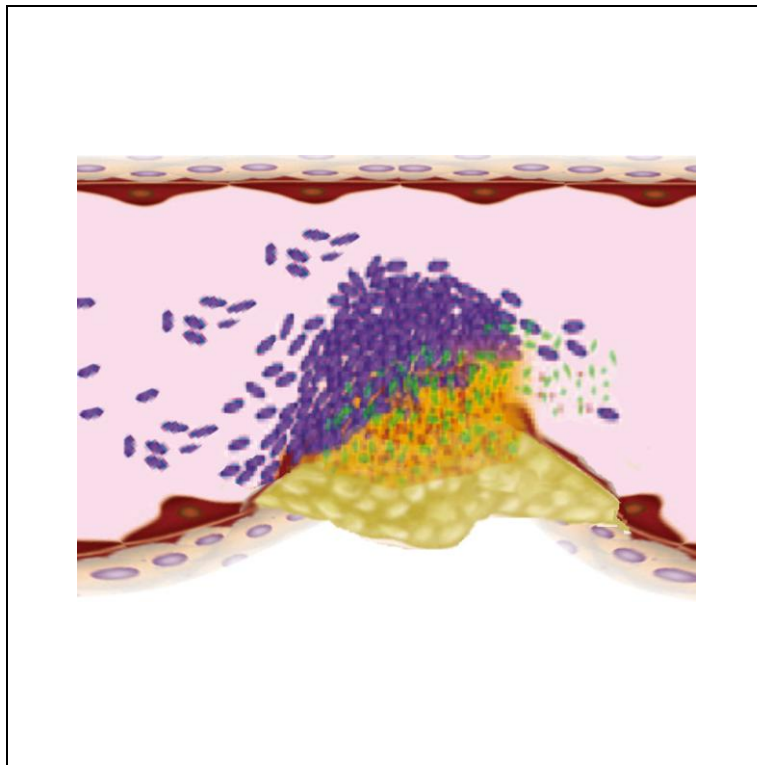


DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
DOKTORGRADES DER FAKULTÄT FÜR  
MEDIZIN DER LUDWIG-MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
INSTITUT FÜR KLINISCHE CHEMIE  
PROFESSOR DR. MED. DANIEL TEUPSER

**DIE ROLLE EINZELNER  
BLUTKOMPONENTEN FÜR DIE  
GERINNUNGSAKTIVIERUNG DURCH  
ATHEROSKLEROTISCHE PLAQUES**



Nina Oehler  
aus  
Tübingen  
2012

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom Oktober 2003 von Prof. Dr. med. Bernd Engelmann betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 20. Januar 2012

.....

(Nina Oehler)

Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernd Engelmann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Michael Spannagl Prof. Dr. Christian Opherk
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	12.07.2012

[Abbildung Titelseite] Atheroskleroseplaqueruptur

Nina Oehler 2011

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 EINLEITUNG .....	8
1.1 Die Atherosklerose .....	8
1.1.1 Molekulare Grundlagen der Plaque-induzierten Thrombose .....	10
1.1.2 Histologische Grundlagen der Plaque-induzierten Thrombose.....	11
1.2 Eigenschaften von Mikropartikel.....	12
1.3 Die Rolle von TF unter physiologischen und pathologischen Bedingungen .....	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	18
2 MATERIALIEN UND METHODEN .....	19
2.1 Chemikalien und Lösungsmittel.....	19
2.2 Antikoagulantien .....	20
2.3 Puffer .....	20
2.4 Blutabnahme .....	23
2.5 Zellisolierung .....	23
2.5.1 Thrombozytenisolierung .....	23
2.5.2 Isolierung der neutrophilen Granulozyten .....	23
2.5.3 Monozytenisolierung.....	25
2.6 Zellzahlbestimmung.....	26
2.7 Herstellung von PPP und MP-freiem PPP .....	26

2.8 Isolierung zirkulierender MP .....	27
2.9 Herstellung von MP in vitro .....	27
2.10 Gewinnung des Plaques .....	27
2.11 Herstellung von Vesikeln aus Plaquelipiden .....	28
2.12 Bedeutung von Gerinnungsparametern im Vollblut mittels Thrombelastographie.....	28
2.13 Bedeutung der Durchflusszytometrie.....	30
2.14 Faktor Xa-Bildung .....	31
2.15 Statistische Auswertung .....	33
3 ERGEBNISSE .....	34
3.1 Bedeutung von zirkulierenden MP für die Gerinnungsaktivierung durch atherosklerotische Plaques.....	34
3.1.1 Bedeutung von zirkulierenden MP in PPP .....	34
3.1.2 MP im Vollblut.....	35
3.1.3 PPP-negative Plaques in PRP.....	37
3.2 Ersatz von zirkulierenden MP durch zellspezifische MP.....	38
3.3 Bedeutung des intravaskulären (blood borne) TF.....	41
3.3.1 Beschichtung von MP mit TF-Antikörpern .....	41
3.3.2 Thrombozytäre TF-Präsentation nach Exposition mit Plaquelipiden .....	42
3.4 Protein Disulfid Isomerase (PDI) .....	43
3.5 Redoxreaktionen .....	45

4 DISKUSSION .....	47
4.1 Bedeutung der zirkulierenden MP bei Plaqueruptur .....	47
4.2 Bedeutung des intravaskulären TF .....	49
4.3 Bedeutung des im Lipidkern enthaltenen TF .....	50
4.4 Ausblick .....	54
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	55
6 Abbildungsverzeichnis .....	56
7 Literaturverzeichnis .....	57

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
BSA	Bovines Serum-Albumin
BHT	Butylated hydroxytoluene
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CT	Clotting time
CTI	Corn Trypsin Inhibitor
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
GRX	Glutathion
H	Stunde
HDL	High Density Lipoproteine
IL	Interleukin
Kbp	Kilo Basenpaare
KD	Kilo Dalton
LDL	Low Density Lipoproteine
LPS	Lipopolysaccherid
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min	Minuten
MP	Mikropartikel
MW	Mittelwert
OxLDL	Oxidiertes LDL
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PPP	Platelet poor plasma/Thrombozyten armes Plasma
PRP	Platelet rich plasma/Thrombozyten reiches Plasma
PS	Phosphatidylserin
Rpm	Rounds per minute/Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Sec	Sekunden
SD	Standardabweichung
TEG	Thrombelastograph
TF	Tissue Factor
TNC	Tri-Natiumcitrat
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TRX	Thioredoxin
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1

$\mu\text{M}$

Micromolar

# 1 EINLEITUNG

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen heutzutage die Haupttodesursache in der westlichen Welt dar. Herzinfarkte und cerebrovaskuläre Ereignisse sind meist auf eine bestehende Gefäßwandveränderung, die atherosklerotischen Plaques, zurückzuführen die in einem plötzlichen Geschehen aufbrechen können (Plaqueruptur).<sup>60</sup> Innerhalb der Plaques befinden sich Mikropartikel (MP), die eine zentrale Rolle in der Blutgerinnung einnehmen könnten. In der Tat präsentieren MP auf ihrer Oberfläche Tissue Factor (TF), das zentrale Starterprotein der Blutgerinnung. Allgemein wird davon ausgegangen, dass Plaque-assoziiertes TF von entscheidender Bedeutung ist für die Thrombosen, die kardiovaskuläre Erkrankungen letztendlich induzieren.

## 1.1 Die Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Systemerkrankung. Es ist die häufigste krankhafte Veränderung der großen und mittelgroßen Arterien weltweit und geht mit Verhärtung, Verdickung und Elastizitätsverlust der Gefäßwände einher.<sup>53; 56</sup> Nach jahrzehntelanger asymptomatischer Progression zeigen sich meist schwerwiegende klinische Folgen. Die häufigsten atherosklerotischen Herz- und Gefäßerkrankungen sind die koronare Herzerkrankung, cerebrovaskuläre Erkrankungen und die periphere arterielle Verschlusskrankheit. Deren gefürchtete Komplikationen wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder der Verlust der unteren Extremitäten kommen in Deutschland im Vergleich zu nicht-industrialisierten Ländern außerordentlich häufig vor. Der Hauptanteil davon entfällt mit etwa 7,5 % aller Todesfälle auf den akuten Herzinfarkt. Männer und Frauen sind dabei im Verhältnis von 3:1 betroffen.<sup>63</sup>

Die pathophysiologischen Mechanismen, die zur Atherosklerose führen, sind komplex und werden durch zahlreiche genetische Faktoren (polygenetisch) sowie Umweltfaktoren beeinflusst.<sup>15; 24; 38</sup> Somit ist die Progression der Atherosklerose ein typisches Beispiel für ein multifaktorielles Geschehen.<sup>15; 25; 38</sup> Während einige Stoffwechselkrankheiten bereits im Kindesalter zur Atherosklerose führen, verläuft ihre Entwicklung in der Regel jedoch über mehrere Jahrzehnte. Trotz der Komplexität



atherogenetischer Mechanismen ließen sich anhand epidemiologischer Untersuchungen einzelne Parameter identifizieren, deren verstärkte oder verminderte Ausprägung das Atheroskleroserisiko erhöhen.<sup>25; 28; 38</sup> Zu diesen Faktoren zählen Hypercholesterinämie, Hypertonie, Rauchen, Diabetes mellitus, Adipositas und körperliche Inaktivität. Auch das Alter spielt eine Rolle. Weitere Risikofaktoren sind Stress und psychosoziale Faktoren sowie eine erhöhte Blutkonzentration von Lipoproteinen und Fibrinogen. Die einzelnen Risikofaktoren sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt (Tabelle 1).<sup>8</sup>

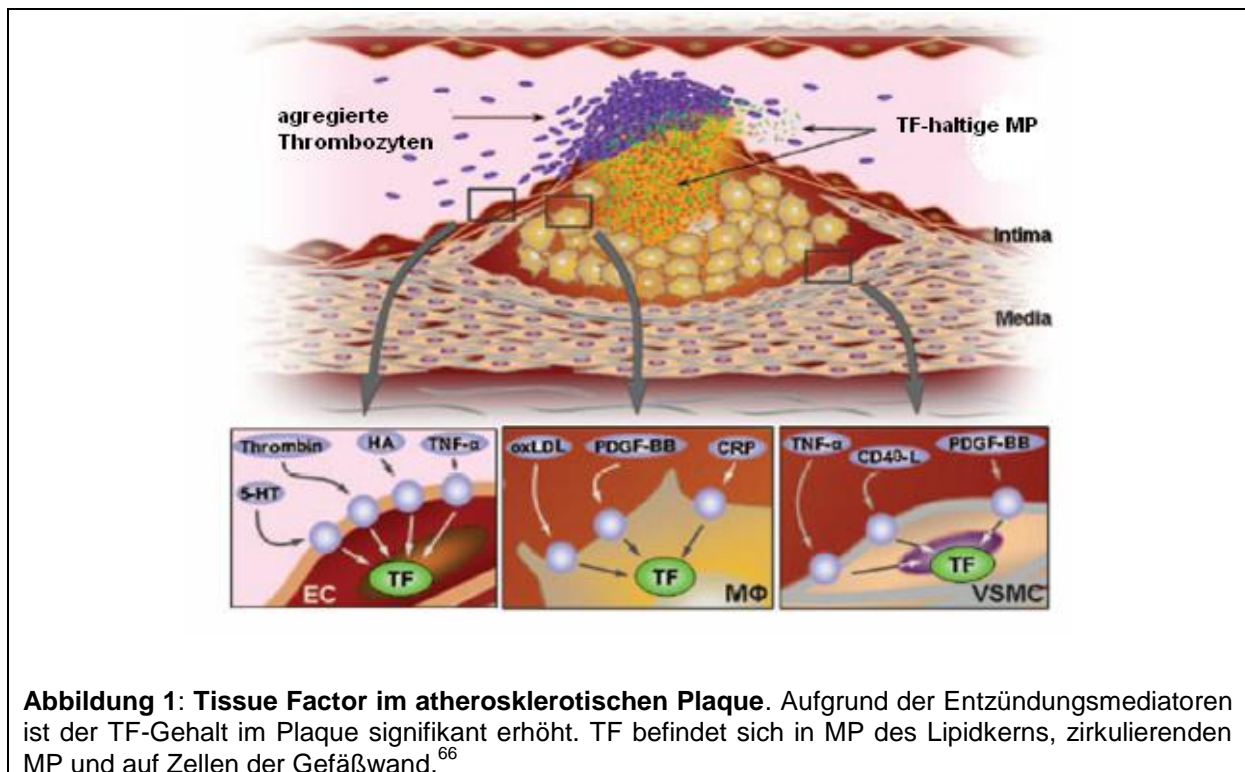
### Risikofaktoren für die Atherosklerose

- Hyperlipidämie (Hypercholesterinämie, Hypertriglyzeridämie)
- Niedriges HDL-Cholesterin (<0,9 mmol/l bzw. <35 mg/dl)
- Hypertonie
- Diabetes mellitus
- Zigarettenrauchen
- Eigenanamnese einer cerebrovaskulären Erkrankung oder einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit
- Familienanamnese einer vorzeitigen koronaren Herzkrankheit (<55 Jahre bei Eltern oder Geschwistern)
- Hyperinsulinismus
- (Abdominale) Adipositas
- Hohes Lipoprotein (a)
- Männliches Geschlecht

**Tabelle 1: Risikofaktoren für die Atherosklerose** Die frühzeitige Atherosklerose scheint oft familiär aufzutreten.<sup>12</sup> In der Mehrzahl der Fälle kann sie der Vererbung von Risikofaktoren wie der Hypertonie, dem Diabetes mellitus und der Hyperlipidämie zugeschrieben werden.<sup>6</sup>

### 1.1.1 Molekulare Grundlagen der Plaque-induzierten Thrombose

Die Adhärenz von im Blut zirkulierenden Monozyten an das vorgeschädigte Endothel sowie deren Migration in die Intima der Gefäßwand, wo sie zu Makrophagen heranreifen, ist von pathogenetischer Bedeutung für die Entstehung der Atherosklerose.<sup>58</sup> Simultan mit den Monozyten wandern Low Density Lipoproteine (LDL) in die Intima ein. Dort werden diese Lipide chemisch modifiziert, u.a. oxidiert. Die Aufnahme von Plaque-assoziierten Makrophagen und oxidativ veränderten LDL in der Gefäßwand führt zur intrazellulären Cholesterinablagerung sowie zur Bildung lipidbeladener Schaumzellen. Schliesslich kommt es zur Apoptose der MP. Im Lipidkern entsteht eine postapoptotische Nekrose, die wiederum zur Bildung von MP führt. Durch die Aufnahme der veränderten Lipoproteine wird die TF-Expression der Zellen und somit deren Thrombogenität hochreguliert.<sup>52</sup> Die vermehrte TF-Freisetzung bewirkt durch Plaqueruptur eine unmittelbare Aktivierung der Gerinnungskaskade.<sup>4</sup> Dieser komplexe Prozess begünstigt die Entwicklung der Atherosklerose und das Auftreten thrombotischer Ereignisse im atherosklerotischen Gefäß (Abb. 1).



