

**Aus dem Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Ulrich Pohl**

**Die Stimulierung des Kontaktaktivierungssystems
der menschlichen Blutgerinnung durch Lipoprotein-
assoziierte Phospholipide**

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

Vorgelegt von

Sonja Anna-Maria Gabriele Klein

aus

München

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bernd Engelmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Heindl

Priv. Doz. Dr. Dr. Erwin Strobel

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

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2011

Inhaltsverzeichnis

Publikation	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	10
1 Einleitung	11
1.1 Das Gleichgewicht der Blutgerinnung in Gefahr	11
1.2 Das Kontaktsystem der Blutgerinnung	11
1.3 Aktivierung von Faktor XII und Kallikrein	13
1.4 Hyperlipidämien und prothrombotische Mechanismen des Kontaktaktivierungssystems .	16
1.5 Zielsetzungen	18
2 Methoden	19
2.1 Blutentnahme	19
2.2 Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) und plättchenarmem Plasma (PAP)	19
2.3 Zellzahlbestimmung	20
2.4 Kinetik der Thrombinbildung	20
2.5 Thrombinbildung bei isolierten Plättchen	21
2.6 Versuche mit TEG	22
2.6.1 Messprinzip	22
2.6.2 Methodik	24
2.7 LDL-Entfernung mittels Chromatographiesäulen	24
2.8 Präparative Lipoproteinisolierung aus Plasma	24
2.9 Proteinbestimmung nach Bradford	26
2.10 Lipidextraktion aus Plasma nach Bligh und Dyer (52)	26
2.11 Herstellung von Lipidvesikeln	27
2.12 Auftrennung der Phospholipide mittels Dünnschicht-chromatographie	27
2.13 Eluieren der Lipide	29
2.13.1 Herauslösen der Phospholipide aus dem Kieselgel	29
2.13.2 Reinigung der Lipide	29

2.14	Phosphatbestimmung nach 2-dimensionaler Dünnschichtchromatographie.....	30
3	Materialien und Geräte.....	31
3.1	Materialien	31
3.1.1	Puffer und Reagenzien	31
3.1.2	Blut- und Thrombozytenpräparation	32
3.1.2.1	Blutentnahme.....	32
3.1.2.2	Thrombozytenpräparation	32
3.1.3	Prothrombinkomplex-Bildung	33
3.1.4	LDL-Entfernung mittels Chromatographie	33
3.1.5	Präparative Phospholipidgewinnung.....	33
3.1.6	Lipidextraktion und Vesikelbildung.....	33
3.1.7	Proteinbestimmung.....	34
3.1.8	Phospholipidgewinnung mittels Dünnschichtchromatographie.....	34
3.1.9	Phosphatbestimmung	34
3.1.10	Vollblutkoagulometrie.....	34
3.2	Materialien und Geräte	34
3.2.1	Materialien	34
3.2.2	Geräte	35
3.3	Statistik	36
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Einfluss der Kontaktaktivierung auf die Thrombinbildung im PRP.....	37
4.2	Beeinflussung der Thrombinbildung durch Lipoproteine	41
4.3	Wirkungen von Phospholipid-Komponenten der Lipoproteine auf die Prothrombinase-Aktivität.....	47
5	Diskussion.....	55
5.1	Thrombozyten-abhängige Aktivierung des Kontaktsystems durch VLDL.....	55
5.2	Stimulierung des Kontaktsystems durch Phospholipidvesikel im PRP	57
5.3	Mechanismen der Aktivierung des Kontaktsystems durch VLDL	58
5.4	Phosphatidylethanolamin als Aktivator des Kontaktsystems.....	59
5.5	Blutgerinnung - Bedeutung für die Klinik.....	62
6	Zusammenfassung	64
7	Referenzen.....	65

8	Anhang.....	75
	Danksagung	75

Publikation

Klein S., Spannagl M., Engelmann B.

Phosphatidylethanolamine Participates in the Stimulation of the Contact System of Coagulation by Very-Low-Density Lipoproteins.

Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 2001; 21:1695-1700

Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acid-Citrate-Dextrose
Apo-B	Apoprotein B
BHT	2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol
bidest.	Bidestilliert
BK	Bradykinin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
ca.	circa
cm	Zentimeter
CTI	Corn-trypsin-inhibitor
DC	Dünnschichtchromatographie
dest.	Destilliert
dl	Deziliter
DPH	1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI-PC	Ei-Phosphatidylcholin
ELISA	Enzyme Linked Immuno Assay
F V(a)	Faktor V(a)
F VII(a)	Faktor VII(a)
F VIII(a)	Faktor VIII(a)
F IX(a)	Faktor IX(a)
F X(a)	Faktor X(a)
F XI (a)	Faktor XI(a)
F XII(a)	Faktor XII(a)
F XII-def.	Faktor XII-defizient
g	Gramm
g	Erdanziehungskraft
h	hora (e)
HCl	Salzsäure

HDL	High Densitiy Lipoprotein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMWK	High Molecular Weight Kininogen
H ₂ O	Wasser
i. R.	im Rahmen
k	Rate des Thrombuswachstums (mm)
KBr	Kaliumbromid
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LDL	Low Densitiy Lipoprotein
LPC (Lyso-PC)	1-Acyl-2-Lyso-Phosphatidylcholin
MA	Maximale TEG Amplitude
M	Molar
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mO.D./min	Rate der Änderung der Optischen Dichte pro Minute
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PA	Phosphatidsäure
PAP	Plättchenarmes Plasma
PBS	Phosphat Buffert Saline
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin

PI	Phosphatidylinositol
pH	potentia hydrogenii, pH-Wert als Maß für die saure oder alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung
PK	Prekallikrein
PRP	Plättchenreiches Plasma
PS	Phosphatidylserin
r	Rate der Fibrinbildung (mm)
s	Sekunde(n)
SM	Sphingomyelin
TEG	Thrombelastograph
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
uPAR	Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
z. B.	zum Beispiel
Zn ²⁺	Zink

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Extrinsischer und intrinsischer Weg der Fibrinbildung.....	13
Abb.2: Aktivierung von HMWK, PK/F XI und F XII.	15
Abb. 3: Schematische Darstellung der Kurve der Thrombinbildung	21
Abb. 4: Prinzip der Thrombelastographie	23
Abb. 5: Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie.....	28
Abb. 6: Zeitabhängigkeit der Thrombinbildung im PRP.....	37
Abb. 7: Thrombinbildung durch das Kontaktsystem	39
Abb. 8: Zugabe von Lipoproteinen zu LDL-depletiertem PRP	41
Abb. 9: Konzentrationsabhängigkeiten der VLDL-Wirkung auf die Thrombinbildung.....	42
Abb. 10: F XII-Abhängigkeit der VLDL-stimulierten Thrombinbildung	43
Abb. 11: Thrombinbildung im PAP nach Zugabe von VLDL und Thrombin.....	44
Abb. 12: Wirkung von VLDL auf die Fibrinbildung im Vollblut.....	46
Abb. 13: Wirkungen verschiedener Lipidfraktionen von VLDL auf die Thrombinbildung	48
Abb. 14: Thrombinbildung nach Zugabe einzelner Phospholipid-Fractionen des VLDL.....	49
Abb. 15: Thrombinstimulation durch VLDL-assoziiertes PE	50
Abb. 16: Wirkung synthetischer Phospholipide auf die Thrombinbildung	51
Abb. 17: Eliminierung einzelner Phospholipidfraktionen	52
Abb. 18: Vergleich der Thrombinstimulation von VLDL und einem aus synthetischen Phospholipiden hergestelltem VLDL-Gemisch.....	54
Abb. 20: Direkte Aktivierung von F XIIa durch VLDL-assoziiertes PE	60
Abb. 21: Aktivierung des Kontaktsystems durch Thrombozyten-assoziiertes PE	62

1 Einleitung

1.1 Das Gleichgewicht der Blutgerinnung in Gefahr

Die Blutgerinnung ist ein komplexes System, in dem das abgestimmte Zusammenspiel der einzelnen Gerinnungsfaktoren von essentieller Bedeutung für die reibungslose Hämostase nach Gefäßverletzung ist. Eine überschießende Gerinnungsaktivierung kann ebenso lebensgefährlich sein wie eine fehlende Gerinnungsaktivierung. Eine überschießende Reaktion führt zu Thrombosierungen und die ausbleibende Reaktion bedeutet Blutungen. Das Gleichgewicht unserer Blutgerinnung hängt dabei allerdings nicht nur von den Gerinnungsfaktoren, sondern, besonders in den Industrienationen, immer mehr auch von den sogenannten Risikofaktoren für Atherosklerose und Thrombosen ab. Zu diesen gehört unter anderem auch die Hypertriglyceridämie. Aus diesem Grund ist die Erforschung der genauen Mechanismen der Beeinflussung der Blutgerinnung durch Lipoproteine für die moderne Präventionsmedizin von entscheidender Bedeutung. Behandlungsstrategien können entwickelt werden noch bevor Erkrankungen wie Schlaganfall und Herzinfarkt auftreten.

1.2 Das Kontaktsystem der Blutgerinnung

Das Gerinnungssystem wird in ein intrinsisches und ein extrinsisches System eingeteilt.

Im extrinsischen System wird durch eine Gewebsverletzung tissue factor (TF) freigesetzt. Nach Kontakt mit Blut bildet Faktor VII/ VIIa (F VII/ F VIIa) einen Komplex, der dann in Anwesenheit von Phospholipiden und Ca^{2+} Faktor X (F X) aktiviert. Der Komplex aus Faktor VIIa und TF wird als extrinsischer Tenase-Komplex (**Abb. 1**) bezeichnet.

Faktor Xa (F Xa) bildet dann mit den Faktoren Va (F Va), Ca^{2+} und Phospholipiden den Prothrombinasekomplex, der seinerseits Prothrombin in aktives Thrombin spaltet. Damit kommt es schließlich zur Bildung von Fibrin und zur Blutgerinnung (Nemerson et al., 1982; Camerer et al., 1996).

Beim intrinsischen System wird von einer initialen Aktivierung des Faktor XII (F XII) durch Kontakt mit anionischen Oberflächen ausgegangen. Als Kofaktoren fungieren hierbei Prekallikrein (PK) und high molecular weight kininogen (HMWK). Nach der Aktivierung des Faktor XII in XIIa erfolgt kaskadenartig die Aktivierung von Faktor XI (F XI) gefolgt von der

Aktivierung von Faktor IX (F IX) durch Faktor XIa. Schließlich bildet der Faktor IXa zusammen mit Faktor VIIIa (F VIIIa), Phospholipiden und Ca^{2+} einen Komplex, der Faktor X aktiviert. Der Komplex aus Faktor IXa und Faktor VIIIa wird als intrinsischer Tenase-Komplex bezeichnet (**Abb. 1**).

Faktor XII, HMWK und PK, die Starterproteine des intrinsischen Wegs der Gerinnung, müssen mit Endothelzellen, Thrombozyten oder mit künstlichen Oberflächen in Kontakt treten, um aktiviert zu werden. Aus dieser Beobachtung entstand der Begriff des „Kontaktsystems“.

Neuere Forschungsergebnisse haben allerdings zeigen können, dass TF auch über Querverbindungen den intrinsischen Weg aktivieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass ein Komplex aus TF und Faktor VIIa Faktor IX direkt in seine aktive Form überführen kann und somit in das intrinsische System eingreifen kann (Osterud et al. 1977; Bom et al., 1991; Rapaport et al., 1992) (**Abb. 1**).

Das im extrinsischen System entstandene Thrombin kann die Faktoren V (F V), VIII und XI aktivieren, und so ebenfalls in das intrinsische System eingreifen (Esmon et al., 1979; Eaton et al., 1986; Naito et al., 1991).

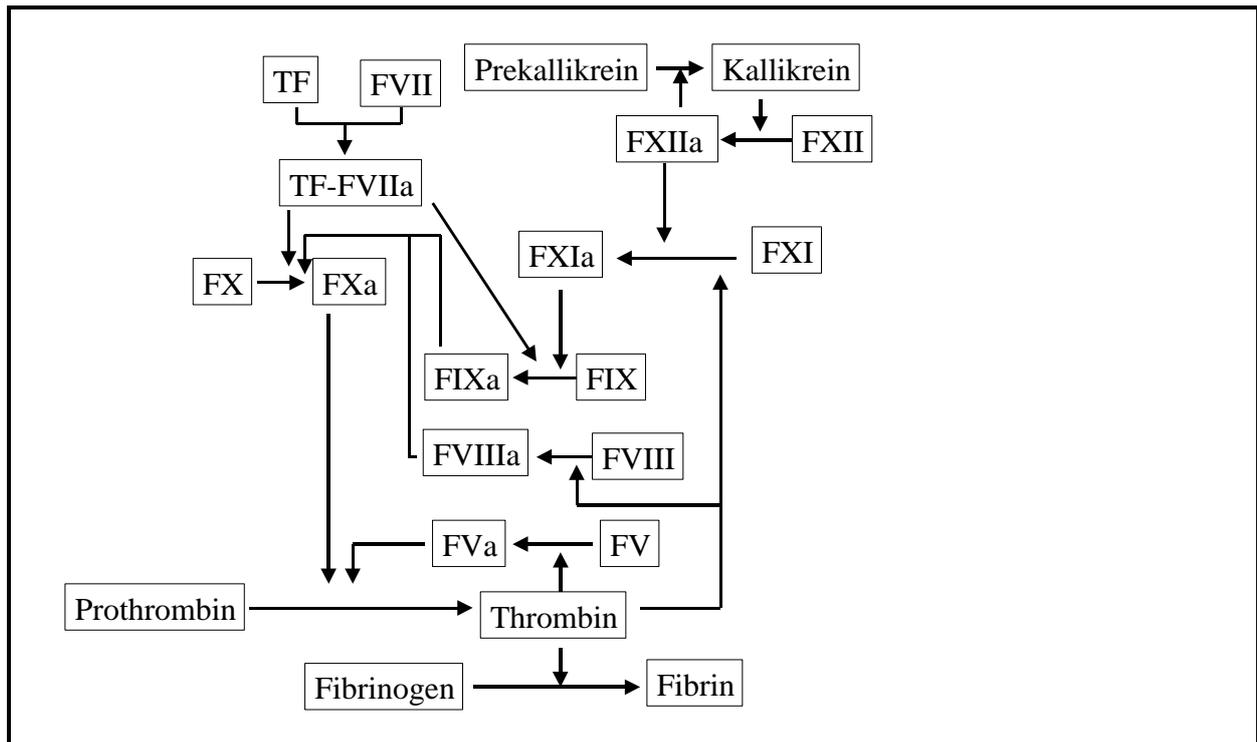


Abb. 1: Extrinsischer und intrinsischer Weg der Fibrinbildung

Vereinfachte Darstellung der menschlichen Blutgerinnung. Über den extrinsischen Weg aktiviert TF als extrinsischer Tenase-Komplex mit F VIIa F IX zu IXa und F X zu Xa. F Xa löst gemeinsam mit F Va im Prothrombinasekomplex die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin aus. Thrombin ist in der Lage Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln und über positive Rückkopplung die Faktoren V, VIII und XI zu aktivieren. Nach Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen wird F XII in F XIIa überführt. Dieser kann sowohl aus Prekallikrein Kallikrein abspalten, als auch F XI in XIa umwandeln. Kallikrein führt über positive Rückkopplung zur massiven Bildung von F XIIa. F XIa führt nach Aktivierung des intrinsischen Tenase-Komplexes (F IXa mit F VIIa) zur Aktivierung von F X.

1.3 Aktivierung von Faktor XII und Kallikrein

Da nun Faktor XII einer der Initiatoren der Gerinnungskaskade ist, ist es umso erstaunlicher, dass bei Personen mit homozygoter Faktor XII-Defizienz keine Blutungsneigung beobachtet wird (Furie et al., 1988). Auch zeigen Mäuse mit homozygoter Faktor XII-Defizienz keine verlängerte Blutungszeit (Pauer et al., 2004).

Diese Beobachtungen führten zu der Schlußfolgerung, dass Faktor XII für die physiologische Blutstillung (Hämostase) in vivo wohl nicht erforderlich ist.

Es wurden weitere Studien durchgeführt die die antikoagulatorischen, profibrinolytischen, antiadhäsiven und proinflammatorischen Eigenschaften der Proteine des Kontaktsystems

HMWK, PK, F XII, F XI untersuchten. Die Wissenschaft kam bisher allerdings zu keiner einheitlichen Meinung über die Bedeutung der prokoagulatorischen und fibrinolytischen Eigenschaften dieser Proteine.

Die prokoagulatorischen Eigenschaften von HMWK hängen von zwei Fähigkeiten ab: Zum einen von dessen Bindung an negativ geladenen Oberflächen und der Interaktion mit F XI und PK und zweitens von der Bindung an Thrombozyten, Endothelzellen und Neutrophilen (Schmaier et al., 1987; Greengard et al., 1986; Reddigari et al., 1989; Kaufmann et al., 1993).

PK ist in seiner Aminosäurestruktur dem F XI sehr ähnlich (Asakai et al., 1987) und kann auf Endothelzellen ähnlich wie PK aktiviert werden (Schmaier et al., 1999). In vitro ist F XII zur Aktivierung von PK auf negativ geladenen Oberflächen nötig. Allerdings kann auf Endothelzellen PK gebunden an HMWK ohne F XII aktiviert werden (Wuepper et al., 1972; Motta et al., 1998).

F XII, HMWK und Prourokinase sind Substrate von Kallikrein. Letzteres stellt einen der wichtigsten Plasminogenaktivatoren dar und hat somit Einfluss auf die Fibrinolyse (Hauert et al., 1989; Ichinose et al., 1986; Gurewich et al., 1993).

HMWK bindet über Cytokeratin 1-Antigen in Kombination mit Zn^{2+} an Endothelzellen, Thrombozyten und Granulozyten und erlaubt so die Aktivierung von PK (**Abb. 2**). Als ein weiterer Rezeptor für HMWK wurde der Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPAR) identifiziert (**Abb. 2**), der in Endothelzellen und Granulozyten lokalisiert ist, nicht aber in Thrombozyten (Colman et al., 1997). Zusätzlich zu diesen beiden Rezeptoren gibt es noch gC1qR, der als HMWK-Bindungsrezeptor angesehen wird (**Abb. 2**). Dieser Rezeptor bindet auch F XII (Herwald et al., 1996; Joseph et al., 1996). Es gibt Anhalte dafür, dass HMWK über zwei weitere Rezeptoren an Plättchen binden kann, allerdings ist die Identität der Rezeptoren noch nicht bekannt. Nachdem die Mehrheit von PK und F XI im Plasma an HMWK gebunden ist, liegt es nahe, dass auch F XI als Rezeptor für diese Proteine an Thrombozyten und Endothelzellen dienen könnte. Wenn PK an HMWK gebunden ist bildet es dreimal so viele Komplexe mit HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), wie PK alleine. Dieses Ergebnis unterstützt das Ergebnis, dass HMWK als Rezeptor für PK fungieren könnte (Motta et al., 1998). Schmaier et al. postulieren weiterhin, dass gebundenes PK auf Zellmembranen nicht durch F XII aktiviert wird, sondern höchstwahrscheinlich durch eine membranassoziierte Cystein-Protease (Schmaier et al., 1999).

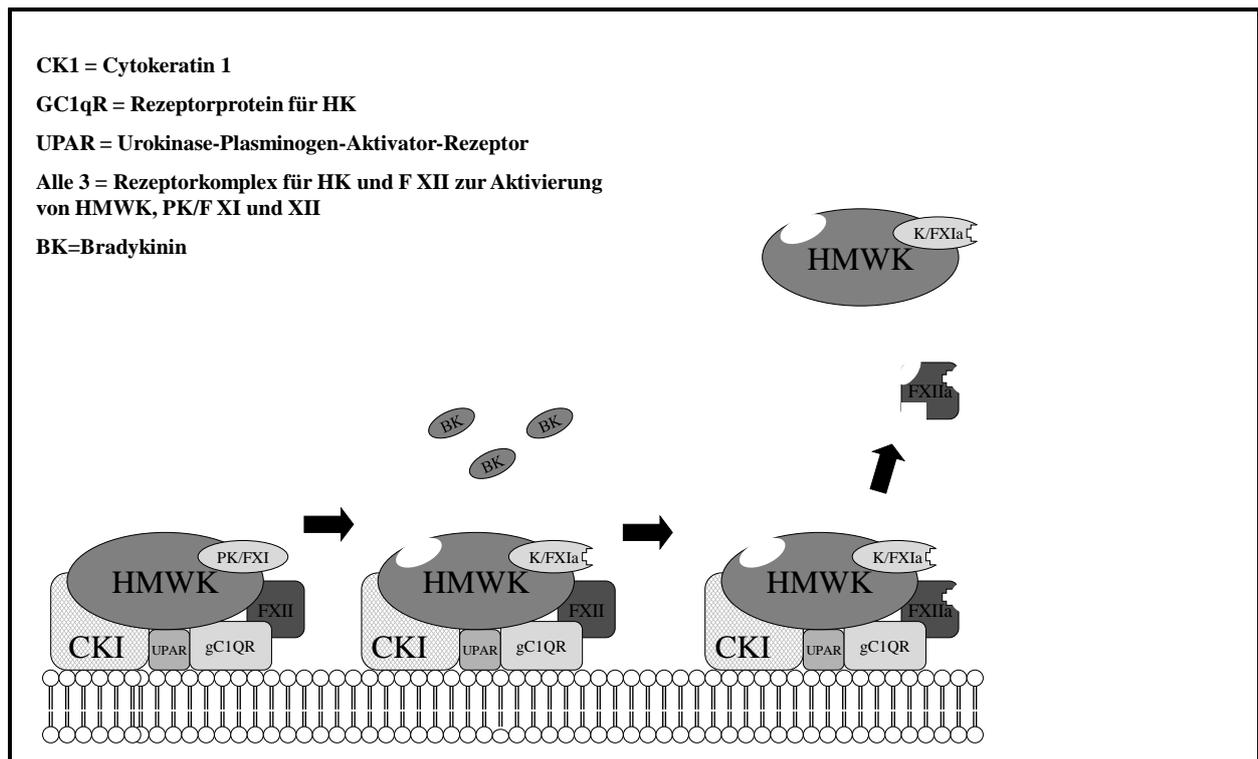


Abb. 2: Aktivierung von HMWK, PK/F XI und F XII.

HK bindet an einen Rezeptorkomplex bestehend aus Cytokeratin 1, GC1qR, Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor auf den Zellmembranen und wird dadurch aktiviert. Hierdurch entsteht Bradykinin und Prekallikrein wird zu Kallikrein bzw. F XI zu F XIa aktiviert. Auch F XII wird in diesem Komplex aktiviert und anschließend freigesetzt (nachempfunden aus Schmaier 1999).

