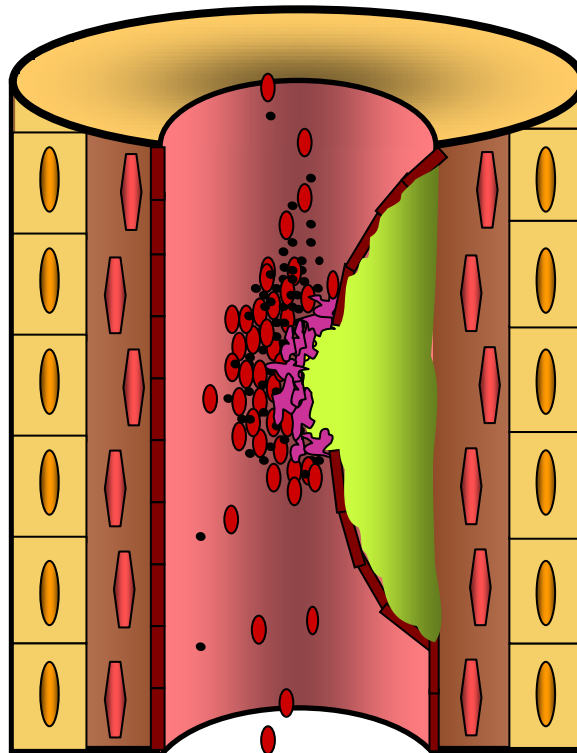


Aus dem Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern, LMU München

Komm. Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel

Initiale Gerinnungsaktivierung durch Mikropartikel-Plättchen-Interaktionen und zelluläre RNA



Dissertation

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

vorgelegt von

Berid Altmann

aus

Hamburg

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Engelmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Armin J. Reiningger

Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. Dorit Nägler

Mitberichtersteller: Prof. Dr. Stephan Nees

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2009

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	9
1. Einleitung	10
1.1 Fibrinbildung – lebenswichtig aber auch lebensgefährlich	10
1.2 <i>Tissue Factor</i> (TF) – das zentrale Starterprotein der Gerinnung	10
1.3 Intravasaler oder <i>blood borne</i> TF (iTf)	13
1.4 <i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i> (TFPI)	15
1.5 Mikropartikel – Zellmembranfragmente mit prokoagulatorischem Potential	16
1.6 Pathophysiologie der Mikropartikel	18
1.7 Mikropartikel-Zell-Interaktionen	19
1.8 <i>Factor VII Activating Protease</i> (FSAP): TF-unabhängige Aktivierung von Faktor VII	21
1.9 Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel	24
2.1.2 Puffer	24
2.1.3 Blut-, Zell- und Mikropartikelpräparationen	25
2.1.4 Thrombelastographie	26
2.1.5 Faktor Xa Bildung	26
2.1.6 Durchflusszytometrie	27
2.1.7 Zellkultur	27
2.1.8 RNA-Interferenz	27
2.1.9 Flusskammer-Experimente	27
2.1.10 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) und Gelelektrophorese	27
2.1.11 Materialien und Geräte	28
2.2 Methoden	29
2.2.1 Blut-, Zell- und Mikropartikelpräparationen	29
2.2.1.1 Probanden und Blutentnahme	29

2.2.1.2 Gewinnung von plättchenreichem (PRP) und plättchenarmem (PAP) Plasma	29
2.2.1.3 Isolierung von Plättchen	29
2.2.1.4 Isolierung von neutrophilen Granulozyten	30
2.2.1.5 Monozytenisolierung	31
2.2.1.6 Bestimmung der Zellzahl	32
2.2.1.7 Mikropartikelisolierung aus Vollblut	32
2.2.1.8 Mikropartikelproduktion durch stimulierte Blutzellen	33
2.2.2 Gewinnung des Lipidkerns atherosklerotischer Plaques	33
2.2.3 Thrombelastographie	34
2.2.3.1 Messprinzip	34
2.2.3.2 Protokoll: Gerinnungsaktivierung durch Plaquematerial	36
2.2.3.3 Protokoll: Gerinnungsaktivierung durch RNA und DNA	37
2.2.4 Faktor Xa Bildung	37
2.2.4.1 Messprinzip	37
2.2.4.2 Protokoll: Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen	38
2.2.4.3 Protokoll: Plättchen und monozytäre Mikropartikel	39
2.2.4.4 Protokoll: Zelluläre RNA und FSAP	40
2.2.5 Durchflusszytometrie	40
2.2.5.1 Messprinzip	40
2.2.5.2 Protokoll: Bestimmung der Mikropartikel-Zahl	41
2.2.6 Zellkultur	41
2.2.6.1 Einfrieren, Auftauen und Revitalisieren von Zellen	42
2.2.6.2 Mikropartikelproduktion durch THP-1 Zellen	42
2.2.7 RNA-Interferenz	43
2.2.7.1 Methodenbeschreibung	43
2.2.7.2 Protokoll: Zelltransfektion mit TF-siRNAs	44
2.2.7.3 Reverse Transkriptions-PCR von TF-RNA	45
2.2.7.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	46
2.2.8 Flusskammermodell	46
2.2.8.1 Methodenbeschreibung	46
2.2.8.2 Protokoll: Flusskammer	47
2.2.9 Statistik	48
3. Ergebnisse	49
3.1 Faktor X Aktivierung durch aktivierte Plättchen und PAP	49
3.2 TF-abhängige Gerinnungsaktivierung durch Mikropartikel-Plättchen-Interaktionen	50
3.3 Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zur Bestimmung der Mikropartikel-Zahl	51
3.4 Interaktionen von Plättchen und zellspezifischen Mikropartikeln im Vergleich	52
3.5 Gerinnungsaktivierung durch atherosklerotische Plaques	54
3.6 Bedeutung des Mikropartikel- und des Plättchen-assoziierten TF für die prokoagulatorische Aktivität	56
3.7 Methodenetablierung zur Produktion TF-depletierter Mikropartikel	58
3.8 Mikropartikel und Plättchen unter Flussbedingungen	59
3.9 Mechanismen der TF-Aktivierung	61
3.10 Zelluläre RNA: Kofaktor der FSAP-initiierten Blutgerinnung	64

4. Diskussion	68
4.1 Intramuraler und intravasaler TF (iTf)	68
4.2 Intravasale Mikropartikel	71
4.3 Mikropartikel-Plättchen-Interaktionen	73
4.4 Proteaseinhibitoren und TFPI	74
4.5 Monozytäre Mikropartikel	76
4.6 Mechanismen der TF-Aktivierung	77
4.7 FSAP und RNA: TF-unabhängige Gerinnungsinitiierung	78
5. Zusammenfassung	82
6. Literaturverzeichnis	83
7. Anhang	94
7.1 Danksagung	94
7.2 Lebenslauf	95

Publikationen

Reinhardt C, von Brühl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, **Altmann B**, Dlugai S, Hess S, Konrad I, Orschiedt L, Mackman N, Ruddock L, Massberg S, Engelmann B: Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Inv* 2008; 118: 1110-1122.

von Brühl ML, Grahl L, Konrad I, Lorenz M, Schulz M, Reinhardt C, Manukyan D, **Altmann B**, Dlugai S, Mackman N, Massberg S, Engelmann B: Protein Disulfide Isomerase (PDI) signals Tissue Factor (TF)-dependent Fibrin formation in vivo. *Circulation* 2007; 116: II_156. (abstract)

Grahl L, von Brühl M, Reinhardt C, Manukyan D, **Altmann B**, Dlugai S, Konrad I, Lorenz M, Mackmann N, Massberg S, Engelmann B: Protein Disulfide Isomerase (PDI) uncovers Tissue Factor (TF)-dependent fibrin formation after vessel injury. *J Thromb Haemost* 2007; 5: Abstract-Number: O-W-042. (abstract)

Altmann B, Götz C, Reinhardt C, Engelmann B: Interactions between microparticles and platelets foster initiation of coagulation. *Platelets* 2006; 17: 108-125. (abstract)

Altmann B, Durda J, Böer A, Reich K: Disseminiertes Granuloma anulare – Therapieoption: Clofazimine (Lamprene®). *JDDG* 2009; 7: Abstract-Number: P 17/04. (abstract)

Abkürzungsverzeichnis

AT	α_1 -Antitrypsin
ACT	α_1 -Antichymotrypsin
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CFT	Clot Formation Time (Thrombuswachstumsrate)
CHO-Zellen	Chinese-Hamster-Ovary Zellen
CHO-DNA	Chinese-Hamster-Ovary cell DNA
CHO-RNA	Chinese-Hamster-Ovary cell RNA
CMK	Chloromethylketone
CT	Coagulation Time (Gerinnungszeit)
CTI	Corn Trypsin Inhibitor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F	Faktor
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Flouresceinisothiocyanat
FSAP	Factor VII Activating Protease
fMLP	N-formyl-Met-Leu-Phe
GP	Glykoprotein
h	hours (Stunden)
Hanks BSS Medium	Hanks Balanced Salt Sodium Medium
IgG	Immunglobulin G
iTF	intravasaler Tissue Factor
kDa	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minuten
MP	Mikropartikel
mRNA	messenger-RNA
P	Blutplättchen
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PAP	plättchenarmes Plasma
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Prek.-I	Prekallikrein-Inhibitor
Prek./ FXI-I	Prekallikrein/ Faktor XI-Inhibitor
PRP	plättchenreiches Plasma
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
RNA	Ribonukleinsäure

RNase
s
siRNA
TF
TFPI
TNC
VB

Ribonuklease
Sekunden
small interfering RNA
Tissue Factor
Tissue Factor Pathway Inhibitor
Trinatriumcitrat
Vollblut

Abbildungsverzeichnis

Abb. Titel:	Thrombusbildung nach Plaqueruptur	1
Abb. 1:	Vereinfachte Darstellung des Blutgerinnungssystems	12
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Mikropartikelbildung und Membranstruktur	17
Abb. 3:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von TF-präsentierenden Mikropartikeln	17
Abb. 4:	Erkrankungen, die mit einer erhöhten Anzahl an zellspezifischen Mikropartikeln einhergehen	19
Abb. 5:	<i>Real time</i> intravitalmikroskopische Bilder sich entwickelnder Thromben in Mäusen	20
Abb. 6:	Primärstruktur von FSAP	21
Abb. 7:	Das MiniMACS Verfahren zur Zellisolierung	31
Abb. 8:	Das Prinzip der Thrombelastographie	35
Abb. 9:	Beispiel eines Thrombelastogrammes	36
Abb.10:	Versuchsprinzip der Faktor Xa Bildung	38
Abb.11:	Modell der RNA-Interferenz	44
Abb.12:	Das Staupunkt-Flusskammersystem	47
Abb.13:	TF-Aktivität in Suspensionen aus Plättchen und PAP	49
Abb.14:	TF-abhängige Faktor Xa Bildung in Suspensionen aus Mikropartikeln und Plättchen	50
Abb.15:	Annexin V markierte Mikropartikel in der Durchflusszytometrie	52
Abb.16:	TF-Aktivität verschiedener zellspezifischer Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen	53
Abb.17:	TF-abhängige Fibrinbildung nach Zugabe von Plaquematerial zu VB	55
Abb.18:	Gerinnungszeit (CT) und Thrombuswachstumsrate (CFT) im PRP nach Zugabe von atherosklerotischem Plaquematerial	55
Abb.19:	Mittelwerte der CT von VB, PRP und PAP	56
Abb.20:	Faktor X Aktivierung durch Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen vor und nach spezifischer TF-Inhibierung	57
Abb.21:	TFmRNA-Expression von THP-1 Zellen vor und nach Transfektion mit TF-spezifischer siRNA	58
Abb.22:	Mikropartikel-Plättchen-Interaktionen unter Flussbedingungen	60
Abb.23:	TF-Aktivität von Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen vor und nach Zugabe von Proteaseinhibitoren	62
Abb.24:	TF-Aktivität von Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen nach Zugabe von Thiolisomerase-Inhibitoren	63
Abb.25:	Faktor X Aktivierung durch FSAP und zelluläre RNA	65
Abb.26:	CT und CFT nach Zugabe von zellulärer RNA und DNA zu VB	66
Abb.27:	Vollblutgerinnungszeiten nach RNA-Aktivierung und Zugabe von Aktivatoren und Inhibitoren der Kontaktaktivierung	67
Abb.28:	Modell der Thrombusbildung nach Ruptur eines vulnerablen Plaque	70
Abb.29:	Schematische Darstellung der Mikropartikelbildung und Auflistung der präsentierten Oberflächenmoleküle	71
Abb.30:	Hypothetisches Modell der Gerinnungsaktivierung durch RNA	81

1. Einleitung

1.1 Fibrinbildung – lebenswichtig aber auch lebensgefährlich

Die Bildung von Fibrin ist ein entscheidender Abwehr- und Reparaturmechanismus des Körpers, der für die Integrität des Gefäßsystems von besonderer Wichtigkeit ist (Dahlbäck, 2000; Schenone et al., 2004; Gomez et al., 2006). Bei einer Gefäßverletzung kommt es neben der sofortigen Adhäsion und Aggregation von Blutplättchen durch rasche Gerinnungsaktivierung zur Fibrinbildung, welche für den Verschluss der Läsion und somit die Verhinderung von gefährlichen Blutverlusten lebenswichtig ist. Andererseits kann eine pathologische, überschießende Bildung von Fibrin die Entwicklung von lebensgefährlichen arteriellen und venösen Thrombosen begünstigen (Steffel et al., 2006; Mackman et al., 2007). Diese können schwerwiegende Komplikationen wie Myokardinfarkt und Apoplex auslösen und stellen mit Abstand die häufigste Todesursache in den industrialisierten Ländern dar. Die genaue Erforschung des kompliziert regulierten Gerinnungssystems unseres Körpers ist für das Verständnis der physiologischen Blutgerinnung und die Entwicklung neuer Strategien zur erfolgreichen Behandlung überschießender Gerinnungsaktivierung von entscheidender Bedeutung für die Medizin.

1.2 *Tissue Factor* (TF) – das zentrale Starterprotein der Gerinnung

Tissue Factor (auch als Blutgerinnungsfaktor III, CD 142, Thrombokinase oder Thromboplastin bekannt) ist ein glykosyliertes 47 Kilo-Dalton (kDa) großes, integrales Zellmembranprotein der Zytokin-Rezeptor-Superfamilie und der wahrscheinlich wichtigste Initiator der physiologischen Blutgerinnung. Das reife Protein entsteht nach Abspaltung einer *leader* Sequenz und wird in eine 219 Aminosäuren lange extrazelluläre, eine 23 Aminosäuren umfassende transmembranöse und eine 21 Aminosäuren kurze zytoplasmatische Domäne unterteilt (Edgington et al., 1991; Eilertsen et al., 2004). In die extrazelluläre Domäne sind drei Glykolisierungsstellen und zwei Disulfidbrücken eingebaut. Nach klassischer Ansicht wird *Tissue Factor* (TF) vor allem in Fibroblasten und glatten Muskelzellen der Gefäßwand exprimiert und umgibt das Gefäß wie eine schützende Hülle (Drake et al., 1989; Fareed et al., 1995). Kommt dieser sogenannte intramurale

TF im Rahmen einer Gefäßverletzung oder Thrombusruptur mit Blut in Berührung, führt er zur sofortigen Aktivierung des Gerinnungssystems. Es kommt zur Thrombusbildung und zu einem raschen Verschluss der Gefäßverletzung. Die Blutgerinnungskaskade initiiert TF durch Ausbildung eines Komplexes mit dem Blutgerinnungsfaktor VIIa. Dabei steigert TF die proteolytische Aktivität der Serinprotease Faktor VIIa um ein Vielfaches und führt damit zur Aktivierung der Faktoren X und IX (Abb. 1). Faktor IXa bildet zusammen mit Faktor VIII den membrangebundenen *intrinsic tenase*-Komplex, welcher ebenfalls Faktor X zu Xa zu aktivieren vermag. Der gebildete Faktor Xa spaltet anschließend als Teil des Prothrombinasekomplexes zusammen mit Faktor Va, sowie durch Interaktion mit auf der Zelloberfläche exponierten Phospholipiden, Prothrombin zu Thrombin (Mann et al., 1988; Lane et al., 2005) und ermöglicht damit die Bildung von Fibrin und die Aktivierung von adhärennten Plättchen (Abb. 1). Sobald geringe Mengen an Thrombin gebildet wurden, werden die Faktoren V, VIII und XI rückkoppelnd aktiviert (Baglia et al., 2000; Yun et al., 2003), wodurch größere Mengen an Thrombin und schließlich Fibrin gebildet werden (Abb. 1). Durch die Verknüpfung unterschiedlicher, sich gegenseitig aktivierender Komplexe kommt es zu einer massiven Amplifizierung des ursprünglichen Signals und damit zu einem schnelleren Stillstand der Blutung nach einer Verletzung. Die Regulation der Blutgerinnung erfolgt auf verschiedenen Ebenen der Kaskade, entweder durch Inhibierung der beteiligten Faktoren oder durch Veränderung der Aktivität von Kofaktoren. So werden u.a. die Enzyme Thrombin, Faktor IXa und Faktor Xa durch den Serinproteasen-Inhibitor Antithrombin inaktiviert (Gomez et al., 2006). Zusätzlich bindet Thrombin an das auf Endothelzellen exprimierte Thrombomodulin und aktiviert somit Protein C, welches zusammen mit seinem Kofaktor Protein S die Aktivität des *intrinsic tenase*- und des Prothrombinase-Komplexes durch Proteolyse der Faktoren VIIIa und Va reduziert (Dahlbäck et al., 2005; Espana et al., 2005). Andererseits kann die Fibrinbildung auch durch Aktivierung der sogenannten „Kontaktphase“ ausgelöst werden. Die Aktivierung dieses Systems unter physiologischen Bedingungen *in vivo* ist noch nicht vollständig geklärt. *In vitro* wird Faktor XII durch den Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen über Autoaktivierung in Faktor XIIa überführt und kann dann inaktives Prekallikrein zu aktivem Kallikrein spalten (Abb. 1). Kallikrein wiederum vermag in einem Komplex an Zelloberflächen mit Kininogenen ebenfalls Faktor XII zu aktivieren (Shore et al., 1987; Schousboe, 1993; Mahdi et al., 2001) (Abb. 1). Dieser positive Feedback-

Mechanismus führt zu einer Amplifizierung des ursprünglichen Signals und somit zur Bildung von hohen Konzentrationen an Faktor XII, welcher seinerseits Faktor XI zu XIa spaltet. Der an den Kontaktphasen-Komplex gebundene Faktor XIa aktiviert sodann Faktor IX (Schmaier et al., 1999) (Abb. 1). Die beiden Prozesse der TF- und der kontaktinitiierten Fibrinbildung wurden früher als strikt voneinander unabhängig angesehen. Jedoch wurden viele Quervernetzungen, wie zum Beispiel die Aktivierung von Faktor IX durch den TF/VIIa-Komplex und Faktor XI beschrieben (Osterud et al., 1977; Bom et al., 1991; Rapaport et al., 1992). Mittlerweile betrachtet man beide Systeme daher als ein zusammenhängendes, von verschiedenen Initiatoren aktiviertes Blutgerinnungssystem (Abb.1).

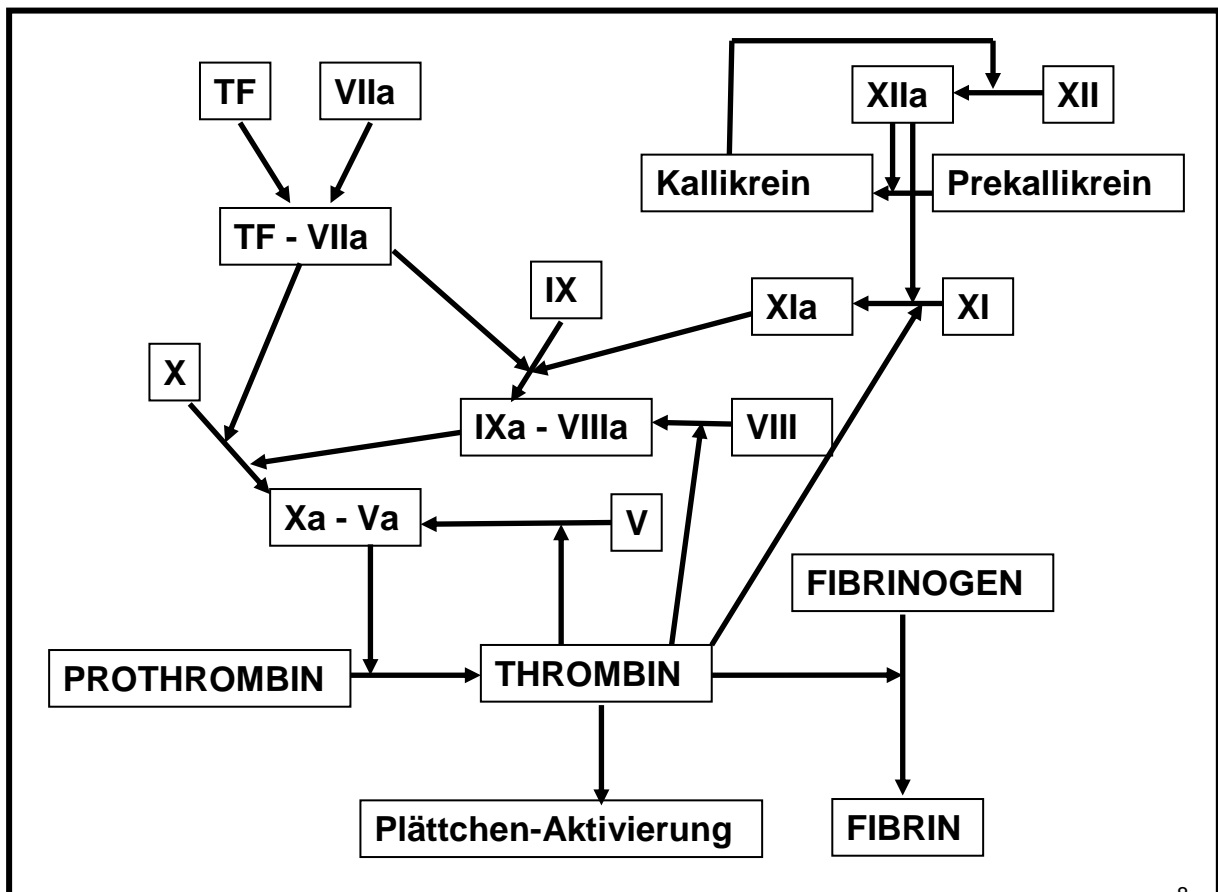


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung des Blutgerinnungssystems

Der TF/VIIa-Komplex aktiviert Faktor X zu Xa und Faktor IX zu IXa. Faktor IX bildet mit dem Kofaktor Faktor VIIIa einen Komplex, der ebenfalls große Mengen Faktor X in Xa zu überführen vermag. Faktor Xa löst zusammen mit Faktor Va im Prothrombinasekomplex die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin aus. Thrombin ist in der Lage sowohl Fibrinogen in Fibrin zu überführen und Plättchen zu aktivieren, als auch über positive Rückkoppelung Faktor V, Faktor VIII und Faktor XI zu aktivieren. Zusätzlich kann Faktor XII durch den Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen über Autoaktivierung in Faktor XIIa überführt werden und Prekallikrein zu Kallikrein spalten. Kallikrein führt über einen positiven Feedback-Loop ebenfalls zur Aktivierung großer Mengen Faktor XII. Dieser spaltet Faktor XI zu XIa, welcher dann durch Aktivierung des *intrinsic tenase*-Komplexes (Faktoren IXa und VIIa) ebenfalls Faktor X in Xa überführt.

1.3 Intravasaler oder *blood borne* TF (iTF)

Neuere Untersuchungen verschiedener Forschungsgruppen konnten neben dem intramuralen TF der Gefäßwand auch TF-Antigen im Blut gesunder Probanden nachweisen (Koyama et al., 1994; Albrecht et al., 1996; Zumbach et al. 1997; Giesen et al., 1999). Diese neu entdeckte Form des TF wurde intravasaler oder *blood borne* TF (iTF) genannt und konnte auf der Oberfläche von Blutzellen und Mikropartikeln nachgewiesen werden (Giesen et al., 1999; Zillmann et al., 2001; Camera et al., 2003; Engelmann et al., 2003; Müller et al., 2003). Hierbei sind Zellen, die TF erst nach transkriptioneller Aktivierung des TF-Gens exprimieren (Monozyten) von anderen Zellen des Gefäßsystems, die TF präformiert aufweisen (Plättchen, eosinophile Granulozyten), zu unterscheiden. Aktivierte Blutplättchen können TF in der Tat schnell auf der Zelloberfläche präsentieren. Dabei ist der Plättchen-assoziierte TF vorwiegend in den alpha-Granula gespeichert (Müller et al., 2003). Eosinophile Granulozyten speichern TF ebenfalls in spezifischen Granula und weisen unter allen unstimulierten Blutzellen den höchsten TF-Gehalt auf (Moosbauer et al., 2007). Im Blutplasma ist TF nahezu ausschließlich in zirkulierenden Mikropartikeln zu finden (Misumi et al., 1998; Giesen et al., 1999; Müller et al., 2003; Hugel et al., 2005). Eine durch alternatives Splicing entstandene Variante von TF bildet nur einen kleinen Anteil des gesamten TF-Pools des Plasmas. Sie besitzt den Großteil der extrazellulären Domäne, jedoch fehlt ihr die transmembranöse TF Domäne (Bogdanov et al., 2003). Diese Variante ist der auf Zelloberflächen und Mikropartikeln exprimierten *full length* Form in ihrer funktionellen Aktivität deutlich unterlegen (Neuenschwander et al., 1992; Lösche, 2005). Doch auch der auf der Oberfläche von aktivierten Zellen und Mikropartikeln präsentierte *full length* TF scheint unter physiologischen Bedingungen zum Großteil in einer inaktiven, sogenannten *encrypted* Form vorzuliegen (Müller et al., 2003; Bach, 2006). Er bindet den Gerinnungsfaktor VIIa, ist aber kaum in der Lage die Blutgerinnung zu initiieren. Es ist zu vermuten, dass die Verschlüsselung (*encryption*) des iTF unter physiologischen Bedingungen eine überschießende Blutgerinnungsaktivierung verhindert.

Interessanterweise wurde bei verschiedenen Patienten, die an kardiovaskulären oder hämatologischen Erkrankungen litten, ein erhöhter Gehalt an TF-Antigen im Blut gefunden (Fareed et al., 1995; Gando et al., 1998; Key et al., 1998; Koy et al., 1998).

Außerdem kommt es unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. bei der Thrombusbildung nach Gefäßverletzung oder Plaqueruptur zu einer Aktivierung des iTF (Balasubramanian et al., 2002), was möglicherweise ganz entscheidend zur pathologischen Fibrinbildung im Rahmen der Thrombogenese beiträgt (Bach, 2003). Die Hypothese einer wichtigen Rolle des iTF bei der Thrombusbildung wird durch folgende Überlegung gestützt: Zur Fibrinbildung ist die Ausbildung des Prothrombinasekomplex durch die aktivierten Faktoren X und V auf der Plättchenoberfläche entscheidend. Lagern sich Plättchen während der Thrombogenese an einen rupturierten atherosklerotischen Plaque oder an die verletzte Gefäßwand an, so bildet sich dadurch eine impermeable Barriere für Faktor Xa. Wären in dieser Situation nur Gefäßwandzellen in der Lage TF zu exprimieren, würde die Bildung des Blutgerinnsels dadurch deutlich erschwert werden. Es wurde daher postuliert, dass sich funktionell aktiver TF auch auf der Oberfläche von aktivierten Plättchen und der Membran von rekrutierten Mikropartikeln befindet (Engelmann et al., 2003). Es existieren verschiedene Hypothesen zur Entschlüsselung von TF: Bach et al. fanden 1998 eine erhöhte prokoagulatorische Aktivität von TF exprimierenden Zellen nach Ca^{2+} -Einstrom und erklärten dies durch eine Ca^{2+} -abhängige Änderung der quaternären Struktur des TF Moleküls und Freilegung des aktiven Zentrums (Bach et al., 1998). Nach Osterud et al. besteht die Möglichkeit, dass TF-reiche monozytäre Mikropartikel mit Plättchen-Mikropartikeln interagieren und so unter anderem Partikel mit entschlüsselter TF-Aktivität entstehen (Osterud et al., 2001). Auch wurde die Aktivierung des monozytären TF durch die Bereitstellung von prokoagulatorischen Phospholipiden auf der Membran aktivierter Plättchen postuliert (Key et al., 2001; Bach, 2003). Nach Rehemtulla et al. ist die Integrität der Disulfidbrücke Cys¹⁸⁶-Cys²⁰⁹ der extrazellulären Domäne des TF für die Entschlüsselung/ Verschlüsselung von entscheidender Bedeutung für die TF-Aktivität (Rehemtulla et al., 1991). Der genaue Aktivierungsprozess des iTF ist jedoch trotz intensiver Untersuchungen bislang weitgehend ungeklärt.

1.4 Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI)

Der sogenannte Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) ist der direkte Gegenspieler von TF und einer der wichtigsten Inhibitoren der physiologischen Blutgerinnung im menschlichen Organismus (Lwaleed et al., 2005; Polgar et al., 2005). TFPI ist in der Lage die funktionelle Aktivität des TF/VIIa/Xa-Komplexes durch Bindung seiner Kunitz 1 und Kunitz 2 Domänen an die Faktoren VIIa und Xa rasch zu inhibieren und damit die TF-initiierte Blutgerinnungsaktivierung zu stoppen (Broze, 1995; Bajaj et al., 2001). TFPI konnte in großen Mengen in Endothelzellen und anderen Gefäßwandzellen gefunden werden (Grabowski et al., 2001), wird aber auch von aktivierten Blutplättchen sezerniert (Novotny et al., 1998; Engelmann et al., 2003). Er ist für die Aufrechterhaltung der normalen Hämostase unerlässlich (Broze, 1995). Durch bestimmte pathophysiologische Prozesse kann es zur Inaktivierung von TFPI und zu einer vermehrten Blutgerinnungsaktivierung kommen. So konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen einer Plättchen-Leukozyten-Interaktion zu einer Inaktivierung des Plättchen-TFPI und einer vermehrten TF-Aktivität der Zellsuspensionen kommt (Zillmann et al., 2001). Dies wird unter anderem durch die Adhäsionsmoleküle P-Selektin und P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) vermittelt. P-Selektin ist ein vaskuläres Zelladhäsionsmolekül, das auf der Oberfläche von Plättchen und Endothelzellen nach Aktivierung exprimiert wird. Es vermittelt die Interaktion von stimulierten Plättchen und Endothelzellen bzw. Leukozyten, welche PSGL-1 auf ihrer Oberfläche tragen (Furie et al., 2004). So spielt die P-Selektin/PSGL-1-Interaktion z.B. eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten zur Stelle einer Gefäßverletzung (Polgar et al., 2005; Morel et al., 2006) und bei der Aktivierung von Leukozyten, auch im Rahmen von Entzündungsprozessen (Cambien et al., 2004). Durch die P-Selektin/PSGL-1-abhängige Interaktion von Plättchen mit neutrophilen Granulozyten kann die Sekretion von Serinproteasen der aktivierten Leukozyten verstärkt werden (Tsuji et al., 1994; Owen et al., 1995). Diese Serinproteasen (u.a. Neutrophilen-Elastase) können Plättchen-TFPI proteolytisch inaktivieren (Higuchi et al., 1992; Petersen et al., 1992). Damit könnte es zur vermehrten Gerinnungsaktivierung in den ausgebildeten Plättchen-Neutrophilen-Konjugaten kommen (Engelmann et al., 2003).