Zusätzlich zu dem oben beschriebenen Beitrag von TF an der *lokalen* Gerinnungsaktivierung fördert TF möglicherweise auch einen Zustand der Hyperkoagulabilität als Folge einer *systemischen* Entzündungsreaktion. Dies geschieht aufgrund der vermehrten Oberflächenexpression von TF in Zusammenhang mit der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie IL-6 und IL-8. Hiermit werden möglicherweise zirkulierende Monozyten aktiviert, die daraufhin TF exprimieren.<sup>48</sup>

### 1.1.2 Histologische Grundlagen der Plaque-induzierten Thrombose

Die Plaqueruptur, die eine akute Thrombose induzieren kann, ist auf verschiedene, multikausal wirkende Faktoren zurückzuführen: einen großen Lipidkern, einen erhöhten TF-Gehalt, sowie eine stetig dünner werdende fibröse Kappe, die aufgrund der in ihr enthaltenen Matrix-degenerierenden Enzyme, wie beispielsweise Metalloproteinasen, ihre Festigkeit zunehmend verliert. Diese Arbeit beschäftigt sich im Folgenden unter anderem mit der Wirkung des Lipidkerns in Bezug auf die Blutgerinnung.

Der Lipidkern ist der am stärksten thrombogene Teil des atherosklerotischen Plaques. Kommt es nach Ruptur des Plaques zum Kontakt des Lipidkerns mit dem Blut, so bildet sich schnell ein Thrombus, der das betroffene Gefäß verschließen kann.<sup>19</sup> Dabei scheint der TF-Gehalt der einzelnen Plaques in dieser pathophysiologischen Reaktion einen großen Einfluss auf die Thrombogenität zu haben.<sup>61</sup> Bei Extraktionen des Lipidkerns des Plaques wurden TF-positive MP gefunden, die wahrscheinlich von apoptotischen Zellen abstammen (vgl. Kapitel 1.1.1). Man nimmt an, dass diese MP die TF-Aktivität und damit zu einem erheblichen Teil die Thrombogenität des Plaques bestimmen.<sup>37</sup>

Ein anderer Faktor, der ebenfalls relevant für die Thrombogenität eines Plaques ist, ist die Expression von TF auf der Zelloberfläche glatter Gefäßmuskelzellen. Dies wird gefördert durch Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und Thrombin, die die Expression des Proteins in den glatten Gefäßmuskelzellen induzieren.<sup>68</sup>

Das in dieser Arbeit verwendete Plaquematerial kann in drei Gruppen eingeteilt wer-

den: PPP-positive, PPP-negative und TF-unabhängige Plaques. Die PPP-positiven Plaques sind definiert durch ihre Fähigkeit, in Abwesenheit von Thrombozyten PPP zu koagulieren; d.h. zum Start der Gerinnungskaskade reichen allein MP und Blutgerinnungsfaktoren des Plasmas aus. Im Gegensatz dazu sind PPP-negative Plaques an die Anwesenheit von Thrombozyten gebunden, um ihre gerinnungsaktivierende Wirkung entfalten zu können. Die TF-unabhängige Gruppe ist in diesem Zusammenhang nicht von Bedeutung.

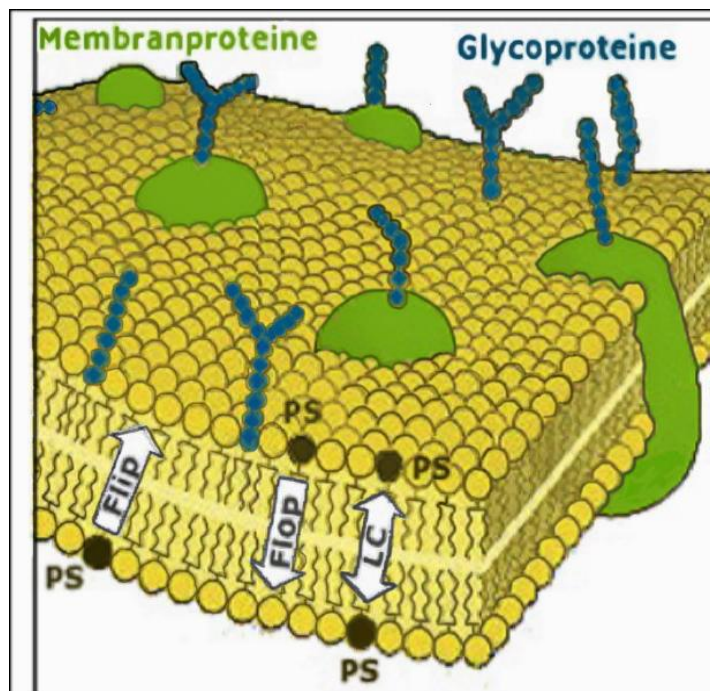
## 1.2 Eigenschaften der MP

Zum ersten Mal wurden MP 1967 von P. Wolf beschrieben; er nannte sie „Plättchenstaub“. Dieser „Staub“ enthält Vesikel, die kleiner als  $1\mu\text{m}$  im Durchmesser sind und in Abwesenheit von anderen Zellkomponenten die Blutgerinnung aktivieren können.<sup>76</sup> Bei den MP handelt es sich definitionsgemäß um Partikel von einer Größe von 100-800 nm. Sie bestehen aus Zytosol, umgeben von einer Lipidbilayermembran, die in ihrer Zusammensetzung der Plasmamembran ihrer Ursprungszelle ähnelt.

Inzwischen weiß man, dass MP von vielen verschiedenen Zellen gebildet werden können. *In vitro* werden MP sowohl aus Thrombozyten als auch aus Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Leuko-, Lympho- oder Erythrozyten freigesetzt. Nachweisbar sind sie *in vivo* unter physiologischen als auch unter pathologischen Konditionen, wobei sie sich in Zusammensetzung und Ursprung unterscheiden können.<sup>72</sup> Ihre Funktionen sind vielseitig: Neben der Blutgerinnung scheinen sie auch eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen und bei Regulation der Durchblutung zu spielen.

Verschiedene zelluläre Prozesse können die Entstehung von MP fördern: eine Zellaktivierung, die Apoptose und die Scherkräfte in der Blutstrombahn. So werden z.B. thrombozytäre MP durch Aktivierung der Thrombozyten gebildet, u.a. durch Thrombin, ADP, Kollagen oder bei erhöhten Scherkräften in der Blutzirkulation. Es wird davon ausgegangen, dass der Anstieg des zytoplasmatischen freien Kalziums nach Thrombozytenaktivierung u.a. die Cysteinprotease Calpain aktiviert. Hierdurch könnten u.a. Proteine gespalten werden, die den Kontakt zwischen der Plasmamembran und dem darunter liegenden Zytoskelett vermitteln.

In der Plasmamembran ruhender Zellen haben die beiden Membranblätter eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung. Auf der inneren Seite überwiegen Aminophospholipide wie Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE), während auf der externen Seite mehr Phosphatidylcholin und Sphingomyelin vorhanden sind. Diese Verteilung unterliegt der Kontrolle dreier Translokasen: einer einwärts gerichteten Pumpe, der Flippase – spezifisch für PS und PE, auch bekannt als Aminophospholipid Translokase; einer auswärts gerichteten Pumpe, Floppase genannt; und einer Scramblase, die bidirektional eine Redistribution der Phospholipide zwischen beiden Membranblättern unterstützt <sup>6</sup> (Abb.2).



**Abbildung 2:** Lipidbilayermembran. Durch die Flippase (Flip), Floppase (Flop) und die Lipidscramblase (LC) wird die Lipidzusammensetzung der Membran aufrechterhalten und insbesondere die Verteilung von PS reguliert.

Der Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei einer Zellstimulation verändert die Verteilung der Phospholipide über die Zellmembran. Vermutlich werden die Scramblase und Floppase stimuliert, während die Flippase gehemmt wird. Damit kommt es zu einer vermehrten Lokalisation von PS und PE auf der Aussenseite der Zellmembran. Als Folge ergeben sich ähnliche Verteilungsmuster der Phospholipide

in den an der Plasmamembran freigesetzten MP. Wichtig ist v.a. das gehäufte Vorkommen des negativ geladenen PS.<sup>6</sup> Dies spielt offensichtlich in der *in vivo*-Situation eine entscheidende Rolle, da Phosphatidylserin mit einer hohen Affinität an Gerinnungsfaktoren bindet, so dass der Gerinnungsprozess auf der Oberfläche der MP ablaufen kann.<sup>52</sup>

Die auf MP exponierten Oberflächenantigene sind spezifisch für ihre Ursprungszelle. Des Weiteren können sie Antigene tragen, die während der Zellaktivierung oder Apoptose hochreguliert werden. Zum Beispiel exponieren MP, die von Thrombozyten abstammen, auf ihrer Oberfläche P-Selectin und Glykoprotein 53, welche beide von intrazellulären Granulae abstammen.<sup>62</sup> Da MP die Oberflächenmoleküle der Ursprungszelle enthalten, können sie Funktionen dieser Oberflächenmoleküle vermitteln. So können Monozyten TF ins Plasma freisetzen. Dieser freigesetzte TF ist nun an MP gebunden und hat eine signifikante prokoagulatorische Aktivität.<sup>61</sup>

### **1.3 Die Rolle von TF unter physiologischen und pathologischen Bedingungen**

TF ist ein zentrales Starterprotein der Gerinnungskaskade. Humanes TF, auch bekannt als Gewebsthromboplastin oder CD143, ist ein kleines, 47 kDa schweres transmembranales Glykoprotein und gehört zur Superfamilie der Cytokinrezeptoren, zu welcher auch Interferon  $\alpha/\beta$  und Interferon  $\gamma$  gehören.<sup>45</sup> TF besteht aus 263 Aminosäuren, welche sich gemäß ihrer räumlichen Anordnung in drei Domänen gliedern lassen: eine lösliche extrazelluläre Domäne aus 219 Aminosäuren, welche die Rezeptorfunktion für Faktor VII/VIIa darstellt; eine unlösliche transmembranale Domäne aus 23 Aminosäuren; und eine zytoplasmatische Domäne aus 21 Aminosäuren. Letztere bewirkt durch Reorganisation des zytoplasmatischen Aktinnetzwerkes via spezifischer Interaktion mit aktinbindenden Proteinen die Zellmigration im Rahmen der Gefäßmodellierung und Tumormetastasierung.<sup>50</sup>

Das Protein besitzt zwei Disulfidbrücken, die u.a. die Tertiärstruktur stabilisieren. Diejenige Disulfidbrücke, die von Cystein 186 zu Cystein 209 führt, ist auf der Pro-

teinoberfläche exponiert und kann offensichtlich verschiedene Redoxzustände einnehmen.<sup>36</sup>

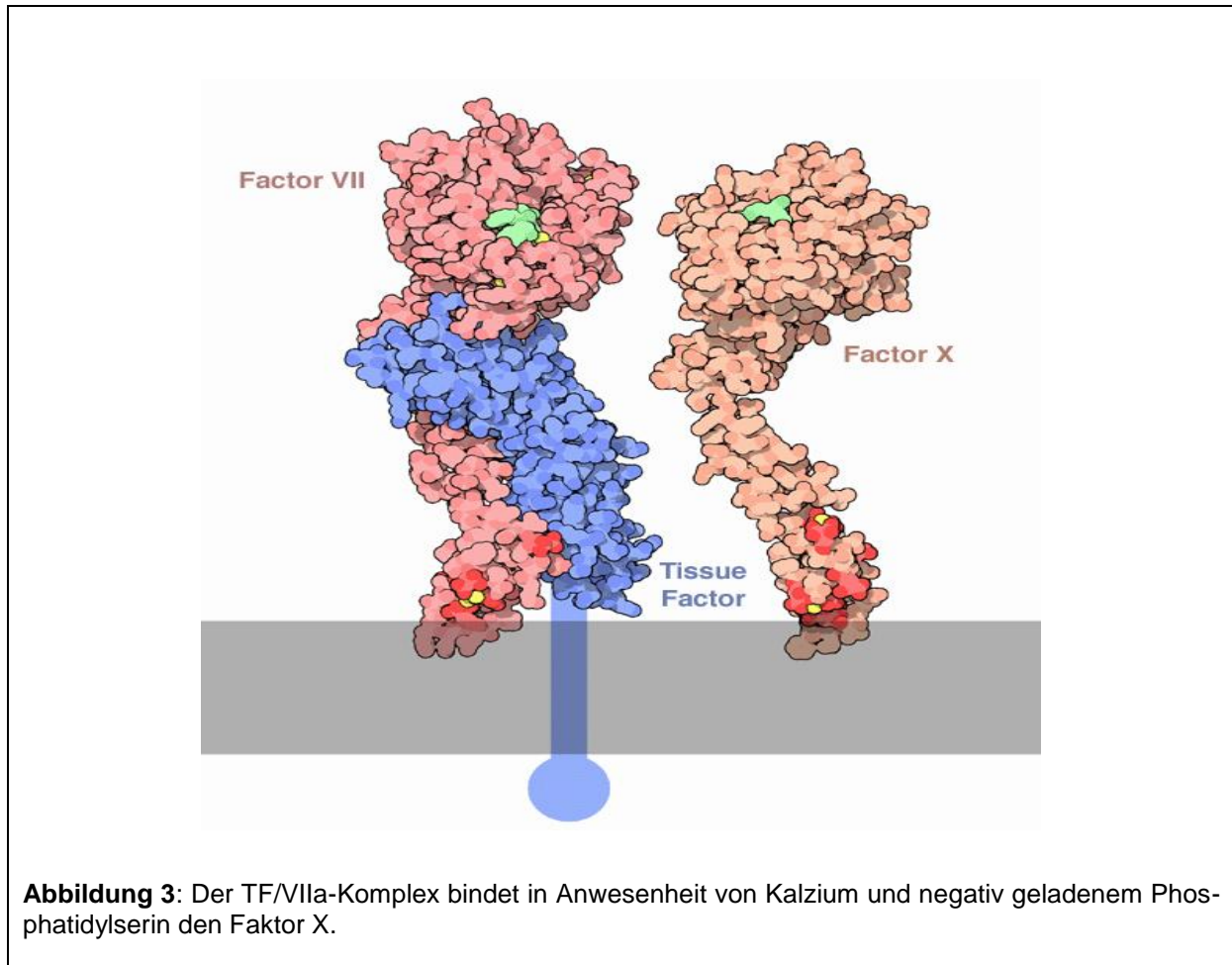
In der Gefäßwand ist TF in subendothelial liegenden Zellen, wie z.B. in den glatten Muskelzellen, konstitutiv exprimiert, so dass bei Verletzung der Gefäßwand die Gerinnungskaskade sofort in Gang gesetzt wird.<sup>72</sup> Im Gegensatz dazu präsentieren Endothelzellen und Monozyten unter physiologischen Bedingungen keinen TF, so dass nur eine geringe Fibrinbildung im intakten Gefäßen stattfindet. Unter Stimulation können jedoch auch Monozyten und Endothelzellen TF an ihrer Oberfläche präsentieren.<sup>59</sup> Dies bedarf einer Aktivierung des TF-Gens.

