

Aus dem Institut für Klinische Chemie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Komm. Leiter: Prof. Dr. med. M. Vogeser

Interaktionen zwischen Thrombozyten und Mikropartikeln und deren Bedeutung für die initiale Blutgerinnung

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades in Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Verena Haringer

aus

Pfarrkirchen

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Engelmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schramm
Prof. Dr. Laurenz J. Wurzinger

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

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2010

Im Gedenken an meinen Vater und in Dankbarkeit meiner Mutter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungsverzeichnis.....	4
<u>I. Einleitung</u>	6
I. 1. Die Hämostase	6
I. 1. 1 Die Bedeutung von Thrombozyten für die primäre Hämostase.....	6
I. 1. 2 Die Rolle von Tissue Factor (TF) für die Blutgerinnung.....	7
I. 1. 3. Bedeutung von MP in der Blutgerinnung.....	9
I. 1. 4. TF in Thrombozyten.....	13
I. 1. 5. Übertragung von Zellmembranproteinen auf Akzeptorzellen mittels MP.....	15
I. 1. 6 Thrombozyten als Phagozyten.....	15
I. 1. 7. Der GPIIb/IIIa-Komplex der Thrombozyten.....	16
I. 2. Grundlagen der Endozytose	17
I. 2. 1. Grundprinzipien der Endozytose.....	17
I. 2. 2. Die Rolle des Aktins in der Endozytose.....	18
I. 2. 3. Der intrazelluläre Weg des Endozytosevesikels.....	20
I. 3. Zielsetzung der Arbeit	20
<u>II. Material und Methoden</u>	21
II. 1. Material	21
II. 1. 1. Geräte.....	21
II. 1. 2. Verbrauchsmaterial.....	21
II. 1. 3. Chemikalien.....	22
II. 1. 4. Puffer und Lösungen.....	24
II. 1. 4. 1. Lösungen zur Zellisolierung.....	24
II. 1. 4. 2. Lösungen zur pH-Messung.....	24
II. 1. 4. 3. Lösungen und Medien für die Zellkultur.....	25
II. 1. 5. Zellkulturen.....	26
II. 2. Methoden	26
II. 2. 1. Zellkultur.....	26
II. 2. 1. 1. Kultivierung von THP-1-Zellen und U-937-Zellen.....	26
II. 2. 1. 2. Kultivierung von CHO-Zellen.....	26
II. 2. 1. 3. Zellzahlbestimmung.....	27
II. 2. 1. 4. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	27

II. 2. 2. Transfektion.....	27
II. 2. 2. 1. Transfektion von CHO-Zellen.....	27
II. 2. 3. Isolierung von Zellen und MP aus zirkulierendem Blut.....	28
II. 2. 3. 1. Blutentnahme.....	28
II. 2. 3. 2. Isolierung humaner Thrombozyten aus zirkulierendem Blut.....	28
II. 2. 3. 3. Isolierung von Monozyten aus zirkulierendem Blut.....	28
II. 2. 3. 4. Bestimmung der Zellzahl, Reinheit und Zellviabilität.....	29
II. 2. 4. Isolierung von Mikropartikeln.....	29
II. 2. 4. 1. Isolierung von Mikropartikeln aus Monozyten.....	29
II. 2. 4. 2. Isolierung von Mikropartikeln aus THP-1-Zellen.....	30
II. 2. 4. 3. Isolierung von MP aus U-937-Zellen.....	30
II. 2. 4. 4. Isolierung von zirkulierenden MP.....	30
II. 2. 5. Faktor Xa-Bildung.....	31
II. 2. 6. pH-Messung.....	32
II. 2. 6. 1. pH_i (= intra-MP pH)-Messungen.....	32
II. 2. 6. 2. pH_i -Messungen an inkubierten MP.....	33
II. 2. 6. 3. Kalibrierungskurven zur pH_i -Messung.....	35
II. 2. 6. 4. Auswertung und Statistik.....	36
II. 2. 7. Konfokale Laserscanmikroskopie.....	36
II. 2. 7. 1. Inkubation von MP mit ruhenden Thrombozyten.....	38
II. 2. 7. 2. Inkubation von MP mit aktivierten Thrombozyten.....	38
III. <u>Ergebnisse</u>	39
III. 1. Prokoagulatorische Aktivität in Gemischen aus MP und Thrombozyten	39
III. 2. Internalisierung von MP in Thrombozyten	39
III. 2. 1. Kalibrierungskurven.....	39
III. 2. 2. Messung von pH_i in isolierten MP.....	41
III. 3. Internalisierung Fluoreszenz-markierter MP in verschiedene Zelllinien	42
III. 3. 1. pH_i -Messung nach Inkubation mit CHO-Zellen.....	42
III. 3. 2. pH_i -Messung in mit ruhenden Thrombozyten inkubierten MP.....	43
III. 3. 3. pH_i -Messung in mit aktivierten Thrombozyten inkubierten MP.....	44
III. 3. 4. Nachweis der Internalisierung von MP in Thrombozyten mittels konfokaler Laserscanmikroskopie (LSM).....	46
III. 3. 5. MP-Internalisierung in Thrombozyten in Gegenwart von Inhibitoren der Endozytose.....	51
III. 3. 5. 1. Chlorpromazin.....	51
III. 3. 5. 2. Cytochalasin B.....	53
III. 3. 5. 3. Inkubation bei 4°C.....	53

Inhaltsverzeichnis	3
<hr/>	
III. 3. 6. Internalisierung von MP in Plättchen: Beteiligte Rezeptoren.....	55
III. 3. 7 Internalisierung von MP in Thrombozyten in Anwesenheit von Tirofiban.....	59
<u>IV. Diskussion</u>	62
IV. 1. Thrombozyten und MP potenzieren sich in ihrer koagulatorischen Aktivität	62
IV. 2. Intramikropartikuläre pH-Werte	63
IV. 3. Bedeutung des thrombozytären Aktivierungszustands für die MP-Internalisierung	63
IV. 4. Verschiedene Endozytosewege sind an der Internalisierung von MP beteiligt	65
IV. 4. 1.MP-Internalisierung in Thrombozyten findet via Endozytose statt.....	65
IV. 4. 2. CHO-Zellen internalisieren MP via Dynamin-abhängige Endozytose.....	66
IV. 4. 3. Das Aktinzytoskelett ist von Bedeutung für MP-Internalisierung	66
IV. 4. 4.Clathrin-abhängige Endozytose ist an der MP-Internalisierung beteiligt.....	67
IV. 5. Der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa fördert die MP-Internalisierung in den Thrombozyten	67
IV. 6. Darstellung der MP-Internalisierung mittels konfokaler LSM	68
IV. 7. Ausblick	69
<u>V. Zusammenfassung</u>	71
<u>VI. Summary</u>	73
<u>VII. Literaturverzeichnis</u>	74
<u>VIII. Danksagung</u>	94
<u>IX. Curriculum vitae</u>	95

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	Aqua bidestillata, bidestilliertes Wasser
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AM	Azetoxymethylester
BCECF	2',7'-bis(2-carboxy-ethyl)-5(and-6)-carboxyfluorescein
BSA	Bovines Serum Albumin
CCR5	Chemokin (C-C Motiv) Rezeptor 5
CHO	Chinese Hamster Ovary
DCF	5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (5(6)-CFDA, SE)
et al.	<i>et alii</i> , und andere
F	Faktor
Fu	Fluoreszenz
FBS	Fetal Bovine Serum
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IgG	Immunoglobulin G
kD	kilo Dalton
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Exzitationswellenlänge
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Laserscanmikroskop(ie)
min	Minuten
MP	Mikropartikel
mMP	Mikropartikel aus Monozyten
mRNA	messenger RNA
OCS	open canalicular system = offenes kanalikuläres System
PBS	Phosphate-buffered saline
pHi	intramikropartikulärer pH
PRP	Plättchen-reiches Plasma
PS	Phosphatidylserin

PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SD	standard deviation, Standardabweichung
TF	Tissue Factor = Gewebsthromboplastin
Thr.	Thrombozyten
tMP	Mikropartikel aus THP-1-Zellen
U	Units, Einheiten
uMP	Mikropartikel aus U-937-Zellen
VB	Vollblut
vWF	von-Willebrand-Faktor
wt	wild type
zMP	Mikropartikel aus zirkulierendem Blut

I. Einleitung

I. 1. Die Hämostase

Das System der Hämostase gewährleistet, dass unter normalen Bedingungen Blut in einem flüssigen Zustand gehalten wird, und reagiert auf eine Verletzung der Blutgefäße mit der schnellen Ausbildung eines Thrombus. Zu diesem Vorgang tragen sowohl die Thrombozyten als auch die Gerinnungskaskade einen wesentlichen Teil bei.

I. 1. 1. Die Bedeutung von Thrombozyten für die primäre Hämostase

Die primäre Hämostase besteht in der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand. Falls ein Blutgefäß verletzt wird, führt dies zunächst zu einer Aktivierung von Endothelzellen. Diese enthalten in ihrem Zytoplasma sogenannte Weibel–Palade–Körperchen, in welchen von–Willebrand–Faktor (vWF) gespeichert wird, der bei Stimulation der Zelle schnell an die Zelloberfläche transportiert wird (McEver *et al.* 1989). vWF wird auch in den α -Granula von Thrombozyten gespeichert. Eine Gefäßverletzung führt in analoger Weise zur Aktivierung der Thrombozyten, in welchen vWF an die Oberfläche transloziert wird.

Die Funktion dieses Proteins hängt von der Fließgeschwindigkeit des Blutes ab. Falls, wie in großen arteriellen Gefäßen, eine hohe Scherbeanspruchung vorherrscht, führt vWF zur Anheftung von Thrombozyten an die verletzte Gefäßstelle, indem er den Glykoprotein Ib-Komplex (GPIb) auf der Thrombozytenoberfläche und das Kollagen im freigelegten subendothelialen Gewebe verbindet (Sakariassen *et al.* 1979; Green 2006).

Diese Bindung hat nur eine kurze Halbwertszeit und kann somit keine irreversible Adhäsion der Thrombozyten vermitteln. Allerdings führt die Bindung an GPIb neben einer Adhäsion auch zu einer Aktivierung des Thrombozyten. Dadurch können thrombozytäre Rezeptoren, wie der Glykoprotein IIb/IIIa-Komplex (GPIIb/IIIa = Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$), Fibrinogen binden und über Fibrinogenbrücken benachbarte Thrombozyten miteinander vernetzen, was schließlich zu einer permanenten Adhäsion und Aggregation führt (Savage *et al.* 1998; Gawaz *et al.* 2001).

Dies bewirkt ein provisorisches Abdichten der verletzten Gefäßstelle. Erst durch eine nachfolgende Verklebung des Plättchenthrombus mittels Fibrin (= sekundäre Hämostase) wird eine mechanische Stabilität des Gefäßverschlusses erreicht (Ni *et al.* 2003).

I. 1. 2. Die Rolle von Tissue Factor (TF) für die Blutgerinnung

Die Fibrinbildung wird unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich durch den extrinsischen Weg initiiert, der zentral über TF aktiviert wird. TF ist ein 47 kD großes, transmembranöses Glykoprotein und wird aufgrund seiner Struktur zu den Zytokinrezeptoren der Klasse II gezählt.

Für den Start des extrinsischen Weges ist die Bildung eines Komplexes von TF mit dem aktivierten Faktor VII (FVIIa) notwendig. FVIIa alleine ist eine relativ schwache Serinprotease. Die Bindung an TF bewirkt eine allosterische Aktivierung von FVIIa, so dass seine Aktivität um ein Vielfaches verstärkt wird (Eilertsen *et al.* 2004). Der TF/VIIa-Komplex, die sogenannte extrinsische Faktor Xase, aktiviert die Zymogene Faktor IX (FIX) und mit Hilfe des aktivierten Faktors VIII (VIIIa) auch Faktor X (FX), welcher zur Thrombin- und nachfolgenden Fibrinbildung führt (Osterud *et al.* 1977, Schenone *et al.* 2004) (Abb. 1). Dass zum Anstoß der Blutgerinnung nur kleinste Mengen an TF vonnöten sind, lässt sich durch das Vorhandensein verschiedener Verstärkungsmechanismen erklären.

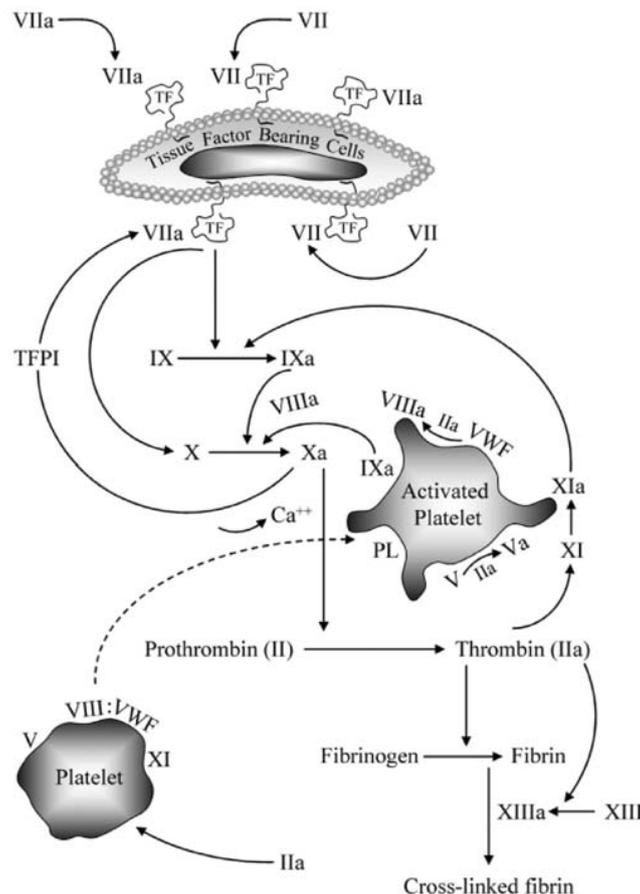


Abb. 1 Start des Blutgerinnungssystems durch zellulären TF (modifiziert nach Hoffman *et al.* 2003).

Die Gerinnung wird über den TF/VIIa-Komplex gestartet. Die nachfolgende Aktivierung von Faktor X führt über die Bildung von Thrombin letztlich zur Fibrinpolymerisation. Verschiedene Rückkopplungsschleifen führen zu einer Verstärkung der Fibrinbildung.

Der physiologische Gerinnungshemmer TFPI (= Tissue Factor Pathway Inhibitor) ist eingezeichnet. Faktor VIII liegt in einem Komplex mit vWF vor zum Schutz vor schnellem Abbau. Faktor XIII führt zu einer Stabilisierung von Fibrin durch Quervernetzung.

TF wird gewebsspezifisch exprimiert. Im extravaskulären Gewebe von gut durchbluteten Organen, wie Plazenta, Gehirn, Herz, Nieren, Haut und Lunge (Fleck *et al.* 1990; Drake *et al.* 1989) wird TF konstitutiv sowohl in den Gefäßwänden (Tunica adventitia) als auch Organkapseln exprimiert, wohingegen Leber, Milz, Skelettmuskel und Thymus niedrige Spiegel von TF exprimieren (Pawlinski *et al.* 2004). Da das Endothel keinen TF exprimiert (Eilertsen *et al.* 2004) und so das Gefäßlumen als antikoagulatorische Schicht auskleidet, bildet der TF sozusagen eine protektive, prokoagulatorische Hülle um das Blutgefäßsystem und viele Organe

herum und reagiert sofort, sollte die Integrität der Gefäßwände beeinträchtigt werden. Die gewebsspezifische Verteilung von TF ist ein Hinweis auf seine essentielle Rolle in der Hämostase, die einen Schutz lebenswichtiger Organe vermittelt (Eddleston *et al.* 1993).

Obwohl TF normalerweise in Zellen, die mit dem Blut assoziiert sind, wie Monozyten und Endothelzellen, nicht exprimiert wird, können diese beiden Zelltypen durch Exposition gegenüber Bakterien, Lipopolysaccharid (LPS), Immunkomplexen und Bestandteilen des Komplementsystems, Tumorzellen, Anaphylatoxinen, Lymphokinen und proinflammatorischen Zytokinen (Eilertsen *et al.* 2004) dazu stimuliert werden, TF-mRNA, TF-Antigen und funktionsfähiges TF-Protein zu exprimieren.

Wie wichtig funktionierender TF für die Blutgerinnung *in vivo* ist, zeigt sich nicht zuletzt daran, dass bisher von keiner TF-Defizienz in Menschen berichtet wurde (Mackman 2009). Mäuse, in denen das TF-Gen mittels gentechnologischer Methoden ausgeschaltet wurde, sterben bereits *in utero* (Toomey *et al.* 1996; Bugge *et al.* 1996). Mäuse mit nur 1% der normalen TF-Aktivität überleben hingegen, was darauf hinweist, dass bereits sehr geringe Expressionslevel von TF für eine adäquate Hämostase ausreichen (Pawlinski *et al.* 2004).

I. 1. 3. Bedeutung von MP in der Blutgerinnung

Zusätzlich zu dem mit Zellen assoziierten TF existiert auch im Blut zirkulierender TF. Dieser wird hauptsächlich in der Form von TF-reichen Mikropartikeln (MP) transportiert. MP wurden erstmal 1967 beschrieben, als Wolf von Plättchenmembranfragmenten im menschlichen Plasma berichtete und diese als „Plättchen-Staub“ bezeichnete (Wolf 1967). Heute weiß man, dass MP kleine, exozytotische Plasmavesikel sind, die von der Plasmamembran freigesetzt werden. Ihr Durchmesser ist $<1\mu\text{m}$ und daher kleiner als derjenige von Blutzellen. Sie werden von einer Vielzahl von Zellen gebildet, und zwar einmal von im Blut zirkulierenden Zellen wie Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Erythrozyten, und auf der anderen Seite auch von Zellen, die Bestandteil der Gefäßwand sind, wie Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen und Makrophagen.

MP zirkulieren unter physiologischen Bedingungen im Blut und entstehen hauptsächlich aus Thrombozyten, wohingegen MP anderer Herkunft in einer weitaus geringeren Anzahl im Blut vorhanden sind (George *et al.* 1982). Man nimmt heute an, dass MP aus lipidreichen Mikrodomänen (rafts) der Zellmembran entstehen (Del Conde *et al.* 2005; Hugel *et al.* 2005).

Die wichtigsten zellulären Vorgänge, die zur MP-Bildung führen, sind Zellaktivierung, Apoptose, Zellalterung („cell maturation“), Hypoxie (van Wijk *et al.* 2003) und mechanischer Stress („shear stress“) (Reininger *et al.* 2006).

Sowohl der Vorgang der Apoptose als auch der intrazelluläre Calcium-Anstieg, der oft auf eine Zellaktivierung folgt, führen zu einer Veränderung der normalen Lipiddoppelschicht der Zellmembran, insbesondere dazu, dass die internen negativ geladenen Phospholipide auf der externen Oberfläche enthüllt werden (Zwaal *et al.* 1997). Diese Membranphospholipide, insbesondere Phosphatidylserin (PS), die somit auf der Oberfläche von MP vorhanden sind, können an Gerinnungsfaktoren binden und die Bildung und Aktivität der Xase (FVIIIa, FIXa, FX, PS)- und Prothrombinase (FVa, FXa, FII, PS)-Komplexe vorantreiben (Piccin *et al.* 2007).

Mikropartikel bestehen immer aus einer zweischichtigen Lipidmembran und einem intravesikulären oder intramikropartikelären Kompartiment (Abb.2). Sie tragen einmal die zellspezifischen Marker ihrer Ursprungszelle, z.B. CD14 auf monozytären MP, CD42b auf thrombozytären MP oder CD4 und CD8 auf MP, die von Lymphozyten abstammen (Burnier *et al.* 2009). Andererseits hängt ihre Zusammensetzung und Zahl auch vom dem jeweiligen zellulären Vorgang ab, der zur Mikropartikelbildung geführt hat, so dass diejenigen Proteine, die z.B. in der Ursprungszelle während der Zellaktivierung hochreguliert werden, schließlich auch in den freigesetzten MP vorhanden sind (Diamant *et al.* 2004). So besitzen auf verschiedene Weise entstandene MP auch unterschiedliche physiologische Funktionen.

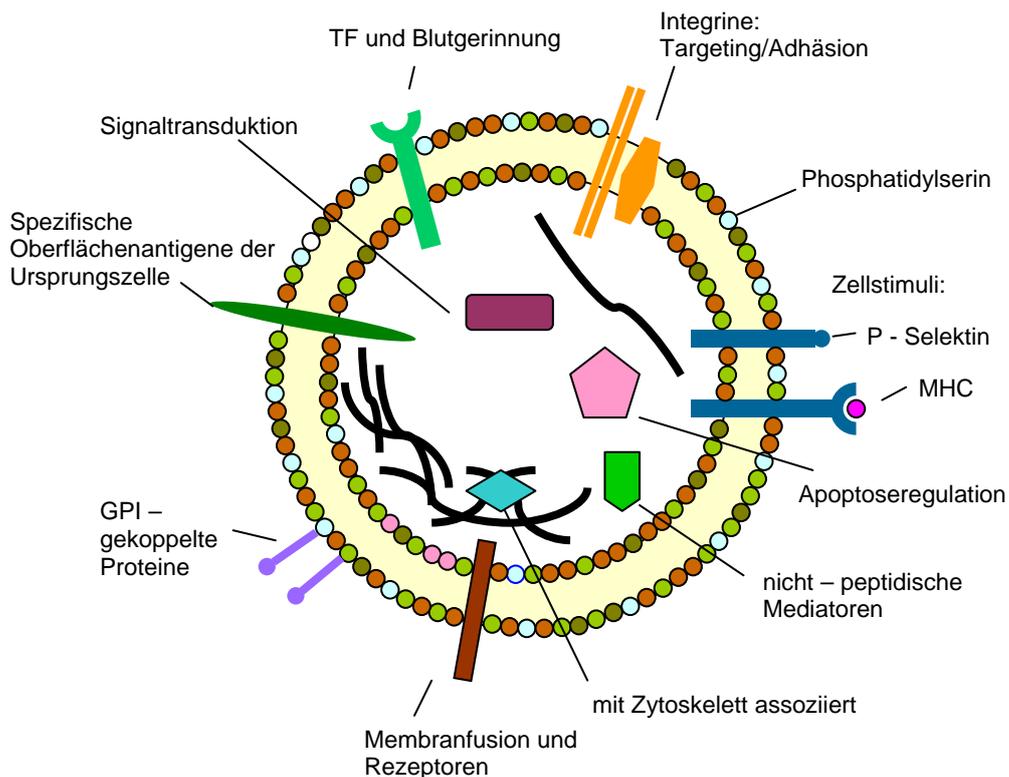


Abb. 2 Schematische Darstellung der Zusammensetzung eines Mikropartikels (modifiziert nach Hugel *et al.* 2005).

Die Phospholipide in MP von gesunden Probanden bestehen v.a. aus Phosphatidylcholin (ca. 60%), Sphingomyelin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin (Weerheim *et al.* 2002). MHC = Major histocompatibility complex; GPI = Glykosylphosphatidylinositol.

MP spielen eine wichtige Rolle bei einer ganzen Reihe biomedizinisch relevanter Prozesse, wie z.B. bei der intrazellulären Kommunikation, Immunität und Hämostase. So akkumulieren von Monozyten abstammende MP, welche TF und PSGL-1 exprimieren, auf aktivierten Thrombozyten, welche P-Selektin exprimieren, und konzentrieren somit TF auf einem Level, welches den Anstoß zum Start der Blutgerinnung gibt (Falati *et al.* 2003). Die Fähigkeit, MP zu bilden, ist ein essentieller Teil der physiologischen Blutgerinnung: ein Defekt in der MP-Produktion führt zu einer seltenen Blutungsneigung namens Scott-Syndrom (Sims *et al.* 1989). Auf der anderen Seite wurde von Patienten berichtet, die trotz niedriger Thrombozytenzahlen keine Blutungsneigungen (wie z. B. Petechien, Hämaturie oder Schleimhautblutungen) zeigten, wohl dank einer hohen Anzahl zirkulierender MP (Jy *et al.* 1992; Springer *et al.* 1998).

Viele Zelltypen können prinzipiell TF-haltige MP generieren, so z.B. Monozyten (Falati *et al.* 2003), Endothelzellen (Shet *et al.* 2003), Thrombozyten (Siddiqui *et al.* 2002 ; Müller *et al.* 2003) und glatte Gefäßmuskelzellen (Leroyer *et al.* 2007; Hron *et al.* 2007). Der Beitrag, den diese verschiedenen Zelltypen zum zirkulierenden Pool an TF-haltigen MP leisten, hängt wahrscheinlich von der zugrunde liegenden Erkrankung des jeweiligen Patienten ab (Mackman *et al.* 2007).

So findet man erhöhte Spiegel an Plättchen-MP bei Myokardinfarkt (Mallat *et al.* 2000), arterieller Hypertension (Preston *et al.* 2003), Diabetes mellitus (Nomura *et al.* 1995) und verschiedenen malignen Erkrankungen (Kim *et al.* 2003), wohingegen MP aus Endothelzellen vermehrt im zirkulierenden Blut vorhanden sind bei systemischem Lupus erythematodes und Antiphospholipid-Syndrom (Dignat-George *et al.* 2004), akutem Koronarsyndrom (Mallat *et al.* 2000) und Diabetes mellitus Typ 1 (Sabatier *et al.* 2002). Bei Diabetikern ist zusätzlich die Anzahl der MP mit leukozytärem Ursprung um ein dreifaches höher als in gesunden Probanden.

HIV-Infizierte zeigen erhöhte Spiegel an Mikropartikeln, die das CD4-Antigen tragen (Aupeix *et al.* 1997). Granulozytäre und lymphozytäre MP sind bei Präeklampsie erhöht (van Wijk *et al.* 2002), ebenso wie eosinophile MP bei Sepsis (Ogura *et al.* 2004). MP aus glatten Gefäßmuskelzellen spielen eine potentielle Rolle bei der Atherosklerose und Thrombusformation (Brisset *et al.* 2003; Schechter *et al.* 2000). Allerdings sind auch nicht TF-haltige MP prokoagulatorisch aktiv (Sturk-Maquelin *et al.* 2003; Hrachovinova *et al.* 2003). Wahrscheinlich gibt es mehrere Wege, über die MP die Blutgerinnung unterstützen. Wie oben beschrieben, werden negative Phospholipide exponiert, die zur Bindung und Aktivierung von Gerinnungsfaktoren führen. MP spielen aber auch eine Rolle in der zellulären Blutgerinnung, indem sie Zellen an einen sich entwickelnden Thrombus rekrutieren. Darüber hinaus können sie, je nach Ursprungszelle und Entstehungsart, sogar antikoagulatorische Eigenschaften haben (Lynch *et al.* 2007).

Neben TF-reichen MP existiert auch eine lösliche Form von TF als alternativ gespleißte Form (Bogdanov *et al.* 2003). Diese alternativ gespleißte Form enthält den Großteil der extrazellulären Domäne, aber anstelle der Transmembrandomäne durch eine Leserasterverschiebung eine einzigartige Peptidsequenz am C-Terminus, assoziiert mit dem Fehlen von Exon 5. Da Exon 5 eine Region kodiert, die zur

Bindung von FVII benötigt wird, ist es umstritten, ob diese TF-Unterform prokoagulatorische Aktivität hat.