Schmaier et al. konnten nachweisen, dass es zu keiner Autoaktivierung des F XII auf Endothelzellen kommt, gleichzeitig aber eine weiter fortschreitende Aktivierung von PK und eine schnellere Aktivierungsrate sowie ausgeprägtere Aktivierung von PK durch die Anwesenheit von F XII (Røjkjær et al., 1998 a) bewirkt wird. Daraus erschließt sich, dass auf künstlichen Oberflächen F XIIa durch Autoaktivierung gebildet wird, auf Endothelzellen hingegen durch PK. Damit stellt PK den kritischen ersten Schritt der Aktivierung des Kontaktsystems der Blutgerinnung auf Endothelzellen dar (Schmaier et al., 1999).

Auch die Aktivierung von F XI auf Endothelzellen erfolgt gebunden an HMWK und F XII-unabhängig durch eine Cystein-Protease. Ein aktivierter F XI kann dann F X aktivieren, wenn gleichzeitig F IX und VIIIa vorhanden sind (Røjkjær et al., 1998 b).

Die Aktivierung des F XII kann also prinzipiell entweder durch Autoaktivierung oder durch eine Fremdprotease erfolgen. Des Weiteren kann sie in der flüssigen Phase oder durch Bindung an negativ geladene Oberflächen vermittelt werden (Cochrane et al., 1973).

Die Kininogen-Bindung kann die Aktivierung des Kontaktsystems modulieren, da das HMWK als Rezeptor für F XI und Prekallikrein dient. Zudem ist über eine F XII-unabhängige PK-Aktivierung (Motta et al., 1998) und damit Kallikreinbildung eine weitere Aktivierung von F XII möglich, was wiederum zu einer Aktivierung der F XII-abhängigen Kallikrein-Bildung führt (Lenich et al., 1995; Plow et al., 1982).

Beides führt zur Freisetzung des Peptids Bradykinin (BK), das verschiedene physiologische Mechanismen beeinflusst (**Abb. 2**). Bradykinin hemmt die Thrombozytenfunktion (Crutchley et al., 1983; Hong et al., 1980), die Superoxidbildung (Holland et al., 1990) und die Freisetzung von Gewebeplasminogen-Aktivatoren. Gleichzeitig stimuliert es die Plasminogen-Aktivierung (Smith et al., 1983; Brown et al., 1997), Stickoxidbildung (Palmer et al., 1987) und die Bildung des Endothel-abhängigen smooth muscle hyperpolarisation factor (Nakashima et al., 1993).

Das Kontaktsystem leistet so möglicherweise auch einen entscheidenden Beitrag zur Fibrinolyse.

1.4 Hyperlipidämien und prothrombotische Mechanismen des Kontaktaktivierungssystems

Ein Zusammenhang zwischen Hyperlipidämie und erhöhtem Risiko für Thrombosen wird seit längerer Zeit postuliert. Einige Studien zeigten Zusammenhänge von Hyperlipidämien und Arteriosklerosen der Koronararterien mit erhöhten Faktor XIIa-Spiegeln im Blut. Nach Kohler et al. dienen dabei besonders Triglyceride als unabhängige Prädiktoren für hohe F XIIa-Level (Kohler et al., 1998). Miller et al. zeigen ebenfalls, dass koronare Herzerkrankungen mit erhöhten F XIIa-Level im Blut in Verbindung stehen (Miller et al., 1997).

Ishii et al. und Zito et al. bestätigen die Verbindung zwischen einer F XII-Aktivierung und der Entstehung von Hyperlipidämien (Ishii et al., 2000; Zito et al., 2000). Bereits in früheren Studien konnten Kelleher et al. eine Korrelation zwischen der Aktivität von F XIIa mit der Blutkonzentration von Triglyceriden und VLDL-Cholesterin zeigen (Kelleher et al., 1992). Sie bestätigten die Hypothese, dass die Kontaktaktivierung über freie Fettsäuren größerer Lipoproteinpartikel zustande kommt, die als negativ geladene Oberflächen nach demselben Prinzip fungieren wie Kontaktaktivierungen in vitro.

Diese Ergebnisse gewinnen an Bedeutung, wenn man berücksichtigt, dass F XIIa auch F VII direkt aktivieren kann (Seligsohn et al., 1979; Mitropoulos et al., 1995). Sogar Fragmente des F XII, die F XI nicht mehr aktivieren können, sind offensichtlich in der Lage, F VII zu aktivieren (Radcliffe et al., 1977). Damit könnte F XII auch in den extrinsischen Weg eingreifen.

Mitropoulos et al. konnten zeigen, dass auch die prokoagulatorische Aktivität von F VII mit steigenden Konzentrationen an Triglycerid-reichen Lipoproteinen im Plasma zunimmt (Mitropoulos et al., 1993).

Weitere epidemiologische Daten bestätigen, dass der Level an zirkulierendem Faktor VIIa mit der Konzentration an Lipoprotein-Phospholipiden korreliert (Griffin et al., 2001). Schließlich wurde postuliert, dass die Erhöhung von aktiviertem F VIIa und F XIIa mit einem erhöhten Thromboserisiko einhergeht (Cardigan et al., 2001).

Eine gesteigerte Triglyceridkonzentrationen im Blut könnte damit die Aktivierung von Faktor VII im Plasma gesunder Probanden sowie bei F XII-defizienten Probanden induzieren.

Die Aktivierung des F VII könnte möglicherweise unabhängig von der Zusammensetzung der Lipide der Triglycerid-reichen Lipoproteine sein (Miller et al., 1991; Miller et al., 1996).

1.5 Zielsetzungen

Auf der Grundlage der oben genannten Ergebnisse verschiedenster Studien, untersuchten wir das Kontaktsystem der Blutgerinnung und den Einfluss der verschiedenen Lipoproteinfraktionen des Blutes auf dieses System.

Dabei ergaben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Sind Plättchen notwendig für den Aktivierungsprozess des Kontaktsystems?
- 2) Welche Lipoproteine beeinflussen die Aktivierung des Kontaktsystems?
- 3) Welche Lipidkomponenten der Lipoproteine sind für die Aktivierung des Kontaktsystems verantwortlich?
- 4) Spielt dabei die Zusammensetzung der Lipoproteinen eine wichtige Rolle?

2 Methoden

2.1 Blutentnahme

Wir rekrutierten gesunde Probanden zwischen 20 und 35 Jahren, die in einem Zeitraum von 14 Tagen vor der Blutentnahme keine Medikamente einnehmen durften, die die Blutgerinnung beeinflussen. Zusätzlich wurden die Probanden aufgefordert, am Tag der Entnahme nüchtern zu erscheinen.

Venöses Blut wurde nach Hautdesinfektion mit Kodan-Tinktur FORTE mit Spritzen eines Volumens von 10 ml bzw. 20 ml und Venofix Venenpunktionsbesteck aus einer Vene in der Armbeuge entnommen. Die Spritzen wurden direkt vor der Entnahme mit einer Natriumcitratlösung der Endkonzentration von 0,38 % gefüllt. Dies gilt für alle Ansätze, soweit nicht anders erwähnt. Anschließend wurde das gewonnene Blut sofort mittels einer 1000 µl Pipette in 7 ml Aliquots auf Reagenzgefäße aus Polypropylen mit einem Volumen von 10 ml aufgeteilt.

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

Die 7 ml Aliquots der Blutproben wurden mit Parafilm verschlossen und bei 1300 U/min 15 min bei Raumtemperatur in der Varifuge GL zentrifugiert. Danach wurden die oberen $\frac{2}{3}$ des Überstandes, die dem PRP entsprechen, abgezogen. Der Rest wurde verworfen. $\frac{1}{4}$ des PRP wurde bei 4500 U/min 15 min zentrifugiert, um PAP zu erhalten. Hiervon wurde der Überstand, der dem PAP entspricht, bis auf 10 % abgezogen und der Rest verworfen. Die restlichen $\frac{3}{4}$ des PRP wurden zu je 7 ml in Zentrifugenröhrchen mit Maximalvolumen von 15 ml eingefüllt und bei 2000 U/min wieder für 15 min bei 22° C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 10 % abgezogen und verworfen. Darauf wurde das bestehende Volumen von 700 µl mit dem gewonnenen PAP auf ein Volumen von 1 ml gebracht und das am Grund des Röhrchens liegende Pellet durch vorsichtiges Hochziehen und Herunterdrücken mit der Pipette wieder gelöst.

2.3 Zellzahlbestimmung

Die Plättchenzahl wurde mittels eines Particle Count and Size Analyzer ermittelt, indem die Plättchenlösung (PRP/PAP) zunächst 100-fach mit Puffer A verdünnt wurde, bevor sie mit einem Volumen von 50 μl in die Zählösung (20 ml isotoner NaCl-Lösung) des Analysegerätes pipettiert wurde. Der Leerwert des NaCl wurde von der ermittelten Plättchenzahl abgezogen. Die Anzahl der Plättchen wurde danach mit PAP auf 10^8 pro 1 ml Plasma eingestellt.

2.4 Kinetik der Thrombinbildung

Eine Mikrotiterplatte wurde mit einer Thrombin-Verdünnungsreihe vorbereitet, die dem Messgerät (Dynatech Elisa Reader) als Referenz für die Umrechnung der m.O.D./min in tatsächliche Thrombinkonzentrationen dienen sollte.

Pro Ansatz wurden 10^8 Plättchen in soviel Plasma gelöst, dass nach der Zugabe von Trägersubstanz (Puffer A) bzw. Lipoproteinen ein Volumen von 1 ml erzielt wurde. Um die Reaktion zu starten, wurden nun 20 μl einer 1 M CaCl_2 -Lösung dazu pipettiert und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Zu den gegebenen Zeitpunkten (bei 0, 20, 30, 40, 50, 60, 70 min) wurden je 2 Wells einer Mikrotiterplatte pro Ansatz mit Aliquots von 10 μl beschickt. Diese Mikrotiterplatte war zuvor mit jeweils 90 μl einer 2,5 % NaCl-Lösung befüllt worden, um die Reaktion zu stoppen. Das Meßgerät (ELISA Reader) wurde auf eine Wellenlänge von 405 nm eingestellt. Es wurde über 19,5 min alle 30 s eine Messung durchgeführt. Zu Beginn der Messung wurde in die Wells 50 μl einer 0,5 M Lösung des chromogenen Substrates S-2238 in 1 M Tris-Puffer pipettiert. Gemessen wurde die Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit, die durch Abbau des Substrates S-2238 entsteht. Die Kurven der Kontrolle zeigten einen langsam steigenden Verlauf in den ersten 30-40 min, die Kurven nach Stimulierung stiegen früher. Dann kam es zu einem exponentiellen Anstieg. Diese Kurven entsprachen der Funktion $f(t)=ae^{bt}$, mit Hilfe deren Ableitung ein Schwellenwert S ermittelt werden konnte. Dieser bestimmte den Beginn der Reaktion und wurde als lag time bezeichnet. Arithmetisch wurde dieser bei 1,5 für die Kontrollen festgesetzt (**Abb. 3**).

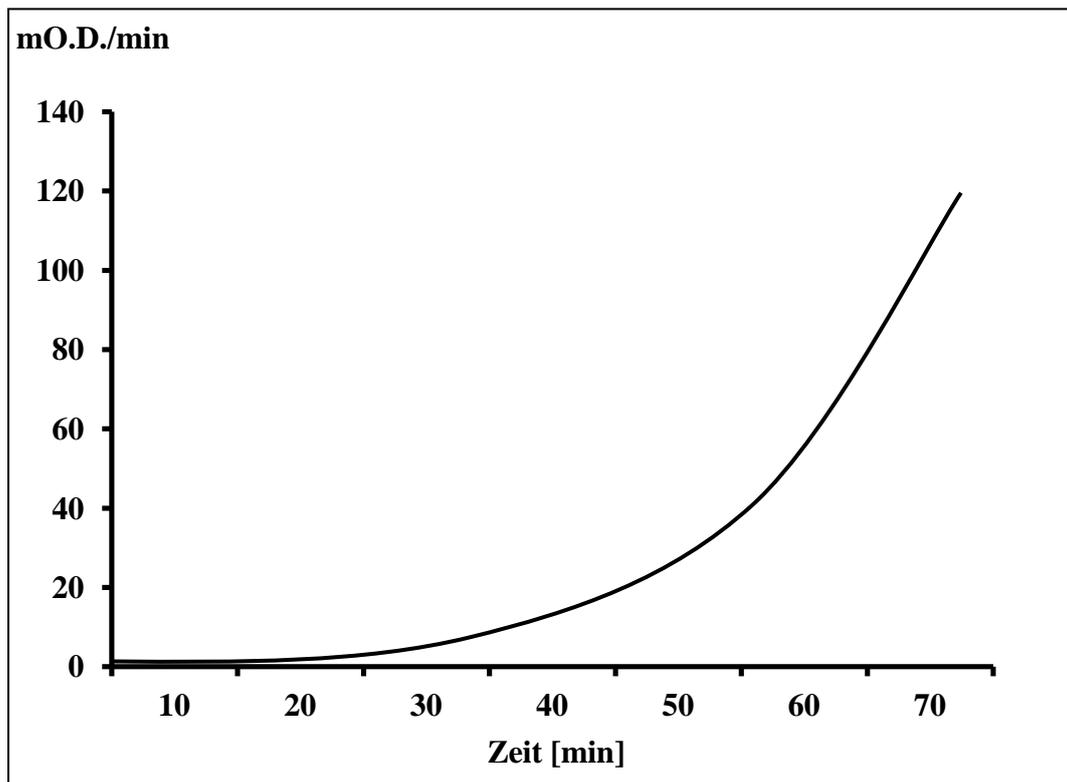


Abb. 3: Schematische Darstellung der Kurve der Thrombinbildung

Im PRP wird die Reaktion der Thrombinbildung im PRP mittels des Abbaus des chromogenen Substrates S-2238 im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Dabei zeigt sich dieser exponentielle Verlauf der Thrombinentstehung.

2.5 Thrombinbildung bei isolierten Plättchen

Für diesen Ansatz wurde venöses Blut von gesunden Probanden, wie oben beschrieben, abgenommen, allerdings mit dem Unterschied, dass die Spritzen mit 1,5 ml ACD auf 10 ml Blut befüllt wurden. Um nun das PRP zu erhalten, wurde das Blut wieder in Reagenzröhrchen zu je 5 ml pro Röhrchen aufgeteilt. Anschließend wurde es bei 1300 U/min für 15 min zentrifugiert und das PRP abgezogen. Zu dem so gewonnenen PRP wurden 10 µl Iloprost auf 1 ml PRP pipettiert. Um nun reine Plättchensuspensionen zu erhalten wurde das PRP nochmalig in einem Zentrifugenröhrchen bei 2100 U/min für 10 min zentrifugiert. Der dabei erhaltene Überstand wurde abgossen, das Plättchenpellet in 1 ml Waschpuffer resuspendiert und wiederum bei 2100 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Pellet in 300 ml Puffer A gelöst und die Plättchen in einem Coulter-Counter gezählt. Die Plättchenzahl wurde auf 1×10^7 in 150 µl Puffer A eingestellt. In den Experimenten zur Inkubation der Plättchen mit Lipoproteinen wurde in den Kontrollansätzen

Puffer A alleine zugegeben (Vehikelkontrolle). In allen Teilen wurden die Proben auch mit Thrombin bzw. Collagen stimuliert (37° C, 5 min). Anschließend wurden Faktor II in der Endkonzentration von 0,434 µM, Faktor Va in der Endkonzentration von 1,08 µM und Faktor Xa in der Endkonzentration von 0,52 µM eingesetzt und für 4 min bei 37° C inkubiert.

Die Proben wurden parallel zu einer Thrombinverdünnungsreihe auf eine Mikrotiterplatte aufgebracht und mit dem Fluoreszenz-Substrat 2238 in einer Endkonzentration von 0,82 mM beschickt. Die Änderung der m.O.D./min wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm in einem Elisa-Reader gemessen.

2.6 Versuche mit TEG

2.6.1 Messprinzip

Der Thrombelastograph wurde 1948 von Herrn Prof. Hellmut Hartert in Heidelberg entwickelt (Hartert, Klinische Wochenschrift, 26.Jahrgang). Mit diesem Gerät war es erstmalig möglich mittels einer einzigen Messung den Ablauf des Gerinnungsprozesses von Beginn an mit Bildung der ersten Fibringerinnsel bis zur Fibrinolyse zu beobachten. Bis heute wurde das Prinzip dem aktuellen Stand der Technik angepasst und computerisiert. Mit dieser Methode können Aussagen zum Start der Gerinnung (Rate der Fibrinbildung, r), zur Kinetik der Gerinnung (Rate des Thrombuswachstums, k), zur maximalen Gerinnselfestigkeit (maximale Amplitude, MA) und zur Fibrinolyse getroffen werden.

Die in der Messvorrichtung fixierte und auf 37° C vorgewärmte Küvette wird mit dem Probenmaterial (Vollblut, PRP, PAP oder anderem Probenmaterial) befüllt. Dann taucht ein Stempel senkrecht in das Material ein, der mit Start der Messung torsionselastisch nach rechts und links zu rotieren beginnt. Bei der Drehpendelbewegung, die dabei entsteht, wird eine 10 s dauernde Bewegung von einer 1 s dauernden Ruhephase unterschieden.

Die Bewegung ist bei fehlender Gerinnung unbehindert. Mit Einsetzen der Gerinnung und damit Haftung am Stempel bildet sich jedoch ein Widerstand der die Rotation des Stempels einschränkt und die Amplitude der Drehung vermindert. Die Fibrinfäden lenken also den Messstab in seine Drehpendelbewegung aus, wobei diese Auslenkung von einem mit Ölwannen gedämpften Messsystem registriert und über ein Schreibwerk auf Thermoregistrierpapier abgebildet wird.

Die Zeit bis zum Einsetzen der Gerinnung wird über einen Graphen in mm vermittelt. Ebenso kann das Ausmaß der Gerinnung in mm gemessen werden. Neuere Systeme verfügen mittlerweile über Computertechnik (**Abb. 4**).

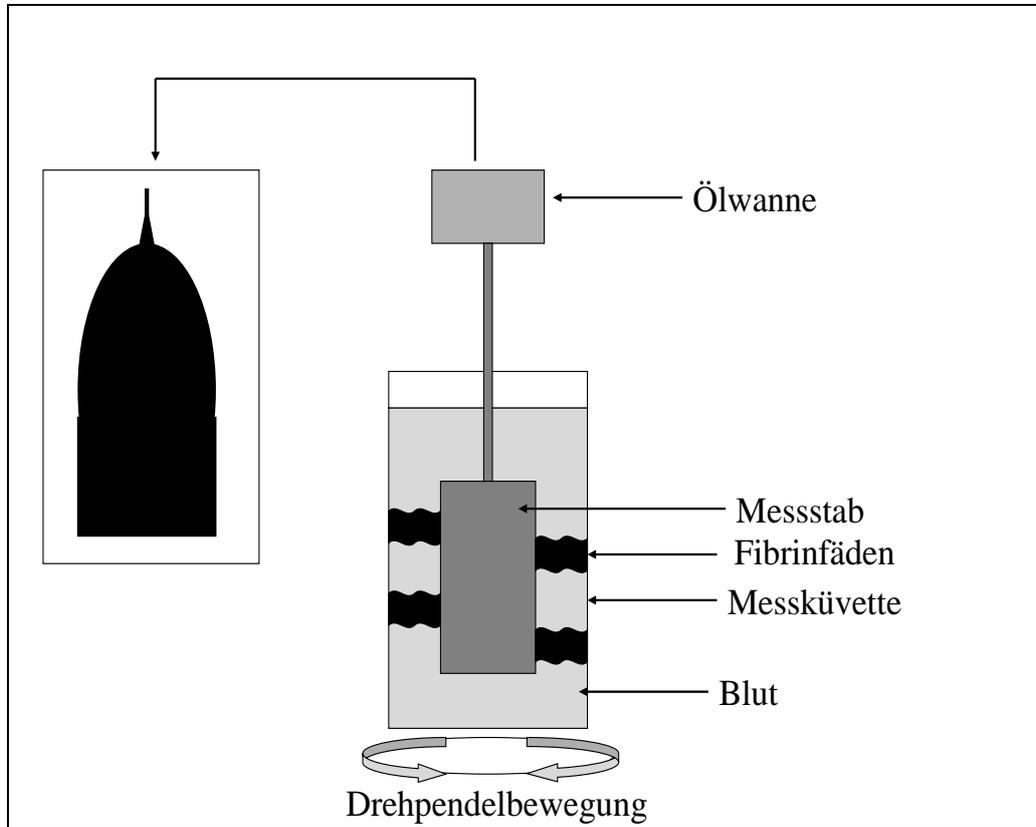


Abb. 4: Prinzip der Thrombelastographie

Durch eine Ablenkung der Drehpendelbewegung des Messstabes durch Fibrinbildung des Blutes in der Messkuvette wird über ein Ölwannensystem das Ausmaß an ein Schreibgerät vermittelt. So können die Rate der Fibrinbildung (r), die Rate des Thrombuswachstums (k) und die maximale Amplitude im Ausschlag des Schreibers (MA) aufgezeichnet werden.

2.6.2 Methodik

Das Gerät wurde für 30 min auf 37° C vorgewärmt.

Währenddessen wurde den Probanden unter den wie oben beschriebenen Bedingungen venöses Blut entnommen. Nach der Aufwärmphase wurde das antikoagulierte Vollblut zusammen mit den potentiellen Aktivator (VLDL, LDL) auf ein Gesamtvolumen von 300 µl eingestellt. Die Reaktion wurde mit 60 µl eines 100 mM Ca²⁺Cl-10 mM HEPES-Puffer (pH 7,4) und durch sich sofort anschließendes Heben und Senken des Stempels gestartet. Dabei wurde der Start durch eine Markierung des Schreibers definiert. Die Messung erfolgte dann bis zum Erreichen der maximalen Amplitude.

2.7 LDL-Entfernung mittels Chromatographiesäulen

Eine Chromatographiesäule mit anti-h-LDL-Antikörper-gekoppelter Sepharose CL 4B wurde nach Anleitung zunächst mit Glycin-HCl-Puffer (pH 2,8) und PBS-Puffer gespült. Danach wurde sie mit frisch gewonnenem PAP beschickt. Dabei wurden die ersten 2 ml des gereinigten Plasmas verworfen. Nach dem Durchlauf des Plasmas wurde die Säule wieder nachgespült, um das in der Säule befindliche LDL wieder herauszulösen.

Um die Effektivität der Säule zu überprüfen, wurde eine Eichkurve mittels einer LDL-Cholesterin-Verdünnungsreihe erstellt. Durch eine enzymatische Farbreaktion des Reagenz konnte die Konzentration der Absorption der Eichkurve bei einer Wellenlänge von 280 nm gegen die Proben photometrisch gemessen werden. Somit konnte die Konzentration von LDL in den Proben vor und nach Durchlauf durch die Chromatographiesäule bestimmt werden.

