsprechende Versuchsreihen untersucht und in Zusammenschau mit Thrombusinzidenz und -gewicht pathomechanistisch interpretiert werden.

2.1 Thrombozyten und GPIIb/IIIa beeinflussen die Thrombuskomposition, ohne die Thrombusinzidenz zu beeinflussen

An gleichem Mausmodell ohne Einfluss tumoröser Mikropartikel konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten und ihr Adhäsionsrezeptor GPIIb/IIIa für die Entstehung der venösen Thrombose von wesentlicher Bedeutung sind ⁵³. Unter Einwirkung von L3.6pl-MP wirkten sich jedoch weder ein Defekt im thrombozytären Adhäsionsrezeptor GPIIb/IIIa noch die Depletion der Thrombozyten signifikant auf Thrombusinzidenz und -gewicht aus ¹⁰⁴.

Aus den immunhistologischen Untersuchungen der Thrombuskomposition geht hervor, dass selbst unter Einfluss von L3.6pl-MP ein intakter GPIIb/IIIa Rezeptor auf Thrombozyten für die Adhärenz der Thrombozyten am Endothel wie auch für die Adhärenz von neutrophilen Granulozyten an Thrombozyten von Bedeutung ist. Für die Entstehung der markanten zwei Schichten in der Fibrin(-ogen) Verteilung scheint der GPIIb/IIIa Rezeptor jedoch ohne Relevanz zu sein. Voll funktionsfähige Thrombozyten sind dagegen sehr wohl für die Entstehung dieser zwei Schichten von Bedeutung. In Anbetracht der bekannten Rolle von Thrombozyten in der Thrombusentstehung ist

daher denkbar, dass Thrombozyten durch ihre Oberfläche sowie die durch PolyP getriggerte und über FXII ablaufende Thrombinbildung auf die initiale bzw. endothelnahe Fibrin(-ogen) Struktur Einfluss nehmen^{26,80,128,129}. Wie zu beobachten war, wirkte sich das Fehlen der Thrombozyten nicht nur auf die Fibrin(-ogen) Struktur, sondern auch auf die Gesamtmenge an rekrutierten Leukozyten aus. Während ein defekter thombozytärer GPIIb/IIIa Rezeptor zwar keine Adhäsion, allerdings noch ein Rolling von Leukozyten auf Thrombozyten erlaubt, ist diese Interaktion in Thrombozyten depletierten Mäusen gänzlich unterbunden und könnte sich daher auch unter dem Einfluss von L3.6pl-MP auf die Leukozytenrekrutierung auswirken^{130,131}. Auch die geringere Menge an P-Selektin, die durch fehlende Thrombozyten hervorgerufen wird, könnte Anteil an dieser Beobachtung haben¹³².

Im Ansatz lässt sich damit auch hier jene Rolle von Thrombozyten bzw. ihres Adhäsionsrezeptors GPIIb/IIIa erkennen, wie sie aus der nicht-tumorassoziierten venösen Thrombose bekannt ist. Und dennoch zeigt sich deutlich, dass unter dem Einfluss der L3.6pl-MP keiner der beiden Faktoren Einfluss auf die letztliche Thrombusentstehung hat. Hinsichtlich der Rolle des Adhäsionsrezeptors GPIIb/IIIa geht diese Beobachtung auch mit den Versuchen von Thomas et al. einher. Hier konnten venöse Thrombosen unter dem Einfluss von Pankreastumor MP durch einen Defekt im GPIIb/IIIa Adhäsionsrezeptor nicht verhindert werden¹³³. Da die medikamentöse Plättchenhemmung bei Tumorpatienten keinen protektiven Einfluss auf die Thrombusentstehung nehmen konnte, sprechen auch diese klinischen Erkenntnisse für die Beobachtungen der hier vorgelegten Versuchsreihe^{134,135}. Nichts desto trotz liegen auch Hinweise vor, die für die Bedeutung von Thrombozyten sprechen. So konnte in einer kürzlich publizierten Arbeit *in vitro* demonstriert werden, dass Thrombozyten durch MP der humanen Pankreastumor Zelllinien L3.6pl und BxPc-3 aktiviert werden. Zudem wies Clopidrogrel bei *in vivo* Versuchen protektive Effekte in der frühen Thrombusentstehung auf¹³⁶. Letztlich wird hierdurch deutlich, dass die Bedeutung von Thrombozyten in der tumorassoziierten venösen Thrombose noch nicht abschließend geklärt ist. Als Ursache für diese abweichenden Ergebnisse können die verschiedenen Versuchsmodelle ebenso wie die Unterschiede in den untersuchten Tumor-Zelllinien gesehen werden.

2.2 L3.6pl-MP induzieren venöse Thrombosen unabhängig von P-Selektin

In der Entstehung der nicht-tumorassozierten venösen Thrombose nehmen neben Thrombozyten auch myeloide Leukozyten eine herausragende Rolle ein. Dabei haben neutrophile Granulozyten insbesondere durch die Bildung von NETs^{77,78}, Monozyten vor allem durch die Expression von Tissue Factor⁵³ Einfluss auf die Thrombogenese. Deren Rekrutierung an aktiviertes Endothel erfolgt dabei maßgeblich durch P-Selektin^{27,53}.

Unter Einfluss von L3.6pl-MP hat die Abwesenheit von P-Selektin allerdings keinen signifikanten Einfluss auf Thrombusinzidenz und -gewicht¹⁰⁴. Damit scheint die L3.6pl-MP assoziierte venöse Thrombose unabhängig von P-Selektin abzulaufen. Dies spricht gegen die Ergebnisse von Thomas et al., die im Tiermodell mit FeCl₃ induzierter Gefäßverletzung zeigen konnten, dass tumoröse Panc02-MP mit Endothelzellen und Thrombozyten interagieren und abhängig von P-Selektin zur tumorassozierten Thrombusbildung führen¹³⁷. Die fehlenden Kontakte zwischen Thrombozyten und L3.6pl-MP sprachen auch in der immunhistologischen Analyse gegen diese Hypothese. Aufgrund der beobachteten Berührungspunkte zwischen Endothelzellen und L3.6pl-MP wäre hier jedoch eine P-Selektin vermittelte Interaktion denkbar gewesen. Allerdings bekräftigen auch die Versuche von Wagner et al. im Stenose-induzierenden Mausmodell unter Einfluss von MP der Panc02-Zelllinie, dass sich die prokoagulatorische Wirkung von tumorösen TF+MP unabhängig von P-Selektin entwickelt¹³³. Die beobachteten Kontakte zwischen L3.6p-MP und Endothelzellen scheinen daher einem anderen Mechanismus zu unterliegen. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Thomas et al. könnten auch hier durch die unterschiedlichen Tiermodelle begründet sein. Im FeCl₃ Modell wird eine direkte Gefäßverletzung mit Freilegung der subendothelialen Matrix hervorgerufen. Im Stenose-induzierenden Mausmodell bleibt die Gefäßwand dagegen intakt^{53,84,138,139}. Die Aktivierung des Endothels erfolgt auf Grund von Stase sowie Hypoxie. Insofern ähnelt dieses Mausmodell mehr den Gegebenheiten, unter denen sich venöse Thrombosen beim Menschen und als Folge von vermehrter Bettlägerigkeit und Inaktivität vor allem bei Tumorpatienten entwickeln¹⁴⁰⁻¹⁴².