I. 1. 4. TF in Thrombozyten

2001 wurde von unserer Arbeitsgruppe zum ersten Mal nachgewiesen, dass Thrombozyten TF enthalten (Zillmann *et al.* 2001). Innerhalb der Thrombozyten wird TF in den α -Granula und dem offenen kanalikulären System (OCS) gespeichert, wohingegen Zytoplasma und δ -Granula (dense granules) frei von TF sind (Muller *et al.* 2003). Nach Aktivierung der Thrombozyten mittels Thrombin, Kollagen und Adenosin-5'-diphosphat (ADP) fusionieren die α -Granula mit der Plasmamembran, so dass der Plättchen-TF an die Zelloberfläche transloziert, wo er v. a. auf den Filopodien der aktivierten Thrombozyten zu finden ist (Leon *et al.* 2004).

Es existieren im Thrombozyten zwei wichtige Klassen von sekretorischen Granula. Auf der einen Seite sind dies die dichten Granula (dense granules), die z.B. ADP und Calcium freisetzen. Auf der anderen Seite gibt es die α -Granula, die eine ganze Reihe verschiedener Proteine freisetzen. Davon werden einige, wie Fibrinogen, mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose aus dem Blutplasma aufgenommen. Andere, wie der vWF, werden von Megakaryozyten, den Vorläuferzellen der zirkulierenden Thrombozyten im Knochenmark, synthetisiert (George 2000).

In den Megakaryozyten wurden aber weder TF-Protein noch TF-mRNA nachgewiesen (Zillmann *et al.* 2001), so dass eine Übernahme des TF-Proteins von den Megakaryozyten in die Thrombozyten ausgeschlossen ist. Allerdings können ruhende Thrombozyten, obwohl sie kernlose Blutzellen sind, TF-mRNA enthalten, so dass sie möglicherweise in der Lage sind, dieses Protein eigenständig zu synthetisieren (Camera *et al.* 2003). Gewinnen Blutplättchen ihren nachgewiesenermaßen funktionell aktiven TF via De-novo-Synthese oder stammt der Plättchen-TF eher aus extrazellulären Ursprüngen?

Dass die kernlosen Thrombozyten prinzipiell in der Lage sind, Proteine zu synthetisieren, wurde schon 1987 nachgewiesen (Kieffer *et al.* 1987). Aber erst vor kurzem fanden Schwertz *et al.* (Schwertz *et al.* 2006), dass Thrombozyten prä-mRNA konstitutiv exprimieren.

Um prä-mRNA in reife mRNA zu überführen bedarf es eines sog. Spliceosoms, einem Komplex aus snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins) und verschiedener Hilfsproteine. Dieser Komplex erkennt Introns und schneidet diese aus der prä-mRNA heraus. Die übrigbleibende Aneinanderreihung von Exons wird als reife mRNA der Translation zugeführt (Maniatis *et al.* 2002). Man glaubte lange Zeit, dass dieser Vorgang nur im Inneren des Zellkerns stattfindet. Essentielle Bestandteile des Spliceosoms sind aber auch in Thrombozyten vorhanden (Denis *et al.* 2005). Diese können somit, abhängig von ihrem Aktivierungszustand, neben Form und Funktion auch ihr Proteom verändern (Zimmerman *et al.* 2008). So kommt es erst nach Aktivierung der Thrombozyten durch outside-in-signalling zum Spleißen der prä-mRNA zu reifer mRNA und schließlich zu einer Induktion und Vermehrung der TF mRNA (Schwertz *et al.* 2006) und nachfolgend zur Synthese von TF-Protein. Thrombozyten sind also prinzipiell in der Lage zur De-novo-Synthese von TF (Panés *et al.* 2007).

Allerdings leistet de-novo-synthetisierter Plättchen-TF keinen wesentlichen Beitrag zur raschen Plättchen-abhängigen Blutgerinnung, so dass man postulieren kann, dass neben neu gebildetem TF auch eine gewisse Menge an präformiertem TF-Protein im Thrombozyten vorhanden ist (Panés *et al.* 2007). Plättchenaktivierung führt in jedem Fall sowohl zu einer Translokation von de-novo-synthetisiertem oder präformiertem Plättchen-TF von den α -Granula an die Thrombozytenoberfläche als auch zu einer Freisetzung von TF in den Extrazellulärraum. Dabei scheint der TF auf der Thrombozytenoberfläche funktionell nur sehr schwach aktiv zu sein, wohingegen der freigesetzte TF größere funktionelle Kompetenz hat (Siddiqui *et al.* 2002; Scholz *et al.* 2002).

Bei einer Gefäßverletzung führt die Aktivierung von Thrombozyten u.a. dazu, dass in α -Granula gespeichertes P-Selektin an die Thrombozytenoberfläche transloziert wird. P-Selektin gehört zu den Selektinen, einer Familie von Zelladhäsionsmolekülen. Der P-Selektin-Rezeptor PSGL-1 (P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1) findet sich sowohl auf der Zellmembran von neutrophilen Granulozyten als auch auf Monozyten (Wagner 2005). Über die Interaktion von P-Selektin und PSGL-1 entstehen Verbände aus Neutrophilen und Thrombozyten. Besonders in diesen Verbänden findet eine Präsentation von TF auf der Thrombozytenoberfläche statt (Zillmann *et al.* 2001; Barnard 2005).

Aktiviert Thrombozyten sezernieren aber auch TFPI, den wichtigsten physiologischen Antagonisten des extrinsischen Weges der Koagulationskaskade (Maroney *et al.* 2007). In den Verbänden aus Neutrophilen und Thrombozyten könnte die proteolytische Inaktivierung von TFPI durch neutrophile Proteasen (Falanga *et al.* 2005) die Fähigkeit von thrombozytärem TF zur Initiierung der Blutgerinnungskaskade verstärken (Leon *et al.* 2004; Engelmann 2006). Die funktionelle Aktivierung des thrombozytären TF würde also erst durch die Inaktivierung von TFPI erreicht werden.

I. 1. 5. Übertragung von Zellmembranproteinen auf Akzeptorzellen mittels MP

Rauch *et al.* zeigten den Transfer von TF von leukozytären MP auf die Außenseite des Zellmembran von Thrombozyten, vermittelt über die Interaktion von granulozytärem CD15 mit thrombozytärem P–Selektin (Rauch *et al.* 2000).

Die prinzipielle Möglichkeit, dass Mikropartikel Membranproteine von einer Zelle auf eine andere übertragen können, wurde von Mack *et al.* erstmals nachgewiesen (Mack *et al.* 2000). Dabei wurde gezeigt, dass CCR5, ein Chemokinrezeptor, der eine zentrale Rolle bei der Übertragung und Verbreitung des HI–Virus Typ 1 spielt, von der Oberfläche verschiedener Zelltypen als MP freigesetzt wird und daraufhin auf CCR5–negative Zellen übertragen wird und in deren Zellmembran integriert werden kann. Del Conde *et al.* fanden nun, dass TF–haltige MP mit der Zellmembran aktivierter Thrombozyten fusionieren und dadurch ihre Membranproteine, inklusive TF, auf die Plättchen übertragen können (Del Conde *et al.* 2005).

I. 1. 6. Thrombozyten als Phagozyten

Andererseits ist auch bekannt, dass Thrombozyten als Phagozyten fungieren können. So können Blutplättchen z. B. Latexpartikel via Phagozytose aufnehmen (Movat *et al.* 1965; White *et al.* 1972). Thrombozyten internalisieren auch Viren (Danon *et al.* 1959) und Bakterien über Endozytose (Youssefian *et al.* 2002) und sind auch in der Lage, Liposomen über ihr OCS (offenes kanalikuläres System) aufzunehmen, ein Kanalsystem, welches durch Invagination der Plasmamembran ins

Plättcheninnere gebildet wird und dadurch unter anderem als Membranreserve dient (Male *et al.* 1992; Nishiya *et al.* 2004). Dass Plättchen TF-haltige Phospholipid-Vesikel aufnehmen können, und zwar innerhalb relativ kurzer Zeit (5 – 60 min), wurde schließlich mittels Elektronenmikroskopie gezeigt (Lopez-Vilchez *et al.* 2007).

I. 1. 7. Der GPIIb/IIIa-Komplex der Thrombozyten

Der kalziumabhängige Glykoprotein IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)-Komplex ist, abhängig von seiner Aktivierung, in seiner aktiven Konformation der Haupt-Fibrinogen-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche. Thrombozytenstimulation durch lösliche Agonisten wie ADP, Thrombin oder Thromboxan A2 führt über einen intrazellulären Signalweg zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die von einer niedrigen zu einer sehr hohen Affinität des Rezeptors zu seinen Liganden (zirkulierendes Fibrinogen oder vWF) führt (Quinn *et al.* 2003).

Abciximab (ReoPro[®]) stellt das Fab-Fragment des monoklonalen Antikörpers AK 7E3, eines chimären Fusionsmoleküls (Mensch-Maus) gegen GPIIb/IIIa dar. Abciximab bindet irreversibel an den GPIIb/IIIa-Rezeptor, aber mit gleicher Affinität auch an das verwandte $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (den Vitronektin-Rezeptor) (Schneider *et al.* 2004). Tirofiban (Aggrastat[®]) ist ein nicht-peptidisches Tyrosin-Derivat, ein synthetischer Agonist mit niedrigem Molekulargewicht, der selektiv und reversibel an die Plättchen-GPIIb/IIIa-Rezeptoren bindet (Tanaka *et al.* 2004).

Der Primärmechanismus der GPIIb/IIIa-Inhibitoren ist also, unabhängig vom Mechanismus, der zur Thrombozytenaktivierung führt, die Hemmung der gemeinsamen Endstrecke der Plättchenaggregation: die Bindung von Fibrinogen oder vWF an den GPIIb/IIIa-Komplex (Frelinger *et al.* 2001).

Sowohl Tirofiban als auch Abciximab werden in der klinischen Medizin erfolgreich eingesetzt, z.B. in der Prävention, aber auch in der Therapie des akuten Koronarsyndroms (Lincoff *et al.* 2000, Boersma *et al.* 1999).

Zusätzlich zu den oben genannten Mechanismen fördert die Bindung von Fibrinogen an den aktivierten GPIIb/IIIa-Komplex aber auch die Freisetzung von thrombozytären Mikropartikeln. Der antikoagulatorische Effekt der GPIIb/IIIa-Inhibitoren könnte also nicht alleine darauf beruhen, dass die Fibrinogen-Bindung

blockiert wird, sondern auch daran, dass die Bildung von MP aus Thrombozyten verhindert wird (Gemmell *et al.* 1993, Reverter *et al.* 1996).

I. 2. Grundlagen der Endozytose

I. 2. 1. Grundprinzipien der Endozytose

Endozytose ist ein essentieller zellulärer Prozess, der die Erhaltung der zellulären Homöostase, die Aufnahme von Nährstoffen und die Abwehr von Mikroorganismen ermöglicht. Via Endozytose können sich Zellen Makromoleküle und andere Substanzen einverleiben. Das aufzunehmende Material wird von einem Teil der Plasmamembran eingehüllt, der sich zunächst einstülpt und dann abschnürt, so dass ein intrazelluläres Vesikel entsteht. Durch Pinozytose werden von allen eukaryontischen Zellen die Extrazellulärflüssigkeit und damit die darin gelösten Substanzen durch Einstülpung der Plasmamembran und nachfolgender Abschnürung relativ kleiner Vesikel aufgenommen. Durch Phagozytose gelangen größere Partikel wie z. B. Mikroorganismen und Zellreste in die Zellen. Dies wird vermittelt über große, Phagosomen genannte, Vesikel. Dieser Mechanismus ist vorwiegend auf Phagozyten beschränkt (v. a. Makrophagen).

Die meisten Säugetierzellen sind zu Rezeptor-vermittelter Endozytose befähigt. Diese beginnt in sog. clathrin-coated pits, Einstülpungen der Zellmembran, die mit zytosolischem Clathrin besetzt sind (Abb. 3). Die clathrin-coated pits sind sehr kurzlebig und verschmelzen schnell mit frühen Endosomen. Die aufzunehmenden Makromoleküle binden zunächst an spezifische Zelloberflächen-Rezeptoren. Diese clustern in besagten Einstülpungen, die sich daraufhin vertiefen, wodurch sich anschließend Clathrin-bedeckte Vesikel abschnüren können.

Ein anderer Weg der Endozytose erfolgt über Clathrin-unabhängige Caveolae (Nichols *et al.* 2001; Mayor *et al.* 2007; Donaldson *et al.* 2009). Caveolae sind tief eingestülpte Plasmamembrandomänen. Ihr Hauptprotein ist Caveolin, welches die innere Oberfläche der Caveolae auskleidet (Rothberg *et al.* 1992). Im Allgemeinen läuft die Internalisation über Caveolae langsam ab. Außerdem ist die Caveolae-vermittelte Endozytose kein konstitutiver Prozess und findet nur bei Zellaktivierung statt. Sie umgeht Lysosomen, indem die aufgenommenen Moleküle und

Makromoleküle direkt ins Zytoplasma bzw. Endoplasmatisches Retikulum abgegeben werden oder in spezielle endozytische Kompartimente, sog. Caveosomen, die sich von Endosomen unterscheiden (Pelkmans *et al.* 2001) (Abb. 3).

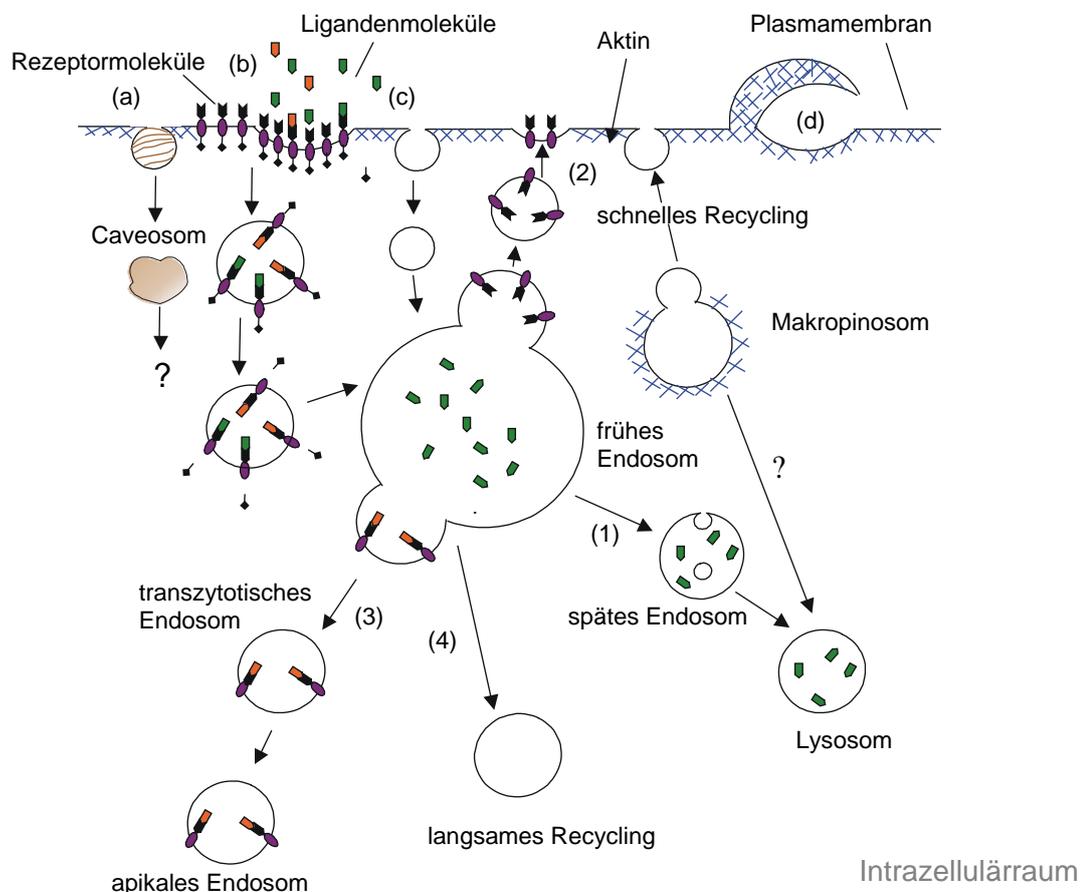


Abb. 3 Wege der Endozytose (modifiziert nach Jones *et al.* 2007)

Schematische Darstellung der intrazellulären Wege anhand von coated pits.
 (a) Caveolae; (b) clathrin-coated pits; (c) Clathrin- und Dynamin-unabhängige Mikropinozytose; (d) Makropinozytose
 (1) abbauender Weg zu den Lysosomen; (2) Recycling zur Plasmamembran;
 (3) Transzytose zur gegenüberliegenden Plasmamembran; (4) Sequestration in langsam recycelnden Endosomen

I. 2. 2. Die Rolle des Aktins in der Endozytose

Eine wichtige Rolle für die Endozytose spielt das Aktin-Zytoskelett der Zelle. Dabei sind mindestens zwei Mechanismen von Bedeutung.

Wenn sich eine Plasmamembraneinstülpung bildet, wird zunächst Clathrin rekrutiert, welches die Einstülpung von der zytosolischen Seite her überzieht. Anschließend

wird Dynamin rekrutiert, welches wiederum verschiedene Effektoren inklusive Aktin-bindende Proteine rekrutiert, welche an der Vesikulation beteiligt sein könnten (Sever *et al.* 2003). Außerdem rekrutiert Dynamin die Aktin-Polymerisations-Maschinerie, welche im nächsten Schritt filamentöses Aktin polymerisiert. Dadurch wird Druck auf die Plasmamembraneinstülpung ausgeübt, was dazu beiträgt, die Einstülpung zu einem Vesikel zu schließen, und das so entstandene Endozytosevesikel von der Zellmembran abzuschneiden (Marks *et al.* 2001). Die Aktivität des Dynamins ist also für eine relativ frühe Phase der Endozytose entscheidend.

Zudem spielt Aktin eine wichtige Rolle für den intrazellulären Weg der Endozytosevesikel. Die Aktinpolymerisation treibt zunächst das Vesikel eine kurze Distanz in die Zelle hinein. Wird der Polymerisationsapparat nicht sofort nach der Vesikelabschnürung angehalten, bildet sich ein sogenannter Aktin-Kometenschwanz, der das Vesikel wie ein Propeller tiefer in die Zelle hineintreibt (Pelkmans *et al.* 2002). Wird der Polymerisationsapparat hingegen sofort nach Vesikelabschnürung angehalten, wird auch das neugeformte Vesikel auf seinem Weg in die Zelle hinein nur Nanometer von seinem Entstehungsort an der Plasmamembran gestoppt (Merrifield *et al.* 2002).

Wenn man also die Aktin-Polymerisation mittels diverser Substanzen wie z. B. Cytochalasin B blockiert, können sich immer noch Caveolae oder Clathrin-Einstülpungen bilden, aber das Endozytosevesikel kann sich nicht komplett abschneiden, geschweige denn in die Zelle hineinwandern. So erklärt sich auch, dass durch Blockade der Aktin-Polymerisation nicht nur die Phagozytose, sondern auch der Prozess der Pinozytose gehemmt wird.

Aktinfilamente sind zudem auch ein wichtiger Bestandteil des Thrombozyten-Zytoskeletts, welches als höchst dynamische Struktur in zwei Untergruppen organisiert ist: einem zytoplasmatischen Aktinnetzwerk und einem Membran-assoziierten Zytoskelett (Rosado *et al.* 2000).

Ungefähr 40% des Aktins liegen in der ruhenden Zelle in der Form von Filamenten vor, dem sogenannten F-Aktin. Während der Plättchenaktivierung steigt der Plasmaspiegel von F-Aktin deutlich an (Hartwig *et al.* 1991), was unter anderem zur Formveränderung der Thrombozyten, dem sogenannten „shape change“ führt.

I. 2. 3. Der intrazelluläre Weg des Endozytosevesikels

Nachdem sich nun ein Endozytose–Vesikel an der Plasmamembran gebildet hat, gibt es verschiedene Wege, die es innerhalb der Zelle nehmen kann (Abb. 3). Vor allem die Clathrin–Vesikel sind sehr kurzlebig und fusionieren schnell mit frühen Endosomen. Von hier aus können sie an die Plasmamembran rezyklieren, was auf langsamem oder schnellem Weg vonstatten gehen kann. Auch können sie den transzytotischen Weg nehmen, d. h. durch die Zelle hindurch zur gegenüberliegenden Zellmembran translozieren, oder sie können an späte Endosomen weitergegeben werden. In diesen späten Endosomen liegt ein pH von ungefähr 6 vor. Durch Fusion des späten Endosoms mit einem Lysosom wird der pH weiter auf 5 verändert. Dies ist nun das pH–Optimum für die lysosomalen Hydrolasen, die Enzyme, die die in die Zelle aufgenommenen Moleküle abbauen. Da in den endosomalen und lysosomalen Kompartimenten ein deutlich niedrigerer pH–Wert als im Extrazellularraum und im Cytoplasma vorliegt, wird auch der intramikropartikuläre pH–Wert nach Aufnahme extrazellulärer Partikel durch Endozytose sinken.

I. 3. Zielsetzung der Arbeit

Bislang ist weiterhin unklar, ob thrombozytenassoziiertes TF zur schnellen Blutgerinnung in vivo de novo synthetisiert wird oder via TF–positive MP in die Thrombozyten aufgenommen wird.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mehr über die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Mikropartikeln zu erfahren.

Im einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Werden TF–haltige MP, als ein potentieller extrazellulärer Ursprung von Plättchen–TF, von Thrombozyten aufgenommen?
- Spielt es eine Rolle, ob die Thrombozyten dabei in ruhender Form vorliegen oder aktiviert sind?
- Welche Mechanismen sind an der MP–Aufnahme beteiligt?
- Welche Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche spielen bei der MP–Aufnahme eine Rolle?

II. Material und Methoden

II. 1. Material

II. 1. 1. Geräte

Cuv-o-Stir Model 333	Hellma (Müllheim/Baden)
ELISA Reader Dynatech MR7000	Dynatech Laboratories (Alexandria, USA)
Feinwaage SBC 21	Scaltec (Heiligenstadt)
Konfokales Laserscanmikroskop LSM 510	Zeiss (Jena)
Lichtmikroskop Axiovert 100	Zeiss (Jena)
pH-Glaselektrode HI 1131 P	Hanna Instruments (Kehl a. Rhein)
pH-Meter HI 221	Hanna Instruments (Kehl a. Rhein)
Spectrofluorophotometer RF-5001 PC	Shimadzu (Kyoto, Japan)
Ultrazentrifuge L8 60M	Beckman (München)
Vortex Genie-2	Scientific Industries (Bohemia/NY, USA)
Waage MC1 LC 620 S	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad GFL 1083	Amersham-Buchler (Braunschweig)
Zentrifugen: Rotina 35R, Mikro 22R	Hettich (Tuttlingen)

II. 1. 2. Verbrauchsmaterial

Deckgläser D, 12mm	Roth (Karlsruhe)
Eppendorf Tubes 3810X, 1,5ml, rot	Eppendorf (Hamburg)
Gewebekulturflaschen	Schubert & Weiss (München)
250ml	
750ml	
Microbeads CD14-Antikörper	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
MACS Trennsäulen-LS	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach)
Microcuvetten 101-QS Schichtdicke 10mm, Quarzglas	Hellma (Müllheim/Baden)

Multiwell 96-well flach	BD Biosciences (Heidelberg)
Pipettenspitzen	Gilson (Limburg-Offenheim)
Quali-Filterpipettenspitzen	Kisker-Biotech
Spritzen, Monovette	Sarstedt (Nümbrecht)
Spritzenfilter CME/PVC 0,2µm	Roth (Karlsruhe)
Sterile glass bottom dishes, 35x19mm/22mm	Harry Fein World Precision Instruments (Berlin)
Stripette	Corning (München)
5ml	
10 ml	
Zentrifugenröhrchen, konisch aus Polypropylen	Schubert & Weiss (München)
15ml	
50ml	

II. 1. 3. Chemikalien

Abciximab	Lilly Deutschland GmbH (Bad Homburg)
ADP	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Apyrase Grade VII from Potato	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
BCECF-AM in DMSO	Molecular Probes (Eugene/OR, USA)
Beriplex P/N 500	Aventis Pharma (Frankfurt)
BSA Bovines Serum Albumin	Roth (Karlsruhe)
CaCl ₂ -Lösung 0.025mol/l	Dade Behring (Marburg)
Chlorpromazin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Citrat aus S-Monovetten 9NC/PFA	Sarstedt (Nümbrecht)
Coagulation Factor X, Human Plasma	Calbiochem (Schwalbach)
Cytochalasin B from Helminthosporium dematioideum (Phomin)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
DCF 5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)

Desirudin (<i>S. cerevisiae</i>) AFI	Novartis Pharma (München)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma–Aldrich (Deisenhofen)
Ethanol 70%	Roche (Mannheim)
FBS	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Fibrinogen	Serva Biochemie (Heidelberg)
Ficoll–Paque Plus (Dichte 1,077g/ml)	Amersham Biosciences (Freiburg)
FuGene Transfection Reagent	Roche (Mannheim)
G-418	PAA–Laboratories (Cölbe)
Hellmanex II	Hellma (Müllheim/Baden)
IgG1	BD Biosciences (Heidelberg)
Iloprost	Schering (Berlin)
Kollagen Typ I	Nycomed Pharma GmbH (Konstanz)
Lipofectamin 2000 Reagent	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma–Aldrich (Deisenhofen)
MEM α –Medium	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Nigericin, free acid	Molecular Probes (Eugene/OR, USA)
pcDNA3–Dynamin–K 44A	Dr. S. Egan (Dept. Developmental Biology, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada)
Penicillin/Streptomycin	PAA–Laboratories (Cölbe)
RPMI–1640–Medium with L–Glutamine	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Substrat S–2222	Haemochrom Diagnostica (Essen)
Thromborel	Dade Behring (Marburg)
Tirofibanhydrochlorid	MSD (Haar)
Trypsin/EDTA (0,5g/l Trypsin, 0,2g/l EDTA)	PAA–Laboratories (Cölbe)
Vybrant DiD	Molecular Probes (Eugene/OR, USA)

II. 1. 4. Puffer und Lösungen***II. 1. 4. 1. Lösungen zur Zellisolierung***

Antikörper-Puffer	5mM EDTA, 0.5% BSA; in PBS pH 7.4
Monozyten-Waschpuffer	1mM EDTA, 0.15% BSA; in PBS pH 7.4
PBS (Phosphate-buffered saline)	137mM NaCl, 8mM Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 2.7mM KCl, 1.5mM KH ₂ PO ₄ ; in A. bidest, pH 7.4
Resuspuffer	138mM NaCl, 12mM NaHCO ₃ , 5mM Glucose, 5mM Hepes, 2.7mM KCl, 1mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 0.4mM NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O; in A. bidest pH 7.35
Thrombozytenwaschpuffer	138mM NaCl, 2,7mM KCl, 1mM MgCl ₂ , 15mM Hepes, 2.1mM EDTA, 5mM Glucose, 14mM Tri- Natriumcitrat, 200U Apyrase, in A. bidest, pH 6.3

II. 1. 4. 2. Lösungen zur pH-Messung

Kalibrierungspuffer	10mM Hepes, 140mM KCl, 1mM MgCl ₂ , in PBS
---------------------	--

II. 1. 4. 3. Lösungen und Medien für die Zellkultur

HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	137mM NaCl, 10mM Hepes, 5.6mM Glucose, 5.4mM KCl, 4.2mM NaHCO ₃ , 1.3mM CaCl ₂ x2H ₂ O, 0.6mM MgSO ₄ , 0.5mM MgCl ₂ xH ₂ O, 0.4mM KH ₂ PO ₄ , 0.3mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O; in A. bidest pH 7.4
Kulturmedium für THP-1-Zellen und U-937-Zellen	RPMI-Medium 10% FBS (hitzeinaktiviert) 2mM Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium für THP-1-Zellen und U-937-Zellen	95% RPMI-Medium 5% DMSO
Kulturmedium für CHO-Zellen	MEM- α -Medium 10% FBS (hitzeinaktiviert) 1% Penicillin/Streptomycin
Einfriermedium für CHO-Zellen	50% FBS 16% DMSO 34% MEM- α -Medium

II. 1. 5. Zellkulturen

Bezeichnung	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
CHO-Zellen	CCL-61	ATCC
THP-1-Zellen	TIB-202	ATCC
U-937-Zellen	CRL-1593.2	ATCC

ATCC American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A

II. 2. Methoden

II. 2. 1. Zellkultur

II. 2. 1. 1. Kultivierung von THP-1-Zellen und U937-Zellen

Die Kultivierung der humanen monozytären THP-1-Zellen (Tsuchiya *et al.* 1980) und von U937-Zellen (Sundström *et al.* 1976) erfolgte in Kulturmedium bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre in einem Brutschrank bei einer Zelldichte von 5–10 x 10⁵ Zellen/ml. Die Suspensionszellen wurden alle 2–3 Tage mit frischem Medium versorgt und maximal 4 Wochen in Kultur gehalten und für die Experimente genutzt.