1.5 Mikropartikel – Zellmembranfragmente mit prokoagulatorischem Potential

Mikropartikel sind durch Exozytose gebildete Fragmente der Zellmembran mit einem Durchmesser von 0,1-1 µm, die 1967 erstmals als *platelet dust* beschrieben wurden (Wolf, 1967). In den letzten Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass neben Blutplättchen auch verschiedene andere Zellen wie z.B. Leukozyten (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen), Erythrozyten, vaskuläre glatte Muskelzellen und Endothelzellen in der Lage sind Mikropartikel zu produzieren (VanWijk et al., 2003; Morel et al., 2004). Die Bildung der Mikropartikel scheint ein regulierter Prozess zu sein (VanWijk et al., 2003). Sie werden im Rahmen der Apoptose, durch mechanischen Stress oder durch die Aktivierung von Zellen gebildet (Mallat et al., 2000; Freyssinet, 2003, Nomura et al., 2001; Reininger et al., 2006) (Abb. 2). Bis heute sind die genauen, zur Mikropartikelbildung führenden intrazellulären Vorgänge noch weitestgehend ungeklärt. Wahrscheinlich spielt ein durch zellspezifische Stimuli ausgelöster intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg hierbei eine entscheidende Rolle und könnte zu einer Abschnürung der Zellfragmente führen (Barry et al., 1997; Horstmann et al., 1999; VanWijk et al., 2003).

Mikropartikel bestehen aus einem größtenteils unerforschten intravesikulären Teil und einer umgebenden Phospholipid-*Bilayer*-Membran, in deren Außenseite sich negativ geladene Phospholipiden wie Phosphatidylserin befinden (VanWijk et al., 2003; Hugel et al., 2005; Zwaal et al., 2005) (Abb. 2). Zudem präsentieren sie Antigene und andere spezielle Merkmale ihrer Herkunftszelle, wie z.B. CD14 auf monozytären Mikropartikeln (Falati et al., 2003) oder CD42b und den Fibrinogen-Rezeptor GPIIb-IIIa auf den von Plättchen gebildeten Mikropartikeln (Sabatier et al., 2000; Martinez et al., 2005) (Abb. 2).

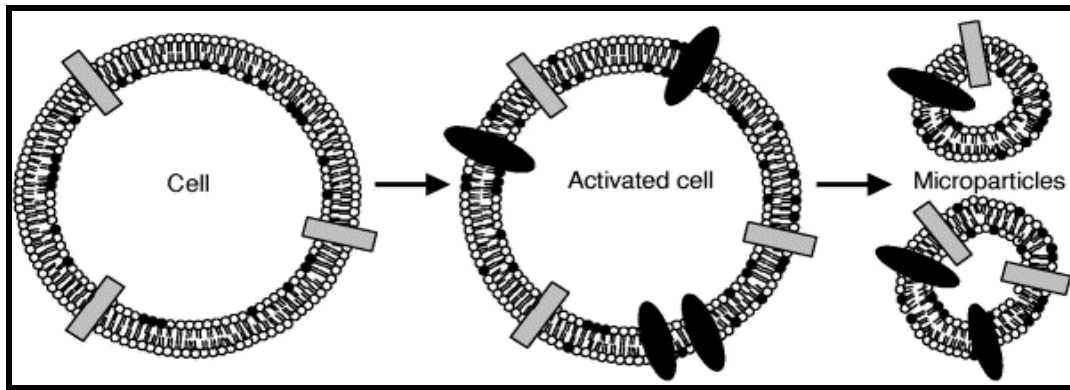


Abb. 2: Schematische Darstellung der Mikropartikelbildung und Membranstruktur

- 1.) negativ geladene Phospholipide (schwarze Punkte) werden durch Aktivierung in die äußere Seite der Zellmembran und die gebildeten Mikropartikel eingebaut.
- 2.) zellspezifische Antigene (graue Rechtecke) werden von gebildeten Mikropartikeln präsentiert
- 3.) Moleküle, die nach Zellaktivierung präsentiert werden, können auch in die Membran der Mikropartikel transferiert werden (schwarze Ovale); (vanWijk et al., 2003).

Mikropartikel, die im Rahmen der Zellaktivierung gebildet werden, weisen Eigenschaften einer aktivierten Zellmembran auf (Freyssinet, 2003). Sie präsentieren beispielsweise Adhäsionsmoleküle aktivierter Plättchen (u.a. P-Selektin) und Leukozyten (z.B. PSGL-1) oder pro- und antikoagulatorische Proteine, wie den für die Blutgerinnung entscheidenden TF (Abb. 3) und seinen Gegenspieler TFPI (Müller et al., 2003; Diamant et al., 2004; Steppich et al., 2005; Morel et al., 2006).

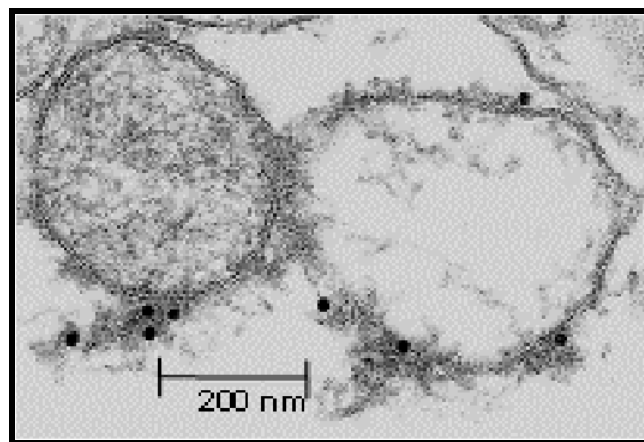


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von TF-präsentierenden Mikropartikeln

Nach 10-minütiger Vollblutstimulierung mit 12µg/ml Kollagen konnte TF-Antigen (schwarze Punkte) elektronenmikroskopisch auf und nahe der Membran von Mikropartikeln nachgewiesen werden. (Müller et al., 2003)

Die Struktur der verschiedenen zellspezifischen Mikropartikel ist jedoch nicht identisch. Sie unterscheiden sich vor allem in Größe, Lipid- und Proteinzusammensetzung der Membran (VanWijk et al., 2003).

1.6 Pathophysiologie der Mikropartikel

Die bisherigen Arbeiten zeigen, dass Mikropartikel aktiv in physiologische und pathophysiologische Vorgänge des Körpers involviert sein könnten. So spielen zirkulierende Mikropartikel beispielsweise bei der Gerinnungsaktivierung, der Angiogenese, der Apoptose und bei Entzündungen offensichtlich eine wichtige Rolle. Da die genannten Prozesse für die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen von Bedeutung sind und die Gesamtzahl zirkulierender oder bestimmter Subspezies der Mikropartikel bei diesen Erkrankungen in vielen Fällen erhöht sind (Abb. 4), wird angenommen, dass Mikropartikel von erheblicher Bedeutung für die Entstehung und die Progression von arteriellen Thrombosen im Rahmen von Myokardinfarkt und Apoplex sind (Chironi et al., 2005; Mallat et al., 2000). Doch auch bei anderen Erkrankungen mit einer erhöhten Gerinnungsneigung wie z.B. Sepsis, Diabetes mellitus und präterminalem Nierenversagen konnte eine deutlich erhöhte Anzahl an zirkulierenden Mikropartikeln nachgewiesen werden (Nieuwland et al., 1997; Hugel et al., 1999; Mallat et al., 2000; Morel et al., 2004; Matsumo et al., 2004) (Abb. 4). Im Blut von Patienten mit Erkrankungen, die mit einer erhöhten Blutungsneigung einhergehen, wie z.B. bei Patienten mit hereditärem Scott-Syndrom, ist ihre Anzahl hingegen deutlich vermindert (VanWijk et al., 2003; Diamant et al., 2004).

Den Hauptanteil der unter physiologischen Bedingungen im Blut vorhandenen Mikropartikel machen die Plättchen-Mikropartikel aus, während die von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten und Endothelzellen abstammenden Mikropartikel ebenfalls nachgewiesen werden können (Berckmans et al., 2001; VanWijk et al., 2002 und 2003). Bei verschiedenen Erkrankungen ist der prozentuale Anteil und die Gesamtanzahl an leukozytären und endothelialen Mikropartikeln deutlich erhöht (Martinez et al., 2005). So weisen z.B. Patienten mit Diabetes mellitus eine erhöhte Anzahl an granulozytären, monozytären, endothelialen und lymphozytären Mikropartikeln im Blut auf (Sabatier et al., 2005; Omoto et al., 2002) (Abb. 4). Bei Patienten mit Meningokokkensepsis, Multiorganversagen, disseminierter intravaskulärer Gerinnung und arteriellem Hypertonus konnte eine deutlich erhöhte Anzahl prokoagulatorischer leukozytärer Mikropartikel nachgewiesen werden (Nieuwland et al., 2000; Preston et al., 2003). Interessanterweise finden sich auch in den Lipidkernen atherosklerotischer Plaques

Mikropartikel, die vornehmlich aus nekrotischen Zellen stammen (Mallat et al., 1999). Diese kommen bei der Plaqueruptur in Kontakt mit dem fließenden Blut und können zur Entwicklung von lebensgefährlichen arteriellen Thrombosen und Embolien beitragen.

Zellspezifische Mikropartikel gebildet von:	Krankheit mit erhöhter Anzahl zellspezifischer Mikropartikeln:
Granulozyten	Sepsis/Multiorganversagen Diabetes mellitus Typ II
Monozyten	atherosklerotische Plaques Diabetes mellitus Typ II
Endothelzellen	akutes Koronarsyndrom Sepsis Diabetes mellitus Typ I arterieller Hypertonus
Lymphozyten	atherosklerotische Plaques Diabetes mellitus Typ II

Abb. 4: Erkrankungen, die mit einer erhöhten Anzahl an zellspezifischen Mikropartikeln einhergehen (Diamant et al., 2004)

1.7 Mikropartikel-Zell-Interaktionen

Es konnte bereits von verschiedenen Gruppen gezeigt werden, dass Mikropartikel mit verschiedenen Blutzellen interagieren, sie aktivieren können und so in viele (patho)physiologische Vorgänge des Gefäßsystems involviert sein könnten (Ahn, 2005; Martinez et al., 2005). Möglicherweise fusionieren Mikropartikel auch mit Zellen, transportieren dabei Membranteile von einer Zelle zu einer anderen und aktivieren sie so indirekt (Del Conde et al., 2005). Erwiesenermaßen adhären Mikropartikel beispielsweise *in vitro* an Endothelzellen und Monozyten und regen sie zur Präsentation von zellspezifischen Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und zur Freisetzung von TF an (Barry et al., 1999; Sabatier et al., 2000; Eilertsen et al., 2005). Verschiedene Arbeiten deuten auch auf eine Interaktion von Mikropartikel und Plättchen und eine dadurch ausgelöste TF-Aktivierung im Rahmen der Thrombogenese hin (Falati et al., 2003; Müller et al., 2003; Engelmann, 2006). *In*

vivo konnte die schnelle P-Selektin/PSGL-1-abhängige Anlagerung von Mikropartikeln an einen sich ausbildenden Plättchenthrombus und die dadurch induzierte ausgeprägte Fibrinbildung nachgewiesen werden (Falati et al., 2003) (Abb. 5). Um zu zeigen, daß die Akkumulation von TF und die anschließend stattfindende Fibrinbildung durch die Adhäsion von Mikropartikeln an den Plättchenthrombus bedingt sind, wurden dabei Wildtyp und PSGL-1 *knock out* Mäusen Calcein-gelabelte Mikropartikel infundiert. Hierbei kam es in der Wildtypmaus zu einer Akkumulation der Mikropartikel im Läsionsbereich, während die Mikropartikel in PSGL-1 *knock out* Mäusen nicht adhärten (Furie et al., 2004). Gleichzeitig war die Fibrinbildung an der Gefäßverletzungsstelle in den PSGL-1 *knock out* Mäusen reduziert. (Biro et al., 2003; Falati et al., 2003; Chou et al., 2004; Furie et al., 2004 ; Wagner, 2005) (Abb. 5).

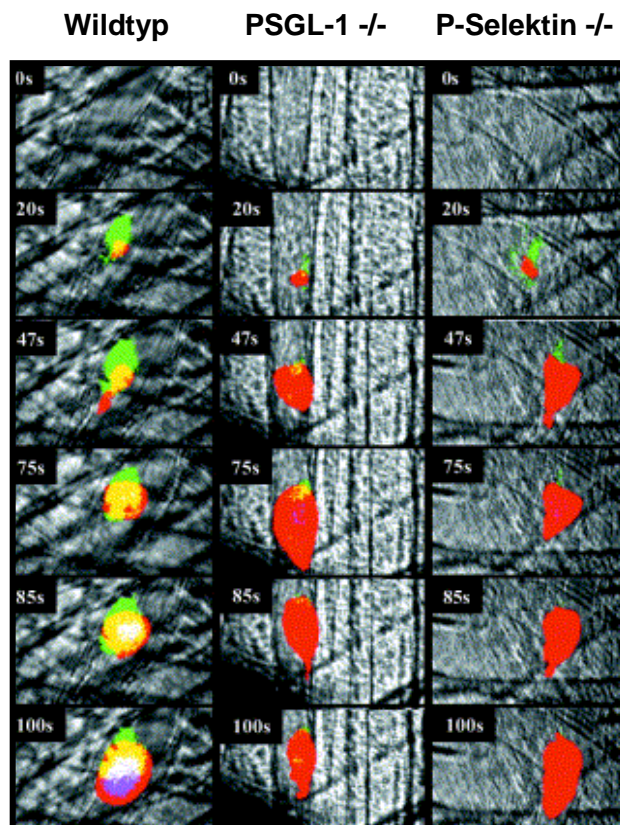


Abb. 5: Real time intravitalmikroskopische Bilder sich entwickelnder Thromben in Mäusen Aufgenommen in Wildtyp-, PSGL-1-Null- und P-Selektin-Null-Mäusen nach Gefäßverletzung. In der Wildtypmaus akkumulieren Plättchen (rot), TF (grün) und Fibrin (blau) und überlagern sich (Plättchen+TF=gelb; TF+Fibrin=türkis; Plättchen+TF=magenta; Plättchen+Fibrin+TF=weiß), während sich in beiden knock out Mäusen keine Ablagerungen von Fibrin und TF zeigen. An der Stelle der Gefäßverletzung akkumulieren fast ausschließlich Plättchen (Furie et al., 2004).

Besonders große Mengen an FSAP werden von der Leber exprimiert und produziert. Jedoch kann die Protease auch in vielen anderen Organen des menschlichen Körpers nachgewiesen werden (Choi-Miura et al., 2001).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass FSAP in ihrer inaktiven Einzelstrangform in einer Konzentration von 12 µg/ml im menschlichen Blutplasma zirkuliert (Altincicek et al., 2006) und verschiedene Funktionen im Bereich der Blutgerinnung übernimmt. Einerseits scheint FSAP zumindest *in vitro* der effektivste TF-unabhängige Aktivator von Faktor VII zu sein (Römisch et al., 1999). Andererseits ist FSAP in der Lage, die Vorläufer der Plasminogen-Aktivatoren Urokinase und *tissue type* Plasminogen-Aktivator durch Spaltung in die aktive Form zu überführen (Etscheid et al., 2000; Römisch, 2002; Hoppe et al., 2005). Somit scheint FSAP gleichzeitig pro- und antikoagulatorisch wirksam und damit für die Aufrechterhaltung des physiologischen Gerinnungsgleichgewichtes von Bedeutung zu sein. Der Marburg I Polymorphismus ist beispielsweise eine Variante von FSAP bei der die Aktivierung der Fibrinolyse gestört ist, während Faktor VII weiterhin aktiviert wird. Durch dieses Ungleichgewicht zugunsten der prokoagulatorischen Aktivität von FSAP entwickeln die betroffenen Patienten lebensgefährliche thrombembolische Ereignisse (Lane et al., 2000; Römisch et al., 2002; Willeit et al., 2003; Hoppe et al., 2005).

Da die Aktivität der isolierten Protease *in vitro* sehr gering ist, wurde eine Eigenaktivierung postuliert. Verschiedene Studien beschäftigten sich bereits mit der Erforschung von Kofaktoren, die zu einer (Auto)Aktivierung von FSAP führen könnten. Dabei scheinen insbesondere verschiedene polyanionische Glukosaminoglykane, wie z.B. Heparin oder Dextransulfat, im Zusammenspiel mit Calciumionen in der Lage zu sein, die inaktive Proenzymform von FSAP in die aktive Serinprotease zu überführen (Kannemeier et al., 2001; Nakazawa et al., 2005; Altincicek et al., 2006).

1.9 Zielsetzung

Die Arbeit sollte zur Klärung verschiedener Mechanismen des intravasalen Gerinnungsstartes beitragen.

Dabei ergaben sich folgende grundlegende Fragestellungen:

- 1.) Führt die Interaktion von Mikropartikeln und Plättchen zu einer Aktivierung des intravasalen gerinnungsstartenden Proteins TF?
- 2.) Kommt es auch unter Flussbedingungen zur Interaktion von Mikropartikeln und Plättchen?
- 3.) Welche Arten von zirkulierenden Mikropartikeln interagieren mit Plättchen?
- 4.) Kommt es durch die Interaktion zu einer Aktivierung des Mikropartikel- oder des Plättchen-assoziierten TF?
- 5.) Welche Mechanismen könnten zur Aktivierung des iTF beitragen?
- 6.) Ist zelluläre RNA ein Kofaktor für die Autoaktivierung des TF-unabhängigen Gerinnungsaktivators FSAP?
- 7.) Nimmt zelluläre RNA möglicherweise durch Aktivierung des Kontaktsystems Einfluss auf die Hämostase?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

BSA Fraktion V	Serva (Heidelberg)
Calciumchlorid	Sigma (Deisenhofen)
EDTA (freie Säure)	Roth (Karlsruhe)
D-Glucose	Roth (Karlsruhe)
Glucose	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Tri-Natriumcitrat Dihydrat (TNC)	Roth (Karlsruhe)
Trypanblau	Sigma (Deisenhofen)

2.1.2. Puffer

Antikörper-Puffer

EDTA, 0,15 %
BSA Fraktion V, 0,15 %
in PBS gelöst
pH 7,4

FACS-Puffer

HEPES, 10mM
KCl, 5 mM
MgCl₂, 1 mM
NaCl, 136 mM
CaCl₂, 2,5 mM
pH 7,4

Calcium-HEPES (Thrombelastographie)

CaCl₂, 100 mM
HEPES, 10 mM
pH 7,4

Monozytenwaschpuffer

BSA 5%
Na EDTA 0,5 M
in PBS gelöst
pH 7,4

Phosphate-Buffered Saline (PBS)

NaCl, 136 mM
KCl, 2,6 mM
Na₂HPO₄, 10 mM
KH₂PO₄, 1,5 mM
pH 7,4

Resuspensionspuffer

NaCl, 138 mM
KCl, 2,7mM
NaHCO₃, 12 mM
Na H₂PO₄, 0,4 mM
D-Glucose, 5 mM
MgCl, 1mM
HEPES, 5 mM
pH 7,4

Plättchenwaschpuffer

NaCl, 138 mM
KCl, 3 mM
MgCl₂, 1 mM
HEPES, 15 mM
EDTA, 5 mM
D-Glucose, 5 mM
Tri-Natriumcitrat, 9 mM
Apyrase, 0,5 g/l
pH 6,3

2.1.3 Blut-, Zell- und Mikropartikelpräparationen

Antikörper:

<i>Microbeads</i> CD14 Antikörper	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
<i>Microbeads</i> CD15 Antikörper	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)

Gerinnungs- und Aktivierungsinhibitoren:

TNC	Roth (Karlsruhe)
Corn Trypsin Inhibitor (CTI)	Calbiochem (Schwalbach)
Iloprost	Schering AG (Berlin)
Revasc (Desirudin)	Novartis/Rhone (Rhone-Polenc Rorer, Frankreich)
Apyrase Grade VII, Kartoffel	Sigma (Deisenhofen)

Stimulantien:

Kollagen Typ I (Kollagenreagenz Horm)	Nycomed Amersham (Ismaning)
Thrombin	Sigma (Deisenhofen)
Lipopolysaccharide from E. coli (LPS)	Sigma (Deisenhofen)

N-formyl-Met-Leu Phe (fMLP)

Sigma (Deisenhofen)

2.1.4 Thrombelastographie

Antikörper:

Mouse-anti-human Tissue Factor VIC7

PD Dr. Luther, Institut für Pathologie,
TU Dresden

Inhibitoren des Kontaktsystems:

Prekallikrein/FXIIa-Inhibitor

Prekallikrein-Inhibitor

Haemochrom Diagnostica (Essen)

Haemochrom Diagnostica (Essen)

Kaolin

Sigma (Deisenhofen)

Nukleinsäuren und Inhibitoren:

CHO-DNA

Prof. Preissner, Institut für Biochemie,
Uni Giessen

CHO-RNA

Prof. Preissner, Institut für Biochemie,
Uni Giessen

dI-dC DNA

Prof. Preissner, Institut für Biochemie,
Uni Giessen

polyIC RNA

Prof. Preissner, Institut für Biochemie,
Uni Giessen

DNase

Fermentas (St. Leon-Roth)

RNaseA

Qiagen (Hilden)

2.1.5 Faktor Xa Bildung

Antikörper:

Mouse-anti-human Tissue Factor VIC7

PD Dr. Luther, Institut für Pathologie,
TU Dresden

Monoclonal Anti-Rat IgG2a

Sigma (Deisenhofen)

Anti-PDI MAb

Affinity BioReagents (Golden, USA)

Bacitracin

Sigma (Deisenhofen)

Gerinnungsfaktoren:

Beriplex PN 500

Aventis Behring (Marburg)

Faktor VIIa

Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dänemark)

Faktor X

Calbiochem (Schwalbach)

RecombiPlasTin

Instrumentation Laboratory
(Lexington, USA)

Inhibitoren des Kontaktsystems:

Prekallikrein/FXIIa-Inhibitor

Haemochrom Diagnostica (Essen)

Prekallikrein-Inhibitor

Haemochrom Diagnostica (Essen)

Kaolin

Sigma (Deisenhofen)

Kollagen Typ I (Kollagenreagenz Horm)

Nycomed Amersham (Ismaning)

Nukleinsäure und Inhibitor:

CHO-Zell RNA

Prof. Preissner, Institut für Biochemie,
Uni Giessen

RNase A

Qiagen (Hilden)

Protease-Inhibitoren:

α_1 -Antichymotrypsin

Sigma (Deisenhofen)

α_1 -Antitrypsin	Sigma (Deisenhofen)
Chloromethylketone (CMK)	Sigma (Deisenhofen)
Substrat (S 2222)	Chromogenix (Mailand, Italien)
Thromborel S (Standard)	Dade Behring (Marburg)

2.1.6 Durchflusszytometrie

Antikörper:	
Annexin V (FITC)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Anti-TF (FITC)	American Diagnostica (Pfungstadt)
Fertiglösungen:	
Lysing Solution	Becton Dickinson (Heidelberg)
Cellfix	Becton Dickinson (Heidelberg)

2.1.7 Zellkultur

Hanks BSS Medium	Invitrogen/Gibco (Paisley, Schottland)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
RPMI 1640 Medium with L-Glutamin	Invitrogen/Gibco (Paisley, Schottland)
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)

2.1.8 RNA-Interferenz

TF-siRNA	PD Dr. Luther, Institut für Pathologie, TU Dresden
Lipofectamine 2000	Invitrogen/Gibco (Paisley, Schottland)
LPS	Sigma (Deisenhofen)

2.1.9 Flusskammer-Experimente

Annexin V	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Alexa Fluor 488	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.10 Polymerase Chain Reaction (PCR) und Gelelektrophorese

β -Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen)
dNTPs	Invitrogen (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Life Technologies (Eggenstein)
oligo dT Primer	MWG Biotech AG (Ebersberg)
PCR-Puffer	Promega (Mannheim)
Primer-Sequenzen:	
Aldolase forward:	
5'- agctgtctgacatcgctcaccg -3'	MWG Biotech AG (Ebersberg)
Aldolase reverse:	
5'- cacatactggcagcgcttcaag-3'	MWG Biotech AG (Ebersberg)

TF forward: 5'-cctggagacaaacctcggacagcc-3'	MWG Biotech AG (Ebersberg)
TF reverse: 5'-ccagctctgccccactcctgc-3'	MWG Biotech AG (Ebersberg)
Reverse Transkriptase	Promega (Mannheim)
RNAsin	Promega (Mannheim)
Taq DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)

2.1.11 Materialien und Geräte

Materialien

Agarosegel	Life Technologies (Eggenstein)
BD Discard II Spritzen	Becton Dickinson (Heidelberg)
Bulk Diamond Tips	Gilson (Bad Comberg)
Cutasept F Hautdesinfiziens	Bode Chemie (Hamburg)
Ecoflo Perfusionsbesteck	Dispomed Witt (Gelnhausen)
Elektrophoresegel	MWG Biotech (Ebersberg)
Eppendorf Reaktionsgefäß	Eppendorf-Netheler-Hinz (Hamburg)
Falcon blue max jr. Röhrchen	Greiner Labortechnik (Kremsmünster, Österreich)
Ficoll Paque	Amersham Biosciences (Freiburg)
Mikroskop Deckgläser	Menzel Gläser (Braunschweig)
Microtest, Gewebe Kultur Platte, 96 well	Becton Dickinson (Heidelberg)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
Polypropylen Röhrchen 10 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
RoTEG Küvetten	Instrumentation Laboratory GmbH (Kirchheim)
RNAqueous Kit	Ambion (Foster City, USA)
RNeasy Säulen	Qiagen (Hilden)
Transferpipetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflasche 50 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)

Geräte

AVT Horn CDD Kamera	Horn Imaging (Aalen)
Axiovert 100 Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)
Axiovert 2 plus Mikroskop	Zeiss (Oberkochen)
Coulter Counter	Amersham Biosciences (Freiburg)
ELISA Reader Dynatech MR 7000	Dynatech Laboratories (Virginia, USA)
Durchflusszytometer (FACS)	Beckmann Coulter Epics XL (Krefeld)
Harvard Apparatus Pump 33	Harvard Apparatus (Holliston, USA)
Neubauer Zählkammer	Hecht KG (Sondheim)
Panasonic DVD Rekorder LQ-MD 800	Panasonic (Hamburg)
Thrombelastograph RoTEG	Dynabte GmbH (München)
Vortex Genie 2	Bender & Hebei AG (Zürich, Schweiz)
Zentrifuge Mikro 32 R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Rotina 35 R	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge Universal 32	Hettich (Tuttlingen)

2.2 Methoden

2.2.1 Blut-, Zell- und Mikropartikelpräparationen

2.2.1.1 Probanden und Blutentnahme

Die venöse Blutentnahme für die Blutzellpräparation sowie die Plasma- und Mikropartikelisolierung erfolgte an gesunden Probanden im Alter von 23-45 Jahren, die bis mindestens 10 Tage vor der Blutspende keine antikoagulatorischen Medikamente und keine *anti-platelet drugs* eingenommen hatten. Die Spritzen wurden zu diesem Zweck vor der Entnahme mit dem antikoagulatorisch wirksamen TNC in einer Endkonzentration von 0,38% versetzt und die Blutabnahme erfolgte nach ausreichender Hautdesinfektion aus einer Vene in der Armbeuge. Die ersten 3 ml wurden verworfen, das restliche Vollblut gleichmäßig auf mehrere 10 ml Polypropylen-Röhrchen verteilt und einzelne Blutkomponenten nach den unter 2.2.1.2 bis 2.2.1.8 beschriebenen Protokollen isoliert.

2.2.1.2 Gewinnung von plättchenreichem (PRP) und plättchenarmem (PAP) Plasma

Zur Gewinnung von plättchenreichem (PRP) und plättchenarmem (PAP) Plasma wurde das citrierte Vollblut (VB) zunächst für 15 Minuten (min) bei 190 x g und 24°C zentrifugiert. Anschließend wurden die oberen zwei Drittel des Überstandes, das sogenannte PRP, abgenommen und entweder zur Plättchenisolierung oder zur Präparation von PAP verwendet. Durch weiteres zweimaliges Zentrifugieren des PRP für jeweils 20 min bei 1000 x g und 24°C konnte das PAP als Überstand vom Zellsediment getrennt werden und in verschiedenen Gerinnungsassays oder für die Gewinnung von zirkulierenden Mikropartikeln eingesetzt werden.

2.2.1.3 Isolierung von Plättchen

Zur Isolierung der Blutplättchen wurde zuvor hergestelltes PRP nach Zugabe von 0,1 Units Apyrase/ml und dem Prostacyclin Analogon Iloprost (1 ng/ml) für 10 min bei 190 x g und 24°C zentrifugiert. Die eingesetzte Apyrase inhibierte hierbei die

Voraktivierung der Blutplättchen während der Isolierung durch die Abspaltung von anorganischem Phosphat aus Adenosintriphosphat (ATP) bzw. Adenosindiphosphat (ADP). Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das sichtbare Plättchenpellet in 1 ml Plättchenwaschpuffer resuspendiert. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 190 x g und 24°C wurden die Plättchen dann in der gewünschten Menge Resuspensionspuffer aufgenommen, gezählt und in verschiedenen Versuchsprotokollen eingesetzt.

2.2.1.4 Isolierung von neutrophilen Granulozyten

Zur Isolierung der neutrophilen Granulozyten wurde citriertes VB zunächst für 15 min bei 190 x g und 24°C zentrifugiert, wodurch es zu einer Dreischichtung des Blutes in den Röhrchen kam. Die oberste Schicht enthielt das PRP, in der mittleren Schicht befand sich der sogenannte *buffy coat* und die untere Schicht wurde durch sedimentierte Erythrozyten gebildet. Der *buffy coat* ist die Schicht der Bluteukozyten, in der sich neben Monozyten, Lymphozyten und anderen Zellen auch die neutrophilen Granulozyten befinden. Nachdem das PRP vorsichtig abgenommen und verworfen worden war, konnte der *buffy coat* unter kreisenden Bewegungen mit der Pipette abgenommen und in ein anderes Röhrchen überführt werden.