2.3 Die Entstehung der Tumormikropartikel-assoziierten venösen Thrombose ist unabhängig von myeloiden Leukozyten

Neben den zuvor genannten Erkenntnissen deuten die Versuche mit SELP^{-/-} Mäusen auch darauf hin, dass bei tumorassoziierte Thrombose die Rekrutierung von myeloiden Leukozyten an aktiviertes Endothel ohne Bedeutung ist. Dies zeigt sich auch dadurch, dass die fehlende Leukozytenrekrutierung am Endothel bis auf eine Abschwächung der zweischichtigen Fibrin(-ogen) Struktur keine wesentlichen Veränderungen in der Thrombuskomposition hervorruft. Indem auch die Depletion von neutrophilen Granulozyten keine Auswirkungen auf die Thrombusinzidenz hat, wird diese Annahme weiter bekräftigt¹⁰⁴. In der Zunahme des Thrombusgewichts in Abwesenheit von Neutrophilen wird allerdings die Thrombus-abbauende Eigenschaft dieses Zelltyps erkennbar¹⁴³. In der Analyse der Thrombuskomposition lassen sich diese Beobachtungen weiter veranschaulichen. Während die leichte Zunahme der luminalen Fibrin(-ogen) Struktur auf einen reduzierten Thrombusabbau deutet, sprechen die ansonsten kaum vorhandenen Veränderungen für die untergeordnete Rolle der neutrophilen Granulozyten in diesem Setting. Da die Neutropenie bei Tumorpatienten einen Risikofaktor für venöse Thrombosen darstellt, gehen diese Beobachtungen auch mit klinischen Beobachtungen einher^{140,144}. Als Erklärung hierfür könnten die Erkenntnisse aus experimentellen Arbeiten dienen. Hier zeigt sich, dass der inflammatorische Prozess, der für die Auflösung venöser Thromben nötig ist, durch eine Neutropenie negativ beeinflusst wird^{145,146}.

Die Versuche mit Tieren, in denen myeloide Leukozyten im Gesamten depletiert wurden, unterstreichen die zuvor genannten Annahmen. Zudem wird hier die unbedeutende Rolle von Monozyten für die Thrombusbildung ersichtlich. Während Monozyten durch ihre Tissue Factor-Expression entscheidend an der Entstehung der nicht-tumorassoziierten venösen Thrombose beteiligt sind^{53,147}, erscheint dieser Mechanismus unter L3.6pl-MP Einwirkung bedeutungslos. Dies spricht entweder für eine untergeordnete Rolle von Tissue Factor oder dafür, dass dieser einer anderen Quelle entstammt, die den Tissue Factor auf Monozyten als unbedeutend erscheinen lässt.

3. Tissue Factor auf L3.6pl-Mikropartikel beeinflusst maßgeblich die Thrombuskomposition

Tissue Factor auf L3.6pl-MP kommt die entscheidende Rolle im Pathomechanismus zu. Dessen Inhibition führt nicht nur zu einem signifikanten Absinken von Thrombusinzidenz und -gewicht¹⁰⁴, sondern lässt auch eine Thrombuskomposition entstehen, die nahezu gänzlich der unter Blut-MP bzw. keinem MP Einfluss gleicht. Diese ist gekennzeichnet durch eine vermehrte Akkumulation von myeloiden Leukozyten und Thrombozyten sowie einen Verlust der Zweischichtung. Hiermit wird ersichtlich, dass die ausgeprägt prothrombotische Wirkung der L3.6pl-MP maßgeblich über Tissue Factor bzw. den extrinsischen Aktivierungsweg der Gerinnungskaskade abläuft.

Diese herausragende Rolle von Tissue Factor wird noch weiter verstärkt, indem sich auch Faktor XII und damit auch der intrinsische Weg der Gerinnungskaskade für die Thrombusentstehung als unbedeutend erweisen. Während sich noch in den *in vivo* Versuchen von Brühl et al. durch Inaktivierung von Faktor XII ein vielversprechender medikamentöser Ansatz für die nicht-tumorassoziierte venöse Thrombose andeutet⁵³, kann dieser unter L3.6pl-MP Einfluss nicht mehr gelten. Faktor XII kann neben der Aktivierung des intrinsischen Weges durch Erhöhung der Fibrindichte direkten Einfluss auf die Thrombusstruktur nehmen⁸⁰. Diese bekannte Rolle wird zwar auch in der Thrombuskomposition unter L3.6pl-MP Einfluss erkennbar; da sich hierunter allerdings keine Auswirkungen auf Thrombusinzidenz und -gewicht zeigen¹⁰⁴, wird deutlich, dass letztlich Faktor XII nicht an der prothrombotischen Wirkung der tumorösen MP beteiligt ist.

4. Die prothrombotische Wirkung von L3.6pl-MP ist abhängig vom Synergismus zwischen intrinsischem und Tumor-MP Tissue Factor

Auf Grund der genannten Erkenntnisse imponiert der Tissue Factor auf L3.6pl-MP als einzig entscheidender Faktor im Pathomechanismus. Gegen diese Annahme und für einen darüber hinaus bedeutenden Faktor spricht jedoch die Beobachtung, dass die Injektion von L3.6pl-MP unmittelbar vor Flussreduktion zu keiner vermehrten Thrombusbildung führt. Damit wird ersichtlich, dass infolge der Flussreduktion Veränderungen auftreten, die für die volle Wirkung von L3.6pl-MP erforderlich sind.

Auf der Suche nach hierbei involvierten Faktoren fiel der von der Maus selbst entstammende Tissue Factor auf. Denn Mäuse, die keinen murinen Tissue Factor, jedoch gerade so viel humanen Tissue Factor besitzen, um nicht an spontaner Blutung zu versterben, zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine reduzierte Thrombusinzidenz und ein vermindertes Thrombusgewicht. Dieser Einfluss geht allerdings nicht mit Veränderungen in der Thrombuskomposition einher. Damit wird ersichtlich, dass der Maus inhärente Tissue Factor für die frühe Thrombusentstehung nach Flussreduktion bedeutsam ist. Alle weiteren Veränderungen, die sich in der Folge auf die Thrombuskomposition auswirken, scheinen dagegen gänzlich vom Tissue Factor der L3.6pl-MP abhängig zu sein.