II. 2. 1. 2. Kultivierung von CHO-Zellen

Die Kultivierung dieser adhärenen epithelialen Zelllinie (Tjio *et al.* 1958) erfolgte in Kulturmedium bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre in einem Brutschrank. Nach der Ausbildung eines lückenlosen Zellrasens wurden die Zellen abgelöst, 1:4 verdünnt und wieder neu ausgesät. Dazu wurden sie einmal mit DPBS gespült, bis zu ihrer Ablösung mit 2–4 ml einer 0,05% Trypsin/0,02% EDTA-Lösung bedeckt und anschließend mit 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden maximal 4 Wochen in Kultur gehalten und für die Experimente verwendet.

II. 2. 1. 3. Zellzahlbestimmung

Gleiche Volumina einer Zellsuspension und einer 0,05%igen Trypanblau – Lösung wurden gemischt und 2 µl davon zur Auszählung in einer Neubauer–Zählkammer eingesetzt. Aus 4 x 16 ausgezählten Kleinquadraten (= 4 Großquadrate) errechnet sich die Zellzahl wie folgt, wobei die Zahl 80 dem Kammerfaktor entspricht:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 80$$

II. 2. 1. 4. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen für 10 min bei 170 x g zentrifugiert und das Zell–Pellet in 4°C–gekühltem Einfriermedium in einer Dichte von 1 x 10⁶ Zellen/ml resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurden in Kryoröhrchen in einem Cryo–Freezing–Container bei –80°C eingefroren und anschließend im Kühlschrank bei –80°C gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen im Kryoröhrchen langsam in warmem Wasser erwärmt und anschließend im jeweiligen Kulturmedium resuspendiert und in Kulturflaschen ausgesät, wobei das Kulturmedium nach 24 Std. erneuert wurde.

II. 2. 2. Transfektion

II. 2. 2. 1. Transfektion von CHO–Zellen

CHO–Zellen wurden, wie oben beschrieben, bis zur Ausbildung eines lückenlosen Zellrasens kultiviert. Am Tag der Transfektion wurden die CHO–Zellen mit DPBS gewaschen, bevor neues MEM–α–Medium ohne FBS und ohne Antibiotika substituiert wurde. Die Zellen wurden mit 1.3µg/ml Plasmid (pcDNA3–Dynamin–K44A) mittels FuGene 6 Transfektion Reagenz transfiziert, und zwar nach den Vorschriften des Herstellers. Nach einer 24–stündigen Inkubation mit dem FuGene/Plasmid–Gemisch wurde das Präzipitat entfernt, und die Zellen vor jedem Experiment für weitere 5 Tage kultiviert.

II. 2. 3. Isolierung von Zellen und MP aus zirkulierendem Blut

II. 2. 3. 1. Blutentnahme

Eine Einverständniserklärung der Blutspender wurde in Übereinstimmung mit dem Helsinki Protokoll eingeholt. Venöses Vollblut wurde von gesunden Spendern (Alter 23–45 Jahre) aus einer peripheren Vene (Cubitalvene) unter der Voraussetzung gewonnen, dass innerhalb der letzten 14 Tage keine gerinnungsbeeinflussenden Medikamente eingenommen worden waren.

Nach Hautdesinfektion und Punktion der Vene wurde das Blut in mit Tri-Natriumzitat (Endkonzentration 0.38%) und Hirudin (1µg/ml) gefüllte Kunststoffspritzen überführt.

II. 2. 3. 2. Isolierung humaner Thrombozyten aus zirkulierendem Blut

Das entnommene venöse Vollblut wurde auf je 10 ml Reagenzgläser aus Kunststoff verteilt und umgehend aufgearbeitet. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 268 x g wurde das thrombozytenreiche Plasma vorsichtig abgenommen, mit 1µl/ml Iloprost und 4µl/ml Apyrase als Thrombozytenaggregationshemmer versehen und 10 min bei 268 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Plättchenpellet in Thrombozytenwaschpuffer resuspendiert, erneut für 10 min bei 268 x g zentrifugiert und schließlich in Resuspension aufgenommen.

II. 2. 3. 3. Isolierung von Monozyten aus zirkulierendem Blut

Monozyten wurden unter Endotoxin-freien Konditionen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation und anschließender Aufreinigung mit anti-CD 14 Antikörpern isoliert.

Das entnommene venöse Vollblut wurde für 15 min bei 180 x g zentrifugiert und anschließend der leukozytenreiche buffy coat vorsichtig abgenommen. Danach wurde die Leukozytensuspension verdünnt (1:3 mit PBS) und anschließend langsam auf Überschichtung über 15 ml Ficoll Paque (Dichte 1.077 g/cm³) überschichtet. Daraufhin wurde für 25 min bei 280 x g zentrifugiert und die Interphase entnommen, in welcher sich aufgrund des Dichtegradienten die monozytären Zellen ansammeln. Danach erfolgte die Verdünnung mit Monozyten- Waschpuffer (30 ml), das Waschen

der Zellsuspension (10 min, 210 x g) und die Resuspension des Zellpellets in 1 ml Antikörper-Puffer. Anschließend wurde die Zellsuspension mit magnetischen Microbeads inkubiert, welche mit Antikörpern gegen das monozytäre Oberflächenmolekül CD14 beschichtet sind (15 min, 4°C). Die letztendliche Isolierung der Monozyten erfolgte nun mittels selektiver Zellseparations-Magnetsäulen (Mini Macs) durch Elution der Monozyten mit Antikörper-Puffer. Daraufhin erfolgte das Spülen der Säule mit 3 x 1 ml Antikörper – Puffer, das Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld und das Spülen mit 3 x 2 ml Antikörper-Puffer. Schließlich wurde die Monozyten-Suspension für 10 min bei 210 x g zentrifugiert und das Zellpellet in Resuspuffer aufgenommen.

II. 2. 3. 4. Bestimmung der Zellzahl, Reinheit und Zellviabilität

Alle Zellpräparationen wurden direkt nach der Isolation unter dem Lichtmikroskop auf ihre Reinheit geprüft. Mittels Trypanblaufärbung wurde die Viabilität getestet und die Zellanzahl, wie oben beschreiben, in der Neubauerzählkammer bestimmt.

II. 2. 4. Isolierung von Mikropartikeln

II. 2. 4. 1. Isolierung von Mikropartikeln aus Monozyten

Vorversuche mittels Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting-FACS) zeigten, dass 3×10^6 LPS-stimulierte Monozyten ca. 1×10^6 monozytäre Mikropartikel in den Extrazellulärraum abgeben. Nach mehreren Vorversuchen zeigte sich, dass diese MP-Bildung v.a. am Ende der Stimulationszeit stattfindet, so dass jeder Ansatz mit 3×10^6 Monozyten mit 10µg/ml LPS für 16 Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Die Inkubation erfolgte in PBS.

Die stimulierten Monozyten wurden anschließend für 15 min bei 3215 x g zentrifugiert und der Überstand in 250µl-Anteilen in lichtdichte, rote Eppendorf-Tubes überführt. Durch zweifache Zentrifugation bei 17740 x g für 30 min wurden die Mikropartikel gewonnen und für die weiteren Versuche in 100µl Resuspuffer aufgenommen.

II. 2. 4. 2. Isolierung von Mikropartikeln aus THP-1-Zellen

Analog zu den Monozyten wurde für die monozytäre Vorläuferzelllinie THP-1 MP-Bildung nach Stimulation durch LPS beschrieben (Hall *et al.* 1999). FACS-Messungen zeigten, dass 3×10^7 LPS-stimulierte THP-1-Zellen ca. 1×10^7 THP-1-spezifische MP abgeben. So wurden, wie oben beschrieben, Ansätze mit 3×10^7 THP-1-Zellen mit $10 \mu\text{g/ml}$ LPS für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte in HBSS-Medium. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert wie unter II. 2. 4. 1. beschrieben.

II. 2. 4. 3. Isolierung von MP aus U937-Zellen

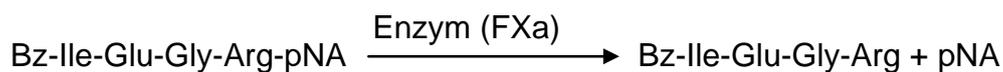
Die Isolierung von MP aus U937-Zellen erfolgte analog derjenigen für THP-1-Zellen (II. 2. 4. 2.).

II. 2. 4. 4. Isolierung von zirkulierenden MP

Peripher-venöses Blut von gesunden Spendern wurde innerhalb der Spritze mit Tri-Natriumzitat (0.38% Endkonzentration) und $1 \mu\text{g/ml}$ Hirudin versetzt. Das entnommene Vollblut wurde unverzüglich aufgearbeitet und für 15 min bei $268 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand (= plättchenreiches Plasma) wurde abgenommen und mit $1 \mu\text{l/ml}$ Iloprost als Thrombozytenaggregationshemmer versetzt. Nach Zentrifugation für 20 min bei $1430 \times g$ wurde der Überstand abgenommen und erneut für 20 min bei $1430 \times g$ zentrifugiert. Nach Zentrifugation des abgenommenen Überstandes (= MP-reiches Plasma) für 30 min bei $17750 \times g$, wurde das MP-Pellet in PBS gewaschen und erneut für 30 min bei $17750 \times g$ zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme des MP-Pellets in der Resuspension.

II. 2. 5. Faktor Xa-Bildung

Die funktionelle TF-Aktivität kann mittels eines zweistufigen Assays über die Bildung des Gerinnungsfaktors Xa bestimmt werden. Dieser spaltet sein physiologisches Substrat Prothrombin an 2 verschiedenen Stellen, welchen beiden eine Sequenz aus den gleichen 4 Aminosäuren vorausgeht. Ebenso spaltet FXa das chromogene Substrat S-2222 (= N-Benzyl-L-Isoleuzin-L-Glutaminsäure-Glycin-L-Arginin-p-Nitroanilin), welches aus eben jenen 4 Aminosäuren besteht. Reaktionsprinzip:



Die Methode zur Aktivitätsbestimmung des Faktors Xa basiert auf der Differenz in der Absorption (optische Dichte) zwischen dem freigesetzten pNA und dem Originalsubstrat. Die Menge der pNA-Freisetzung und damit die Steigerung der Absorption pro Sekunde (405 nm) ist proportional zur Enzymaktivität und wird mit einem Photometer gemessen.

Isolierte Thrombozyten (1.5×10^7 in 50 μ l, Dreifachbestimmung) wurden entweder für 5 min bei 37°C mit zMP (MP aus 20ml VB pro Ansatz) oder tMP (1×10^6 MP) inkubiert, mit oder ohne Aktivierung durch Kollagen (Endkonzentration 12 μ g/ml). In parallelen Versuchsansätzen wurden sowohl isolierte Thrombozyten (1.5×10^7 in 50 μ l, Dreifachbestimmung) als auch isolierte zMP (MP aus 20ml VB pro Ansatz) oder tMP (1×10^6 MP) für 5 min bei 37°C mit Kollagen (Endkonzentration 12 μ g/ml) inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation gewaschen (268 x g) und anschließend in Resuspensionspuffer aufgenommen. Als Kontrollen dienten Ansätze, die nur aus isolierten Thrombozyten (1.5×10^7 in 50 μ l, Dreifachbestimmung), isolierten zMP (MP aus 20ml VB pro Ansatz) oder isolierten tMP (1×10^6 MP) bestanden.

Die Proben (50 μ l), sowie je 50 μ l einer Konzentrationsreihe mit Thromborels wurden in eine mit 50 μ l CaCl₂ (8mM) bestückte 96-well-Mikrotiterplatte gefüllt, und nach Zugabe von Beriplex (Gemisch aus den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X, Endkonzentration 0.4ng/ μ l) und des chromogenen Substrates S-2222 (Endkonzentration 13.5 nM) erfolgte die Messung der optischen Dichte über einen

Zeitraum von 30 min, in 5 aufeinanderfolgenden 360–Sekunden–Intervallen in einem ELISA–Reader (Dynatech MR 7000).

II. 2. 6. pH–Messung

II. 2. 6. 1. *pHi* (= *intra–MP pH*) –Messungen

Der intramikropartikuläre pH wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie gemessen, und zwar mit Hilfe des pH–sensitiven Fluoreszenzfarbstoffs 2',7'–bis(2–carboxy–ethyl)–5(und–6)–carboxyfluorescein, Azetoxymethylester (BCECF–AM).

Die Fluoreszenzexcitationsspektren (λ_{ex} , 490nm und 440nm) wurden bei 516nm–Emission (slits bei 10 x 20 nm) im Fluoreszenzspektrofluorophotometer gemessen (Spectrofluorophotometer RF–5001 PC, Shimadzu, Kyoto, Japan).

Die Messungen wurden an MP durchgeführt, die mit BCECF–AM gefärbt waren. Zur Beladung der Mikropartikel mit BCECF wurde das Prinzip der Ionenfalle angewendet. Das Molekül BCECF trägt vier polare Carboxylgruppen, weswegen es schlecht über biologische Membranen permeieren kann. Durch Bindung an einen Azetoxymethylester wird ein unpolares Molekül hergestellt, welches die Zellmembran überqueren kann. BCECF–AM selbst fluoresziert kaum, wird aber, sobald er innerhalb der Zellmembran ist, in die fluoreszierende Form der freien Säure, BCECF, hydrolysiert, was entweder über zelluläre Esterasen oder mittels pH–abhängiger Hydrolyse geschieht (Draper *et al.* 1997; Hirohashi *et al.* 1997; Allen *et al.* 1990).

Die Isolierung von MP aus Monozyten respektive THP–1–Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Für die letzten 30 min der Inkubationszeit mit LPS wurde im Dunkeln 16µM BCECF–AM zugegeben und die Probe bei 37°C inkubiert.

Jede Versuchsprobe, die aus isolierten zirkulierenden MP bestand, wurde in ein lichtdichtes, rotes Eppendorf–Tube überführt und für 30 min bei 37°C mit 16µM BCECF inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 30 min bei 17750 x g zentrifugiert, das MP–Pellet in PBS gewaschen, erneut für 30min bei 17750 x g zentrifugiert, in Resuspension aufgenommen und schließlich mit verschiedenen Zelllinien je nach Versuchsansatz inkubiert.

II. 2. 6. 2. pHi – Messungen nach Inkubation der MP mit verschiedenen Zelllinien

BCECF–markierte MP wurden bei 37°C mit verschiedenen Zelllinien für unterschiedliche Zeiten im jeweils relevanten Kulturmedium inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in eine Quartzglas–Küvette überführt. Die Glasküvette wurde vor jeder Messung mit 70%igem Ethanol gereinigt und anschließend mit A. bidest gespült. Der in das Spektrofluorophotometer integrierte Küvettenhalter war mit einem magnetischen Rührfisch ausgestattet und konnte auf 37°C thermoreguliert werden, so dass der gesamte Versuchsaufbau bei einer konstanten Temperatur von 37°C durchgeführt wurde. Jede Probe wurde vor der Messung kurz (60 s) auf 37°C erwärmt.

Der pH–sensitive Fluoreszenzfarbstoff BCECF wurde alle 20 s durch kurze (~ 1 s) alternierende Lichtimpulse mit den Wellenlängen 490 nm (pH–sensitiv) und 440 nm (pH–insensitiv) angeregt. Charakteristisch für BCECF ist, dass die Emissionsintensität, gemessen bei 516 nm, bei Anregung mit einem Licht der Wellenlänge von 440 nm pH–unabhängig ist, was als isosbestischer Punkt bezeichnet wird. Wird BCECF aber mit Licht der Wellenlänge 490 nm angeregt, so ist die Intensität des emittierten Lichts pH–abhängig. Wird nun der Farbstoff in unmittelbarer Abfolge von Licht mit jeweils 440 nm und 490 nm angeregt, so kann man die emittierten Intensitäten als Quotient angeben. Der intramikropartikuläre pH ist nun proportional zu diesem Quotienten.

$$\text{pHi} = \frac{\text{Fu490}}{\text{Fu440}}$$

Fu490 = Exzitation bei 490 nm, gemessene Emission bei 516 nm, Fluoreszenzintensität

Fu440 = Exzitation bei 440 nm, gemessene Emission bei 516 nm, Fluoreszenzintensität

Durch diese Quotientenbildung mit den pH-unabhängigen Emissionen wird es ermöglicht, Artefakte wie z. B. das Ausbleichen des Farbstoffs auszuschließen.

Die genannte Methode der intrazellulären pH-Messung ist für verschiedene Zellen gut etabliert, z.B. an Thyreozyten (Vilella *et al.* 2003), Oozyten (Dale *et al.* 1998), Magendrüsenzellen (Paradiso *et al.* 1984), Neuronen (Mulkey *et al.* 2003), CHO – Zellen (Ozkan *et al.* 2002) und grampositiven (Molenaar *et al.* 1991) und gramnegativen Bakterien (van Veen *et al.* 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode erstmals zur pH-Messung in MP benutzt.

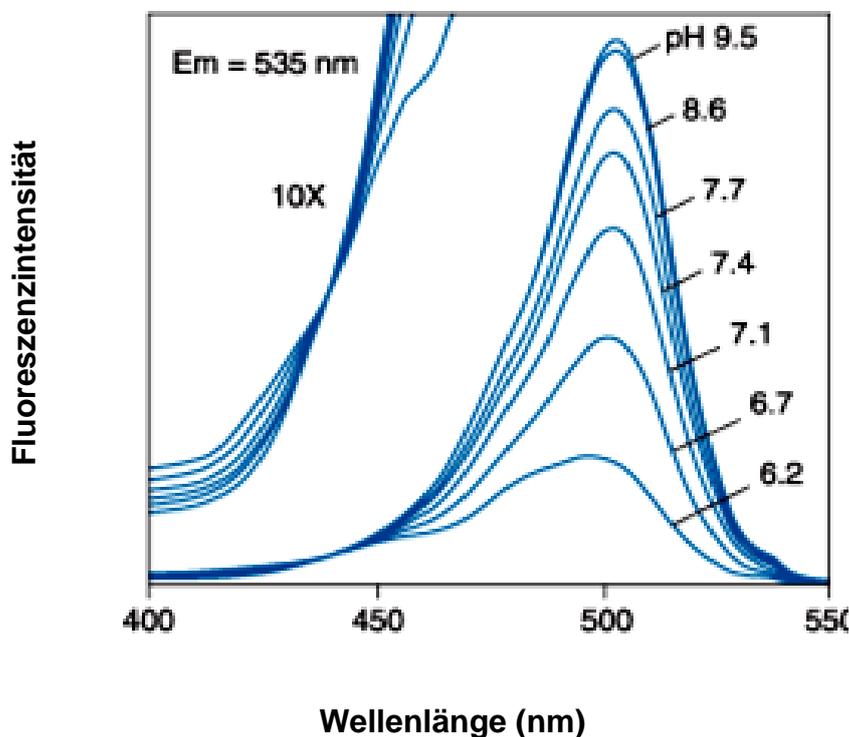


Abb. 4 pH-abhängiges Exzitations-Spektrum der Fluoreszenz von BCECF.

Die linke Kurve zeigt bei 10-facher Vergrößerung den isosbestischen Punkt bei 440 nm. Die Fluoreszenz-Intensität ist bei einer emittierten Wellenlänge von 535 nm dargestellt. In unseren Registrierungen wurde die Fluoreszenz-Intensität bei 516 nm gemessen.

II. 2. 6. 3. Kalibrierungskurven zur pHi-Messung

Zur Kalibrierung wurde die Kalium–Nigericin–Methode benützt. Vor jedem Experiment wurden BCECF–markierte MP in 3ml Kalibrierungspuffer suspendiert. Zugabe von 10µM Nigericin löste einen raschen Ausgleich von extra- und intramikropartikulärem pH aus, da Nigericin als ein Ionophor den Austausch von monovalenten Kationen über biologische Membranen hinweg katalysiert. Falls ein einzelnes Kation vorherrscht, wird dieses Kation gegen H⁺ ausgetauscht (Eisenman et al. 1973, Harold et al. 1974), z.B. internes Kalium gegen externe Wasserstoffionen.

Diese Kalibrierung wurde in einem Puffer durchgeführt, der ungefähr die intrazelluläre Kaliumkonzentration aufweist, so dass nicht der Kaliumgradient über der MP–Membran zur Ausbildung eines pH–Gradienten führte. Nach mehreren Vorversuchen stellte sich die Zusammensetzung des Kalibrierungspuffers aus 10mM Hepes, 140mM KCl, 1mM MgCl₂ in PBS als optimal für unsere Versuche heraus.

Die Nigericin–MP–Suspension wurde für 15 min bei 37°C äquilibriert, bevor der pH mittels einer Glaselektrode (gefüllt mit 3M KCl) gemessen wurde. Nun wurde der extramikropartikuläre pH der Lösung mittels Zugabe kleiner Mengen von HCl bzw. NaOH verändert und mittels Nigericin folgte der pHi dieser pH–Veränderung. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal gemessen, nachdem die Lösung in eine mittels Magnetfisch gerührte Küvette überführt worden war, und diese für 60 s im Küvettenhalter wiedererwärmt worden war. Dieser Vorgang wurde für 8 pH–Werte über den Bereich von 5.60–7.70 wiederholt und somit eine Kalibrierungskurve erstellt, wo der pHi versus die Emissions–Ratio F490/F440 aufgetragen wurde.

Der gesamte Kalibrierungsvorgang fand abgeschirmt von Licht und im Wasserbad bei 37°C statt.

II. 2. 6. 4. Auswertung und Statistik

Die in dieser Arbeit aufgeführten Werte sind als Mittelwert mit Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. Die Mittelwerte ergeben sich aus den Mittelwerten der einzelnen Versuche.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software Sigma Stat™ (Jandel Cooperation, St. Rafael, CA, USA), die Gruppen wurden, je nach Versuchsaufbau, mittels ANOVA (für multiple Vergleiche) oder t-Test verglichen. Differenzen von $*p < 0.05$ werden als signifikant angesehen.

II. 2. 7. Konfokale Laserscanmikroskopie

Der Vorteil der Laserscanmikroskopie (LSM) liegt darin, dass Fluorophore selektiv in einer einzigen optischen Ebene der Probe erfasst werden können. Durch Verschieben der Fokusebene entstehen verschiedene optische Schnittbilder, welche anschließend mit geeigneter Software zu einer dreidimensionalen Darstellung zusammengesetzt werden können. Durch Lochblenden werden die Signale, die nicht aus der Fokusebene stammen, ausgeblendet und somit nicht registriert (Abb. 5).

Durch den ihr spezifischen Strahlengang ermöglicht somit die LSM nicht nur die Erfassung der relativ kleinen MP, sondern durch die Möglichkeit der dreidimensionalen Schnittbilddarstellung auch Aussagen über die Lokalisation der fluoreszenzmarkierten MP. In der vorliegenden Arbeit war hierbei eine zentrale Fragestellung, ob die MP an die Zellmembran der Thrombozyten binden oder in die Thrombozyten internalisiert werden können.

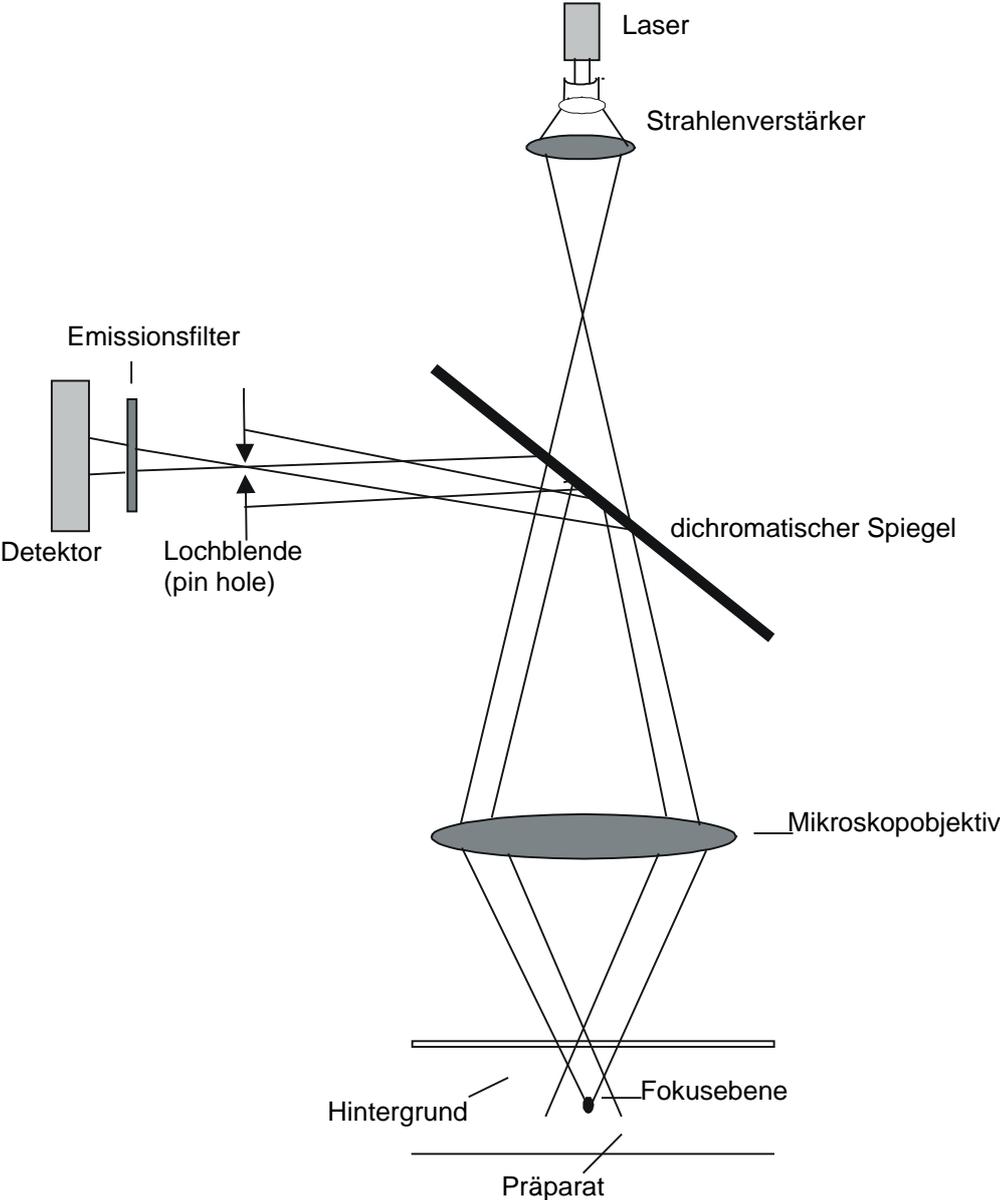


Abb. 5 Schematische Darstellung der Funktionsweise der Laserscanmikroskopie

II. 2. 7. 1. Inkubation von MP mit ruhenden Thrombozyten

MP wurden entweder aus den Überständen LPS-stimulierter THP-1-Zellen oder U-937-Zellen isoliert und mit DCF markiert. Hierfür wurden pro MP-Ansatz 2µl DCF zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Proben noch einmal gewaschen wurden und in Resuspension aufgenommen wurden. Danach wurden die MP isoliert (II. 2. 4. 2. und II. 2. 4. 3.).