Das TF-Gen ist auf dem ersten Chromosom lokalisiert. Es setzt sich aus sechs Exons zusammen, wobei die Exons 2 bis 5 die Kofaktor- und Rezeptorfunktion der extrazellulären Domäne kodieren. Getrennt werden diese Exons durch fünf Introns. Das Gen besteht ohne Promoter und Regulator aus 12,4 kbp.<sup>33; 12; 59</sup> Zwei alternative Splicingprodukte sind bis dato bekannt.<sup>7</sup>

Bereits 1981 und 1985 wurde von Schwartz und Gregory Hinweise auf die Existenz von intravaskulärem TF gefunden. In diesen Studien konnte eine TF-Exprimierung nach Stimulation mit Entzündungsmediatoren wie Lipopolysacchariden (LPS), Immunkomplexen oder Zytokinen auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen, induziert werden. Ebenfalls erkannte man, dass stimulierte Monozyten das TF-Gen *de novo* transkribieren können.<sup>33</sup> Aus neueren Studien mittels Elektronenmikroskopie geht hervor, dass Stimulation *in vitro* von Vollblut mit Kollagen zu einer TF-Exprimierung auf der Oberfläche von Leukozyten-Thrombozyten-Komplexen führt.<sup>77</sup> Dieser Prozess setzt voraus, dass TF im Blut vorhanden sein muss (intravasaler oder blood borne TF).

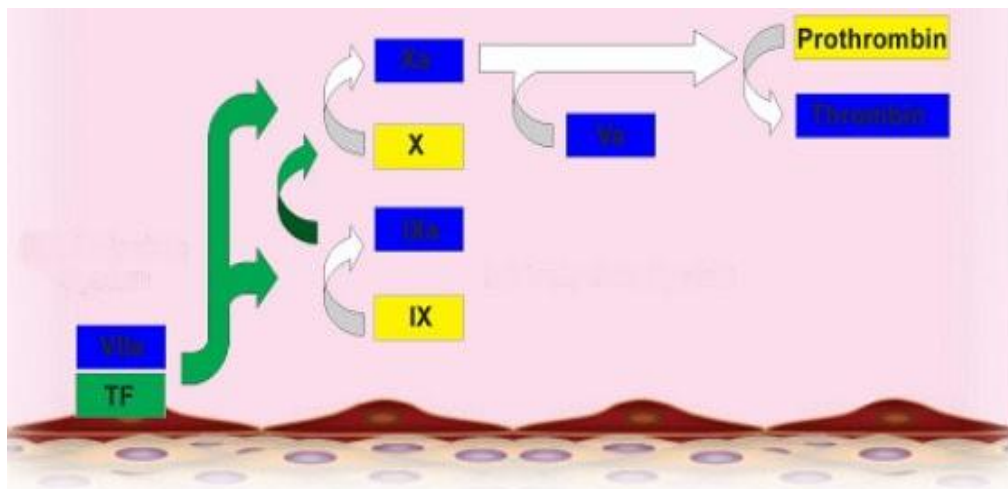
TF ist das zentrale Starterprotein des extrinsischen sowie auch des intrinsischen Weges der Blutgerinnung. Innerhalb des extrinsischen Weges bildet er einen Komplex mit Faktor VIIa. Factor VIIa ist ein Protein, welches sich aus verschiedenen Domänen zusammensetzt. Eine dieser Domänen – die carboxylierte Gla Domäne – bindet in Anwesenheit von Kalzium an negativ geladene Phospholipide. Diese Bindung wie-

derum unterstützt die Protein-Protein-Bindung am TF. Der TF/VIIa-Komplex stimuliert nun seinerseits die Produktion von Faktor Xa (Abb. 3).



Faktor Xa ist notwendig für die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin. Weiterhin stimuliert der TF/VIIa-Komplex die Bildung von Faktor IXa, der seinerseits ebenfalls Faktor X aktivieren kann.<sup>45; 55</sup> (Abb. 4)





**Abbildung 4:** Die Startphase der Blutgerinnung. Der TF/VIIa-Komplex aktiviert Faktor X sowie Faktor IX, die letztendlich Prothrombin in Thrombin umwandelt.

Da bei Patienten mit Defekten der Kontaktaktivierungsfaktoren (Faktor XII, Prekallikrein, HMW-Kininogen) keine Blutungsneigungen vorliegen, scheint die physiologische Rolle des Kontaktierungssystems als einer der Hauptauslöser der Fibrinbildung zumindest unsicher. Dies deutet darauf hin, dass der TF-induzierte Gerinnungsweg unter physiologischen Bedingungen den zentralen Startmechanismus darstellt.

Interessanterweise korreliert die TF-Expression nicht direkt proportional mit der TF-Aktivität.<sup>7;9</sup> Eine Hypothese besagt, dass der endogene Gegenspieler des TF – der Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) – von Thrombozyten und Endothelzellen sezerniert wird und damit die TF-Aktivität z.B. der thrombozyten unterdrückt.

Des Weiteren wurde postuliert, dass eine Konfigurationsänderung des Proteins, hervorgerufen durch die Bindung oder die Öffnung der Disulfidbrücke zwischen Cystein 186 und Cystein 209, die TF-Aktivität ändern könnte. Durch diesen Umstand wäre die Zelle in der Lage, schnell auf einen Stimulus zu reagieren, da der TF dann direkt durch eine Konfigurationsänderung aktiviert würde, anstatt eine langwierigere *de novo*-Synthese zu starten.<sup>74</sup> Eine andere Hypothese geht von einer Umverteilung des TF auf verschiedene Zellkompartimente aus. In verschiedenen Publikationen wurde bereits gezeigt, dass MP TF auf ihrer Oberfläche präsentieren können. Dieser MP-assoziierte TF ist jedoch – durch die Enkryption von TF begründet – nur begrenzt

aktiv.

Neben dem zellulär gebundenen TF konnte das TF-Protein auch im Plasma nachgewiesen werden.<sup>1</sup> Besonders hohe Mengen an TF wurden dabei im Plasma von Patienten mit Erkrankungen wie Myokardinfarkt<sup>67</sup> oder instabiler Angina pectoris<sup>39</sup> gefunden. Möglicherweise ist dies der Grund für die erhöhte Thrombogenität des Blutes, welche mit diesen Erkrankungen einhergeht. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß der Plasma-TF zumindest teilweise mit zirkulierenden MP assoziiert ist.<sup>43</sup>

#### **1.4 Zielsetzungen dieser Arbeit**

1. Welche Bedeutung haben zirkulierende MP des Blutes für die Aktivierung der Blutgerinnung durch atherosklerotische Plaques?
2. Welche Rolle spielt der intravasale TF, insbesondere der TF der Thrombozyten bei einer Plaqueruptur?
3. Welchen Einfluss hat die Thiol-Isomerase PDI für die Plaque-induzierte TF-abhängige Aktivierung der Blutgerinnung? Welche Rolle spielt dabei der Plaque-assoziierte TF?

Dies sind die zentralen Fragen, denen die vorliegende Arbeit in besonderer Weise nachgeht.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Im Folgenden werden die verwendeten Chemikalien, Lösungsmittel und Antikörper tabellarisch aufgeführt.

Beriplex PN 500	Behring (Marburg)
BSA Fraktion V	Serva (Heidelberg)
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Corn Trypsin Inhibitor	Calbiochem
EDTA (freie Säure)	Roth (Karlsruhe)
Ficoll Paque	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Glukose	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Lipopolysaccharid (LPS) E. Coli	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Lysing Solution	Becton Dickinson (Heidelberg)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Maus IgG2a Negativ Kontrolle PE (MCA929PE)	Biozol (Eching)
Maus-anti-Human CD14 PE (LC156)	Biotrend (Köln)
Maus-anti-Human CD15 PE (30575X)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Maus-anti-Human CD42b PE (31134X)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Maus-anti-Human TF FITC (4508)	American Diagnostica (Pfungstadt)
Maus-anti-Human TF FITC (9010-5079)	Biotrend (Köln)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)

---

Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
S 2222	Haemochrom Diagnostica (Essen)
Fortsetzung Tabelle Chemikalien und Lösungsmittel ...	
Thrombin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Thromboplastin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Thromborel S	Dade Behring (Marburg)
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
Trypanblau Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

## 2.2 Antikoagulantien

Nachstehend sind die verwendeten Antikoagulantien aufgelistet.

### Tri-natriumcitrat (TNC)

Natriumcitrat 3,68 g

In 100 ml destilliertem Wasser lösen; pH 7,4 mit Salzsäure einstellen.

Corn Trypsin Inhibitor (CTI)

## 2.3 Puffer

Im Folgenden werden die Molekülmengen zur Herstellung der Puffer angegeben.

### PBS:

NaCl 8,0 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 1,4 g

KCl 0,2 g

### Resuspensionspuffer

---

NaCl	4,03 g
KCl	0,10 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,50 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,03 g

Fortsetzung Tabelle Resuspensionspuffer ...

MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,10 g
D-Glucose	0,45 g
HEPES	0,60 g

In 500 ml destilliertem Wasser lösen; pH 7,4 mit Salzsäure einstellen.

#### **CaCl<sub>2</sub>/Hepes Puffer**

Hepes 10 mM	23,83 mg
CaCl <sub>2</sub> 100 mM	147 mg

In 10 ml destilliertem Wasser lösen.

#### **Monozyten-Waschpuffer**

BSA	1,50 g
Na <sub>2</sub> EDTA	1,40 g

In 1000 ml PBS lösen; pH 7,4

#### **Antikörper-Puffer**

EDTA (freie Säure)	0,15 g
BSA	0,50 g

In 100 ml PBS lösen, pH 7,4 einstellen. Vor Gebrauch entgasen.

#### **Thrombozyten-Waschpuffer**

NaCl	8,06 g
KCl	0,22 g
MgCl <sub>2</sub>	0,20 g

---

HEPES	3,57 g
EDTA	2,92 g
Glucose	0,90 g
Tri-Natriumcitrat	1,89 g
Apyrase	0,05 g

In 1000 ml destilliertem Wasser lösen; pH 6,3 einstellen.

## 2.4 Blutabnahme

Venöses Blut wurde gesunden Probanden im Alter von 20 bis 40 Jahren entnommen. Die Spender unterlagen keiner Dauermedikation und hatten ab 21 Tage vor Entnahme keinerlei Medikamente eingenommen, die die Blutgerinnung beeinflussen könnten. Das Blut wurde nach der Abnahme mit 3,18%iger Tri-Natriumcitratlösung versetzt und umgehend weiterverarbeitet. Die Blutabnahmen wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt.

## 2.5 Zellisolierung

### 2.5.1 Thrombozytenisolierung

Das abgenommene Blut wurde bei 1300 rpm für 15 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Man erhält dabei drei Phasen: In der untersten Phase sammeln sich die Erythrozyten; darüber ist eine kleine weiße Schicht aus Leukozyten, die *buffy coat* genannt wird; die oberste Phase enthält das plättchenreiche Plasma, im Folgenden als *platelet rich plasma* (PRP) bezeichnet.

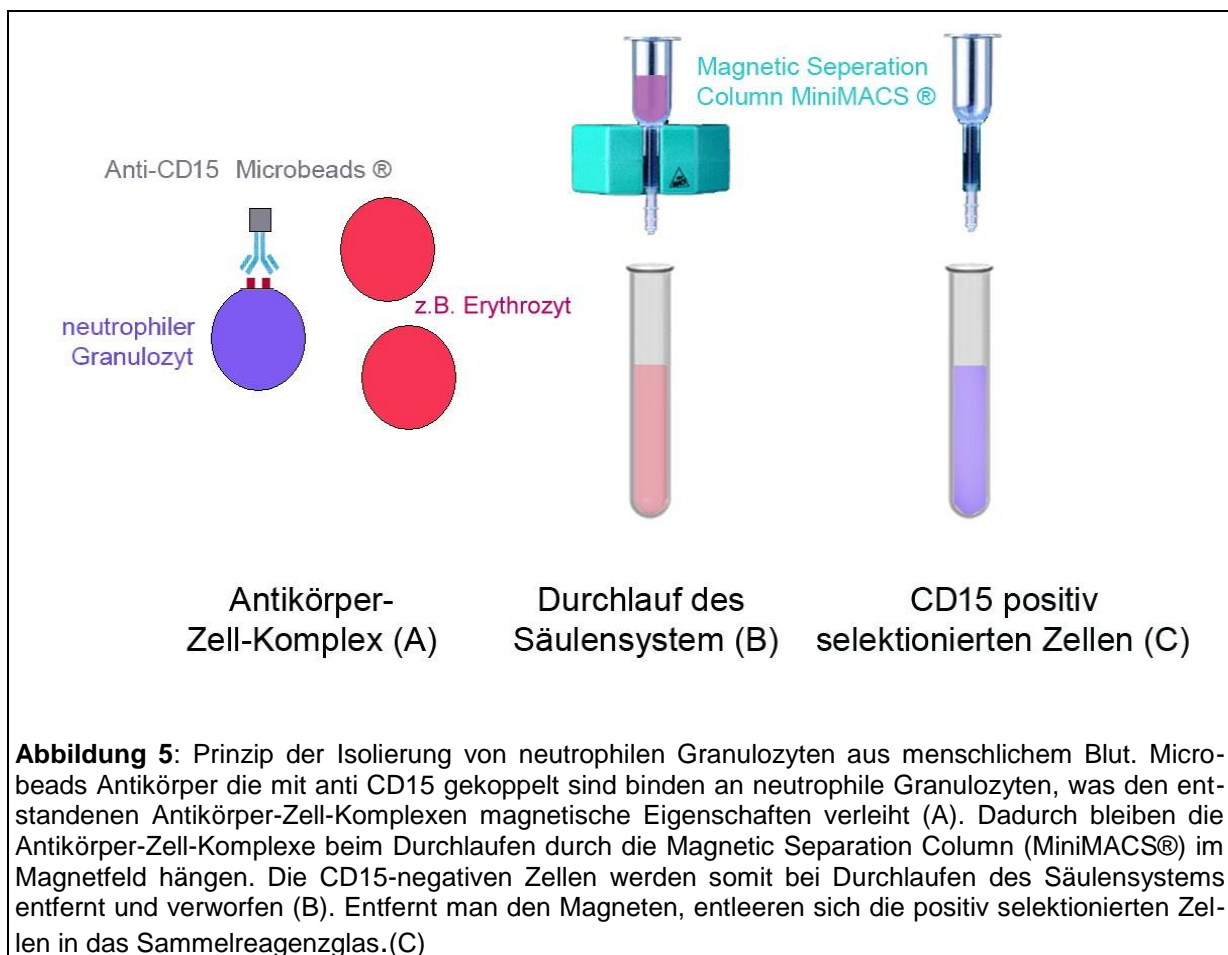
2ml PRP wurden mit 8µl Apyrase (entspricht einer Konzentration von 0,475 U/ml) und 2µl Iloprost (entspricht einer Konzentration von 10ng/ml) versetzt. Dieser Zusatz ist notwendig, um die Aktivierung der Thrombozyten während der Verarbeitung zu verhindern. Anschließend wurde das PRP bei 1300 rpm zentrifugiert (für 10 Minuten, ebenfalls ohne Bremse). Der Überstand wurde entfernt und die Plättchen in Thrombozytenwaschpuffer resuspendiert. Die Thrombozyten wurden sodann erneut zentrifugiert (1300 Rpm für 10 Minuten) und anschließend in 150 µl Resuspensionspuffer gelöst.