Zur Isolierung der neutrophilen Granulozyten wurde der gesamten *buffy coat* mit magnetisch konjugiertem CD15 Antikörper für 15 min bei 7-10°C im Dunkeln inkubiert (Abb. 7). Für eine Ausgangsmenge von 20 ml Vollblut wurden dabei 40 µl der Antikörperlösung benötigt. Zeitgleich wurden die verwendeten MiniMACS Magnetsäulen in die Magnetfeldhalterungen eingeführt und zweimal mit jeweils 1 ml Antikörperpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Antikörperpuffer verdünnt und auf die gespülten Säulen aufgetragen. Nach dem vollständigen Durchlauf der Zellsuspension wurde jede Säule mit 500 µl Antikörperpuffer gespült. Die durch die Antigen-Antikörper-Komplexe positiv markierten Zellen verblieben somit während der Passage durch das Magnetfeld in den MiniMACS Säulen, während die nicht markierten Zellen ausgewaschen wurden. Dann wurden die Säulen aus dem Magnetfeld entfernt und die mit *MicroBeads*-markierten Granulozyten mittels eines Kolbens in 2 ml Antikörperpuffer aus den Säulen eluiert (Abb. 7). Die Zellsuspension wurde in einem Falconröhrchen mit

Resuspensionspuffer aufgefüllt und bei 170 x g und 24°C 10 min lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 150 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Zellzahl und Viabilität wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

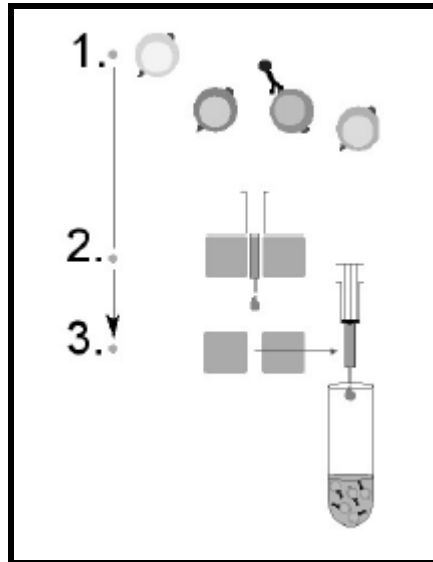


Abb. 7: Das MiniMACS Verfahren zur Zellisolierung

- 1) Markierung der zu isolierenden Zellpopulation mit an Antikörper gebundenen Magnetkügelchen (*MicroBeads*)
- 2) Positive Selektion der markierten Zellen im Magnetfeld
- 3) Entfernung der Säulen aus dem Magnetfeld und Eluierung der in der Säule verbliebenen selektierten Zellen

2.2.1.5 Monozytenisolierung

Zur Isolierung von Monozyten wurde ebenfalls der in 2.2.1.4 beschriebene *buffy coat* nach Blutentnahme und Zentrifugation abgenommen. Da Monozyten jedoch nur einen geringen Anteil der gesamten Leukozytenzahl ausmachen, war es notwendig, die Monozyten vor der Inkubation mit den magnetgekoppelten Antikörpern mit Hilfe eines Ficoll-Dichtegradienten zu konzentrieren. Dazu wurden je 15 ml des *buffy coat* in einem 50 ml Falconröhrchen mit 5 ml PBS verdünnt und mit 13 ml Ficoll (Dichte 1,077) langsam und vorsichtig unterschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen bei 500 x g und 24°C für 25 min zentrifugiert und die entstandene Interphase, welche sich aufgrund ihrer geringen Dichte über der Ficollschicht befand und von Plasma und Erythrozyten getrennt werden konnte, in einem anderen 50 ml Falconröhrchen gesammelt. In der Interphase befanden sich die mononukleäre Leukozyten (vorwiegend Monozyten und Lymphozyten), die nun in Monozytenwaschpuffer

resuspendiert und bei 200 x g und 24°C 10 min lang abzentrifugiert wurden. Das gewonnene Pellet wurde in Antikörperpuffer aufgenommen und mit CD14 *Microbeads* Antikörpern für 15 min bei 7-10°C im Dunkeln inkubiert. Die MiniMACS Magnetsäulen wurden wie oben beschrieben vorbereitet, die Zellsuspension mit Antikörperpuffer verdünnt und auf die Säulen aufgetragen. Nach viermaligem Waschen der Säulen mit Antikörperpuffer wurden sie aus dem Magnetfeld entfernt, mit je 2 ml Antikörperpuffer aufgefüllt und die Monozyten konnten mit einem Stempel aus den Säulen eluiert werden (Abb. 7). Anschließend wurde die Zellsuspension mit 35 ml PBS verdünnt und bei 200 x g und 24°C für 10 min zentrifugiert. Zuletzt wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.1.6 Bestimmung der Zellzahl

Die isolierten Blutzellen (Plättchen, neutrophile Granulozyten, Monozyten) wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer mikroskopisch ausgezählt. Zu diesem Zweck wurden 20 µl der Zellsuspension zu der gleichen Menge Trypanblau-Lösung gegeben und 10 µl dieser Zell-Farbstoff Mischung unter das Deckblatt der Zählkammer pipettiert. Zur Ermittlung eines Mittelwertes wurde die Zellanzahl zweier Zählkammern in jeweils 4 Quadranten bestimmt. Diese Zahl wurde mit dem Verdünnungsfaktor und dem messspezifischen Faktor 80 multipliziert und ergab so die absolute Zellzahl pro µl.

2.2.1.7 Mikropartikelisolierung aus Vollblut

Zur Mikropartikelisolierung aus VB wurde neben TNC auch das Hirudin Analogon Desirudin in einer Konzentration von 1 µg/ml in der Spritze vorgelegt. Nach der Blutentnahme wurden nach dem unter 2.2.1.2 beschriebenen Protokoll mehrere ml PAP gewonnen, jeweils 250 µl des PAP in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und alle Reaktionsgefäße bei 18000 x g und 24°C für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurden jeweils 225 µl Überstand vorsichtig abgenommen, das in den restlichen 25 µl befindliche Mikropartikel in 225 µl PBS aufgenommen und erneut bei 18000 x g und 24°C für 30 min zentrifugiert. Zuletzt wurde das Plasma komplett abgezogen, die sich am Gefäßboden befindlichen Mikropartikel in 25 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und in verschiedenen Assays eingesetzt.

2.2.1.8 Mikropartikelproduktion durch stimulierte Blutzellen

Zur Mikropartikelproduktion durch verschiedene stimulierte Blutzellen wurden ebenfalls TNC und Desirudin in einer Endkonzentration von 1 µg/ml in der Entnahmespritze vorgelegt. Die Blutzellen (Plättchen, neutrophile Granulozyten und Monozyten) wurden nach den oben beschriebenen Protokollen (2.2.1.3, 2.2.1.4 und 2.2.1.5) isoliert und durch Inkubation mit einem zellspezifischen Stimulus zur Produktion von 1×10^6 Mikropartikeln pro Ansatz angeregt.

Dazu wurden 4×10^8 Blutplättchen mit 0,1 U/ml Thrombin und 8 µg/ml Kollagen für 30 min bei 37°C stimuliert, 6×10^6 neutrophile Granulozyten für 2 Stunden (h) bei 37°C mit 100µM N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) inkubiert und 3×10^6 Monozyten 12 h lang mit 100 ng/ml LPS zur zellspezifischen Mikropartikelproduktion angeregt. Anschließend wurden die Zellen für 15 min bei 2240 x g und 24°C zentrifugiert, der komplette Mikropartikel-reiche Überstand abgenommen und das Zellpellet verworfen. Jeweils 250 µl des Überstandes wurden dann in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und bei 18000 x g und 24°C für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurden 225 µl Überstand vorsichtig abgenommen, das in den restlichen 25 µl befindliche Mikropartikelpellet in 225 µl PBS aufgenommen und erneut bei 18000 x g und 24°C für 30 min zentrifugiert. Zuletzt wurde das Plasma komplett abgezogen, die sich am Gefäßboden befindlichen Mikropartikel in 25 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und in verschiedenen Assays eingesetzt.

2.2.2 Gewinnung des Lipidkerns atherosklerotischer Plaques

Die in dieser Arbeit verwendeten Lipidkerne atherosklerotischer Plaques stammen von 10 verschiedenen Patienten, die sich aufgrund einer hochgradigen Carotisstenose einer Thrombendarteriektomie unterziehen mussten. Intraoperativ erfolgte eine sorgfältige Dissektion der atherosklerotischen Plaques. Die lipidreiche Kernregion wurde in mit gefrorenem Stickstoff abgesättigtem Puffer (NaCl 150 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, pH 7,2) homogenisiert und bei -20°C gelagert. Das Feuchtgewicht der Kernregionen unterschiedlicher Plaques betrug 50 mg/ml.

Das Plaquematerial wurde freundlicherweise von PD Dr. Richard Brandl (Gefäßchirurgische Abteilung des Klinikums München-Schwabing) zur Verfügung gestellt. Die Homogenisierung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Wolfgang Siess (Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Klinikum Innenstadt, Universität München). Jeder Patient erteilte seine Einwilligung mittels eines Formblattes des Ethikkomitees der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München.

2.2.3 Thrombelastographie

2.2.3.1 Messprinzip

Der klassische Thrombelastograph wurde 1948 von Prof. Hellmut Hartert in Heidelberg entwickelt. Zum ersten Mal war es durch eine einzige Messung möglich einen Überblick über den gesamten Gerinnungsprozess von der Bildung der ersten Fibrinfäden bis zum Auflösen des Gerinnsels zu bekommen. In der Zwischenzeit wurde das Verfahren verfeinert und computerisiert. Mit Hilfe der Thrombelastographie können Aussagen zum Start der Gerinnung (*Coagulation Time* = CT), zur Kinetik der Gerinnung (*Clot Formation Time* = CFT), zur maximalen Gerinnselfestigkeit (Maximale Amplitude = MA) und zur Fibrinolyse (Maximale Lyse = ML) gemacht werden (Abb. 9). Sie wird heutzutage in vielen Bereichen der Diagnostik von Gerinnungsstörungen und in der Blutgerinnungsforschung eingesetzt.

Bei der Thrombelastographie wird die zylindrische, in einer Messzelle fixierte und auf 37 °C vorgewärmte Küvette mit VB, PRP oder PAP und je nach Versuch verschiedenen anderen Zusätzen befüllt. Dann wird die Küvette auf einen Stempel gesetzt, der an das untere Ende einer senkrechten Achse angesteckt ist und durch den Start der Messung beginnt die torsionselastisch frei aufgehängte Achse nach links und rechts in einem Winkel von 4,75° zu rotieren (Abb. 8). Zusätzlich wird die Strahlung einer Dioden-Lichtquelle über eine am oberen Ende der Achse befestigten Spiegelplatte abgelenkt und die reflektierte Lichtstrahlung durch einenlichtsensiblen Sensor registriert, wodurch das Ausmaß der Rotation bestimmt werden kann. Die Bewegung ist bei fehlender Gerinnung ungehindert. Jedoch wird durch beginnende Gerinnselbildung und Anhaftung des Gerinnsels an die Oberfläche des Stempels und

die Küvette die Bewegung vermindert (Abb. 8). Die Rotationsamplitude der Achse wird mit wachsender Festigkeit des Gerinnsels immer weiter reduziert. Somit lässt sich die Gerinnungszeit (CT) und die Thrombuswachstumsrate (CFT), jeweils in Sekunden angegeben, ermitteln (Abb. 9).

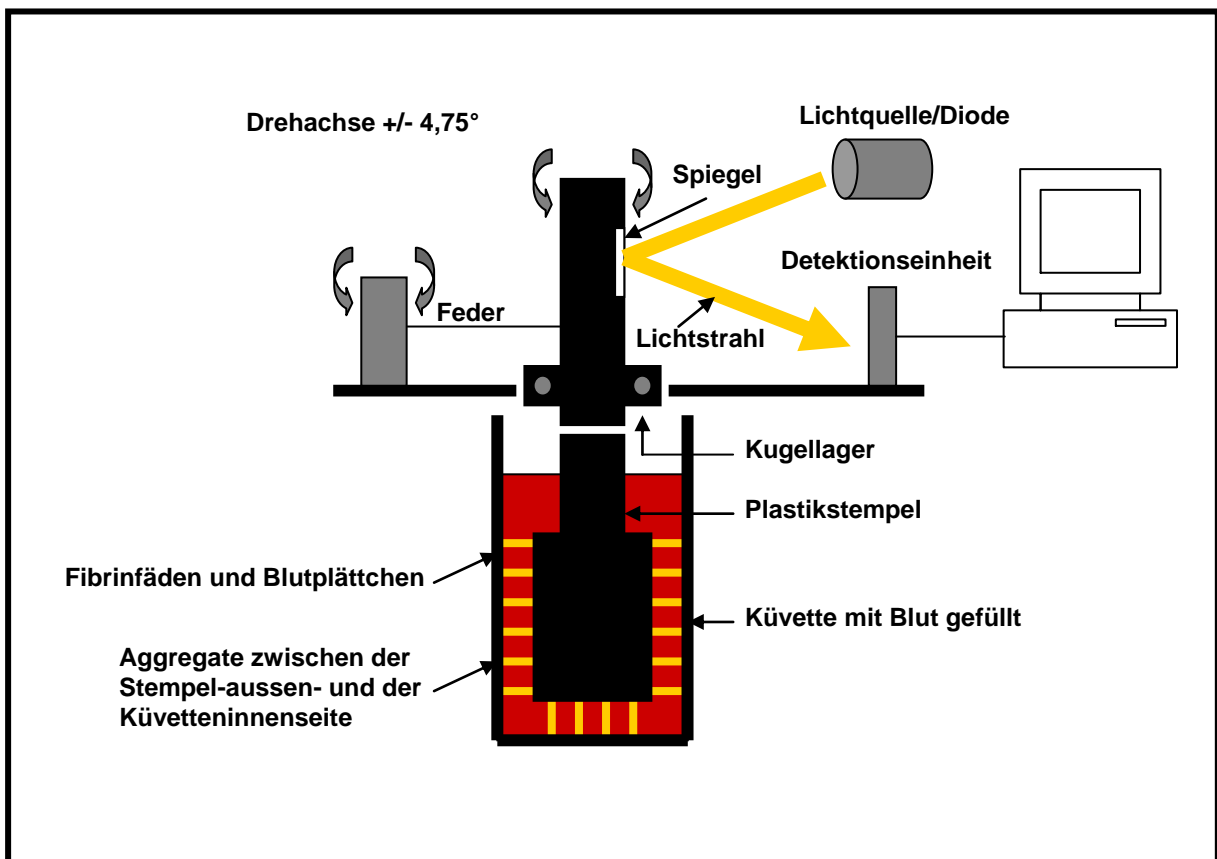


Abb. 8: Das Prinzip der Thrombelastographie

Die auf 37 °C vorgewärmte, mit Blut und verschiedenen Zusätzen befüllte Küvette wird auf einen Stempel gesetzt, der an das untere Ende einer senkrechten Achse angesteckt ist. Die Achse rotiert bei fehlender Gerinnung in einem Winkel von 4,75° nach links und rechts, mit beginnender Gerinnelbildung und wachsender Festigkeit des Gerinnsels wird die Rotationsamplitude der Achse jedoch immer weiter reduziert. Die Strahlung einer Dioden-Lichtquelle wird über eine am oberen Ende der Achse befestigte Spiegelplatte abgelenkt und die reflektierte Lichtstrahlung durch einen lichtsensiblen Sensor registriert, wodurch das Ausmaß der Rotation bestimmt und der Start bzw. das Ausmaß der Gerinnelbildung durch einen angeschlossenen Computer registriert werden kann.

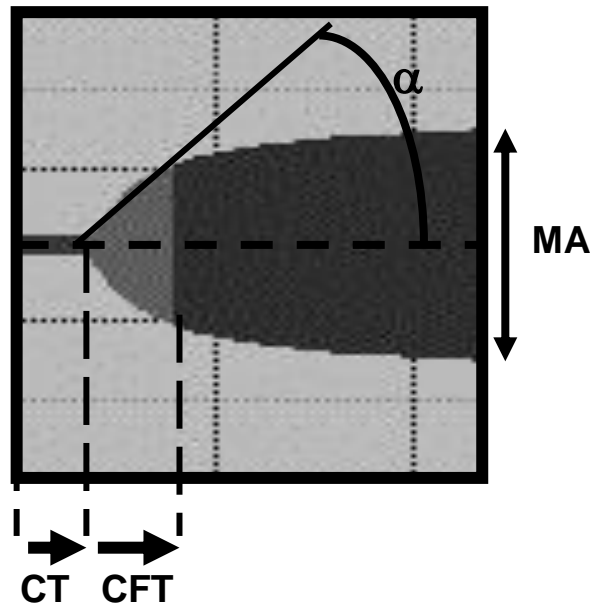


Abb. 9: Beispiel eines Thrombelastogrammes

CT: (*Coagulation Time*) Zeitspanne vom Start der Messung bis zu einer signifikanten Gerinnelbildung

CFT: (*Clot Formation Time*) Zeitspanne von der initialen Gerinnelbildung bis zum Erreichen einer Amplitude von 20 mm (gemäß Definition der Gerinnselfestigkeit)

α : Winkel zwischen der Mittellinie und einer Tangente an die Kurve durch den 2 mm Amplitudenpunkt, welcher die Kinetik der Gerinnelbildung beschreibt

MA: (maximale Amplitude) entspricht der maximal erreichten Gerinnselfestigkeit während der Messung

2.2.3.2 Protokoll: Gerinnungsaktivierung durch Plaquematerial

Für die Thrombelastographie-Versuchsreihe mit lipidreichen Kernregionen atherosklerotischer Plaques wurde bereits vor der Blutentnahme neben Citrat auch 32 $\mu\text{g/ml}$ CTI, ein Inhibitor von Faktor XIIa und somit der Kontaktaktivierung des Blutes, in die Spritze gegeben. Sofort nach der Entnahme wurden je 300 μl VB, PRP oder PAP in eine vorgewärmte Küvette gegeben und entweder 5 μl Plaquematerial (Feuchtgewicht 50 mg/ml) oder die gleiche Menge Puffer (als Kontrolle) hinzugefügt. In der letzten Küvette wurde das Blut vor Zugabe des Plaquematerials mit dem Anti-TF Antikörper VIC7 (Anti-TF Ak VIC7) für 20 min bei 37°C vorbehandelt, um die Bedeutung von TF an der plaqueinduzierten Fibrinbildung zu verifizieren. Zuletzt wurde der Gerinnungsprozess mit 60 μl einer 100 mM CaCl_2 / 10 mM HEPES Lösung gestartet und die Messung nach Ermittlung der CT und CFT gestoppt.

2.2.3.3 Protokoll: Gerinnungsaktivierung durch RNA und DNA

Je 300 µl frisch entnommenes, citriertes VB wurden in eine vorgewärmte Küvette gegeben und abhängig vom Versuchsansatz mit potentiellen Aktivatoren oder Inhibitoren der Blutgerinnung versetzt. Als potentielle Gerinnungsaktivatoren wurden verschiedene Nukleinsäuren (50 µg/ml) eingesetzt und im jeweils letzten Versuchsansatz mit 100 µg/ml RNaseA bzw. 100 µg/ml DNase für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Die zellulären Nukleinsäuren wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Preissner (Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität Giessen) mit Hilfe eines RNeasy Kit und eines DNA-Isolations-Kit (Qiagen, Hilden) aus kultivierten *Chinese Hamster Ovary* Zellen (*CHO*-Zellen) isoliert. In weiterführenden Versuchen wurde neben zellulärer RNA auch 1 µg/ml Kaolin (Aktivator des Kontaktsystems) und die Inhibitoren des Kontaktsystems Prekallikrein-Inhibitor (10 µmol/l) und Prekallikrein-/ FaktorXI-Inhibitor (10 µmol/l) zum VB hinzugegeben. Der Gerinnungsprozess wurde durch Zugabe von 60 µl einer 100 mM CaCl₂/ 10 mM HEPES Lösung gestartet und die Messung nach Ermittlung der CT und CFT gestoppt.

2.2.4 Faktor Xa Bildung

2.2.4.1 Messprinzip

Die Faktor Xa Bildung ist eine Methode zur Bestimmung der TF-Aktivität verschiedener Versuchsansätze. Dabei bildet der aktive TF der Probe zusammen mit Faktor VII einen Komplex, welcher den Blutgerinnungsfaktor X in Xa zu überführen vermag. Der so gebildete Faktor Xa ist nun in der Lage das chromogene Substrat S 2222 zu spalten und induziert eine Absorptionssteigerung bei 405 nm (Abb. 10). Die Steigerung der Absorption pro Sekunde ist dabei proportional zur TF-Aktivität der Probe und kann mittels eines Photometers gemessen werden. Zur Umrechnung der optischen Dichte in U/ml wurde bei jeder Messung eine Konzentrationsreihe unter Verwendung eines rekombinanten humanen TF als Standard ermittelt. Dann wurden die Proben in die 96-Loch-Platte pipettiert und anschließend 50 µl einer 8 mM CaCl₂-Lösung und 100 µl Substrat-Gemisch zu jeder Probe hinzugegeben, um die enzymatische Reaktion zu starten. Das Substrat-Gemisch bestand aus 3375 µl Resuspensionspuffer, 400 µl des chromogenen Substrats S 2222 und 225 µl eines

Gerinnungsfaktorkonzentrates der Faktoren II, VII, IX, X (Beriplex). Nach Fertigstellung der Probensuspensionen wurde der Anstieg der optischen Dichte über einen Zeitraum von 30 min mit dem ELISA Reader photometrisch bestimmt.

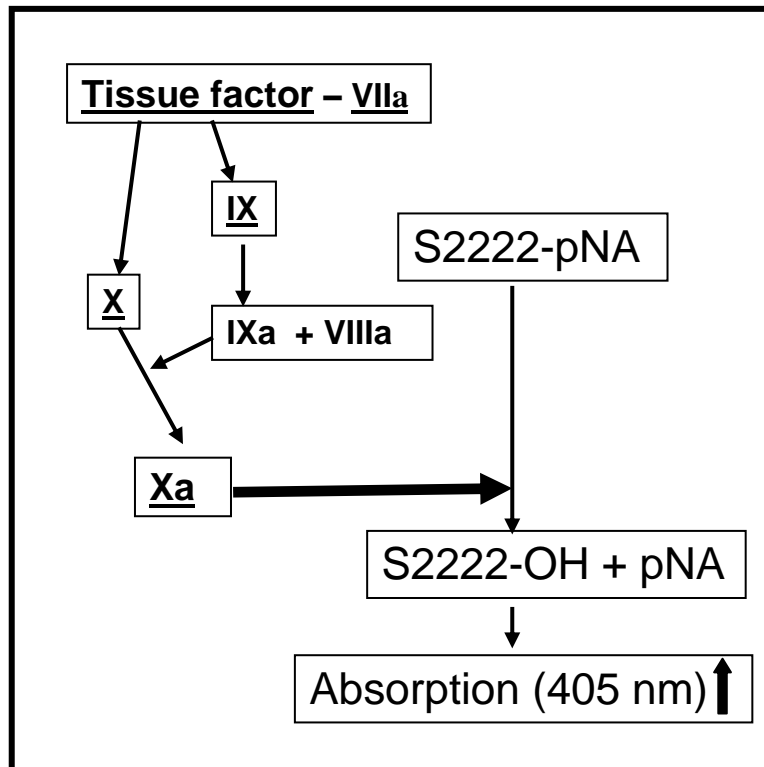


Abb. 10: Versuchsprinzip der Faktor Xa Bildung

Der TF/VIIa-Komplex aktiviert neben Faktor X auch Faktor IX. Letzterer aktiviert zusammen mit Faktor VIIIa ebenfalls Faktor X zu Xa. In diesem Assay spaltet der gebildete Faktor Xa das chromogene Substrat S 2222 und führt so zu einer Absorptionssteigerung bei 405 nm, welche mittels eines Photometers gemessen wird. Die Steigerung der Absorption pro Sekunde verhält sich dabei proportional zur TF-Aktivität der Probe.

2.2.4.2 Protokoll: Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen

Für alle Versuche mit Plättchen, PAP, VB-Mikropartikeln und zellulären Mikropartikeln wurde neben TNC auch Hirudin in die Spritze gegeben, die Blutkomponenten nach den oben beschriebenen Standardprotokollen (2.2.1.2, 2.2.1.3, 2.2.1.4, 2.2.1.5, 2.2.1.7 und 2.2.1.8) isoliert und je nach Versuchsaufbau pro Ansatz 1×10^6 Mikropartikel und $1,5 \times 10^7$ Plättchen eingesetzt.

Um die TF-Abhängigkeit der Gerinnungsaktivierung aufzuzeigen, wurden die Plättchen-Mikropartikel-Suspensionen im letzten Ansatz mit dem anti-TF Ak VIC7 für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden alle Proben mit 12 µg/ml Kollagen für 5 min bei 37°C im Wasserbad stimuliert und in den verwendeten

wells zunächst 50 µl CaCl₂ vorgelegt, dann jede Probe auf 3 *wells* à 50 µl aufgeteilt und die Gerinnung durch Zugabe von 100 µl Substratmischung (Zusammensetzung wie in 2.2.4.1 beschrieben) gestartet. In weiterführenden Versuchen wurden die Proteaseinhibitoren α₁-Antitrypsin (20 µg/ml), α₁-Antichymotrypsin (20 µg/ml) und Chloromethylketone (0,5 mM) kurz vor der Kollagenstimulierung zu den Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen hinzugegeben.

2.2.4.3 Protokoll: Plättchen und monozytäre Mikropartikel

Für die Versuche mit Plättchen und monozytären Mikropartikeln wurden TNC und Hirudin in die Entnahmespritze gegeben, die Plättchen und monozytären Mikropartikel nach den oben beschriebenen Standardprotokollen (2.2.1.3 und 2.2.1.8) isoliert und pro Ansatz 1×10^6 Mikropartikel und $1,5 \times 10^7$ Plättchen eingesetzt. In *Coating*-Versuchen sollten die Bedeutung des Plättchen- und des Mikropartikel-assoziierten TF näher analysiert werden. Dazu wurden entweder die monozytären Mikropartikel oder die Plättchen mit einem anti-TF Ak *gecoated*. Die Proben wurden zunächst für 30 min bei 37 °C mit dem anti-TF Ak VIC7 bzw. der identischen Menge Resuspuffer als Kontrolle inkubiert, dann auf 250 µl mit PBS aufgefüllt und die Mikropartikel für 30 min bei 18000 x g zentrifugiert. In identisch behandelten Ansätzen wurden die Plättchen für 10 min bei 190 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Pellets im Endvolumen resuspendiert. Die Mikropartikel wurden zu der Plättchensuspension gegeben und alle Proben mit 12 µg/ml Kollagen für 5 min bei 37°C im Wasserbad stimuliert. Um die Aktivierungsmechanismen des iTF näher zu analysieren wurden die Blutplättchen in einem anderen Versuchsaufbau für 10 min bei 37 °C im Wasserbad mit Kollagen stimuliert, dann Bacitracin (12 mM) und anti-Protein Disulfid Isomerase (PDI)-Ak (400 µg/ml) zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur mit den Plättchen inkubiert. Als letztes wurden die Mikropartikel zu den Proben gegeben und die Suspension erneut 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Für beide Versuchsansätze wurden in den verwendeten *wells* zunächst 50 µl CaCl₂ vorgelegt, jede Probe auf 3 *wells* à 50 µl aufgeteilt und die Gerinnung durch Zugabe von 100 µl Substratmischung pro well (Zusammensetzung wie in 2.2.3.1 beschrieben) gestartet.

2.2.4.4 Protokoll: Zelluläre RNA und FSAP

Zunächst wurde in allen verwendeten *wells* einer 96-Loch-Platte 50 µl CaCl₂ vorgelegt, dann der Faktorenkomplex Beriplex (Faktoren II, VII, IX und X), Resuspensionspuffer und je nach Ansatz 12 µg/ml FSAP, 50 µg/ml zelluläre RNA oder eine Suspension aus beiden in einem Endvolumen von 50 µl je Probe für 10 min bei 37°C inkubiert. Um die RNA-Abhängigkeit der Gerinnungsaktivierung aufzuzeigen, wurde die eingesetzte CHO-RNA in dem letzten Ansatz vor der 10-minütigen Inkubation zusätzlich mit 100 µg/ml RNaseA versetzt. Dann wurde der Versuch durch Zugabe des chromogenen Substrates S 2222 gestartet.

2.2.5 Durchflusszytometrie

2.2.5.1 Messprinzip

Bei der Durchflusszytometrie werden die zu analysierenden Zellen oder Mikropartikel mit monoklonalen Antikörpern, die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, markiert und passieren dann in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert nacheinander einen Laserstrahl. Dabei wird das auftreffende Licht durch die Zellen gestreut. Das in einem geringen Winkel (3-10°) gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (FS) bezeichnet und korreliert in erster Näherung mit der Zellgröße. Das um 90° reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (SS) bezeichnet und gibt die Granularität und Membranfaltung der Zelle an. Zusätzlich werden die an Ak gekoppelten Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, welches durch Teilerspiegel und farbselektive Bandpassfilter in Spektren aufgetrennt wird und auf photosensitive Detektoren, sogenannte Photomultiplier trifft. In der Regel stehen drei Sensoren für 530 nm (Fluoreszenzkanal FL1), 585 nm (FL2) und >650 nm (FL3) über den ersten Laser zur Verfügung. FS- und SS-Signale werden in linearer und Fluoreszenz-Signale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen.

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte, nach Speicherung auf der Festplatte mit dem WinMDI Programm. Die Daten wurden dort als zweidimensionale Punkt-Diagramme (*dot-plots*) oder als eindimensionale Histogramme dargestellt und konnten so analysiert werden. In den Punkt-Diagrammen repräsentierte jeder Punkt

eine Zelle bzw. einen Mikropartikel. Durch das Setzen von Analysefenstern konnte die Expressionsanalyse auf bestimmte Zell- oder Mikropartikelpopulationen beschränkt werden.

2.2.5.2 Protokoll: Bestimmung der Mikropartikel-Zahl

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS) der Firma Beckmann Coulter mit einem 488 nm Argon- und einem roten Dioden-Laser (635 nm) verwendet. Zunächst wurden die VB- bzw. zellspezifischen Mikropartikel nach den unter 2.2.1.7 und 2.2.1.8 beschriebenen Protokollen isoliert. Zu den 50 µl Mikropartikelsuspension pro Ansatz wurde dann Fluoresceinisothiocyanat- (FITC-) markiertes Annexin V im Verhältnis 1:10 hinzugegeben und die Proben für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und für 30 min bei 18000 × g und 24°C zentrifugiert. Um ungebundenes Annexin V zu entfernen, wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Pellet erneut in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und für weitere 30 min bei 18000 × g und 24°C zentrifugiert. Dann wurde das Mikropartikelpellet in 500 µl FACS-Puffer gelöst und in das FACS-Gerät eingelesen.