Parallel wurden Thrombozyten aus peripher-venösem Blut gesunder Spender isoliert. Durch Zugabe von Apyrase und Iloprost wurde sichergestellt, dass die Thrombozyten nicht während des Isolierungsprozesses aktiviert wurden. Die aus 20ml VB erhaltenen Thrombozytenpellets wurden in 800µl Resuspuffer aufgenommen und 4µl Vybrant DiD zugegeben. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Fluorophor für 15 min bei 37°C unter Lichtabschluss inkubiert und anschließend gewaschen. Zeitgleich wurden Fibrinogen-gecoateten Fluorodishes hergestellt. Dazu wurden 0.5 ml der Stammlösung mit 0.5 mg/ml Fibrinogen in PBS in die Mitte eines Fluorodishes gegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Fluorodish zweimal mit jeweils 1ml PBS gespült.

1×10^7 MP wurden mit 5×10^6 Thrombozyten inkubiert. Die Proben wurden für 30 min oder 60 min bei 37°C in einem lichtdichten Eppendorf-Tube im Wasserbad inkubiert und anschließend zweimal gewaschen, bevor sie auf die gecoateten Fluorodishes gegeben wurden. Alternativ erfolgte die Inkubation der Proben direkt auf den gecoateten Fluorodishes im Brutschrank für 30 min bei 37°C. Anschließend wurden die Fluorodishes zweimal mit jeweils 1 ml PBS gespült. Daraufhin wurde 0.5 ml PBS auf das Fluorodish gegeben, um ein Austrocknen der Probe zu verhindern.

II. 2. 7. 2. Inkubation von MP mit aktivierten Thrombozyten

Die Isolierung und Markierung von tMP, uMP und Thrombozyten erfolgte wie oben beschrieben. Den isolierten Thrombozyten wurden MP zugegeben und anschließend die Suspensionen mit 12µg/ml Kollagen oder 10µM ADP stimuliert. In einigen Ansätzen wurde Tirofiban in einer ansteigenden Konzentrationsreihe zu den isolierten Thrombozyten gegeben, bevor die MP zugegeben wurden und die Mischung anschließend mit 12µg/ml Kollagen oder 10µM ADP stimuliert wurde.

III. Ergebnisse

III. 1 Prokoagulatorische Aktivität in Gemischen aus MP und Thrombozyten

Um festzustellen, inwieweit Thrombozyten und TF-haltige MP funktionell miteinander interagieren, wurde zunächst die Faktor Xa-Bildung in Suspensionen aus isolierten Thrombozyten und isolierten MP durchgeführt. Nach Inkubation der MP mit ruhenden Thrombozyten war die Faktor Xa-Bildung vergleichbar mit derjenigen der Thrombozyten alleine. Hingegen bewirkten die MP in Anwesenheit aktivierter Thrombozyten eine deutliche Steigerung der prokoagulatorischen Aktivität (Abb. 6).

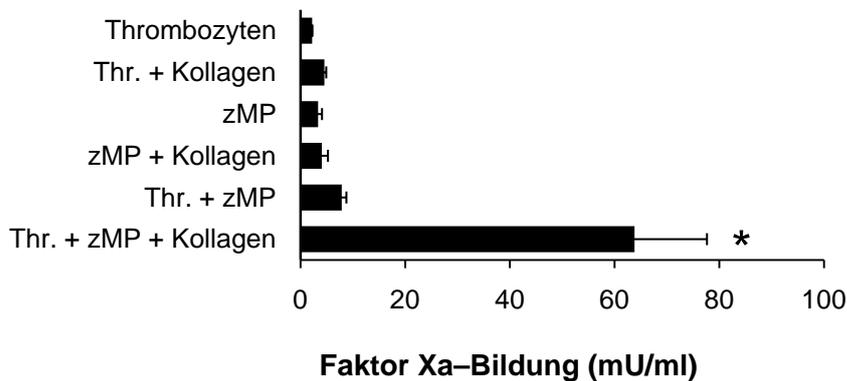


Abb. 6 Faktor Xa-Bildung in Gemischen aus MP und Thrombozyten

1.5×10^7 Thrombozyten wurden mit 1×10^7 tMP respektive zMP aus 20ml VB für 5 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit oder ohne Kollagenstimulierung die FXa-Bildung gemessen. n = 3-7, Mittelwerte +/- SD, *p<0.05 vs. Kontrolle (Thr + zMP ohne Kollagen)

III. 2. Internalisierung von MP in Thrombozyten

III. 2. 1. Kalibrierungskurven

Um die MP-Aufnahme in die Thrombozyten zu erfassen, entwickelten wir eine pH-sensitive Methode, mit deren Hilfe von den pH - Veränderungen in den MP auf die MP-Aufnahme in Zellen geschlossen werden kann. Zunächst wurde vor jedem Experiment eine Kalibrierungskurve für die BCECF-Fluoreszenz mit der BCECF-AM-Nigericin-Methode hergestellt (vgl. II. 2. 6. 3.), und zwar jeweils für 3 verschiedene Arten von MP: (i) tMP mit hoher TF-Expression, die aus THP-1-Zellen isoliert wurden (Abb. 7a). (ii) TF-positive mMP, die aus Monozyten isoliert wurden

(Abb. 7b). (iii) zMP, d.h. MP, die im Vollblut von gesunden Spendern zirkulieren und sowohl TF-positive MP als auch TF-negative MP beinhalten (Abb. 7c).

Dabei zeigte sich, dass die zur Ermittlung des pH-Wertes bestimmte Fluoreszenz-Ratio in einem Bereich zwischen pH 6.5 bis 7.4 weitgehend eine lineare Abhängigkeit von dem intravesikulären pH aufwies. Daher konnten diese Kalibrierungskurven zur Auswertung und Analyse der nachfolgenden Experimente verwendet werden.

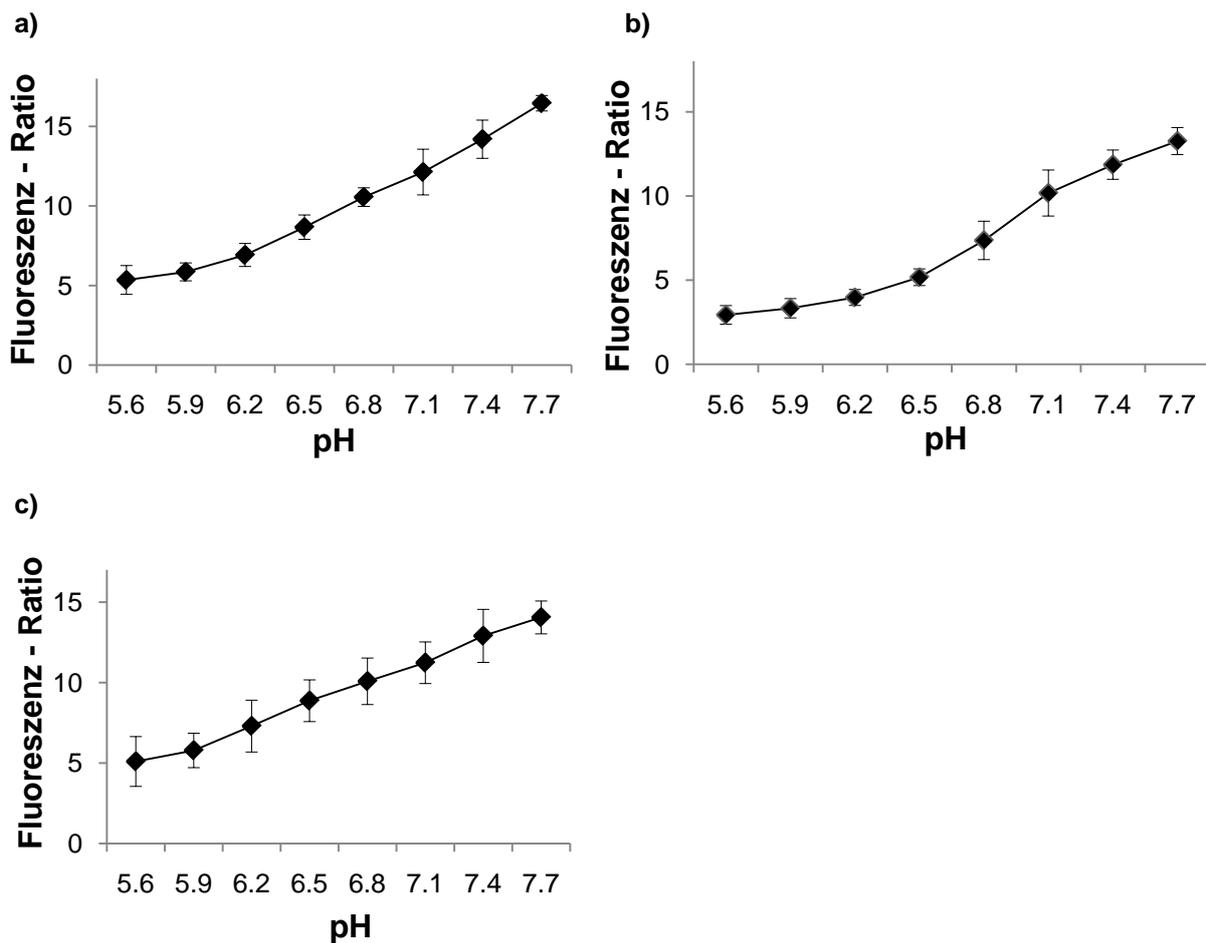


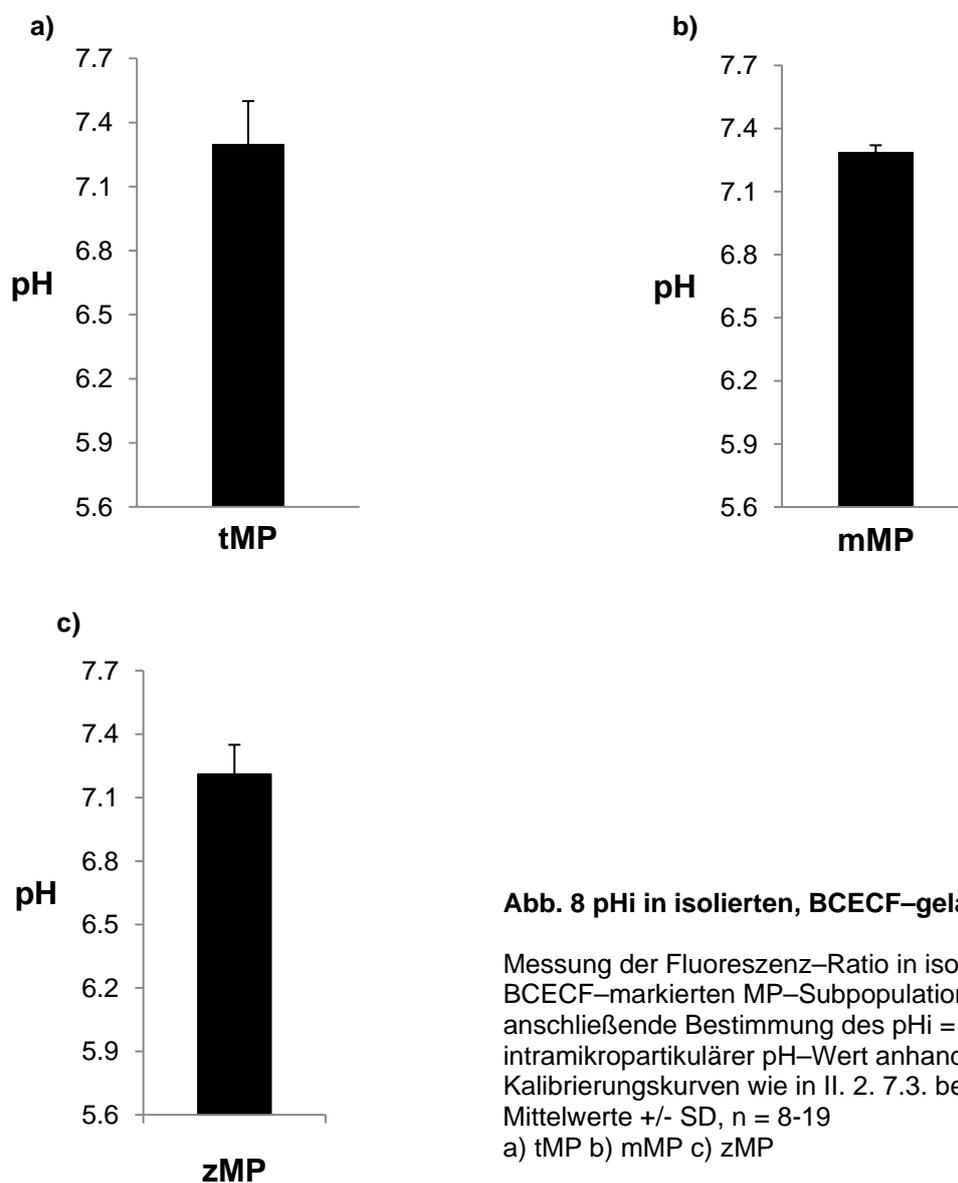
Abb. 7 Kalibrierungskurven für BCECF-gelabelte MP mit Hilfe der Kalium-Nigericin-Methode.

Dargestellt ist der pH-Wert versus die Fluoreszenz-Ratio, entsprechend dem Quotienten Fu_{490}/Fu_{440} (Emission gemessen bei 516 nm, Exzitation bei 490 nm bzw. 440 nm). Der detaillierte Versuchsaufbau ist II. 2. 7. 3. zu entnehmen.

- a) tMP, Mittelwerte \pm SD, n = 7-15
- b) mMP, Mittelwerte \pm SD, n = 3-8
- c) zMP, Mittelwerte \pm SD, n = 3-7

III. 2. 2. Messung von pHi in isolierten MP

Als erster Schritt wurde der physiologische pH-Wert der isolierten MP bestimmt (pHi). tMP, mMP und zMP wurden isoliert, mit BCECF gelabelt, in 3 ml Resuspuffer gelöst und in Quartzglasküvetten überführt. Nach Erwärmung der Probe auf 37°C für 60 s im Küvettenhalter, wurde die Fluoreszenzemission der Probe gemessen. Anhand der in Abb. 7 dargestellten Kalibrierungskurven wurde sodann der pHi mittels der Fluoreszenz-Ratio bestimmt. Der intramikropartikuläre pH liegt bei allen 3 Subpopulationen bei pH 7.2 (Abb. 8).



III. 3. Internalisierung Fluoreszenz-markierter MP in verschiedene Zelllinien

III. 3. 1. pHi-Messung nach Inkubation mit CHO-Zellen

Zuerst wurden TF-haltige tMP für verschiedene Zeitintervalle mit CHO-Zellen inkubiert. Wir inkubierten 3.5×10^4 CHO-Zellen mit 1×10^7 tMP im Dunkeln für 5, 15, 30, 45 und 60 Min. bei 37°C. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Resuspensionpuffer gewaschen, bevor die Probenansätze in Quartzküvetten überführt wurden und die Fluoreszenz-Ratio gemessen wurde. Die Nullkontrolle entspricht einer Probe, bei der CHO-Zellen mit tMP zusammengegeben wurden und direkt anschließend gewaschen wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass der intravesikuläre pH nach 60 Min. signifikant abnimmt (Abb. 9).

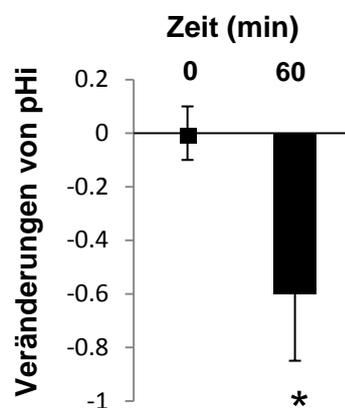


Abb. 9 Messung von pHi in tMP nach Inkubation mit wt CHO-Zellen.

Mittelwerte +/- SD, n = 3-5, *p<0.05 vs. Kontrolle

Wir vermuteten, dass dieser pH-Abfall bedeuten könnte, dass CHO-Zellen die MP via Endozytose internalisieren. In der Tat ist zu erwarten, dass der pH abnimmt, wenn die aufgenommenen MP mit endosomalen bzw. lysosomalen Kompartimenten fusionieren, die einen niedrigeren pH-Wert aufweisen als die MP selbst.

Um diese Hypothese zu testen wurden die CHO-Zellen mit der Dynamamin-Mutante pcDNA3-Dynamamin-K44A transfiziert, die sowohl die Clathrin-abhängige (van der Bliek *et al.* 1993) als auch die Caveolae-induzierte Endozytose hemmt (Henley *et al.* 1998, Dessy *et al.* 2000). Erneut wurden 3.5×10^4 CHO-Zellen mit 1×10^7 tMP im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Hierbei wurde kein pH-Abfall nach 60 Min. beobachtet (Abb. 10).

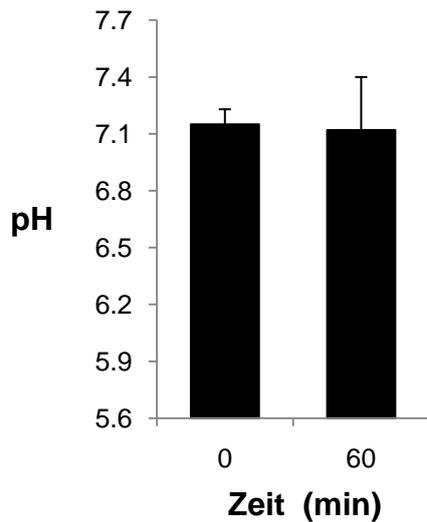


Abb. 10 Messung von pHi in tMP nach Inkubation mit CHO-Zellen, welche mit pcDNA3-Dynamin-K44A transfiziert wurden.

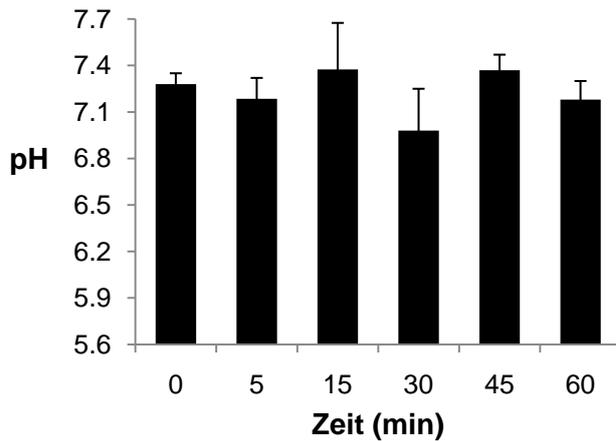
Mittelwerte +/- SD, n = 3-5

III. 3. 2. pHi-Messung in mit ruhenden Thrombozyten inkubierten MP

Um die MP-Internalisierung in die Thrombozyten zu ermitteln, wurden als nächstes 1×10^7 BCECF-gelabelte tMP mit 1×10^5 ruhenden Thrombozyten aus venösem Blut gesunder Spender inkubiert. Wieder wurde der pH-Abfall als Indikator für die MP-Aufnahme in die Zelle angesehen.

Um eine etwaige Aktivierung der Thrombozyten durch die MP zu hemmen, wurde den Plättchensuspensionen Iloprost zugefügt. Die Ergebnisse zeigen, dass es hierbei zu keinem pH-Abfall kommt und daher keine MP-Aufnahme in ruhende Thrombozyten nachweisbar ist (Abb 11).

a)



b)

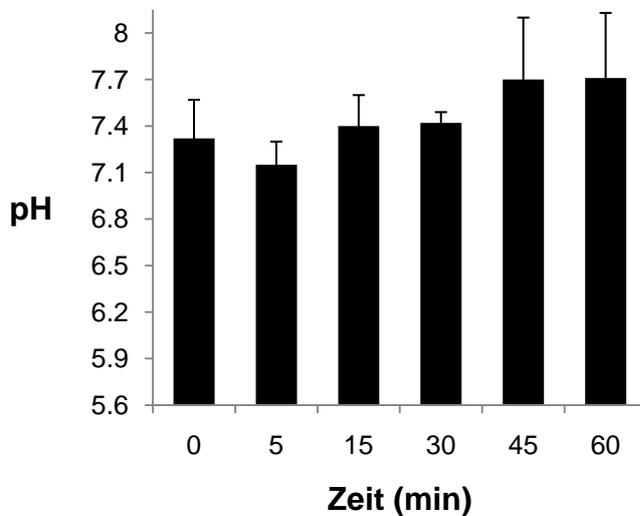


Abb. 11 Messung von pH_i in MP, welche mit nicht-aktivierten Thrombozyten inkubiert wurden.

Inkubation von MP mit isolierten Thrombozyten nach Zugabe von Iloprost (1ng/ml).

a) tMP, Mittelwerte \pm SD, n = 3-5

b) mMP, Mittelwerte \pm SD, n = 3-6

III. 3. 3. pH_i -Messung in mit aktivierten Thrombozyten inkubierten MP

Im nächsten Schritt wurden isolierte Thrombozyten mit 10 μ M ADP stimuliert, bevor die TF-haltigen MP (tMP oder mMP) zu den Zellen gegeben wurden.

Die Plättchenaktivierung mittels ADP führt zu einem schnellen Calcium-Einstrom und Mobilisierung von Calcium aus Speichern (Wilde *et al.* 2000), Inhibierung der

Adenylatzyklase (Mellwig *et al.* 1980), Plättchenaggregation (Gachet *et al.* 2001) und einem Formwandel. Hierbei wurde beobachtet, dass nach Inkubation der Thrombozyten mit tMP der intravesikuläre pH nach 45 und 60 Min. deutlich abfiel (Abb. 12 a). Nach Inkubation mit mMP war bereits nach 15 Min. eine signifikante Reduktion des pH-Wertes zu erkennen (Abb. 12 b).

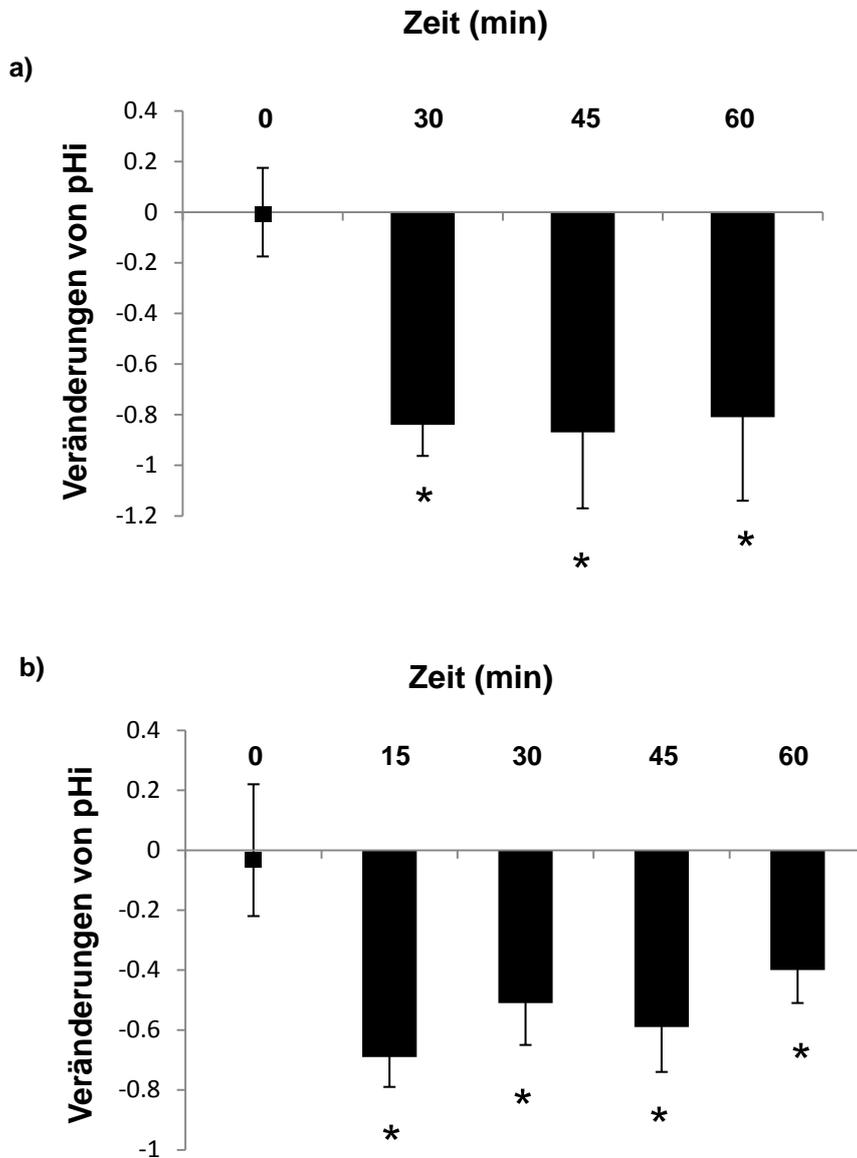


Abb. 12 Messung von pHi in MP nach Inkubation mit aktivierten Thrombozyten.

Inkubation von MP mit isolierten Thrombozyten nach Zugabe von ADP (10 μ M).

a) tMP, Mittelwerte \pm SD, n = 8-18, *p<0.05 vs. Kontrolle
b) mMP, Mittelwerte \pm SD, n = 8-14, *p<0.05 vs. Kontrolle

III. 3. 4. Nachweis der Internalisierung von MP in Thrombozyten mittels konfokaler Laserscanmikroskopie (LSM)

Um die Internalisierung der MP in die Thrombozyten zu visualisieren und um nachzuweisen, in welchen Kompartimenten des Thrombozyten die MP sich nach der Internalisierung befinden, wurden parallele Experimente mittels konfokaler LSM durchgeführt. 1×10^7 DCF-markierte MP (Abb. 13) wurden zunächst mit 5×10^6 Vybrant DiD-markierten ruhenden Thrombozyten (Abb. 14) inkubiert.

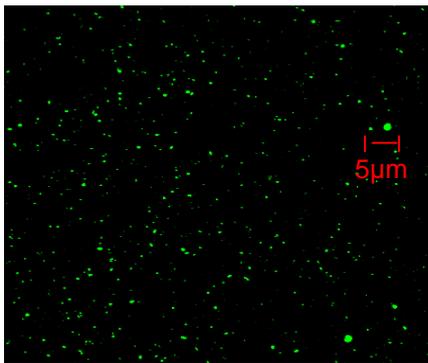
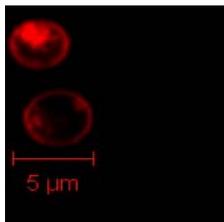


Abb. 13 LSM. Markierung der Membran isolierter tMP mit DCF.