Doch welchen Ursprung hat dieser dem Anschein nach initial relevante und von der Maus abstammende Tissue Factor? In der Thrombusentstehung unter reiner Flussreduktion stammt der Großteil an Tissue Factor von Monozyten ab ^{53,148}. Da allerdings deren Depletion unter dem Einfluss von L3.6pl-MP ohne Auswirkungen bleibt, spricht dies gegen Blutzellen als Quelle. Die Versuche mit LysM^{Cre+} TF^{flx/flx} Mäusen, deren myeloide Zellen keinen Tissue Factor exprimieren, unterstreichen diese Annahme, so dass letztlich von einer anderen Quelle als der des Blutes auszugehen ist ¹⁰⁴. Eine Freilegung von subendotheliale Tissue Factor ist im Stenose-induzierenden Mausmodell, im Gegensatz zum FeCl₃ Verletzungsmodell, nicht oder allenfalls in geringem Ausmaß zu erwarten ^{53,84,138,139}. Dies konnte gut durch die Versuchsreihe belegt werden, in der L3.6pl-MP 24h und 48h nach Sham Operation injiziert wurde und keines von 8 Versuchstieren eine venöse Thrombose entwickelte ¹⁰⁴. Damit ist auch nicht anzunehmen, dass der gesuchte Maus inhärente Tissue Factor dem Subendothel entstammt. Folglich rückt die von Endothelzellen ausgehende Tissue Factor Expression als mögliche Quelle in den Vordergrund. *In vitro* konnte mehrfach gezeigt werden, dass Endothelzellen Tissue Factor exprimieren können ^{42,43}. *In Vivo* war dies allerdings nur in bestimmten Situationen wie beispielsweise bei schwerer Sepsis, malignen Tumoren und bei lokalen Flussturbulenzen der Fall ^{44,45}. Letztere Situationen sind, zumindest zum Teil, auch in dem Mausmodell der vorliegenden Arbeit unter L3.6pl-MP Einfluss gegeben. Dies wiederum unterstützt die Hypothese, dass der von der Maus abstammende Tissue Factor, der im Synergismus mit dem von L3.6pl-MP zur vollen prothrombotischen Wirkung führt, von Endothelzellen abstammt. Neben der Tissue

Factor Expression durch Endothelzellen selbst wird auch ein Transfer von Tissue Factor tragenden Mikropartikeln auf Endothelzellen diskutiert und von einigen Autoren für die diskrepanten Ergebnisse verantwortlich gemacht ¹⁴⁸. Da L3.6pl-MP in der immunhistologischen Untersuchung von Thromben der vorliegenden Arbeit direkt am Endothel zu beobachten waren, wäre ein solcher Transfer durchaus auch hier vorstellbar. Auch wenn damit mögliche Quellen des Maus inhärentem Tissue Factor angedeutet sind, kann dies letztlich nur durch weitere *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen geklärt werden.

Insgesamt deuten die aufgezeigten Unterschiede zur Immunzell-vermittelten venösen Thrombose an, dass zur Prophylaxe von venösen Thrombosen bei Krebspatienten andersartige medikamentöse Strategien erforderlich sind. Um negative Auswirkungen wie verstärkte Blutungsneigung zu vermeiden, ist es notwendig in Zukunft Zielstrukturen zu finden, die vor Thrombose schützen und dabei möglichst wenig Einfluss auf die Hämostase nehmen ^{6,149-151}. Für die nicht-tumorassoziierte venöse Thrombose stellen FXII und NETs von Leukozyten derartige Zielstrukturen dar, die möglicherweise Einzug in die medikamentöse Prophylaxe finden ^{151,152}. Durch die vorliegende Arbeit wird allerdings ersichtlich, dass diese unter dem Einfluss von Tumor Mikropartikeln nicht in Frage kommen. Vielversprechend erscheinen dagegen Ansätze, die entweder auf tumorassoziierte Tissue Factor positive Mikropartikel oder deren Tissue Factor direkt zielen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Krebspatienten tragen ein hohes Risiko, an venöser Thrombose zu erkranken. Dieses ist abhängig von der Art des Tumors und besonders hoch für Patienten mit Pankreaskarzinom. Der hieraus resultierende Einfluss auf Morbidität und Mortalität ist erheblich. Wenngleich der Zusammenhang von venösen Thrombosen und Tumorerkrankung seit dem 19. Jahrhundert bekannt ist, sind die hierbei involvierten Pathomechanismen bis heute nicht vollständig verstanden. Während die venöse Thrombose unter reiner Flussreduktion einem inflammatorischen Prozess gleicht, deuten Erkenntnisse der jüngeren Forschung darauf hin, dass Tissue Factor tragende

Mikropartikel, die von malignen Tumorzellen in die Blutzirkulation abgegeben werden, eine bedeutende Rolle im Pathomechanismus von venösen Thrombosen bei Krebspatienten spielen. Von diesem Forschungsthema weitestgehend unberücksichtigt blieb bislang die Einbeziehung der Thrombuskomposition jener Tumormikropartikel-assoziierten venösen Thrombosen. In der vorliegenden Arbeit konnte im Stenose-induzierenden Mausmodell gezeigt werden, dass die Thrombuskomposition, die sich nach intravenöser Gabe von Mikropartikeln der Pankreastumor-Zelllinie L3.6pl entwickelt, deutlich von der unter Blut Mikropartikel Einfluss abweicht. Durch unterschiedliche Inhibitions-, Knock-Out- und Depletionsverfahren konnten wesentliche Unterschiede zur Immunzell-vermittelten, nicht-tumorassoziierten venösen Thrombose aufgedeckt werden: Myeloide Leukozyten, Thrombozyten, FXII und Rezeptoren wie P-Selektin und GPIIb/IIIa (allesamt Faktoren, die unter reiner Flussreduktion unabdingbar sind) haben zwar teils noch Einfluss auf die Thrombuskomposition, für die thrombogene Potenz der L3.6pl-MP sind sie allerdings vollkommen vernachlässigbar. Als entscheidender Faktor für die abweichende Thrombuskomposition stellte sich der Tissue Factor auf L3.6pl-MP heraus. In Zusammenschau mit Daten zu Thrombusinzidenz und -gewicht war darüber hinaus erkennbar, dass dieser erst im Synergismus mit einem der Maus entstammenden Tissue Factor nicht myeloiden Ursprungs seine volle prothrombotische Potenz entfalten kann. Die hiermit *in vivo* aufgezeigten Unterschiede zur Immunzell-vermittelten venösen Thrombose verdeutlichen, dass andersartige medikamentöse Strategien erforderlich sind, um einerseits die Entstehung von venösen Thrombosen bei Krebspatienten zu verhindern und andererseits Blutungsrisiken wie bei Einsatz von Antikoagulanzen zu vermeiden.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Blom, J.W., Doggen, C.M., Osanto, S. & Rosendaal, F.R. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA* **293**, 715-722 (2005).
2. Cronin-Fenton, D.P., *et al.* Hospitalisation for venous thromboembolism in cancer patients and the general population: a population-based cohort study in Denmark, 1997-2006. *Br J Cancer* **103**, 947-953 (2010).
3. Heit, J.A., *et al.* Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: A population-based case-control study. *Archives of Internal Medicine* **160**, 809-815 (2000).
4. Walker, A.J., Card, T.R., West, J., Crooks, C. & Grainge, M.J. Incidence of venous thromboembolism in patients with cancer – A cohort study using linked United Kingdom databases. *European Journal of Cancer* **49**, 1404-1413 (2013).
5. Elyamany, G., Alzahrani, A.M. & Bukhary, E. Cancer-associated thrombosis: an overview. *Clin Med Insights Oncol* **8**, 129-137 (2014).
6. Key, N.S., *et al.* Thrombosis in Cancer: Research Priorities Identified by a National Cancer Institute/National Heart, Lung, and Blood Institute Strategic Working Group. *Cancer Res* **76**, 3671-3675 (2016).
7. Kasthuri, R.S., Taubman, M.B. & Mackman, N. Role of Tissue Factor in Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 4834-4838 (2009).
8. Zwicker, J.I., *et al.* Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res* **15**, 6830-6840 (2009).
9. Tesselaar, M.E.T., *et al.* Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* **5**, 520-527 (2007).
10. Tesselaar, M.E., Romijn, F.P., van der Linden, I.K., Bertina, R.M. & Osanto, S. Microparticle-associated tissue factor activity in cancer patients with and without thrombosis. *J Thromb Haemost* **7**, 1421-1423 (2009).
11. Manly, D.A., *et al.* Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism. *Thromb Res* **125**, 511-512 (2009).