### 2.5.2 Isolierung der neutrophilen Granulozyten

Um neutrophile Granulozyten zu isolieren, wurde das abgenommene Blut zusätzlich zu TNC mit Hirudin versetzt. Nach der ersten Zentrifugation (1300 rpm für 15 Minuten) wurde der *buffy coat* großzügig abgenommen, der Rest verworfen. Es folgte

eine weitere Zentrifugation (auch bei 1300 rpm, diesmal nur für 10 Minuten). Der *buffy coat* wurde abgenommen und mit Anti-CD15 Antikörpern, die an Microbeads gekoppelt waren, für 15 Minuten bei 4°C inkubiert.

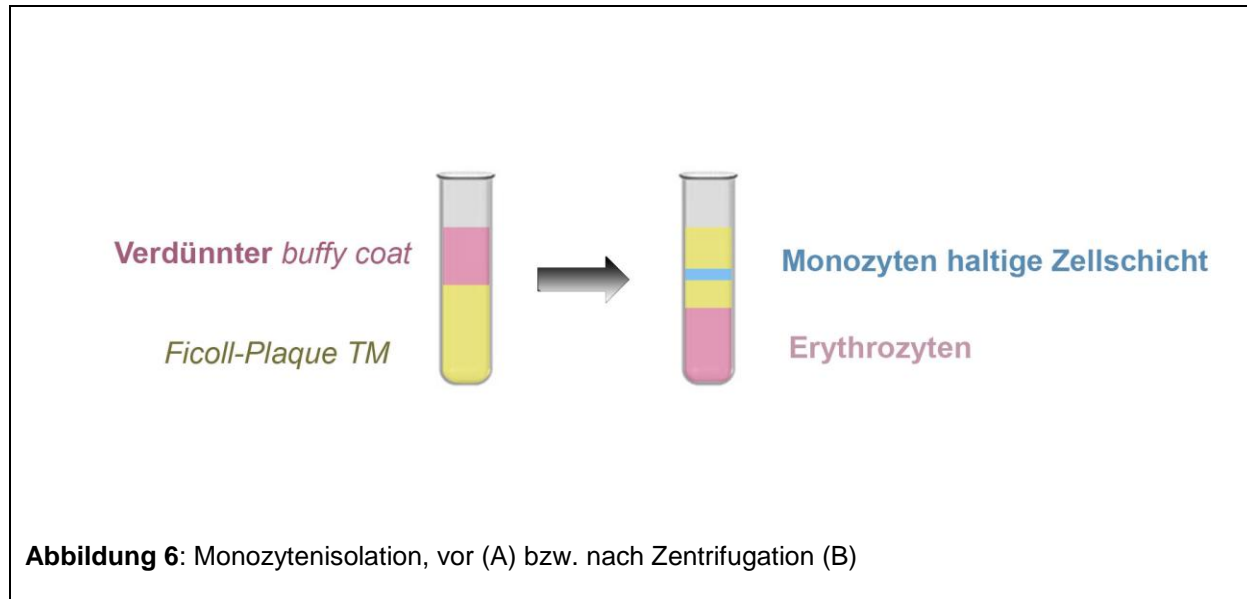
Die Zellsuspension wurde nach Verdünnung mit Antikörperpuffer durch die Magnetic Separation Columns MiniMACS® der Firma *Miltenyi Biotec* geleitet. Die im Magnetfeld positiv selektierten Zellen wurden durch Entfernung des Magneten mit Antikörperpuffer aus der Säule ausgespült. Die so isolierten Zellen wurden zentrifugiert (1000 rpm für 10 Minuten) und in Resuspensionspuffer aufgenommen (Abb. 5).





### 2.5.3 Monozytenisolierung

Das entnommene Blut wurde bei 1300 rpm für 15 Minuten bei 24°C zentrifugiert. Der *buffy coat* wurde gesammelt und im Verhältnis 1:4 mit PBS verdünnt. Um einen Dichtegradienten aufzubauen, wurde das zuvor vorbereitete Ficoll-Plaque TM Plus® dem verdünnten *buffy coat* hinzugegeben. Die nun zweigeschichteten Falcons® wurden für 25 Minuten bei 1600 rpm ohne Bremse zentrifugiert.



Wie auf Abbildung 6 zu erkennen ist, sammeln sich durch diesen Vorgang die Zellen des *buffy coats* in einer gut abgetrennten Schicht, die extrahiert werden kann. Diese Schicht wurde mit Monozytenwaschpuffer versetzt und bei 1400 rpm für 10 Minuten bei 24°C ohne Bremse zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in Antikörperpuffer resuspendiert und mit Microbeads, die mit anti-CD14-Antikörpern gekoppelt waren, bei 8°C für 15 Minuten inkubiert und anschließend analog der oben beschriebenen Methode (2.5.2) mittels Magnetic Separation Columns aufgereinigt.

## 2.6 Zellzahlbestimmung

Nach Färbung mit Trypanblau und geeigneter Verdünnung wurden die isolierten Zellen in der Zählkammer unter dem Mikroskop manuell quantifiziert.

## 2.7 Herstellung von PPP und MP-freiem PPP

Zur Herstellung von PPP mussten alle Zellen aus dem Plasma entfernt werden. Nach der ersten Zentrifugation bei 1300 rpm (15 Minuten bei 24°C, ohne Bremse) setzt sich das PRP im Überstand ab. Dieses PRP wurde sodann durch zweifache Zentrifugation bei 3000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert, um die Thrombozyten zu entfernen. In einem weiteren Schritt - Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge, 12600 rpm für 30 Minuten - wurde das MP-freie Plasma isoliert.

## 2.8 Isolierung zirkulierender MP

MP wurden aus PPP gewonnen. 250 µl PPP wurden in Eppendorfröhrchen überführt und bei 12600 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. MP sammeln sich hierbei als kaum sichtbares Pellet am Boden der Röhrchen. Nach Verwerfen des Überstandes (MP-freies PPP) wurden die MP mit PBS-Puffer gewaschen (ebenfalls bei 12600 rpm für 30 Minuten bei 24°C, ohne Bremse).

## 2.9 Herstellung von MP *in vitro*

MP wurden *in vitro* aus Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten präpariert.  $4 \times 10^8$  Thrombozyten wurden benötigt, um  $10^6$  MP zu generieren. Dazu wurde die benötigte Thrombozyten-Menge mit 0,1 U/ml Thrombin und 8µl/ml Kollagen bei 37°C für 30 Minuten stimuliert; anschließend erfolgte die Isolierung der MP (4500 rpm für 15 Minuten; Überstand abnehmen, Pellet verwerfen; 12600 rpm für 30 Minuten; Überstand verwerfen, in 225 µl PBS resuspendieren; 12600 rpm für 30 Minuten; 225 µl Überstand verwerfen, restliche 25 µl resuspendieren und vereinigen).

Um  $10^6$  MP aus neutrophilen Granulozyten herzustellen, wurden  $6 \times 10^6$  Zellen benötigt. Diese wurden mit 100 µM fMLP bei 37°C für 2 Stunden stimuliert; anschließend erfolgte die Isolierung der MP. Nach Stimulation von  $2 \times 10^6$  Monozyten mit 100 ng/ml LPS bei 37°C für 14 Stunden wurden  $1 \times 10^6$  monozytäre MP gewonnen.

## 2.10 Gewinnung des Plaques

Atherosklerotisches Plaquematerial wurde von Patienten extrahiert, die sich einer Operation zur Sanierung hochgradiger Carotisstenosen unterzogen. Wie vom Ethikkommission der Fakultät der Medizin der Universität München gefordert, wurde ihre Zustimmung eingeholt. Das Plaquematerial wurde durch intraoperative Endarterektomie entfernt, die Plaque-Struktur en Block bewahrt. Der atherosklerotische Plaque wurde sorgfältig von anderen Regionen des atherosklerotisch veränderten Gewebes, wie den Kollagen-reichen Bindegeweben, getrennt. Das Plaquematerial

wurde mittels histologischer Analyse charakterisiert. In einigen atherosklerotischen Plaquematerialien war es möglich, makroskopisch den lipidreichen Kern zu isolieren. Der Plaque wurden gewogen, homogenisiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Der atherosklerotische Plaque wog  $50\text{ mg/mL}$ , entsprechend Protein-Konzentrationen von  $0.5\text{--}2.5\text{ mg/mL}$ .

### **2.11 Herstellung von Vesikeln aus Plaquelipiden**

Frisch isolierte  $10\mu\text{l}$  Atheroskleroseplaque wurde mit  $90\mu\text{l}$  Resuspensionspuffer gemischt und gekühlt. Mittels eines Ultraschallstabs wurde die Lösung je  $4 \times$  für  $10$  Sekunden behandelt, um die Membranstruktur zu zerstören.  $100\mu\text{l}$  Chloroform (mit  $50\text{ mg/l}$  BHT = butylated hydroxytoluene) und  $200\mu\text{l}$  Methanol wurden hinzugegeben und, nach Begasung mit reinem Stickstoff, verschlossen und für  $30$  Sekunden gevortext. Nach  $15$  Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde  $100\mu\text{l}$  doppelt destilliertes Wasser und  $300\mu\text{l}$  Chloroform hinzugegeben; die Probe wurde begast und gevortext und daraufhin bei  $4000\text{ rpm}$  für  $10$  Minuten bei  $10^{\circ}\text{C}$  ohne Bremse zentrifugiert. Dabei ergeben sich zwei Phasen: In der unteren Phase befinden sich die Lipide, in der oberen Phase die wasserlöslichen Moleküle. Die untere Phase wurde aufbewahrt; zur oberen Phase wurde wieder  $400\mu\text{l}$  Chloroform hinzugegeben und erneut zentrifugiert, und die untere Phase wieder aufbewahrt. Die gesammelten Chloroformphasen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit Stickstoff eingedampft und anschließend in  $50\mu\text{l}$  Chloroform-Methanol-Mischung im Verhältnis  $2:1$  resuspendiert und mit Metallkügelchen gevortext, bis sich die Lösung trüb färbte – das Zeichen dafür, dass sich Lipidvesikel gebildet haben.

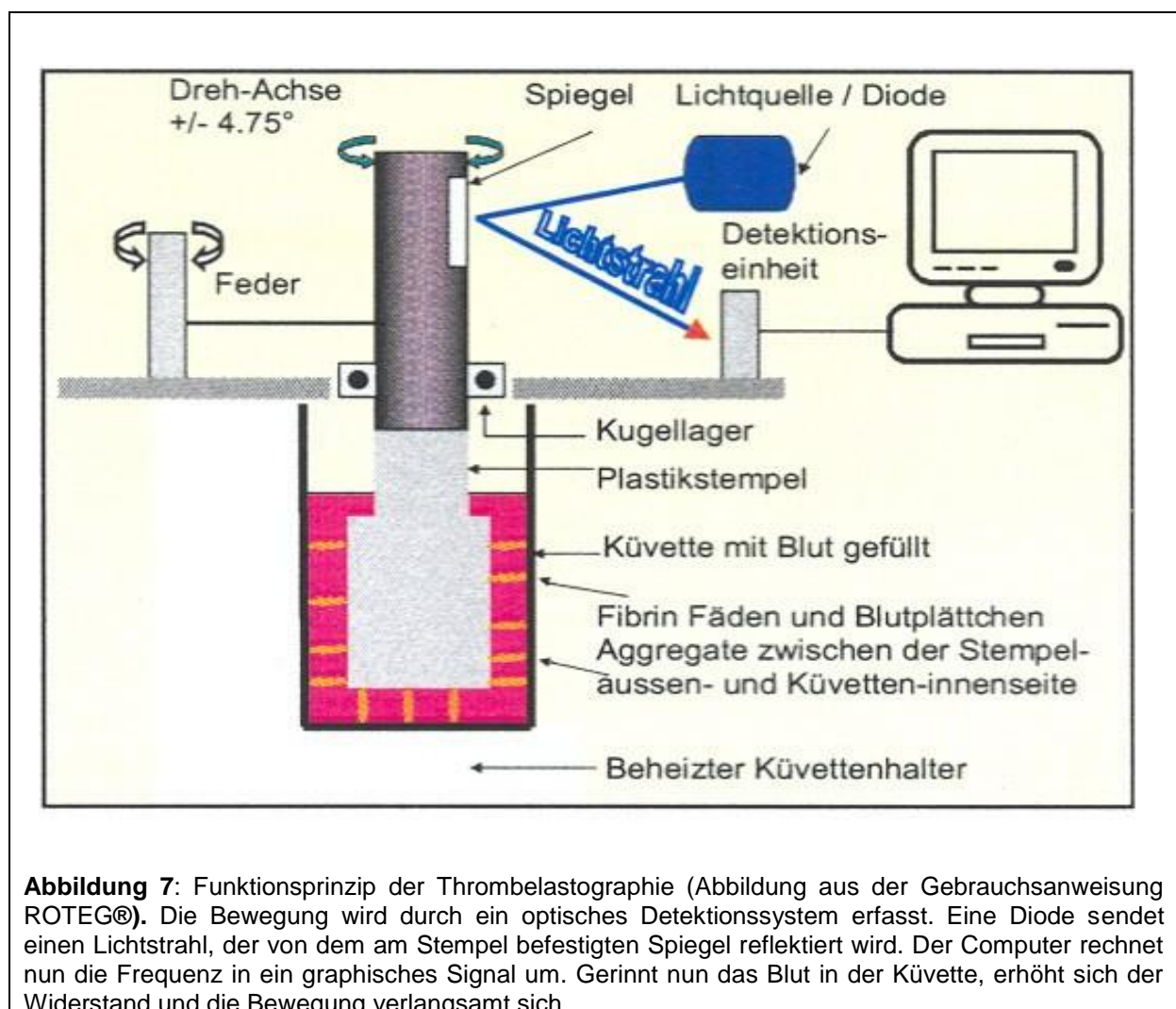
### **2.12 Bedeutung von Gerinnungspapametern im Vollblut mittels Thrombelastographie**

Die klassische Thrombelastographie wurde in den 40er Jahren des vorigen Jahrhunderts entwickelt und basiert auf einer kontinuierlichen graphischen Aufzeichnung der Festigkeit eines Blutgerinnsels während seiner Entstehung.