Isolierung von tMP wie in II. 2. 4. 2. beschrieben. Zugabe von 2 μ l DCF pro MP-Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließende Darstellung der gelabelten-MP mittels konfokaler LSM.

a)



b)

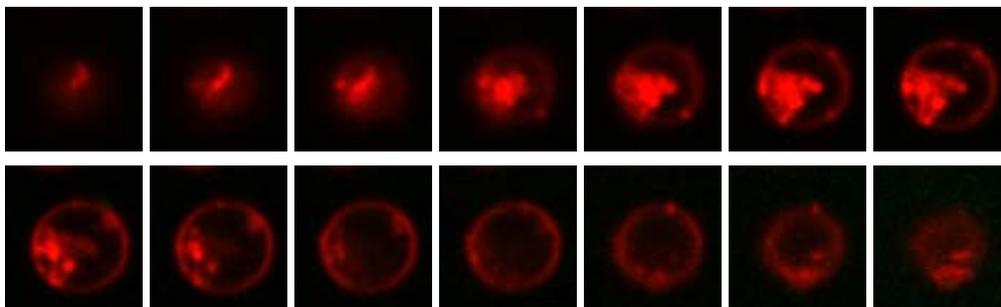


Abb. 14 LSM. Markierung der Plasmamembran ruhender Thrombozyten mit Vybrant DiD

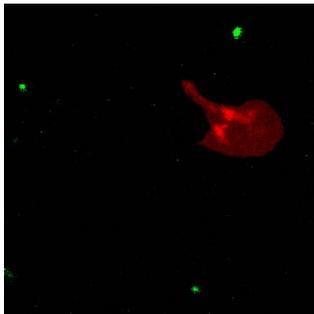
Thrombozyten wurden unter Zugabe von Apyrase und Iloprost isoliert. Anschließend wurden 4 μ l Vybrant DiD pro 800 μ l Zellsuspension zugegeben wie in II. 2. 7. 1. beschrieben. Darstellung einzelner ruhender Thrombozyten auf einem Fibrinogen-gecoateten Fluorodish mittels konfokaler LSM.

a) Zwei benachbart lokalisierte ruhende Thrombozyten.

b) Z-Stapel durch einen ruhenden Thrombozyten. Schnittführung von oben nach unten, Schichtdicke 0,45 μ m

Nach Inkubation der nicht-stimulierten Thrombozyten mit MP für 15 min bei 37°C befanden sich die MP zumeist entfernt von den Thrombozyten (Abb. 15 a), oder waren extrazellulär mit den Plättchen assoziiert (Abb 15 b). Allerdings zeigten die Thrombozyten Pseudopodien als Zeichen einer gewissen Aktivierung während des Isolations – oder Inkubationsvorgangs.

a)



b)

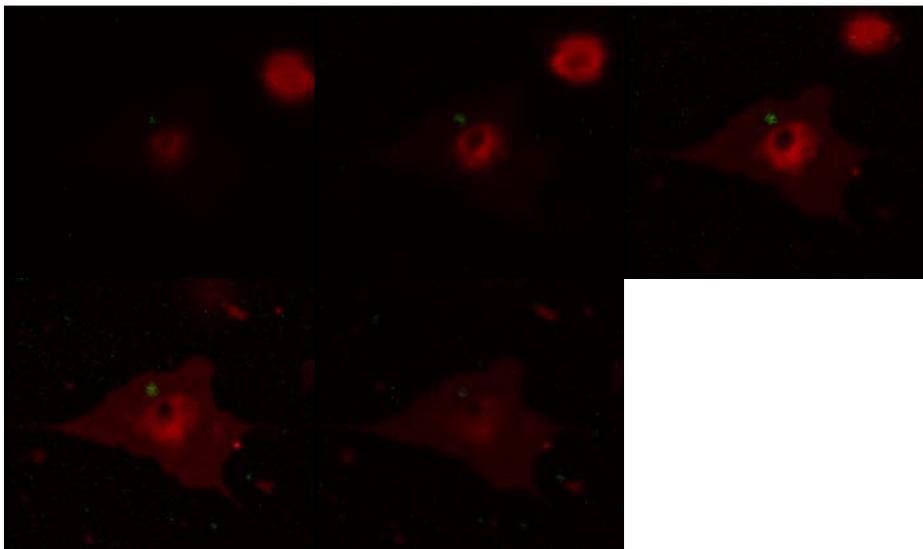


Abb. 15 LSM. DCF-gelabelte tMP und nicht-stimulierte Thrombozyten.

Nach Inkubation von Thrombozyten, welche nicht aktiv durch die Zugabe von Agonisten stimuliert wurden (gefärbt mit Vybrant DiD) mit tMP für 15 min bei 37°C fand keine MP – Internalisierung in die Thrombozyten statt.

Die isolierten Thrombozyten sind adhären auf Fibrinogen-gecoateten Fluorodishes.

a) MP in einiger Entfernung vom Thrombozyten. Repräsentatives Schnittbild durch einen Thrombozyten.

b) MP auf einem Thrombozyten. Z-Stapel. Schnittführung von oben nach unten, Schichtdicke 0,36µm.

Rot = Markierung der Thrombozytenmembran mit Vybrant DiD

Grün = Markierung der MP-Membran mit DCF

Nach Inkubation für 30 Min. bei 37°C sahen wir die Thrombozyten in ihrer typischen diskoiden Form mit einer leichten Grünfärbung, die sich v.a. um die Granulomere konzentrierte (Abb. 16). Dies entspricht einer Übertragung des MP-gebundenen Fluorophors DCF auf die Thrombozyten, so dass man von einer geringen MP-Internalisierung in die ruhenden Thrombozyten ausgehen kann.

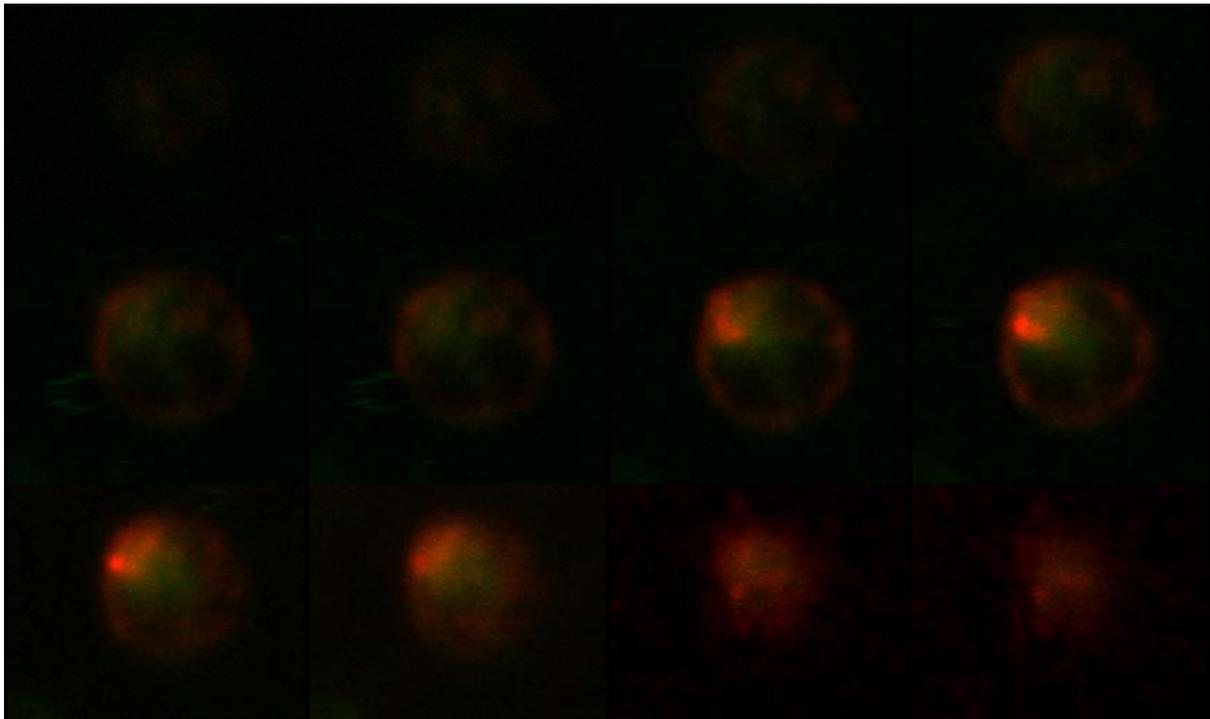


Abb. 16 LSM. DCF-gelebte tMP und ruhende Thrombozyten

Nach Inkubation von nicht-aktivierten Thrombozyten (= gefärbt mit Vybrant DiD) mit tMP für 30 min bei 37°C zeigen sich keine MP außerhalb des Thrombozyten. Die zusätzliche Grünfärbung des Thrombozyten entspricht einer Übertragung der MP-gebundenen DCF-Fluoreszenz auf den Thrombozyten.

Die isolierten Thrombozyten sind adhärent auf Fibrinogen-gecoateten Fluorodishes.

Rot = Markierung der Thrombozytenmembran mit Vybrant DiD

Grün = Markierung der MP-Membran mit DCF

Z-Stapel. Schnitfführung von oben nach unten, Schichtdicke 0,36µm.

Wurden die Vybrant DiD-markierten Thrombozyten vor der MP-Zugabe mit 12µg/ml Kollagen stimuliert wurden, bevor die MP zugegeben wurden, so zeigte sich die erwartete Formänderung (Abb. 17).

a)

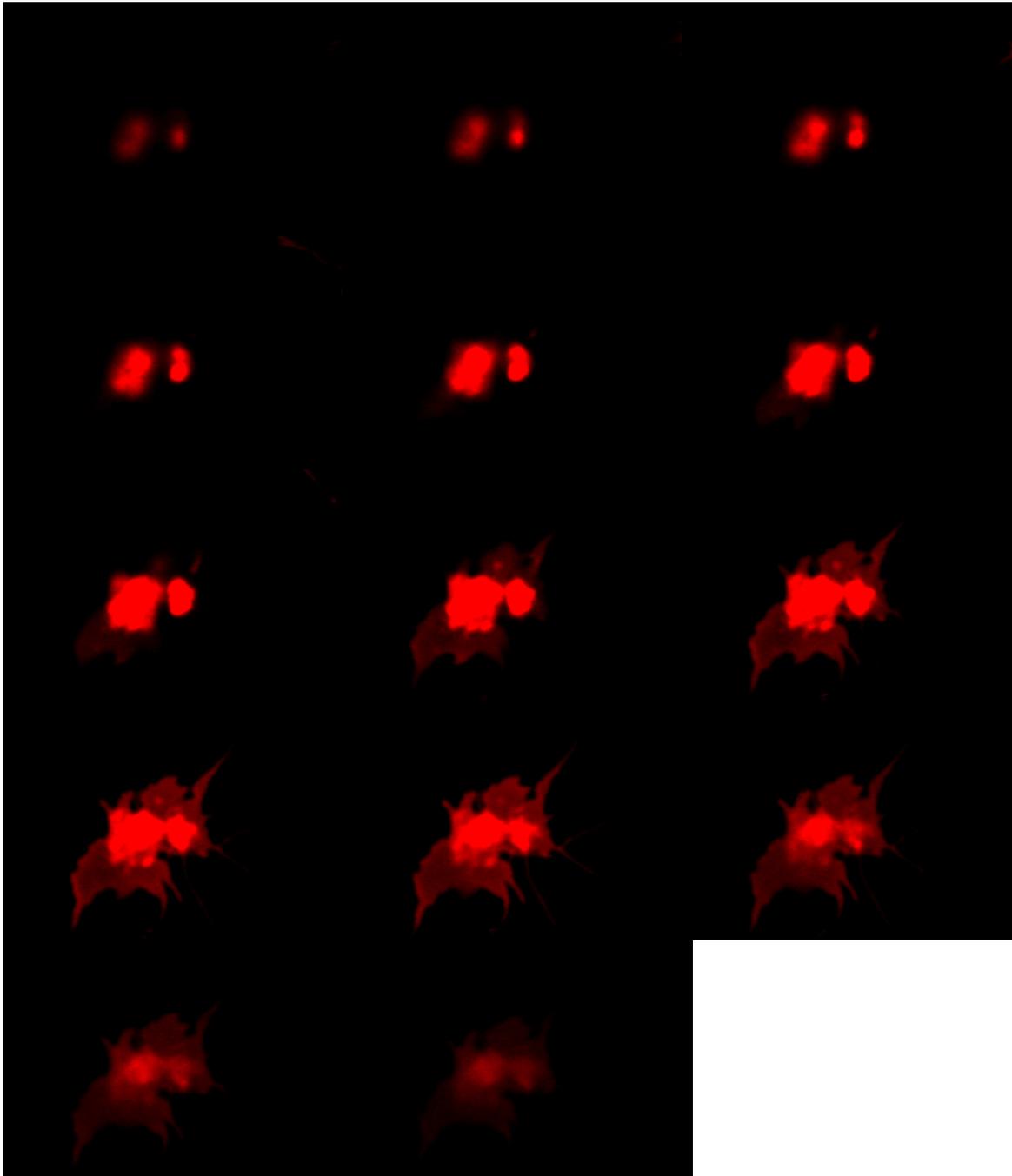


Abb. 17 Darstellung Kollagen-aktivierter Thrombozyten (gefärbt mit Vybrant DiD) mittels LSM (Z-Stapel, Schnittführung von oben nach unten, Schichtdicke 0,19 μ m)

Gleichzeitig zeigte sich eine diffuse Grünfärbung des gesamten Plättchen-Zytoplasmas und auch der Pseudopodien (Abb. 18 b) tMP c) uMP).

b)

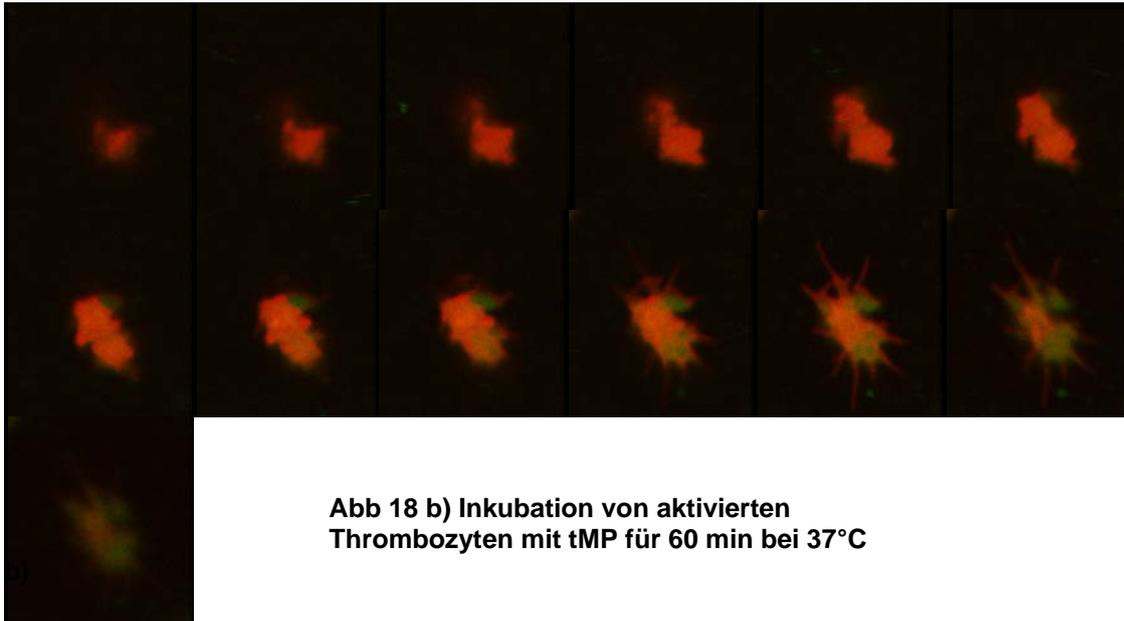


Abb 18 b) Inkubation von aktivierten Thrombozyten mit tMP für 60 min bei 37°C

c)

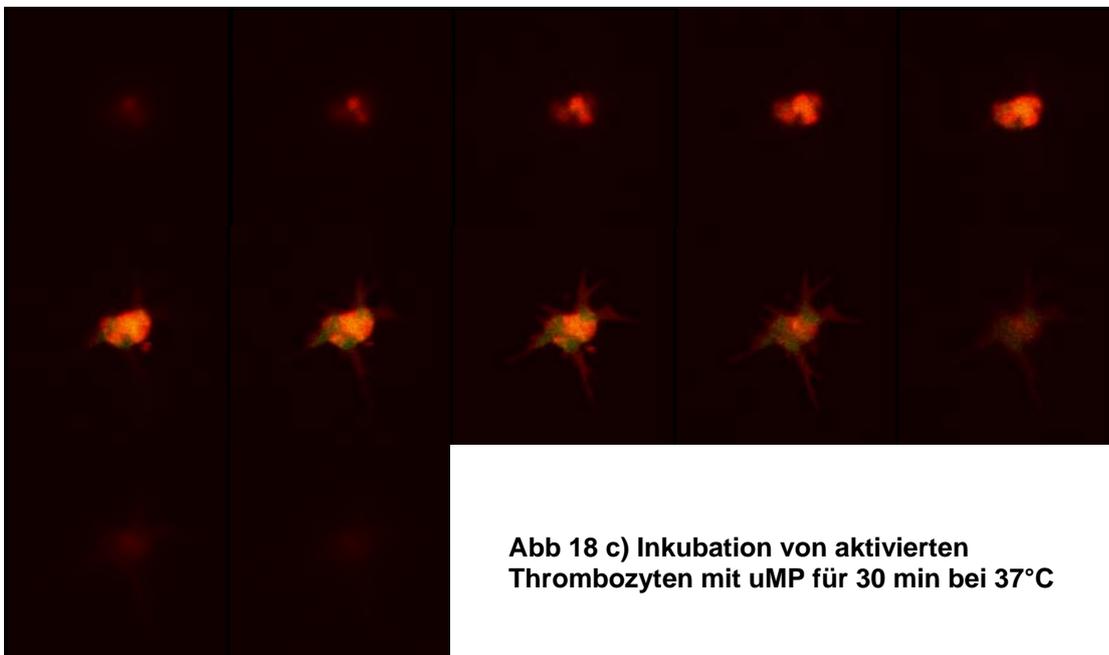


Abb 18 c) Inkubation von aktivierten Thrombozyten mit uMP für 30 min bei 37°C

Abb 18. LSM. Kollagen-aktivierte Thrombozyten internalisieren MP.

Isolierte Thrombozyten wurden mit Vybrant DiD markiert (=rot) und mit Kollagen (12µg/ml) stimuliert, bevor MP zugegeben wurden. Nach Inkubation für unterschiedliche Zeiten sieht man eine deutliche Grünfärbung der Thrombozyten, was wiederum als Übertragung der MP-gebundenen DCF-Fluoreszenz auf die Thrombozyten gewertet wurde.

Die Thrombozyten sind adhärenz auf Fibrinogen-gecoateten Fluorodishes. Z-Stapel. Schnittführung von oben nach unten, Schichtdicke 0,36µm

- a) Darstellung von isolierten, aktivierten Thrombozyten mittels LSM
- b) Inkubation von aktivierten Thrombozyten mit tMP für 60 min bei 37°C
- c) Inkubation von aktivierten Thrombozyten mit uMP für 30 min bei 37°C

III. 3. 5. MP-Internalisierung in Thrombozyten in Gegenwart von Inhibitoren der Endozytose

Da die bisherigen Ergebnisse daraufhin deuteten, dass der pH-Abfall nach Interaktion mit aktivierten Thrombozyten, nicht aber mit ruhenden Plättchen auf eine Internalisierung der MP zurückzuführen ist, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob der pH-Abfall durch Hemmstoffe der Endozytose beeinflusst wird .

III. 3. 5. 1. Chlorpromazin

Als erstes wurde der Einfluss von Chlorpromazin analysiert, einem Neuroleptikum aus der Klasse der Phenothiazine. Diese kationische amphiphile Substanz hemmt spezifisch die Clathrin-vermittelte Endozytose, indem es zu einer Umverteilung der clathrin-coated pits von der Zelloberfläche zu endosomalen und anderen intrazellulären Membranen kommt (Wang *et al.* 1993; Blanchard *et al.* 2006).

Chlorpromazin (6µg/ml) wurde zu den isolierten Thrombozyten gegeben, bevor diese mit 10µM ADP stimuliert wurden. Erst dann wurden die verschiedenen MP zugegeben. In diesen Experimenten zeigte sich keinerlei pHi-Abfall (Abb. 19 a-c).

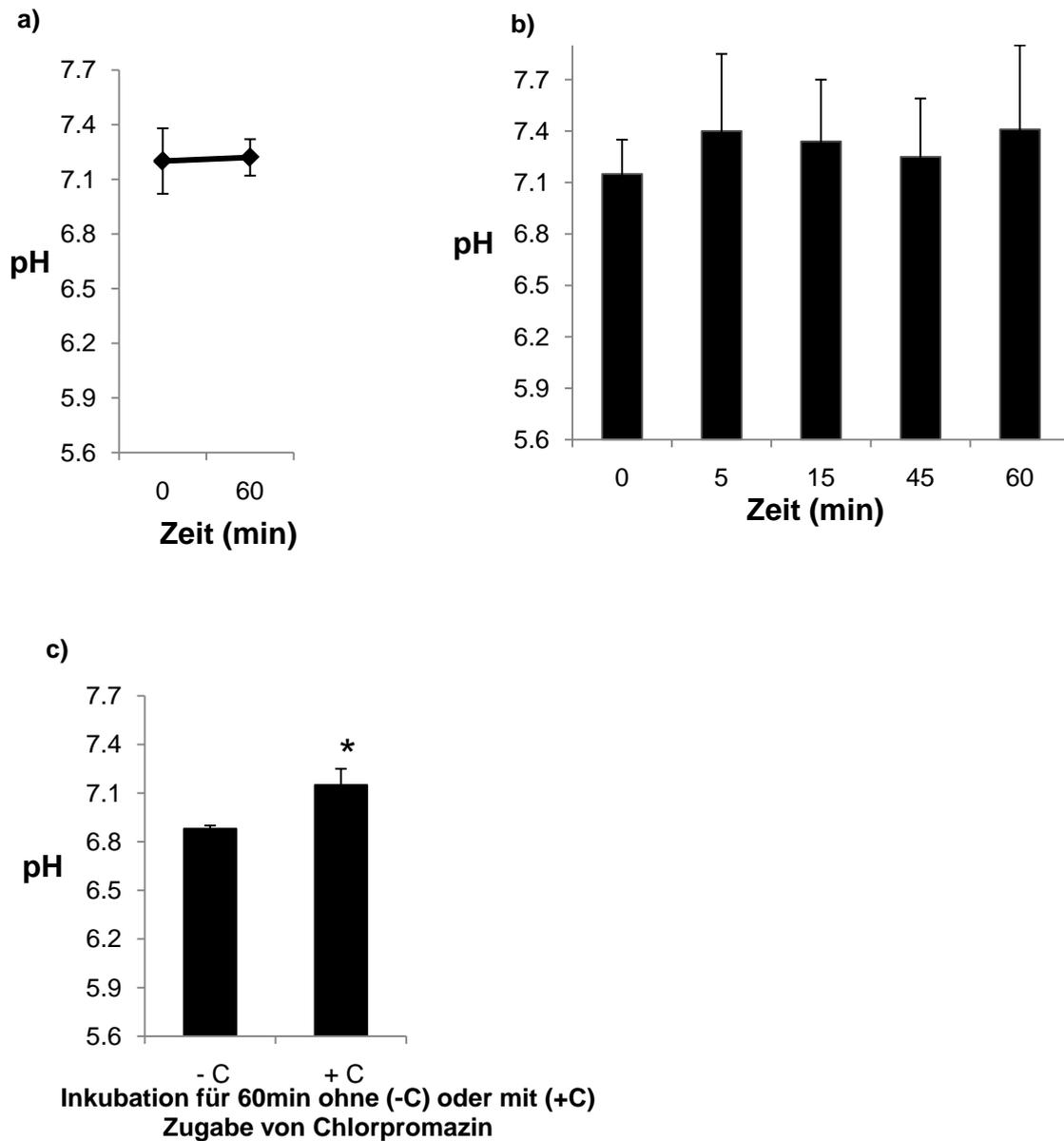


Abb. 19 Messung von pH_i in MP nach Inkubation mit aktivierten Thrombozyten und Zugabe von Chlorpromazin

Stimulation der isolierten Thrombozyten mit ADP ($10\mu\text{M}$) vor Inkubation mit MP führt zu einem Abfall von pH_i , wie in Abb. 12 dargestellt. Dieser Effekt wird nach Zugabe von Chlorpromazin ($6\mu\text{g/ml}$) zu den ADP-aktivierten Thrombozyten aufgehoben.

a) tMP, Mittelwerte \pm SD, $n = 4-5$

b) mMP, Mittelwerte \pm SD, $n = 2-5$

c) zMP, Mittelwerte \pm SD, $n = 8$, * $p < 0.05$ vs. Kontrolle ohne Chlorpromazin

III. 3. 5. 2. Cytochalasin B

Als zweiter Endozytose-Hemmstoff wurde Cytochalasin B verwendet, ein Metabolit des Pilzes *Helminthosporium dematoideum*. Cytochalasin B bindet an Aktin und verhindert so die Polymerisation der Mikrofilamente des Aktin-Zytoskeletts. Dies wiederum inhibiert verschiedene Endozytosewege (Merrifield *et al.* 2004; Fox *et al.* 1981). Nach Zugabe von 10 µg/ml Cytochalasin B zu isolierten Thrombozyten und anschließender Stimulation mit 10 µM ADP und Inkubation mit MP wurde kein pH-Abfall beobachtet (Abb. 20).

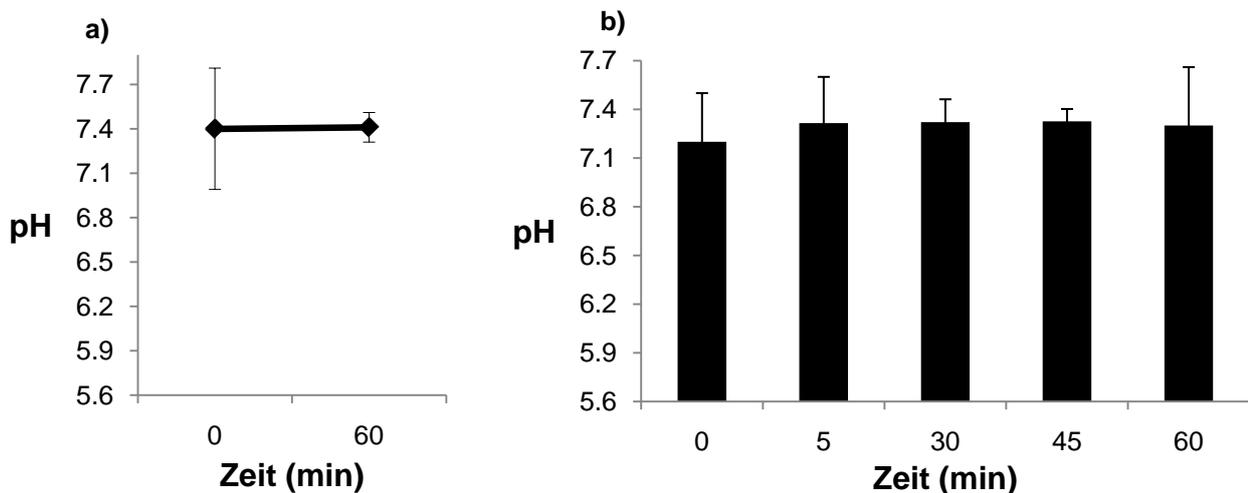


Abb. 20 Messung von pH in MP nach Inkubation mit aktivierten Thrombozyten und Zugabe von Cytochalasin B

Analog zu Chlorpromazin (Abb. 18) führt die Zugabe von Cytochalasin B zu einer Aufhebung des pH-Abfalls, welcher nach Inkubation der MP mit ADP-aktivierten Thrombozyten zu sehen ist.

a) tMP, Mittelwerte +/- SD, n = 3-6

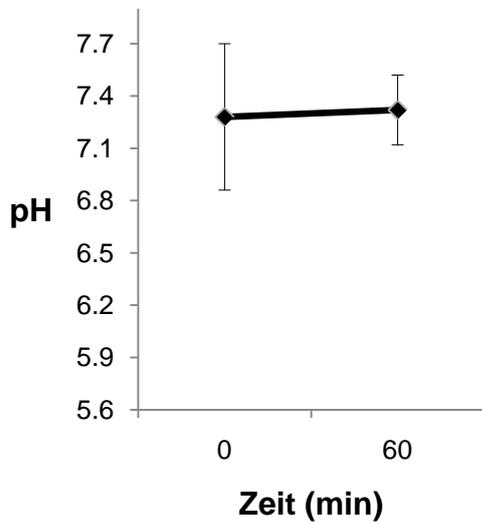
b) mMP, Mittelwerte +/- SD, n = 3-4

III. 3. 5. 3. Inkubation bei 4°C

Alle bekannten Wege der Endozytose sind bei niedrigen Temperaturen stark beeinträchtigt, wenn auch nicht komplett blockiert (Wright *et al.* 1989). Aus diesem Grund führten wir im nächsten Schritt die Inkubation der ADP-aktivierten Thrombozyten mit den verschiedenen MP bei 4°C durch. Erneut fanden wir keinen pH-Abfall in den TF-haltigen MP (Abb. 21).