2.8 Präparative Lipoproteinisolierung aus Plasma

Zunächst wurde venöses Blut mit Na-EDTA gefüllten Spritzen von gesunden Probanden abgenommen (vgl. 2.1). Durch 15-minütiges Zentrifugieren des Vollblutes wurde das benötigte Plasma gewonnen. Das Plasma wurde in spezielle Zentrifugenröhrchen - Quick-Seal-Röhrchen - eingefüllt und mittels Zugabe von KBr-Lösung auf eine Dichte von 1,006 eingestellt. Anschließend wurden die Röhrchen mit dem Quick-Sealer verschweißt. Die Zentrifugation erfolgte in einem zuvor auf 4° C gekühlten Rotor (Typ 50.3 Ti) in einer Ultrazentrifuge bei 48.000 U/min und 4° C für 18 h. Nach diesem ersten

Zentrifugationsschritt befanden sich das VLDL und die Chylomikronen am oberen Rand des Röhrchens, LDL und HDL hingegen am Boden. Um die einzelnen Schichten abziehen zu können, wurden die Röhrchen zunächst durch Einstecken einer Kanüle am obersten Rand belüftet. Dann wurde beginnend mit der obersten Schicht jede der Schichten mit einer Spritze abgezogen. Um die LDL/HDL-Fraktion aufzutrennen, wurde die Dichte mit KBr-Lösung auf 1,063 eingestellt und die Fraktion wieder in Quick-Seal-Röhrchen gefüllt. Es folgte ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 48.000 U/min und 4° C für 24 h. Nach diesem Schritt befand sich die LDL-Fraktion am oberen Rand der Röhrchen und wurde wie oben beschrieben abgezogen. Da sich in der HDL-Fraktion auch kleinere Proteine befanden, wurde die HDL-enthaltende Fraktion nach Einstellung der Dichte mit KBr-Lösung auf 1,220 nochmals bei 48.000 U/min und 4° C für 24 h zentrifugiert. Im Anschluss dazu wurde das am oberen Rand des Röhrchens angereicherte HDL nach Belüftung der Röhrchen mit einer Spritze abgezogen. Um das EDTA und das KBr wieder zu entfernen, wurden die Lipoprotein-Lösungen einer Dialyse unterzogen. Dafür wurden die Lösungen zunächst in Dialyseschläuche gefüllt. In einem Kunststoffexsikkator wurden die Schläuche in 2 l eines Dialysepuffers gelegt, entgast und mit Argon gesättigt. Es erfolgte eine Inkubation für 6 h. Anschließend wurde der Puffer noch 3-4 Mal gewechselt und der Vorgang jeweils wiederholt. Das letzte Mal wurden die Proteine in einen Aufbewahrungspuffer dialysiert, in dem die Schläuche 24 h inkubiert wurden, bevor die Lipoproteinlösungen entnommen und nach Sterilfiltration (Filter mit Poren der Größe 0,2 µm) in kleinere Aliquots aufgeteilt und in Caps gelagert wurden. Bevor die jeweilige Menge an Lipoprotein in den Versuchsreihen zum Einsatz kam, wurde sie mit Hilfe von speziellen Molekularfiltern (Centricon, Membran MWCO 100 000 Dalton) entsalzt. Dabei wurde die benötigte Menge der Lipoproteinlösung mit PBS (ohne CaCl₂) auf 1,5 ml aufgefüllt, mit Argon bedampft und, mit Parafilm verschlossen, in einer Zentrifuge bei 1000 x g bei 4° C solange zentrifugiert bis nur noch ein kleiner Flüssigkeitsspiegel oberhalb der Membran vorhanden war. Dieser Reinigungs- und Konzentrierungsvorgang wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss dazu wurden die Proben in Caps aufgeteilt, mit Argon begast und bei -18° C gelagert.

2.9 Proteinbestimmung nach Bradford

Um eine genaue Mengenangabe der isolierten Lipoproteine zu erhalten, wurde die Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford (Bradford et al., 1976) angewandt. Dabei wurde ein kleines Volumen Lipoprotein-Lösung (10-40 µl) mit dem Testreagenz (Bio Rad Protein Assay) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jede Testreihe wurde gegen eine Eichkurve mit Immunglobulin G-Standard bei 595 nm Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm gegen das Reagenz gemessen.

2.10 Lipidextraktion aus Plasma nach Bligh und Dyer (Bligh et al., 1959)

2 ml PAP bzw. isoliertes VLDL wurden in einem 20 ml-Schliffröhrchen aus Glas resuspendiert. Dann wurden 2 ml einer Chloroform-BHT-Lösung (50 mg BHT/l Chloroform) zugegeben, daraufhin 4 ml Methanol zugefügt und die Lösung mit Stickstoff begast, verschlossen und für 30 s gevortext. Anschließend wurde die Lösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 2 ml bidestilliertes Wasser und 6 ml Chloroform zugefügt. Die Lösung wurde nochmals mit Stickstoff begast, verschlossen, für 30 s gevortext und danach 10 min bei 4500 U/min bei 10° C zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen: die obere wässrige Phase, eine weiße Trennschicht dazwischen und eine untere Chloroform-Phase. Die Chloroform-Phasen wurden abgezogen und in einem Schliffröhrchen gesammelt. Die obere wässrige Phase wurde wieder mit 4 ml einer Lösung aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 aufgefüllt, mit Stickstoff begast, gevortext und zentrifugiert. Es wurden die Chloroform-Phasen von insgesamt 3 Waschvorgängen gesammelt und gepoolt. Die Lösung wurde in einem Wasserbad bei 37° C mit Stickstoff eingedampft. Zur Lagerung bei -20° C wurde die Lipidphase nochmals mit Argon bedampft und verschlossen.

2.11 Herstellung von Lipidvesikeln

Zur Herstellung von Lipidvesikeln wurden die Lipide aus der oben beschriebenen Extraktion wieder in 800 µl PBS-Puffer in Schliffröhrchen gelöst. Um Vesikel aus Phospholipiden zu bilden, die zuvor durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt worden waren (vgl. 2.12), wurde Dipalmitoyl-Phosphatidylcholin (3 µmol/ Probe) als Vesikelbildner eingesetzt. Danach wurde die Lösung einem Ultraschall für 2 x 2 min, mit 1 min Pause zwischen den Ultraschallschritten, im Eisbad unter Stickstoffbegasung ausgesetzt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 2000 U/min und 10° C für 10 min wurden 600 µl der oberen Schicht abgezogen. Auch diese wurde zur Lagerung bei 8° C mit Argon begast.

2.12 Auftrennung der Phospholipide mittels Dünnschichtchromatographie

Bevor mit dem Auftragen der Proben begonnen werden konnte, wurde die Kieselgelplatte eine Stunde in einem Trockenschrank getrocknet und beschriftet. Es wurden drei Auftragungspunkte mit je 3 cm Abstand definiert. Die nach der Lipidextraktion nach Bligh und Dyer erhaltene Lipidphase wurde in 100 µl einer Chloroform-Methanol-Lösung im Verhältnis 2:1 gelöst. Die Lösung wurde gevortext und auf drei Schliffröhrchen zu je 30 µl verteilt. Die Lösungen aus diesen Röhrchen wurden an den gekennzeichneten Punkten auf der Kieselgelplatte mit Glaskapillaren Lines aufgetragen. Als Kontrolle wurden Standards mit definierten Phospholipiden aufgetragen: Lysophosphatidylcholin (LPC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC). Danach wurde die Platte für ca. 1,5 h in eine mit Laufmittel befüllte Kammer gestellt. Nach der Entnahme wurde sofort die Laufmittelfront mit Bleistift gekennzeichnet, bevor die Platte eine halbe Stunde trocknete. Nach Besprühen mit einer 0,03 % DPH-Lösung (1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien, in Chloroform gelöst) konnten unter UV-Licht die Spots der einzelnen Lipide sichtbar gemacht und mit Bleistift markiert werden. Um eine zweidimensionale Auftrennung der Lipide zu erhalten, wurde ein einzelner Spot der Lipidphase in die rechte untere Ecke der Platte aufgetragen. Danach wurde sie zuerst in die erste Kammer für 1,5 h verbracht. Nach der Trocknungszeit von einer halben Stunde, wurde die Platte um 90 Grad gedreht und danach für 1,5 h in eine zweite Kammer mit Laufmittel gestellt. Nach weiteren 0,5 Stunden Trocknung wurde die

Platte mit 0,03 % DPH (1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatrien, in Chloroform gelöst) besprüht und unter UV-Licht die aufgetrennten Spots markiert. Hingegen wurden für die analytischen Bestimmungen des Phosphatgehalts der Phospholipide die Spots mittels Joddampf detektiert (**Abb. 5**). Die Zusammensetzung des Laufmittels für die erste Dimension bestand aus Chloroform/ Methanol/ konzentriertem Ammoniak/ Aqua bidest. im Verhältnis 45:37:6:4, für die zweite Dimension wurde ein Laufmittel aus Chloroform/ Methanol/ Diethylether/ Essigsäure/ Aqua bidest. im Verhältnis 40:15:15:12:8 verwendet.

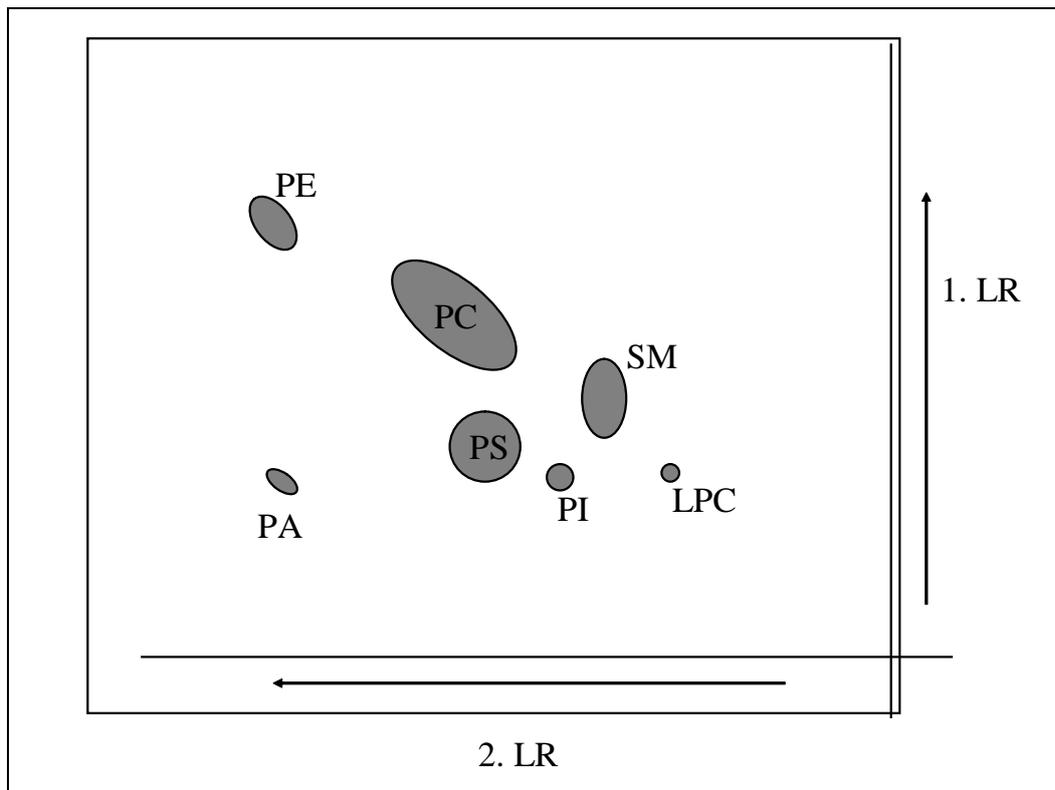


Abb. 5: Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

Eine Kieselgelplatte wurde mit den zu bestimmenden Lipidproben beschickt und in eine Kammer mit Laufmittel gestellt (1. Laufrichtung, 1. LR). Danach wurde die Platte um 90 Grad gedreht und in eine zweite Kammer mit einem weiteren Laufmittel gestellt (2. Laufrichtung, 2. LR). So trennten sich Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidyl-ethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI), Sphingomyelin (SM), Lysophosphatidylcholin (LPC) und Phosphatidsäure (PA).

2.13 Eluieren der Lipide

2.13.1 Herauslösen der Phospholipide aus dem Kieselgel

Nach der Auftrennung der Lipide mittels Dünnschichtchromatographie wurden die einzelnen Spots zunächst anhand der Standards identifiziert. Danach wurden die Spots mit einem Skalpell zusammen mit dem Kieselgel von der Glasplatte abgekratzt und in Reagenzgläser gefüllt. Die Röhrchen wurden mit 5 ml einer Chloroform-Methanol-Lösung im Verhältnis 1:4 befüllt, mit Stickstoff begast, verschlossen und gevortext. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 3000 U/min (4° C, 10 min). Der Überstand wurde abgezogen und in je ein weiteres Reagenzröhrchen pipettiert. Dieser Vorgang wurde noch zwei Mal wiederholt. Während der Bearbeitung wurden die Proben im Eisbad gekühlt. Die Überstände der jeweiligen Proben wurden gepoolt und im Wasserbad bei 37° C mit Stickstoff eingedampft.

2.13.2 Reinigung der Lipide

Die eingedampften Proben wurden mit 1 ml H₂O, 5 ml einer Chloroform-Methanol-Lösung (1:2) und 1 ml einer Methanol-H₂O-Lösung (1:1) aufgefüllt und mit Stickstoff im Eisbad begast. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben bei 3000 U/min und 4° C für 10 min zentrifugiert. Die dabei entstandene obere Phase wurde abgezogen und verworfen, die untere Phase wurde mit 1 ml Chloroform-Methanol-Lösung, 1 ml H₂O und 1 ml Methanol-H₂O-Lösung aufgefüllt. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde die untere Phase, die die gewaschenen Lipide enthielt, abgezogen und im Wasserbad bei 37° C mit Stickstoff eingedampft. Zur Lagerung der Lipide bei -20° C wurden sie mit Argon bedampft.

2.14 Phosphatbestimmung nach 2-dimensionaler Dünnschichtchromatographie

Die Kieselgelspots wurden mit einem Skalpell abgekratzt und in hitzebeständige Reagenzgläser überführt, die bei 5 ml mit einer Ringmarke versehen waren. Danach wurde 0,7 ml Veraschungsreagenz zugegeben und die Mixtur in einem Heizblock bei 275° C für 90 min unter dem Abzug inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 4 ml Ammoniummolybdat (1 %), 0,2 ml Bartelett-Reagenz plus Aqua bidest. auf 5 ml aufgefüllt. Nach jeder Zugabe wurden die Röhrchen dreimal gevortext. Die Reagenzröhrchen wurden jeweils mit einem ca. 4 x 4 cm großen Stück Aluminiumfolie verschlossen und diese mit einer Kanüle einmal angestochen, damit entstehender Dampf entweichen konnte. Die Proben wurden anschließend für 10 min im Wasserbad gekocht. Danach wurden sie sofort in Eiswasser auf Raumtemperatur abgekühlt und bei 4500 U/min und 16° C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und bei 820 nm und einem Spalt von 650-1000 bei einer Schichtdicke von 1 cm gegen das Reagenz photometrisch gemessen. Die Messung von Extinktionen verschiedener Verdünnungsstufen einer 1 mM Kaliumhydrogenphosphatlösung diente zur Erstellung einer Eichkurve.

3 Materialien und Geräte

3.1 Materialien

3.1.1 Puffer und Reagenzien

Acetat-Puffer (pH 2,8):

NaCl 0,15 M Roth, Karlsruhe

Essigsäure 0,1 M Roth, Karlsruhe

Gelöst in Aqua dest.

Glycin-HCl-Puffer (pH 2,8)

Glycin Roth, Karlsruhe

HCL zum Einstellen des pH-Werts Roth, Karlsruhe

Dialysepuffer (pH 7,4):

Tris-Base 1 mM Roth, Karlsruhe

NaCl 150 mM Roth, Karlsruhe

Na-EDTA 0,3 mM Roth, Karlsruhe

Aufbewahrungspuffer (pH 7,4):

Tris-Base 10 mM Roth, Karlsruhe

NaCl 150 mM Roth, Karlsruhe

Na-EDTA 0,3 mM Roth, Karlsruhe

Thrombozyten-Wasch-Puffer (pH 6,3):

NaCl 138 mM Roth, Karlsruhe

KCl 3 mM Roth, Karlsruhe

MgCl₂ 1 mM Roth, Karlsruhe

HEPES 15 mM Roth, Karlsruhe

Glucose 5 mM Roth, Karlsruhe

Puffer A (pH 7,4):

NaCl 140 mM Roth, Karlsruhe

KCl 5 mM Roth, Karlsruhe

HEPES 10 mM Roth, Karlsruhe

MgCl₂ 1 mM Roth, Karlsruhe

Glucose 5 mM Roth, Karlsruhe

Puffer B (pH 7,4):

NaCl 140 mM	Roth, Karlsruhe
KCl 5 mM	Roth, Karlsruhe
HEPES 10 mM	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ 1 mM	Roth, Karlsruhe
Glucose 5 mM	Roth, Karlsruhe
CaCl ₂ 5,93 mM	Roth, Karlsruhe

TEG-Calzium-Hepes-Puffer (pH 7,4):

CaCl ₂ 0,1 M	Roth, Karlsruhe
HEPES 0,01 M	Roth, Karlsruhe
Gelöst in Aqua dest.	

Bartelett-Reagenz:

Natriumdisulfit 7,5 g in Aqua bidest. lösen,	Merck, Darmstadt
0,125 g 1-Amino-2-hydroxy-naphthalein-sulfonsäure	Merck, Darmstadt
und 0,5 g Natriumsulfit dazugeben,	Merck, Darmstadt
und mit Aqua bidest. auf 50 ml auffüllen,	
unter Lichtausschluß 20 min rühren	

Veraschungsreagenz:

1:1 Schwefelsäure (95-97 %) : Perchlorsäure (60 %)	Roth, Karlsruhe
--	-----------------

3.1.2 Blut- und Thrombozytenpräparation

3.1.2.1 Blutentnahme

Einmalspritzen 10 ml, 20 ml	Braun, Melsungen
HCl	Roth, Karlsruhe
Kodan-Tinktur FORTE	Schülke Mayr, Norderstedt
NaOH	Roth, Karlsruhe
Polypropylenröhrchen 10 ml	Greiner Labortechnik
Trinatriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Venofix-Punktionsbesteck	Braun, Melsungen

3.1.2.2 Thrombozytenpräparation

Falcon yellow max jr Röhrchen	Falcon, Greiner Labortechnik
-------------------------------	------------------------------

3.1.3 Prothrombinkomplex-Bildung

CaCl₂ gelöst in Aqua dest. 1 M

Faktoren:

Faktor II (human)

Faktor Va (bovine)

Faktor Xa (bovine)

Iloprost

1-Palmitoyl-2-Linoleyl-phosphatidylethanolamin

1-Palmitoyl-2-Lyso-Phosphatidylcholin (aus Eigelb)

1-Palmitoyl-2-Palmitoyl-Phosphatidylcholin

L- α -Phosphatidylcholin (aus Eigelb)

Phosphatidylinositol

Phosphatidylserin

Sphingomyelin

Substrat S-2238 (in Tris 1 M)

Thrombin

Tris gelöst in Aqua dest. 1 M

Roth, Karlsruhe

Enzyme Research Laboratories
Ltd., Swansea

Schering, Berlin

Sigma Chemie, Deisenhofen

Haemochrom Diagnostica, Essen

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Roth, Karlsruhe

3.1.4 LDL-Entfernung mittels Chromatographie

PBS

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.1.5 Präparative Phospholipidgewinnung

KBr

Merck, Darmstadt

Na-EDTA

Roth, Karlsruhe

PBS- (PBS minus CaCl₂)

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

3.1.6 Lipidextraktion und Vesikelbildung

BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol)

Sigma Chemie, Deisenhofen

Chloroform

Merck, Darmstadt

Methanol

Merck, Darmstadt

3.1.7 Proteinbestimmung

Bio Rad Protein Assay

Bio Rad Laboratories, München

3.1.8 Phospholipidgewinnung mittels Dünnschichtchromatographie

Diethylether

Merck, Darmstadt

DPH (1,6-Diphenyl-1,3,5-Hexatrien)

Sigma Chemie, Deisenhofen

Essigsäure

Merck, Darmstadt

Jod

Sigma Chemie, Deisenhofen

3.1.9 Phosphatbestimmung

Ammoniummolybdat

Merck, Darmstadt

Kaliumhydrogenphosphat

Merck, Darmstadt

3.1.10 Vollblutkoagulometrie

CTI-Inhibitor

Haemochrom Diagnostica, Essen

Öl zur Probenabdeckung

Hellige, Freiburg

3.2 Materialien und Geräte

3.2.1 Materialien

Centricon Filter

Membran MWCO 100 000 Dalton,
Amicon, Millipore, Billerica,
Headquarters, Massachusetts

Dialyseschläuche

Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Dünnschichtchromatografie-Fertigplatten,

20 x 20 cm Kieselgel 60

Merck, Darmstadt

Laufmittelkammern,

Desaga-Kammer, 20,5 x 8,5 x 20,5 cm

DESAGA GmbH, Heidelberg

Mikrotiter-Platte, 96-well

Schubert & Weiss GmbH,
OMNILAB, München

Pasteurpipette

Brand, Wertheim

Pipetman-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Pipetus Akku Pipettierhilfe	Abimed, Langenfeld
Quick-Seal-Röhrchen 13 x 64 mm,	Beckmann Instruments, Spinco Spectra/Por Division Palo Alto, California, USA
Reagenzgläser, hitzebeständig Volumen 24 ml;	Schott, Mainz
Schliffröhrchen 20 ml	Normschliff, Wertheim
3.2.2 Geräte	
Coulter Counter	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
ELISA Reader Dynatech MR 7000	Dynatech Laboratories, Alexandria, USA
Lamin Air Abzugssystem	Heraeus Instruments, Hanau
Thrombelastograph D	Hellige, Freiburg
Küvetten	Dynabyte, München
Messstifte	Dynabyte, München
Papier	Hellige, Freiburg
Zentrifugen:	
Biofuge 13	Heraeus Instruments, Hanau
Labofuge 400 ®	Heraeus Instruments, Hanau
Nalgene Ultra Plus	Beckmann, München
Rotor Typ 50.3 Ti	Beckmann, München
Varifuge GL	Heraeus Instruments, Hanau
Photometer 503300 PM 4	Carl Zeiss, Oberkochen
Quick-Sealer	Beckmann Instruments, Spinco Division Palo Alto, California, USA
Trockenschrank, Typ T 5025	Heraeus Christ, Lochham, Osterode
UV-Licht Typ 5393	Fluotest, Original, Hanau
Heizblock, Typ TB 4	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim

3.3 Statistik

Die statistische Signifikanz *p wurde mit der Software SPSS 17.0 für Windows ermittelt. Als signifikant gelten Werte mit $p < 0,05$. Bei sehr kleinen Stichproben wurde die Bonferroni-Korrektur ($0,05/3$) eingesetzt und die Signifikanz für Werte $p < 0.167$ festgelegt. Als Tests wurde der Kruskal-Wallis-Test für die mehrfaktorielle Varianzanalyse und der Mann-Witney-White-Test für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der Kontaktaktivierung auf die Thrombinbildung im PRP

PRP wurde wie oben beschrieben aus Vollblut gesunder Spender zwischen 20 und 35 Jahren gewonnen. Nach Rekalzifizierung wurde zeitabhängig die Thrombinbildung bestimmt (Abb. 6).