12. Campello, E., *et al.* Endothelial, platelet, and tissue factor-bearing microparticles in cancer patients with and without venous thromboembolism. *Thromb Res* **127**, 473-477 (2011).
13. Haubold, K., *et al.* Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles is increased in patients with early-stage prostate cancer. *Thrombosis and Haemostasis* **101**, 1147-1155 (2009).
14. Hron, G., *et al.* Tissue factor-positive microparticles: Cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thrombosis and Haemostasis* **97**, 119-123 (2007).
15. Hach-Wunderle, V. Venenthrombose. In Renz-Polster H., Krautzig S. (Hrsg.). *Basislehrbuch Innere Medizin. 5. Auflage Urban & Fischer, München*, 229-238 (2012).
16. Heit, J.A. Epidemiology of venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol* **12**, 464-474 (2015).
17. Kyrle, P.A. & Eichinger, S. Deep vein thrombosis. *Lancet* **365**, 1163-1174 (2005).
18. Fowkes, F.J., Price, J.F. & Fowkes, F.G. Incidence of diagnosed deep vein thrombosis in the general population: systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **25**, 1-5 (2003).
19. Cohen, A.T., *et al.* Venous thromboembolism in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thrombosis and Haemostasis* (2007).
20. Kyrle, P.A. & Eichinger, S. Pathogenese und Risikofaktoren der venösen Thrombose. In B. Pötzsch (Hrsg.) K. Madlener (Hrsg.). *Hämostaseologie. 2. Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg* 392-394 (2010).
21. Lopez, J.A. & Chen, J. Pathophysiology of venous thrombosis. *Thromb Res* **123 Suppl 4**, 30-34 (2009).
22. Bagot, C.N. & Arya, R. Virchow and his triad: a question of attribution. *Br J Haematol* **143**, 180-190 (2008).
23. Reitsma, P.H., Versteeg, H.H. & Middeldorp, S. Mechanistic view of risk factors for venous thromboembolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 563-568 (2012).

24. Mackman, N. New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest* **122**, 2331-2336 (2012).
25. Versteeg, H.H., Heemskerk, J.W., Levi, M. & Reitsma, P.H. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev* **93**, 327-358 (2013).
26. Muller, F., *et al.* Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* **139**, 1143-1156 (2009).
27. Bovill, E.G. & van der Vliet, A. Venous valvular stasis-associated hypoxia and thrombosis: what is the link? *Annu Rev Physiol* **73**, 527-545 (2011).
28. Chiu, J.-J. & Chien, S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* **91**, 327-387 (2011).
29. Sevitt, S. & Gallagher, N. Venous thrombosis and pulmonary embolism. A clinico-pathological study in injured and burned patients. **48**, 475-489 (1961).
30. Nicolaidis, A.N., Kakkar, V.V., Field, E.S. & Renney, J.T.G. The origin of deep vein thrombosis: a venographic study. *The British Journal of Radiology* **44**, 653-663 (1971).
31. Sevitt, S. The structure and growth of valve-pocket thrombi in femoral veins. *Journal of clinical pathology* **27**, 517-528 (1974).
32. Hamer, J., Malone, P.C. & Silver, I.A. The PO₂ in venous valve pockets: its possible bearing on thrombogenesis. *British Journal of Surgery* **68**, 166-170 (1981).
33. Lurie, F., Kistner, R.L., Eklof, B. & Kessler, D. Mechanism of venous valve closure and role of the valve in circulation: a new concept. *Journal of Vascular Surgery* **38**, 955-961 (2003).
34. López, J.A. & Chen, J. Pathophysiology of venous thrombosis. *Thrombosis Research* **123**, S30-S34 (2009).
35. Esmon, C.T. & Esmon, N.L. The link between vascular features and thrombosis. *Annu Rev Physiol* **73**, 503-514 (2011).
36. Bouvy, C., Gheldof, D., Chatelain, C., Mullier, F. & Dogne, J.M. Contributing role of extracellular vesicles on vascular endothelium haemostatic balance in cancer. *J Extracell Vesicles* **3** (2014).

37. B. A. Steppich, I.O. Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI). In B. Pötzsch (Hrsg.) K. Madlener (Hrsg.). *Hämostaseologie*. 2. Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg 146-157 (2010).
38. I. A. Vinnikov, P.P.N., B. Isermann. Thrombomodulin- Protein C -System und Protein Z. In B. Pötzsch (Hrsg.) K. Madlener (Hrsg.). *Hämostaseologie*. 2. Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg 245-255 (2010).
39. Ogawa, S., et al. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. Increased monolayer permeability and induction of procoagulant properties. *The Journal of Clinical Investigation* **85**, 1090-1098 (1990).
40. Aird, W.C. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost* **3**, 1392-1406 (2005).
41. Eilertsen, K.E. & Osterud, B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* **15**, 521-38 (2004).
42. Aharon, A., Tamari, T. & Brenner, B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis* (2008).
43. Essayagh, S., et al. Microparticles from apoptotic monocytes induce transient platelet recruitment and tissue factor expression by cultured human vascular endothelial cells via a redox-sensitive mechanism. *Thromb Haemost* **98**, 831-837 (2007).
44. Contrino, J., Hair, G., Kreutzer, D.L. & Rickles, F.R. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med* **2**, 209-215 (1996).
45. van Hinsbergh, V.W. Endothelium--role in regulation of coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol* **34**, 93-106 (2012).
46. Gardiner, C., et al. Extracellular vesicles, tissue factor, cancer and thrombosis - discussion themes of the ISEV 2014 Educational Day. *J Extracell Vesicles* **4**, 26901 (2015).
47. Mackman, N. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost* **7 Suppl 1**, 136-139 (2009).