Da immer eine genau definierte Menge der Mikropartikelsuspension eingelesen wurde und das Programm die Anzahl der Annexin V-positiven Events und damit Mikropartikel berechnet, konnten wir mit Hilfe der Durchflusszytometrie eine Methode zur Bestimmung der Mikropartikelzahl etablieren.

2.2.6 Zellkultur

Die Inkubation der monozytären Suspensionszelllinie THP-1 erfolgte in einem Zellkulturschrank bei 37°C und 5 % CO₂ Begasung. Die Zellen wurden in 10 ml RPMI 1640/Penicillin/Streptomycin- (RPMI 1640/Pen/Strep)-Medium in liegenden Zellkulturflaschen mit 50 ml Gesamtvolumen kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt, die Zellen nach der unter 2.2.1.6 beschriebenen Methode gezählt und bei Überschreitung einer mittels Neubauer-Zählkammer bestimmten Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ ml im Verhältnis 1:1 geteilt. Dazu wurden die THP-1 Zellen aus dem Zellkulturschrank entnommen, unter der Sterilbank in sterile

Falconröhrchen überführt und für 10 min bei 150 x g und 24°C zentrifugiert. Anschließend wurde das RPMI-Medium unter sterilen Bedingungen vorsichtig abgesaugt und die Zellen gezählt. Je 1×10^5 Zellen/ml wurden in 10 ml RPMI/Pen/Strep-Medium resuspendiert, in sterile Zellkulturflaschen überführt und im Zellkulturschrank weiterkultiviert.

2.2.6.1 Einfrieren, Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Das Ausgangsmaterial zum Einfrieren waren Zellkulturen im RPMI/Pen/Strep-Medium. Die Zellen wurden 10 min bei 150 x g und 24°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen gezählt. Jeweils 0,5 bis 1×10^6 Zellen wurden in 1 ml kaltem Einfriermedium (5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in RPMI) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nach mindestens 24 h Einfrierzeit bei -80°C erfolgte die Lagerung der Konserven in flüssigem Stickstoff. Zum Revitalisieren wurde die Zellsuspension bei 37°C aufgetaut und in Kulturflaschen mit auf 37°C temperiertem RPMI/Pen/Strep-Medium überführt. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um die verbliebenen Reste des DMSO zu entfernen.

2.2.6.2 Mikropartikelproduktion durch THP-1 Zellen

Zur Mikropartikelproduktion durch THP-1 Zellen wurden die Zellen in sterile Falconröhrchen überführt und für 10 min bei 150 x g und 24°C zentrifugiert. Das RPMI/Pen/Strep-Medium wurde vorsichtig abgesaugt, die Zellen gezählt, in Hanks Balanced Salt Sodium Medium (Hanks BSS-Medium) resuspendiert und erneut für 10 min bei 150 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde nach diesem Waschvorgang komplett abgesaugt, das Pellet erneut in 1 ml Hanks BSS-Medium gelöst und 3×10^6 Zellen für 16 h bei 37°C mit 0,1 mg/ml LPS zur Mikropartikelproduktion angeregt. Anschließend erfolgte die Isolierung der zellspezifischen Mikropartikel nach der unter 2.2.1.8 beschriebenen Methode.

2.2.7 RNA-Interferenz

2.2.7.1 Methodenbeschreibung

Für die Erforschung der RNA-Interferenz erhielten die beiden US-Forscher Andrew Fire und Craig Mello im Jahre 2006 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. Es handelt sich bei der RNA-Interferenz um einen Mechanismus der Translationshemmung durch kurze, aus 21–23 Nukleotiden bestehende, doppelsträngige RNA-Moleküle (*small interfering* RNA oder siRNA). Diese werden z.B. mit Hilfe von Liposomen in die Zelle eingeschleust. Intrazellulär kann auch ein Enzym, *Dicer* (Häcksler), aus längeren, doppelsträngigen, zelleigenen RNA-Molekülen oder viralen RNA-Molekülen entsprechende siRNA-Moleküle generieren (Abb. 11). Anschließend werden die siRNA in ihre beiden Einzelstränge zerlegt und verbinden sich mit Proteinen zum sogenannten RNA-induzierenden Silencing Complex (RISC). Dieser Komplex bindet zelleigene *messenger*-RNA (mRNA) mit komplementären Nukleotidsequenzen, welche dann durch ein als *Slicer* (Hobel) bezeichnetes Enzym des RISC zerschnitten und damit zerstört werden (Abb. 11). Die Translation an den Ribosomen ist somit inhibiert und das von der betreffenden mRNA kodierte Protein kann nicht mehr gebildet werden (Abb. 11).

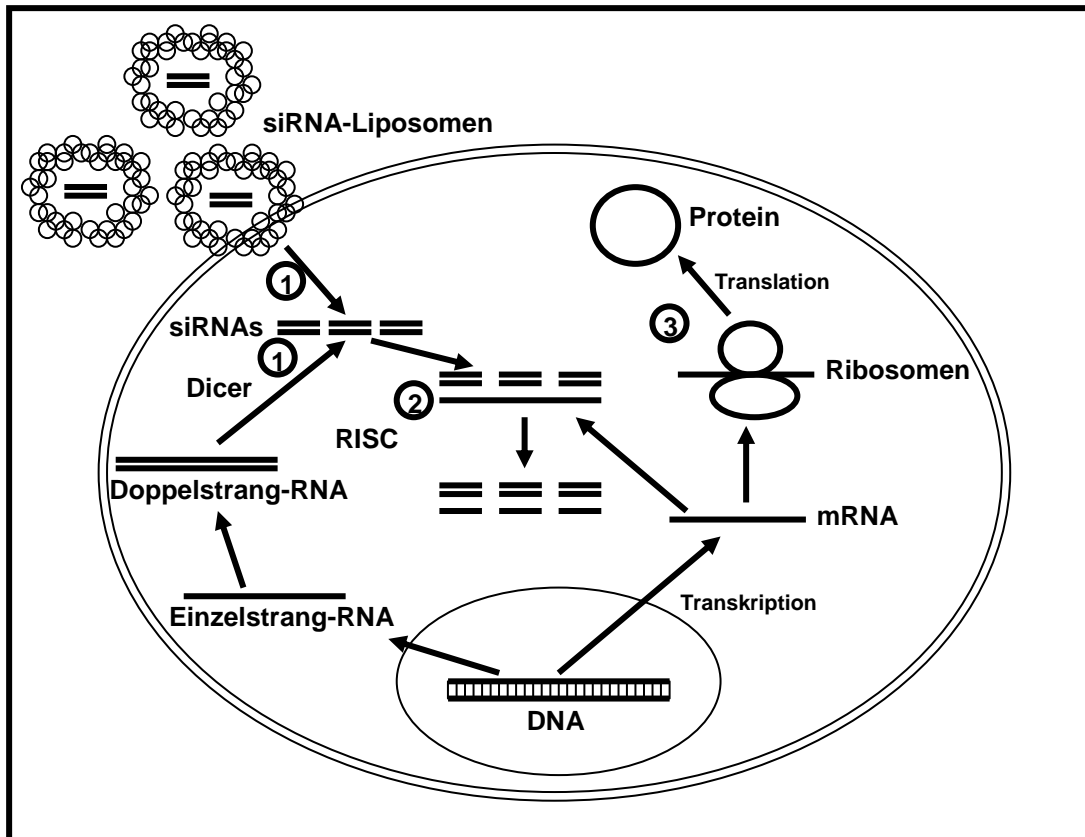


Abb. 11: Modell der RNA-Interferenz

- 1.) siRNAs werden entweder mit Hilfe von Liposomen in die Zelle eingeschleust oder durch ein Enzym namens *Dicer* (Häcksler) aus längeren doppelsträngigen zelleigenen RNA-Molekülen oder viralen RNA-Moleküle produziert
- 2.) siRNAs werden in den RISC aufgenommen und spalten zelleigene komplementäre mRNA
- 3.) die Translation an den Ribosomen und Proteinbildung ist inhibiert

2.2.7.2 Protokoll: Zelltransfektion mit TF-siRNAs

Um die TF-Synthese von THP-1 Zellen zu inhibieren, wurden zunächst THP-1 Zellen mit gegen TF-gerichteten siRNAs transfiziert. Dazu wurden die Zellen gezählt und jeweils 6×10^5 Zellen in 500 μ l RPMI + Fetal Bovine Serum (FBS)-Medium ohne Zusatz von Antibiotika in einem *well* resuspendiert. Zeitgleich wurden für jede zu transfizierende Probe 10-30 nM siRNA und 1-3 μ l Lipofectamin jeweils in 50 μ l OPTIMEM gelöst, vereinigt und zur Ausbildung der RNA-Lipofectamin-Komplexe für 20 min bei Raumtemperatur koinkubiert. Anschließend wurden die 100 μ l RNA-Lipofectamin-Komplexe zu den Zellen gegeben, durch leichte Bewegung der Platte vermischt und die Zellen für 12-14 h bei 37°C in einem CO₂-Inkubator transfiziert. Um die Wirksamkeit der Transfektion zu überprüfen, wurde anschließend die zelleigene RNA isoliert und mit Hilfe der reversen Transkriptase in *copy*-DNA (cDNA) umgeschrieben. Dann wurden die entsprechenden Abschnitte durch die PCR

amplifiziert, gefärbt, auf ein Gel aufgetragen und durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht. Die Isolierung der RNA wurde mit Hilfe und nach Anleitung des RNAqueous-Kit durchgeführt und die RNA-Konzentration anschließend mit einem UV-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Absorption 1.0 bei 260 nm korrelierte dabei mit einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

2.2.7.3 Reverse Transkriptions-PCR von TF-RNA

Um sekundäre Strukturen zu zerstören und die *poly A tags* der mRNA zugänglich zu machen, wurde 1 µg RNA mit mehreren oligo dT Primern (80 ng/µl) für 5 min bei 65°C inkubiert. Dann wurde eine Mischung bestehend aus der reversen Transkriptase (0,5 µl, 200 U/µl), dNTPs (0,5 µl, 20 mM), β-Mercaptoethanol (0,5 µl, 0.1 M), RNAsin (0,25 µl, 40 U/µl) und NX Puffer 10 x 1,5 µl zugegeben und der Ansatz bei 37°C für 55 min inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme durch 5-minütiges Erhitzen der Suspension auf 95°C inaktiviert und zuletzt 90 µl H₂O zugegeben. Von der gewonnenen cDNA wurden 2-3 µl in der anschließenden PCR eingesetzt. Für die PCR wurden die cDNA, 20 mM dNTP (0,2 µl/Reaktion), 5 µM Primer-Mix (2 µl/Reaktion), 5 U/µl Taq DNA-Polymerase (0,5 µl/Reaktion) und 2 µl 10 x PCR-Puffer (20 µl) vermischt. Die PCR-Amplifikation wurde in einem programmierbaren Thermoblock nach dem folgenden Protokoll durchgeführt, wobei die *Annealing*-Temperatur und die Syntheszeiten variiert wurden:

1. initiale Denaturierung bei 94°C für 2 min
2. Denaturierung bei 94°C für 20 s
3. *Annealing*: 52-68°C für 30 s
4. Synthese: 72°C, 1 min pro Kilobase
5. mehrfach zurück zu 2.-4.
6. finale Elongation bei 72°C für 5 min
7. Beendigung der Amplifizierung, die Proben werden auf 4°C abgekühlt

2.2.7.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in 0,6-1,2%-igen Agarosegelen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1x TAE Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Blaumarker (0,2% Bromphenolblau, 25% Glycerin) versetzt und die Nukleinsäuren nach der Auftrennung durch UV-Bestrahlung (254 nm) sichtbar gemacht.

2.2.8 Flusskammermodell

2.2.8.1 Methodenbeschreibung

Mit Hilfe des von Herrn PD Dr. Armin Reininger (Institut für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie, LMU München) entwickelten Flusskammermodells können verschiedene Blutzellen und Mikropartikel unter Flussbedingungen visualisiert werden. Die Apparatur besteht aus einer montierten Flusskammer, einem Mikroskop mit wahlweise Durch- oder Fluoreszenzlicht, einer Farbkamera und einem DVD-Rekorder sowie einer Anlage zur digitalen Bildverarbeitung (Abb. 12). Die Flusskammer ist quadratisch, aus durchsichtigem Glas und wird auf den Objektisch des Mikroskops fixiert. Eine Perfusorpumpe saugt das Blut über einen zuleitenden Schlauch in die Flusskammer, die Zellen treffen auf eine Glasoberfläche, adhären und können unter Flussbedingungen mikroskopisch beobachtet werden. Nach Durchquerung der Kammer wird das Blut über zwei parallele Schläuche in die Perfusorspritzen abgeleitet (Abb. 12). Der benötigte Fluss kann in ml/min über die Perfusor-Pumpe eingestellt werden. Bei definierter Kammergeometrie wurde die gewünschte Scherrate durch Variation der Flussgeschwindigkeit eingestellt. Die Scherrate stellt wie der *shear stress* (Scherkraft, Schubspannung) ein gültiges Maß für die hydrodynamischen Bedingungen im Blutstrom dar. Wir wählten für unsere Versuche ein Flusskammersystem mit Staupunktströmung. Im Gegensatz zu Parallelströmungssystemen wird das Blut in diesem System senkrecht zur Glasoberfläche eingeleitet, was einen maximalen Plättchen-Wand-Kontakt gewährleistet. Die auftreffenden Plättchen adhären an der Glasoberfläche, werden durch Dunkelfeldmikroskopie beleuchtet und entsenden Lichtsignale, welche von

einem Photomultiplier aufgenommen und als Funktion der Zeit aufgezeichnet werden. Der vollständige Versuchsablauf wurde auf DVD dokumentiert.

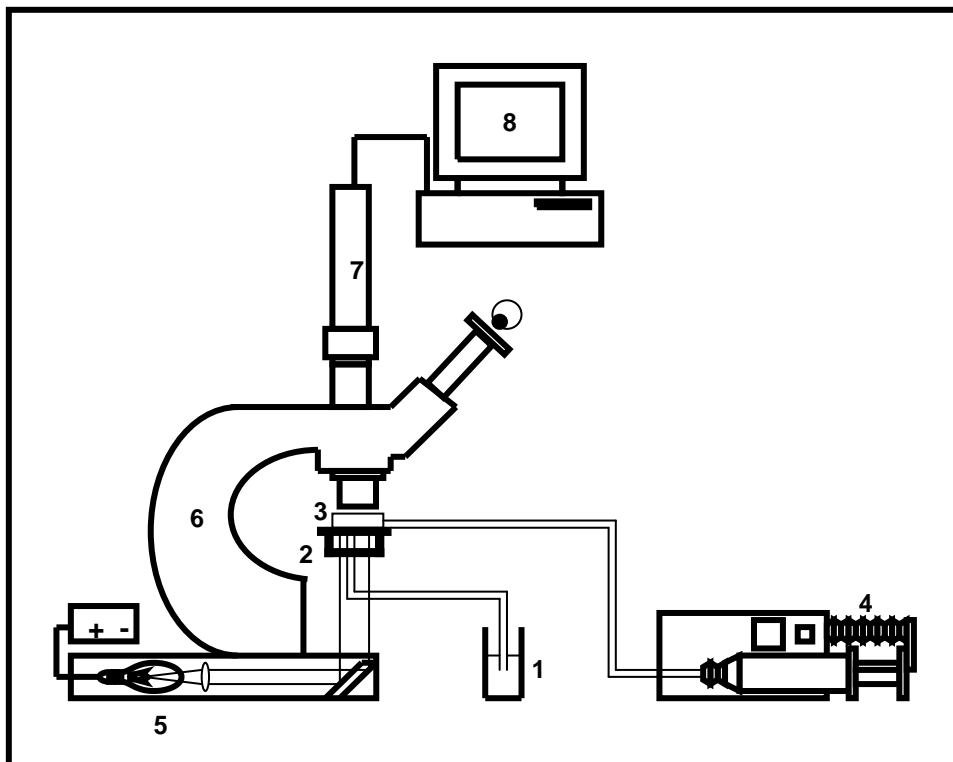


Abb. 12: Das Staupunkt-Flusskammersystem

- | | | |
|--------------------------------|------------------------------|--|
| 1 - Zulauf Vollblut | 2 - Dunkelfeldkondensor | 3 - Staupunktflusskammer auf Mikroskopiertisch |
| 4 - Abfluss in Perfusorspritze | 5 - Lampe | 6 - Dunkelfeldmikroskop |
| 7 - Videokamera | 8 - Computer zur Bildanalyse | (nach Reininger et al., 1998) |

2.2.8.2 Protokoll: Flusskammer

Mit Hilfe des Flusskammermodells sollte die Rolle der Mikropartikel-Plättchen-Interaktionen unter Flussbedingungen untersucht werden. Um die Mikropartikel fluoreszenzmikroskopisch sichtbar zu machen, wurden diese nach der Beschreibung in Protokoll 2.2.1.7 isoliert und mit dem an Annexin V (5 $\mu\text{g/ml}$) gebundenem Fluorophor Alexa 488 (5 $\mu\text{g/ml}$) markiert. Zunächst wurden 100 μl einer Annexin V-Lösung in eine Kapsel gegeben und in einem Dialysierpuffer (0,1 M NaHCO_3 ; pH 8,3) für 12 h inkubiert, um die Bindung an das Alexa 488 zu erleichtern. Anschließend wurde das Annexin V mit einer Spritze aus der Kapsel entnommen und mit in 100 μl gelöstem Alexa 488 unter Rühren im Dunkeln für 1 h inkubiert. Dann wurde das Alexa/Annexin Gemisch auf zwei Dialysierkapseln aufgeteilt und in 5 l PBS-Puffer (pH 7,4) 24 h umgepuffert. Zuletzt wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt und

die Mikropartikel markiert. Die Flusskammer wurde zunächst mit mehreren ml frisch entnommenem citriertem VB perfundiert und die Adhäsion der Plättchen an die Glasoberfläche lichtmikroskopisch beobachtet. Anschließend wurde das Plasma durch Spülung der Kammer mit PBS-Puffer ausgewaschen, das Mikroskop auf Fluoreszenzvideomikroskopie umgestellt und die markierten Mikropartikel mit den adhären Plättchen in Kontakt gebracht. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Um zu zeigen, dass Mikropartikel an Plättchen adhären, wurde jeder Bildausschnitt immer erst fluoreszenz- und dann dunkelfeldmikroskopisch betrachtet.

2.2.9 Statistik

Die statistische Signifikanz *p wurde mit der Software Stat Win (Jandel Cooperation) berechnet. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte bei Normalverteilung mit dem t-test oder bei Nicht-Normalverteilung mit dem Mann-Whitney-Rank-Sum-Test. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde bei Normalverteilung der One-Way-Analysis-of-Variance Test oder bei Nicht-Normalverteilung der Kruskal-Wallis One-Way-Analysis-of-Variance-on-Ranks Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwert +/- Standardabweichung ausgedrückt.

*p-Werte < 0,05 wurden als signifikant bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Faktor X Aktivierung durch aktivierte Plättchen und PAP

Der intravasale, auf der Oberfläche von Blutzellen und Mikropartikel präsentierte TF weist unter physiologischen Bedingungen eine nur sehr limitierte Aktivität auf (Bach, 2006; Engelmann, 2006). Um zu klären ob es möglicherweise durch eine Interaktion zwischen Mikropartikeln des PAP und Plättchen zu einer Aktivierung des zirkulierenden TF kommt, wurden Plättchen und PAP aus dem Blut gesunder Probanden isoliert, 5 min bei 37°C mit Kollagen (Typ I, 12 µg/ml) stimuliert und einzeln oder nach Koinkubation eingesetzt. Die prokoagulatorische Aktivität der Proben wurde über den Nachweis der Aktivierung von Faktor X analysiert. In Suspensionen aus isolierten Plättchen allein und im PAP allein konnte eine nur sehr geringe TF-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 13). Dagegen zeigte sich nach Zugabe aktivierter Plättchen zu PAP ein massiver Anstieg der Faktor Xa Bildung (Abb. 13).

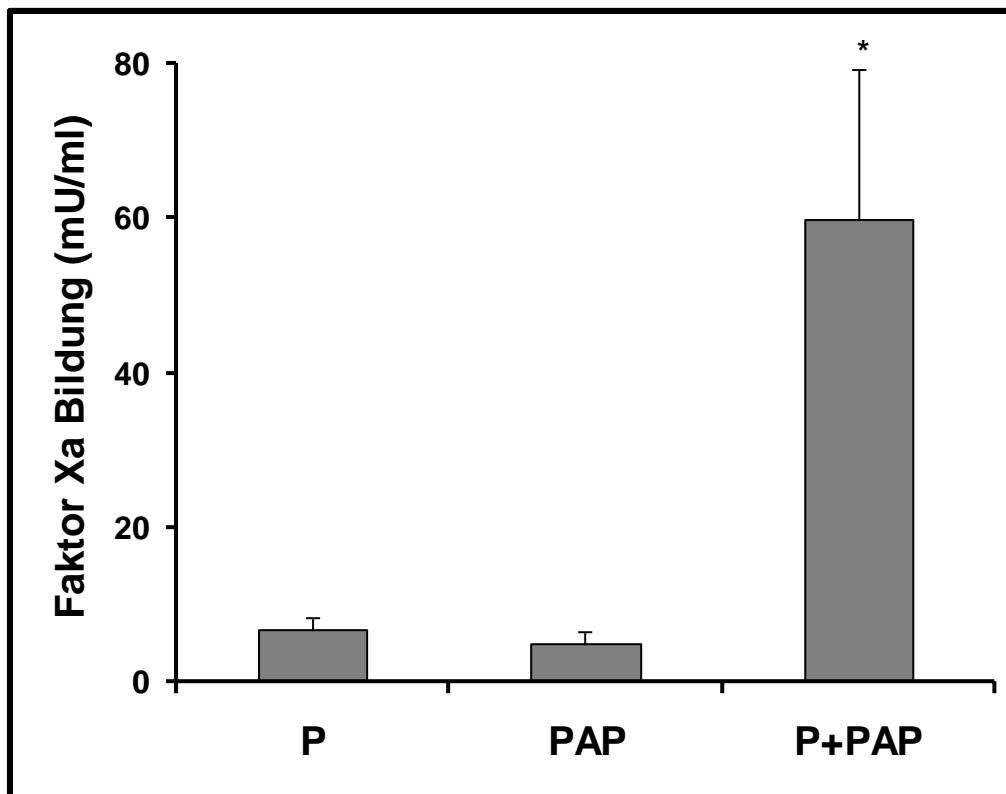


Abb. 13: TF-Aktivität in Suspensionen aus Plättchen und PAP

1,5 x 10⁷ isolierte Plättchen (P) und 1 ml PAP wurden einzeln und nach Koinkubation 5 min bei 37°C mit Kollagen (12µg/ml) stimuliert und die Faktor Xa Bildung bestimmt. n=7; *p<0,05 gegenüber P und gegenüber PAP.

3.2 TF-abhängige Gerinnungsaktivierung durch Mikropartikel-Plättchen-Interaktionen

Um zu prüfen, ob es sich bei den mit den Plättchen interagierenden Komponenten des PAP um Mikropartikel handelt, wurden zirkulierende Mikropartikel (1×10^6) und Plättchen ($1,5 \times 10^7$) aus dem Blut gesunder Probanden isoliert und miteinander inkubiert. Mikropartikel und Plättchen wurden in dieser Versuchsreihe sowohl getrennt voneinander als auch gemeinsam eingesetzt. Alle Ansätze wurden für 5 min bei 37°C mit $12 \mu\text{g/ml}$ Kollagen inkubiert. Isolierte stimulierte Plättchen und Mikropartikel allein wiesen eine nur sehr geringe prokoagulatorische Aktivität auf. Jedoch kam es nach Koinkubation beider Blutbestandteile zu einem sehr deutlichen Anstieg der Faktor Xa Bildung (Abb. 14). Um nachzuweisen, dass die Aktivierung von TF für diesen Anstieg verantwortlich ist, wurde die Mikropartikel-Plättchen-Suspension vor der Kollagenstimulierung mit dem Anti-TF Ak VIC7 ($20 \mu\text{g/ml}$) vorbehandelt. Dabei fanden wir, dass der spezifische Ak, welcher ausschliesslich die funktionell aktive *full-length* Form von TF erkennt, die Faktor Xa Bildung der Mikropartikel-Plättchen-Suspension deutlich zu hemmen vermochte (Abb. 14).

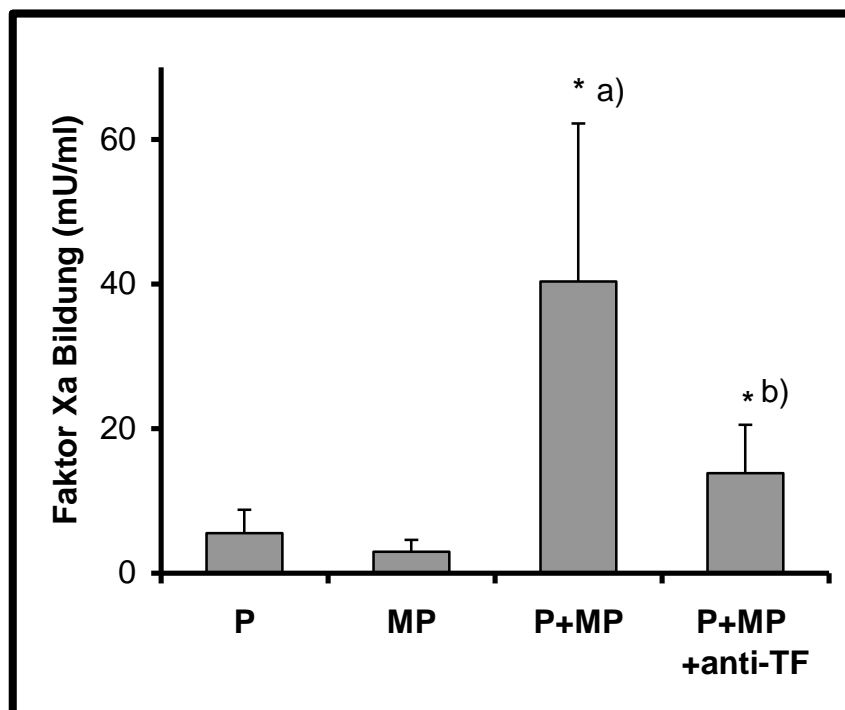


Abb. 14: TF-abhängige Faktor Xa Bildung in Suspensionen aus Mikropartikeln und Plättchen $1,5 \times 10^7$ isolierte Plättchen (P) und 1×10^6 zirkulierende Mikropartikel (MP) wurden einzeln oder gemeinsam (P+MP) für 5 min bei 37°C mit Kollagen ($12 \mu\text{g/ml}$) inkubiert und die Faktor Xa Bildung (mU/ml) bestimmt. Zusätzlich wurde die Mikropartikel-Plättchen-Suspension mit dem Anti-TF Ak VIC7 ($20 \mu\text{g/ml}$) vorbehandelt (P+MP+anti-TF). $n=8$; $p^* < 0,05$ a) gegenüber P und MP allein; b) gegenüber P+MP.

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen darauf hin, dass zirkulierende Mikropartikel und aktivierte Plättchen miteinander interagieren und dass diese Interaktion für die funktionelle Aktivierung des iTF von besonderer Wichtigkeit ist.

3.3 Etablierung einer durchflusszytometrischen Methode zur Bestimmung der Mikropartikel-Zahl

Nachdem wir zeigen konnten, dass im Blut gesunder Probanden zirkulierende Mikropartikel mit stimulierten Plättchen interagieren, sollte untersucht werden, welche zellspezifischen Mikropartikel präferenziell mit Blutplättchen interagieren. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, musste in allen Versuchen die identische Menge an Mikropartikeln eingesetzt werden. Es wurde daher eine Methode etabliert, mit deren Hilfe die Anzahl der gebildeten Mikropartikel gemessen werden konnte. Zu diesem Zweck wurden Blutzellen (Plättchen, neutrophile Granulozyten, Monozyten) durch zellspezifische Stimuli zur Mikropartikelproduktion angeregt und die gebildeten Mikropartikel mit FITC-markiertem Annexin V gefärbt. Danach wurden die Annexin V positiven Events (FL1-Log) mit einem Durchmesser von 0,1-1 μm (FS-Log) flowzytometrisch sichtbar gemacht (Abb. 15).

Annexin V bindet in Anwesenheit von Calcium an Phosphatidylserin und ist daher ein Marker für die Phosphatidylserin-exponierenden Mikropartikel. Das Flowzytometer lieferte uns genaue Angaben über die in das Fenster eingelesenen Events pro Sekunde (Abb. 15). Dort konnte in einem definierten Volumen die Anzahl der eingelesenen Mikropartikel kalkuliert werden. Anschließend berechneten wir die jeweilige Anzahl an Zellen, welche zur Bildung von 1×10^6 Mikropartikeln notwendig waren. Dabei ergaben sich die folgenden für die Bildung von 1×10^6 Mikropartikeln erforderlichen Zellzahlen: 4×10^8 Blutplättchen, 6×10^6 neutrophile Granulozyten und 3×10^6 Monozyten.