Zusammengenommen lassen die in III. 3. 5. 1. bis III. 3. 5. 3. aufgeführten Ergebnisse vermuten, dass aktivierte Plättchen MP über Endozytosemechanismen internalisieren können.

a)



b)

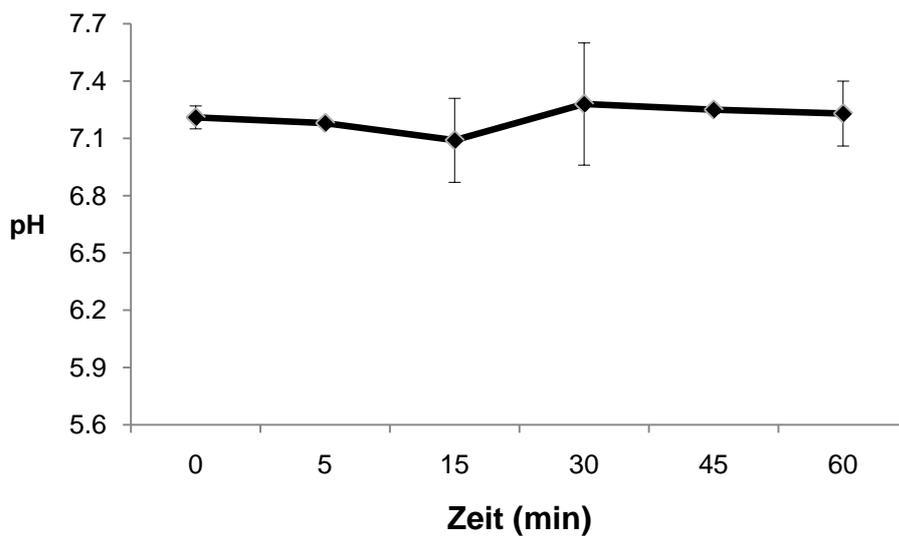


Abb. 21 Messung von pH_i in MP nach Inkubation mit aktivierten Thrombozyten bei 4°C.

Analog zu Chlorpromazin (Abb. 19) und Cytochalasin B (Abb. 20) führt Inkubation bei 4°C zu einer Aufhebung des pH_i -Abfalls, welcher nach Inkubation der MP mit ADP-aktivierten Thrombozyten zu sehen ist.

a) tMP, Mittelwerte \pm SD, n = 3-5

b) mMP, Mittelwerte \pm SD, n = 2-4

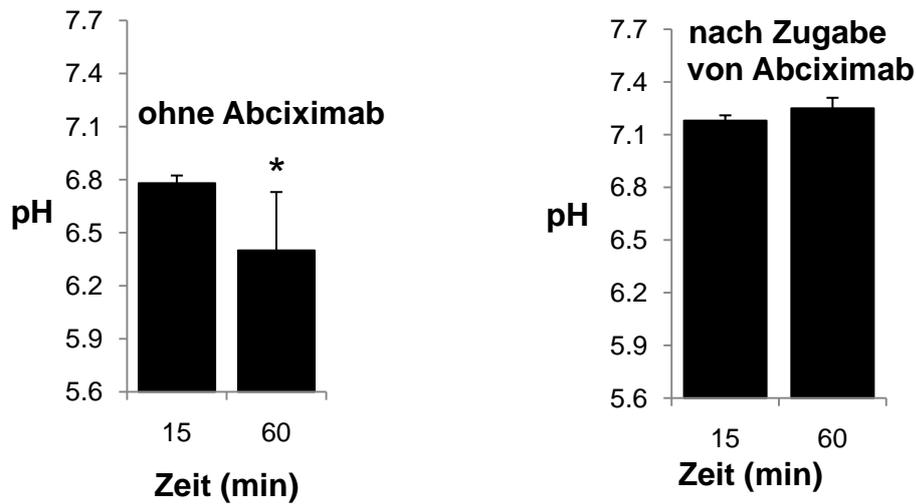
III. 3. 6. Internalisierung von MP in Plättchen: Beteiligte Rezeptoren

Um festzustellen, welche Thrombozytenrezeptoren an der Endozytose der MP beteiligt sein könnten, wurden im nächsten Schritt eine Beteiligung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa geprüft. Dieser Heterodimerrezeptor erscheint als geeigneter Kandidatenrezeptor, da er zuvor als Endozytoserezeptor beschrieben wurde. Daher wurden die GPIIb/IIIa-Antagonisten Abciximab und Tirofiban eingesetzt.

Abciximab ist das Fab-Fragment eines monoklonalen Antikörpers, welcher irreversibel gegen den GPIIb/IIIa-Komplex bindet. Tirofiban ist ein synthetisch hergestellter Agonist mit reversibler Bindung an den thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptor. Diese beiden Substanzen hemmen also den letzten Schritt der Thrombozytenaktivierung, nämlich die Bindung von Fibrinogen oder vWF an den GPIIb/IIIa-Komplex (Frelinger *et al.* 2001).

Nach Zugabe von 10µg/ml Abciximab zu den isolierten Thrombozyten vor der Stimulation mit 10µM ADP und anschließender Inkubation mit verschiedenen MP-Spezies, wurde der pHi-Abfall nahezu vollständig blockiert. (Abb. 22).

a)



b)

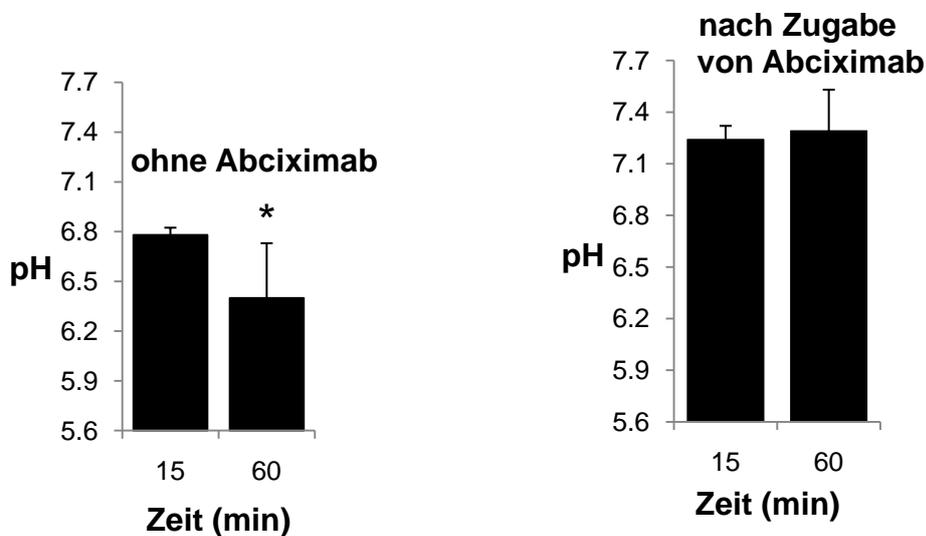


Abb. 22 Messung von pHi in MP nach Inkubation mit aktivierten Thrombozyten und Zugabe von Abciximab.

Stimulation der isolierten Thrombozyten mit ADP ($10\mu\text{M}$) vor Inkubation mit MP führt zu einem Abfall von pHi, wie in den Kontrollexperimenten ohne Zugabe von Abciximab links dargestellt ist. Dieser Effekt wird nach Zugabe von Abciximab ($10\mu\text{g/ml}$) zu den ADP-aktivierten Thrombozyten aufgehoben, wie in den rechten Abbildungen dargestellt.

a) tMP, Mittelwerte \pm SD, $n = 5-9$, $*p < 0.05$ vs. Kontrolle
b) mMP, Mittelwerte \pm SD, $n = 5-7$, $*p < 0.05$ vs. Kontrolle

Um sicherzustellen, dass dieser Effekt nicht allein auf der Bindung des AK an seinen Rezeptor beruht, wurde parallel ein Kontrollexperiment mit der gleichen Menge (10µg/ml) eines Isotyp-Antikörpers (IgG₁) durchgeführt. Hier zeigte sich keinerlei Beeinflussung des intramikropartikulären pHs im Vergleich zu einer Kontrolle aus ADP-aktivierten Thrombozyten ohne IgG₁ (Abb. 23).

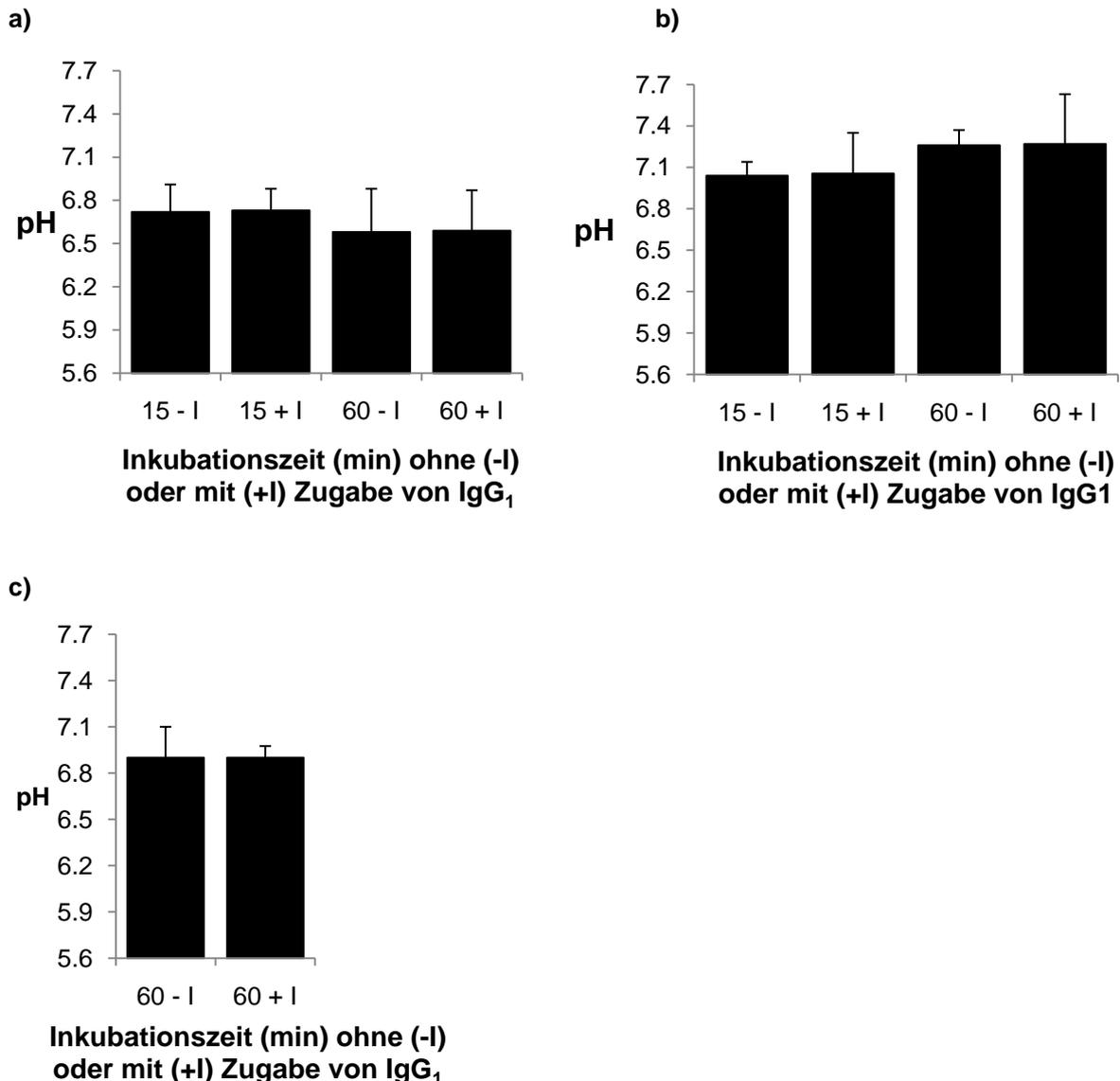


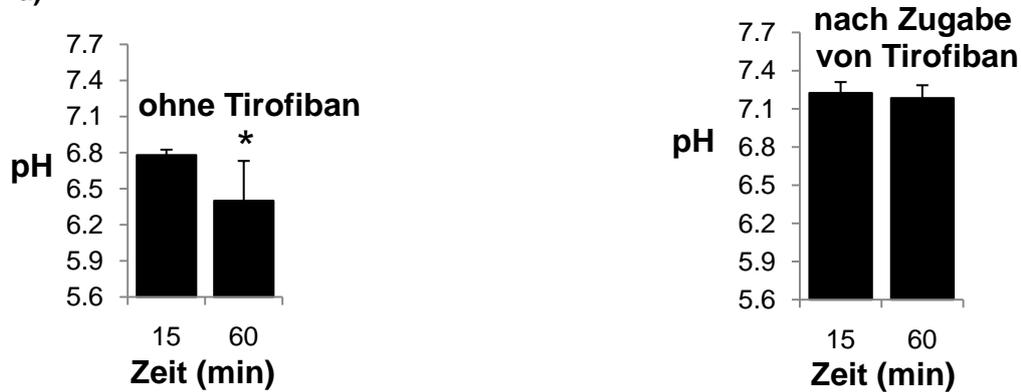
Abb. 23 Messung von pH_i in MP nach Inkubation mit aktivierten Thrombozyten und Zugabe von IgG₁

Stimulation der isolierten Thrombozyten mit ADP (10µM) vor Inkubation mit MP führt zu einem Abfall von pH_i, wie in den Kontrollexperimenten ohne Zugabe von IgG₁ dargestellt ist. Zugabe von IgG₁ (10µg/ml) zu den ADP-aktivierten Thrombozyten hat keinerlei Einfluss auf diesen pH_i-Abfall.

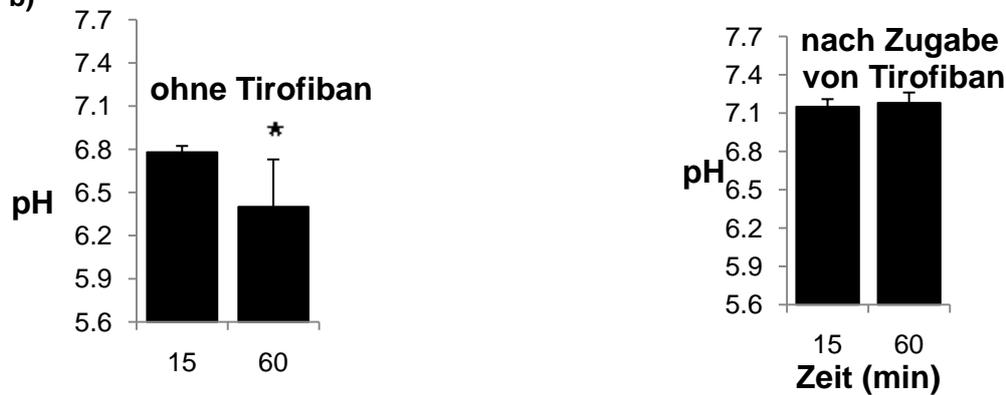
- a) tMP, n = 3-11, Mittelwerte +/- SD
 b) mMP, n = 6-7, Mittelwerte +/- SD, *p<0.05
 c) zMP, n = 3-7, Mittelwerte +/- SD

Auch nach Zugabe von 0.25µg/ml Tirofiban fand kein Abfall der Fluoreszenz-Ratio statt (Abb. 24).

a)



b)



c)

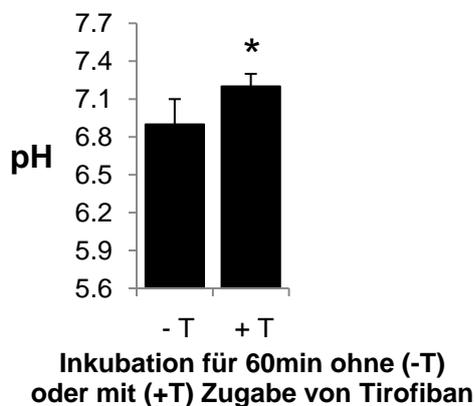


Abb. 24 Messung von pH_i in MP nach Inkubation mit aktivierten Thrombozyten und Zugabe von Tirofiban.

Analog zu Abciximab (Abb. 21) führt die Zugabe von Tirofiban zu einer Aufhebung des pH_i-Abfalls, welcher nach Inkubation der MP mit ADP-aktivierten Thrombozyten zu sehen ist.

a) tMP, n = 5-6, Mittelwerte +/- SD, *p<0.05 vs. Kontrolle

b) mMP, n = 6-7, Mittelwerte +/- SD

c) zMP, n = 5, Mittelwerte +/- SD, *p<0.05 vs. Kontrolle

III. 3. 7. Internalisierung von MP in Thrombozyten in Anwesenheit von Tirofiban

Um zu prüfen, ob die Internalisierung auch visualisiert werden kann, wurden Experimente mit konfokaler Laserscannmikroskopie mit DCF-markierten MP und Vybrant-DiD-markierten Thrombozyten durchgeführt. Trotz der Anwesenheit von Tirofiban, zeigten ADP-aktivierte Plättchen noch einen shape change. Allerdings zeigte sich nach Inkubation der aktivierten Thrombozyten mit uMP eine Reduktion der Grünfärbung des Thrombozyten. Da diese Grünfärbung einer Übertragung des MP-gebundenen Fluorophors DCF auf die Thrombozyten entspricht, kann eine Reduktion derselben als Indikator für eine verminderte Aufnahme der MP in die Plättchen angesehen werden (Abb. 25).

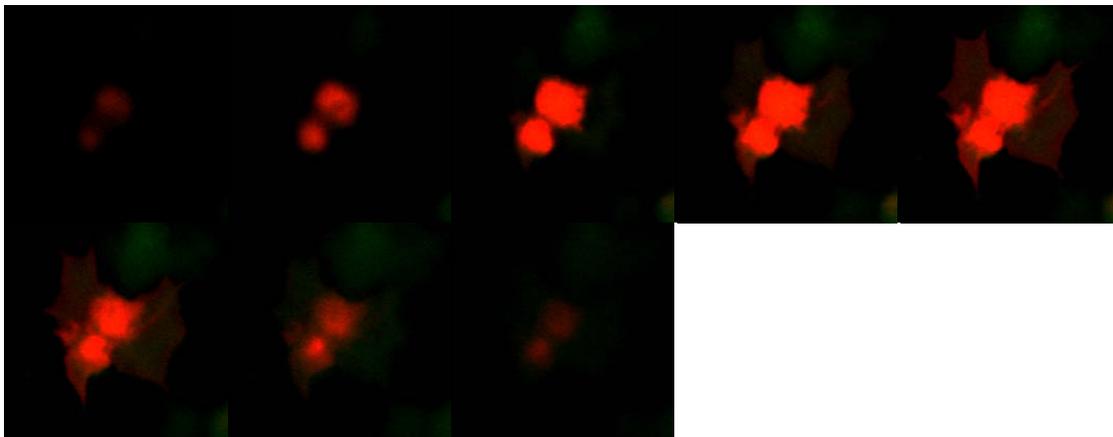


Abb. 25 LSM. Reduktion der Internalisierung von MP durch aktivierte Thrombozyten nach Zugabe von Tirofiban

Wie in Abb. 18 dargestellt, führt Inkubation von MP mit aktivierten Thrombozyten zu einer Übertragung der MP-assoziierten DCF-Fluoreszenz auf die Thrombozyten, was einer Internalisierung der MP in die Thrombozyten entspricht. Durch Zugabe von Tirofiban (1.25µg/ml) zu den aktivierten Thrombozyten wird dieser Effekt reduziert.

Die Thrombozyten sind adhärent auf Fibrinogen-gecoateten Fluorodishes.

Rot = Markierung der Thrombozytenmembran mit Vybrant DiD

Grün = Markierung der MP-Membran mit DCF

Z-Stapel. Schnittführung von oben nach unten, Schichtdicke 0,36µm

Bei Inkubation der ADP-aktivierten Thrombozyten mit tMP und einer ansteigenden Konzentrationsreihe von Tirofiban, zeigte sich eine zunehmende Minimierung der Grünfärbung der Thrombozyten. Insbesondere waren die MP auch außerhalb der Thrombozyten lokalisiert (Abb. 26 – 27).

Abb. 26 a)

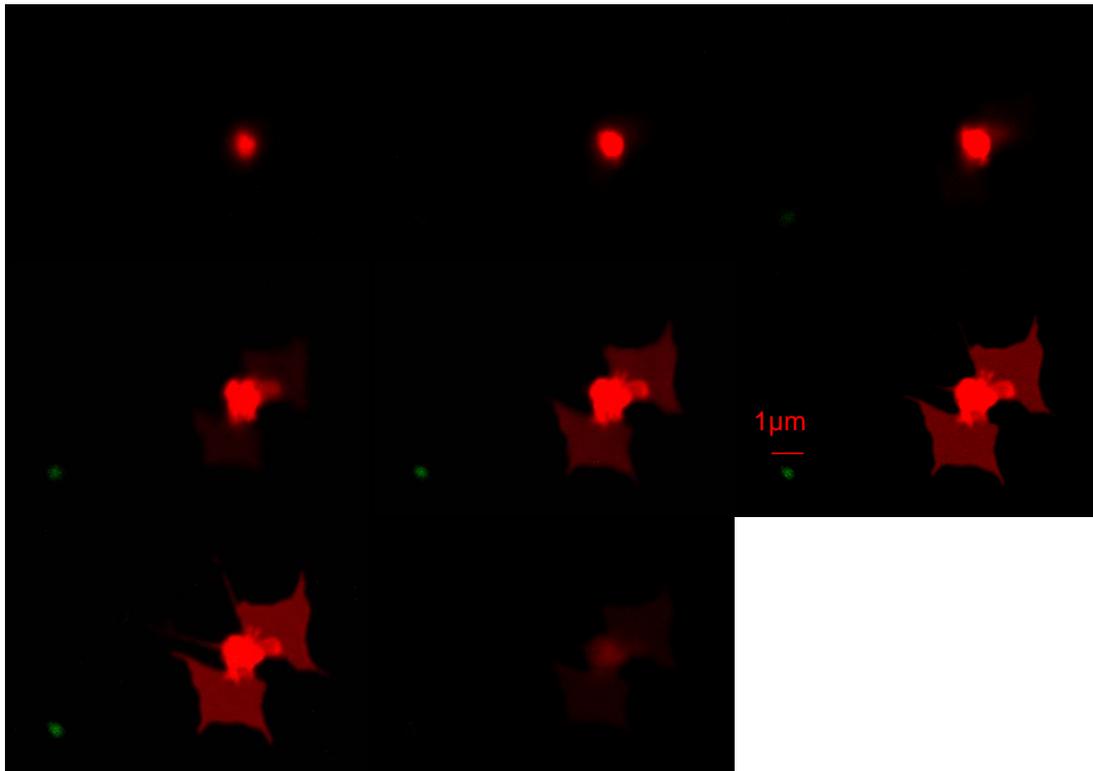
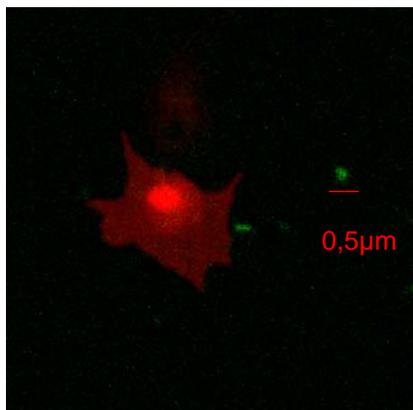


Abb. 26 b)

**Abb. 26 Zugabe von Tirofiban hemmt die MP-Internalisierung in die Thrombozyten.**

Isolierte Thrombozyten wurden mit ADP ($10\mu\text{M}$) stimuliert. Anschließende Zugabe von Tirofiban ($1.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$), bevor eine Inkubation mit MP stattfand. Darstellung der Proben mittels konfokaler LSM. Die Thrombozyten sind adhären auf Fibrinogen-gecoateten Fluorodishes.