48. Rao, L.V. & Pendurthi, U.R. Regulation of tissue factor coagulant activity on cell surfaces. *J Thromb Haemost* **10**, 2242-2253 (2012).
49. Manukyan, D., von Bruehl, M.-L., Massberg, S. & Engelmann, B. Protein disulfide isomerase as a trigger for tissue factor-dependent fibrin generation. *Thrombosis Research* **122**, 19-22 (2008).
50. Furie, B. & Furie, B.C. Mechanisms of Thrombus Formation. *New England Journal of Medicine* **359**, 938-949 (2008).
51. Reinhardt, C., *et al.* Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *The Journal of Clinical Investigation* **118**, 1110-1122 (2008).
52. Cho, J., Furie, B.C., Coughlin, S.R. & Furie, B. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *The Journal of Clinical Investigation* **118**, 1123-1131 (2008).
53. von Bruhl, M.L., *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* **209**, 819-835 (2012).
54. Fleck, R.A., Rao, L.V.M., Rapaport, S.I. & Varki, N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thrombosis Research* **59**, 421-437 (1990).
55. Drake, T.A., Morrissey J.H. & Edgington, T.S. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* **134**, 1087-1097 (1989).
56. Geddings, J.E. & Mackman, N. Recently Identified Factors that Regulate Hemostasis and Thrombosis. *Thromb Haemost* **111**, 570-574 (2014).
57. Shet, A.S., *et al.* Sick blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* **102**, 2678-2683 (2003).
58. Rauch, U. & Antoniak, S. Editorial Focus: Tissue factor-positive microparticles in blood associated with coagulopathy in cancer. *Thrombosis and Haemostasis* **97**, 9-10 (2007).
59. Misumi Md, K., *et al.* Comparison of Plasma Tissue Factor Levels in Unstable and Stable Angina Pectoris. *The American Journal of Cardiology* **81**, 22-26 (1998).

60. Aras, O., *et al.* Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* **103**, 4545-4553 (2004).
61. Mackman, N., Tilley, R.E. & Key, N.S. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1687-1693 (2007).
62. Aharon, A., Tamari, T. & Brenner, B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thrombosis and haemostasis* **100**, 878-885 (2008).
63. Aharon, A. & Brenner, B. Microparticles, thrombosis and cancer. *Best Pract Res Clin Haematol* **22**, 61-69 (2009).
64. Keller, S., Sanderson, M.P., Stoeck, A. & Altevogt, P. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters* **107**, 102-108 (2006).
65. Larson, M.C., Woodliff, J.E., Hillery, C.A., Kearl, T.J. & Zhao, M. Phosphatidylethanolamine is externalized at the surface of microparticles. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 1501-1507 (2012).
66. Castellana, D., Kunzelmann, C. & Freyssinet, J.M. Pathophysiologic significance of procoagulant microvesicles in cancer disease and progression. *Hämostaseologie* **29**, 51-57 (2009).
67. Mause, S.F. & Weber, C. Microparticles: Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. *Circulation Research* **107**, 1047-1057 (2010).
68. Berckmans, R.J., *et al.* Cell-derived Microparticles Circulate in Healthy Humans and Support Low Grade Thrombin Generation. *Thrombosis and Haemostasis* **85**, 639-646 (2001).
69. Flaumenhaft, R., *et al.* Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* **113**, 1112-1121 (2008).
70. Burnier, L., Fontana, P., Kwak, B.R. & Angelillo-Scherrer, A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thrombosis and haemostasis* **101**, 439-451 (2009).

71. Morel, O., *et al.* Procoagulant Microparticles: Disrupting the Vascular Homeostasis Equation? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26**, 2594-2604 (2006).
72. Nieuwland, R. & Sturk, A. Why do cells release vesicles? *Thrombosis research* **125 Suppl 1**, 49-51 (2010).
73. Owens, A.P. & Mackman, N. Microparticles in Hemostasis and Thrombosis. *Circulation Research* **108**, 1284-1297 (2011).
74. Shapiro, S. & Laffan, M. Making contact with microparticles. *J Thromb Haemost* **10**, 1352-1354 (2012).
75. Darbousset, R., *et al.* Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* **120**, 2133-2143 (2012).
76. Ward, C.M., Tetaz, T.J., Andrews, R.K. & Berndt, M.C. Binding of the von Willebrand Factor A1 domain to histone. *Thrombosis Research* **86**, 469-477 (1997).
77. Fuchs, T.A., *et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 15880-15885 (2010).
78. Massberg, S., *et al.* Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* **16**, 887-896 (2010).
79. Ammollo, C.T., Semeraro, F., Xu, J., Esmon, N.L. & Esmon, C.T. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost* **9**, 1795-1803 (2011).
80. Konings, J., *et al.* Factor XIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. *Blood* **118**, 3942-3951 (2011).
81. Schulz, C., Engelmann, B. & Massberg, S. Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis. *J Thromb Haemost* **11 Suppl 1**, 233-241 (2013).
82. Wakefield, T.W., *et al.* Venous Thrombosis—Associated Inflammation and Attenuation With Neutralizing Antibodies to Cytokines and Adhesion Molecules. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **15**, 258-268 (1995).

83. Wolberg, A.S. Plasma and cellular contributions to fibrin network formation, structure and stability. *Haemophilia* **16**, 7-12 (2010).
84. Brill, A., *et al.* von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. *Blood* **117**, 1400-1407 (2011).
85. Lee, A.Y.Y. Management of thrombosis in cancer: primary prevention and secondary prophylaxis. *British Journal of Haematology* **128**, 291-302 (2005).
86. Khorana, A.A., Francis, C.W., Culakova, E., Kuderer, N.M. & Lyman, G.H. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J Thromb Haemost* **5**, 632-634 (2007).
87. Chew, H.K., Wun, T., Harvey, D.J., Zhou, H. & White, R.H. Incidence of Venous Thromboembolism and the Impact on Survival in Breast Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology* **25**, 70-76 (2006).
88. Wun, T. & White, R.H. Epidemiology of cancer-related venous thromboembolism. *Best Pract Res Clin Haematol* **22**, 9-23 (2009).
89. Sallah, S., Wan, J.Y. & Nguyen, N.P. Venous Thrombosis in Patients with Solid Tumors: Determination of Frequency and Characteristics. *Thrombosis and Haemostasis* **87**, 575-579 (2002).
90. Komrokji, R.S., *et al.* Venous thromboembolism in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* **47**, 1029-1033 (2006).
91. Falanga, A. & Marchetti, M. Venous Thromboembolism in the Hematologic Malignancies. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 4848-4857 (2009).
92. Kuderer, N.M. & Lyman, G.H. Guidelines for treatment and prevention of venous thromboembolism among patients with cancer. *Thrombosis Research* **133**, 122-127 (2014).
93. Lee, A.Y.Y. Epidemiology and management of venous thromboembolism in patients with cancer. *Thrombosis Research* **110**, 167-172 (2003).
94. Prandoni, P., Falanga, A. & Piccioli, A. Cancer and venous thromboembolism. *The Lancet Oncology* **6**, 401-410 (2005).
95. Rickles, F.R. Mechanisms of Cancer-Induced Thrombosis in Cancer. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* **35**, 103-110 (2006).