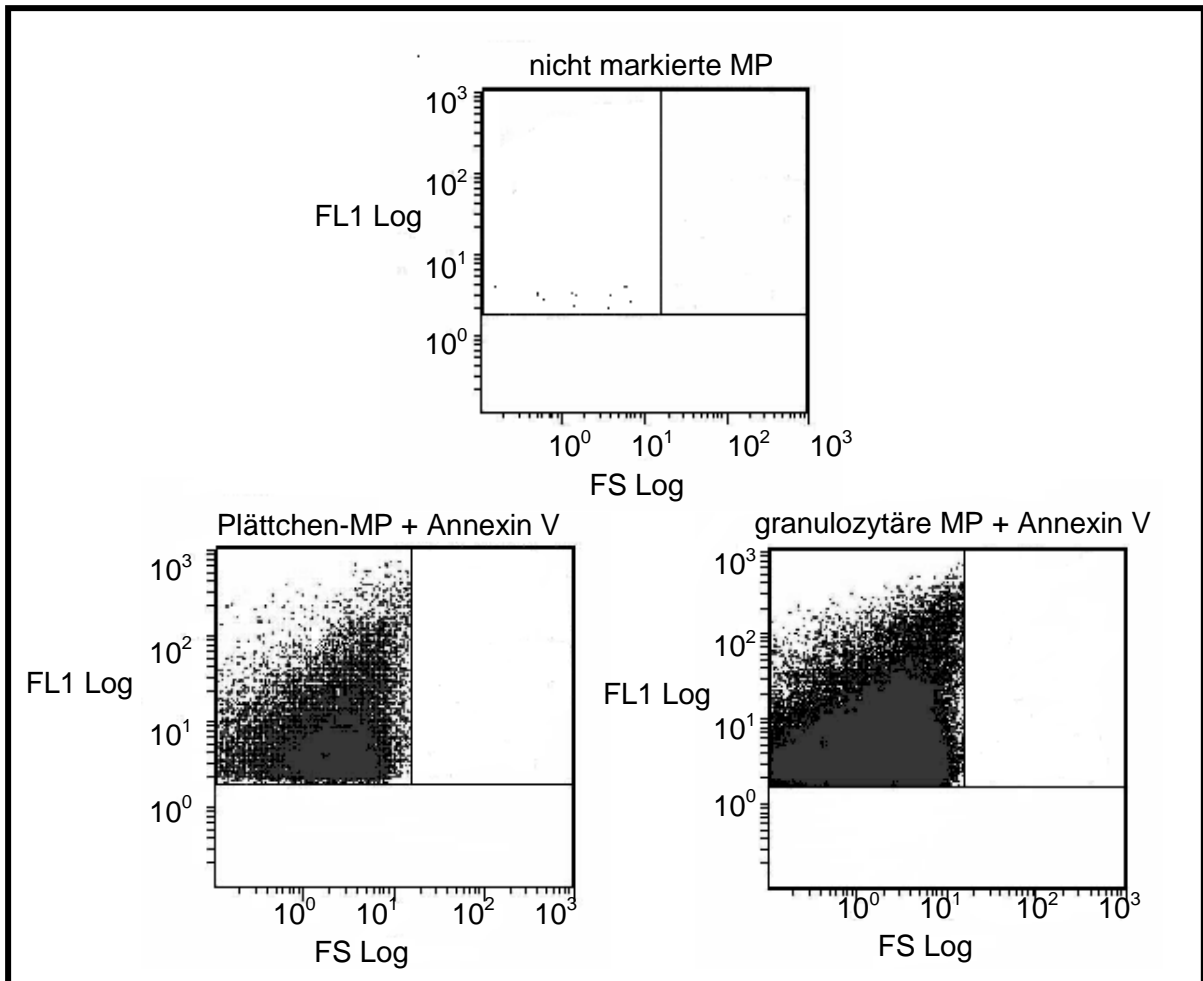


Abb. 15: Annexin V markierte Mikropartikel in der Durchflusszytometrie

Plättchen-Mikropartikel (Plättchen-MP) (unten links) und von neutrophilen Granulozyten produzierte Mikropartikel (granulozytäre MP) (unten rechts) wurden mit Annexin V markiert und durchflusszytometrisch gemessen. Als Negativkontrolle wurden nicht markierte Mikropartikel (MP) von Plättchen und neutrophilen Granulozyten eingesetzt (oben). FS Log gibt die Größe der Events (0,1-1 µm), FL-1 Log die fluoreszenzmarkierten, Annexin V-positiven Events an. In dem gesetzten Fenster kann die Anzahl der eingelesenen Mikropartikel errechnet werden.

3.4 Interaktionen von Plättchen und zellspezifischen Mikropartikeln im Vergleich

Um zu analysieren, welche der zirkulierenden Mikropartikel mit Plättchen interagieren und die gegenseitigen Aktivierungsmechanismen näher zu untersuchen, wurden zellspezifische Mikropartikel von Plättchen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten zu Plättchensuspensionen gegeben, die Suspensionen 5 min mit Kollagen (12 µg/ml) stimuliert und danach deren prokoagulatorische Aktivität bestimmt. Wie erwartet, zeigten alle zellspezifischen Mikropartikel und aktivierten Plättchen einzeln eingesetzt eine nur sehr limitierte TF-Aktivität (Abb. 16). In Suspensionen aus Plättchen und Plättchen-Mikropartikeln wurde im Vergleich zu den

Bestimmungen in Suspensionen aus den beiden einzelnen Blutbestandteilen eine nur geringfügig höhere Faktor Xa Aktivität gemessen (Abb. 16). Diese Zunahme der TF-Aktivität ist als additiver Effekt zu werten. Nach Koinkubation von granulozytären Mikropartikeln und Plättchen kam es zu einer moderaten Zunahme der Faktor Xa Bildung (Abb. 16). Interessanterweise zeigten jedoch die Suspensionen aus monozytären Mikropartikeln und aktivierten Plättchen eine deutliche Steigerung der prokoagulatorischen Aktivität. Die Koinkubation dieser beiden Blutbestandteile führte zu einer signifikanten Steigerung der TF-Aktivität (Abb. 16). Dies lässt darauf schließen, dass die zuvor beobachtete Steigerung der TF-Aktivität im PAP und in Anwesenheit der Gesamtpopulation zirkulierender Mikropartikel vorwiegend durch Interaktion von Plättchen mit monozytären Mikropartikeln bedingt ist.

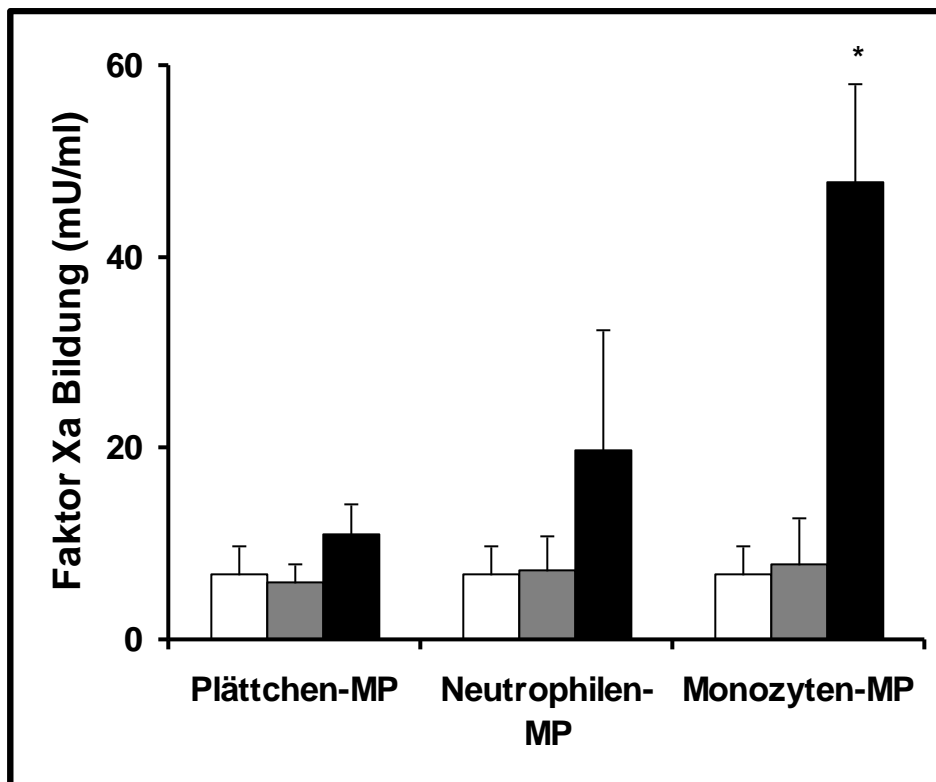


Abb. 16: TF-Aktivität verschiedener zellspezifischer Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen
Jeweils 1×10^6 Plättchen-Mikropartikel (Plättchen-MP), von neutrophilen Granulozyten produzierte Mikropartikel (Neutrophilen-MP) und monozytäre Mikropartikel (Monozyten-MP) wurden mit $1,5 \times 10^7$ Plättchen inkubiert und die Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen mit Kollagen ($12 \mu\text{g/ml}$) stimuliert.
Weiße Säulen: Plättchen
Graue Säulen: zellspezifische Mikropartikel
Schwarze Säulen: Suspensionen aus Plättchen und zellspezifischen Mikropartikeln
 $n=8$; $p^* < 0,05$ gegenüber Monozyten-Mikropartikeln und Plättchen einzeln eingesetzt.

3.5 Gerinnungsaktivierung durch atherosklerotische Plaques

Danach untersuchten wir detaillierter die klinische Relevanz der Mikropartikel-Plättchen-Interaktionen für den TF-aktivierten Gerinnungsstart. Hierzu wurde getestet, ob die Induktion der Fibrinbildung durch lipidreiche Kerne atherosklerotischer Plaques die Interaktion mit Blutplättchen benötigt. Innerhalb der Plaques ist TF vorwiegend mit Mikropartikeln assoziiert, die aus monozytären Makrophagen stammen. Wir verglichen zu diesem Zweck die Gerinnungszeit und die Thrombuswachstumsrate nach Zugabe lipidreicher Kerne atherosklerotischer Plaques zu VB, PRP und PAP. 300 µl citriertes Vollblut wurden mit 32 µg/ml CTI (Inhibitor des humanen Faktors XIIIa und somit der Kontaktaktivierung des Blutes) versetzt. Danach wurden jeweils 5 µl der lipidreichen Kernregion atherosklerotischer Plaques zu VB, PRP oder PAP in einer vorgewärmten Küvette zugegeben. Insgesamt wurde jeder Plaque dreimal in unabhängigen Versuchen im VB, PRP oder PAP getestet und das Blut jeweils von drei unterschiedlichen gesunden Probanden gespendet. Um die Bedeutung des TF an der plaqueinduzierten Fibrinbildung zu verifizieren, wurde das VB auch vor Zugabe des Plaquematerials mit 20 µg/ml des anti-TF Ak VIC7 vorbehandelt.

Jeder der 6 eingesetzten Plaques führte sowohl im VB (Abb. 17) als auch im PRP (Abb. 18) zu einer rasch einsetzenden Fibrinbildung und zur Entstehung eines stabilen Gerinnsels. Die Gerinnungszeiten nach Zugabe der Plaques betragen im VB gemittelt 401 ± 111 s (Abb. 19) und im PRP gemittelt 427 ± 236 s (Abb. 19). Der Mittelwert aller im PAP gemessenen Gerinnungszeiten lag hingegen bei über 2000 s (Abb. 19). Der eingesetzte anti-TF Ak VIC7 konnte die Gerinnungsaktivierung durch die Plaques im VB deutlich hemmen (Abb. 17) und zeigte so die TF-Abhängigkeit der Gerinnungsaktivierung durch das atherosklerotische Plaquematerial auf. Somit sind Blutplättchen offensichtlich von essentieller Bedeutung für eine rasche Gerinnungsaktivierung durch die lipidreichen Kernregionen atherosklerotischer Plaques. Dies lässt darauf schließen, dass eine Interaktion der Blutplättchen mit TF-positiven Mikropartikeln der atherosklerotischen Plaques an der Gerinnungsaktivierung durch atherosklerotische Plaques beteiligt ist.

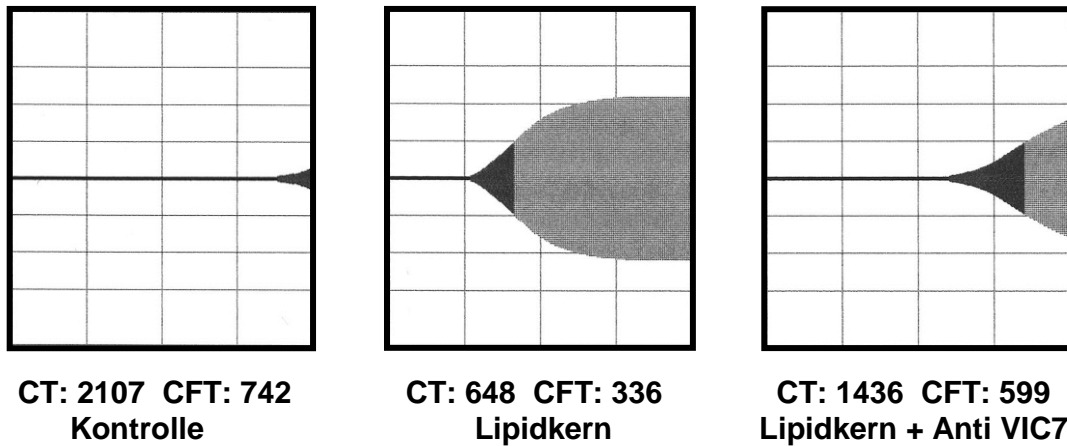


Abb. 17: TF-abhängige Fibrinbildung nach Zugabe von Plaquematerial zu VB

Citriertes und mit CTI (32 µg/ml) versetztes VB wurde mit 5 µl des homogenisierten Lipidkerns eines atherosklerotischen Plaques stimuliert und recalcifiziert (Mitte). Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge an Puffer zugegeben (links). Durch Vorbehandlung des citrierten VB mit dem anti-TF Ak VIC7 vor Zugabe des Plaquematerials konnte die Fibrinbildung und das Thrombuswachstum deutlich gehemmt werden (rechts). CT und CFT der Proben wurden mit Hilfe der Thrombelastographie bestimmt.

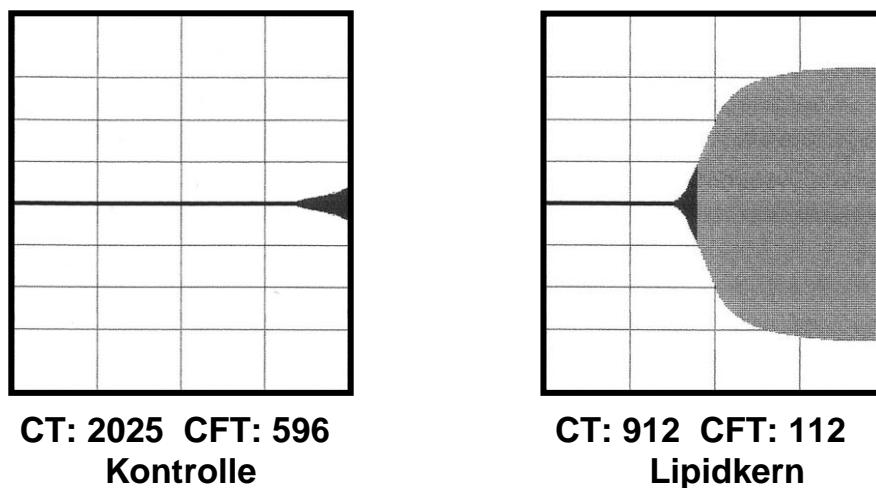


Abb. 18: Gerinnungszeit (CT) und Thrombuswachstumsrate (CFT) im PRP nach Zugabe von atherosklerotischem Plaquematerial

PRP wurde aus citriertem und mit CTI (32 µg/ml) versetztem Vollblut isoliert, mit 5 µl des homogenisierten Lipidkerns eines atherosklerotischen Plaques stimuliert und recalcifiziert (rechts). Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge an Puffer zugegeben (links).

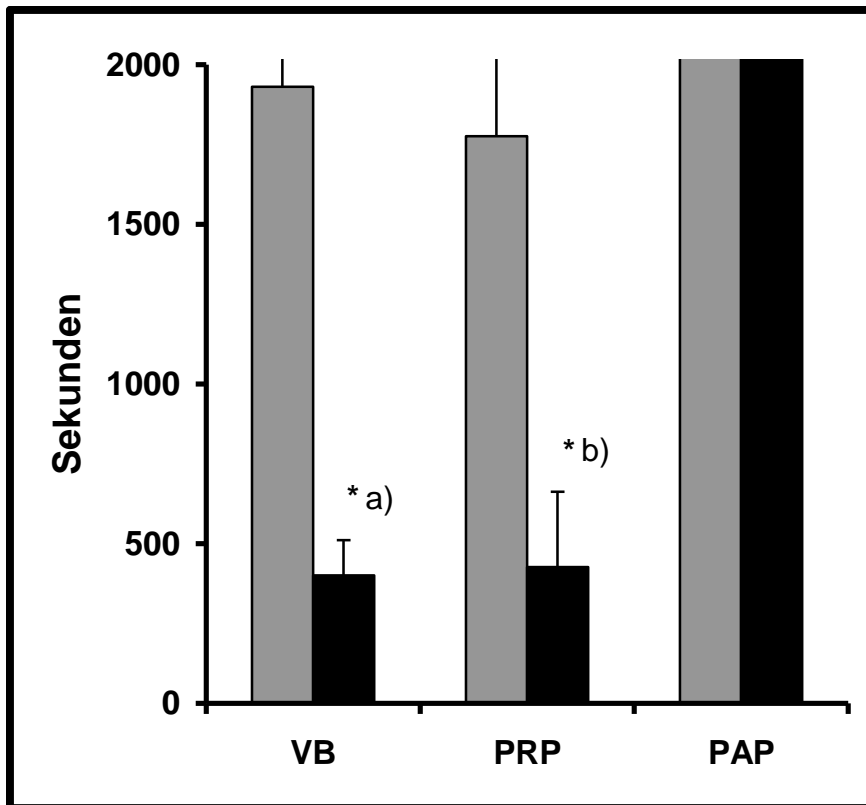


Abb. 19: Mittelwerte der CT von VB, PRP und PAP

300 µl VB, PRP oder PAP wurden je 5 µl des lipidreichen Kerns atherosklerotischer Plaques, bzw 5 µl Puffer als Kontrolle zugegeben. Die Gerinnungszeit im VB betrug für die Kontrolle im Mittel 1931 ± 513 s, nach Plaquestimulierung verkürzte sie sich auf 401 ± 111 s. Im PRP betrug die Kontrollzeit 1776 ± 421 s und verkürzte sich nach Plaquezugabe ebenfalls signifikant auf 427 ± 236 s. Mit über 2500 s lagen sowohl der Kontrollwert, als auch der Wert nach Plaquestimulierung im PAP deutlich oberhalb der in den anderen Blutsystemen (VB und PRP) erzielten Werte.

grau: VB, PRP und PAP nach Zugabe von 5 µl Puffer (Kontrolle)

schwarz: VB, PRP und PAP nach Stimulation durch 5 µl Plaquematerial

n=3 (für jeden untersuchten Plaque), $p^* < 0,05$ a) gegenüber VB-Kontrolle und PAP; b) gegenüber PRP-Kontrolle und PAP

3.6 Bedeutung des Mikropartikel- und des Plättchen-assoziierten TF für die prokoagulatorische Aktivität

Nachdem wir zeigen konnten, dass insbesondere die TF-reichen monozytären Mikropartikel mit Plättchen interagieren und zu einer deutlichen Steigerung der TF-Aktivität und der Fibrinbildungsrate führen (Abb. 16), wollten wir in weiterführenden Versuchen überprüfen, ob es durch die Interaktion der beiden Blutkomponenten vor allem zu einer Aktivierung des Mikropartikel- oder des Plättchen-assoziierten TF kommt. Zu diesem Zweck wurde vor der Koinkubation von Mikropartikeln und Plättchen selektiv entweder der Mikropartikel- oder der Plättchen-assoziierte TF mit einem anti-TF Ak blockiert. Dazu wurden die Proben für 30 min bei 37 °C mit dem anti-TF Ak VIC7 (20 µg/ml) inkubiert und überschüssiger, ungebundener Antikörper

durch Resuspendierung in PBS, anschließende Zentrifugation und Verwerfung des Überstandes entfernt. Dann wurden die Zell- bzw. Mikropartikelpellets im Endvolumen resuspendiert, getrennt oder vereinigt eingesetzt und alle Proben mit 12 µg/ml Kollagen für 5 Minuten bei 37°C stimuliert. Dabei konnten wir zeigen, dass eine Vorinkubation der monozytären Mikropartikel mit dem anti-TF Ak VIC7 eine komplette Inhibierung der synergistischen TF-Aktivierung in Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen bewirkt (Abb. 20). Dagegen blieb der Effekt nach Inhibierung des Plättchen-assoziierten TF unverändert. Wurden sowohl der Plättchen-, als auch der Mikropartikel-assoziierte TF gehemmt, war die prokoagulatorische Aktivität der Probe wie erwartet ebenfalls gering (Abb. 20). Wir schlussfolgerten daraus, dass unter den angewandten experimentellen Bedingungen der Mikropartikel-assoziierte TF die entscheidende Rolle in der Gerinnungsaktivierung durch Mikropartikel-Plättchen-Interaktion spielt. Er liegt unter physiologischen Bedingungen in einer inaktiven, sogenannten *encrypted* Form vor und benötigt für die Aktivierung die Interaktion mit Plättchen.

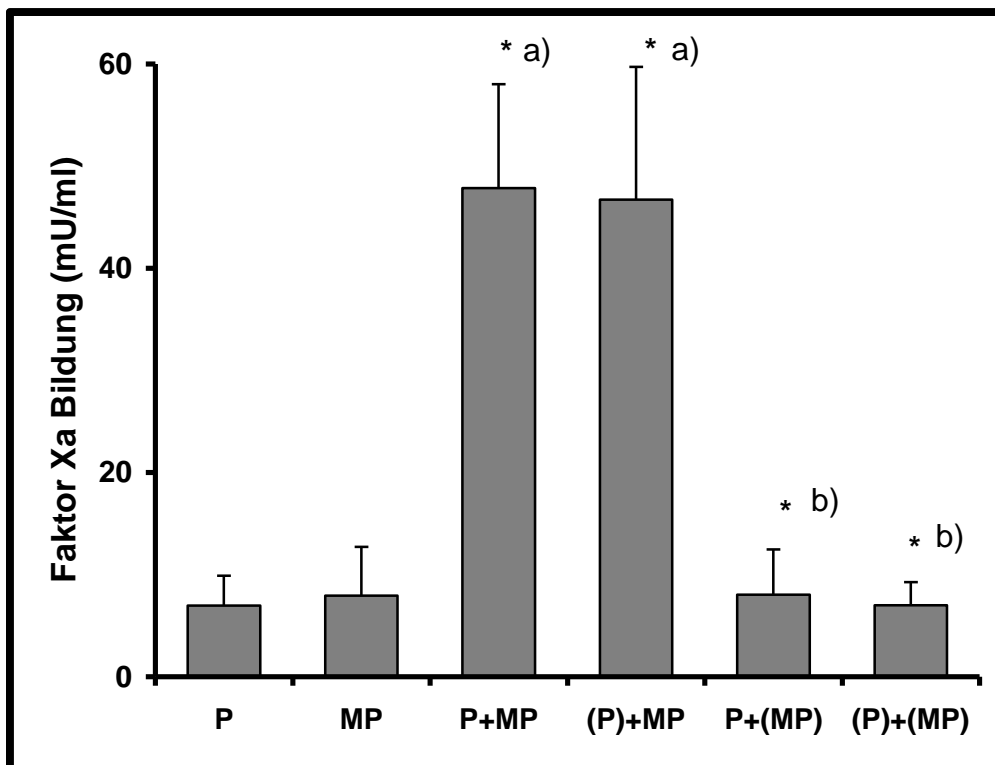


Abb. 20: Faktor X Aktivierung durch Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen vor und nach spezifischer TF-Inhibierung

$1,5 \times 10^7$ isolierte Plättchen [P] und 1×10^6 monozytäre Mikropartikel [MP] wurden einzeln und in Suspension [P+MP] eingesetzt. Durch Vorbehandlung der in Suspensionen eingesetzten Plättchen [(P)+MP] bzw. Mikropartikel [P+(MP)] oder beider Blutkomponenten [(P)+(MP)] mit dem anti-TF Ak VIC7 (20 µg/ml) konnte der Plättchen- bzw. Mikropartikel-assoziierte TF spezifisch gehemmt werden. Alle Proben wurden zuletzt mit 12 µg/ml Kollagen stimuliert und die prokoagulatorische Aktivität der Proben mit Hilfe der Faktor Xa Bildung bestimmt.

n=8; $p^* < 0,05$ a) gegenüber P bzw. MP; b) gegenüber P+MP

3.7 Methodenetablierung zur Produktion TF-depletierter Mikropartikel

Um die Beteiligung des von monozytären Mikropartikeln exprimierten TF am Gerinnungsstart weiter zu analysieren, unternahmen wir den Versuch eine Methode zur Herstellung TF-depletierter monozytärer Mikropartikel zu entwickeln. Hierzu wurde eine monozytäre Zelllinie verwendet (THP-1 Zellen). Um die Kontroll-Mikropartikel zu gewinnen wurden 3×10^6 THP-1 Zellen für 16 h bei 37°C mit 0,1 mg/ml LPS zur Mikropartikelproduktion angeregt und die so gebildeten Mikropartikel isoliert. Die von THP-1 Zellen gebildeten Mikropartikel zeigten eine höhere prokoagulatorische Aktivität als die zuvor eingesetzten monozytären Mikropartikel (28,34 mU/ml vs. 7,95 mU/ml). Jedoch wurde auch die TF-Aktivität der THP-1 Mikropartikel nach Koinkubation mit aktivierten Plättchen gesteigert (auf 72,32 mU/ml). Zur Gewinnung von TF-depletierten Mikropartikeln wurden die THP-1 Zellen vor der LPS-Stimulierung mit doppelsträngiger siRNA transfiziert, um die komplementäre TF-mRNA zu hemmen. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der Methode wurde die RNA der THP-1 Zellen isoliert, mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und nach Durchführung der PCR auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Es zeigte sich, dass die Transfektion mit siRNA in der Tat erfolgreich war. Die TF-Bande der transfizierten THP-1 Zellen bei 628 *base pairs* (bp) war nach Optimierung der Bedingungen im Vergleich zu den Kontrollzellen und dem Kontrollprotein Aldolase (571 bp) deutlich abgeschwächt (Abb. 21).

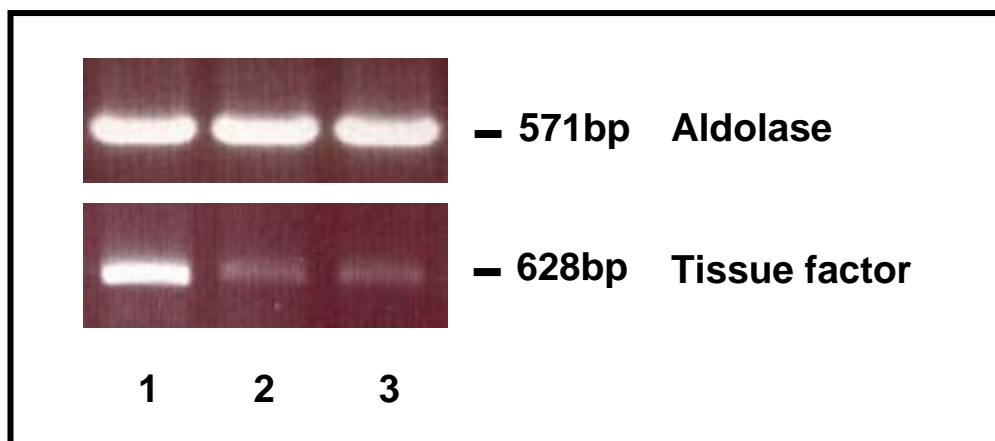


Abb. 21: TFmRNA-Expression von THP-1 Zellen vor und nach der Transfektion mit TF-spezifischer siRNA

THP-1 Zellen wurden mit siRNA gegen TF transfiziert. Um die Wirksamkeit der Methode zu überprüfen, wurde die zelleigene RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, durch PCR amplifiziert und auf ein Agarosegel-Gel aufgetragen

- 1: nicht transfizierte THP-1 Zellen;
- 2: mit 50 nM TF-spezifischer siRNA transfizierte THP-1 Zellen;
- 3: mit 200 nM TF-spezifischer siRNA transfizierte THP-1 Zellen

Nachdem wir die Wirksamkeit der Transfektion belegen konnten, wurden die transfizierten THP-1 Zellen mit 0,1 mg/ml LPS zur Mikropartikelproduktion angeregt. Die gebildeten Mikropartikel wurden durchflusszytometrisch auf TF-Präsentation untersucht. Es wurden Mikropartikel der mit TF-spezifischer siRNA transfizierten THP-1 Zellen und Mikropartikel einer Kontrollgruppe mit einem FITC-markierten Anti-TF Ak angefärbt und die TF-Präsentation verglichen. Allerdings war hierbei kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Mikropartikelpopulationen festzustellen. Vermutlich kam es mehrere Stunden nach der Transfektion durch die lange LPS-Stimulation der THP-1 Zellen zur Neusynthese von TF.

3.8 Mikropartikel und Plättchen unter Flussbedingungen

Zur Analyse der Mikropartikel-Plättchen-Interaktion unter Bedingungen, die der *in vivo* Situation im Blutgefäß nahe kommen, und zur Visualisierung der Interaktion von Mikropartikeln und aktivierten Plättchen, wurden Flusskammerversuche in Zusammenarbeit mit PD Dr. Armin Reiningger durchgeführt. Die verwendete Apparatur bestand aus einer montierten Flusskammer, einem Mikroskop mit wahlweise Dunkelfeld- oder Fluoreszenzlicht, einer integrierten Kamera und einem DVD Rekorder sowie einer Anlage zur digitalen Bildverarbeitung (vgl. Abb. 12). Durch eine Perfusorpumpe wurde das frisch entnommene citrierte VB mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min über einen zuleitenden Schlauch in die Flusskammer gesogen. Die Plättchen trafen dabei senkrecht auf eine Glasoberfläche und adhärten daraufhin oder wurden nach Durchquerung der Kammer mit dem restlichen Blut über zwei parallele Schläuche in die Perfusorspritzen abgeleitet. Die Adhäsion der Plättchen an die Glasoberfläche wurde dunkelfeldmikroskopisch beobachtet (Abb. 22, links) und über eine ins Mikroskop integrierte Videokamera dokumentiert. Anschließend wurde das Blutplasma durch Spülung mit PBS-Puffer ausgewaschen. Dann wurden die zuvor im PAP fluoreszenzmarkierten (Alexa 488-Annexin V) Mikropartikel unter definierten Flussbedingungen in Kontakt mit den adhären Plättchen gebracht. Nach Optimierung der Bedingungen konnten die Alexa 488-Fluoreszenz der markierten Mikropartikel einzeln unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden (Abb. 22, rechts). Durch genaue fluoreszenzmikroskopische Beobachtung eines Bildausschnittes, anschließendes Umschalten in die Dunkelfeldmikroskopie und Überlagerung der Bilder konnte unter

langsamen Flussbedingungen eine Adhäsion der Mikropartikel an die aktivierten Plättchen beobachtet werden (Abb. 22, farbige geometrische Formen).