Rot = Markierung der Thrombozytenmembran mit Vybrant DiD

Grün = Markierung der MP-Membran mit DCF

a) Z-Stapel, Schnittführung von oben nach unten, Schichtdicke $0,36\mu\text{m}$

b) 2 MP außerhalb eines Thrombozyten lokalisiert, repräsentatives Schnittbild durch den Thrombozyten

Abb. 27 a)

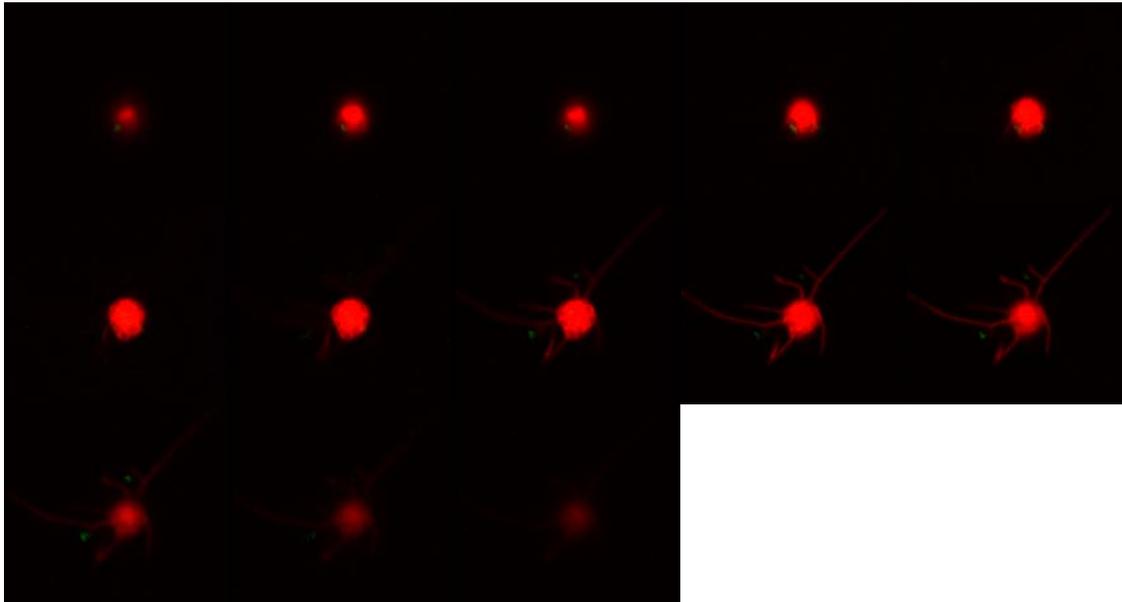


Abb. 27 b)

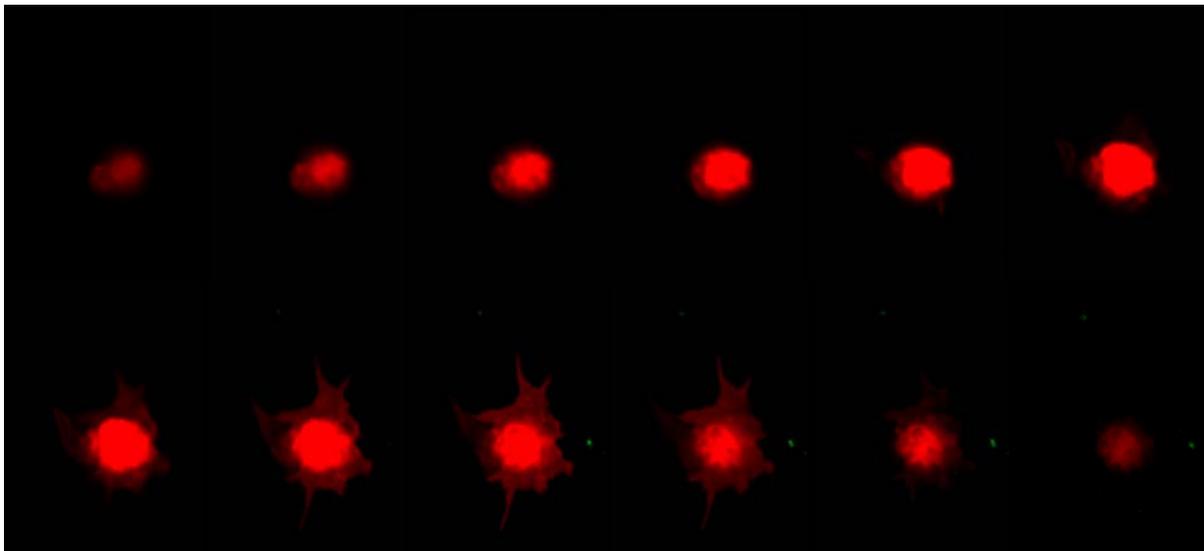


Abb. 27 Durch Zugabe von Tirofiban wird die MP-Internalisierung und damit die Übertragung der MP-gebundenen DCF-Fluoreszenz auf die Thrombozyten gehemmt.

ADP-aktivierte Thrombozyten ($10\mu\text{M}$) wurden nach Zugabe von Tirofiban mit tMP für 30 min bei 37°C inkubiert. Thrombozyten stellen sich in ihrer aktivierten Form dar, MP sind außerhalb der Thrombozyten lokalisiert.

Rot = Markierung der Thrombozytenmembran mit Vybrant DiD

Grün = Markierung der MP-Membran mit DCF

Darstellung von Z-Stapeln, Schnittführung von oben nach unten, Schichtdicke $0,36\mu\text{m}$.

a) Zugabe von $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Tirofiban

b) Zugabe von $8,3\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Tirofiban

IV. Diskussion

Die Blutgerinnung wird unter physiologischen Bedingungen durch Kontakt von Blut mit TF–exprimierenden Gefäßwandzellen gestartet. Während lange davon ausgegangen wurde, dass der Hauptstartpunkt der Gerinnung extravaskulär konstitutiv exprimierter TF ist, welcher erst nach einer Gefäßverletzung mit dem zirkulierenden Blut in Kontakt kommt, weiß man mittlerweile, dass auch eine im Blut zirkulierende Form von TF existiert, die v. a. mit MP assoziiert ist. MP wurden erstmals 1967 von Wolf als „Plättchenstaub“ beschrieben (Wolf 1967). Heute weiß man, dass MP von vielen verschiedenen Zellen als kleine, ca. 0.1–0.8 µm große exozytotische Plasmavesikel freigesetzt werden können.

Verschiedene Mechanismen können zur MP–Bildung führen, wobei die wichtigsten wohl Apoptose, Zellaktivierung, Hypoxie (van Wijk *et al.* 2003) und mechanischer Stress (Reininger *et al.* 2006) sind. Je nach Ursprungszelle und Entstehungsmechanismus ist die Zusammensetzung und somit potentielle physiologische Bedeutung der MP eine andere. So können verschiedene Zellen, wie Monozyten (Falati *et al.* 2003), Endothelzellen (Shet *et al.* 2003), Thrombozyten (Siddiqui *et al.* 2002, Müller *et al.* 2003) und glatte Gefäßmuskelzellen (Leroyer *et al.* 2007; Hron *et al.* 2007) TF–haltige MP generieren, die nachfolgend im Blut zirkulieren und einen Beitrag zur Gerinnung leisten können.

Aber auch nicht TF–haltige MP stellen eine wichtige prokoagulatorische Blutkomponente dar. Die negativen Aminophospholipide auf der Oberfläche von MP stellen Bindungsstellen für die Gerinnungsfaktoren IXa, VIII, Va und IIa (Hamilton *et al.* 1990, Berckmans *et al.* 2001) zur Verfügung, wodurch sie die Bildung und Aktivität von Gerinnungsenzymkomplexen, wie Xase (FVIIIa, FIXa, FX, PS) – und Prothrombinase (FVa, FXa, FII, PS) –Komplexe aktivieren.

IV.1. Thrombozyten und MP potenzieren sich in ihrer koagulatorischen Aktivität

Isolierte und Kollagen–stimulierte Thrombozyten alleine wiesen ebenso wie isolierte MP und ruhende Thrombozyten keine nennenswerte Faktor Xa–Aktivität auf. Jedoch war die prokoagulatorische Aktivität in Anwesenheit von Kollagen–stimulierten Thrombozyten und MP synergistisch erhöht. Dieser Effekt war bei Inkubation mit der

heterogenen Population der physiologischerweise im Blut zirkulierenden MP stärker ausgeprägt als bei TF-haltigen MP, die von THP-1-Zellen, einer monozytären Vorläuferzelllinie abstammen.

IV. 2. Intramikropartikuläre pH – Werte

Eine zentrale Frage dieser Arbeit war, inwiefern Thrombozyten MP internalisieren können. Zur Bearbeitung dieser Frage wurde zunächst eine Methodik entwickelt, mittels derer der intramikropartikuläre pH in den drei isolierten MP-Subpopulationen gemessen werden konnte. tMP, mMP und frei im Blut zirkulierende MP wurden isoliert und mit dem pH-sensitiven Farbstoff BCECF-AM inkubiert. BCECF-AM wird, sobald es innerhalb der mikropartikulären Membran ist, in die fluoreszierende Form der freien Säure, BCECF, hydrolysiert (Draper *et al.* 1997; Hirohashi *et al.* 1997). Diese kann nun bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden. Die bei 516nm freigesetzte Emissionsintensität ist dabei pH-unabhängig, falls die Exzitation bei 440nm stattfindet. Wird BCECF allerdings bei einer Wellenlänge von 490nm angeregt, so ist die Emissionsintensität pH-abhängig. Regt man BCECF nun kurz hintereinander bei 440nm und 490nm an, kann man die jeweiligen Emissionsintensitäten als einen Quotienten darstellen, welcher proportional zum vorliegenden intramikropartikulären pH ist.

Da MP wie oben beschrieben eine zytoplasmatische Abschnürung ihrer Elternzelle darstellen, ist es nicht verwunderlich, dass der gefundene intramikropartikuläre pH (pHi) von 7.2 dem physiologischen zytosolischen pH der jeweiligen Elternzelle entspricht (Heming *et al.* 2003; Baldini *et al.* 2003).

IV. 3. Bedeutung des thrombozytären Aktivierungszustands für die MP – Internalisierung

Thrombozyten stammen von hämatopoetischen Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, ab und zirkulieren im peripheren Blut als einzelne glatte, bikonvex geformte, zellkernfreie Zellen. Erst nach einer Gefäßverletzung kommen die zirkulierenden Thrombozyten in Kontakt mit Agonisten wie Thrombin, Adrenalin oder

Kollagen, deren Bindung an die Thrombozyten eine Folge von Reaktionen auslöst. ADP ist dabei der am längsten bekannte und einer der wichtigsten Agonisten der Plättchenaktivierung. ADP wird in den δ -Granula (dense granules) menschlicher Thrombozyten gespeichert. Als Folge der Thrombozyten-Aktivierung durch ADP kommt es durch Aktivierung von Mikrofilamenten zu einer Veränderung der Zellform („shape change“), so dass die scheibenförmigen ruhenden Zellen rasch zu stacheligen Kugeln werden (Born *et al.* 1962). Dieser „shape change“ wird gefolgt von einer Sekretion der Granulainhaltsstoffe (Mills *et al.* 1968), was zu Freisetzung von mehr ADP, aber auch einer Reihe anderer Substanzen führt, wie in I. 1. 4. beschrieben. Darauf kann ADP an die verschiedenen ADP-Rezeptoren der Plasmamembran binden, wodurch verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert werden. Dabei spielt u. a. ein schneller Kalziumeinstrom (Sage *et al.* 1986; MacKenzie *et al.* 1996; Hallam *et al.* 1985) und eine Inhibition der Adenylatzyklase (Hechler *et al.* 1998, Hollopeter *et al.* 2001) eine wichtige Rolle.

Obwohl ADP selbst ein relativ schwacher Agonist der Plättchenaktivierung ist, ist es ein notwendiger Kofaktor der normalen Plättchenaktivierung durch andere Agonisten wie Thrombin oder Kollagen, die seine Sekretion aus den δ -Granula induzieren.

Schon geringe Konzentrationen von ADP amplifizieren nämlich die Effekte anderer Agonisten.

Die ADP-induzierte Plättchenaggregation ist essentiell für die Aufrechterhaltung einer normalen Hämostase, ist aber pathologisch erhöht bei Krankheiten wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und Atherosklerose. Zum anderen sind Inhibitoren der ADP-induzierten Plättchenaggregation effektive antithrombotische Medikamente (Cattaneo *et al.* 2007; Savi *et al.* 2005).

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass die ADP-Aktivierung der Thrombozyten von Bedeutung ist für die Aufnahme von MP in Thrombozyten. Bei der Inkubation von MP mit ADP-aktivierten Thrombozyten wurde im Vergleich zur Inkubation von MP mit ruhenden Thrombozyten ein stärkerer pH-Abfall gefunden. Dies spricht dafür, dass die Internalisierung der MP in ADP-aktivierte Thrombozyten gegenüber ruhenden Plättchen verstärkt ist.

IV. 4. Verschiedene Endozytosewege sind an der Internalisierung von MP beteiligt

IV. 4. 1. MP-Internalisierung in die Thrombozyten findet via Endozytose statt

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, die an der MP-Internalisierung beteiligten Mechanismen zu untersuchen. Inkubation von MP und Thrombozyten bei 4°C lieferte einen Anhaltspunkt dafür, dass bei der MP-Internalisierung einer der verschiedenen Wege der Endozytose eine Rolle spielt.

Thrombozyten sind Temperatur-sensitiv. Wenn sie bei niedrigen Temperaturen gelagert werden, verändern sie ihre Form („shape change“) (White *et al.* 1967), sezernieren die Inhaltsstoffe ihrer α -Granula und Lysosomen (Bode *et al.* 1990), zeigen einen Anstieg von zytosolischem Kalzium (Oliver *et al.* 1999) und polymerisieren Aktin (Winokur *et al.* 1995). Diese Ereignisse beginnen bei Temperaturen niedriger als 22°C (Tablin *et al.* 1996). Thrombozyten werden also durch niedrige Temperaturen spontan aktiviert. Auf der anderen Seite ist allgemein anerkannt, dass die bekannten Wege der Endozytose, obwohl sie sich in ihren Mechanismen unterscheiden, bei niedrigen Temperaturen gehemmt werden (Wright *et al.* 1989).

Wenn man annimmt, dass MP von den einzelnen Zellen via Endozytose aufgenommen werden, gelangen diese über die Zeit via Endosomen oder Caveosomen in Lysosomen. In diesen herrscht ein niedrigerer pH-Wert vor als dies im Inneren des Zytosols der Fall ist, was sich in einem niedrigeren pHi widerspiegeln könnte. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese fand sich in den Versuchen, in denen BCECF – markierte MP bei 4°C mit Thrombozyten inkubiert wurden, keinerlei Abfall der Fluoreszenz-Ratio, was einem fehlenden pHi-Abfall entspricht.

IV. 4. 2. CHO-Zellen internalisieren MP via Dynamin-abhängige Endozytose

Dynamin spielt eine wichtige Rolle bei der Abschnürung endozytotischer Vesikel, unabhängig von dem zugrundeliegenden Endozytose-Mechanismus (Gold *et al.* 1999, Jones *et al.* 1998). Das Dynamin-Gen besteht aus 3 GTPase-Domänen, Element 1, 2, und 3. Wenn man Lysin an Position 44 durch Alanin über gerichtete Mutagenese ersetzt, entsteht die Dynamin-Mutante pcDNA3-Dynamin-K44A, welche die Ausbildung funktionsfähiger Dynamin-Helixstrukturen hemmt. Transfektion von Zellen mit dieser Dynamin-Mutante hemmt also beide Hauptmechanismen der Endozytose, den Weg der Rezeptor-vermittelten Endozytose auf der Zwischenstufe der clathrin-coated Vesikel (van der Bliek *et al.* 1993) und denjenigen der Clathrin-unabhängigen Endozytose via Caveolae (Dessy *et al.* 2000).

CHO-Zellen stellen eine adhärente Zelllinie mit einer hohen Rate an Endozytose dar. Bei Inkubation der wild type CHO-Zellen mit MP zeigte sich zeitabhängig ein Abfall des intramikropartikulären pHs. Entsprechend zeigte sich in CHO-Zellen, die mit der GTPase-negativen Dynamin-Mutante pcDNA3-Dynamin-K44A transfiziert wurden, dass der pH-Abfall gehemmt war. Dies lässt darauf rückschließen, dass beide oben genannten Endozytosewege eine Rolle bei der MP-Internalisierung spielen.

IV. 4. 3. Das Aktinzytoskelett ist von Bedeutung für MP-Internalisierung

Cytochalasin B ist ein Pilz-Metabolit, der an Aktinfilamente bindet und dadurch die Aktinpolymerisation und Verlängerung der Aktinfilamente verhindert (Forscher *et al.* 1988; Diaz-Ricart *et al.* 2002).

Eine wichtige Gemeinsamkeit der verschiedenen Endozytosewege ist, dass die Abschnürung eines endozytotischen Vesikels und dessen Translokation ins Zytoplasma von Aktinfilamenten abhängt (Merrifield *et al.* 2004). Vor diesem Hintergrund wird jegliche Endozytose durch den Einsatz von Cytochalasin B gehemmt. Auch in Thrombozyten verhindert Cytochalasin B den Anstieg von filamentösem F-Aktin, welcher eine Aktivierung von Thrombozyten begleitet, und macht ihn z.T. sogar rückgängig. Allerdings wird das F-Aktin in ruhenden Thrombozyten nicht beeinflusst (Fox *et al.* 1981, Casella *et al.* 1981).

Dass in den Experimenten, in denen Cytochalasin B eingesetzt wurde, keinerlei pH-Abfall gefunden werden konnte, deutet darauf hin, dass das Aktin-Zytoskelett der Thrombozyten eine Rolle bei der MP-Internalisierung spielt.

IV. 4. 4. Clathrin-abhängige Endozytose ist an der MP-Internalisierung beteiligt

Chlorpromazin ist ein spezifischer Inhibitor der Clathrin-abhängigen Endozytose, indem es dosisabhängig und sehr effektiv Clathrin und das Adaptor Protein AP-2 von der Zelloberfläche hin zu endosomalen und anderen intrazellulären Membranen umverteilt, was zu einem Verlust der clathrin-coated pits an der Plasmamembran führt (Wang *et al.* 1993, Blanchard *et al.* 2006).

Wir beobachteten, dass es in Gegenwart von Chlorpromazin zu keinem pH-Abfall in den MP nach Inkubation mit aktivierten Thrombozyten kam. Dies deutet darauf hin, dass Clathrin-vermittelte Endozytose eine Rolle bei der Internalisierung der MP in humane Thrombozyten spielt.

IV. 5. Der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa fördert die MP-Internalisierung in den Thrombozyten

Um eine Aussage darüber machen zu können, welche Thrombozytenrezeptoren an der Internalisierung der MP beteiligt sind, wurde der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa genauer untersucht.

Der GPIIb/IIIa-Rezeptor (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) kommt ausschließlich auf Thrombozyten und Megakaryozyten vor (Quinn *et al.* 2003) und ist mit 40.000–60.000 Kopien pro Zelle der häufigste Rezeptor auf den Thrombozyten (Calvete *et al.* 1999; Schneider *et al.* 2004). Der Komplex befindet sich in ruhenden Plättchen vorwiegend intrazellulär.

Aktivierung der Thrombozyten führt dazu, dass α -Granula, in welchen GPIIb/IIIa gespeichert ist (Wencel-Drake *et al.* 1986), mit der Zelloberfläche verschmelzen, und somit die Zahl der GPIIb/IIIa-Rezeptoren auf der Oberfläche um 25–50% auf über 80.000 Kopien ansteigt (Woods *et al.* 1986, Niya *et al.* 1987, Escolar *et al.* 2000).

Plättchenaktivierung führt auch zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, der erst dadurch in der Lage ist, seinen Hauptliganden, Fibrinogen, zu binden (Phillips *et al.* 1991, Ni *et al.* 2003).

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob der GPIIb/IIIa–Rezeptor der Thrombozyten bei der Internalisierung von MP beteiligt ist, wurden Versuche mit zwei verschiedenen GPIIb/IIIa–Antagonisten durchgeführt. Deren Primärmechanismus ist also, unabhängig vom Mechanismus, der zur Thrombozytenaktivierung geführt hat, die Hemmung der gemeinsamen Endstrecke der Plättchenaggregation: die Bindung von Fibrinogen oder vWF an den GPIIb/IIIa–Komplex (Frelinger *et al.* 2001).

Abciximab (ReoPro[®]) stellt das Fab–Fragment eines chimären Antikörpers (Mensch–Maus) dar, welches irreversibel an den GPIIb/IIIa–Rezeptor bindet. Bei pHi–Messung nach Zugabe von Abciximab, konnte der pHi–Abfall, der in parallel durchgeführten Versuchen mit aktivierten Thrombozyten gesehen wurde, wieder aufgehoben werden. Tirofiban (Aggrastat[®]) ist ein synthetisches Derivat der Aminosäure Tyrosin, welches spezifisch und reversibel mit einer Halbwertszeit von ca. 2 Stunden an den thrombozytären Fibrinogenrezeptor bindet (Tanaka *et al.* 2004). Analog zu den Versuchen mit Abciximab konnte kein pHi–Abfall im Vergleich zu parallelen Experimenten in Abwesenheit von Tirofiban gesehen werden.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der GPIIb/IIIa–Rezeptor der Thrombozyten zur MP–Internalisierung der Thrombozyten beiträgt.

IV. 6. Darstellung der MP–Internalisierung mittels konfokaler LSM

Für die Versuche mittels konfokaler Laserscanmikroskopie (LSM) wurden die Plasmamembranen isolierter Thrombozyten mit Vybrant DiD gelabelt. Dessen Vorteile liegen darin, dass die grundlegenden physiologischen Eigenschaften der gefärbten Zelle nicht wesentlich beeinflusst werden (Honig *et al.*, 1986; Honig *et al.* 1989).

Zunächst wurden Vybrant DiD – gelabelte Thrombozyten mit DCF–gelabelten MP inkubiert, wobei sich erst nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C eine leichte intrazelluläre Grünfärbung des Thrombozyten darstellen ließ. Dies lässt eine geringfügige MP–Internalisierung vermuten, da nun DCF–Färbung innerhalb des

ruhenden, diskoiden Thrombozyten zu sehen war. Bei Aktivierung der Thrombozyten mittels Kollagen und nachfolgender Inkubation mit MP war eine deutlicher ausgeprägte intrazelluläre DCF-Färbung der Thrombozyten zu sehen.

Aufgrund der geringen Größe der Thrombozyten ermöglichen die LSM-Experimente einen Hinweis, aber keine endgültige Aussage darüber, ob MP als Ganzes von den Thrombozyten aufgenommen werden. Trotz Durchführung von sog. Z-Stapeln (dreidimensionale Darstellung eines ausgewählten Thrombozyten durch Schnittebenen im kleinstmöglichen Abstand von $<1\mu\text{m}$; repräsentative Schnittebenen sind in der vorliegenden Arbeit abgebildet), war es zum Teil nicht möglich, zu klären, ob MP der Plasmamembran von ruhenden Thrombozyten von innen oder außen her aufgelagert sind. Außerdem würde man eine diffuse Grünfärbung der Zelle eher bei einer MP-Internalisierung durch Membranverschmelzung erwarten, wie diese auch in einer früheren Arbeit dargestellt wurde (Del Conde *et al.* 2005). Um diesen Sachverhalt genauer zu klären, wäre es vonnöten, kontinuierliche, noch höher auflösende Bildgebung, z.B. mittels Elektronenmikroskopie, durchzuführen.

Nach Zugabe der GPIIb/IIIa-Antagonisten wie Tirofiban wiesen die Thrombozyten Zeichen der Aktivierung auf (v. a. Vorhandensein von Pseudopodien).

Gleichzeitig reduzierte Tirofiban die intrazelluläre DCF-Färbung der Thrombozyten. Dies deutet darauf hin, dass weniger MP pro Thrombozyt aufgenommen wurden. Damit wurden die Ergebnisse der pH_i-Messung bestätigt, dass der GPIIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozyten eine Rolle bei der MP-Internalisierung spielt.

IV. 7. Ausblick

Bisher waren diagnostische Messungen und der Nachweis von erhöhten MP-Spiegeln bei verschiedenen Krankheiten ohne therapeutische Konsequenz.

Es ist denkbar, dass die Interaktion von Thrombozyten mit MP eine erhöhte Thromboseneigung bei kardiovaskulären Erkrankungen bedingt. Damit könnten klinisch bewährte Medikamente wie die GPIIb/IIIa-Antagonisten Abciximab und Tirofiban unter ganz neuen Gesichtspunkten klinisch eingesetzt werden, da sie die prokoagulatorische Komponente der MP abschwächen könnten. Eine andere therapeutische Anwendung könnte darin liegen, dass MP mittels Plasmapherese aus

dem zirkulierenden Blut entfernt werden, um Thrombosen vorzubeugen.

Auf der anderen Seite könnten MP eine potentielle therapeutische Relevanz bei thrombozytopenischen und leukämischen Patienten bekommen (Blajchman *et al.* 2003). Hier ist ein Einsatz der MP als prokoagulatorische Blutkomponente bei verschiedenen Erkrankungen mit hämorrhagischer Diathese denkbar.

Durch Infusion mit P-Selektin und Immunglobulinen erzeugte prokoagulatorische MP konnten im Mausmodell die Blutgerinnung von Hämophilie-Mäusen auf ein normales Maß anheben (Hrachovinova *et al.* 2003), so dass deren Einsatz auch bei menschlichen Hämophilie-Patienten denkbar ist. Unabhängig davon haben GPIIb-tragende Plättchen-MP einen gewissen hämostatischen Effekt in verschiedenen Modellen von Thrombozytopenie (Keuren *et al.* 2007).

Nicht zuletzt wäre ein Verhindern des Transfers von TF-positiven MP auf Thrombozyten, v.a. unter Berücksichtigung der MP-Internalisierung durch Thrombozyten, eine neue Strategie zur Prävention von Thrombosen.

Voraussetzung für eine therapeutische Verwendung der MP außerhalb von Studien wäre allerdings, dass die Methoden, mittels derer MP isoliert, quantifiziert und klassifiziert werden, standardisiert werden.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Aspekt der Blutgerinnung behandelt, die Interaktion zwischen TF-haltigen MP und Thrombozyten als einem potentiellen neuen Startpunkt der Gerinnungskaskade.

Wir beobachteten, dass die prokoagulatorische Aktivität von MP potenziert wird, wenn sie mit aktivierten Thrombozyten interagieren.

Zum genaueren Verständnis der Interaktion von Thrombozyten und MP wurde eine Methodik entwickelt, mit deren Hilfe der intramikropartikuläre pH gemessen werden konnte. Hierbei zeigte sich, dass der pH-Wert unter Ausgangsbedingungen in den MP bei 7,2 liegt, was dem physiologischen pH im Zytosol der Elternzelle entspricht. Nach Inkubation der MP mit aktivierten Thrombozyten kam es zu einem Abfall dieses pH-Wertes. Diese Reduktion des pH-Werts spricht dafür, dass sich die MP nunmehr in intrazellulären Kompartimenten (Endosomen, Lysosomen) mit stark sauren pH-Werten befinden. Dies wurde an CHO-Zellen bestätigt.

Unter verschiedenen Bedingungen der Endozytosehemmung (4°C, Inkubation der Thrombozyten mit Cytochalasin B bzw. Chlorpromazin, Transfektion mit der Dynamin-Mutante pcDNA3-Dynamin-K44A) wurden sowohl Clathrin-vermittelte als auch Clathrin-unabhängige Endozytosewege gehemmt. Hier zeigte sich, dass beide Hauptmechanismen der Endozytose bei der MP-Internalisierung mitwirken.

Indem spezifisch die Clathrin-abhängige Endozytose mittels Chlorpromazin gehemmt wurde, ließ sich nachweisen, dass der Endozytoseweg via clathrin-coated pits mitverantwortlich für die MP-Aufnahme in die Thrombozyten ist.

Mit Hilfe der GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten Abciximab und Tirofiban konnten wir zeigen, dass der Hauptfibrinogen-Rezeptor der Thrombozyten auch bei der MP-Aufnahme in die Zelle beteiligt ist, da bei Blockade dieses Rezeptors kein pH-Abfall zu erkennen war.

Mittels konfokaler Laserscanmikroskopie wurden die Interaktionen zwischen Thrombozyten und MP visualisiert, indem dreidimensionale Schnittbilder der Thrombozyten erstellt wurden. Dabei bestätigte sich die Relevanz des GPIIb/IIIa-Rezeptors für die MP-Aufnahme.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aktivierte Thrombozyten offensichtlich über verschiedene Endozytosewege MP aufnehmen können, wobei dem GPIIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozyten für die Regulation dieser Aufnahme eine wichtige Bedeutung zukommt.

VI. Summary

The present work examines a new aspect of blood coagulation, the interactions between TF-rich MP und thrombocytes as a potential new starting point of the coagulation cascade.

We observed an amplification of procoagulant MP-activity when interacting with activated platelets. To better understand the interaction of platelets and MP a new method to measure intramicroparticular pH was developed. This revealed an intramicroparticular pH-value of 7.2 on starting conditions which is equivalent to physiologic cytosolic pH in the parenting cell. After incubating the MP with activated thrombocytes this pH-value dropped which is an indicator for the MP now being within intracellular compartments (endosomes, lysosomes) with very acidic pH-values. These results were confirmed by experiments with CHO-cells.

Using different means of inhibiting endocytosis (4°C, platelet incubation with cytochalasin B or chlorpromazine, transfection with the dynamin-mutant pcDNA3-dynamin-K44A) both clathrin-mediated and clathrin-independent pathways of endocytosis could be blocked. This reveals that both main mechanisms of endocytosis are involved in MP-internalization.

By specifically inhibiting clathrin-dependent endocytosis via chlorpromazine it could be shown that clathrin-coated pits are of importance for MP-uptake into thrombocytes.