Das moderne ROTEG® Vollblut-Hämostase-System stellt eine Weiterentwicklung

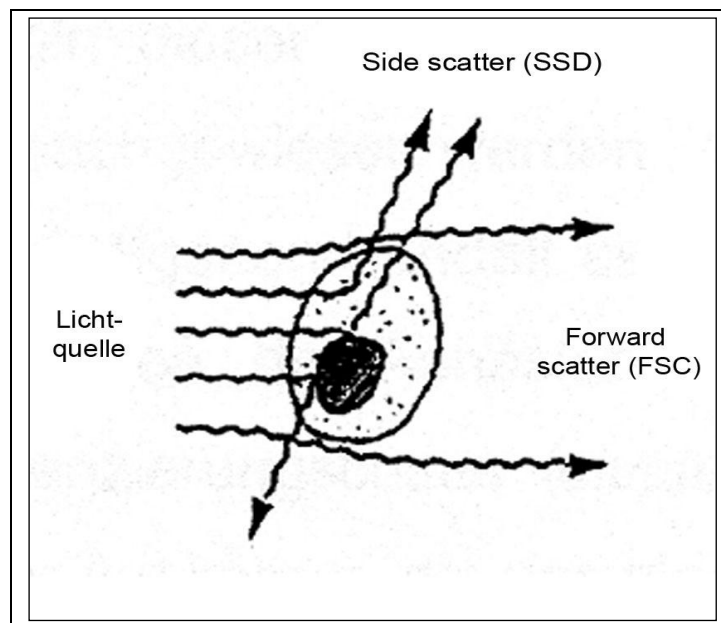
dieses Systems dar. Die mit Blut gefüllte Küvette taucht in den senkrecht stehenden Plastikstempel ein. Dieser Stempel ist auf einem Kugellager befestigt und rotiert in einem Winkel von  $4.75^\circ$  um die eigene Achse.

Die Bewegung wird durch ein optisches Detektionssystem erfasst. Eine Diode sendet einen Lichtstrahl, der von dem am Stempel befestigten Spiegel reflektiert wird. Der Computer rechnet nun die Frequenz in ein graphisches Signal um. Gerinnt nun das Blut in der Küvette, erhöht sich der Widerstand und die Bewegung verlangsamt sich (Abb. 7). In der vorliegenden Arbeit ist hauptsächlich die *Clot Formation Time* (Fibrinbildungszeit) von Bedeutung, die als die Zeit in Sekunden von Beginn der Calciumzugabe, welche die Gerinnung in Gang setzt, bis zu dem Zeitpunkt, an dem eine signifikante Koagulation stattgefunden hat, definiert ist.



### 2.13 Bedeutung der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) genannt, ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Anhand von Streulicht, das entsteht wenn der Laser die Zelle trifft, kann Fluoreszenzintensität in nach Größe und Granularität separierten Partikeln gemessen werden.



**Abbildung 8:** Das so genannte Forward-scatter (FSC) misst, wie in der Abbildung gezeigt, die Größe der durch den Flüssigkeitsstrom fließenden Partikel (u.a. Zellen). Das Side-scatter (SSC) misst die Granularität anhand der Streuung des Laserstrahls, der von den Granulae und dem Zellkern abgelenkt wird.

In einem flüssigen System werden die Zellen zum Messpunkt transportiert. Bei dieser hydrodynamischen Fokussierung werden die Zellen einer Einzelzellsuspension, an einendergereiht, an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Das Erfassungssystem wandelt nun das optische Signal in ein elektronisches um, welches dann digitalisiert und für die Computeranalyse verwendbar wird.

Jede Zellart streut entsprechend ihrer Größe, der Struktur ihrer Zellmembran und der Art ihrer intrazellulären Bestandteile das auftreffende Licht in spezifischer Weise. Der größte Anteil des Lichts wird vorwärts gestreut, wobei das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) nach Ausblendung des ungebrochenen Zentralstrahles ein Maß für die Größe der Zelle ist. Ein weiterer Teil des Lichts wird im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut und als Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC, 90-Streulicht) bezeichnet. Das Maß der Seitwärtsstreuung ist von der Granularität der Zelle abhängig.

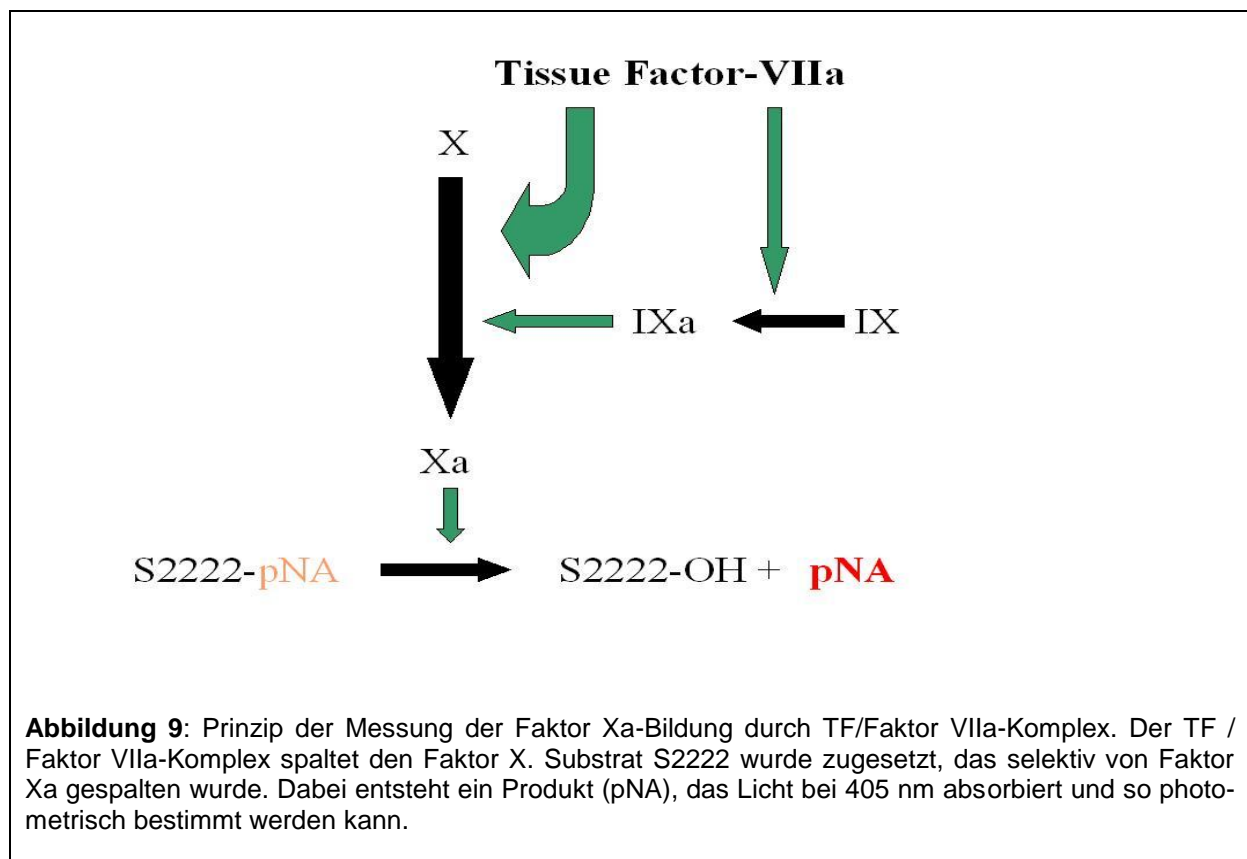
Um bestimmte molekulare Merkmale einer Zelle zu untersuchen, muss man dieses Merkmal zuerst einmal markieren. Das geschieht mit Antikörpern, die gegen dieses Merkmal gerichtet sind und bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe tragen, z.B. FICS (Fluoreszeinisothiozyanat) oder PE (Phycorythrin). Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserimpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern.

Beispielweise weist das Fluoreszenzspektrum von FITC ein Maximum bei 515 nm (gelb-grün) auf, das von Phycoerythrin ein Maximum bei 580 nm (rot-orange) auf. Damit sind der Hochpunkt der Emissionsmaxima deutlich voneinander zu unterscheiden und können von entsprechenden Detektoren erfasst werden. Des Weiteren erlaubt die Software dem Benutzer zu gaten, d.h. bestimmte Zellen auszuwählen und separat auf Merkmale zu untersuchen.

### **2.14 Faktor Xa-Bildung**

Die Bildung von Faktor Xa kann Aufschluss geben über den Gehalt an funktionell aktivem TF in der untersuchten Probe. Der TF / Faktor VIIa Komplex spaltet den Faktor X entweder direkt oder indirekt über eine Faktor IX Aktivierung (vgl.f.S. Abb. 11). Um die Faktor Xa-Bildung einzuleiten wurde den Proben das Substrat S2222 zugesetzt, das selektiv von Faktor Xa gespalten wurde. Dabei entsteht ein Produkt (pNA), das Licht bei 405 nm absorbiert und so photometrisch bestimmt werden kann.

Um der *in vivo* Situation möglichst nahe zu kommen, sind in dem Gerinnungsfaktorkonzentrat Beriplex, welches den TF-haltigen Proben zugeben wurde, neben Faktor VII auch Faktor II, IX und X sowie die antikoagulatorischen Moleküle Antithrombin und Protein C enthalten. Die entsprechenden Proben (biologisches Material, Beriplex und S2222) wurden in eine 96 Loch Platte pipettiert. Zur Umrechnung der optischen Dichte in Units/ml wurde eine Konzentrationsreihe unter Verwendung eines rekombinanten humanen TF ermittelt (0,05 mU/ml, 0,1 mU/ml, 0,2 mU/ml, 0,4 mU/ml, 0,8 mU/ml und 1,6 mU/ml). Nach Zugabe von je 50 µl CaCl<sub>2</sub> Lösung und 100 µl einer Lösung aus Resuspensionspuffer, Substrat S2222 und Beriplex (3,375 ml Resuspensionspuffer, 400 µl S2222, 225 µl Beriplex) zu den Proben und den Standards, wurde der Anstieg der optischen Dichte über einen Zeitraum von 30 Minuten mit einem ELISA Reader photometrisch bei Raumtemperatur bestimmt.



**Abbildung 9:** Prinzip der Messung der Faktor Xa-Bildung durch TF/Faktor VIIa-Komplex. Der TF / Faktor VIIa-Komplex spaltet den Faktor X. Substrat S2222 wurde zugesetzt, das selektiv von Faktor Xa gespalten wurde. Dabei entsteht ein Produkt (pNA), das Licht bei 405 nm absorbiert und so photometrisch bestimmt werden kann.



## 2.15 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS® und SigmaStat® durchgeführt. Die Daten wurden mittels t-Test (bei vorliegender Gauß'scher Normalverteilung) bzw. mittels Mann-Whitney-Test (bei fehlender Normalverteilung) ausgewertet. Als signifikant wurden p-Werte  $\leq$  0,05 angenommen.

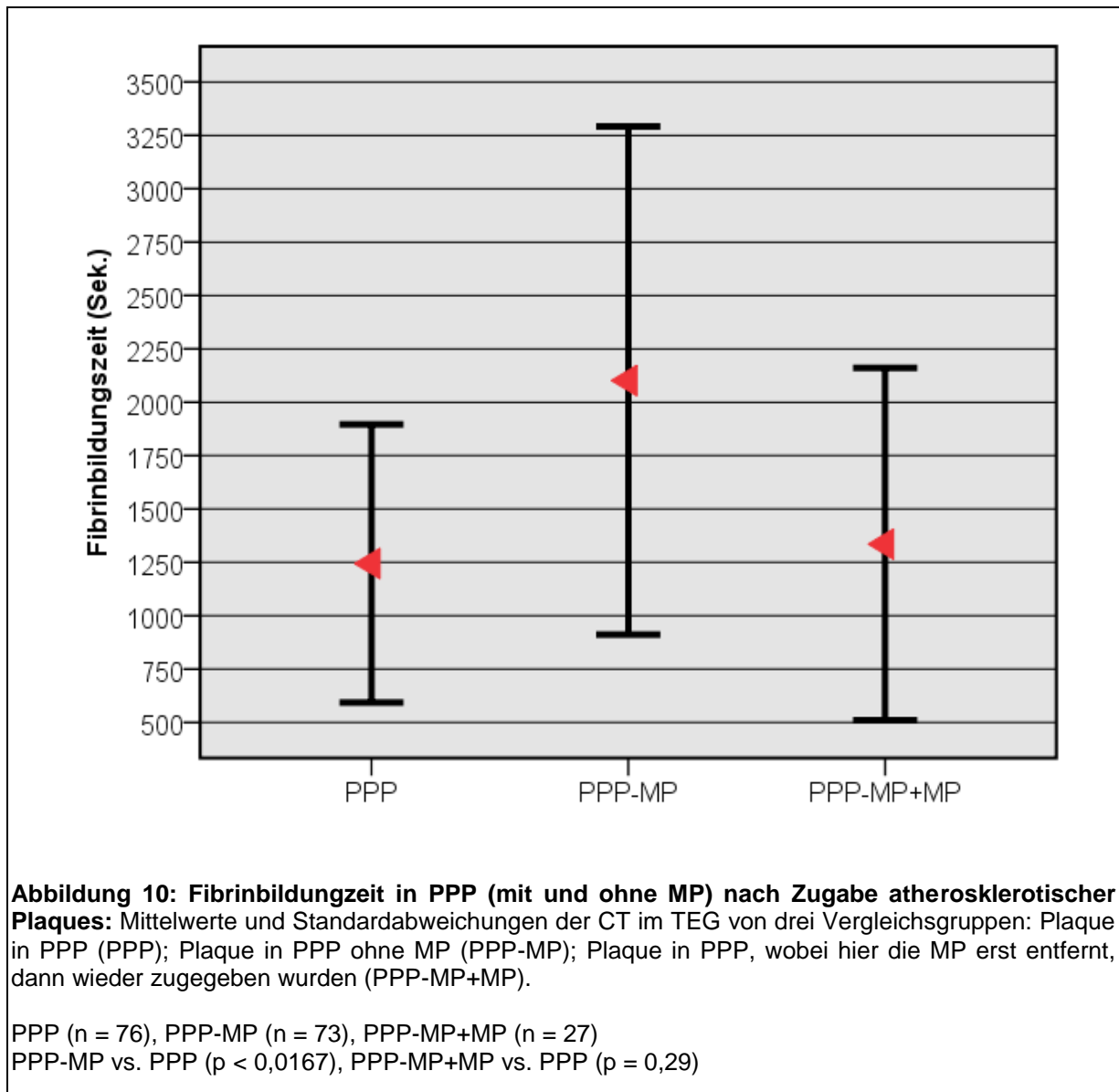
## **3 ERGEBNISSE**

### **3.1 Bedeutung von zirkulierenden MP für die Gerinnungsaktivierung durch atherosklerotische Plaques**

#### **3.1.1 Bedeutung von zirkulierenden MP in PPP**

Um den Einfluss der im Blut zirkulierenden MP auf die Aktivierung der Fibrinbildung nach Plaqueruptur zu analysieren, wurde den homogenisierten, aus Karotiden von Patienten isolierten Plaques PPP zugesetzt. Anschließend wurde die Fibrinbildung (Clotting Time; CT) mittels Thrombelastographie bestimmt. Sodann wurde die Fibrinbildungszeit in PPP gemessen, indem die MP entfernt wurden. In einem dritten Ansatz wurden die zuvor isolierten MP wieder in derselben Konzentration wie im unbehandelten PPP zurückgeführt. Mit diesem letzten Ansatz sollte geprüft werden, ob die verschiedenen experimentellen Schritte zur Entfernung der MP die Ergebnisse per se beeinflussen. Alle drei Gruppen wurden parallel mit Material desselben Blutspenders und desselben Plaquespenders durch Zugabe von 5 µl Plaque zu 300 µl PPP durch Rekalzifizierung gestartet.