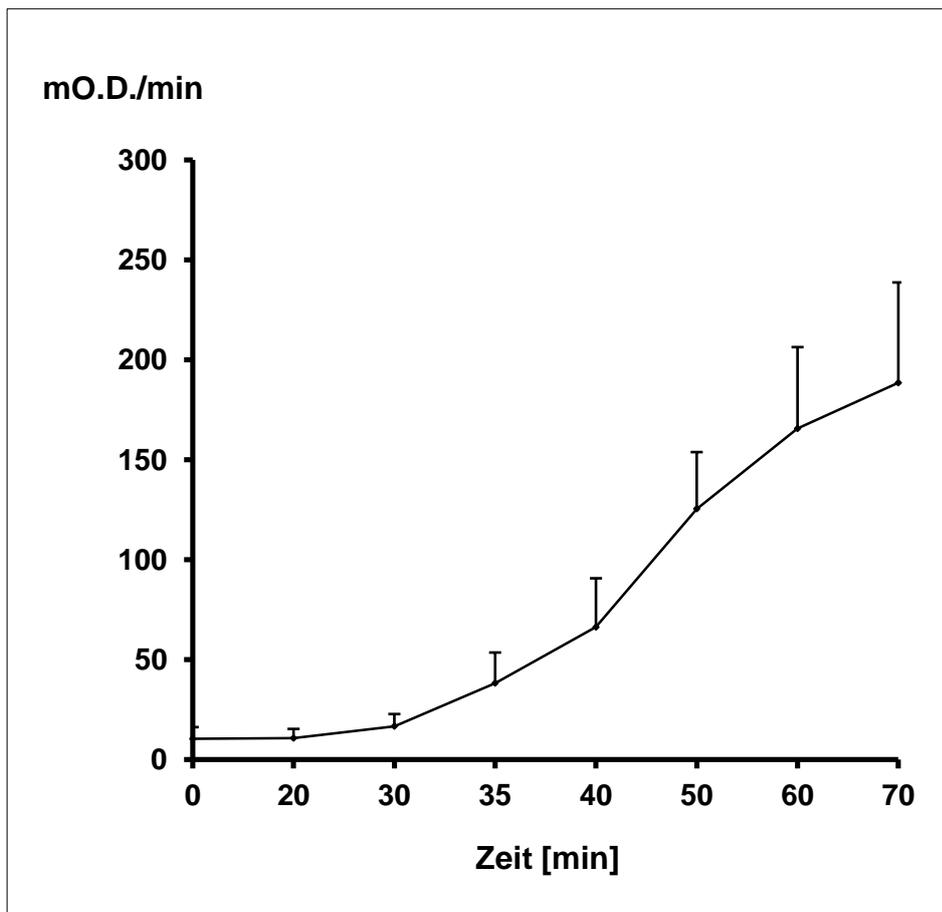


Abb. 6: Zeitabhängigkeit der Thrombinbildung im PRP

Es wurde PRP mit einer 1 M CaCl_2 -Lösung stimuliert und die Thrombinbildung über den Abbau eines chromogenen Substrats in einem ELISA-Reader gemessen. In den ersten 30 min kommt es zu keiner wesentlichen Thrombinbildung. Danach kommt es zu einem Anstieg, der jenseits der 70 min in eine Sättigungsphase übergeht. (Mittelwerte: 0 min: $10,44 \pm 5,84$ mO.D./min, 20 min: $10,78 \pm 4,59$ mO.D./min, 30 min: $38,3 \pm 15,29$ mO.D./min, 40 min: $66,31 \pm 24,41$ mO.D./min, 50 min: $125,5 \pm 28,33$ mO.D./min, 60 min: $165,63 \pm 40,73$ mO.D./min, 70 min: $188,5 \pm 50,20$ mO.D./min), (n = 14).

Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte (Aoki et al., 1997; Aronson et al., 1992), änderte sich die Thrombinkonzentration mit Messbeginn bis zu einem Zeitwert von ca. 30 min kaum. Ab diesem Punkt war ein steiler exponentieller Anstieg der Thrombinbildung zu verzeichnen, der bis zu dem Messwert von ca. 70 min nachweisbar war (**Abb. 3**).

Um die Mechanismen der Thrombinbildung zu verstehen, ist es notwendig, die Messreihen durch eine mathematische Funktion auszudrücken.

Dabei wurde von folgenden Hypothesen ausgegangen:

Die Kurve der Thrombinbildung bleibt bis zu einem Zeitpunkt t_0 linear mit einer Steigung von 0. Bis zum Zeitpunkt 0 hat die Reaktion noch nicht begonnen.

Der daraufhin folgende exponentielle Anstieg kann angenähert werden durch eine Funktion $f(t)=ae^{bt}$.

Da diese exponentielle Funktion aber nie die Steigung 0 besitzt (Verlauf vor t_0 !) muss ein Schwellenwert für die Ableitung $f'(t_0) = S$ ermittelt werden, der als Vergleichskriterium herangezogen werden kann und den Startpunkt der Reaktion beschreibt.

Mit Hilfe eines exponentiellen Regressionsverfahrens wurden für 12 ausgesuchte und vergleichbare Messreihen i die angenäherten Funktionen $f_i(t)$ bestimmt. Anhand dieser Funktionen wurden die Konstanten a_i und b_i ermittelt. Für jede dieser Messreihen wurde ein passendes t_{0i} bestimmt. Daraufhin wurden für den Wert t_{0i} die Funktionswerte der jeweiligen Ableitung $f'_i(T_{0i})$ erstellt. Die so erhaltenen Werte für $f'_i(T_{0i})$ wurden arithmetisch gemittelt, woraus sich der Standard-Schwellenwert der Ableitung S ergibt.

Nun wurden für weitere Messreihen der Zeitpunkt t_0 und damit der Startpunkt der Reaktion

$$t_0 = \frac{1}{b} \ln \frac{S}{ab}$$

bestimmt, die sich durch Auflösen der Gleichung $S=abe^{bt}$ nach t ergibt.

Durch dieses Verfahren wurde gleichzeitig die Auswirkung eventueller Messungenauigkeiten minimiert und eine genaue Ermittlung der einzelnen Schwellenwerte ermöglicht. Insgesamt ergab sich ein Lag Time Wert von 1,5.

Um zu prüfen, ob die Thrombozyten-abhängige Thrombinbildung durch das Kontaktaktivierungssystem induziert wird, wurde der Versuchsreihe ein spezifischer Hemmstoff des Faktors XIIa, der Corn-trypsin-Inhibitor (CTI, Corn Hagemann Faktor Inhibitor) beigelegt.

Dies führte zu einem vollständigen Ausbleiben des Thrombinanstiegs (**Abb. 7**).

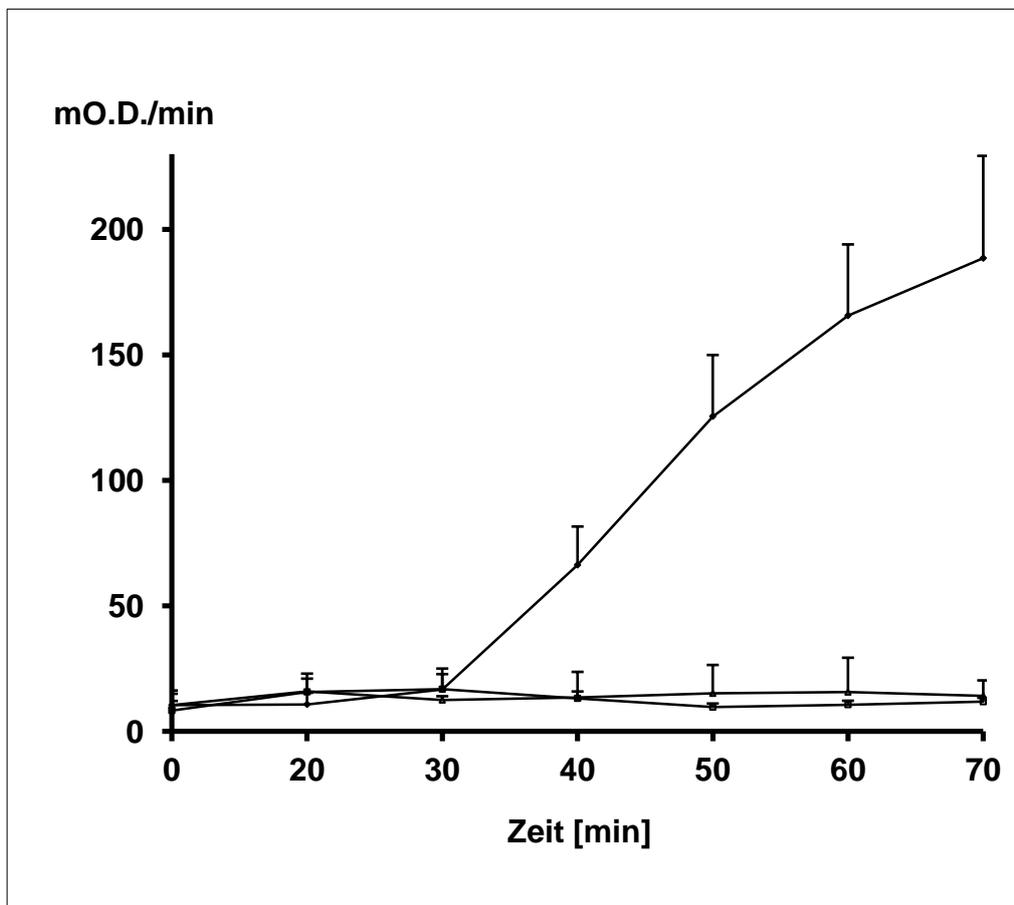


Abb. 7: Thrombinbildung durch das Kontaktsystem

In dieser Versuchsreihe in PRP (10^8 Plättchen/ml PRP) wurde die Thrombinbildung in unverändertem PRP (gefüllte Rauten), in PRP mit CTI (Quadrate) und in PRP von Patienten mit homozygotem Faktor XII-Mangel (Dreiecke) untersucht. Mittelwerte des unveränderten PRP: 0 min: $10,44 \pm 5,84$ mO.D./min, 20 min: $10,78 \pm 4,59$ mO.D./min, 30 min: $38,3 \pm 15,29$ mO.D./min, 40 min: $66,31 \pm 24,41$ mO.D./min, 50 min: $125,5 \pm 28,33$ mO.D./min, 60 min: $165,63 \pm 40,73$ mO.D./min, 70 min: $188,5 \pm 50,20$ mO.D./min; n = 14; Mittelwerte des PRP mit CTI: 0 min: $8,33 \pm 3,79$ mO.D./min, 20 min: $15,75 \pm 5,25$ mO.D./min, 30 min: $16,83 \pm 8,18$ mO.D./min, 40 min: $13,17 \pm 2,72$ mO.D./min, *p = 0,008, 50 min: $9,67 \pm 1,43$ mO.D./min, *p = 0,011, 60 min: $10,67 \pm 1,55$ mO.D./min, *p = 0,003, 70 min: $11,83 \pm 1,65$ mO.D./min, *p = 0,002; n = 3. Mittelwerte des PRP von Pat. mit F XII-Mangel: 0 min: $10,5 \pm 4,49$ mO.D./min, 20 min: $16,0 \pm 7,0$ mO.D./min, 30 min: $12,5 \pm 1,5$ mO.D./min, 40 min: $13,5 \pm 10,2$ mO.D./min, 50 min: $15,17 \pm 11,29$ mO.D./min, 60 min: $15,17 \pm 13,67$ mO.D./min, 70 min: $14,17 \pm 6,14$ mO.D./min; n = 3.

Zur weiteren Prüfung der Beteiligung von Faktor XII wurde PRP eines Faktor XII-defizienten Patienten (homozygote Faktor XII-Defizienz) getestet. Dabei zeigte sich ebenfalls kein Anstieg der Thrombinkonzentration.

In weiteren Versuchsreihen konnten wir auch eine Verstärkung der Prothrombinaseaktivität durch die Zugabe von 0,05 U/ml Thrombin sowohl in PRP (Verkürzung der Lagtime im Mittel um das 2,12-fache \pm 0,96; Mittelwerte der Kontrolle: $56,22 \pm 34,53$ mO.D./min, Thrombinstimulierung: $30,76 \pm 24,82$ mO.D./min; n = 15) als auch in Anwesenheit isolierter Thrombozyten (Erhöhung der Aktivität um das 1,85-fache \pm 0,5; Mittelwerte der Kontrolle: $47,08 \pm 29,23$ mO.D./min; Mittelwerte der Thrombinstimulierung: $77,73 \pm 32,92$ mO.D./min; n = 8) feststellen. Somit lassen die oben beschriebenen Ergebnisse auf eine Aktivierung der Thrombinbildung durch das Kontaktsystems schließen.

4.2 Beeinflussung der Thrombinbildung durch Lipoproteine

Um festzustellen, welchen Effekt die einzelnen Lipoproteinfraktionen VLDL, LDL und HDL auf die Aktivierung der Thrombinbildung haben, wurde zunächst LDL aus dem PRP mittels anti-h-LDL-Antikörpern-gekoppelter Chromatographiesäulen nach der unter 2.5 angegebenen Methode entfernt. Im Anschluss wurden zu diesem LDL-depletierten PRP, sowie auch zu nativem PRP, welches nicht über die Säulen gelaufen war, definierte Mengen an VLDL, LDL und HDL zugefügt. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von VLDL den stärksten Effekt auf die Thrombinbildung aufwies (**Abb. 8**).

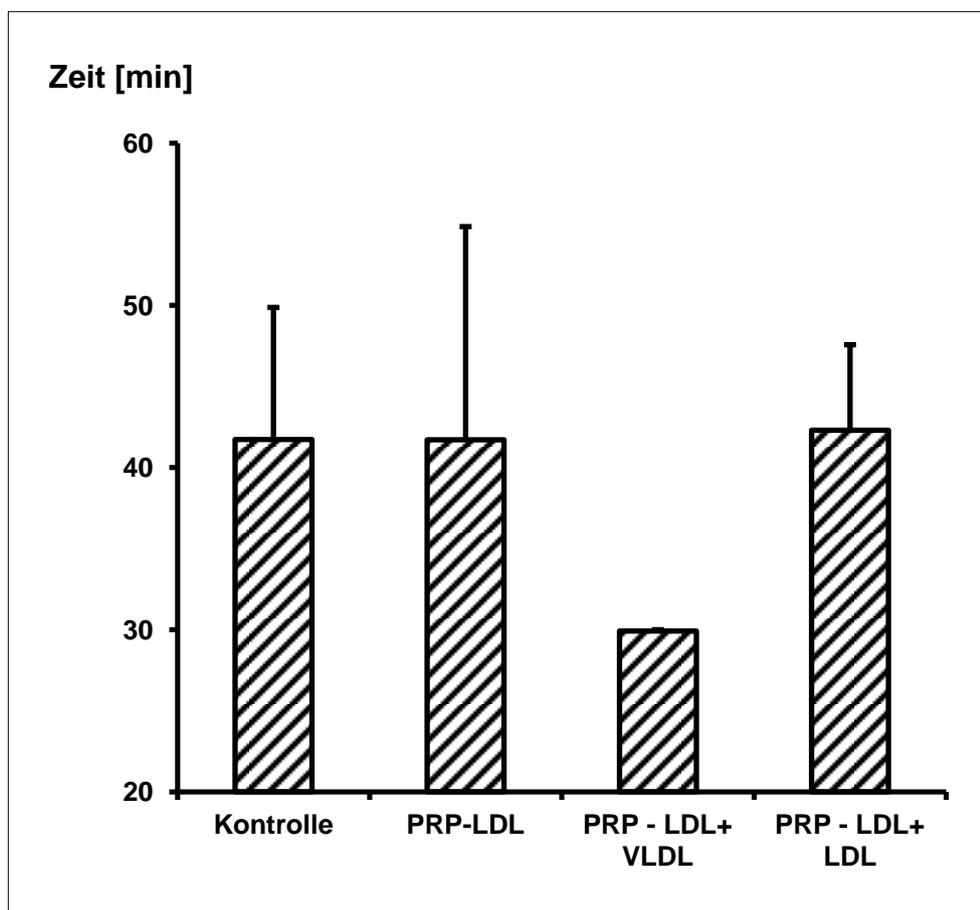


Abb. 8: Zugabe von Lipoproteinen zu LDL-depletiertem PRP

PAP wurde über Säulenchromatografie mittels Antikörper-beschickten Säulen das LDL entzogen. Im Anschluss wurden dem PAP wieder die Plättchen (10^8 /ml) beigefügt und VLDL und LDL jeweils 0,6 mg/ml zugegeben. Unter der VLDL-Zugabe erfolgte eine Stimulierung der Thrombinbildung während unter LDL-Zugabe nach Entzug von LDL die Ausgangswerte erreicht wurden. (Mittelwerte: Kontrolle: $41,74 \pm 8,14$ min, $n = 19$, PRP-LDL: $41,72 \pm 13,14$ min, $n = 7$, PRP-LDL+VLDL: $29,92 \pm 0,08$ min, $n = 2$; * $p = 0,086$ (* $p < 0,017$), PRP-LDL+LDL: $42,3 \pm 5,28$ min; $n = 2$)

Bereits geringe Mengen VLDL verkürzten die Lagtime. Bei Konzentrationen von 0,3 mg Protein/ml verkürzte VLDL die Lagtime im Vergleich zur Kontrolle um 18 %. Bei einer Steigerung der VLDL-Konzentration auf 0,6 mg Protein/ml wurde die Lagtime nur geringfügig weiter verkürzt (**Abb. 9**). Bei höheren Konzentrationen zeigte sich eine Sättigung des Effekts (vgl. auch McNally et al., 1996).

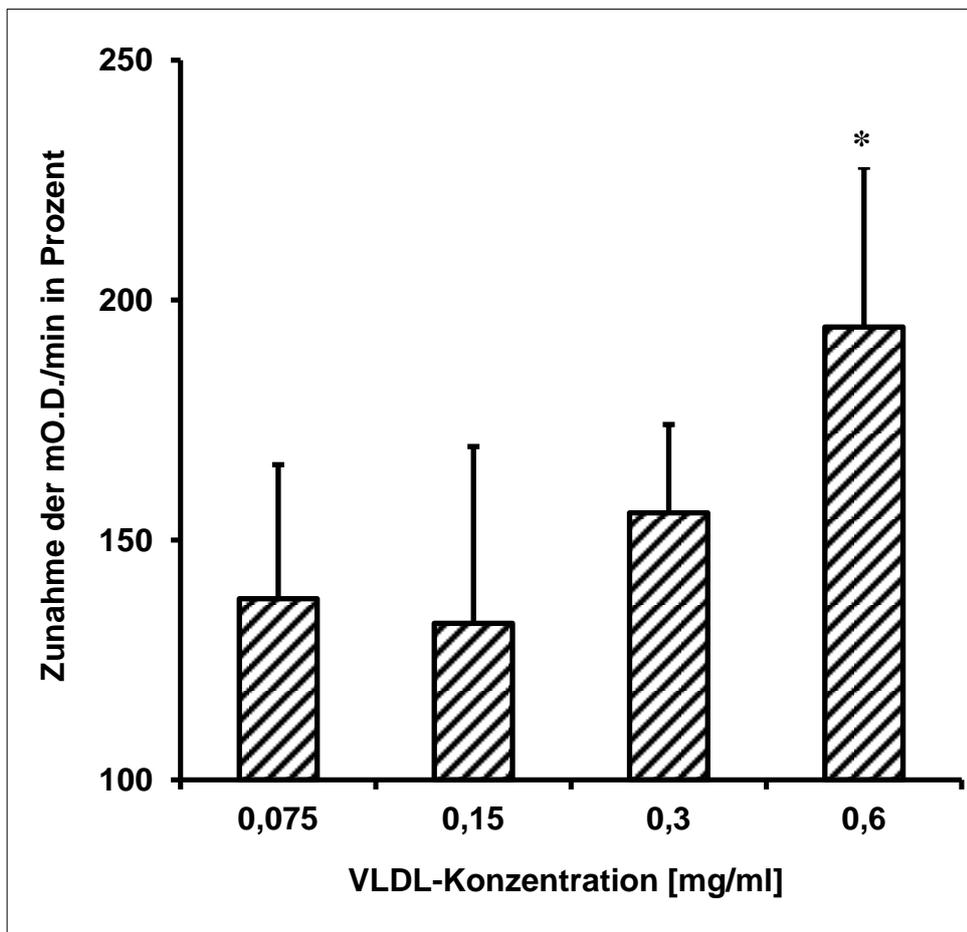


Abb. 9: Konzentrationsabhängigkeiten der VLDL-Wirkung auf die Thrombinbildung

PRP wurden i. R. des Versuchs zur Thrombinbildung jeweils VLDL-Mengen von 0,075 mg/ml (n = 2), 0,15 mg/ml (n = 4), 0,3 mg/ml (n = 3), 0,6 mg/ml (n = 5) zugefügt und im ELISA Reader die Thrombinbildung anhand des Abbaus des Substrates S-2238 gemessen. Dabei ergab sich bei 0,6 mg/ml VLDL eine signifikante Stimulierung der Thrombinbildung im Vergleich zu 0,075 mg/ml. (Mittelwerte: bei 0,075 mg/ml: $137,72 \pm 27,94$, bei 0,15 mg/ml: $132,64 \pm 36,81$, bei 0,3 mg/ml: $155,66 \pm 18,39$, bei 0,6 mg/ml: $194,39 \pm 33,28$, *p = 0,051)

Da auch nach Entfernung des LDLs mittels Säulenchromatografie keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle zu verzeichnen waren (vgl. **Abb. 8**), ist zusammengenommen davon auszugehen, dass die Thrombinbildung spezifisch durch VLDL stimuliert wird.

Da bereits bei einer VLDL-Konzentration von 0,3 mg Protein/ml ein deutlicher Effekt erzielt wurde, wurde in weiteren Versuchen diese Konzentration eingesetzt.

Um zu prüfen, ob der VLDL-vermittelte Effekt auf die Thrombinbildung durch das Kontaktsystem unterstützt wird, wurde in einer weiteren Versuchsreihe zu den Ansätzen auch CTI zugefügt. Hierdurch wurde die VLDL-induzierte Thrombinbildung vollständig gehemmt (**Abb. 10**). Zu demselben Ergebnis führten auch Versuchsreihen mit PRP, das aus dem Blut von Patienten stammte, die eine homozygote Faktor XII-Defizienz aufwiesen (**Abb. 10**).