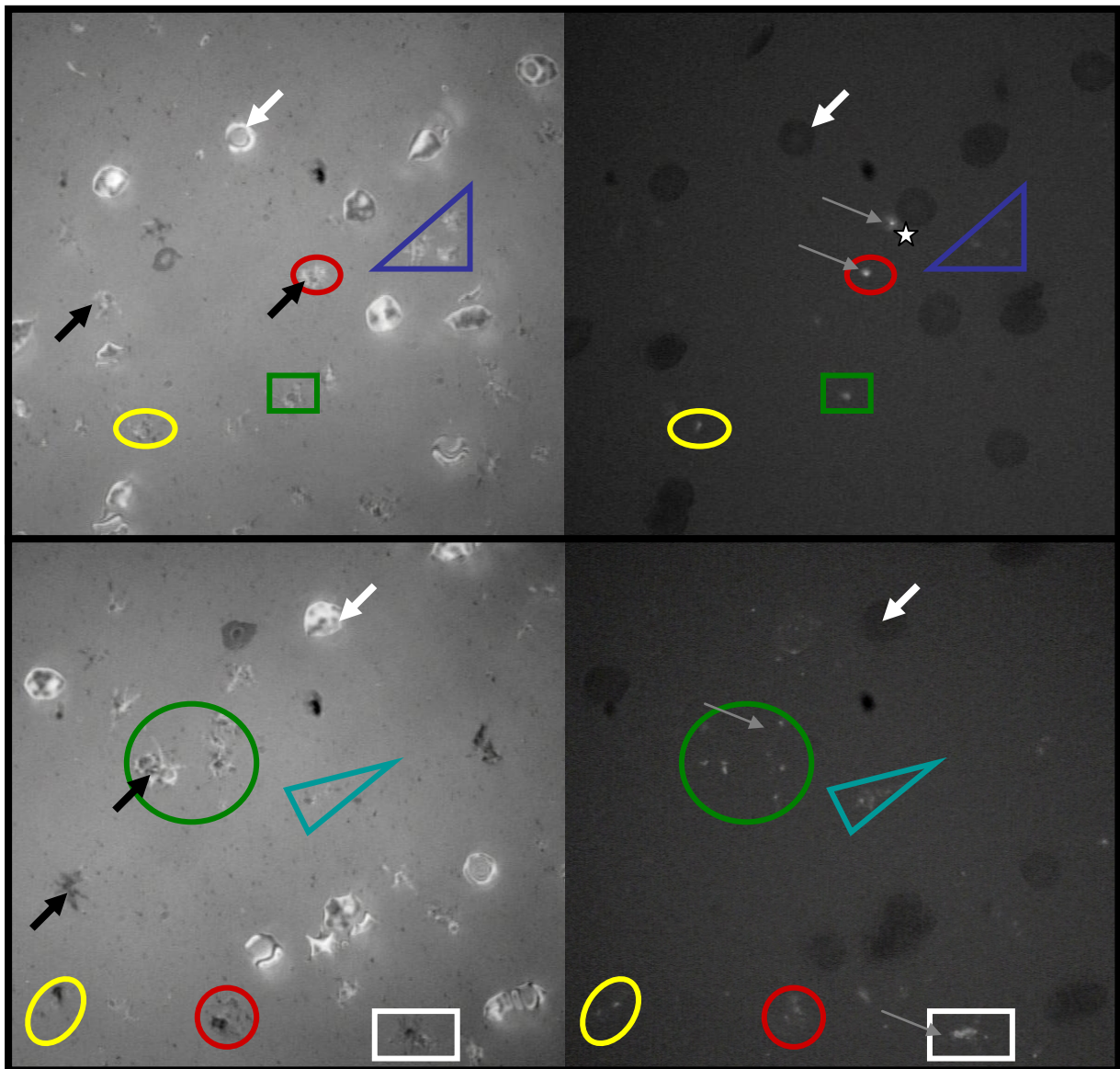


Abb. 22: Mikropartikel-Plättchen-Interaktionen unter Flussbedingungen

Frisch entnommenes, citriertes Vollblut wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min im sogenannten Staupunktströmungsverfahren auf eine Glasoberfläche geleitet und die Adhäsion der Plättchen an die Glasoberfläche dunkelfeldmikroskopisch beobachtet (Abbildungen, links). Anschließend wurde das Blutplasma durch Spülung mit PBS Puffer ausgewaschen, die zuvor mit Alexa 488-Annexin V-markierten Mikropartikel unter Flussbedingungen (1 ml/min) in Kontakt mit den adhären Plättchen gebracht und fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht (Abbildungen, rechts). Durch genaue Kennzeichnung der Anheftungsgebiete (bunte geometrische Formen) und Überlagerung der Bilder konnte eine Adhäsion der Mikropartikel an aktivierte Plättchen sichtbar gemacht werden. Auch konnten einzelne, noch bewegliche Mikropartikel fluoreszenzmikroskopisch verfolgt und ihre Anheftung an Plättchen dokumentiert werden (Beispiel für einen zuvor beweglichen, dann adhären Mikropartikel: weißer Stern); weißer Pfeil: Erythrozyt; schwarzer Pfeil: adhären Plättchen; grauer Pfeil: Mikropartikel

3.9 Mechanismen der TF-Aktivierung

Nach den bisherigen Ergebnissen war davon auszugehen, dass sowohl der Mikropartikel- als auch der Plättchen-assoziierte TF per se in einem funktionell inaktiven Zustand vorliegen und es erst durch die Interaktion der beiden Blutkomponenten zum intravasalen Gerinnungsstart kommt. Im Folgenden sollte daher der Aktivierungsmechanismus des iTF näher untersucht werden. Bekannterweise können Plättchen an Leukozyten (Monozyten, neutrophile Granulozyten) adhären und diese zur Sekretion verschiedener Proteasen (u.a. Elastase) stimulieren, welche ihrerseits den von Plättchen freigesetzten Inhibitor TFPI spalten und somit zu einer vermehrten TF-Aktivität der Plättchen-Leukozyten-Suspension führen. Es galt daher zu prüfen, ob Mikropartikel diese Proteasen auf ihrer Oberfläche aufweisen, dadurch Plättchen-assoziierten TFPI spalten und so die prokoagulatorischen Aktivität von Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen steigern können. Die Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen wurden zunächst 5 min bei 37°C mit 12 µg/ml Kollagen stimuliert und anschließend mit spezifischen Inhibitoren gegen Serinproteasen (α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin und Chloromethylketone) inkubiert. Es zeigte sich nach Zugabe der Proteaseinhibitoren ein deutlicher Rückgang der prokoagulatorischen Aktivität in den Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen. In Anwesenheit von α_1 -Antitrypsin (20 µg/ml), einem Inhibitor der neutrophilen Elastase, war die prokoagulatorische Aktivität um mehr als 60% gehemmt (Abb. 23). α_1 -Antichymotrypsin, ein Inhibitor der Serinprotease Cathepsin G, führte zu einer fast 70%-igen Hemmung, während die Zugabe von Chloromethylketone, einem weiteren Inhibitor der Elastase, die prokoagulatorische Aktivität der Probe um über 75% reduzierte (Abb. 23).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch Mikropartikel-assoziierte Proteasen induzierte TFPI-Spaltung einen Teil der vermehrten TF Aktivität nach Inkubation von Mikropartikeln und Plättchen vermitteln könnte.

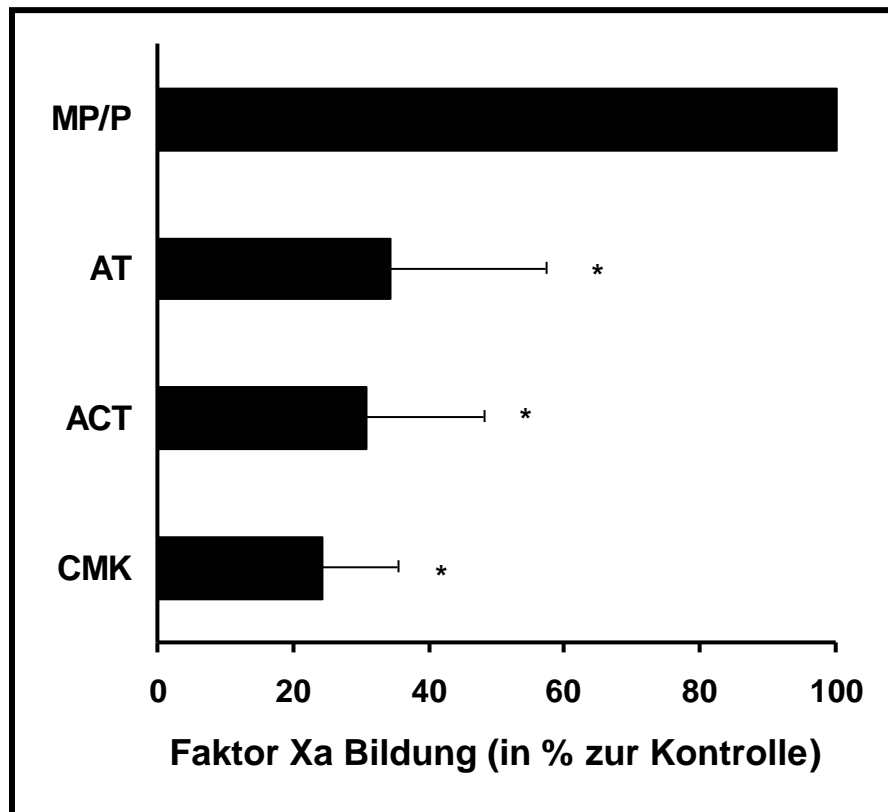


Abb. 23: TF-Aktivität von Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen vor und nach Zugabe von Proteaseinhibitoren

Suspensionen aus zirkulierenden Vollblut-Mikropartikeln (1×10^6) und Plättchen ($1,5 \times 10^7$) wurden für 5 min mit $12 \mu\text{g/ml}$ Kollagen stimuliert (MP/P) und anschließend mit α_1 -Antitrypsin (AT) ($20 \mu\text{g/ml}$), α_1 -Antichymotrypsin (ACT) ($20 \mu\text{g/ml}$) oder Chloromethylketone (CMK) ($0,5 \text{ mM}$) inkubiert. Durch Zugabe der Proteaseinhibitoren kam es zu einem deutlichen Rückgang der Faktor Xa Bildung (hier in Prozent angegeben); $n=7$, $p^* < 0,05$ gegenüber MP/P

Danach untersuchten wir, welche Veränderungen im TF-Molekül selbst die Regulierung der TF-Aktivität vermitteln könnten. Da vor allem der Mikropartikel-assoziierte TF aktiviert wird, nahmen wir an, dass bestimmte von den Plättchen sezernierte Substanzen, wie z.B. Thiolisomerasen an der Modifikation des TF-Proteins und seiner Aktivierung beteiligt sein könnten. Insbesondere die Protein Disulfid Isomerase (PDI), welche Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen, also die Oxidation, Reduktion und Umlagerung von Disulfid-Brücken zahlreicher Proteine katalysiert, kam hierbei als Kandidat in Frage. Um die Funktion der Thiolisomerasen für die Aktivierung des Mikropartikel-assoziierten TF zu studieren, wurden unspezifische Thiolisomerasen-Inhibitoren (Bacitracin) sowie ein spezifischer anti-PDI Ak eingesetzt. Die Plättchen wurden für 10 min bei 37°C mit Kollagen ($12 \mu\text{g/ml}$) aktiviert, 20 min mit den Inhibitoren Bacitracin (12 mM) und anti-PDI Ak ($400 \mu\text{g/ml}$) bzw. dem Kontrollantikörper IgG inkubiert und danach die monozytären Mikropartikel für 10 min bei 37°C zugegeben.

Erstaunlicherweise konnten wir nach Zugabe der Inhibitoren einen deutlichen Rückgang der TF-Aktivität unserer Proben beobachten, während der Kontrollantikörper IgG zu keiner Hemmung der Faktor Xa Bildung führte (Abb. 24). Nach Zugabe von anti-PDI Ak kam es zu einer 56%-igen, nach Zugabe von Bacitracin sogar zu einer 60%-igen Hemmung der prokoagulatorischen Aktivität (Abb. 24).

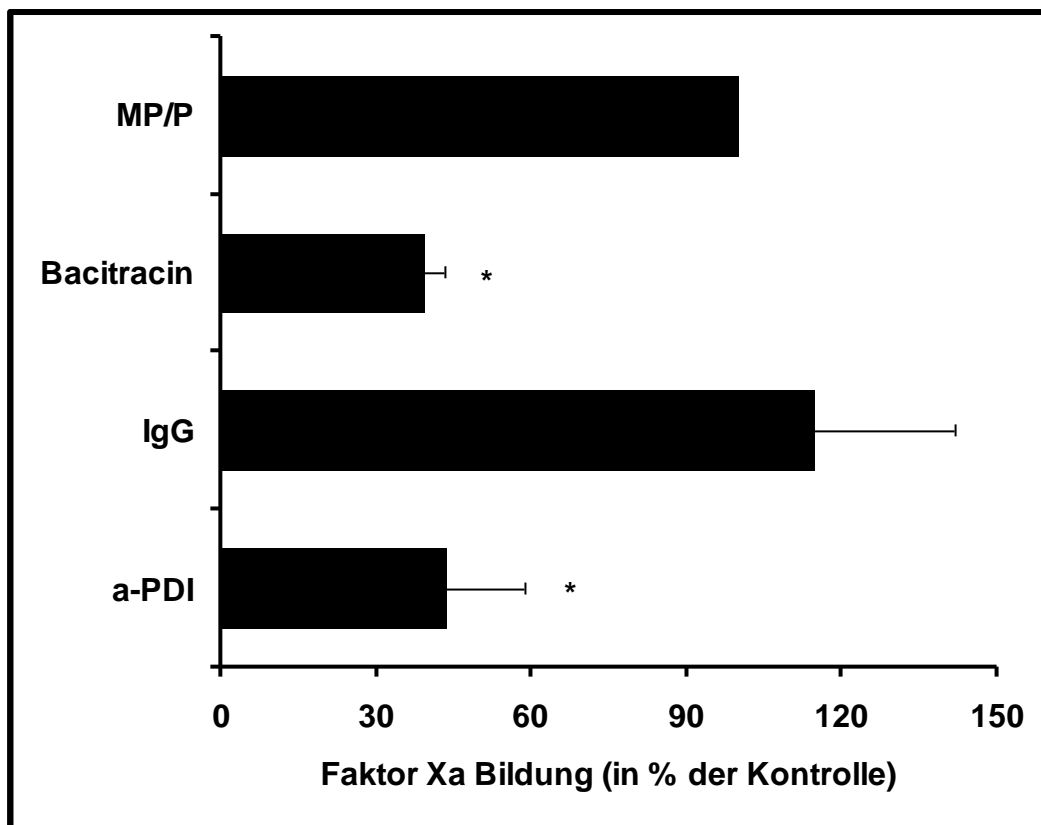


Abb. 24: TF-Aktivität von Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen nach Zugabe von Thiolisomerase-Inhibitoren

$1,5 \times 10^7$ isolierte Plättchen wurden für 10 min mit Kollagen (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) präaktiviert, die Inhibitoren Bacitracin (12 mM) und anti-PDI Ak (a-PDI) (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bzw. der Kontrollantikörper IgG für weitere 20 min zugegeben und die Proben anschließend 10 min mit 1×10^6 monozytären Mikropartikeln inkubiert. $n=8$, $p^* < 0,05$ gegenüber MP/P

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein gewichtiger Teil der durch Mikropartikel-Plättchen-Interaktionen ausgelösten Blutgerinnungsaktivierung durch einen Disulfidaustausch im TF-Molekül auf der Mikropartikelmembran vermittelt wird und dass hierfür die von Plättchen sezernierte Thiolisomerase PDI mit verantwortlich ist.

3.10 Zelluläre RNA: Kofaktor der FSAP-initiierten Blutgerinnung

FSAP konnte bereits vor einigen Jahren als weiterer, TF-unabhängiger Gerinnungsaktivator charakterisiert werden. Die Protease liegt im Plasma hauptsächlich in inaktiver Form vor, kann aber nach Ergebnissen anderer Forschungsgruppen möglicherweise durch bestimmte Kofaktoren aktiviert werden. In dieser Arbeit sollte insbesondere zelluläre RNA als potentieller Cofaktor von FSAP näher untersucht werden. Isolierte FSAP (12 µg/ml) wurde in Anwesenheit von zellulärer CHO-RNA (50 µg/ml) zu einem Gerinnungsfaktorengemisch aus den Faktoren II, VII, IX und X zugegeben. Um die RNA-Abhängigkeit der FSAP-Wirkung aufzuzeigen, wurde die RNA in einem Ansatz durch Vorinkubation mit 100 µg/ml RNaseA gespalten. Die Proben wurden für 10 min bei 37°C inkubiert und das Experiment durch Zugabe des chromogenen Substrates gestartet.

Interessanterweise führte FSAP einzeln eingesetzt nur zu einer limitierten Zunahme der Bildung von aktiviertem Faktor X (Kontrolle: 2,41 mU/ml; + FSAP: 7,77 mU/ml) (Abb. 25). Zelluläre RNA einzeln eingesetzt zeigte keinen signifikanten prokoagulatorischen Effekt (3,74 mU/ml) (Abb. 25). Wurde die RNA jedoch gemeinsam mit FSAP und dem Faktorengemisch eingesetzt, kam es zu einem deutlichen Anstieg der Faktor Xa Bildung (35,54 mU/ml) (Abb. 25). Spaltung der RNA durch RNaseA blockierte den FSAP-vermittelten Aktivierungsprozess durch zelluläre RNA vollständig (6,48 mU/ml) (Abb. 25).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass RNA für die funktionelle Aktivierung von FSAP von Wichtigkeit ist.

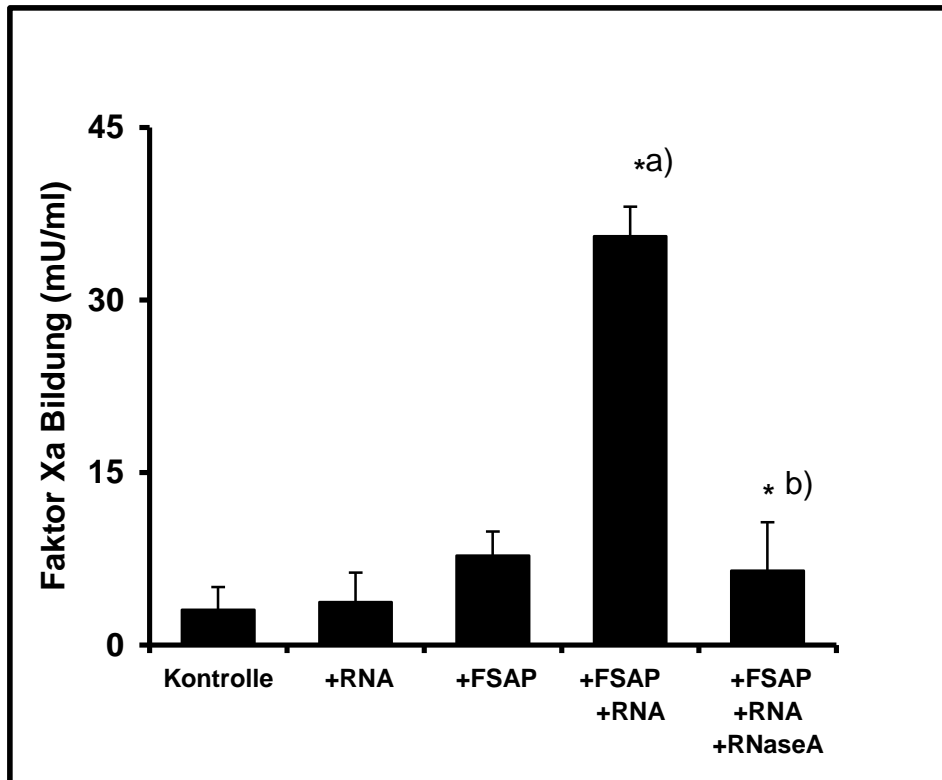


Abb. 25: Faktor X Aktivierung durch FSAP und zelluläre RNA

Zu CaCl_2 und den Faktoren II, VII, IX und X (Kontrolle) wurden zelluläre CHO-RNA (50 $\mu\text{g/ml}$), FSAP (12 $\mu\text{g/ml}$) oder Suspensionen aus FSAP und zellulärer CHO-RNA (+FSAP, +RNA) gegeben und die Proben 10 min bei 37°C inkubiert. Um die RNA-Abhängigkeit des Aktivierungsprozesses aufzuzeigen wurde die RNA durch Vorinkubation mit 100 $\mu\text{g/ml}$ RNaseA gespalten (+FSAP, +RNA, +RNaseA). n=7; $p^* < 0,05$ a) gegenüber RNA bzw. FSAP; b) gegenüber FSAP+RNA

Zusätzlich zeigte zelluläre RNA in Vorversuchen im Blutplasma auch eine FSAP-unabhängige Gerinnungsaktivierung, die möglicherweise durch Einflussnahme auf das Kontaktsystem bedingt war, welche daher ebenfalls untersucht wurde. In Thrombelastographieversuchen wurden verschiedene Nukleinsäuren (jeweils 50 $\mu\text{g/ml}$) zu 300 μl citriertem, frisch entnommenen VB gegeben und die Messung nach der Recalcifizierung gestartet. Sowohl nach Zugabe von RNA, als auch nach Zugabe von DNA zu VB kam es zu einer deutlichen Verkürzung der Gerinnungszeit und zu einer Beschleunigung der Thrombuswachstumsrate (Abb. 26). Vor allem die Beschleunigung der Thrombuswachstumsrate war nach Zugabe von zellulärer RNA stärker ausgeprägt als nach dem Einsatz von zellulärer DNA (Abb. 26). Um zu zeigen, dass dieser Aktivierungsprozess spezifisch durch die jeweils eingesetzte RNA bzw. DNA ausgelöst wurde, behandelten wir die Nukleinsäuren vor dem Versuch mit RNaseA (100 $\mu\text{g/ml}$) bzw DNase (100 $\mu\text{g/ml}$) vor. Dieses führte zu einer deutlichen Hemmung der Gerinnungsaktivierung (Abb. 26).

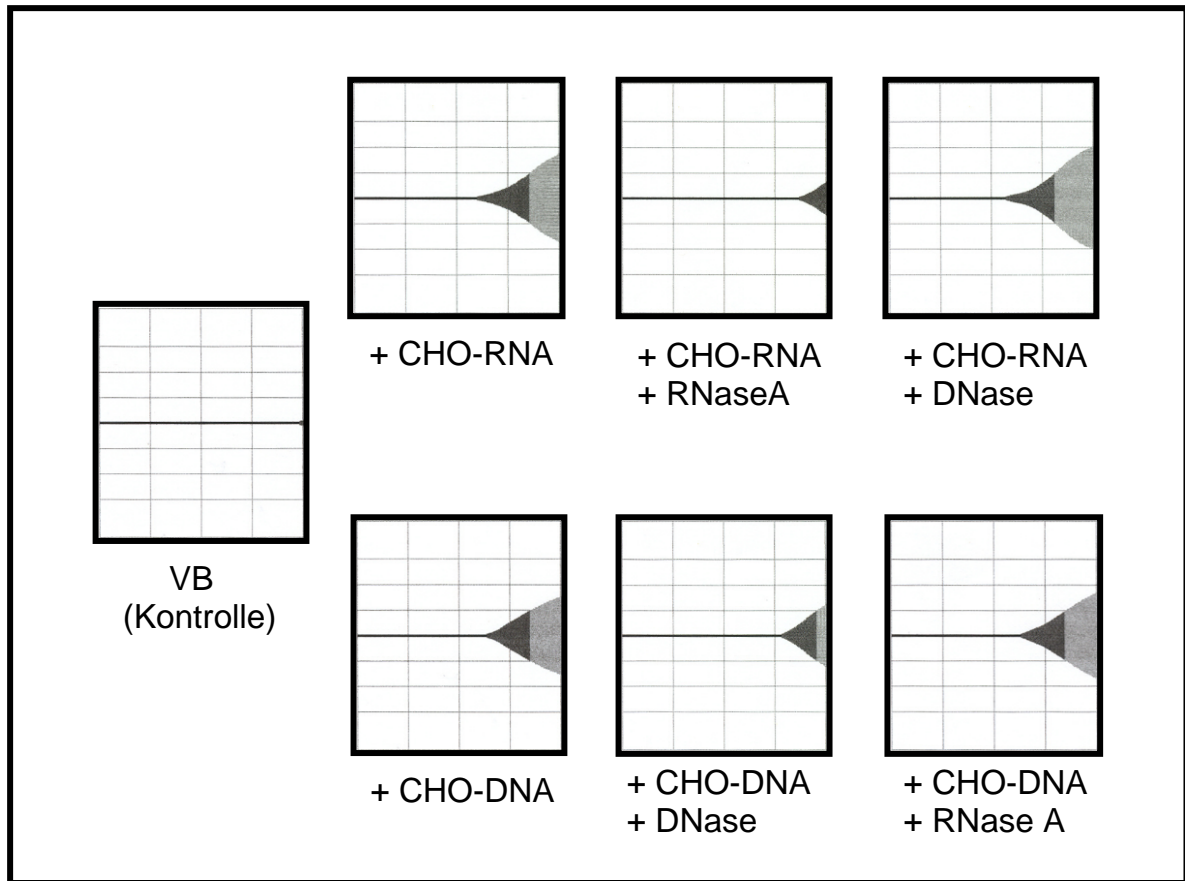


Abb. 26: CT und CFT nach Zugabe von zellulärer RNA und DNA zu VB

Citriertes VB wurde mit zellulärer CHO-RNA (50 µg/ml), CHO-DNA (50 µg/ml) oder Puffer (Kontrolle) versetzt und recalcifiziert. Durch Vorinkubation der Nukleinsäuren mit RNaseA bzw. DNase wurde die Spezifität des Aktivierungsprozesses aufgezeigt. (Repräsentative Einzelexperimente von insgesamt 10 Experimenten)

Anschließend wurde der Einfluss zellulärer RNA auf das Kontaktaktivierungssystem näher untersucht und die mögliche Aktivierung einzelner Faktoren des Systems analysiert. Es wurden neben zellulärer RNA der Aktivator Kaolin und verschiedene Inhibitoren (Prekallikrein-Inhibitor und Prekallikrein/ Faktor XI-Inhibitor) des Kontakt-systems eingesetzt. Citriertes VB wurde mit RNA (50 µg/ml) und entweder Kaolin (1 µg/ml), Prekallikrein-Inhibitor (10 µmol/l) oder kombiniertem Prekallikrein/ Faktor XI-Inhibitor versetzt und recalcifiziert. Auch in diesem Gerinnungsassay fanden wir eine Blutgerinnungsaktivierung durch zelluläre RNA. Die ermittelte Gerinnungszeit (CT) verkürzte sich nach Zugabe der RNA zu VB von 1417 ± 111 s auf im Mittel 1050 ± 210 s (Abb. 27). Dieser Effekt wurde noch verstärkt durch Zugabe des Kontakt-systemaktivators Kaolin (Mittelwert: 862 ± 158 s) (Abb. 27). Die Inhibitoren des Kontaktaktivierungssystem Prekallikrein- bzw. Prekallikrein/ Faktor

XI-Inhibitor führten hingegen zu einer vollständigen Inhibition der Gerinnungsaktivierung durch zelluläre RNA (Abb. 27).

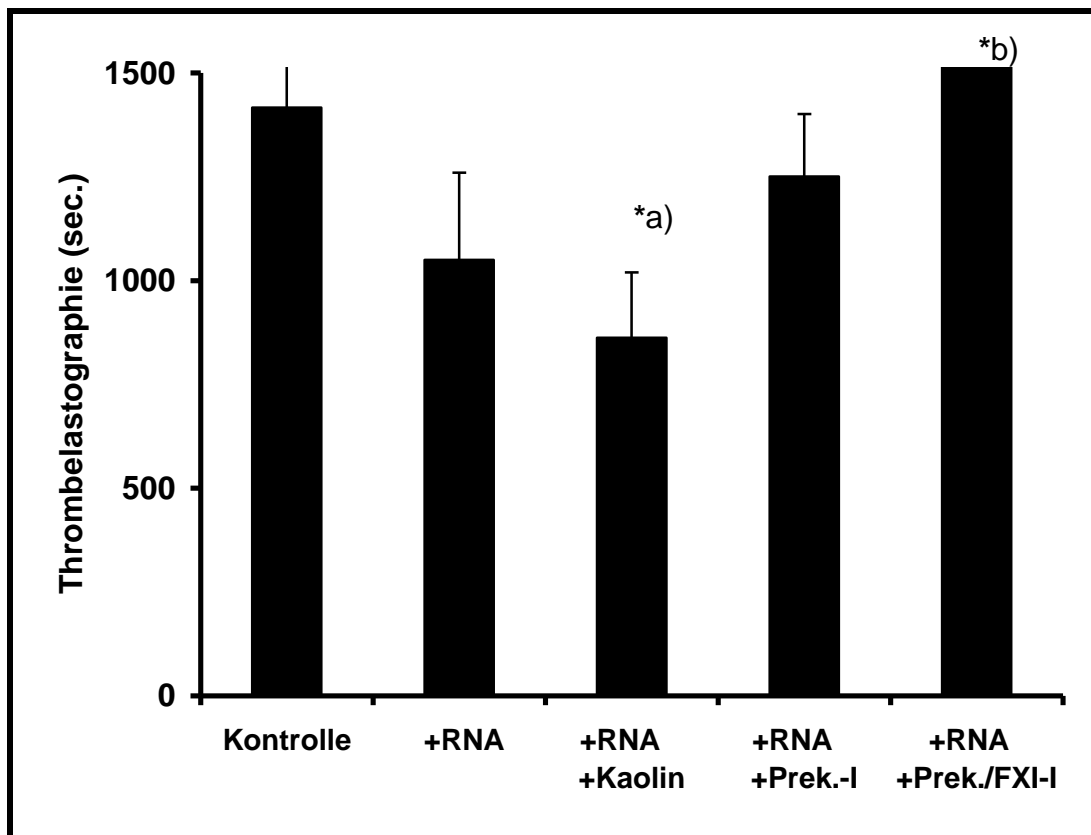


Abb. 27: Vollblutgerinnungszeiten nach RNA-Aktivierung und Zugabe von Aktivatoren und Inhibitoren der Kontaktaktivierung

Zugabe von RNA (+RNA) zu VB (Kontrolle) führte zu einer deutlichen Verkürzung der Gerinnungszeit, welche durch den Kontaktaktivator Kaolin (+RNA, +Kaolin) noch verstärkt wurde, während die Zugabe der Kontaktsystem-Inhibitoren Prekallikrein-Inhibitor (+RNA, +Prek.-I) und Prekallikrein/ Faktor XI-Inhibitor (+RNA, +Prek./FXI-I) die Gerinnungsaktivierung hemmte.

n=8; p* < 0,05 a) gegenüber der Kontrolle; b) gegenüber +RNA +Kaolin

Zusammenfassend sprechen diese Befunde dafür, dass zelluläre RNA die Blutgerinnung über verschiedene Mechanismen stimulieren kann: Einerseits als Kofaktor von FSAP und andererseits durch Aktivierung von Prekallikrein und damit des Kontaktsystems.