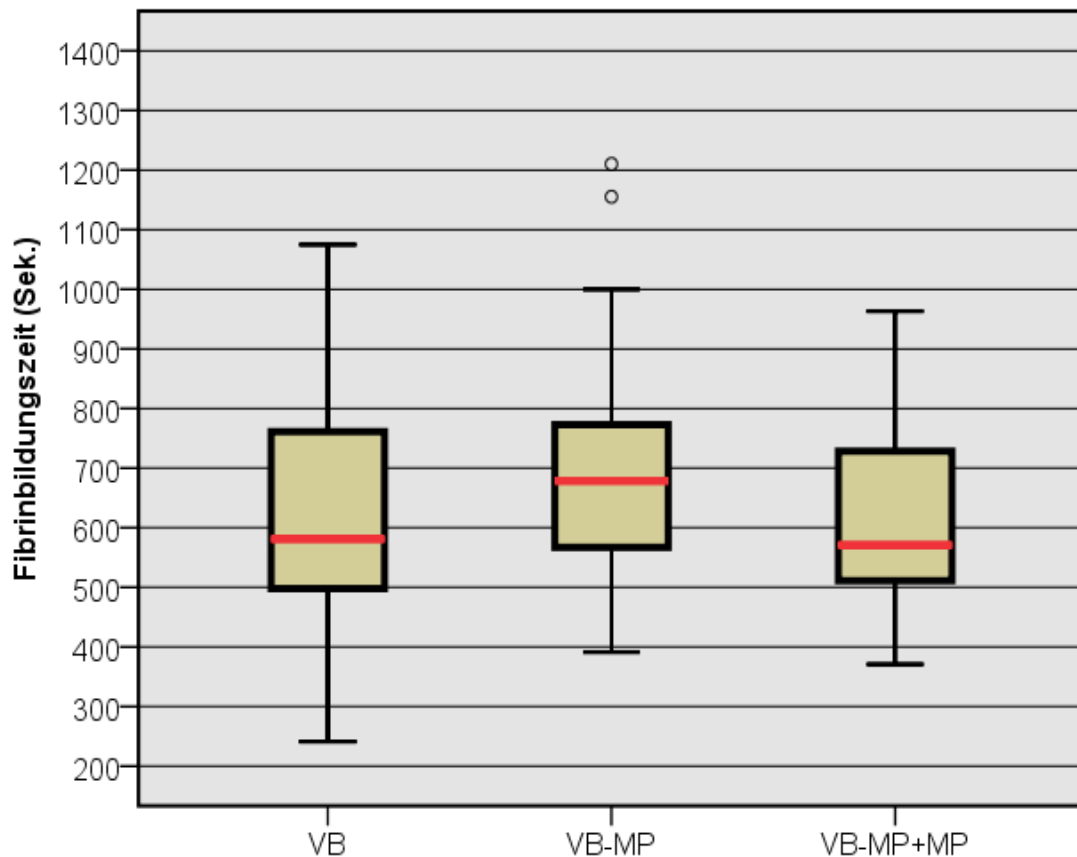
Die plaqueinduzierte Fibrinbildung nahm bei den Plasmen ohne MP im Vergleich zur Gruppe der MP-haltigen Plasmen im Schnitt um 50% zu. Dies bedeutet, dass in Abwesenheit der im Blut zirkulierenden MP die Blutgerinnung deutlich später einsetzt. Die Fibrinbildung in denjenigen Plasmen, bei denen MP wieder zugegeben wurden, verhielt sich wie diejenige der unbehandelten Gruppe (Abb. 10, s.f.S.). Dies lässt darauf schließen, dass der nach MP-Entfernung beobachtete Effekt tatsächlich auf die Präsenz der MP zurückzuführen ist und nicht auf Veränderungen des PPP während des Experimentes per se beruht.



### 3.1.2 MP im Vollblut

Die oben beschriebene Versuchsreihe zeigt einen deutlichen Einfluss der MP auf die Fibrinbildung im PPP. Um der *in vivo*-Situation nach Ruptur eines atherosklerotischen Plaques näher zu kommen, wurden die MP selektiv aus dem Vollblut entfernt. Wieder wurden jeweils drei verschiedene Vollblutproben desselben Spenders parallel mit Plaquematerial desselben Spenders versetzt. Die erste Gruppe beinhaltete un-

behandeltes Vollblut, die zweite Gruppe Vollblut nach Entfernung der MP. Die dritte Gruppe stellte wiederum eine Kontrolle dar, in der die MP zuerst entfernt und anschließend wieder zugefügt wurden. Nach Zugabe des Plaquematerials ergaben sich zwischen den drei Gruppen keine statistisch relevanten bzw. keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der gemessenen Fibrinbildung (Abb. 11).

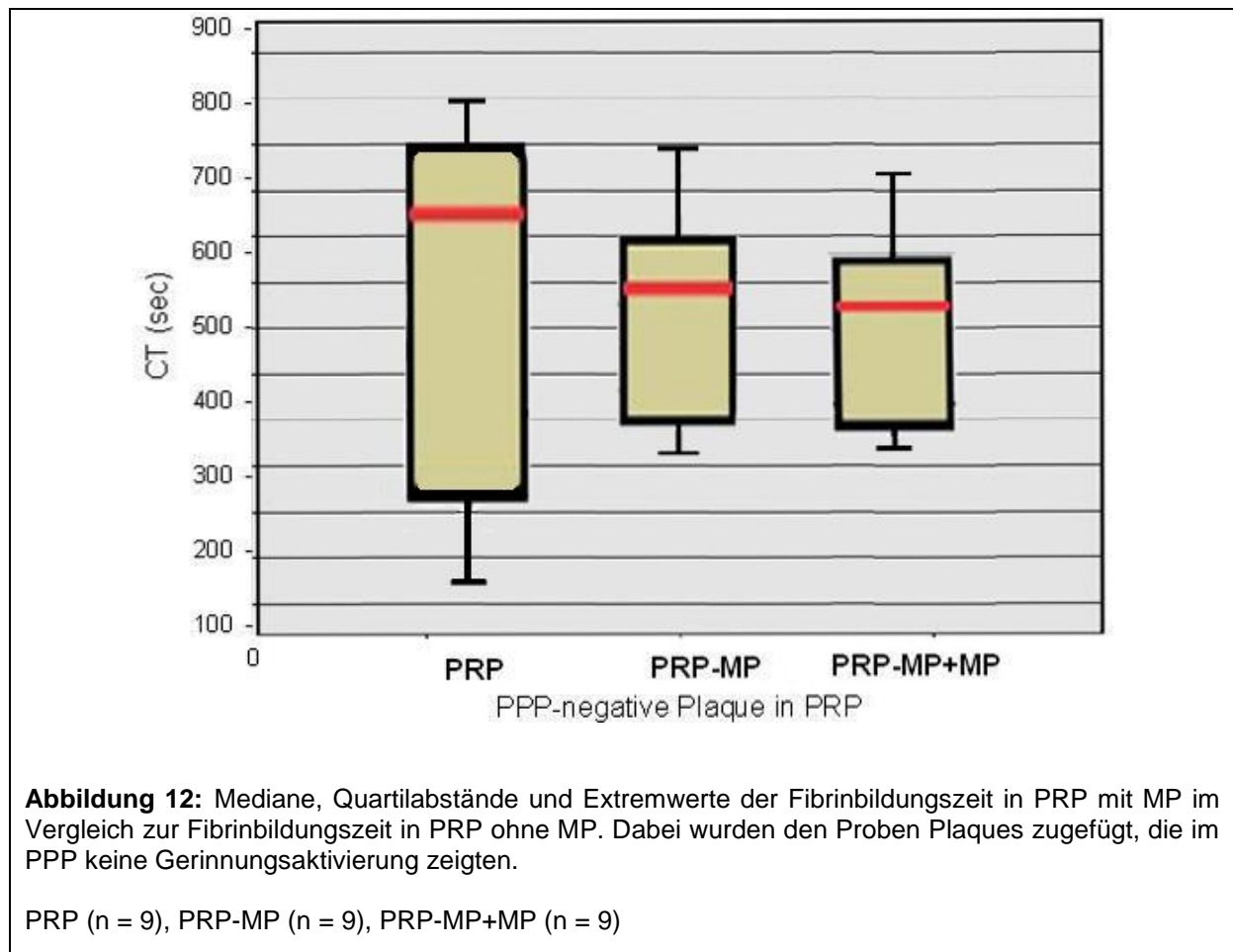


**Abbildung 11: Wirkung der MP auf die Plaque-induzierte Fibrinbildung im Vollblut:** Mediane, Quartilabstände und Extremwerte der CT im TEG von drei Vergleichsgruppen: VB: Vollblut; VB-MP: Vollblut aus dem selektiv die MP entfernt wurden; VB-MP+MP: Vollblut aus dem selektiv die MP entfernt wurden und anschließend wieder zugefügt wurden.

VP (n = 100), VB-MP (n = 71), VB-MP+MP (n = 33)

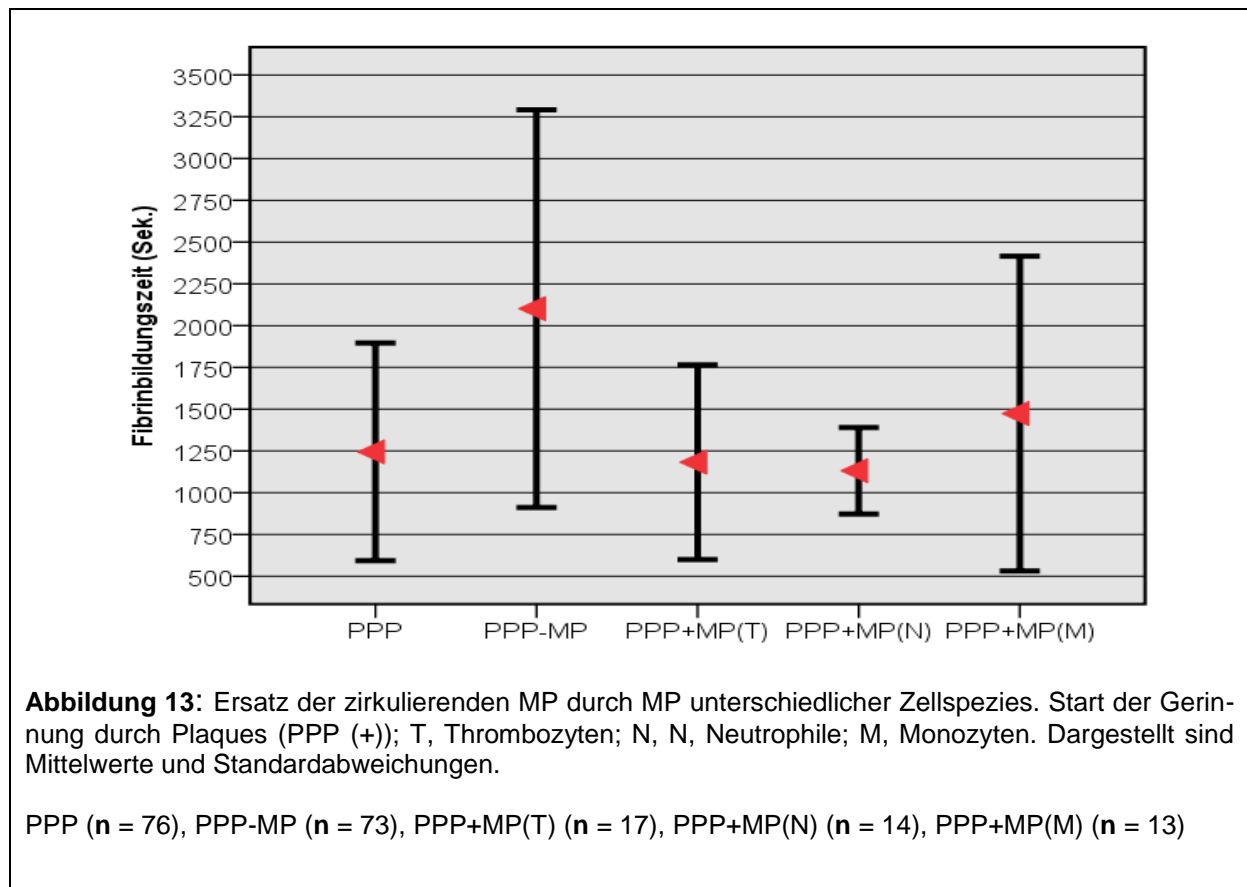
### 3.1.3 PPP-negative Plaques in PRP

Wie in der Einleitung beschrieben, lassen sich verschiedene Plaquegruppen unterscheiden, je nachdem ob sie im PPP die Fibrinbildung stimulieren oder nicht. In dieser Versuchsreihe wurde nun die PPP-negativen Plaques in PPP getestet. Hierbei wurde kein Effekt der MP auf die Clotting time im TEG beobachtet. Es ergaben sich keine statistisch relevanten Unterschiede der PPP-negativen Plaques zwischen PRP-Proben mit/ohne MP (Abb. 12)

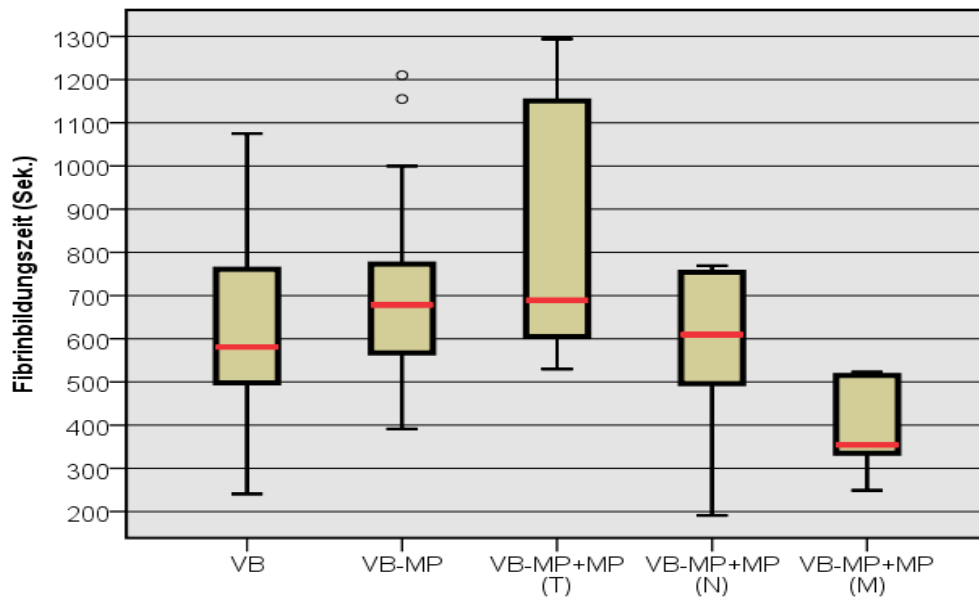


### 3.2 Ersatz von zirkulierenden MP durch zellspezifische MP

Um festzustellen, welche MP den entscheidenden Effekt auf die Fibrinbildung ausüben, wurde die unterschiedliche Herkunft der einzelnen MP-Entitäten berücksichtigt. Um dies zu untersuchen, wurden die physiologisch im Blut zirkulierenden MP durch aus verschiedenen Blutzelltypen *in vitro* generierte MP ersetzt. Dabei wurden MP *in vitro* aus Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten präpariert. Danach wurden die zirkulierenden MP entfernt und durch die gleiche Menge der jeweiligen zellspezifischen MP-Spezies ersetzt. Interessanterweise vermochten dabei alle MP-Spezies in PPP die Kontrollfibrinbildung wieder herzustellen (Abb.13).