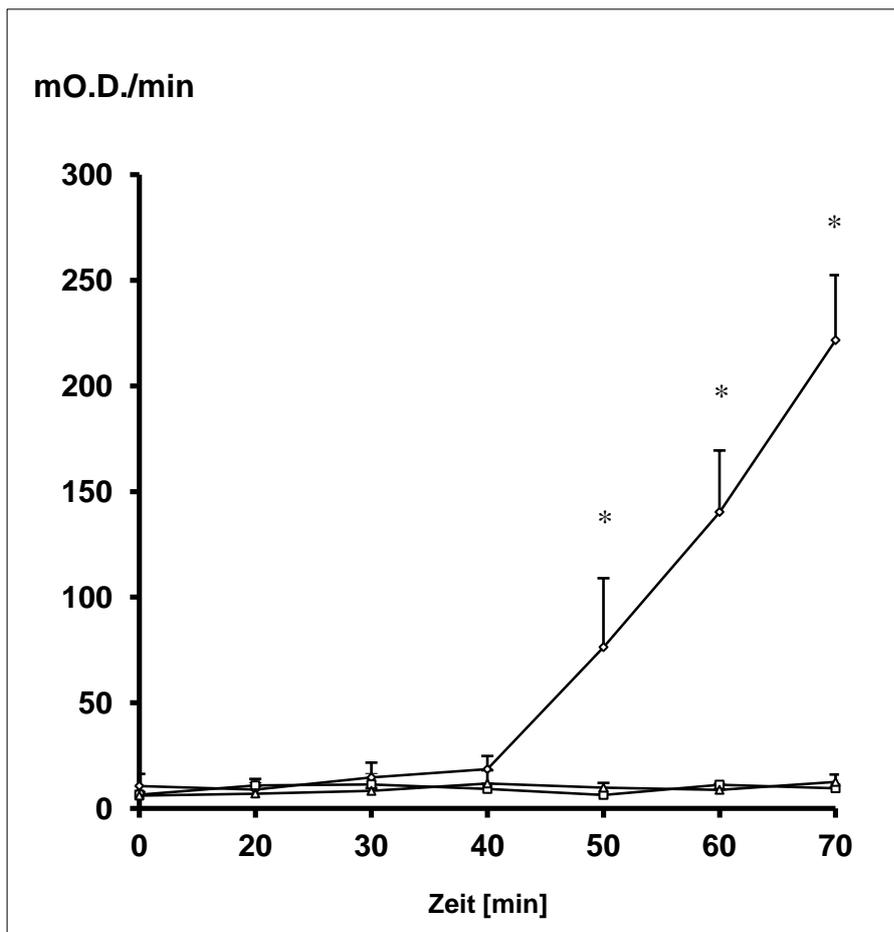


Abb. 10: F XII-Abhängigkeit der VLDL-stimulierten Thrombinbildung

PRP wurde mit 0,6 mg/ml VLDL versetzt. Gegenüber dieser Kontrolle (Rauten) wurde in einem weiteren Ansatz CTI zugefügt (Dreiecke). Ein zusätzlicher Ansatz wurde mit F XII-defizientem PRP (Quadrate) versetzt. (Mittelwerte der Kontrolle: 0 min: $10,58 \pm 5,68$ mO.D./min, 20 min: $8,83 \pm 5,03$ mO.D./min, 30 min: $14,6 \pm 7,02$ mO.D./min, 40 min: $18,5 \pm 6,25$ mO.D./min, 50 min: $76,3 \pm 32,64$ mO.D./min, $p = 0,022$, 60 min: $140,3 \pm 29,12$ mO.D./min, $p = 0,022$, 70 min: $221,67 \pm 30,79$ mO.D./min, $p = 0,023$; $n = 6$; Mittelwerte der CTI-Ansätze: 0 min: $6,5 \pm 1,5$ mO.D./min, 20 min: $10,83 \pm 1,18$ mO.D./min, 30 min: $11,33 \pm 5,14$ mO.D./min, 40 min: $9,17 \pm 2,72$ mO.D./min, 50 min: $6,33 \pm 0,63$ mO.D./min, 60 min: $11,17 \pm 0,62$ mO.D./min, 70 min: $9,5 \pm 0,82$ mO.D./min; $n = 3$. Mittelwerte der F XII-def. Ansätze: 0 min: $6,0 \pm 1,5$ mO.D./min, 20 min: $7,0 \pm 3,5$ mO.D./min, 30 min: $8,25 \pm 1,25$ mO.D./min, 40 min: $11,75 \pm 6,25$ mO.D./min, 50 min: $9,75 \pm 2,25$ mO.D./min, 60 min: $8,75 \pm 0,25$ mO.D./min, 70 min: $12,5 \pm 3,5$ mO.D./min; $n = 3$).

In einer weiteren Versuchsreihe mit plättchenarmem Plasma (PAP) zeigte sich, dass VLDL in diesem System wirkungslos blieb (**Abb. 11**). Auch bei zusätzlicher Anwesenheit von Thrombin blieb die Thrombinbildung unbeeinflusst. Dies zeigt, dass Thrombozyten für den VLDL-induzierten Effekt auf die Thrombinbildung unbedingt erforderlich sind.

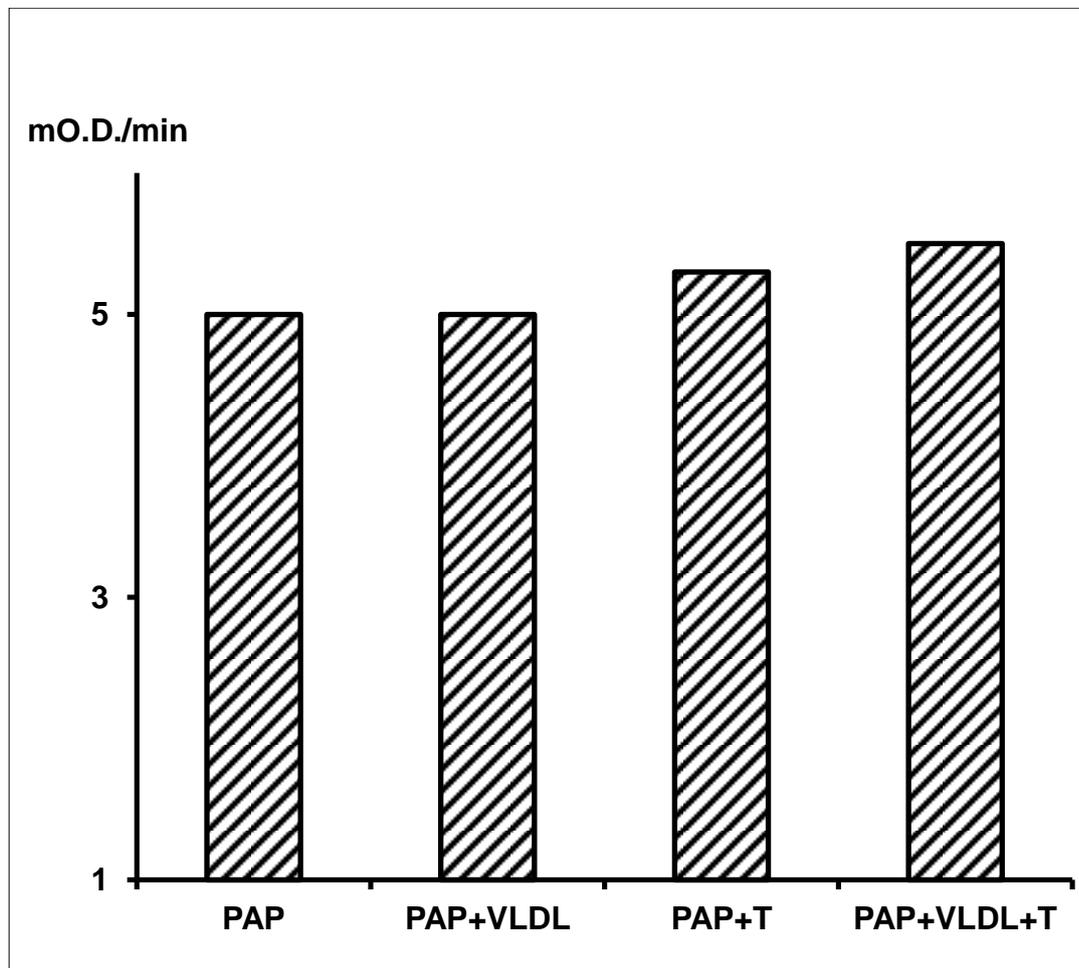


Abb. 11: Thrombinbildung im PAP nach Zugabe von VLDL und Thrombin

Die Thrombinbildung wurde in PAP (Kontrolle), nur mit 0,6 mg/dl VLDL, nur mit Thrombin (T) und mit VLDL plus Thrombin bestimmt. n = 1

Inwieweit lässt sich eine derartige in-vitro-Situation auf die in-vivo-Situation und damit auf den menschlichen Organismus übertragen? Es schlossen sich weitere Versuche im Vollblut an, wobei mittels der Thrombelastographie die Fibrinbildung und das Clot-Wachstum im Vollblut bestimmt wurden.

In Kontrollexperimenten wurde ermittelt, dass die Fibrinbildung auch unter diesen experimentellen Bedingungen über das Kontaktsystem vermittelt wird. In der Tat war nach Zugabe von CTI zu Vollblut ebenso wie bei Vollblut von Faktor XII-defizienten Patienten keine Fibrinbildung sowie Clot-Bildung festzustellen.

Nach Zugabe von VLDL (0,3 mg Protein/ml) wurde eine deutliche Verstärkung der Fibrinbildung beobachtet, die sich in einer Verkürzung des r-Wertes um 20 % zeigte. Diese Zunahme der Fibrinbildung konnte durch Zugabe von CTI gehemmt werden bzw. war im Vollblut eines Faktor XII-defizientem Patienten nicht nachweisbar.

Somit konnte gezeigt werden, dass auch in einem ex-vivo-System die Thrombinbildung über die Aktivierung des Kontaktsystems durch VLDL eine deutliche Steigerung erfährt und damit das in-vitro-Experiment übertragbar auf das Vollblut ist. Dagegen führte die LDL-Zugabe (0,6 mg Protein/ml) im Vollblut zu einer Verlängerung des r-Wertes um 60 % (**Abb. 12**).

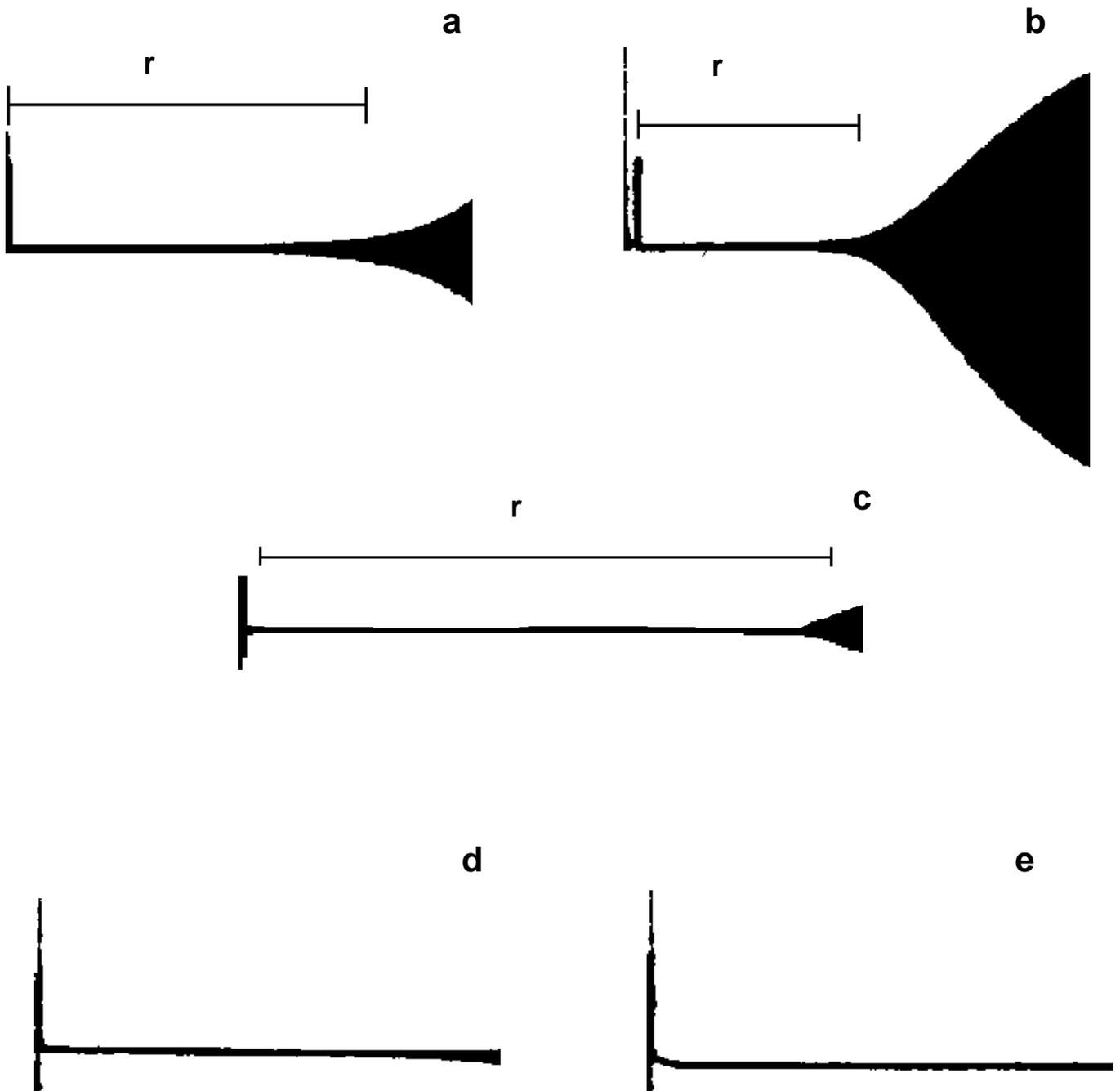


Abb. 12: Wirkung von VLDL auf die Fibrinbildung im Vollblut

In Vollblut wurde gegen eine Kontrolle ohne Lipoproteininzusatz (a) eine Probe mit VLDL (b) und eine Probe mit LDL (c) stimuliert. Derselbe Versuch wurde mit Vollblut eines Patienten mit homozygotem F XII-Mangel unternommen. Dabei ist der r-Wert ein Maß für die Fibrinbildung im Vollblut. Abgebildet wurden repräsentative Experimente an Blut von Spendern ohne (a-c) bzw. mit homozygotem F XII-Mangel (d, e)

In einer weiteren Versuchsreihe wurde getestet, ob VLDL die Fibrinbildung nicht nur über das Kontaktaktivierungssystem steigern kann, sondern auch durch den extrinsischen Weg, der durch TF vermittelt wird.

Daher wurde dem Vollblut 1,4 ng/ml rekombinanter TF zugegeben. Wie zu erwarten, verkürzte sich der r-Wert dadurch von im Mittel $27,5 \pm 7,0$ mm auf $16,25 \pm 2,9$ mm. Dieser Effekt konnte jedoch durch die Zugabe von VLDL (0,3 mg Protein/ml) nicht weiter gesteigert werden (Mittelwert: $r = 17,9 \pm 4$ mm, $n = 6$). Auch eine zusätzliche Blockade der Aktivierung des Kontaktsystems durch CTI erbrachte keine Änderung des Ergebnisses. Auch die TF-induzierte Fibrinbildung im Vollblut eines Patienten mit homozygotem F XII-Mangel wurde durch VLDL nicht beeinflusst (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die thrombinbildende Wirkung des VLDL ausschließlich über die Kontaktaktivierung abläuft und keinen Einfluss auf die extrinsische Gerinnung hat.

4.3 Wirkungen von Phospholipid-Komponenten der Lipoproteine auf die Prothrombinase-Aktivität

Im Weiteren wurde untersucht, welche Bestandteile des VLDL für deren Einfluss auf die Thrombinbildung von Bedeutung sind. Dafür wurde VLDL zunächst aus dem Plasma eines gesunden Spenders isoliert und gereinigt. Danach erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford, um die Konzentration des VLDL-Proteinanteils zu ermitteln. Anschließend wurde die lipophile von der hydrophilen Phase der Lipoproteine nach der Methode von Bligh und Dyer getrennt, um zunächst den Effekt der beiden Phasen auf die Thrombinbildung zu messen. Dabei wurde dem PRP jeweils die lipo- bzw. hydrophile Phase in einer Menge zugegeben, die dem Proteinanteil von 0,6 mg VLDL-Protein/ml entspricht. Die lipophile Phase wurde dabei als Lipidvesikel aufbereitet. Im Vergleich zur Kontrolle stieg der Wert der Thrombinbildung nach Zugabe der lipophilen Phase um ein 5,98-faches $\pm 0,02$ ($n = 2$). Hingegen war nach Zugabe der wasserlöslichen Phase mit $0,57 \pm 0,2$ ($n = 5$) eine Reduktion der Thrombinbildung festzustellen.

Der thrombinstimulierende Faktor des VLDL lag demnach in der lipophilen Phase.

Daher wurden die VLDL-Lipide anschließend mittels Dünnschichtchromatographie zunächst in eine Gesamt-Phospholipid-Fraktion und eine Neutrallipid-Fraktion aufgetrennt.

Die beiden Fraktionen wurden im Anschluss wie oben isoliert und Lipidvesikel daraus hergestellt. Daraufhin erfolgte die Zugabe zum PRP. In der anschließenden Messung zeigte sich eine Reduktion der Lagtime um 33 % bei Anwesenheit beider Fraktionen in einer Probe. Auch steigerte die Gesamt-Phospholipid-Fraktion alleine die Thrombinbildung um 38 %. Hingegen war nach Zugabe der Neutrallipide kein Effekt auf die Thrombinentstehung zu verzeichnen (Abb. 13).

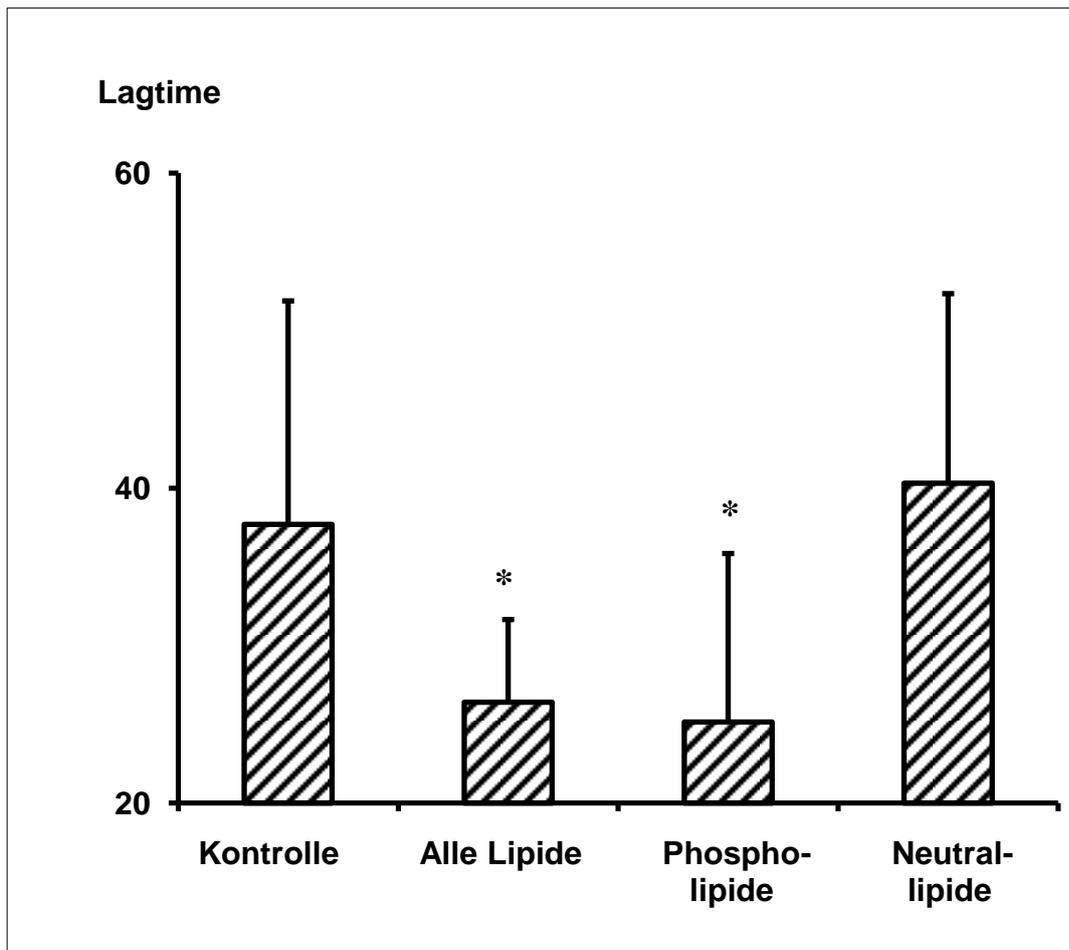


Abb. 13: Wirkungen verschiedener Lipidfraktionen von VLDL auf die Thrombinbildung

PRP wurde mit Vesikeln aus der gesamten Lipid-Fraktion (n = 6), aus der Gesamt-Phospholipid-Fraktion (n = 3) bzw. aus der Neutrallipid-Fraktion (n = 4) versetzt. Daraufhin wurde die Thrombinbildung bestimmt. Mittelwerte der Lagtime: Kontrolle: $37,7 \pm 14,2$, gesamte Lipid-Fraktion: $26,4 \pm 5,26$, *p = 0,05, Gesamt-Phospholipid-Fraktion: $25,1 \pm 10,7$, *p = 0,05, Neutrallipid-Fraktion: $40,3 \pm 12,0$.

Dies ließ darauf schließen, dass die Stimulierung des Kontaktsystems durch die Phospholipide des VLDL induziert wird. Da diese Fraktion von unterschiedlichen Phospholipidspezies gebildet wird, wurde in einem nächsten Schritt nach der für den Anstieg der Thrombinbildung verantwortlichen Phospholipid-Komponente gefahndet.

Um die verschiedenen Phospholipide aufzutrennen, wurden sie zusammen mit bekannten Standard-Phospholipiden auf eine Dünnschichtchromatographieplatte aufgebracht und aufgetrennt. Dabei zeigten sich spezifische Spots für PE, PC/PI, SM und LPC, die durch die parallel laufenden Standards identifiziert werden konnten.

Aus den einzelnen Spots wurden nach Extraktion und Reinigung wieder Lipidvesikel hergestellt und dem PRP zugefügt. Die Ergebnisse zeigten nur im Falle der PE-enthaltenden Vesikel einen signifikanten Thrombinzuwachs. Dabei verkürzte sich die Lagtime um 41 %. Dagegen wurden keine Veränderungen durch Lipidvesikel erzielt, die selektiv PC/PI, SM und LPC enthielten. (Abb. 14).