4. Diskussion

4.1 Intramuraler und intravasaler TF (iTF)

Jahrzehntlang wurde davon ausgegangen, dass TF, der wichtigste Gerinnungsinitiator des menschlichen Organismus, im Blutgefäßsystem ausschließlich intramural exprimiert wird und der Gerinnungsstart über die Bindung des blutassoziierten Faktor VIIa an den Gefäßwand-TF (intramuralen TF) erfolgt. (Banner et al., 1996; Fuster et al., 1996). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass dieser intramurale TF von verschiedenen Gefäßwandzellen in unterschiedlich hoher Konzentration exprimiert wird. Adventitielle Fibroblasten weisen den höchsten TF-Gehalt auf (Wilcox et al., 1989). Die Gefäßmuskelzellen der Media exprimieren kleinere Mengen an TF, welche Sie jedoch in pathologischen Zuständen wie bei der Ausbildung arteriosklerotischer Plaques deutlich steigern können. Ob die Endothelzellen der Interna auf ihrer Oberfläche TF präsentieren ist umstritten. Einige Gruppen konnten *in vitro* deutlich erhöhte TF-Aktivität nach der Stimulierung von Endothelzellen nachweisen (Camerer et al., 1996), während andere Forschungsgruppen keine TF-Präsentation aufzeigen konnten (Solberg et al., 1990). Die intramurale TF-Konzentration der Gefäßwand ist von außen nach innen abnehmend, so dass die Gerinnungsfaktoren des Blutes in einem intakten Gefäß nicht mit größeren Mengen des intramuralen TF in Berührung kommen, nach Ruptur oder Verletzung der Gefäßwand jedoch eine rasche Gerinnungsinitiierung möglich ist (Drake et al., 1989).

Neuere Ergebnisse zeigen, dass auch im Blut funktionell aktiver TF vorhanden ist und eine intravasale Gerinnungsaktivierung prinzipiell möglich macht (Giesen et al., 1999; Mackman et al., 2004; Müller et al., 2003). Dieser intravasale TF (iTF) wird auf der Oberfläche verschiedener aktivierter Blutzellen wie Monozyten und neutrophilen Granulozyten, vor allem jedoch auf zirkulierenden Mikropartikeln exprimiert (Nieuwland et al., 1997). Aufgrund der Ergebnisse verschiedener Studien geht man heute davon aus, daß aktivierte Blutplättchen ebenfalls funktionell aktiven TF exprimieren können (Camera et al., 2003; Müller et al. 2003). Einige Gruppen konnten jedoch bisher keinen aktivierten TF auf Blutplättchen nachweisen (Butenas et al., 2005). Wir vermuten, daß die eingesetzten Stimuli und die *in vitro*

Bedingungen ohne Einbeziehung wichtiger Aktivierungskomponenten wie z.B. von mechanischem Stress unter Flussbedingungen zu diesen Ergebnissen geführt haben könnten (Rauch et al., 2000). Insbesondere in Studienmodellen, die *in vivo* Bedingungen im realen Blutgefäßsystem nahe kommen, konnte die Rolle des aktivierten iTF überzeugend nachgewiesen werden (Falati et al. 2003; Furie et al., 2004). Während der letzten Jahre wurden viele Studien bezüglich des Vorkommens, der Konzentration und der Aktivität des iTF veröffentlicht. Insbesondere die Aktivität des intravasalen TF wurde kontrovers diskutiert. Einige Gruppen konnten große Mengen an aktivem iTF nachweisen (Balasubramanian et al., 2002; Giesen et al., 1999), während andere Gruppen keine TF-Aktivität im Vollblut gesunder Menschen finden konnten (Berckmans et al., 2001; Butenas et al., 2004). Die Konzentration an funktionell aktivem TF im Blut ohne vorheriges Trauma wird ebenfalls unterschiedlich angegeben und schwankt zwischen weniger als 20 fM (Butenas et al., 2005) und 37 pM (So et al., 2003). Wir gehen davon aus, dass ein Großteil des iTF unter physiologischen Bedingungen nachweislich in der inaktiven sogenannten *encrypted* Form vorliegt, was vermutlich für die Aufrechterhaltung der normalen Hämostase unerlässlich ist. Bei bestimmten pathologischen Vorgängen, wie z.B im Rahmen der Thrombogenese, kann der iTF jedoch offensichtlich aktiviert werden, was eine Hyperkoagulabilität und damit schwerwiegende Folgen wie Myokardinfarkt, Apoplex und Lungenembolie induzieren könnte (Chironi et al., 2005). Insbesondere der mechanische Stress in durch Atherosklerose stenosierte Arterien scheint ein wichtiger Aktivator des iTF zu sein (Bogdanov et al., 2003). Wird die Gefäßwand im Rahmen einer atherosklerotischen Plaqueruptur geschädigt, kommt es zur Bildung eines Plättchenthrombus aus primär adhätierenden Plättchen (Abb. 28) und zur Gerinnungsaktivierung durch Ausbildung des TF/VIIa-Komplexes aus intramuralem TF und Faktor VII des Blutes. Sind die TF-präsentierenden Plaque-Mikropartikel jedoch mit einer Schicht aus aktivierten, primär adhätierten Plättchen und Fibrin bedeckt (Abb. 28), können die Gerinnungsfaktoren wie z.B Faktor VII oder X im Blut nicht mehr durch diesen TF aktiviert werden (Engelmann et al., 2003; Hathcock et al., 2004). In dieser Situation wird möglicherweise der von zirkulierenden Blut-Mikropartikeln präsentierte iTF für das Wachstum und die Stabilisierung des Thrombus benötigt (Abb. 28). Vermutlich kommt es durch eine Interaktion der rekrutierten zirkulierenden Blut-Mikropartikel und der präaktivierten Plättchen zu einer Aktivierung und Konzentrierung des Mikropartikel-assoziierten iTF.

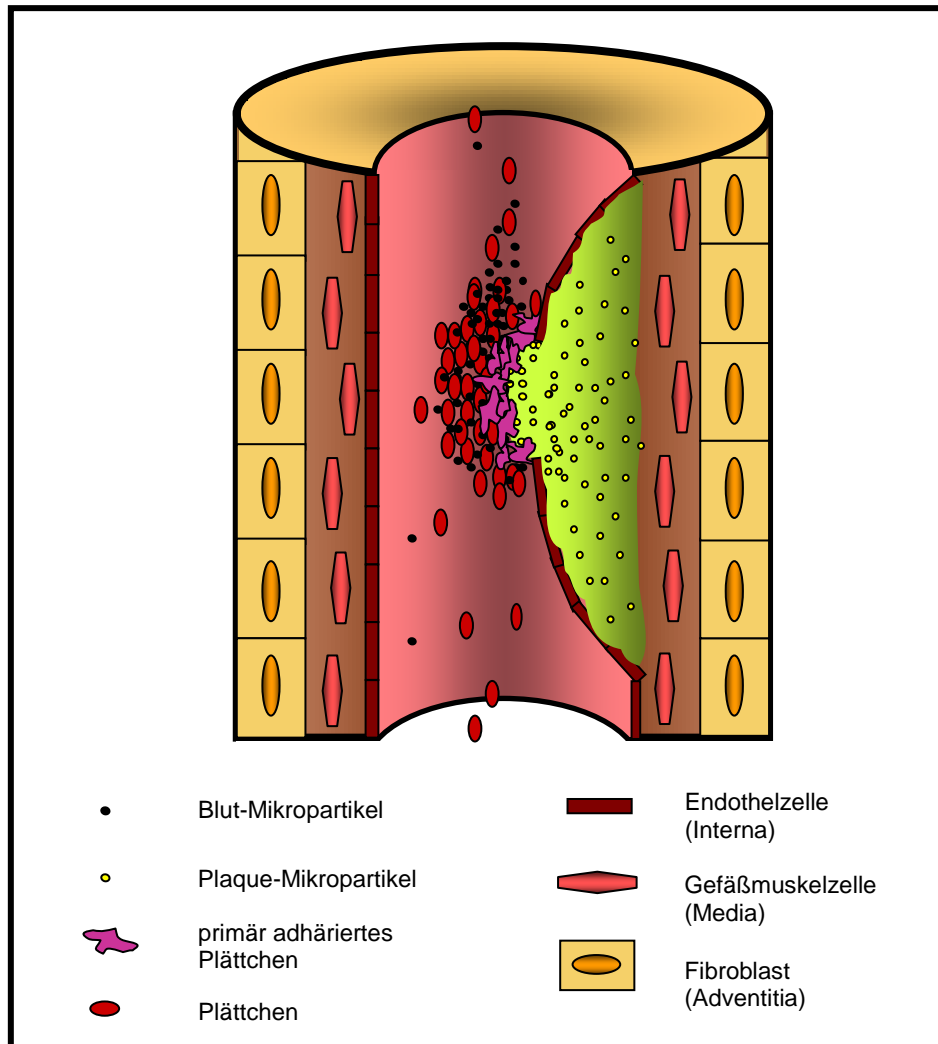


Abb. 28: Modell der Thrombusbildung nach Ruptur eines vulnerablen Plaques

Schematische Darstellung einer großen Arterie: Im linken Teil der Abbildung wird der Aufbau einer gesunden Gefäßwand bestehend aus Adventitia, Media und Interna dargestellt. In der intakten Gefäßwand nimmt die intramurale TF-Konzentration von außen nach innen ab. Im rechten Teil der Abbildung zeigt sich eine atherosklerotisch veränderte Gefäßwand mit Ausbildung eines atherosklerotischen Plaques. Nach Ruptur adhärieren Plättchen (violett) rasch an den TF-reichen Lipidkern (gelb), der unter anderem aus Plaque-Mikropartikeln besteht (gelbe Kreise). Nachdem sich eine Barriere aus vernetzten Plättchen (violett) gebildet hat, kann der Plaque-TF nicht mehr mit Blut in Berührung kommen und daher möglicherweise auch nicht mehr die Fibrinbildung initiieren. Nun könnten TF-positive, zur Gefäßverletzung rekrutierte und mit sekundär adhärierenden Plättchen (rote Ovale) interagierende Mikropartikel (schwarze Kreise) den iTF aktivieren, was zur intravasalen Gerinnungsaktivierung und Thrombusstabilisierung beitragen könnte (Engelmann et al., 2003).

4.2 Intravasale Mikropartikel

Zirkulierende Mikropartikel exprimieren TF, weisen negativ geladene, prokoagulatorische Phospholipide auf und sind daher potentielle Auslöser intravasaler Thromben (Diamant et al. 2004). Seit ihrer Entdeckung durch Wolf im Jahre 1967 konnten viele wichtige Aspekte der Struktur und Funktion dieser durch Aktivierung, Apoptose oder mechanischen Stress entstehenden 0,1-1 µm großen Zellmembranfragmente erforscht werden. Mikropartikel bestehen aus einem intravesikulären Teil und einem umgebenden Lipid-Bilayer, in den je nach Mikropartikel-Spezies verschiedene Adhäsionsmoleküle (z.B. P-Selektin, PSGL-1), Entzündungsmediatoren und andere Proteine wie TF eingelagert sind (Diamant et al., 2004, Morel et al., 2006) (Abb. 29).

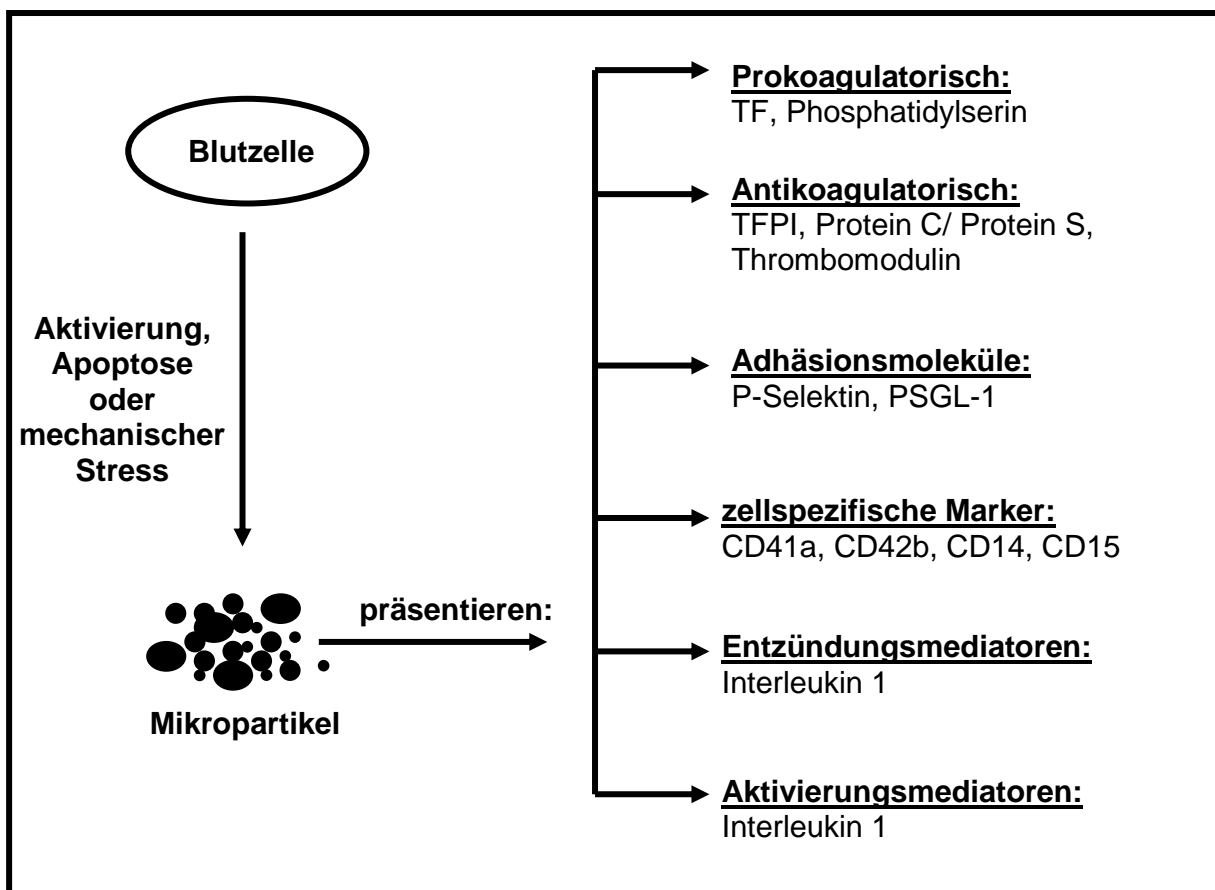


Abb. 29: Schematische Darstellung der Mikropartikelbildung und Auflistung der präsentierten Oberflächenmoleküle

Mikropartikel werden durch Zellaktivierung, hohe Scherraten oder Apoptose gebildet und können durch Präsentation von pro- oder antikoagulatorischen Proteinen, Adhäsionsmolekülen und Entzündungsmediatoren ihrer Herkunftszellen aktiv in verschiedene (patho)physiologische Prozesse des Körpers eingreifen.

Möglicherweise sind Mikropartikel in viele (patho)physiologische Vorgänge des Körpers involviert und ihre Funktionen vielfältig. Sie könnten einerseits wichtige Funktionen bei physiologischen Prozessen im Bereich der Hämostase übernehmen (Diamant et al. 2004) und andererseits in pathologische Vorgänge wie die Entwicklung von Myokardinfarkt, Apoplex und Entzündungen im Körper des Menschen involviert sein (Barry et al., 1999; Diamant et al., 2004). Viele Aspekte der Mikropartikelbildung, -verwertung, -funktion und vor allem der Interaktion mit Zellen sind jedoch bis heute unklar und bedürfen der näheren Erforschung. Ihre pathophysiologische Bedeutung ist umstritten und auch die Anzahl zirkulierender Mikropartikel im gesunden Menschen könnte zu gering sein um eine prothrombotische Wirkung zu erlangen. Im Blut von Patienten mit Erkrankungen die mit einer erhöhten Thromboseneigung einhergehen wie Sepsis, Diabetes mellitus und präterminalem Nierenversagen konnten jedoch deutlich erhöhte Mikropartikelgesamtkonzentrationen nachgewiesen werden und auch der prozentuale Anteil verschiedener zellspezifischer Mikropartikel an der Gesamtpopulation war zum Teil deutlich erhöht (Martinez et al., 2005; Sabatier et al., 2005; Omoto et al., 2002). Es könnte daher möglich sein Mikropartikel als relevante Biomarker des vaskulären Zustandes der Patienten und als Indikatoren des individuellen thrombotischen Risikos zu nutzen (Mallat et al., 2004; Morel et al., 2006). Auch in Stasesituationen, wie bei der Ausbildung eines Plättchenthrombus nach Gefäßverletzung oder Plaqueruptur (vgl. Abb. 28), könnten Mikropartikel durch die lokale Konzentrierung und mögliche gegenseitigen Aktivierungsmechanismen mit Plättchen eine pathologische Bedeutung erlangen (Morel et al., 2006). Die weitere Forschungsarbeit auf diesem Gebiet könnte nicht nur für die Aufklärung der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen, sondern auch für die Prävention und Behandlung dieser Erkrankungen von Bedeutung sein (Diamant et al. 2004; Rauch et al., 2000).

4.3 Mikropartikel-Plättchen-Interaktionen

Nach den Ergebnissen neuerer Untersuchungen geht man davon aus, dass sowohl Plättchen als auch Mikropartikel TF, den wichtigsten Blutgerinnungsinitiator exprimieren können (Müller et al. 2003). Gegenseitige Aktivierungsprozesse zwischen aktivierten Blutplättchen und Mikropartikeln könnten demnach zur TF-Aktivierung im Blutgefäß führen. Intravitalmikroskopisch wurde beobachtet, dass Mikropartikel innerhalb von Sekunden an einen gebildeten Plättchenthrombus adhären und es wenige Zeit später zur ausgeprägten Fibrinbildung kommt (Furie et al., 2004) (vgl. Abb. 28). Einige Gruppen konnten *in vitro* jedoch keine TF-Aktivität auf der Oberfläche isolierter Mikropartikel gesunder Probanden nachweisen (Berckmans et al., 2001; Butenas et al., 2005). Diese Beobachtungen könnten durch die Verschlüsselung des iTF (*encryption*) und die unter *in vitro* Bedingungen fehlende Aktivierung durch Interaktionen mit Blutzellen oder mechanischen Stress im Gefäßsystem bedingt sein (Osterud et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit beobachteten wir, dass sowohl mit Kollagen voraktivierte Plättchen als auch im Plasma befindliche und isolierte Mikropartikel eine nur sehr geringe TF-Aktivität aufwiesen, der präsentierte TF somit im *encrypted state* vorlag (Abb. 14). Das prokoagulatorische Potential der Suspensionen steigerte sich jedoch nach Koinkubation der Blutbestandteile um ein Vielfaches und wurde durch Zugabe eines anti-TF Ak gehemmt (Abb. 14). Die Interaktion von Blutplättchen und Mikropartikeln führte somit zu einer deutlichen Aktivierung des iTF. Unter Flussbedingungen konnten wir eine Anheftung von Mikropartikeln an aktivierte Plättchen aufzeigen und somit die Relevanz der beobachteten Interaktionen unter Flussbedingungen unterstreichen (Abb. 22). Wir setzten in unseren Versuchen im Verhältnis zur Plättchenanzahl ($1,5 \times 10^7$) bewusst große Mengen an Mikropartikeln (1×10^6) ein. Dadurch fokussierten wir einerseits auf den Mikropartikel-assoziierten TF und simulierten andererseits ähnliche Bedingungen wie bei der Thrombusbildung. Voruntersuchungen konnten demnach zeigen, dass Mikropartikel massiv in den wachsenden Plättchenthrombus inkorporiert werden, mit den Plättchen interagieren und TF an der Stelle der Gefäßverletzung konzentrieren (Furie et al., 2004). Ebenso kommt es gerade während der Ischämie und in Stasesituationen zu einer Ansammlung und vermehrten Anheftung von TF-positiven Mikropartikeln (Morel et al. 2006).

Zur genaueren Analyse der Interaktionen von Mikropartikeln und Plättchen setzten wir in weiterführenden Versuchen isolierte, zellspezifische, von Plättchen, neutrophilen Granulozyten oder Monozyten produzierte Mikropartikel ein (Abb. 16). Interessanterweise interagierten weder Plättchen- noch granulozytäre Mikropartikel einzeln eingesetzt mit den aktivierten Plättchen. Monozytäre Mikropartikel führten hingegen nach Koinkubation mit den Plättchen zu einem deutlichen Anstieg der Faktor Xa Bildung (Abb. 16). Einige Gruppen gehen davon aus, dass Mikropartikel nicht nur mit Zellen wie z.B. Plättchen interagieren sondern auch fusionieren und so Proteine und Lipide transferieren (DelConde et al., 2005).

4.4 Proteaseinhibitoren und TFPI

Um den TF initiierten Gerinnungsablauf räumlich und zeitlich einzugrenzen und somit eine überschießende Gerinnungsaktivierung zu verhindern ist vor allem der TFPI von entscheidender Bedeutung. Plättchen sezernieren nach Aktivierung beträchtliche Mengen an TFPI. Dieser inhibiert den ternären Komplex aus TF/VIIa/Xa und führt so zu einer spezifischen Hemmung der initialen Aktivierung der Blutgerinnung.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die P-Selektin/ PSGL-1-abhängige Interaktion von Plättchen und Leukozyten zu einem Anstieg der TF-Aktivität der Suspensionen führt (Müller et al., 2003). Hohe Konzentrationen an Plättchen-Leukozyten-Aggregaten sind im Übrigen mit einem erhöhten Thromboserisiko verbunden (Michelson et al., 2001). Daher könnten Plättchen-Leukozyten-Aggregate TF-abhängig die Fibrinbildung aktivieren. Auf welche Weise dies geschieht ist weitgehend unklar. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtungen sind die von Leukozyten nach Interaktion mit den Plättchen sezernierten Serinproteasen. Diese könnten möglicherweise zu einer Inhibierung von TFPI beitragen und somit die prokoagulatorische Wirkung von TF steigern (Engelmann et al, 2003; Müller et al., 2003).

Verschiedene *in vivo* Studien zeigen, dass Leukozyten verzögert in einen wachsenden arteriellen Thrombus inkorporiert werden. In den ersten 3 min nach Gefäßwandschädigung kommt es bereits zur Akkumulation von TF und Fibrin, jedoch wird noch keine Leukozyteninkorporierung beobachtet. Zu diesem frühen Zeitpunkt wird aber bereits eine massive Adhäsion von Mikropartikeln beobachtet (s. Abb. 5)

(Furie et al., 2004). Wir nahmen daher an, dass die Interaktion von leukozytären Mikropartikeln und aktivierten Plättchen möglicherweise ebenfalls eine proteolytische Inaktivierung von Plättchen-TFPI durch Mikropartikel-assoziierte Serinproteasen induziert. Um die Rolle der Serinproteasen für die Faktor Xa Bildung näher zu untersuchen, wurden den Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen die Proteaseinhibitoren α_1 -Antitrypsin, α_1 -Antichymotrypsin und Chloromethylketone zugegeben. Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Rückgang des prokoagulatorischen Potentials der Suspensionen nach Zugabe der Proteaseinhibitoren (Abb. 23). Wir gehen daher davon aus, dass ein Teil des prokoagulatorischen Potentials der Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen durch die Spaltung von Plättchen-TFPI zu erklären ist. Es ist davon auszugehen, dass Zelladhäsionsmoleküle wie P-Selektin und PSGL-1 nicht nur bei der Interaktion von neutrophilen Granulozyten und Plättchen, sondern auch bei der Adhäsion von zirkulierenden Mikropartikeln an aktivierte Plättchen und eventuell sogar für die Bildung von Mikropartikeln von Bedeutung sind. In PSGL-1- und P-Selektin-defizienten Mäusen adhärirten Mikropartikel nicht an den Plättchen-Thrombus und es wurde keine größeren Mengen an Fibrin gebildet (s. Abb. 5) (Furie et al., 2004). Die P-Selektin/PSGL-1-abhängige Anheftung von Mikropartikeln an Plättchen scheint somit für die Interaktion und nachfolgende Fibrinbildung unerlässlich zu sein. Interessanterweise konnten erhöhte P-Selektin Level bereits bei verschiedenen thrombotischen Prozessen nachgewiesen werden. Sie könnten sich in Zukunft als wichtige Marker für kardiovaskuläre Komplikationen erweisen (Cambien et al 2004). Auch wurden Antikörper gegen P-Selektin und PSGL-1 in experimentellen Modellen bereits erfolgreich zur Behandlung arterieller und venöser Thrombosen eingesetzt (Esmon, 2001; McEver, 2002; Wagner et al., 2003). Auf der anderen Seite könnte der Einsatz von P-Selektin Immunglobulinen, welche die Anzahl zirkulierender Mikropartikel deutlich erhöhen, entweder allein oder in Kombination mit rekombinantem Faktor VIIa eine vielversprechende neue Therapieoption für Patienten mit Hämophilie sein (Hrachovinová et al., 2003; Polgar et al., 2005).

4.5 Monozytäre Mikropartikel

Stimulierte Monozyten können bekannterweise TF-reiche Mikropartikel freisetzen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten monozytären Mikropartikel wiesen eine limitierte TF-Aktivität auf (Abb. 20 links). Dies ist offensichtlich dadurch bedingt, dass ein Großteil des Mikropartikel-TF im *encrypted state* vorliegt. Wir konnten zeigen, dass die TF-reichen monozytären Mikropartikel mit aktivierten Plättchen interagieren und diese Interaktion die TF-Aktivität der Suspensionen deutlich steigert (Abb. 20). Um herauszufinden, ob der Plättchen- oder der Mikropartikel-assoziierte TF hierbei aktiviert wurde, inhibierten wir gezielt nur den Plättchen- oder den Mikropartikel-assoziierten TF. Durch gezielte Inhibition des mikropartikel-assoziierten TF ließ sich eine komplette Hemmung des Effektes beobachten (Abb. 20 rechts). Demnach wird der primär inaktiv vorliegende Mikropartikel-assoziierte TF durch die Interaktion mit Blutplättchen aktiviert und zur Gerinnungsinisierung befähigt. Monozytäre Mikropartikel machen nur einen limitierten Anteil an der Gesamtmenge der Mikropartikel (ca. 10%) aus. Jedoch kommt es insbesondere in pathologischen Situationen zu einer deutlichen Steigerung der Plasmakonzentration an monozytären Mikropartikeln, wodurch die TF-Aktivierung durch Plättchen eine erhebliche Bedeutung erlangen könnte. So könnte die Interaktion an der Thrombus-Bildung nach Plaqueruptur beteiligt sein. Innerhalb der atherosklerotischen Plaques ist TF hauptsächlich mit Mikropartikeln assoziiert, die aus apoptotischen Makrophagen/Monozyten stammen (Toschi et al., 1997; Mallat et al., 1999; Rauch et al., 2000). Durch die Plaqueruptur kommen diese Mikropartikel des Lipidkerns mit Blut in Berührung, Plättchen adhären und können somit den Mikropartikel-assoziierten TF aktivieren. Anschließend könnte damit die Blutgerinnungskaskade initiiert werden und ein intravasaler Thrombus durch Bildung von Fibrin stabilisiert werden. Um die Beteiligung der Plättchen an der Plaque-induzierten Thrombusbildung zu untersuchen, testeten wir die gerinnungsaktivierende Wirkung der mikropartikelreichen Lipidkerne atherosklerotischer Plaques mit Hilfe der Thrombelastographie im VB. Wir konnten zeigen, dass jeder der eingesetzten Plaques sowohl im VB (Abb. 17), als auch im PRP (Abb. 18) zu einer rasch einsetzenden Fibrinbildung und Entstehung eines stabilen Gerinnsels führte (Abb. 19). Im PAP kam es hingegen zu keiner messbaren Gerinnungsaktivierung durch die Lipidkerne (Abb. 19). Somit sind die Plättchen offensichtlich von essentieller

Bedeutung für eine rasche Gerinnungsaktivierung durch die lipidreiche Kernregion von atherosklerotischen Plaques, welche durch die Interaktion von Plaque-assoziierten Mikropartikeln der Makrophagen/ Monozyten mit den Blutplättchen zustande kommen könnte. Häufig okkludiert der initial nach Plaqueruptur gebildete Thrombus das Gefäß zunächst nicht vollständig, wächst aber langsam weiter und verschließt das Gefäß dann nach einiger Zeit komplett. Möglicherweise tragen zusätzlich zu den Plaque-assoziierten Mikropartikeln auch die zirkulierenden Mikropartikel zur Thrombusbildung bei. Dies könnte insbesondere bei venösen Thrombosen von Bedeutung sein, bei denen keine Endothelruptur beobachtet wird. In Tiermodellen konnte in der Tat bereits eine TF-Beteiligung an der Entstehung venöser Thrombosen beobachtet werden (Lawson et al., 1997). Auch in anderen pathologischen Zuständen, in denen die Anzahl an monozytären Mikropartikeln im Blut der Patienten erhöht ist, so z.B. im Rahmen der disseminierten intravasalen Gerinnung bei Meningokokken-Sepsis, könnte auf monozytären Mikropartikeln exprimierter TF pathogenetisch von erheblicher Bedeutung sein.

4.6 Mechanismen der TF-Aktivierung

Vorarbeiten zeigen, dass nicht nur der Mikropartikel-assoziierte TF, sondern ein Großteil des gesamten iTF in einer inaktiven Form, dem sogenannten *encrypted state* vorliegt. Bislang ist unbekannt über welche Mechanismen dieser *encrypted* TF aktiviert wird und damit den Blutgerinnungsstart steuert (Engelmann et al., 2003). Verschiedene Gruppen entwickelten in den letzten Jahren unterschiedliche theoretische Modelle zur TF-Aktivierung (Bach et al., 2003; Key et al., 2001; Osterud 2001). Wir vermuteten, dass insbesondere der Status der membrannahen Disulfidbrücke in der extrazellulären Domäne des TF-Moleküls mit dem Aktivierungszustand verknüpft sein könnte. Nach dieser Hypothese könnten von Plättchen-sezernierte Thiolisomerasen, wie z.B. PDI, durch die Bildung einer Disulfidbrücke zur Aktivierung des mikropartikel-assoziierten TF beitragen (Ahamed et al., 2006; Reinhardt et al., 2008). PDI katalysiert Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen, also die Oxidation, Reduktion und Isomerisierung von Cysteinen zahlreicher Proteine (Elgaard et al., 2005 ; Essex et al., 2001 ; Peltoniemi et al., 2006 ; Wilkinson et al., 2004). Erstaunlicherweise erreichten wir durch Vorinkubation der aktivierten Plättchen mit einem anti-PDI Ak eine deutliche

Hemmung der prokoagulatorischen Aktivität der Mikropartikel-Plättchen-Suspensionen (Abb. 24). Wir nehmen daher an, dass ein entscheidender Teil der durch Mikropartikel-Plättchen-Interaktion ausgelösten Gerinnungsaktivierung durch einen Disulfidaustausch innerhalb des TF-Moleküls zustande kommt und diese Veränderungen durch die von Plättchen sezernierte Thiolisomerase PDI vermittelt wird. Diese Ergebnisse könnten nicht nur zum Verständnis des Aktivierungsmechanismus des iTF beitragen, sondern auch therapeutische und präventive Konsequenzen haben. So könnten beispielsweise Enzyme, die in der Lage sind Disulfid-Austausche zu regulieren, in der Therapie thrombotischer Erkrankungen eingesetzt werden.