96. Carrier, M., *et al.* Systematic Review: The Trousseau Syndrome Revisited: Should We Screen Extensively for Cancer in Patients with Venous Thromboembolism? *Annals of Internal Medicine* **149**, 323-333 (2008).
97. Khorana, A.A. Targeted prophylaxis in cancer: the evidence accumulates. *Internal and Emergency Medicine* **8**, 187-189 (2012).
98. Timp, J.F., Braekkan, S.K., Versteeg, H.H. & Cannegieter, S.C. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood* **122**, 1712-1723 (2013).
99. Kakkar, A.K., DeRuvo, N., Chinswangwatanakul, V., Tebbutt, S. & Williamson, R.C.N. Extrinsic-pathway activation in cancer with high factor VIIa and tissue factor. *The Lancet* **346**, 1004-1005 (1995).
100. Kakkar, A.K., Lemoine, N.R., Scully, M.F., Tebbutt, S. & Williamson, R.C.N. Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer. *British Journal of Surgery* **82**, 1101-1104 (1995).
101. Khorana, A.A., *et al.* Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *J Thromb Haemost* **6**, 1983-1985 (2008).
102. Woei, A.J.F.J., *et al.* Tissue factor-bearing microparticles and CA19.9: two players in pancreatic cancer-associated thrombosis? *Br J Cancer* **115**, 332-338 (2016).
103. Mege, D., Mezouar, S., Dignat-George, F., Panicot-Dubois, L. & Dubois, C. Microparticles and cancer thrombosis in animal models. *Thrombosis Research* **140**, 21-26 (2016).
104. Schubert, I. Einfluss tumoröser Mikropartikel auf die Entstehung tiefer Venenthrombosen im murinen Stenosemodell. *Dissertation. München* (2013).
105. Kanaji, T., Russell, S. & Ware, J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood* **100**, 2102-2107 (2002).
106. Bergmeier, W., *et al.* The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16900-16905 (2006).
107. Kanaji, T., Russell, S. & Ware, J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood* **100**, 2102 (2002).

108. Romo, G.M., *et al.* The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* **190**, 803-814 (1999).
109. Mayadas, T.N., Johnson, R.C., Rayburn, H., Hynes, R.O. & Wagner, D.D. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* **74**, 541-554 (1993).
110. Parry, G.C., Erlich, J.H., Carmeliet, P., Luther, T. & Mackman, N. Low levels of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice. *The Journal of clinical investigation* **101**, 560-569 (1998).
111. Pawlinski, R., *et al.* Hematopoietic and nonhematopoietic cell tissue factor activates the coagulation cascade in endotoxemic mice. *Blood* **116**, 806-814 (2010).
112. Mackman, N. Tissue-specific hemostasis: role of tissue factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **6**, 303-305 (2008).
113. Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. & Forster, I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic research* **8**, 265-277 (1999).
114. Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. & Förster, I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Research* **8**, 265-27 (1999).
115. Bruns, C.J., Harbison, M.T., Kuniyasu, H., Eue, I. & Fidler, I.J. In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia* **1**, 50-62 (1999)
116. Torres, M.P., *et al.* Novel pancreatic cancer cell lines derived from genetically engineered mouse models of spontaneous pancreatic adenocarcinoma: applications in diagnosis and therapy. *PLoS One* **8**, e80580 (2013).
117. Life Technologies. Carboxy-DCFDA (5-(and-6)-Carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C369> (Zugriff: 19.03.2017).
118. Mulisch, M. & Nixdorf-Bergweiler, B. Fluoreszenzfärbungen. In *Mulisch, M. (Hrsg.), Welsch, U. (Hrsg.). Romeis Mikroskopische Technik. 19. Auflage Springer Spektrum, Heidelberg*, 284-291 (2015).

119. Mulisch, M. Immunlokalisation. In *Mulisch, M. (Hrsg.), Welsch, U. (Hrsg.). Romeis Mikroskopische Technik. 19. Auflage Springer Spektrum, Heidelberg, 423-432 (2015).*
120. Chandraratne, S. Rolle der Neutrophil extracellular Traps (NETs) bei der Entstehung der venösen Thrombose. *Dissertation. München (2012).*
121. Biologend. Purified anti-mouse CD45 Antibody. Clone 30-F11. <https://www.biologend.com/en-us/products/purified-anti-mouse-cd45-antibody-102> (Zugriff: 19.03.2017).
122. eBioscience. Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1). Clone 1A8. <http://www.ebioscience.com/mouse-ly6g-gr1-antibody-apc-1a8-ly6g.htm> (Zugriff: 19.03.2017).
123. abcam. Anti-F4/80 antibody. Clone BM8. <http://www.abcam.com/f480-antibody-bm8-ab16911-references.html> (Zugriff: 19.03.2017).
124. Biologend. FITC anti-mouse CD41 Antibody. Clone MWReg30. <https://www.biologend.com/en-us/products/fitc-anti-mouse-cd41-antibody-5896> (Zugriff: 19.03.2017).
125. DAKO. Catalog - Specific Proteins. *Agilent Technology Company, 22 (2010).*
126. eBioscience. Anti-Mouse CD54 (ICAM-1) Purified. Clone YN1/1.7.4 <http://www.ebioscience.com/mouse-cd54-antibody-purified-yn1-174.htm> (Zugriff: 19.03.2017).
127. Zeintl, H. Cap-Image, Heidelberg. http://www.drzeintl.de/CAP_deutsch.htm (Zugriff: 20.03.2017).
128. Renne, T., *et al.* Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* **202**, 271-281 (2005).
129. Mezouar, S., *et al.* Role of platelets in cancer and cancer-associated thrombosis: Experimental and clinical evidences. *Thromb Res* **139**, 65-76 (2016).
130. Diacovo TG, R.S., Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood* **88**, 146-157 (1996).