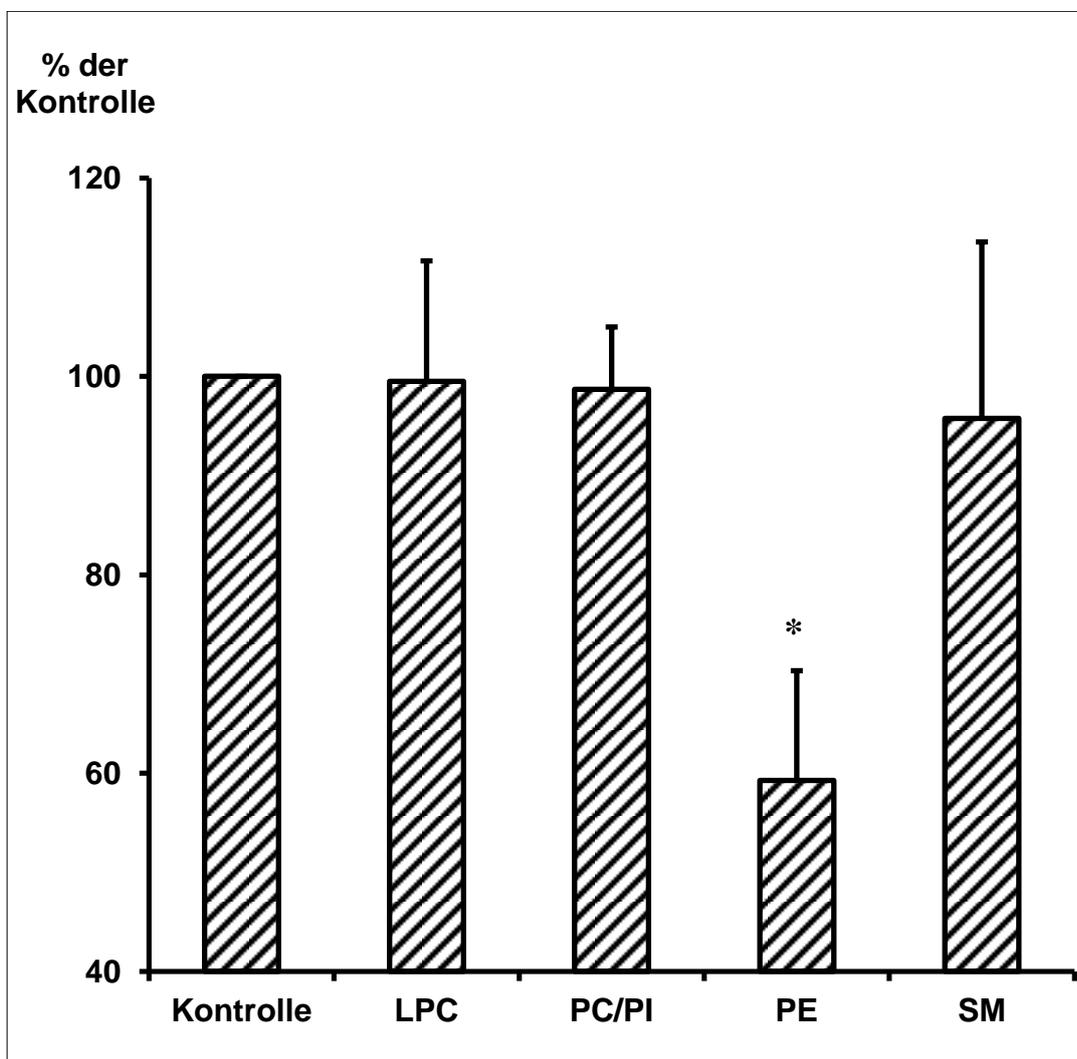


Abb. 14: Thrombinbildung nach Zugabe einzelner Phospholipid-Fractionen des VLDL

Nachdem die Phospholipid-Fraktion mittels DC aufgetrennt wurde, wurden die einzelnen Fraktionen (LPC (n=3), PC/PI (n = 3), PE (n = 4), SM (n = 3)) in Vesikel inkorporiert und PRP zugegeben. Mittelwerte: LPC: 99,5 ± 12,1 %, PC/PI: 98,7 ± 6,3 %, PE: 59,3 ± 11,1 %, *p = 0,001, SM: 95,8 ± 17,8 %.

Um auszuschließen, dass es sich bei der aktivierenden Substanz um eine mit der PE-Fraktion laufende aktivierende Komponente handelt, wurden konventionell erworbene synthetische Phospholipide getestet. Diese Phospholipide wurden ebenfalls in Lipidvesikel bestehend aus 95 % Ei-PC und 5 % des jeweiligen Phospholipids eingebracht und dem PRP zugegeben. Es stellte sich bei der Zugabe von Vesikeln, die synthetisches PE enthielten, derselbe stimulierende Effekt ein wie bei den Vesikeln, die aus VLDL-PE hergestellt wurden (Abb. 15).

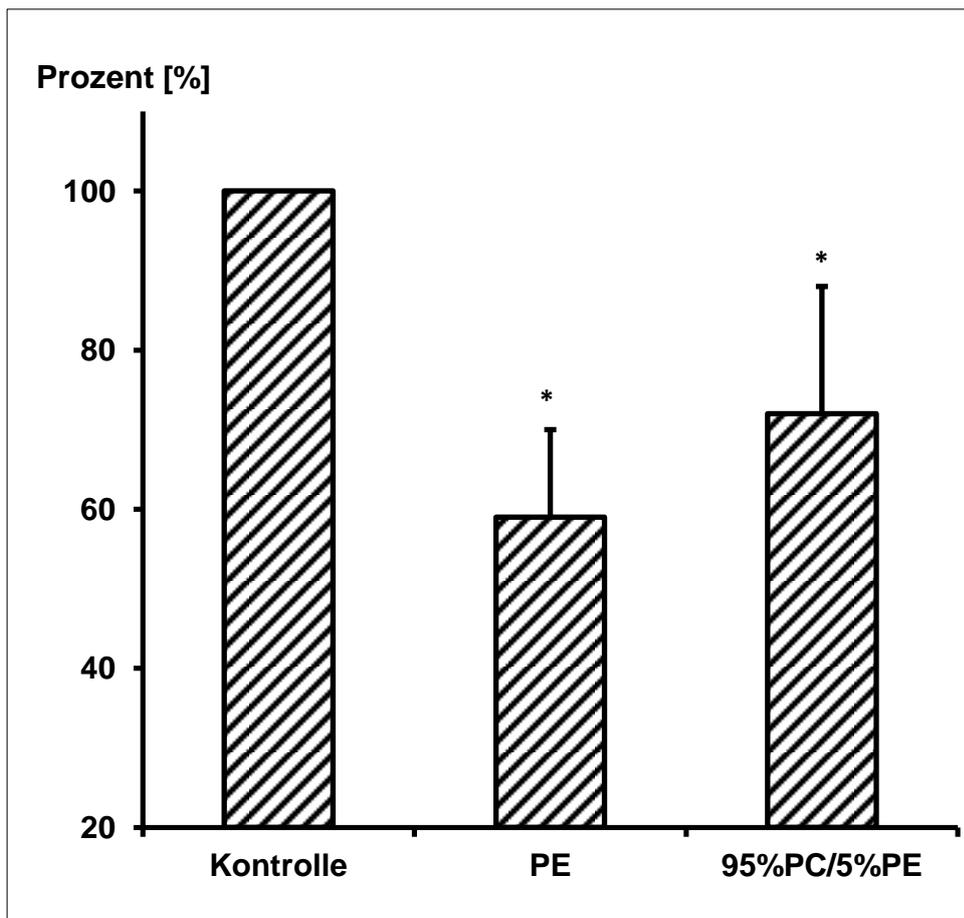


Abb. 15: Thrombinstimulation durch VLDL-assoziiertes PE

In dieser Versuchsreihe wurde VLDL-assoziiertes PE mit synthetischem PE verglichen. Aus beiden PE-Spezies wurden Vesikel hergestellt und in einer Menge von 0,6 mg/ml Protein dem zuvor gewonnenen PRP zugegeben. Die Ansätze wurden gegen eine Kontrolle mit reinem PRP verglichen. Dabei stimuliert das industriell hergestellte PE in etwa so wie das aus VLDL gewonnene PE. VLDL-assoziiertes PE: $59,3 \pm 11,1$ % (*p = 0,002), (n = 4), industrielles PE: $72,2 \pm 15,8$ % (*p = 0,015), (n = 2).

Die Lagtime verkürzte sich um 40 % bei VLDL-assoziiertem PE und um 28 % bei synthetischem PE. Hingegen verlängerte sich die Lagtime, gleichbedeutend mit einer Hemmung der Thrombinbildung, nach Zugabe von Vesikeln, die aus 95 % Ei-PC und 5 % lyso-PC präpariert wurden (Abb. 16).

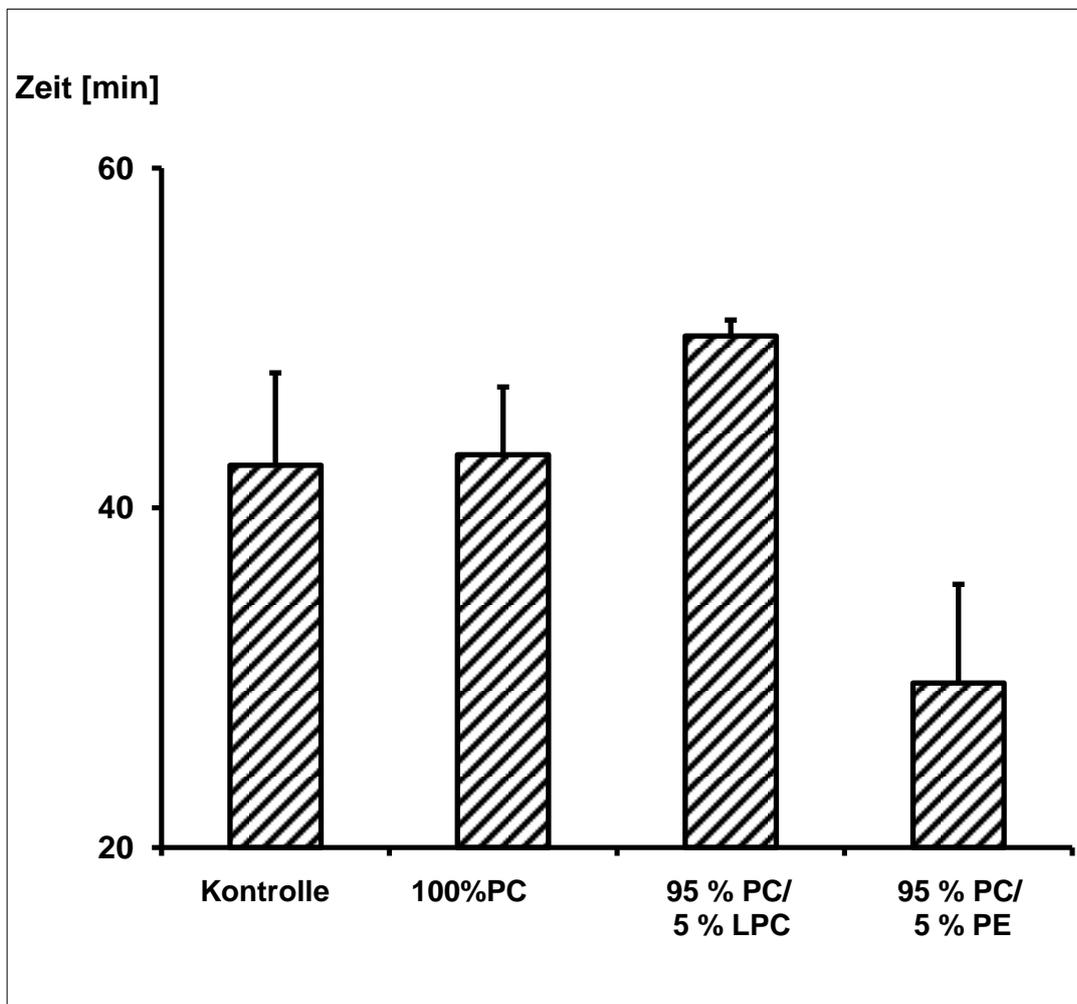


Abb. 16: Wirkung synthetischer Phospholipide auf die Thrombinbildung

PRP wurden Lipidvesikel aus synthetischen Phospholipiden beigemischt und die Thrombinbildung gemessen. Im Vergleich zur Kontrolle wurden reines PC, ein Gemisch aus PC/LPC, und ein Gemisch aus PC/PE eingesetzt. Mittelwerte: Kontrolle: 42,5 ± 5,4 min, 100 % PC: 43,1 ± 4,0 min, 95 % PC/ 5 % LPC: 50,1 ± 0,9 min, 95 % PC/ 5 % PE: 29,8 ± 5,8 min, (p = 0,024 bei *p < 0,017).

In derselben Versuchsreihe wurde auch PA eingesetzt, welches sich in der eindimensionalen Dünnschichtchromatographie nur schlecht von den anderen Fraktionen trennen ließ. Dabei sahen wir einen tendenziell hemmenden Effekt auf die Thrombinbildung.

In einem Kontrollversuch wurden die einzelnen aus VLDL isolierten Phospholipide wieder zusammengefügt. Dabei wurde jeweils eine einzelne Fraktion weggelassen und der Rest als Phospholipidgemisch dem PRP in Form von Vesikeln zugefügt. Hierbei führte die Eliminierung von LPC zu einer Verkürzung der Lagtime, während die Eliminierung von PE zu einer signifikanten Verlängerung der Lagtime führte. Dies zeigt, dass im Falle des Fehlens von LPC die Thrombinbildung stimuliert sowie bei fehlendem PE die Thrombogenese gehemmt wird (**Abb. 17**).

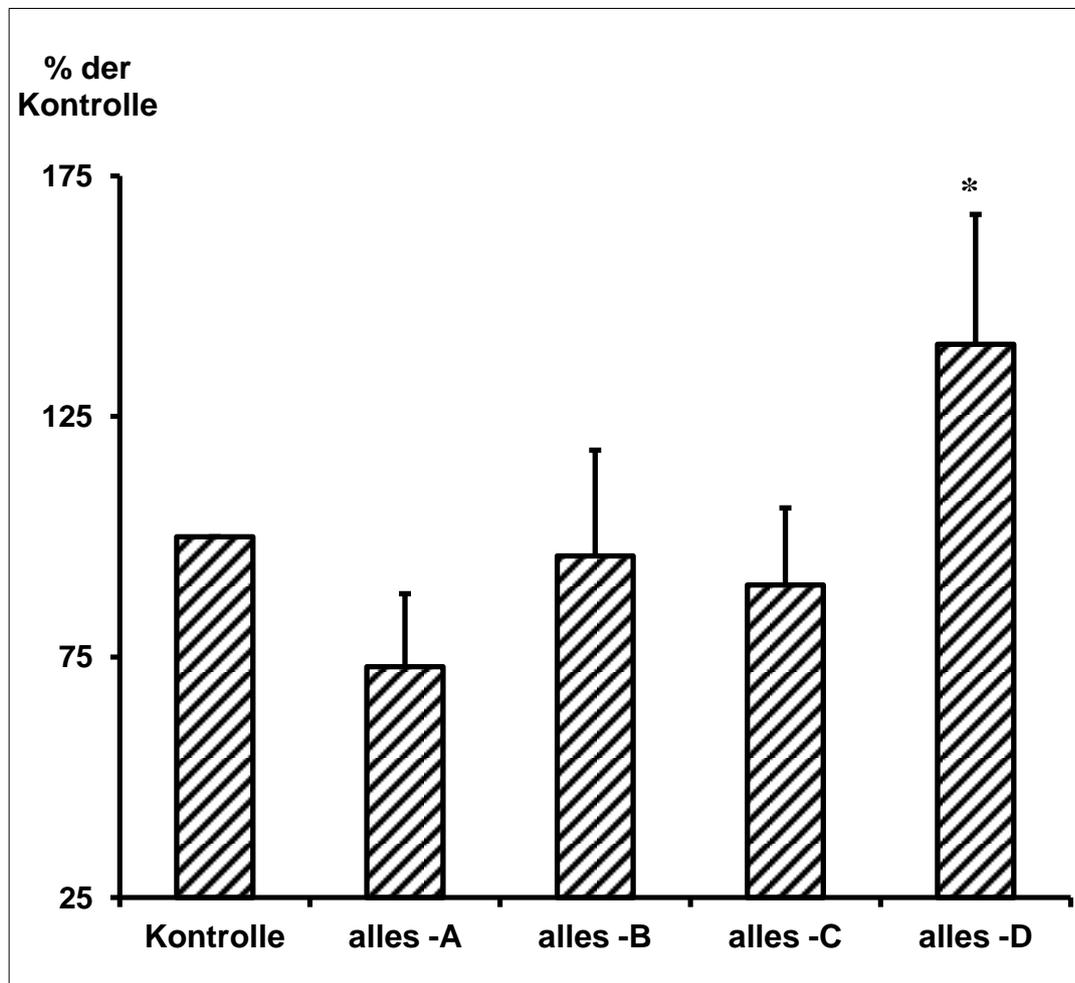


Abb. 17: Eliminierung einzelner Phospholipidfraktionen

PRP wurden Phospholipidgemische zugefügt, welchen jeweils eine spezifische Fraktion entzogen wurde. A = Gemisch ohne LPC, Mittelwert: 73 ± 15 (n = 4), B = Gemisch ohne SM, Mittelwert: 96 ± 22 (n = 4), C = Gemisch ohne PC/PI, Mittelwert: 90 ± 16 (n = 4), D = Gemisch ohne PE, Mittelwert: 54 ± 32 (n=3). Danach wurde die Thrombinbildung gemessen. *p = 0,004.

Zusammengenommen zeigen die Experimente, dass das Kontaktsystem durch das im VLDL vorkommende PE aktiviert wird.

Um dies zu bestätigen, präparierten wir Phospholipidvesikel, in welchen die Konzentration der einzelnen Phospholipide der Zusammensetzung des VLDL bzw. LDL entspricht. Wir gingen dabei von den bekannten Konzentrationen wie folgt aus:

VLDL:	PC 62 Mol %	LDL:	PC 64 Mol %
	PE 5 Mol %		PE 2 Mol %
	SM 16 Mol %		SM 26 Mol %
	LPC 5 Mol %		LPC 3 Mol %
	PI 4 Mol %		PI 2 Mol %
	PA 5 Mol %		PA 1,5 Mol %
	PS 2,4 Mol %		PS 1 Mol %

Wesentliche Unterschiede zwischen VLDL und LDL ergeben sich insbesondere für den Gehalt von PE, das im VLDL in doppelt so hoher Konzentration vorliegt wie im LDL. Bei Versuchen, in welchen die, die tatsächlichen Phospholipidkonzentrationen reproduzierenden Vesikel PRP zugefügt wurden, konnten wir eine Tendenz zur Aktivierung des Kontaktsystems durch das VLDL-entsprechende Phospholipidgemisch nachweisen (**Abb. 18**). Keine Aktivierung ergab sich jedoch bei dem LDL-entsprechenden Phospholipidgemisch. Dies war unabhängig von den Konzentrationen von PA und LPC. Die Ergebnisse waren nicht signifikant, zeigten jedoch eine deutliche Tendenz.

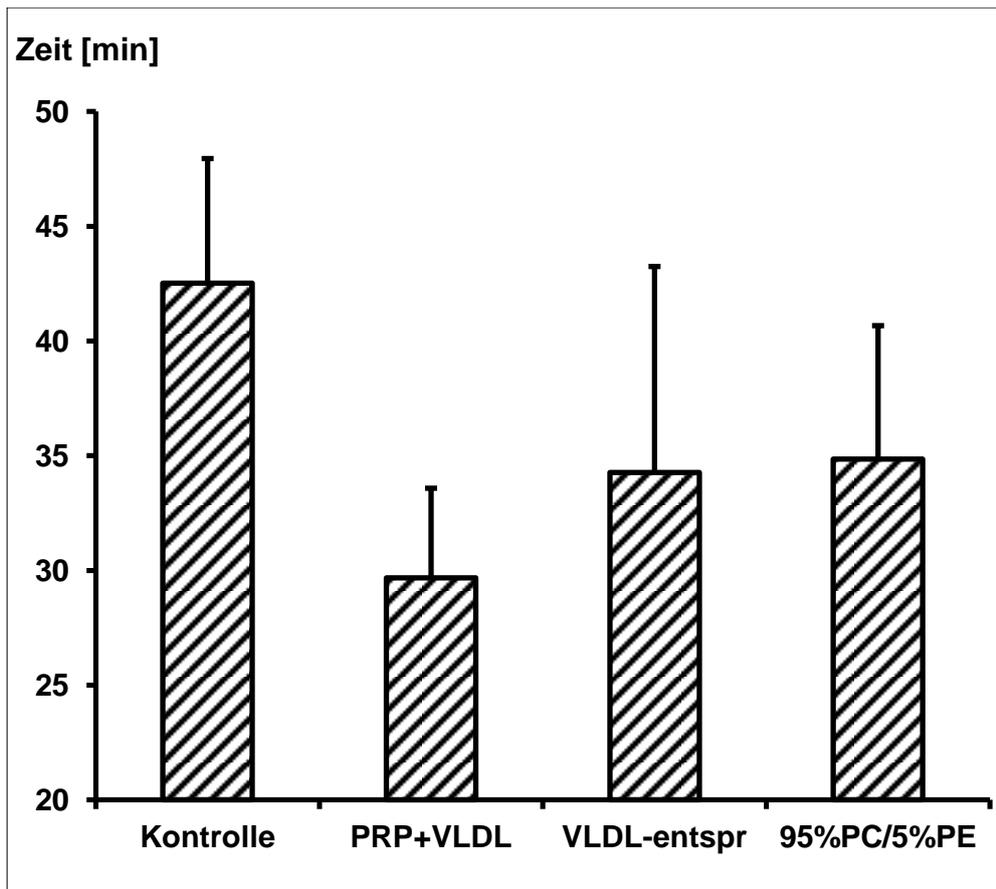


Abb. 18: Vergleich der Thrombinstimulation von VLDL und einem aus synthetischen Phospholipiden hergestelltem VLDL-Gemisch

Gegen eine Kontrolle mit reinem PRP werden Ansätze, die isoliertes VLDL ($p = 0,089$), aus industriellen Lipoproteinen hergestelltes VLDL ($p = 0,089$) und reine PE-Vesikel ($p = 0,023$) enthalten, in ihrer Fähigkeit zur Stimulierung der Thrombinbildung verglichen. VLDL stimuliert am besten, während sowohl das künstlich hergestellte VLDL als auch das industrielle PE etwas weniger gut stimulieren. Es ließ sich keine Signifikanz von $*p < 0,017$ nachweisen.