4.7 FSAP und RNA: TF-unabhängige Gerinnungsinitiatoren

Die vor einigen Jahren neu entdeckte Serinprotease FSAP ist *in vitro* der effektivste TF-unabhängige Aktivator von Faktor VII. Zusätzlich ist FSAP in der Lage, die Vorläufer der Plasminogen-Aktivatoren Urokinase und *tissue type* Plasminogen-Aktivator durch Spaltung in die aktive Form zu überführen (Etscheid et al., 2000; Hoppe et al., 2005; Römisch et al., 1999). Somit scheint FSAP gleichzeitig pro- und antikoagulatorisch zu wirken. Durch Spaltung der FSAP-Peptidkette wird die inaktive FSAP (Einketten-FSAP) in die aktive Form überführt (Kannemeier et al., 2001). Neuere Untersuchungen zeigen, dass FSAP in ihrer inaktiven Einzelstrangform im menschlichen Blutplasma zirkuliert und möglicherweise verschiedene Kofaktoren zur Aktivierung benötigt (Altincicek et al., 2006). Verschiedene polyanionische Glukosaminoglykane, wie z.B. Heparin oder Dextransulfat sind in der Lage, im Zusammenspiel mit Calciumionen, die inaktive Proenzymform von FSAP in die aktive Serinprotease zu überführen (Kannemeier et al., 2001). Da sich viele Initiierungs- und Aktivierungsprozesse im Bereich der Hämostase auf der Zellmembran abspielen, wurde der Einfluss verschiedener zellulärer Komponenten auf die FSAP-Aktivierung und Funktion von unseren Kooperationspartnern, der Arbeitsgruppe von Prof. Preissner an der Universität Giessen näher analysiert. Interessanterweise führte nur eine RNase-Behandlung des konditionierten Mediums verschiedener Zellen zu einem Verlust der FSAP-Aktivität. Wir nahmen an, dass insbesondere zelluläre RNA FSAP autoaktivieren könnte und analysierten daher die Rolle von verschiedenen zellulären RNA-Spezies als Kofaktoren von FSAP. FSAP und

zelluläre RNA einzeln eingesetzt stimulierten die Bildung von aktiviertem Faktor X nur geringfügig (Abb. 25). Wurde die RNA jedoch gemeinsam mit FSAP und einem Faktorengemisch (bestehend aus den Faktoren II, VII, IX und X) eingesetzt, so kam es zu einem deutlichen Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität (Abb. 25). Um nachzuweisen, dass RNA entscheidend für die Autoaktivierung von FSAP ist, wurde diese vor dem Versuchseinsatz mit RNaseA gespalten, was den FSAP Aktivierungsprozess vollständig hemmte (Abb. 25). Somit konnten wir zeigen, dass nicht nur extrazelluläre Substanzen wie Heparin und Hyaluronsäure, sondern auch intrazelluläre Substanzen wie RNA FSAP aktivieren können. Bei Verletzung der Gefäßwand wird RNA (z.B. mRNA) aus geschädigten Zellen freigesetzt. Somit kann extrazelluläre RNA möglicherweise auch *in vivo* FSAP aktivieren. Da sich die Autoaktivierung der FSAP nach RNase Verdau der eingesetzten RNA wieder normalisierte, kann davon ausgegangen werden, dass die FSAP eine komplexe, hochmolekulare Struktur benötigt, um die Autoaktivierung zu beschleunigen und die negative Ladungen der RNA-Spaltprodukten allein für die Aktivierung nicht ausreichen.

Neben FSAP kann auch Faktor XII durch RNA aktiviert werden. Das Kontaktsystem der Blutgerinnung wird *in vitro* vor allem durch artifizielle, polyanionische Oberflächen wie Kaolin oder Glas aktiviert. Der entscheidende Kofaktor für die Aktivierung des Kontaktsystems unter *in vivo* Bedingungen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Wir konnten zeigen, dass es sowohl nach Zugabe von RNA als auch nach DNA Zugabe zu Vollblut zu einer deutlichen Verkürzung der Gerinnungszeit und zu einer Beschleunigung der Thrombuswachstumsrate kommt (Abb. 26). Diese Wirkungen sind spezifisch auf die Aktivierung durch die jeweilige Nukleinsäure zurückzuführen, da eine Vorbehandlung der eingesetzten Nukleinsäuren mit RNase bzw. DNase die Gerinnungsaktivierung hemmte. Vor allem die Beschleunigung der Thrombuswachstumsrate war jedoch nach Zugabe von zellulärer RNA stärker ausgeprägt als nach dem Einsatz von zellulärer DNA (Abb. 26). Auch *in vivo* wurde bereits eine wichtige prokoagulatorische Rolle von Zell-freier, polyanionischer RNA im Verhältnis zu DNA nachgewiesen (Kannemeier et al., 2007). Dieses ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass die zelluläre RNA nach Zellverletzung sofort mit Blut in Kontakt kommt, während die DNA möglicherweise noch in Komplexen mit Histonen eingebunden ist und daher nicht prokoagulatorisch wirksam

sein kann (Kannemeier et al., 2007). In weiterführenden Untersuchungen beobachteten wir nach Zugabe eines Prekallikrein-Inhibitors eine deutliche Hemmung der RNA-induzierten Aktivierung der Fibrinbildung, was auf eine mögliche Aktivierung von Prekallikrein durch RNA hindeutet (Abb. 27). Die gezielte Aktivierung von Prekallikrein durch RNA könnte ein neuer Startmechanismus des Kontaktsystems sein. RNA fungiert hierbei möglicherweise als negativ geladene Oberfläche, die insbesondere Prekallikrein aktiviert. Der erste Schritt für die RNA-induzierte Aktivierung der Kontaktphase wäre demnach nicht mehr die Autoaktivierung von Faktor XII, sondern die Aktivierung von Prekallikrein.

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse ergab sich ein Modell der Blutgerinnungsaktivierung, wobei zelluläre RNA gleichzeitig verschiedene Wege der Blutgerinnungskaskade aktiviert (Abb. 30). Als ein Ko-Faktor und Aktivator der Serinprotease FSAP trägt zelluläre RNA einerseits zur Faktor VII-Aktivierung bei, andererseits scheint zelluläre RNA auch in das Kontaktsystem über die Aktivierung von Prekallikrein einzugreifen. Damit wäre zelluläre RNA ein weiteres Bindungsglied zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Gerinnungssystem.

5. Zusammenfassung

Der in den letzten Jahren entdeckte intravasale *Tissue Factor* (iTf) könnte an der Aktivierung der Blutgerinnung im Rahmen von arteriellen und venösen Thrombosen beteiligt sein. Ein Großteil des zirkulierenden iTf ist mit Mikropartikeln assoziiert. Dieser Mikropartikel-TF liegt unter physiologischen Bedingungen in einer funktionell inaktiven Form vor. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass zirkulierende Mikropartikel unter Flussbedingungen an aktivierte Plättchen adhäreren. Die Interaktion mit Plättchen führt zu einer Aktivierung des iTf. Dabei interagieren insbesondere die TF-reichen monozytären Mikropartikel mit den aktivierten Plättchen und diese Interaktion steigert die Fibrinbildung. Die Aktivierung der Mikropartikel durch Plättchen wird offensichtlich durch verschiedene Mechanismen vermittelt. Zum einen fanden wir, dass die proteolytische Spaltung und Inaktivierung des Plättchen-assoziierten Gegenspielers von TF, *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI), die TF-Aktivität der Mikropartikel erhöht. Zum anderen beobachteten wir, dass bestimmte von Plättchen sezernierte Substanzen, wie z.B. Thiolisomerasen, welche Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen, also die Oxidation, Reduktion und Umlagerung von Disulfid-Brücken von Proteinen katalysieren, zu einer direkten Aktivierung von TF führen können. Auch konnten wir zeigen, dass Plättchen für die TF-abhängige Gerinnungsaktivierung nach der Ruptur atherosklerotischer Plaques mitverantwortlich sind. Schließlich ergaben die Untersuchungen der Arbeit einen deutlichen Hinweis darauf, dass zelluläre RNA und zelluläre DNA prokoagulatorisch wirken. Die Aktivierung der Gerinnung durch zelluläre RNA erfolgt über eine Aktivierung der *Faktor VII Activating Protease* (FSAP). Gleichzeitig wird auch die Aktivität des Gerinnungsfaktor XII erhöht. Damit bewirkt zelluläre RNA sowohl eine Stimulierung des extrinsischen als auch des intrinsischen Weges der Gerinnung.

6. Literaturverzeichnis

Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, Ruf W: Disulfide isomerizations switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 13932-13937.

Ahn YS: Cell-derived microparticles: Miniature envoys with many faces. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 884-887.

Albrecht S, Kotzsch M, Siegert G, Luther T, Grossmann H, Grosser M, Müller M: Detection of circulating tissue factor and factor VII in normal population. *J Thromb Haemost* 1996; 75: 772-777.

Altincicek B, Shibamiya A, Trusheim H, Tzima E, Niepmann M, Linder D, Preissner KT, Kanse SM: A positively charged cluster in the epidermal growth factor-like domain of Factor VII-activating protease (FSAP) is essential for polyanion binding. *Biochem J* 2006; 394: 687-692.

Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M: Circulating nucleic acids in plasma or serum. *Clin Chim Acta* 2001; 313: 143-146.

Bach RR: Mechanism of tissue factor activation on cells. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9: 37-43.

Bach RR: Tissue factor de-encryption. *J Thromb Haemost* 2003; 1: SY17.

Bach RR: Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 456-461.

Baglia FA, Walsh PN: Thrombin-mediated feedback activation of factor XI on the activated platelet surface is preferred over contact activation by factor XIIIa or XIa. *J Biol Chem* 2000; 275: 20514-20519.

Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, Bajaj SP: Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost* 2001; 86: 959-972.

Balasubramanian V, Grabowski E, Bini A, Nemerson Y: Platelets, circulating tissue factor and fibrin colocalize in ex vivo thrombi: Real time fluorescence images of thrombus formation and propagation under defined flow conditions. *Blood* 2002; 100: 2787-2792.

Banner DW, D'Arcy A, Chene C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchhofer D: The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* 1996; 380: 41-46.

Barry OP, Pratico D, Lawson JA, Fitzgerald GA: Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997; 99: 2118-2127.

Barry OP, FitzGerald GA: Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles. *J Thromb Haemost* 1999; 82: 794-800.

Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A: Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2001; 85: 639-646.

Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R: Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2561-2568.

Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y: Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 2003; 9: 458-462.

Bom VJJ, Van Hinsbergh VWM, Reinalda-Poot HH, Mohanlal RW, Bertina RM: Extrinsic activation of human coagulation factors IX and X on the endothelial surface. *J Thromb Haemost* 1991; 66: 283-291.

Broze GJ: Tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost* 1995; 74: 90-93. Review.

Butenas S, Mann KG: Active tissue factor in blood? *Nat Med* 2004; 10: 1155-1156.

Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG: Tissue factor activity in whole blood. *Blood* 2005; 105: 2764-2770.

Cambien B, Wagner DD: A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends in Mol Med* 2004; 10: 179-186. Review.

Camera M, Frigerio M, Toschi V, Brambilla M, Rossi F, Cottell DC, Maderna P, Parolari A, Bonzi R, De Vincenti O, Tremoli E: Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1690-1696.

Camerer E, Kolsto AB, Prydz H: Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thrombosis Research* 1996; 81: 1-41.

Chironi G, Hugel B, Bihorel Y, Del-Pino M, Gariepy J, Freyssinet JM, Simon A, Tedgui A: Leukocyte-derived microparticles as an independent marker of preclinical carotid atherosclerosis. *Circulation* 2005; 112: 72.

Choi-Miura NH, Tobe T, Sumiya J, Nakano Y, Sano Y, Mazda T, Tomita M: Purification and characterization of a novel hyaluronan-binding protein (PHBP) from human plasma: it has three EGF, a kringle and a serin protease domain, similar to hepatocyte growth factor activator. *J Biochem* 1996; 119: 1157-1165.

Choi-Miura NH, Otsuyana K, Sano Y, Saito K, Takahashi K, Tonita M: Hepatic injury-specific conversion of mouse plasma hyaluronan binding protein to the active heterodimer form. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 892-896.

Chou J, Mackmann N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B: Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 2004; 104: 3190-3197.

Dahlbäck B: Blood Coagulation. *Lancet* 2000; 355: 1627-1632.

Dahlbäck B, Villoutreix BO: The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Letters* 2005; 579: 3310-3316.

Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA: Tissue factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005; 106: 1604-1611.

Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R: Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 392-401. Review.

Drake DA, Morrissey JH, Edgington TS: Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. *Am J Pathol* 1989, 134: 1087-1097.

Edgington TS, Mackmann N, Brand K, Ruf W: The structural biology of expression and function of tissue factor. *J Thromb Haemost* 1991; 66: 67-79.

Eilertsen KE, Osterud B: Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15: 521-538. Review.

Eilertsen KE, Osterud B: The role of blood cells and their microparticles in blood coagulation. *Biochem Society* 2005; 33: 418-422.

Ellgard L, Ruddock LW: The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* 2005; 6: 28-32.

Engelmann B, Luther T, Müller I: Intravascular tissue factor pathway – a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *J Thromb Haemost* 2003; 89: 3-8. Review.

Engelmann B: Initiation of coagulation by tissue factor carriers in blood. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36: 188-190.

Esmon CT: Role of coagulation inhibitors in inflammation. *J Thromb Haemost* 2001; 86: 51-56.

Espana F, Medina P, Navarro S, Zorio E, Estelles A, Aznar J: The multifunctional protein C system. *Curr Med Chem Cardiovasc Haematol Agents* 2005; 3: 119-131. Review.

Essex DW, Li M, Miller A, Feinmann RD: Protein disulfide isomerase and sulfhydryl-dependent pathways in platelet activation. *Biochemistry* 2001; 40: 6070-6075.

Etscheid M, Hunfeld A, König H, Seitz R, Dodt J: Activation of proPHBSP, the zymogen of a plasma hyaluronan binding serin protease, by an intermolecular autocatalytic mechanism. *J Biol Chem* 2000; 275: 1223-1231.

Fareed J, Callas DD, Hoppensteadts D, Berner EW: Tissue factor antigen levels in various biological fluids. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6: 32-36.

Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B: Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 2003; 197: 1585-1598.

Freyssinet JM: Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1655-1662.

Furie B, Furie BC: Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *Trends Mol Med* 2004; 10: 171-178. Review.

Fuster V, Fallon JT, Nemerson Y: Coronary thrombosis. *Lancet* 1996; 348: 7-10.

Gando S, Nanzaki S, Sasaki S, Kemmotsu O: Significant correlations between tissue factor and thrombin markers in trauma and septic patients with disseminated intravascular coagulation. *J Thromb Haemost* 1998; 79: 1111-1115.

Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y: Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2311-2315.

Gomez K, McVey KH: Tissue factor initiated blood coagulation. *Front Biosci* 2006; 11: 1349-1359.

Gouin-Thibault I, Achkar A, Samama MM: The thrombophilic state in cancer patients. *Acta Haematol* 2001; 106: 33-42.

Grabowski EF, Reiniger AJ, Petteruti PG, Tsukurov O, Orkin RW: Shear stress decreases endothelial cell tissue factor activity by augmenting secretion of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 157-162.

Hathcock JJ, Nemerson Y: Platelet deposition inhibits tissue factor activity: in vitro clots are impermeable to factor Xa. *Blood* 2004; 104: 123-127.

Higuchi DA, Wun TC, Likert KM, Broze GJ: The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. *Blood* 1992; 79: 1712-1719.

Hoppe B, Tolou F, Radtke H, Kiesewetter H, Dorner T, Salama A: Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease is associated with idiopathic venous thrombosis. *Blood* 2005; 105: 1549-1551.

Horstmann LL, Ahn YS: Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Oncol Hematol* 1999; 30: 111-142. Review.

Hrachovinová I, Cambien B, Hafezi-Moghadam A, Kappelmayer J, Camphausen RT, Widom A, Xia L, Kazazian HH, Schaub RG, McEver, RP, Wagner D: Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. *Nat Med* 2003; 9: 1020-1025.

Hugel B, Socie G, Vu T: Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 1999; 93: 3451-3456.

Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet J-M: Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiologie* 2005; 20: 22-27. Review.

Kannemeier C, Feussner A, Stöhr HA, Weisse J, Preissner KT, Römisch J: Factor VII and single-chain plasminogen activator-activating protease: activation and autoactivation of the proenzyme. *Eur J Biochem* 2001; 268: 3789-3796.

Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, Song Y, Tzima E, Kennerknecht E, Niepmann M, von Bruehl ML, Sedding D, Massberg S, Günther A, Engelmann B, Preissner KT: Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 6388-6393.

Key NS, Slungaard A, Dandele L, Nelson SC, Moertel C, Styles LA, Kuypers FA, Bach RR: Whole blood tissue factor procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell disease. *Blood* 1998; 91: 4216-4223.

Key NS, Bach RR: Tissue factor as a therapeutic target. *J Thromb Haemost* 2001; 85: 375-376.

Koy NS, Stungaard A, Dandele L, Nelson SC, Moertel C, Styles LA, Kuypers FA, Bach RR: Whole blood tissue factor procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell diseases. *Blood* 1998; 91: 4216-4223.

Koyama T, Nishida K, Ondama S, Sawada M, Murami N, Hirosawa S, Kuriyama R, Matsuzawa K, Hasegawa R, Aoki N: Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. *Br J Haematol* 1994; 87: 343-347.

Lane DA, Grant PJ: Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic diseases. *Blood* 2000; 95: 1517-1532.

Lane DA, Philippou H, Huntington JA: Directing thrombin. *Blood* 2005; 106: 2605-2612. Review.

Lawson CA, Yan SD, Yan SF, Liao H, Zhou YS, Sobel J, Kisiel W, Stern DM, Pinsky DJ: Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. *J Clin Invest* 1997; 99: 1729-1738.

Libby P: Atherosclerosis: disease biology affecting the coronary vasculature. *Am J Cardiol* 2006; 98: 3-9.

Lösche W: Platelets and tissue factor. *Platelets* 2005; 16: 313-319. Review.

Lwaleed BA, Bass PS: Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol* 2005; 208: 327-339.

Mackman N: Role of Tissue Factor in Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1015-1022.

Mackman N, Tilley RE, Key NS: Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1687-1693.

Mackman N: The role of Tissue Factor and Factor VIIa in Hemostasis. *Anesth Analg* 2009; 108: 1447-1452.

Mahdi F, Shariat-Madar Z, Todd RF 3rd, Figueroa CD, Schmaier AH: Expression and colocalization of cytokeratin 1 and urokinase plasminogen activator receptor on endothelial cells. *Blood* 2001; 97: 2342-2350.

Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Lesèche G, Freyssinet JM, Tedgui A: Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999; 99: 348-353.

Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A: Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 101: 841-843.

Mann KG, Jenny RJ, Krishnaswamy S: Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annu Rev Biochem* 1988; 57: 915-956. Review.

Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R: Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H1004-1009. Review.

Matsumoto N, Nomura S, Kamihata H, Kimura Y, Iwasaka T: Increased levels of oxidized LDL-dependent monocyte-derived microparticles in acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost* 2004; 91: 146-154.

McEver RP: P-selectin and PSGL-1: exploiting connections between inflammation and venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2002; 87: 364-365.

Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI: Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin : studies in baboons, human coronary interventions, and human acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 104: 1533-1537.

Misumi K, Ogawa H, Yasue H, Soejima H, Suefuji H, Nishiyama K, Takazoe K, Kugiyama K, Tsuji I, Kumeda K, Nakamura S: Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1998; 81: 22-26.

Moosbauer C, Morgenstern E, Cuvelier SL, Manukyan D, Bidzhekov K, Albrecht S, Lohse P, Patel KD, Engelmann B: Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. *Blood* 2007; 109(3):995-1002.

Morel O, Hugel B, Jesel L, Mallat Z, Lanza F, Douchet MP, Zupan M, Chauvin M, Cazenave JP, Tedgui A, Freyssinet JM, Toti F: Circulating procoagulant microparticles and soluble GPV in myocardial infarction treated by primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. A possible role for GPIIb-III antagonists. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1118-1126.

Morel O, Toti F, Bakouboula B, Grunebaum L, Freyssinet JM: Procoagulant microparticles: "criminal partners" in atherothrombosis and deleterious cellular exchanges. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006; 35: 15-22.

Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM: Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2594-2604.

Müller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B: Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 2003; 17: 476-478.

Nakazawa F, Kannemeier C, Shibamiya A, Song Y, Tzima E, Schubert U, Koyama T, Niepmann M, Trusheim H, Engelmann B, Preissner KT: Extracellular RNA is a natural cofactor for the (auto-)activation of Factor VII-activating protease (FSAP). *Biochem J* 2005; 385: 831-838.

Neuenschwander PF, Morrissey JH: Deletion of the membrane anchoring region of tissue factor abolishes autoactivation of factor VII but not cofactor functions. *J Biol Chem* 1992; 267: 14477-14482.

Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PG, ten Have K, Eijlsman L, Hack CE, Sturk A: Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* 1997; 96: 3534-3541.

Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A: Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000; 95: 930-935.

Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J: High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* 2001; 158: 277-287.

Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ Jr: Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood* 1998; 72: 2020-2025.

Omoto S, Nomura S, Shouzu A, Nishikawa M, Fukuhara S, Iwasaka T: Detection of monocyte-derived microparticles in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2002; 45: 550-555.

Osterud B, Rapaport SJ: Activation of factor XI by the reaction product of tissue factor and factor VII: Additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5260-5264.

Osterud B: The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Hematology* 2001; 38: 2-5.

Osterud B, Bjorklid E: The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27: 605-617. Review.

Osterud B, Bjorkid E: Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 11-23.

Owen CA, Campbell MA, Sannes PL, Boukedes SS, Campbell EJ: Cell-surface bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serin proteinases. *J Cell Biol* 1995; 131: 775-789.

Peltoniemi MJ, Karala AR, Jurvansuu JK, Kinnula VL, Ruddock LW: Insights into deglutathionylation reactions. Different intermediates in the glutaredoxin and protein disulfide isomerase catalyzed reactions are defined by the gamma-linkage present in glutathione. *J Biol Chem* 2006; 281: 33107-33114.

Petersen LC, Bjorn SE, Nordfang O: Effect of leukocyte proteinases on tissue factor pathway inhibitor. *J Thromb Haemost* 1992; 67: 537-541.

Polgar J, Matuskova J, Wagner DD: The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1590-1596. Review.

Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstmann LL, Valle M, Aime G, Ahn YS: Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 2003; 41: 211-217.

Rapaport SJ, Rao LVM: Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1111-1121.

Rauch U, Bondermann B, Bohrmann B, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y: Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD 15 and tissue factor. *Blood* 2000; 96: 170-175.

Rehemtulla A, Ruf W, Edington TS: The integrity of the cysteine 186-cysteine 209 bond of the second disulfide loop of tissue factor is required for binding of factor VII. *J Biol Chem* 1991; 266: 10294-10299.

Reinhardt C, von Brühl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, Dlugai S, Hess S, Konrad I, Orschiedt L, Mackman N, Ruddock L, Massberg S, Engelmann B: Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Inv* 2008; 118: 1110-1122.

Reininger AJ, Reininger CB, Agneskirchner J, Scherb H, Spannagl M, Wurzinger LJ: Spreading of platelets: a morphological marker for platelet reactivity in peripheral arterial occlusive disease. *Platelets* 1998; 9: 241-244.

Reininger AJ, Heijnen HFG, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM: Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* 2006; 107: 3537-3545.

Römisch J, Feussner A, Vermohlen S, Stöhr HA: A protease isolated from human plasma activating factor VII independent of tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999; 10: 471-479.

Römisch J: Factor VII activating protease (FSAP): a novel protease in hemostasis. *J Biol Chem* 2002; 277: 11119-11124.

Römisch J, Feussner A, Nerlich C, Stoehr HA, Weimer T: The frequent Marburg I polymorphism impairs the pro-urokinase activating potency of the factor VII activating protease (FSAP). *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13: 433-441.

Sabatier F, Roux V, Anfosso F, Camoin L, Sampol J, Dignat-George F: Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood* 2000; 99: 3962-3970.

Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F: Type 1 and Type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2005; 54: 2840-2845.

Schenone M, Furie BC, Furie B: The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol* 2004; 11: 272-277.

Schmaier AH, Rojkaer R, Scharidat-Madar Z: Aktivation of the plasma Kallikrein/Kinin system on cells: a revised hypothesis. *J Thromb Haemost* 1999; 82: 226-233.

Schousboe I: Contact activation in human plasma is triggered by zinc ion modulation of factor XII (Hageman factor). *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; 4: 671-678.

Shore JD, Day DE, Bock PE, Olson ST: Acceleration of surface-dependent autocatalytic activation of blood coagulation factor XII by divalent metal ions. *Biochemistry* 1987; 26: 2250-2258.

Steffel J, Lüscher TF, Tanner FC: Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2006; 113: 722-731.

Steppich B, Mattisek C, Sobczyk D, Kastrati A, Schoming A, Ott I: Tissue factor pathway inhibitor on circulating microparticles in acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2005; 93: 35-39.

So AK, Varisco PA, Kemkes-Matthes B: Arthritis is linked to local and systemic activation of coagulation and fibrinolysis pathways. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2510-2515.

Solberg S, Osterud B, Larsen T, Sorlie D: Lack of ability to synthesize tissue factor by endothelial cells in intact human saphenous veins. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1990; 1: 595-600.

Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ: Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; 95: 594-599.

Tsuji T, Nagata K, Koike J, Todoroki N, Irimura T: Induction of superoxide anion production from monocytes and neutrophils by activated platelets through the P-selectin-sialyl Lewis X interaction. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 583-587.

VanWijk MJ, Nieuwland R, Boer K: Microparticle subpopulations are increased in pre-eclampsia: possible involvement in vascular dysfunction? *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187: 450-456.

VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R: Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Research* 2003; 59: 277-287. Review.

Wagner DD, Burger PC: Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 2131-2137.

Wagner DD: New links between inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1321-1324.

Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D: Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 2839-2843.

Wilkinson B, Gilbert HF: Protein disulfide isomerase. *Biochem Biophys Acta* 2004; 1699: 35-44.

Willeit J, Kiechl S, Weimer T, Mair A, Santer P, Wiedemann CJ, Römisch J: Marburg I polymorphism of factor VII-activating protease: a prominent risk predictor of carotid stenosis. *Circulation* 2003; 107: 667-670.

Wolf P: The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967; 13: 269-288.

Yun TH, Baglia FA, Myles T, Navaneetham D, Lopez JA, Walsh PN, Leung LL: Thrombin activation of factor XI on activated platelets requires the interaction of factor XI and platelet glycoprotein Ib alpha with thrombin anion-binding exosites I and II, respectively. *J Biol Chem* 2003; 278: 48112-48119.

Zillmann A, Luther T, Müller I, Kotzsch M, Spannagl M, Kauke T, Oelschlagel U, Zahler S, Engelmann B: Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 603-609.

Zumbach M, Hofmann M, Borcea V, Luther T, Kotzsch M, Müller M, Hergesell O, Andrassy K, Ritz E, Ziegler R, Wahl P, Nawroth PP: Tissue factor antigen is elevated in patients with microvascular complications of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol* 1997; 105: 206-212.

Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM: Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 971-988.

7. Anhang

7.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Bernd Engelmann für die Bereitstellung des interessanten Themas, die intensive Betreuung, Unterstützung und Förderung während der Bearbeitung meiner Dissertation. Auch möchte ich mich bei ihm bedanken für die Möglichkeit meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen vorzustellen, sowie für seine Unterstützung meiner Bewerbung als Stipendiatin des DFG Graduiertenkollegs.

Herrn Prof Dr. Dr. h.c. D. Seidel, dem Leiter des Instituts für klinische Chemie, Klinikum Großhadern, möchte ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und der Geräte danken.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Siess und dem DFG Graduiertenkolleg 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ für die Unterstützung, die Organisation zahlreicher wöchentlich stattfindender Seminare und des Herrsching-Symposiums bedanken.

Meinem Kooperationspartner PD Dr. Armin Reiningger danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit, die interessanten Gespräche und Bereitstellung seines Flusskammermodells.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Silke Dlugai, Dr. Christine Götz, Henrike Röse und Reinhard Jantzen für die uneingeschränkte Hilfe und Unterstützung bedanken. Darüber hinaus möchte ich meinen Mitdoktoranden Dr. Kiril Bidzhekov, Dr. Christoph Reinhardt und Dr. Lenka Grahl danken, die mir häufig geholfen und verschiedene Methoden und Isolationsschritte geduldig erklärt haben.

Zuletzt gilt mein herzlicher Dank meiner Familie: meinen Eltern Jörg und Karin Altmann und meinen Brüdern Gunnar, Olaf und Sören Altmann sowie Annelore Somann und Erna Gudenrath, die mich auf meinem Lebensweg stets liebevoll unterstützt und gefördert haben.

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Berid Altmann
Geburtsdatum: 18.09.1980
Geburtsort: Hamburg

Schulbildung

08/1986-08/1990 Grundschohle Hamburg
08/1990-06/1999 Albert-Schweitzer-Gymnasium, Hamburg
Abschluss: Abitur

Hochschulbildung und berufliche Erfahrung

04/2000 – 12/2006 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
03/2002 Physikum
03/2003 Erstes Staatsexamen
08/2005 Zweites Staatsexamen
12/2006 Drittes Staatsexamen
seit 06/2007 Assistenzärztin für Dermatologie im Dermatologikum Hamburg
Stephansplatz 5, 20354 Hamburg

Wissenschaftliche Erfahrung

Seit 05/2003 Doktorandin bei Prof. Dr. med. Bernd Engelmann, Abteilung „Vaskuläre Biologie und Hämostase“ am Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern, LMU München.
Titel: „Initiale Gerinnungsaktivierung durch Mikropartikel-Plättchen-Interaktionen und zelluläre RNA“

01/2004 – 04/2005 Kollegiatin und Stipendiatin des DFG Graduiertenkollegs 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“, Sprecher: Prof. Dr. med. Wolfgang Siess, Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten - Innenstadt, LMU München