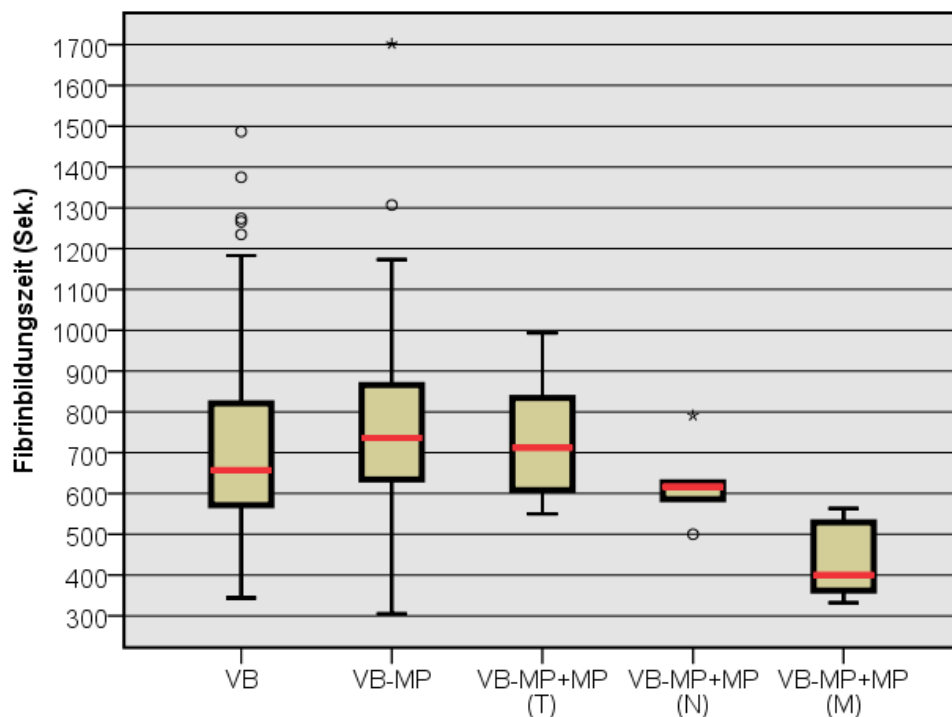


Eine vergleichbare Anordnung wurde auch in Vollblut anstelle von PPP durchgeführt. Hier zeigte sich jedoch ein entscheidender Unterschied: Die von Monozyten abstammenden MP wiesen im Vergleich zu MP aus anderen Zelllinien oder zu den physiologisch zirkulierenden MP die stärkste prokoagulatorische Wirkung auf. Dies galt sowohl für Vollblut, das mit Plaque initiiert wurde, welche bereits die Fibrinbildung in PPP stimulierte, als auch für solche, die keine Fibrinbildung in PPP zeigte. Dies ist offensichtlich darauf zurückzuführen, dass stimulierte Monozyten die höchste TF-Expression unter allen Blutkomponenten aufweisen (Abb. 14 und 15).



**Abbildung 14:** PPP(+)-Plaques wurde VB zugefügt, in dem die zirkulierenden MP durch zellspezifische MP ersetzt wurden. Dargestellt sind Mediane, Quartilabstände und Extremwerte.

VB (n = 44), VB-MP (n = 34), VB-MP+MP(T) (n = 8), VB-MP+MP(N) (n = 6), VB-MP+MP(M) (n = 6)  
 VB vs. VB-MP+MP(M)  $p \leq 0,0167$



**Abbildung 15:** Ersatz der im Vollblut zirkulierenden MP durch von Monozyten freigesetzte MP (VB-MP+MP(M)) steigert die Fibrinbildung in Plaque-stimuliertem Vollblut (PPP(-)). Dargestellt sind Mediane, Quartilabstände und Extremwerte.

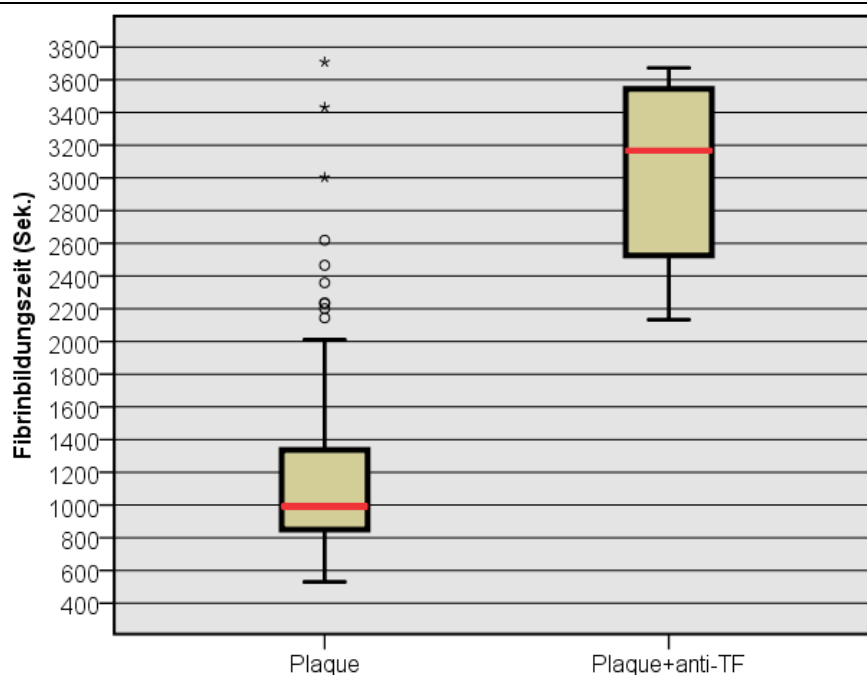
VB (n = 66), VB-MP (n = 37), VB-MP+MP(T) (n = 8), VB-MP+MP(N) (n = 6), VB-MP+MP(M) (n = 6)  
 VB vs. VB-MP+MP(M)  $p \leq 0,0167$



### 3.3 Bedeutung des intravaskulären (blood borne) TF

#### 3.3.1 Beschichtung von MP mit TF-Antikörpern

Die unter 4.1.1 beschriebene Beschleunigung der Blutgerinnung bei Anwesenheit der MP ist vermutlich auf den TF-Gehalt der in Blut zirkulierenden MP zurückzuführen. Um dies experimentell zu unterstützen, wurden zwei Versuchsgruppen angesetzt: Eine erste Gruppe enthielt unbehandeltes PPP. In der zweiten Gruppe wurden die MP mit anti-TF-Antikörper gecoatet. Dafür wurden die zuvor isolierten MP für 30 Minuten mit 10 µg/ml Anti-TF VIC7-Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert, so dass der membrangebundene TF nun ligiert und damit nicht mehr funktionsfähig ist. Um ausschließlich die Aktivität des MP-assoziierten TF zu hemmen, wurden die MP 3x gewaschen. Damit sollte gewährleistet werden, dass kein ungebundener Antikörper die Proben verunreinigen konnte. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Verzögerung der Plaque-induzierten Fibrinbildung im PPP nach Beschichtung der MP mit anti-TF-Antikörper (Abb. 16). Dies lässt darauf schließen, dass der Effekt der zirkulierenden MP auf die Gerinnungsaktivierung durch atherosklerotische Plaques im PPP durch MP-TF vermittelt wird.



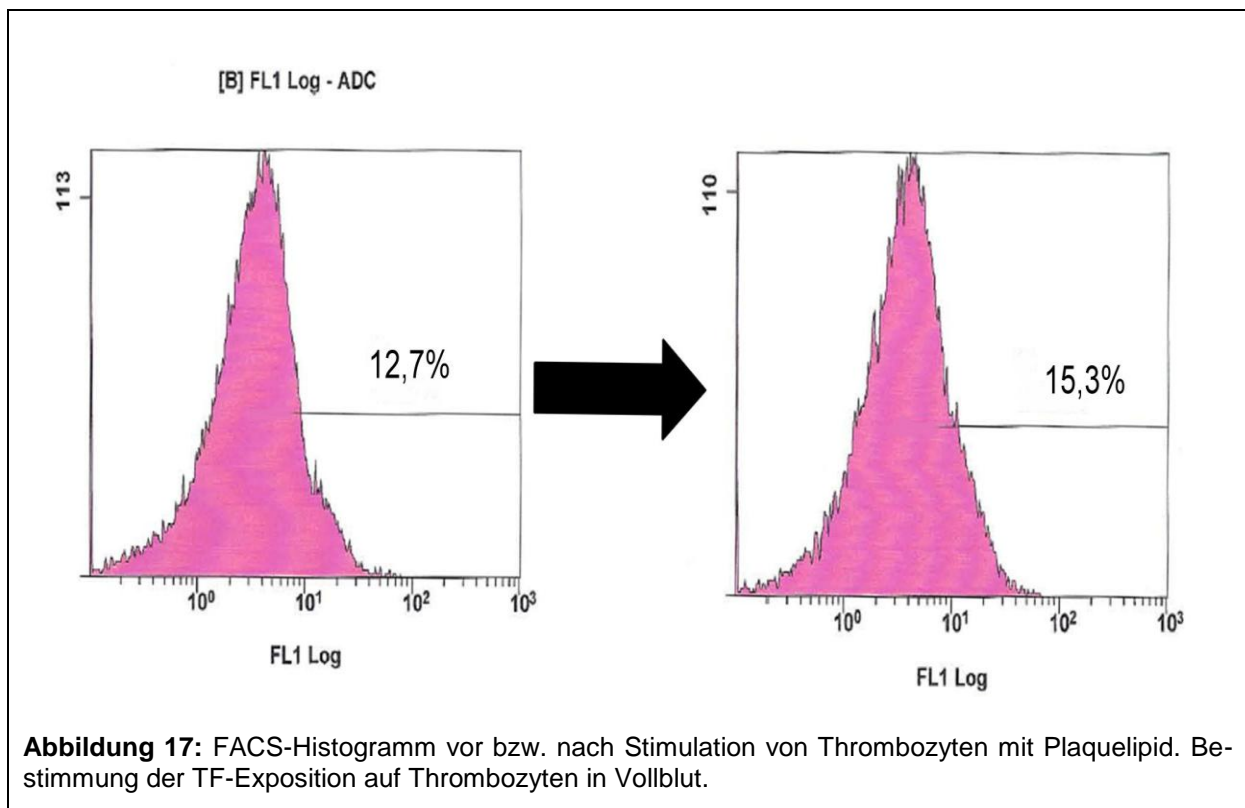
**Abbildung 16:** Zugabe von Plaques zu PPP, dessen MP mit/ohne anti-TF beschichtet wurden. Fibrinbildung bei antiTF-behandelten MP. Dargestellt sind Mediane, Quartilabstände und Extremwerte. Plaque (n = 76), Plaque+anti-TF (n = 6)

### 3.3.2 Thrombozytäre TF-Präsentation nach Exposition mit Plaquelipiden

Im Falle einer Plaqueruptur werden neben anderen Faktoren v.a. Lipide aus dem Plaquekern freigesetzt. Um zu prüfen, ob die Plaquekerne die TF-Exposition in Blutzellen verändern, untersuchten wir, ob die aus Plaquematerial isolierten Lipide die Anwesenheit von TF auf der Thrombozytenoberfläche beeinflussen.

Die Plaquelipide wurden isoliert und in einem Puffer resuspendiert. Danach wurden sie zu 100 µl Vollblut zugegeben. Anschließend wurden die Zellen aus dem Vollblut mit Lysing Solution (Becton Dickinson) lysiert. Dabei sind Thrombozyten von der Lyserung ausgenommen. Im FACS wurde selektiv auf die Thrombozyten fokussiert, die mit murinem Anti-Human-CD42b-PE-Antikörper und murinem Anti-Human-TF-FITC-Antikörper markiert wurden.

Dadurch wurde selektiv die Expression von TF auf der Thrombozytenoberfläche getestet.



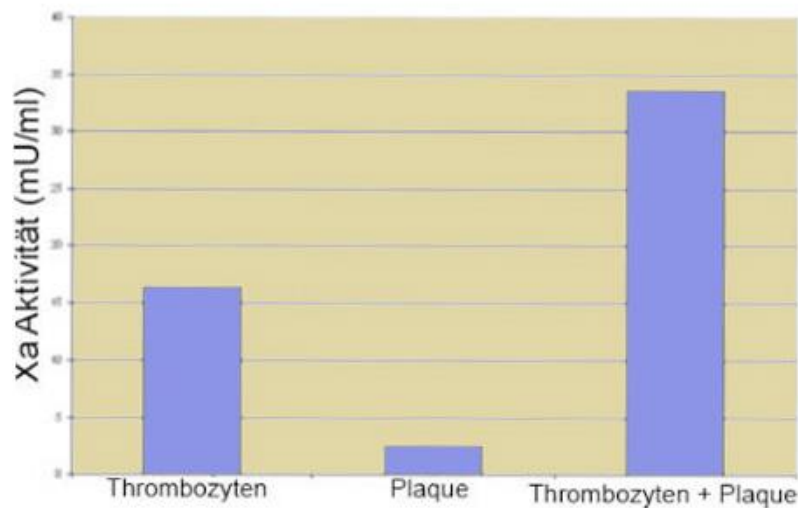
Nach Inkubation der Thrombozyten mit den Plaquelipiden wurde ein limitierter Anstieg der Expression von TF auf den Thrombozyten beobachtet. Stimuliert man nun

im gleichen Verfahren die Thrombozyten mit Kollagen anstatt mit Lipiden, erhält man ein ähnliches Ergebnis: Es wird ein kleiner Anstieg der TF-Exposition auf den Thrombozyten beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass atherosklerotische Plaques die TF-Expression der Thrombozyten verstärken können (Abb. 17).