5 Diskussion

5.1 Thrombozyten-abhängige Aktivierung des Kontaktsystems durch VLDL

Hypertriglyceridämie gilt als einer der wichtigen Risikofaktoren für die Entwicklung der Atherosklerose (Cullen et al., 2000). Mehrere große Studien, wie z. B. die Prospective Cardiovascular Munster study, zeigen Zusammenhänge zwischen Hypertriglyceridämie und dem Risiko zur Entwicklung einer Koronaren Herzerkrankung (KHK) sowie den positiven Effekt einer Lipidsenkung bei KHK (Helsinki Heart Study und Stockholm Ischemic Heart study) (Cullen et al., 2000). Mit unserer Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhten VLDL-Spiegeln im Plasma und Vollblut *in vitro* und der Aktivierung des Kontaktsystems der Blutgerinnung über Thrombozyten hergestellt werden. Außerdem konnten wir den für die Aktivierung des Kontaktsystems verantwortlichen Bestandteil des VLDL bestimmen und so zur Aufklärung des Mechanismus beitragen. Hypertriglyceridämien sind ein Bestandteil des metabolischen Syndroms. Kardiovaskuläre Erkrankungen entstehen häufig auf der Basis eines metabolischen Syndroms. Im Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom treten eine erhöhte Thrombozytenaktivität und teilweise auch Thrombozytosen auf (Sobel et al., 2004). Erhöhte Thrombozytenaktivität bedeutet aber auch Aktivierung des Gerinnungssystems. Wir konnten in unseren Versuchen zeigen, dass das Kontaktaktivierungssystem die Anwesenheit von Thrombozyten zur Initiierung voraussetzt, da in Versuchen mit PAP keine Aktivierung des Kontaktsystems stattfand. Auch unter Stimulierung mit Lipoproteinen oder Thrombin war eine Aktivierung des Kontaktsystems nicht messbar. Je höher also die Thrombozytenaktivität, desto wahrscheinlicher kann auch die Aktivierung des Kontaktsystems stattfinden.

Aufgrund der klinischen Bedeutung der Hypertriglyceridämien im Bereich der vaskulären Erkrankungen ist es von großem Interesse, zu untersuchen, über welche Mechanismen Hypertriglyceridämien möglicherweise das Kontaktaktivierungssystem stimulieren können.

In weiteren Versuchen bestätigten wir zunächst, dass im PRP die Blutgerinnung über die Kontaktaktivierung vermittelt wird, da Corn-trypsin-inhibitor als spezifischer Hemmstoff die Thrombinbildung hemmte. Die Ergebnisse wurden durch die Hemmung der Thrombinaktivierung bei F XII-defizienten Probanden untermauert. Nach der Zugabe der Lipoproteine VLDL, LDL und HDL zu PRP zeigte sich ein selektiver Anstieg der

Thrombinbildung in Anwesenheit von VLDL unabhängig davon, ob LDL zuvor aus dem Plasma entfernt wurde oder nicht. Auch verkürzte die Zugabe von VLDL die Fibrinbildung im Vollblut, nicht aber die Zugabe von LDL oder HDL.

Der Effekt von VLDL auf die Fibrinbildung war insofern spezifisch, da sich keine Reaktion auf den TF-induzierten Gerinnungsweg zeigte. Diese fehlende Wirkung von VLDL auf die TF-induzierte Blutgerinnung kann damit zusammenhängen, dass durch VLDL die Produktion und Freisetzung von Tissue-factor-pathway-inhibitor (TFPI), des Antagonisten von TF, gesteigert wird (Broin et al., 2006). TFPI ist im Plasma zu nahezu 80 % an apo-B enthaltende Lipoproteine gebunden. Nur ca. 10-20 % liegen in einer freien Form vor. Diese freie Form scheint als Inhibitor des TF im Gegensatz zu seiner gebundenen Form jedoch sehr viel aktiver zu sein (Hansen et al., 1997; Kokawa et al., 1995).

In unseren Versuchen konnten wir also zeigen, dass VLDL über das Kontaktaktivierungssystem und damit über F XII auf die Gerinnung im PRP eingreift. Kohler et al. und Miller et al. zeigten bereits, dass Zusammenhänge zwischen erhöhten Triglycerid-Spiegeln und hohen Faktor XIIa-Konzentrationen bestehen (Miller et al., 1997; Kohler et al., 1999). Gleichzeitig deuten neuere Studien darauf hin, dass der Faktor XII einen wichtigen Initiator der Thrombinbildung in vivo darstellt (Schmaier et al., 1999; Røjkjær et al., 1998).

Unsere Versuche erwiesen aber auch, dass F XII nicht nur im PRP sondern auch im Vollblut essentiell für die Aktivierung der Blutgerinnung durch VLDL ist, da auch in diesen Versuchen CTI eine Hemmung der Fibrinbildung verursachte. Zudem zeigten Versuche mit Vollblut eines Patienten mit homozygotem F XII-Mangel keine Fibrinbildung.

Dies bestätigt somit, dass VLDL offensichtlich selektiv über Aktivierung von Faktor XII die Blutgerinnung aktiviert. Dabei können unseren Ergebnissen zufolge bereits leichte Hypertriglyceridämien das Kontaktsystem stimulieren.

5.2 Stimulierung des Kontaktsystems durch Phospholipidvesikel im PRP

Die aktivierende Wirkung von Lipoproteinen wurde bereits in mehreren Studien zuvor, teils auch unter Verwendung desselben Prothrombinase-Assay zur Messung der Thrombinbildung, welches in unseren Versuchen Anwendung fand, bestätigt. So zeigten Moyer et al. in ihrer Studie eine aktivierende Wirkung von VLDL auf die Thrombinbildung in einem isolierten Medium, wobei Lipoproteine und Proteine aus Plasma gewonnen wurden (Moyer et al., 1998). Rota et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass VLDL zu einer höheren Thrombinbildung im künstlichen Medium in einem Prothrombinase-Assay führt als LDL und HDL (Rota et al., 1998). Aviram et al. bestätigten in ihren Arbeiten eine aktivierende Wirkung von VLDL und LDL auf die Thrombinbildung in Anwesenheit von Thrombozyten, während HDL einen hemmenden Effekt zeigte (Aviram et al., 1983). Unsere Versuche in PRP oder Vollblut konnten die aktivierende Wirkung von VLDL bestätigen. Wir strebten daher eine Suche nach der aktivierenden Komponente innerhalb des VLDL an. Wir untersuchten hierbei sowohl die wasserlösliche Phase gegen die Lipidphase, als auch im weiteren Verlauf die Neutrallipide gegen die Phospholipide. In der Phase der Phospholipide konnten wir einzelne Phospholipide schließlich identifizieren, die die Thrombinbildung unterschiedlich stimulierten. Die Phospholipide wurden in Form von Vesikeln aufbereitet und im PRP und Vollblut getestet.

Bereits in früheren Arbeiten wurden einzelne Phospholipide in Form von Vesikeln im Hinblick auf ihre Wirkung auf das Gerinnungssystem und die Thrombinbildung untersucht. So konnten Smeets et al. bereits 1996 zeigen, dass bei Vesikeln mit unterschiedlicher Phospholipid-Zusammensetzung diejenigen aus einem PC-PS-PE-Gemisch zur höchsten Thrombinbildung in einem künstlichen Medium führen (Smeets et al., 1996). Tsuda et al. untersuchten die Wirkung von Vesikeln, die aus verschiedenen Konzentrationen von PC + PS und jeweils PE oder LPC hergestellt wurden, auf das Gerinnungssystem. Dabei wurden die Faktoren V, Prothrombin und X in einem Albumin-enthaltenden Puffer inkubiert. In diesem Milieu zeigte eine steigende Konzentration von PE in den Vesikeln einen eher hemmenden Einfluss auf die Gerinnungsaktivität (Tsuda et al., 2006).

Nach der Auftrennung der Phospholipide durch Dünnschichtchromatographie prüften wir die einzelnen Phospholipide und auch unterschiedliche Kombinationen von Phospholipiden in ihrer Wirkung auf das Blutgerinnungssystem im PRP. Dabei wurden zum einen einzelne Phospholipide getestet, zum anderen Gemische aller Phospholipide, in denen selektiv ein

Phospholipid weggelassen wurde. Die Methode der Isolation der Phospholipide ermöglicht also die Prüfung einzelner Phospholipide, ebenso wie eine Fülle der unterschiedlichen Kombinationen aus mehreren Phospholipidkomponenten. Auf industriell hergestellte Phospholipide kann dabei verzichtet werden, so dass die Versuchsreihe noch besser mit den Gegebenheiten in vivo vergleichbar ist.

5.3 Mechanismen der Aktivierung des Kontaktsystems durch VLDL

Bereits in unseren ersten Versuchen hatte sich gezeigt, dass die Kontaktaktivierung in vitro selektiv über VLDL stimuliert wird. In weiterführenden Versuchen lag unser Interesse auf der Identifikation des Bestandteils des VLDL, welcher maßgeblich an der Aktivierung des Kontaktsystems beteiligt ist.

Um festzustellen, welche Komponenten des VLDL für die Aktivierung der Faktor XII-abhängigen Thrombinbildung verantwortlich sind, separierten wir die wasserlöslichen von den fettlöslichen Anteilen des VLDL. Die als Lipidvesikel vorliegende Phase aktivierte die Thrombinbildung etwa genauso stark wie zuvor das Gesamt-VLDL, während die Zugabe der wasserlöslichen Phase ohne Effekt auf die Aktivierung des Kontaktsystems blieb.

Da daher die aktivierende Komponente in der fettlöslichen Phase des VLDL lag, trennten wir diese weiter in Phospholipide und Neutrallipide auf.

Im Gegensatz zur Fraktion der Neutrallipide, die keinen Effekt auf die Thrombingeneration zeigte, zeigten die VLDL-Phospholipide einen deutlichen Effekt auf die F XII-Aktivierung. Daher begannen wir nach der aktivierenden Komponente innerhalb der Phospholipidfraktion zu suchen (siehe auch **Abb. 14**).

5.4 Phosphatidylethanolamin als Aktivator des Kontaktsystems

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass LDL und HDL die Fähigkeit besitzen, Phospholipide in Plättchen einzuschleusen und dadurch die Zusammensetzung der Membranphospholipide der Thrombozyten zu verändern. Dabei können sowohl PC, PE als auch SM übertragen werden (Ibrahim et al., 2006; Engelmann et al., 1996). Mediatoren wie Thrombin, Kollagen und ADP stimulieren die Aufnahme von PE in Plättchen, nicht aber die von PC oder Sphingomyelin (Engelmann et al., 1998). Um Phospholipide aus VLDL in die Thrombozyten zu transferieren, ist die VLDL-assoziierte LPL erforderlich. Sie stimuliert die Lipolyse von Phospholipiden aus VLDL. Gleichzeitig werden hierbei die Plättchen aktiviert (Ibrahim et al., 2006).

Ibrahim et al. zeigten, dass auch die zytosolische Phospholipase A2 am Transfer von Phospholipiden aus VLDL in aktivierte Thrombozyten beteiligt ist (Ibrahim et al., 2007). VLDL weist eine spezifische Phospholipid-Zusammensetzung auf, die es von anderen Lipoproteinen unterscheidet. Die einzelnen Fraktionen der VLDL-Phospholipide wurden so aufbereitet und isoliert, dass es möglich war, einzelne Fraktionen in der Versuchsanordnung zu testen. Dabei stimulierten nur die PE-enhaltenden Lipidvesikel die kontaktsystemabhängige Thrombingeneration, während die Lipidvesikel, die aus VLDL-SM, -PC/PI und -LPC gebildet wurden, keine Aktivierung verursachten. Engelmann et al. konnten schon in früheren Arbeiten zeigen, dass die Anwesenheit und der Einbau von PE auch die Prothrombinaseaktivität in isolierten Plättchen stimuliert und somit die Thrombinbildung erhöht werden kann (Engelmann et al., 1996). Gleichzeitig erwies sich Thrombin als einer der wichtigen Faktoren, die ihrerseits den Einbau von PE in Plättchen anregen.

In einem weiteren Versuch wurden nacheinander die verschiedenen Fraktionen der Phospholipide aus der Gesamtfraktion entfernt (siehe **Abb. 17**). Dabei zeigte sich nach LPC-Entfernung eine Steigerung der Thrombingeneration, bei Entfernung von SM bzw. PC/PI jedoch kein Effekt. Die Vesikel ohne PE verzögerten die F XIIa-abhängige Thrombinbildung. Diese Ergebnisse zeigten, dass SM und PC/PI nicht die aktiven Komponenten innerhalb der Phospholipide des VLDL sein können.

Der Effekt des PE auf die kontaktsystemabhängige Thrombinaktivierung ließ sich auch in Versuchen mit synthetischem PE reproduzieren, während LPC auch hier eine eher hemmende Wirkung zeigte. In weiteren Versuchen stellten wir Mischungen aus synthetischen Phospholipiden so zusammen, dass sie den isolierten VLDL- bzw. LDL-Phospholipid-Zusammensetzungen entsprachen. Die hauptsächlichen Unterschiede in der Phospholipid-

Zusammensetzung der VLDL-Fraktion zur LDL-Fraktion stellt der Gehalt an PE dar, der mehr als doppelt so hoch in der VLDL-Fraktion ist. Auch in diesen Versuchen konnten wir tendenziell eine stärkere Aktivierung der Kontaktsystem-abhängigen Thrombinbildung durch die dem VLDL entsprechende Phospholipid-Mischung feststellen im Vergleich zur Phospholipid-Mischung, die dem LDL entsprach.

Aktivierte Plättchen exponieren PS an ihrer äußeren Membran, das eine Bindungsstelle für den Tenase-Komplex und den Prothrombinase-Komplex bildet (Sumner et al., 1996). Annexin V, ein Ca^{2+} -abhängiges Bindungsprotein für PS, inhibiert die VLDL-induzierte Thrombingeneration vermutlich über Anbindung an Phospholipide (Rota et al., 1998). Dies bedeutet, dass die Phospholipidstruktur von VLDL für die Bildung des Prothrombin-Komplexes nötig ist, denn andere Lipoproteine können die Thrombinbildung nicht in Abhängigkeit von Annexin V stimulieren. Es ist also denkbar, dass es einen direkten Effekt von in VLDL eingebundenem PE auf die F XII-Aktivierung gibt (**Abb. 20**).

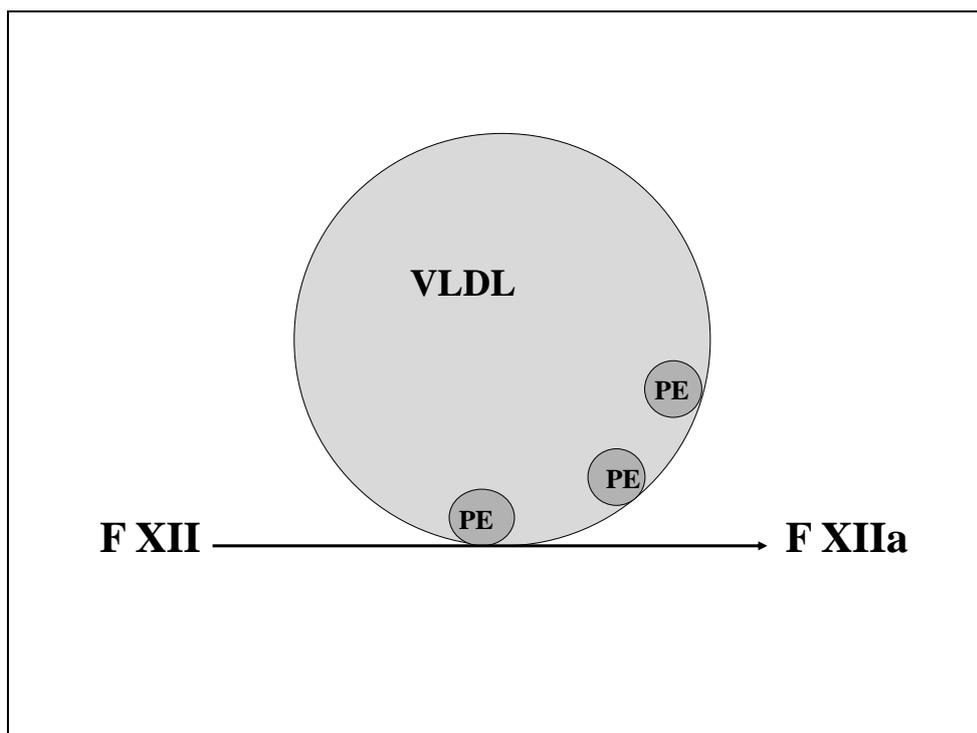


Abb. 20: Direkte Aktivierung von F XIIa durch VLDL-assoziiertes PE

Es ist unseren Experimenten zufolge eher unwahrscheinlich, dass PS einen Effekt auf die Thrombinbildung hat, da es in VLDL-Partikeln in sehr geringer Konzentration vorliegt (Deguchi et al., 2000). PS ist in Spuren in der PC/PI-Fraktion vorhanden. Diese Fraktion zeigte aber nach Aufbereitung keine positiven Effekte auf die Thrombinbildung im Versuch. Dem gegenüber stehen die Daten anderer Autoren, die zeigen dass PE zwar die Plättchenaktivierung steigert, aber dennoch die Anwesenheit von PS voraussetzt. Zudem wird in diesen Arbeiten PS als der hauptsächliche Initiator der Plättchenaktivierung und Stimulator der Prothrombinaseaktivität gesehen (Smirnov et al., 1999; Majumder et al., 2005; Stone et al., 2005).

Zusammenfassend stellt sich PE als diejenige Komponente des VLDL dar, die hauptsächlich für die Aktivierung des Kontaktsystems durch dieses Lipoprotein verantwortlich ist. VLDL weist unter den wichtigen Lipoprotein-Faktoren der Blutgerinnung in der Tat den höchsten Anteil an PE auf (Skipinski et al., 1972). Die Bedeutung für PE für die Thrombinbildung wurde an anderen Systemen bereits in früheren Studien nachgewiesen (Smeets et al., 1996; Smirnov et al., 1994; Falls et al., 2000). PE wurde als Stimulator von Proteasen identifiziert, die in die Blutgerinnung eingreifen. Hierzu gehören die Protein C-abhängige Inaktivierung der Faktoren Va und VIIa (Smirnov et al., 1994), die Aktivierung des Prothrombinase-Komplexes auf der Thrombozytenoberfläche (Smeets et al., 1996; Engelmann et al., 1998) und die Aktivierung des Tenase-Komplexes, der die sn-2-acyl-Kette des PE benötigt (Falls et al., 2000). Interessanterweise kann es auch durch die vermehrte Insertion von PE in die Zellmembran zur Aktivierung der Thrombinbildung kommen. Protein C-Inhibitor, welcher durch aktivierte Plättchen sezerniert wird, unterstützt spezifisch den intermembranären Austausch von PE sowie die Inkorporation von PE in Plättchen (Baumgärtner et al., 2007). Durch die Insertion von PE wird der Prothrombinasekomplex stimuliert, so dass mehr Thrombin entsteht (Baumgärtner et al., 2007). Möglicherweise wird also der Einbau von PE in Thrombozyten verstärkt, nachdem diese durch das gebildete Thrombin aktiviert wurden und die F XII-Aktivierung erfolgt durch das Thrombozyten-assoziierte PE (**Abb. 21**).

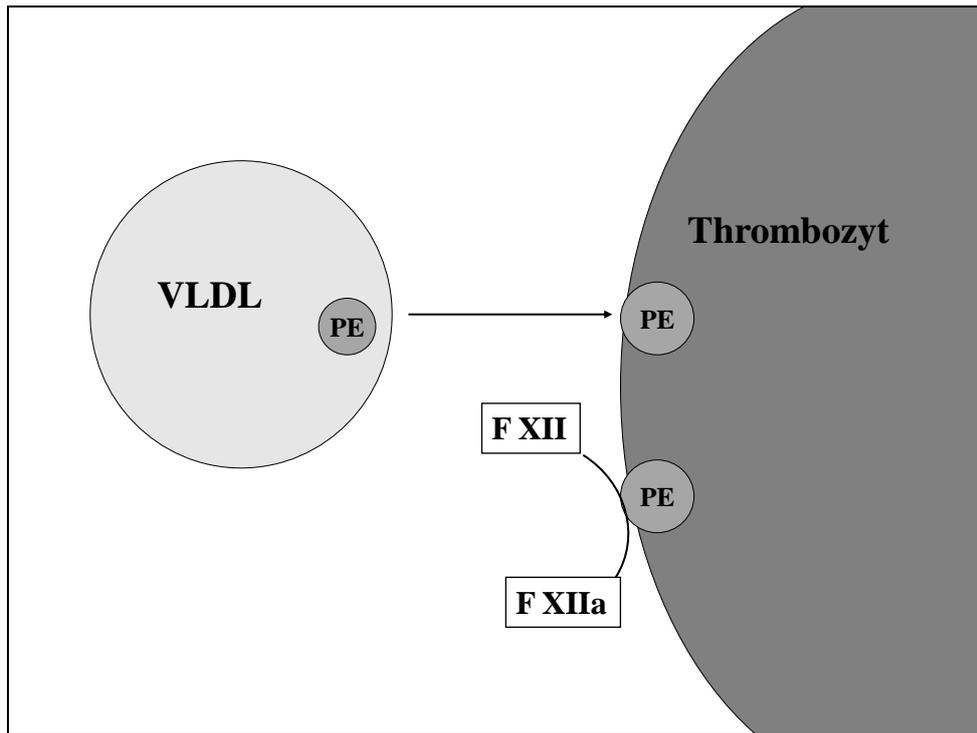


Abb. 21: Aktivierung des Kontaktsystems durch Thrombozyten-assoziiertes PE

Nach Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin wird aus VLDL PE in die Thrombozyten übertragen. Durch dieses membranständige PE könnte dann F XII aktiviert werden.

5.5 Blutgerinnung - Bedeutung für die Klinik

Erhöhte F XIIa-Konzentrationen wurden sowohl bei Patienten mit angiografisch gesicherten Gefäßplaques und Patienten nach Myokardinfarkt als auch bei gesunden Kontrollprobanden gefunden (Kohler et al., 1998). Dabei korrelierte auch bei gesunden Probanden die F XIIa-Konzentration mit der Höhe der Triglyceride im Plasma. Zudem zeigte sich eine starke Korrelation zwischen der F XII-Konzentration und der Größe der Koronarstenosen (Kohler et al., 1998).

Schousboe et. al. beschreiben, dass F XII-knock-out Mäuse einen Defekt in der Stabilisierung von plättchenreichen Verschluss thromben nach Verletzung der Gefäßwand zeigen (Schousboe et al., 2008). Die Wiedergabe von F XII konnte den Effekt rückgängig machen, was zeigt, dass F XII ein entscheidender Faktor für eine effektive Thrombosebildung ist. Wenn man diese Forschungsergebnisse mit unseren Ergebnissen in Zusammenhang bringt, zeigt sich deren Bedeutung in vivo. Die Identifikation des stimulierenden Bestandteils der

Lipoproteine und des Stimulationsweges können Möglichkeiten zur Einschätzung von individuellen Gesundheitsrisiken und auch Möglichkeiten zur Therapieentwicklung eröffnen. In einer österreichischen Studie mit 8.500 Teilnehmern stellte sich heraus, dass erhöhte Level von aktiviertem F XII mit einem erhöhten Risiko für KHK assoziiert sind und einen prognostischen Risikofaktor für wiederkehrende Attacken einer KHK darstellen (Endler et al., 2007).