131. Wang, Y., *et al.* Leukocyte engagement of platelet glycoprotein Ibalpha via the integrin Mac-1 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation* **112**, 2993-3000 (2005).
132. Fijnheer, R., *et al.* The origin of P-selectin as a circulating plasma protein. *Thromb Haemost* **77**, 1081-1085 (1997).
133. Thomas, G.M., *et al.* Tissue factor expressed by circulating cancer cell-derived microparticles drastically increases the incidence of deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* **13**, 1310-1319 (2015).
134. Shai, A., *et al.* Statins, aspirin and risk of thromboembolic events in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* **133**, 304-308 (2014).
135. Shai, A., *et al.* Statins, aspirin and risk of venous thromboembolic events in breast cancer patients. *J Thromb Thrombolysis* **38**, 32-38 (2014).
136. Geddings, J.E., *et al.* Tissue factor-positive tumor microvesicles activate platelets and enhance thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* **14**, 153-166 (2016).
137. Thomas, G.M., *et al.* Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J Exp Med* **206**, 1913-1927 (2009).
138. Mackman, N. Mouse models, risk factors, and treatments of venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 554-555 (2012).
139. Diaz, J.A., *et al.* Critical review of mouse models of venous thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 556-562 (2012).
140. Antic, D., *et al.* Development and validation of multivariable predictive model for thromboembolic events in lymphoma patients. *Am J Hematol* **91**, 1014-1019 (2016).
141. Gussoni, G., *et al.* Three-month mortality rate and clinical predictors in patients with venous thromboembolism and cancer. Findings from the RIETE registry. *Thromb Res* **131**, 24-30 (2013).
142. Johnson, M.J., Sproule, M.W. & Paul, J. The prevalence and associated variables of deep venous thrombosis in patients with advanced cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **11**, 105-110 (1999).

143. Wakefield, T.W., Myers, D.D. & Henke, P.K. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 387-391 (2008).
144. Lin, J., *et al.* Factors associated with recurrent venous thromboembolism in patients with malignant disease. *J Vasc Surg* **37**, 976-983 (2003).
145. Ripplinger, C.M., *et al.* Inflammation modulates murine venous thrombosis resolution in vivo: assessment by multimodal fluorescence molecular imaging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 2616-2624 (2012).
146. Varma, M.R., *et al.* Neutropenia impairs venous thrombosis resolution in the rat. *J Vasc Surg* **38**, 1090-1098 (2003).
147. Basavaraj, M.G., Braekkan, S.K., Brodin, E., Osterud, B. & Hansen, J.B. Monocyte count and procoagulant functions are associated with risk of venous thromboembolism: the Tromso study. *J Thromb Haemost* **9**, 1673-1676 (2011).
148. Osterud, B. & Bjorklid, E. Tissue factor in blood cells and endothelial cells. *Front Biosci (Elite Ed)* **4**, 289-299 (2012).
149. Qureshi, W., *et al.* Venous Thromboembolism in Cancer: An Update of Treatment and Prevention in the Era of Newer Anticoagulants. *Front Cardiovasc Med* **3**, 24 (2016).
150. Kuderer, N.M., Ortel, T.L. & Francis, C.W. Impact of venous thromboembolism and anticoagulation on cancer and cancer survival. *J Clin Oncol* **27**, 4902-4911 (2009).
151. Geddings, J.E. & Mackman, N. New players in haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost* **111**, 570-574 (2014).
152. Weitz, J.I., Jaffer, I.H. & Fredenburgh, J.C. Recent advances in the treatment of venous thromboembolism in the era of the direct oral anticoagulants. *F1000Res* **6**, 985 (2017).

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: vereinfachte Übersicht des Pathomechanismus der venösen Thrombose, modifiziert nach ^{24,25}	4
Abbildung 2: Blutströmung und hypoxische Regionen im Bereich von Venenklappen, modifiziert nach ^{23,27}	5
Abbildung 3: Darstellung von antikoagulatorischen Faktoren auf der Oberfläche von Endothelzellen, modifiziert nach ³⁶	6
Abbildung 4: Monozytäre und endotheliale Signalwege bei Hypoxie induzierter venöser Thrombose, modifiziert nach ²⁷	7
Abbildung 5: Übergang von koagulatorisch inaktivem Tissue Factor zu koagulatorisch aktivem Tissue Factor – vermutlicher Mechanismus unter Einfluss von PDI, modifiziert nach ⁴⁸	8
Abbildung 6: Mikropartikel in schematischer Darstellung, mit freundlicher Genehmigung von Dr. Irene Schubert, LMU München	10
Abbildung 7: Zusammenwirken von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten in der Entstehung venöser Thrombosen, modifiziert nach ⁸¹	12
Abbildung 8: Histologischer Schnitt einer Vene mitsamt Venenklappe in HE Färbung, modifiziert nach ²⁷	12
Abbildung 9: Makro- und mikroskopische Ansicht eines venösen Thrombus 48 h nach Ligatur der murinen Vena cava caudalis, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Massberg und Dr. Chandraratne, LMU München.....	13
Abbildung 10: Tissue Factor positive Mikropartikel von Tumorzellen und Wirtszellen als mögliche Trigger der tumorassoziierten venösen Thrombose, modifiziert nach ⁷	15
Abbildung 11: Screenshot Cap Image 8.6.3 - Bestimmung der rechteckigen Gesamtfläche.....	27
Abbildung 12: Screenshot Cap Image 8.6.3 - Bestimmung aller schwarzen Pixel innerhalb der Gesamtfläche	27
Abbildung 13: Screenshot Cap Image 8.6.3 - Bestimmung der umfahrenden runden Fläche (rote Linie)	28
Abbildung 14: Screenshot Cap Image 8.6.3 - Bestimmung der rechteckigen Gesamtfläche.....	28

Abbildung 15: Screenshot Cap Image 8.6.3 - Bestimmung von CD41 positiven Bereichen innerhalb der Gesamtfläche	29
Abbildung 16: Screenshot Cap Image 8.6.3 - Bestimmung der gesamten Fläche des Thrombusquerschnitts (rote Linie)	29
Abbildung 17: Makroskopische Ansicht venöser Thromben in Situ 48h nach Ligatur der Vena cava caudalis unter Einfluss von Blut-MP bzw. L3.6pl-MP.....	30
Abbildung 18: Quantitative Auswertung von Leukozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten innerhalb von Blut-MP und L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben	31
Abbildung 19: Immunhistologische Visualisierung der Thrombuskomposition von L3.6pl-MP und Blut-MP assoziiertem venösen Thrombus.....	32
Abbildung 20: Mikropartikel am Übergang von dichter zu loser Fibrin(-ogen) Struktur	33
Abbildung 21: Immunhistologische Visualisierung eines venösen Thrombus unter Einfluss von Blut-MP im Längsschnitt	33
Abbildung 22: Immunhistologische Visualisierung eines L3.6pl-MP induzierten venösen Thrombus im Längsschnitt	34
Abbildung 23: Immunhistologische Färbung eines L3.6pl-MP induzierten venösen Thrombus zur Beurteilung der Interaktion von Mikropartikeln mit Endothelzellen, myeloiden Zellen und Thrombozyten	35
Abbildung 24: Immunhistologische Visualisierung eines KPC-MP assoziierten venösen Thrombus in überlagerter Übersicht und Ausschnittvergrößerung.....	36
Abbildung 25: Quantitative Auswertung von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten innerhalb von L3.6pl-MP und KPC-MP assoziierten venösen Thromben	36
Abbildung 26: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in GPIb/IL-4R Mäusen.....	38
Abbildung 27: Quantitative Auswertung von Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in Kontroll- und GPIb/IL-4R Gruppe.....	38
Abbildung 28: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in Thrombozyten depletierten Mäusen und Isotyp Kontrolle	39