That the platelet fibrinogen receptor GPIIb/IIIa also contributes to intracellular MP-uptake could be shown by blocking the receptor with its antagonists abciximab and tirofiban resulting in reversing the pH-drop.

Confocal laserscan microscopy visualized platelet-MP interactions by generating three-dimensional sectional images. Thus, the relevance of the GPIIb/IIIa-receptor for MP-uptake could be confirmed.

In summary it can be said that activated thrombocytes are apparently able to take up MP via different endocytotic pathways, whereas the platelet GPIIb/IIIa-receptor is of great importance for regulating this uptake.

VII. Literaturverzeichnis

Allen C, Harpur E, Gray T, Simmons N, Hirst B. Efflux of biscarboxyethyl–carboxyfluorescein (BCECF) by a novel ATP–dependent transport mechanism in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Oct;**172**(1):262-267

Armstrong, R A. Platelet prostanoid receptors. *Pharmacol Ther.* 1996;**72**(3):171-91

Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali JL, Freyssinet JM. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. *J Clin Invest.* 1997 Apr;**99**(7):1546-1554

Baldini PM, De Vito P, Martino A, Fraziano M, Grimaldi C, Luly P, Zalfa F, Colizzi V. Differential sensitivity of human monocytes and macrophages to ANP : a role of intracellular pH on reactive oxygen species production through the phospholipase involvement. *J Leukoc Biol.* 2003 Apr;**73**(4) :502-510

Barnard MR. Effects of platelet binding on whole blood flow cytometry assays of monocyte and neutrophil procoagulant activity. *J Thromb Haemost.* 2005 Nov;**3**(11) :2563-2570

Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack A, Sturk A. Cell – derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost.* 2001 Apr;**85**(4):639-646

Blajchman MA. Substitutes and alternatives to platelet transfusions in thrombocytopenic patients. *J Thromb Haemostas.* 2003 Jul;**1**(7):1637-1641

Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouille Y. Hepatitis C virus entry depends on clathrin–mediated endocytosis. *J Virol.* 2006 Jul;**80**(14):6964-6972

Bode AP. Platelet activation may explain the storage lesion in platelet concentrates. *Blood Cells*. 1990;**16**(1):109-125

Boersma E, Akkerhuis KM, Theroux P, Califf RM, Topol EJ, Simoons ML. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibition in non-ST-elevation acute coronary syndromes: early benefit during medical treatment only, with additional protection during percutaneous coronary intervention. *Circulation*. 1999 Nov 16;**100**(20):2045-2048

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 Apr;**9**(4):458-62.

Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962 Jun;**194**(4832):927-929

Brisset AC, Terrisse AD, Dupouy D, Tellier L, Pech S, Navarro C, Sie P. Shedding of active tissue factor by aortic smooth muscle cells (SMCs) undergoing apoptosis. *Thromb Haemost*. 2003 Sep;**90**(3):511-518

Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmbäck K, Danton MJS, Colbert MC, Witte DP, Fujikawa K, Davie EW, Degen JL. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 Jun;**93**(13):6258-6263

Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost*. 2009 Mar;**101**(3):439-451

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 Sep 1;**23**(9):1690-6

Casella JF, Flanagan MD, Lin S. Cytochalasin D inhibits actin polymerisation and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change.

Nature. 1981 Sep 24;**293**(5831):302-305

Cattaneo M. Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs.

Expert Rev Cardiovasc Ther. 2007 Jan;**5**(1):45-55

Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem*. 1946 Nov;**166**(1):189-97

Chen YJ, Zhang P, Egelman EH, Hinshaw JE. The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 Jun;**11**(6):574-575

Dale B, Menezo Y, Cohen J, DiMatteo L, Wilding M. Intracellular pH regulation in the human oocyte. *Hum Reprod*. 1998 Apr;**13**(4):964-970

Danon D, Jerushalmy Z, DeVries A. Incorporation of influenza virus in human blood platelets in vitro. Electron microscopical observations. *Virology*. 1959 Dec;**9**(4):719-722

Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005 Sep 1;**106**(5):1604-11.

Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell*. 2005 Aug 12;**122**(3):379-391

Dessy C, Kelly RA, Balligand JL, Feron O. Dynamin mediates caveolar sequestration of muscarinic cholinergic receptors and alteration in NO signaling. *EMBO J*. 2000 Aug;**19**(16):4272-4280

Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest*. 2004 Jun;**34**(6):392-401. Review.

Diaz-Ricart M, Arderiu G, Estebanell E, Perez-Pujol S, Lozano M, White JG, Escolar G, Ordinas A. Inhibition of cytoskeletal assembly by cytochalasin B prevents signaling through tyrosine phosphorylation and secretion triggered by collagen but not by thrombin. *A J Pathol*. 2002 Jan;**160**(1):329-337

Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, Veit V, Combes V, Gentile S, Moal V, Sanmarco M, Sampol J. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost*. 2004 Apr;**91**(4):667-673

Donaldson JG, Porat-Shliom N, Cohen LA. Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cell Signal*. 2009 Jan;**21**(1):1-6

Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol*. 1989 May;**134**(5):1087-97

Draper M, Martell R, Levy, S. Active efflux of the free acid form of the fluorescent dye 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein in multidrug-resistance-protein-overexpressing murine and human leukaemia cells. *Eur J Biochem*. 1997 Jan;**243**(1-2):219-224

Eddleston M, de la Torre JC, Oldstone MB, Loskutoff DJ, Edgington TS, Mackman N. Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central nervous system. A role for astrocytes in cerebral hemostasis. *J Clin Invest*. 1993 Jul;**92**(1):349-358

Eilertsen KE, Osterud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004 Oct;15(7):521-38

Eisenman G, Szabo G, McLaughlin SGA, Ciana SM. Molecular basis for the action of macrocyclic carriers on passive ionic translocation across lipid bilayer membranes. *Bioenergetics*. 1973 Jan;4(1):93-148

Engelmann B. Initiation of coagulation by tissue factor carriers in blood. *Blood Cells Mol Dis*. 2006 Mar-Apr;36(2):188-190

Escolar G, White JG. Changes in glycoprotein expression after platelet activation: differences between in vitro and in vivo studies. *Thromb Haemost*. 2000 Mar;83(3):371-386

Falanga A, Marchetti M, Barbui T, Smith CW. Pathogenesis of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: the role of neutrophils. *Semin Hematol*. 2005 Oct;42(4):239-247

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 Jun 2;197(11):1585-98

Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI, Varki N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res*. 1990 Jul 15;59(2):421-37

Forscher P, Smith SJ. Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J Cell Biol*. 1988 Oct;107(4):1505-1516

Fox J E, Phillips D R. Inhibition of actin polymerization in blood platelets by cytochalasins. *Nature*. 1981 Aug 13;**292**(5824):650-2

Frelinger A L 3rd, Furman M I, Krueger L A, Barnard M R, Michelson A D. Dissociation of glycoprotein IIb/IIIa antagonists from platelets does not result in fibrinogen binding or platelet aggregation. *Circulation*. 2001 Sep 18;**104**(12):1374-9

Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost*. 2001 Jul;**86**(1):222-232

Gemmel CH, Sefton MV, Yeo EL. Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect. *J Biol Chem*. 1993 Jul 15;**268**(20):14586-14589

George, JN. Platelets. *Lancet*. 2000 Apr;**355**(9214):1531-39

George JN, Thoi LL, McManus LM, Reimann TA. Isolation of human platelet membrane microparticles from plasma and serum. *Blood*. 1982 Oct;**60**(4):834-840

Gold ES, Underhill DM, Morrissette NS, Guo J, McNiven MA, Aderem A. Dynamin 2 is required for phagocytosis in macrophages. *J Exp Med*. 1999 Dec;**190**(12):1849-1856

Green D. Coagulation cascade. *Hemodial In.t* 2006 Oct;**10** Suppl 2:S2-4

Hall AJ, Vos HL, Bertina RM. Lipopolysaccharide induction of tissue factor in THP-1 cells involves jun protein phosphorylation and nuclear factor κB nuclear translocation. *J Biol Chem*. 1999 Jan;**274**(1):376-383

Hallam TJ, Rink TJ. Responses to adenosine diphosphate in human platelets loaded with the fluorescent calcium indicator quin2. *J Physiol*. 1985 Nov;**368**:131-146

Hamilton KK, Hattori R, Esmon CT, Sims PJ. Complement proteins C5b–9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *J Biol Chem.* 1990 Mar 5;**265**(7):3809-6814

Harold FM, Altendorf KH, Hirata H. Probing membrane transport mechanisms with ionophores. *Annals N.Y. Acad Sci.* 1974 May;**235**(0):149-160

Hartwig JH, DeSisto M. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol.* 1991 Feb;**112**(3):407-425

Hechler B, Leon C, Vial C, Vigne P, Frelin C, Cazenave JP, Gachet C. The P2Y₁ receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood.* 1998 Jul;**92**(1):152-159

Heming TA, Bidani A. Intracellular pH regulation in U937 human monocytes: roles of V-ATPase and Na⁺/H⁺ exchange. *Immunobiology.* 2003;**207**(2):141-148

Henley, JR, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol.* 1998 Apr 6;**141**(1):85-99

Hirohashi T, Terasaki T, Shigetoshi M, Sugiyama Y. In vivo and in vitro evidence for nonrestricted transport of 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein tetraacetoxymethyl ester at the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 Feb;**280**(2):813-819

Honig MG, Hume RI. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol.* 1986 Jul;**103**(1):171-187

Honig MG; Hume RI. Dil and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trend Neurosci.* 1989 Sep;**12**(9):333-335, 3400-341

Hoffman, M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis.* 2003 Aug–Oct;**16**(1-2):17-20. Review

Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley P. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature.* 2001 Jan;**409**(6817):202-207

Hrachovinova I, Cambien B, Hafezi–Moghadam A, Kappelmayer J, Camphausen RT, Widom A, Xia L, Kazazian HH Jr, Schaub RG, McEver RP, Wager DD. Interaction of P–selectin and PSGL–1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia. *A Nat Med.* 2003 Aug;**9**(8):1020-1025

Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberger P, Eichinger S, Kyrle PA, Weltermann A. Tissue factor–positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost.* 2007 Jan;**97**(1):119-123

Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane Microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda).* 2005 Feb;**20**(1):22-27

Jones AT. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and a role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med.* 2007 Jul/Aug;**11**(4):670-684

Jones SM, Howell KE, Henley JR, Cao H, McNiven MA. Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans–Golgi network. *Science.* 1998 Jan 23;**279**(5350):573-577

Jy W, Horstman LL, Arce M, Ahn YS. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *J Lab Clin Med.* 1992 Apr;**119**(4):334-345

Kieffer N, Guichard J, Farcet JP, Vainchenker W, Breton-Gorius J. Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem.* 1987 Apr;**164**(1):189-195

Keuren JFW, Magdeleyns EJP, Bennaghmouch A, Bevers EM, Curvers J, Lindhout T. Microparticles adhere to collagen type I, fibrinogen, von Willebrand factor and surface immobilised platelets at physiological shear rate. *Br J Haemat.* 2007 Aug;**138**(4):527-533

Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, Kim HK, Ryu KW, Bae JM, Kim S. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. *Eur J Cancer.* 2003 Jan;**39**(2):184-191

Kobzar G, Mardla V, Jarving I, Samel N. Comparison of anti-aggregatory effects of PGI₂, PGI₃ and iloprost on human and rabbit platelets. *Cell Physiol Biochem.* 2001;**11**(5):279-84

Leon C, Alex M, Klocke A, Morgenstern E, Moosbauer C, Eckly A, Spannagl M, Gachet C, Engelmann B. Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. *Blood.* 2004 Jan 15;**103**(2):594-600

Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, Binder BR, Tedgui A, Belanger CM. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Feb;**49**(7):772-777

Lincoff AM, Califf RM, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Apr;**35**(5):1103-1115

Lopez-Vilchez I, Escolar G, Diaz-Ricart M, Fuste B, Galan AM, White JM. Tissue factor-enriched vesicles are taken up by platelets and induce platelet aggregation in the presence of factor VIIa. *Thromb and Haemost.* 2007 Feb;**97**(2):202-211

Lynch SF, Ludlam CA. Plasma microparticles and vascular disorders. *Br J Haematol*. 2007 Apr;**137**(1):36-48

Mackenzie AB, Mahaut-Smith MP, Sage SO. Activation of receptor-operated cation channels via P_{2X1} not P_{2T} purinoceptors in human platelets. *J Biol Chem*. 1996 Feb;**271**(6):2879-2881

Mack M, Kleinschmidt A, Bruhl H, Klier C, Nelson PJ, Chihak J, Plachy J, Stangassinger M, Erfle V, Schlondorff D. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med*. 2000 Jul;**6**(7):769-75.

Mackman N. The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesthesia and Analgesia*. 2009 May. **108**(5):1447-1452

Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Aug;**27**(8):1687-1693

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 Feb;**101**(8):841-843

Male R, Vannier WE, Baldeschwieler JD. Phagocytosis of liposomes by human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Oct 1;**89**(19):9191-5.

Maniatis T, Reed R. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*. 2002 Apr 4;**416**(6880):499-506

- Marks B, Stowell MHB, Vallis Y, Mills IG, Gibson A, Hopkins CR, McMahon H. GTPase activity of dynamin and resulting conformation change are essential for endocytosis. *Nature*. 2001 Mar;**410**(6825):231-235
- Maroney SA, Haberichter SL, Friese P, Collins ML, Ferrel JP, Dale GL, Mast AE. Active tussie factor pathway inhibitor is expressed on the surface of coated platelets. *Blood*. 2007 Mar;**109**(5):1931-1937
- Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin – independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Aug;**8**(8):603-612
- McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall–Carlson L, Bainton DF. GMP–140, a platelet alpha–granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel–Palade bodies. *J Clin Invest*. 1989 Jul;**84**(1):92-99
- Mellwig K P, Jakobs K H. Inhibition of platelet adenylate cyclase by ADP. *Thromb Res*. 1980 Apr 1-15;**18**(1-2):7-17
- Merrifield CJ, Feldman ME, Wan L, Almers W. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin–coated pits. *Nat Cell Biol*. 2002 Sep;**4**(9):691-698
- Merrifield, C J. Seeing is believing: imaging actin dynamics at single sites of endocytosis. *Trends Cell Biol*. 2004 Jul;**14**(7):352-8. Review
- Mills DCB, Robb IA, Roberts GCK. The release of nucleotides, 5–hydroxytryptamine and enzymes from human blood platelets during aggregation. *J Physiol*. 1968 Apr;**195**(3):715-729
- Molenaar D, Abee T, Konings WN. Continuous measurement of the cytoplasmic pH in *Lactococcus lactis* with a fluorescent pH indicator. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Nov 14;**1115**(1):75-83

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 Feb;**109**(3):995-1002

Movat HZ, Weiser WJ, Glynn MF, Mustard JF. Platelet phagocytosis and aggregation. *J Cell Biol*. 1965 Dec;**27**(3):531-543

Mulkey DK, Henderson III RA, Ritucci NA, Putnam RW, Dean JB. Oxidative stress decreases pHi and Na⁺/H⁺ exchange and increases excitability of solitary complex neurons from rat brain slices. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Dec;**286**(4): C940-C951

Muller I, Klocke A, 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 Mar;**17**(3):476-8

Ni H, Freedman J. Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfus Apher Sci*. 2003 Jun;**28**(3):257-264

Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol*. 2001 Oct;**11**(10):406-412

Nishiya T, Toma C. Interaction of platelets with liposomes containing dodecapeptide sequence from fibrinogen. *Thromb Haemost*. 2004 Jun;**91**(6):1158-1167

Niya K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziel JA, Plow EF, Ruggeri ZM. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood*. 1987 Aug;**70**(2):475-483

Nomura S, Suzuki M, Katsura K, Xie GL, Miyazaki Y, Miyake T, Kido H, Kagawa H, Fukuhara S. Platelet-derived microparticles may influence the development of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 1995 Aug;**116**(2):235-240

Ogura H, Tanaka H, Koh T, Fujita K, Fujimi S, Nakamori Y, Hosotsubo H, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H. Enhanced production of endothelial microparticles with increased binding to leukocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *J Trauma*. 2004 Apr;**56**(4):823-830;discussion 830-831

Oliver AE, Tablin F, Walker NJ, Crowe JH. The internal calcium concentration of human platelets increases during chilling. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999 Jan;**1416**(1-2):349-36

Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;**74**(12):5260-5264

Ozkan P, Mutharasan R. A rapid method for measuring intracellular pH using BCECF-AM. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Aug 15;**1572**(1):143-148

Panes O, Matus V, Sáez CG, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D. Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood*. 2007 Jun;**109**(12):5242-5250

Paradiso AM, Tsien RY, Machen TE. Na⁺-H⁺ exchange in gastric glands as measured with a cytoplasmic-trapped, fluorescent pH indicator. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984 Dec; **81**(23): 7436-7440

Pawlinski R, Pedersen B, Ehrlich J, Mackman N. Role of tissue factor in haemostasis, thrombosis, angiogenesis and inflammation: lessons from low tissue factor mice. *Thromb Haemost*. 2004 Sep;**92**(3):444-450

Pelkmans L, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*. 2002 Apr;**296**(5567):535-539

Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*. 2001 May;**3**(5):473-483

Piccin A, Murphy WF, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev*. 2007 May;**21**(3):157-171

Polgar J, Matuskova J, Wager DD. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost*. 2005 Aug;**3**(8):1590-1596

Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa, the responsive integrin. *Cell*. 1991 May 3;**65**(3):359-362

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 Feb;**41**(2):211-217

Quinn MJ, Byzova TV, Qin J, Topol EJ, Plow EF. Integrin α IIb β 3 and its antagonism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Jun 1;**23**(6):945-952

Rauch U, Bondermann D, Bohrmann B, Badimon JJ, Hember B, Riederer MA, Nemerson Y. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood*. 2000 Jul 1;**96**(1):170-175.

Reininger A J, Heijnen H F G, Schumann H, Specht H, Schramm W, Ruggeri Z M. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood*. 2006 May;**107**(9):3537-3545

Reverter JC, Beguin S, Kessels H, Kumar R, Hemker HC, Coller BS. Inhibition of platelet – mediated, tissue factor–induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and ‘clinical restenosis’. *J Clin Invest*. 1996 Aug 1;**98**(3):863-874

Rosado JA, Sage SO. The actin cytoskeleton in store–mediated calcium entry. *J Physiol*. 2000 Jul 15;**526** Pt 2:221-229

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying Y–S, Glenney JR, Anderson RGW. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*. 1992 Feb;**68**(4):673-682

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*. 2002 Sep;**51**(9):2840-2845

Sage SO, Rink TJ. Kinetic differences between thrombin-induced and ADP-induced calcium influx and release from internal stores in fura-2-loaded human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986 May;**136**(3):1124-1129

Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sima JJ. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VIII–Von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature*. 1979 Jun;**279**(5714):636-638

Savage B, Almus–Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate–receptor interactions in platelet thrombus formation. *Cell*. 1998 Sep;**94**(5):657-666

Savi P, Herbert JM. Clopidogrel and ticlopidine: P2Y₁₂ adenosine diphosphate–receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2005 Apr;**31**(2):174-183

Schechter AD, Spirn B, Rossikhina M, Giesen PL, Bogdanov V, Fallon JT, Fisher EA, Schnapp LM, Nemerson Y, Taubman MB. Release of tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000 Jul 21;**87**(2):126-132

Schenone M, Furie BD, Furie B. The blood coagulation cascade. *Current Opinion in Hematology*. 2004 Jul;**11**(4):272-277

Schnappo LM, Nemerson Y, Taubman MB. Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000 Jul;**87**(2):126-132

Schneider DJ, Aggarwal A. Development of glycoprotein IIb/IIIa antagonists: translation of pharmacodynamic effects into clinical benefit. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2004 Nov;**2**(6):903-913

Scholz T, Temmler U, Krause S, Heptinstall S, Losche W. Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P. *Thromb Haemost*. 2002 Dec;**88**(6):1033-1038

Schwartz HJ, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley R, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal – dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med*. 2006 Oct;**203**(11):2433-2440

Sever S, Muhlberg AB, Schmid SL. Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor – mediated endocytosis. *Nature*. 1999 Apr;**396**(6727):481-486

Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Heibel RP. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood*. 2003 Oct;**102**(7):2678-2683

Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets*. 2002 Jun;**13**(4):247-53.

Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem*. 1989 Oct;**264**(29):17049-57

Song BD, Schmid SL. A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry*. 2003 Feb;**42**(6):1369-1376

Springer W, von Ruecker A, Dickerhoff R. Difficulties in determining prophylactic transfusion thresholds of platelets in leukemia patients. *Blood*. 1998 Sep;**92**(6):2183-2184

Stel HV, Sakariassen KS, de Groot PG, van Mourik JA, Sixma JJ. Von Willebrand factor in the vessel wall mediates platelet adherence. *Blood*. 1985 Jan;**65**(1):85-90

Sturk – Maquelin KN, Nieuwland R, Romijn FP, Eijssman L, Hack CE, Sturk A. Pro- and non-coagulant forms of non-cell-bound tissue factor in vivo. *J Thromb Haemost*. 2003 Sep;**1**(9):1920-1926

Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer*. 1976 May;**17**(5):565-577

Tablin F, Oliver AE, Walker NJ, Crowe LM, Crowe JH. Membrane phase transition of intact human platelets: correlation with cold-induced activation. *J Cell Physiol*. 1996 Aug;**168**(2):305-313

Tanaka KA, Katori N, Szlam F, Sato N, Kelly AB, Levy JH. Effects of tirofiban on haemostatic activation in vitro. *Br J Anaesth*. 2004 Jun;**93**(2):263-269

Tjio J H, Puck T T. Genetics of somatic mammalian cells. *J Exp M*. 1958 Aug;**108**(2):259-268

Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood*. 1996 Sep;**88**(5):1583-1587

Topol EJ, Byzova TV, Plow EF. Platelet GPIIb/IIIa blockers. *Lancet*. 1999. Jan 16;**353**(9148):227-231

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterisation of a human acute monocytic leukaemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980 May; **26**(2):171-176

van der Blik AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL. Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol*. 1993 Aug;**122**(3):553-563

van Veen HW, Abee T, Kortstee GJJ, Pereira H, Konings WN, Zehnder AJB. Generation of a proton motive force by the excretion of metal-phosphate in the polyphosphate-accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210A. *J Biol Chem*. 1994 Nov 25;**269**(47):29509-29514

van Wijk MJ, Nieuwland R, Boer K, van der Post JAM, van Bavel E, Sturk A. Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: possible involvement in vascular dysfunction? *Am J Obstet Gynecol*. 2002 Aug;**187**(2):450-456

van Wijk, M J, VanBavel, E, Sturk A, Nieuwland, R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2003 Aug;**59**(2):277-287

Vilella S, Schiavone R, Zilli L, Marsigliante S, Storelli C. Characterization of Na⁺/H⁺ antiporter activity in PC-C13 thyroid cells. *Cell Physiol Biochem*. 2003;**13**(4):207-214

Wagner DD. New links between inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jul;**25**(7):1321-1324

Wang L H, Rothberg K G, Anderson R G. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol.* 1993 Dec;**123**(5):1107-17

Weerheim AM, Kolb AM, Sturk A, Nieuwland R. Phospholipid composition of cell – derived microparticles determined by one–dimensional high–performance thin–layer chromatography. *Anal Biochem.* 2002 Feb;**302**(2):191-198

Wencel–Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM, Ginsberg MH. Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol.* 1986 Aug;**124**(2):324-334

White JG. Uptake of latex particles by blood platelets: phagocytosis or sequestration? *Am J Pathol.* 1972 Dec;**69**(3):439-50

White JG, Krivit W. An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling. *Blood.* 1967 Nov;**30**(1):625-635

Wilde J I, Retzer M, Siess W, Watson SP. ADP–induced platelet shape change: an investigation of the signalling pathways involved and their dependence on the method of platelet preparation. *Platelets.* 2000 Aug;**11**(5):286-95

Winokur R, Hartwig JH. Mechanism of shape change in chilled human platelets. *Blood.* 1995 Apr;**85**(7):1796-1804

Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967 May;**13**(3):269-288

Wright K M, Oparka K J. Uptake of lucifer yellow CH into plant–cell protoplasts: a quantitative assessment of fluid phase endocytosis. *Planta*. 1989 Sep;**179**(2):257-264

Woods VL, Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem*. 1986 Nov 15;**216**(32):15242-15251

Youssefian T, Drouin A, Masse JM, Guichard J, Cramer E. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood*. 2002 Jun 1;**99**(11):4021-9.

Zillmann A, Luther T, Muller 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 Feb 23;**281**(2):603-9

Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal–dependent protein synthesis by activated platelets. New pathways to altered phenotype and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Mar;**28**(3):17-24

Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*. 1997 Feb;**89**(4):1121-1132

VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und gefördert haben. Mein besonderer Dank gilt:

Allen voran Prof. Dr. Bernd Engelmann für die Bereitstellung des interessanten Themas und die umfassende Betreuung und Unterstützung der letzten Jahre,

Prof. Dr. Dr. Seidel für die Möglichkeit, die Experimente für die vorliegende Arbeit am Institut für Klinische Chemie am Universitätsklinikum Großhadern durchführen zu können,

Priv.–Doz. Dr. Stefan Zahler für die Vorversuche am LSM,

Priv.–Doz. Dr. Ralf Gräf (Firma Zeiss) für geduldige Einführung am LSM,

Prof. Dr. Schleicher und seiner Arbeitsgruppe für die Möglichkeit, die LSM–Versuche im Adolf–Butenandt–Institut/Zellbiologie der LMU München durchführen zu können,

allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Susi, Lenka, Nina, Tini, Kiril, Katja, Berid, Silke, Christoph und Davit für die gegenseitige Unterstützung und angenehme Arbeitsatmosphäre,

Pia und Prof. Peter Lohse für die ständige Hilfsbereitschaft und ein immer offenes Ohr,

und ein besonders großes Dankeschön meiner Mutter, meinen Brüdern und meinen Freunden, die mich stets ermutigt und unermüdlich unterstützt haben und mir die Kraft gaben, diese Arbeit zu vollenden.

IX. Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Verena Clarissa Haringer
Anschrift: Gutenbergstr. 19, 93051 Regensburg
Telefon: 0176/78028867
Geburtsdatum und -ort: 16.06.1982 in Pfarrkirchen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1988-1992: Grundschule in Roßbach (Landkreis Rottal –Inn)
1992–2001: Gymnasium in Pfarrkirchen

Hochschulbildung:

2001–2008: Ludwig–Maximilians–Universität, München:
Studium der Humanmedizin
2003 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Approbation als Ärztin

Berufliche Tätigkeit

seit 09/2008 Assistenzärztin an der Universitätsklinik Regensburg
Klinik und Poliklinik für Neurologie

Dissertation

seit 12/2003: Promotionsarbeit: „Interaktionen zwischen
Thrombozyten und Mikropartikeln und deren
Bedeutung für die initiale Blutgerinnung“.
Experimenteller Teil 2003–2006

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

S. Pfeiler, **V. Haringer**, G. Hoffmann, M. Schröder, R. Hinkel, F.-J. Gildehaus, C. Kupatt, B. Engelmann. CD 36 supports endocytic internalization of microparticles in vitro and promotes their clearance in vivo. *Hämostaseologie*. 2010 Feb;**30**(1)
(Abstract)

S. Pfeiler, **V. Haringer**, C. Steib, F.-J. Gildehaus, C. Kupatt, B. Engelmann. MP clearance in vivo is mediated by CD36 which also supports microparticle –internalization via endocytosis in vitro. *(in preparation)*

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit eigenständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Verena Haringer