Diese Erkenntnisse beruhen auf Studien von Renne und Gailani, die nachweisen, dass ein F XII- Mangel ebenso wie ein F XI-Mangel bei Mäusen zu einem Defekt in der arteriellen Verschluss thrombenbildung führt. Auch ist die Fibrinablagerung in den zerebralen Kapillaren bei F XII- und F XI-defizienten Mäusen reduziert (Gailani et al., 2007; Kleinschnitz et al., 2006). Das bedeutet, dass F XIIa zwar für die pathologische Thrombenbildung, nicht aber für die normale Blutgerinnung von Bedeutung ist.

Grundt et al. konnten in einer Studie zeigen, dass Patienten mit rezidivierenden Koronarereignissen einen erhöhten F XIIa-Level aufweisen. Sie konnten nachweisen, dass das relative Risiko für ein rezidivierendes akutes Koronarsyndrom für Patienten um 89 % höher liegt, deren F XIIa-Level in der höchsten Quartile liegt im Vergleich zu den in den übrigen $\frac{3}{4}$ und mehr als doppelt so hoch wie bei den Patienten in der niedrigsten Quartile. Zudem waren die Zeitabstände zwischen dem Auftreten der Ereignisse kürzer. F XIIa kann also als ein Prediktor für das Auftreten künftiger Koronarereignisse gewertet werden. Dabei zeigt sich ein nicht-lineares Verhältnis zwischen erhöhten Faktor XII-Levels und der Wahrscheinlichkeit für ein kardiovaskuläres Ereignis (Grundt et al., 2004).

Bislang ist also wenig über den genauen Mechanismus des Zusammenhangs zwischen Faktor XII-Erhöhung und -Aktivität und der Entstehung arterieller Thrombosen bekannt. Es bleibt weiterhin zu erforschen auf welchem Weg eine Vermittlung zwischen Faktor XII-Aktivität und Thromboseentstehung stattfindet. Wir konnten in den vorliegenden Versuchen zeigen, dass VLDL-assoziiertes PE als Aktivator des Kontaktaktivierungssystems maßgeblich daran beteiligt sein könnte.

6 Zusammenfassung

Hyperlipidämien und das Metabolische Syndrom stehen in Zusammenhang mit einem erhöhten Myokardinfarktrisiko und Thromboserisiko. Bei Patienten mit kardiovaskulären Ereignissen wurden in verschiedenen Studien erhöhte Faktor XII-Konzentrationen beobachtet. Zudem konnte ein erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt bei Patienten mit erhöhten Faktor XII-Konzentrationen bestätigt werden. Andererseits zeigen tierexperimentelle Untersuchungen, dass F XII-defiziente Mäuse gegen das Auftreten von Thrombosen geschützt sind.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es unter hyperlipämischen Bedingungen zu einer erhöhten Thrombinbildung kommt, die durch den Faktor XII vermittelt wird und dass v. a. VLDL für die Aktivierung des Kontaktsystems verantwortlich ist.

In PRP und Vollblut wurde die Fibrinbildung in Anwesenheit von VLDL, LDL und HDL untersucht. VLDL erwies sich dabei als effektivster Stimulator. Es konnte gezeigt werden, dass VLDL über den Weg der Kontaktaktivierung zur Aktivierung der Thrombinbildung führt, da diese im F XII-defizienten Plasma und bei Blockierung des F XII durch CTI völlig ausblieb. VLDL-gesteuerte Stimulierung konnte auch in LDL-depletiertem Plasma durch VLDL erreicht werden. Nach Auftrennung der Lipoproteine in die Fraktion der Neutrallipide und Phospholipide und Zugabe der einzelnen Lipidfraktionen zu PRP zeigte sich, dass die Fraktion der Phospholipide die Thrombinentstehung am stärksten stimuliert. Durch Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie konnten die einzelnen Phospholipide isoliert werden. Sie wurden sowohl einzeln als auch in Gemischen unter Weglassen einer einzelnen Fraktion dem PRP zugegeben. Dabei zeigte sich PE als das am stärksten stimulierende Phospholipid. Die Zugabe aller anderer Phospholipide, auch als Gemisch, induzierte eine im Vergleich zum PE geringere Thrombinbildung. VLDL und VLDL-assoziiertes PE verursachten auch im Vollblut über den Weg der Kontaktaktivierung eine erhöhte Thrombinbildung.

Insgesamt gesehen zeigen diese Ergebnisse, dass VLDL-assoziiertes PE an der Stimulierung des Kontaktsystems bei Hyperlipidämien beteiligt ist.

7 Referenzen

Aoki I., Aoki N., Kawano K., Shimoyama K., Maki A., Homori A., Yanagisawa A., Yamamoto M., Kawai Y., Ishikawa K.. Platelet-dependent thrombin generation in patients with hyperlipidemia. *JACC* 1997, 30: 91-96

Aronson D. L., Chang P., Kessler C. M.. Platelet-dependent thrombin generation after in vitro fibrinolytic treatment. *Circulation* 1992, 85: 1706-1712

Asakai R., Davie E. W., Chung D. W.. Organization of the gene for human factor XI. *Biochemistry* 1987, 26: 7221-7228

Aviram M., Brooks J. G.. Characterisation of the effect of plasma lipoproteins on platelet function in vitro. *Haemostasis* 1983, 13: 344-350

Baumgärtner P., Geiger M., Zieseniss S., Malleier J., Huntington J., Hochrainer K., Bielek E., Stoeckelhuber M., Lauber K., Scherfeld D., Schwille P., Wäldele K., Beyer K., Engelmann B.. Phosphatidylethanolamine critically supports internalization of cell-penetrating protein C inhibitor. *J Cell Biol* 2007, 179 (4): 793-804

Bligh E. G., Dyer W. J.. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959, 37: 912-917

Bom V. J. J., Van Hinsbergh V. W. M., Reinalda-Poot H. H., Mohanlal R. W., Bertina R. M.. Extrinsic activation of human coagulation factors IX and X on the endothelial surface. *Thromb Haemost* 1991, 66: 283-291

Bradford M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72: 248-254

Brodin E., Iversen N., Hansen J.B.. Impact of native VLDL on tissue factor pathway inhibitor in endothelial cells and interactions between TFPI and lipoprotein lipase. *J Lab Clin Med* 2006, 147 (4): 167-173

Brown N. J., Nadeau J. H., Vaughan D. E.. Selective stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) in vivo by infusion of bradykinin. *Thromb Haemost* 1997, 77: 522-525

Camerer E., Kolsto A. B., Prydz H.. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Research* 1996, 81(1): 1-41

Cardigan R. A., Crook M., Mackie I. J., Machin S. J.. Plasma levels of factor XIIa and factor VIIa are increased but not related in primary hyperlipidaemia. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001, 12 (3): 187-192

Cochrane C. G., Revak S. D., Wuepper K. D.. Activation of Hageman factor in solid and fluid phases: A critical role of kallikrein. *J Exp Med* 1973, 138: 1564-1583

Colman R. W., Pixley R. A., Najamunnisa S., Yan W.-Y., Wang J., Mazar A., McCrae K. R.. Binding of high molecular weight kininogen to human endothelial cells is mediated via a site within domains 2 and 3 of the urokinase receptor. *J Clin Invest* 1997, 100: 1481-1487

Crutchley D. J., Ryan J. W., Ryan U. S., Fisher G. H.. Bradykinin-induced release of prostacyclin and thromboxanes from bovine pulmonary artery endothelial cells. Studies with lower homologs and calcium antagonists. *Biochim Biophys Acta* 1983, 751: 99-107

Cullen P. Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor. *Am J Cardiol* 2000, 86 (9): 943-949

Deguchi H., Fernandez J. A., Hackeng T. M., Banka C. L., Griffin J. H.. Cardiolipin is a normal component of human plasma lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97: 1743-1748

Eaton D., Rodriguez H., Vehar G. A.. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* 1986, 25: 505-512

Endler G., Marsik C., Jilma B., Schickbauer T., Quehenberger P., Mannhalter C.. Evidence of a U-shaped association between factor XII activity and overall survival. *J Thromb Haemost* 2007, 5: 1143-1148

Engelmann B., Kögl C., Kulschar R., Schaipp B.. Transfer of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and sphingomyelin from low- and high-density lipoprotein to human platelets. *Biochem J* 1996, 315: 781–789

Engelmann B., Schaipp B., Dobner P., Stoeckelhuber M., Kogl C., Siess W., Hermetter A.. Platelet agonists enhance the import of phosphatidylethanolamine into human platelets. *J Biol Chem* 1998, 273: 27800-27808

Esmon C. T. The subunit structure of thrombin-activated factor V. Isolation of activated factor V, separation of subunits, reconstitution of biological activity. *J Biol Chem* 1979, 254: 964-973

Falls L. A., Furie B., Furie B. C.. Role of phosphatidylethanolamine in assembly and function of the factor IXa - factor VIIIa complex on membrane surfaces. *Biochemistry* 2000, 39: 13216-13222

Furie B., Furie B. C.. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 1988, 53: 505-518

Gailani D., Renné T.. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* 2007, 27: 2507-2513

Greengard J. S., Heeb M. J., Ersdal E., Walsh P. N., Griffin J. H.. Binding of coagulation factor XI to washed human platelets. *Biochemistry* 1986, 25: 3884-3890

Griffin J. H., Fernandez J. A., Deguchi H.. Plasma Lipoproteins, Hemostasis and Thrombosis. *Tromb Hemost* 2001, 86: 386-394

Grundt H., Nilsen D.W.T., Hetland Ø., Valente E., Fagertun H.E.. Activated factor 12 (FXIIa) predicts recurrent coronary events after an acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2004, 147: 260-266

Gurewich V., Johnstone M., Loza J. P., Pannell R.. Pro-urokinase and prekallikrein are both associated with platelets. Implications for the intrinsic pathway of fibrinolysis and therapeutic thrombolysis. FEBS Lett 1993; 318: 317-321

Hansen J. B., Huseby K. R., Huseby N. E., Ezban M., Nordoy A.. Tissue factor pathway inhibitor in complex with low density lipoprotein isolated from human plasma does not possess anticoagulant function in tissue factor-induced coagulation in vitro. Thromb Res 1997, 85: 413-425

Hartert H., Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. Klinische Wochenschrift, 26. Jahrgang, Heft 37/38

Hauert J., Nicoloso G., Schleuning W. D., Bachmann F., Schapira M.. Plasminogen activators in dextran sulfate-activated euglobulin functions: A molecular analysis of factor XII and prekallikrein-dependent fibrinolysis. Blood 1989, 73: 994-999

Herwald H., Dedio J., Kellner R., Loos M., Mueller-Esterl W.. Isolation and characterization of the kininogen-binding protein p33 from endothelial cells: identity with the gC1q receptor. J Biol Chem 1996, 271: 13040-13047

Holland J. A., Pritchard K. A., Pappolla M. A., Wolin M. S., Rogers N. J., Stemerman M. B.. Bradykinin induces superoxide anion release from human endothelial cells. J Cell Physiol 1990, 143: 21-25

Hong S. L... Effect of bradykinin and thrombin on prostacyclin synthesis in endothelial cells from calf and pig aorta and human umbilical vein. Thromb Res 1980, 18: 787-795

Ibrahim S., Djimet-Bboun A., Pruneta-Deloch V., Calzada C., Lagarde M., Ponsin G.. Transfer of very low density lipoprotein-associated phospholipids to activated human plasma. J Lipid Res 2006, 47: 341-348

Ibrahim S., Calzada C., Pruneta-Deloche V., Lagarde M., Ponsin G.. The transfer of VLDL-associated phospholipids to activated platelets depends upon cytosolic phospholipase A₂ activity. *J Lipid Res* 2007, 48: 1533-1538

Ichinose A., Fujikawa K., Suyama T.. The activation of prourokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem* 1986, 261: 3486-3489

Ishii K., Oguchi S., Murata M., Mitsuyoshi Y., Takeshita E., Ito D., Tanahashi N., Fukuuchi Y., Oosumi K., Matsumoto K., Kitajima M., Yamamoto M., Watanabe G., Ikeda Y., Watanabe K.. Activated factor XII levels are dependent on factor XII 46 C/T genotypes and factor XII zymogen levels, and are associated with vascular risk factors in patients and healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000, 11 (3): 277-284

Joseph K., Ghebrehiwet B., Peerschke E. I. B., Reid K. B. M., Kaplan A. P.. Identification of the zinc-dependent endothelial cell binding protein for high molecular weight kininogen and factor XII: identity with the receptor that binds to the globular "heads" of C1q (gC1q-R). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996, 93: 8552-8557

Kaufmann J., Haasemann M., Modrow S., Müller-Esterl W.. Structural dissection of the multidomain kininogens. Fine mapping of the target epitops of antibodies interfering with their functional properties. *J Biol Chem* 1993, 268: 9079-9091

Kelleher C. C., Mitropoulos K. A., Imeson J., Maede T. E., Martin J. C., Reeves B. E., Hughus L. O.. Hageman factor and risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Atherosclerosis* 1992, 97 (1): 67-73

Kleinschnitz C., Stoll G., Bendszus M., Schuh K., Pauer H.-U., Burfeind P., Renné C., Gailani D., Nieswandt B., Renné T.. Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med* 2006, 203: 513-518

Kohler H. P., Carter A. M., Stickland M. H., Grant P. J.. Levels of activated F XII in survivors of myocardial infarction-association with circulating risk factors and extent of coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1998, 79: 14-18

Kohler H. P., Futers T. S., Grant P. J.. FXII (46C→T) polymorphism and in vivo generation of FXII activity-gene frequencies and relationship in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1999, 81 (5): 745-747

Kokawa T., Abumiya T., Kimura T., Harada-Shiba M., Koh H., Tsushima M., Yamamoto A., Kato H.. Tissue Factor pathway inhibitor activity in human plasma. Measurement of lipoprotein-associated and free forms in hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995, 15: 504-510

Lenich C., Pannell R., Gurewich V.. Assembly and activation of the Intrinsic fibrinolytic pathway on the surface of human endothelial cells in culture. *Thromb Haemost* 1995, 74 (2): 698-703

Majumder R., Weinreb G., Lentz B. R.. Efficient thrombin generation requires molecular phosphatidylserine, not a membrane surface. *Biochemistry* 2005, 44: 16998-17006

McNally T., Mackie I. J., Isenberg D. A., Machin S. J.. β_2 Glycoprotein-I inhibits factor XII activation on triglyceride rich lipoproteins: the effect of antibodies from plasma of patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1996, 76 (2): 220-225

Miller G., Martin J., Mitropoulos K., Reeves B., Thompson R., Meade T., Cooper J., Cruickshank J.. Plasma factor VII is activated by postprandial triglyceridemia, irrespective of dietary fat composition. *Atherosclerosis* 1991, 86 (2-3): 163-171

Miller G., Martin J., Mitropoulos M., Esnouf M., Cooper J., Morrissey J., Howarth D., Tuddenham E.. Activation of factor VII during alimentary lipemia occurs in healthy adults and patients with congenital factor XII or factor IX deficiency, but not in patients with factor IX deficiency. *Blood* 1996, 87: 4187-4196

Miller G. J., Esnouf M. P., Burgess A. I., Cooper J. A., Mitchell J. P.. Risk of coronary heart disease and activation of factor XII in middle-aged men. *Arterioscler Vasc Biol* 1997, 17: 2103-2106

Mitropoulos K. A., Reeves B. E., Miller G. J.. The activation of Factor VII in citrated plasma by charged long-chain saturated fatty acids at the interface of triglyceride-rich lipoproteins. *Blood Coag Fibrinolysis* 1993, 4: 943-951

Mitropoulos K. A., Martin J. C., Sterling Y., Morrissey J. H., Cooper J. A.. Activation of factors XII and VII induced in citrated plasma in the presence of contact surface. *Throm Res* 1995, 78 (1): 67-75

Motta G., Rojkaer R., Hasan A. A. K., Cines D.B., Schmaier A.H.. High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: A novel mechanism for contact activation. *Blood* 1998, 91 (2): 516-528

Moyer P. M., Tracy R. P., Tracy P.B., Veer C. V., Sparks C. E., Mann K. G.. Plasma lipoprotein support prothrombinase and other procoagulant enzymatic complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, 18: 458-465

Naito K., Fujikawa K.. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J Biol Chem* 1991, 266 (12): 7353-7358

Nakashima M., Mombouli J. V., Taylor A. A., Vanhoutte P. M.. Endothelium-dependent hyperpolarization caused by bradykinin in human coronary arteries. *J Clin Invest* 1993, 92: 2867-2871

Nemerson Y., Bach R.. Tissue factor revisited. *Prog Hemost Throm* 1982, 23: 657-668

Osterud B., Rapaport S. J.. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci* 1977, 74: 5260-5264

Palmer R. M. J., Ferrige A. G., Moncada S.. Nitric oxide release accounts for the biologic activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987, 327: 524-526

Pauer H. U., Renne T., Hemmerlein B., Legler T., Fritzlar S., Adham I., Müller-Esterl W., Emons G., Sancken U., Engel W., Burfeind P.. Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene—a model for contact phase activation in vivo. *Thromb Haemost* 2004, 92: 503-508

Plow E. F. Leucocyte elastase release during blood coagulation. A potential mechanism for activation of the alternative fibrinolytic pathway. *J Clin Invest* 1982, 69: 564-572

Radcliffe R., Bagdasarian A., Colman R., Nemerson Y.. Activation of bovine factor VII by hageman factor fragments. *Blood* 1977, 50 (4): 611-617

Rapaport S. J., Rao L. V.. Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Arterioscler Thromb* 1992, 12: 1111-1121

Reddigari S., Kapln A. P.. Monoclonal antibody to human high molecular weight kininogen recognizes its prekallikrein binding site and inhibits coagulant activity. *Blood* 1989, 74: 695-702

Røjkjær R., Motta G., Hasan A. A. K., Schousboe I., Schmaier A. H.. Factor XII does not initiate prekallikrein activation on endothelial cells. *Thromb Haemost* 1998, 80: 74-81 (a)

Røjkjær R., Hasan A. A. K., Schmaier A. H.. A novel mechanism for factor XI activation on endothelial cells independent of autoactivation, α -thrombin, or factor XIIa. *Blood*, 1998, 92 (Suppl 1): 40_a (b)

Rota S., McWilliam N. A., Baglin T. P., Bryne C. D.. Atherogenic lipoproteins support assembly of the prothrombinase complex and thrombin generation: modulation by oxidation and vitamin E. *Blood* 1998, 91: 508-515

Schmaier A. H., Schutsky D., Faber A., Silver L. D., Bradford H. N., Colman R. W.. Determination of the bifunctional properties of high molecular weight kininogen by studies with monoclonal antibodies directed to each of its chains. *J Biol Chem* 1987, 262: 1405-1411

Schmaier A. H., Røjkjaer R., Shariat-Madar Z.. Activation of the plasma kallikrein/kinin system of cells: A revised hypothesis. *Thromb Hemost* 1999, 82 (2): 226-233

Schousboe I. Pharmacological regulation of factor XII activation may be a new target to control pathological coagulation. *Biochemical Pharmacology* 2008, 75: 1007-1013

Seligsohn U., Osterud B., Brown S. F., Griffin J. H., Rapaport S. I.. Activation of human factor VII in plasma and in purified systems: Roles of activated factor IX, kallikrein, and activated factor XII. *J Clin Invest* 1979, 64 (4): 1056–1065

Skipski V. P. Lipid composition of lipoproteins in normal and disease states. In: *blood lipids and lipoproteins: quantitation, composition and metabolism*. Ed. G. J. Nelson. Wiley Interscience 1972: 471-583

Smeets E. F., Comfurius P., Bevers E. M., Zwaal R. F.. Contribution of different phospholipid classes to the prothrombin converting capacity of sonicated lipid vesicles. *Thromb Res* 1996, 81: 419-426

Smirnov M. D., Esmon C. T.. Phosphatidylethanolamine incorporation into vesicles selectively enhances factor Va inactivation by activated protein C. *J Biol Chem* 1994, 269: 816-819

Smirnov M. D., Ford D. A., Esmon C. T., Esmon N. L.. The effect of membrane composition on the hemostatic balance. *Biochemistry* 1999, 38: 3591-3598

Smith D., Gilbert M., Owen W. G.. Tissue plasminogen activator release in vivo in response to vasoactive agents. *Blood* 1983, 66: 835-839

Sobel B. E., Schneider D. J.. Platelet function, coagulopathy, and impaired fibrinolysis in diabetes. *Cardiol Clin* 2004, 22: 511-526

Stone M. D., Nelsetuen G. L.. Efficacy of soluble phospholipids in the prothrombinase reaction. *Biochemistry* 2005, 44: 4037-4041

Sumner W. T., Monroe D. M., Hoffmann M.. Variability in platelet procoagulant activity in healthy volunteers. *Thromb Res* 1996, 81: 533-543

Tsuda T., Yoshimura H., Hamasaki N.. Effect of phasphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and lysophosphatidylcholine on the activated factor X-prothromin system. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2006, 17: 465-469

Wuepper K. D., Cochrane C. G.. Plasma prekallikrein. Isolation, characterization, and mechanism of action. *J Exp Med* 1972, 135: 1-20

Zito F., Drummond F., Bujac S. R., Esnouf M. P., Morrissey J. H., Humphries S. E., Miller G. J.. Epidemiological and genetic associations of activated factor XII concentration with factor VII activity, fibrinopeptide A concentration, and risk of coronary heart disease in men. *Circulation* 2000, 102: 2058-2062

8 Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Bernd Engelmann für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die intensive Betreuung, Unterstützung und Förderung während der Bearbeitung meiner Dissertation. Auch bedanken möchte ich mich für die Unterstützung bei der Veröffentlichung der Daten in einem anerkannten Journal.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Pohl, dem Leiter des Physiologischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Bereitstellung der Gerätschaften und Räumlichkeiten.

Herrn Dr. Spannagl möchte ich für die Organisation und Verfügbarkeit von Blut Faktor XII-defizienter Patienten und die beratenden Gespräche danken.

Ich danke Frau Susanne Zieseniss für ihre geduldige und stets hilfreiche Unterstützung während der praktischen Arbeit. Ebenso danke ich meinen Mitdotorandinnen und –en Dr. Ingrid Müller, Dr. Stefanie Urban und Dr. Andreas Zillmann für ihre Geduld und Unterstützung.

Zuletzt danke ich meinen Eltern Gabriele und Emil Klein und meiner Schwester Sabine Klein sowie Dr. Michaela Löbig und Inga Katofsky, die mich auf meinem Lebens- und beruflichen Weg liebevoll unterstützt und gefördert haben.