Abbildung 29: Quantitative Auswertung von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in Kontroll- und Thrombozyten depletierter Gruppe	39
Abbildung 30: Immunhistologische visualisierte Übersicht und Ausschnittvergrößerung von L3.6pl-MP assoziiertem venösen Thrombus in SELP ^{-/-} Mäusen.....	40
Abbildung 31: Quantitative Auswertung von Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in Kontroll- und SELP ^{-/-} Gruppe.....	41
Abbildung 32: Quantitative Auswertung von Thrombozyten und Leukozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in Kontroll- und neutrophilen Granulozyten depletierter Gruppe	42
Abbildung 33: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in mit anti-Ly6G Antikörpern behandelten Mäusen	42
Abbildung 34: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in mit Isotyp Antikörpern behandelten Mäusen	43
Abbildung 35: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in mit Faktor XII Inhibitor PCK behandelten Mäusen.....	44
Abbildung 36: Quantitative Auswertung von Thrombozyten, Leukozyten und neutrophilen Granulozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in Kontroll- und PCK Gruppe	44
Abbildung 37: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in mit anti-TF und Isotyp Antikörpern behandelten Mäusen.	45
Abbildung 38: Quantitative Auswertung von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in Kontroll- und anti-TF Gruppe	46
Abbildung 39: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in low-hTF und HCV Mäusen	47
Abbildung 40: Quantitative Auswertung von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in HCV und low hTF Gruppe.....	47
Abbildung 41: Immunhistologisch visualisierte Übersicht eines L3.6pl-MP assoziierten venösen Thrombus in LysM ^{Cre-} TF ^{flox/flox} und LysM ^{Cre+} TF ^{flox/flox} Mäusen.....	48

XIII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg für die Aufnahme in sein Forschungslabor, die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die stets offene, inspirierende und unterstützende Art, die ich während der Erstellung dieser Arbeit ebenso geschätzt habe, wie seine wissenschaftliche und klinische Expertise.

Herrn Dr. med. Konstantin Stark gebührt mein größter Dank für die Betreuung meiner Promotion. Durch seine Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, seine Leidenschaft bei den geschätzten Diskussionen der Ergebnisse und auch durch seine Geduld trägt er einen sehr bedeutenden Anteil am Entstehen dieser Arbeit.

Zudem danke ich Frau Dr. med. vet. Marie-Luise von Brühl, Frau Dr. med. vet. Irene Schubert, Herrn Michael Lorenz, Frau Dr. med. vet. Sue Chadaratne, Frau Dr. med. vet. Anna Eckart, Herrn Dr. Johannes Beil, Herrn Dr. Florian Gärtner, Herrn Dr. med. vet. Alexander Steinhart, Frau Anne Suhr, sowie allen weiteren Doktoranden und Mitarbeitern der AG Massberg für die tägliche Unterstützung und den wissenschaftlichen Austausch bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. med. Konstantinos Dimitriadis und Herrn Dr. med. Severin Pinilla danken. In ihrer Rolle als Vorbilder, Mentoren und Freunden haben sie mich im Entstehungsprozess dieser Arbeit wie auch bei der ein oder anderen extracurricularen Idee unterstützt.

Zum Schluss gilt mein großer Dank meiner Familie sowie meinen guten Freunden und Kommilitonen die mich während der gesamten Promotionszeit begleitet und unterstützt haben. Besonders zu nennen sind hier neben meiner Familie, Frau Lisa Basten, Herr Samuel Fisser, Herr Dr. med. Florian Gothe, Herr Christian Spicker, Frau Laura Schlemmer, Herr Dr. med. Constantin Jotzu, Herr Andreas Ernst, Herr Philip Krätzig, Frau Lou Hofmann, die gesamte Familie Teubner-Kropff sowie alle Mitglieder der Studentenvereinigung „SMC“.

Abbildung 42: Quantitative Auswertung von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten innerhalb von L3.6pl-MP assoziierten venösen Thromben in LysM Cre- TF flox/flox und LysM Cre+ TF flox/flox Mäusen 48

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Thrombophile Risikosituationen und -faktoren, modifiziert nach ²⁰ 3

Tabelle 2: Agenzien bzw. deren Kombination zur Blockierung unspezifischer Bindungen in Abhängigkeit vom folgenden Primärantikörper 23

Tabelle 3: Markierung von CD 45 24

Tabelle 4: Markierung von Ly-6G bzw. GR-1 24

Tabelle 5: Markierung von F4/80 24

Tabelle 6: Markierung von CD 41 bzw. GPIIb 25

Tabelle 7: Markierung von Fibrin, Fibrinogen und Fibrinogen Fragment D und E ¹²⁵ 25

Tabelle 8: Markierung von CD 54 bzw. ICAM-1 25

XI. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung	mm ²	Quadratmillimeter
BSA	Bovines Serumalbumin	MP	Mikropartikel
bzw.	beziehungsweise	µg	Mikrogramm
°C	Grad Celsius	µm	Mikrometer
ca.	circa	µm ²	Quadratmikrometer
CD	Cluster of Differentiation	µl	Mikroliter
cm	Zentimeter	NaCl	Natriumchlorid(lösung)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole	NET	Neutrophil Extracelluar Trap
DCF	5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetat	nm	Nanometer
d.h.	das heißt	PBS	Phosphat buffered saline
etc.	Et cetera	PCK	H-D-Pro-Phe-Argchloromethylketone

Fc	fragment crystallizable	PDI	Proteindisulfidisomerase
g	gramm	PolyP	Polyphosphate
x g	x-faches der Erdbeschleunigung	PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
GP	Glykoprotein	Tab.	Tabelle
h	Stunde	TF	Tissue Factor
HE	Hämatoxylin-Eosin	TF+ MP	Tissue Factor positive Mikropartikel
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1	asTF	alternativ gesplicter Tissue Factor
IgG	Immunglobulin G	fITF	full length Tissue Factor
IL	Interleukin	TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure	Überl.	Überlagerung
mg	Milligramm	vWF	von Willebrand-Faktor
min	Minute	WPB	Weibel Palade Bodies
ml	Milliliter	z.B.	zum Beispiel
mm	Millimeter		

XII. VERÖFFENTLICHUNGEN

Aus dem Projekt hervorgegangene Veröffentlichung:

Stark, K. *et al.* Distinct Pathogenesis of Pancreatic Cancer Microvesicle-Associated Venous Thrombosis Identifies New Antithrombotic Targets in Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **38**, 772–786 (2018).

Eidesstattliche Versicherung

Schmidergall, Tobias

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Thrombuskomposition bei Tumormikropartikel-assoziiierter venöser Thrombose

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 22.10.2018

Ort, Datum

Tobias Schmidergall

Unterschrift Doktorandin/Doktorand