### 3.4 Protein Disulfid Isomerase (PDI)

Wie in der Einführung erläutert, kommt es nach Zugabe eines Teils der untersuchten Plaques reproduzierbar zu keiner Stimulierung der Fibrinbildung im PPP (PPP(-)-Plaques). Diese Plaques weisen aber nachweisbar TF auf (Bestimmungen von ELISA assays; nicht gezeigt).

Daher wurden zunächst PPP-Plaques ausgewählt. Diese Plaques wurden mit aktivierten Thrombozyten inkubiert und anschließend die TF-Aktivität über die Bildung von Faktor Xa bestimmt.

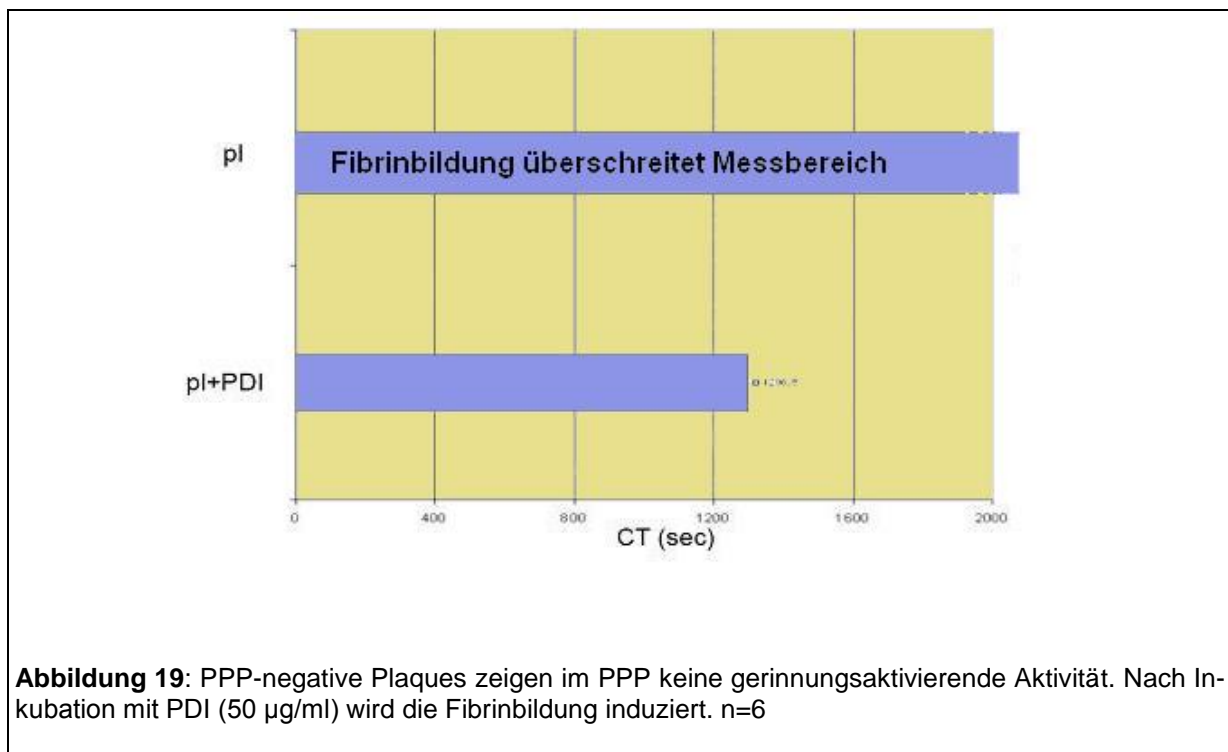


**Abbildung 18:** Faktor Xa-Bildung, Xa Aktivitätsmessung; Thrombozyten alleine, Plaquematerial alleine, und Thrombozyten mit Plaquematerial inkubiert.

Thrombozyten (n = 14), Plaque (n = 14), Thrombozyten+Plaque (n = 6)

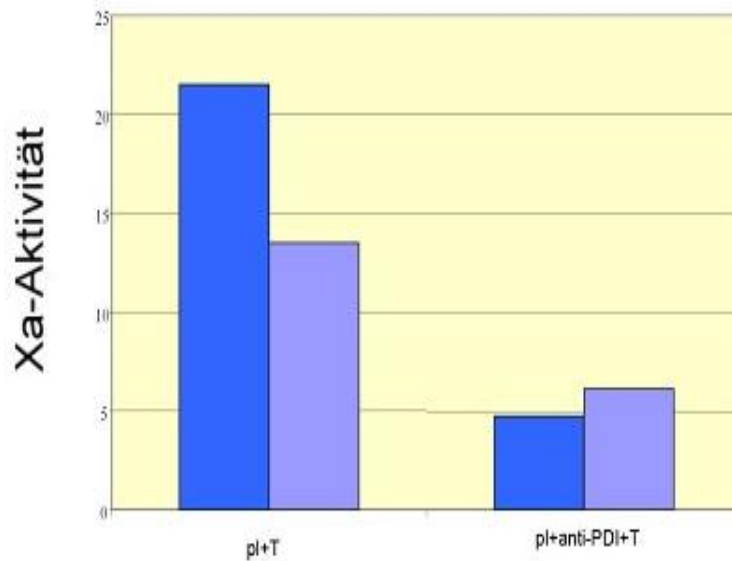
In Abb. 18 ist deutlich zu erkennen, dass sich die prokoagulatorische Xa-Aktivität bei Inkubation des Plaquematerials und den aktivierten Thrombozyten mehr als nur additiv verstärkt. Daraus ergibt sich, dass die Thrombozyten die TF-Aktivität der

Plaques synergistisch steigern können. Neuere Daten zeigen, dass die TF-Aktivierung von dem Redoxzustand eines Cysteinpaares in der extrazellulären Domäne von TF abhängt.<sup>36</sup> Der für die TF-Aktivierung notwendige Redoxzustand wird durch die Thiol Isomerase PDI erzeugt. Aktivierte Thrombozyten sezernieren bekannterweise Thiol Isomerasen, besonders PDI. Um zu prüfen, ob die Aktivitätssteigerung des TF durch PDI hervorgerufen sein kann, wurde eine Versuchsreihe im Thrombelastographen in PPP angesetzt. Der Plaque wurde mit 50 µg/ml PDI bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert und mit demselben Plaque ohne Vorbehandlung verglichen.



**Abbildung 19:** PPP-negative Plaques zeigen im PPP keine gerinnungsaktivierende Aktivität. Nach Inkubation mit PDI (50 µg/ml) wird die Fibrinbildung induziert. n=6

Wie erwartet, zeigten die PPP-negativen Plaques keine relevante Aktivierung der Blutgerinnungskaskade (Abb. 19). Hingegen ergab sich nach Inkubation mit PDI eine Fibrinbildungszeit von ca. 1300 Sekunden, was ungefähr der Fibrinbildung in PPP-positiven Plaques entspricht. Daraus kann gefolgert werden, dass PPP-negative Plaques prinzipiell durch Zugabe von PDI in PPP-positive Plaques umgewandelt werden können. Hingegen war bei PPP-positiven Plaques durch Zugabe von PDI

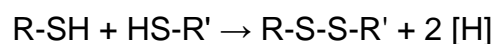


**Abbildung 20:** Wirkung des anti-PDI-Antikörpers auf Faktor Xa-Bildung in Suspension aus aktivierten Thrombozyten und atherosklerotischen Plaques. Das Plaquematerial wird einmal mit aktivierten Thrombozyten versetzt; mit aktivierten Thrombozyten versetzt, aber das Plaquematerial wurde zuvor mit anti-PDI vorinkubiert. (pl+T n = jeweils 12 pl+anti-PDI+T= jeweils 4)  
 Unterschiedliche Farben geben unterschiedliche Plaques wieder. Dunkelblau = PPP-positive Plaques; hellblau = PPP negative Plaques

keine Verkürzung der Fibrinbildungszeit nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde getestet, ob eine Hemmung von PDI die TF-Aktivierung in Suspension aus aktivierten Thrombozyten und Plaques beeinflusst. Bei Inkubation des Plaquematerials mit Anti-PDI-Antikörper für 15 Minuten bei einer Konzentration von 400 µg/ml zeigt sich eine deutliche Senkung der Xa-Aktivität, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Inhibition von PDI eine Reduktion der TF-Aktivität mit sich führt (Abb. 20). Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse vermuten, dass PDI über Stimulierung des im Lipidkern enthaltenen TF für die Aktivierung der Fibrinbildung nach Plaqueruptur mitverantwortlich ist.

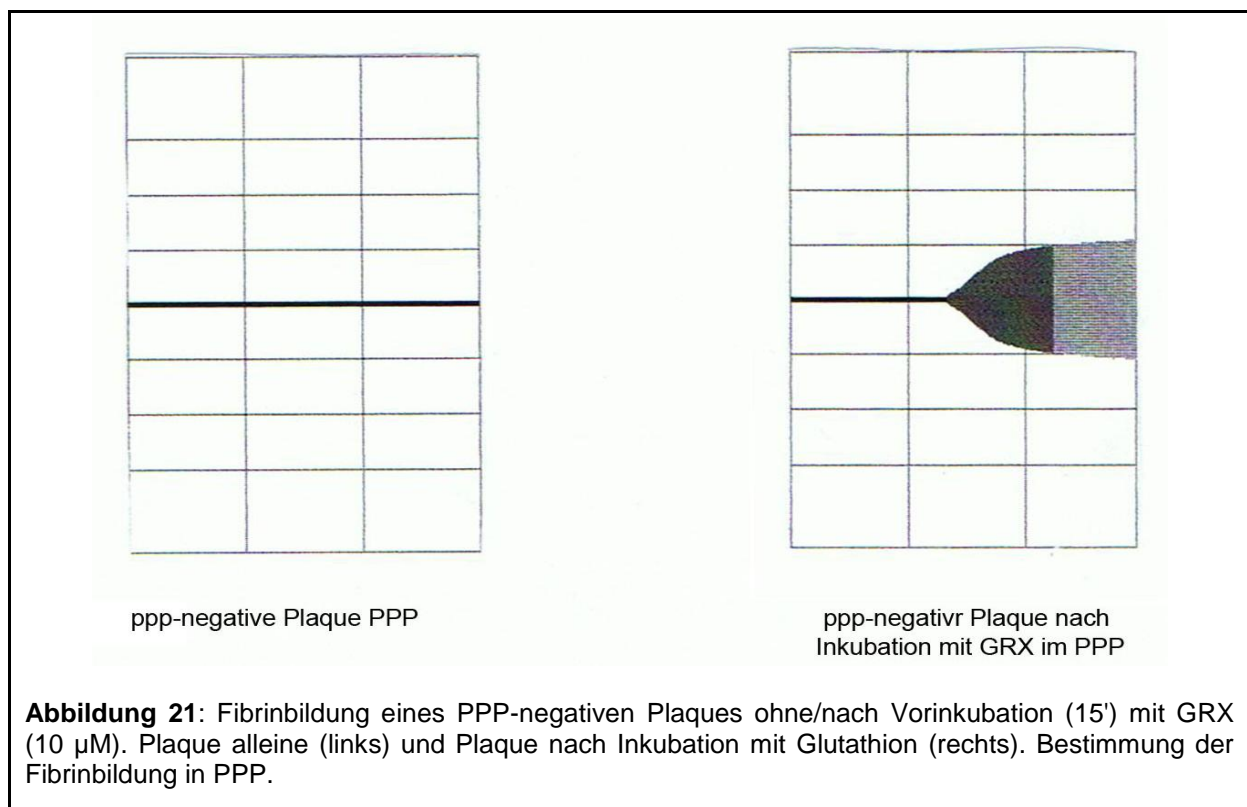
### 3.5 Redoxreaktionen

Disulfidbrücken stabilisieren die dreidimensionale Struktur von Proteinen.



R und R' bezeichnen dabei die Cysteine eines Proteins. Die bei der Oxidation frei werdenden Wasserstoffatome werden von einem Wasserstoffakzeptor gebunden. Wie bereits erwähnt (s. 2.3), besitzt TF zwei Disulfbrücken, wobei eine davon (Cystein 186-209) an der Oberfläche des Proteins lokalisiert und daher für Redoxregulation zugänglich ist. Diese Cysteine können als gemischtes Disulfid mit Gluthation vorliegen.<sup>36</sup> Um die Bedeutung dieses Disulfids im Plaque-TF zu ermitteln, wurden die Plaques mit Glutareoxin (GRX) vorinkubiert, um Gluthation aus der Bindung an Cystein 209 von TF zu entfernen.

PPP-negative Plaques wurden für 15 Min. mit GRX vorinkubiert und danach zu 300 $\mu$ l PPP zugegeben.



Die Ergebnisse zeigen, dass es nach Inkubation mit GRX zu einer Aktivierung der Fibrinbildung durch den PPP(-)Plaque kommt (Abb. 21).

## 4 DISKUSSION

Kaum eine Erkrankung steht seit Jahrzehnten so sehr im Blickpunkt der medizinischen Forschung wie die Atherosklerose. Diese kardiovaskuläre Erkrankung entwickelt sich über Jahrzehnte symptomlos, bis sie sich durch Herzinfarkt, Schlaganfall oder periphere arterielle Verschlusskrankheit manifestiert.<sup>19</sup> Diese für den Patienten oft schwerwiegenden Ereignisse sind meistens Folge einer Ruptur eines atherosklerotischen Plaques der Koronararterien und der Carotiden. Dadurch kommt es zum Kontakt der Plaquekerne mit Blutzellen und Blutplasma. Da im Blut zirkulierende MP prokoagulatorische Aktivität aufweisen, könnten sie an der durch atherosklerotische Plaques getriggerten lokalen Aktivierung der Blutgerinnung beteiligt sein.

### 4.1 Bedeutung der zirkulierenden MP bei Plaqueruptur

MP sind Zellabschnürungen der Zellmembran verschiedener Ursprungszellen. Frühere Arbeiten dokumentierten erhöhte Mengen an MP bei Patienten mit akuten koronaren Herzkrankheiten, Sepsis oder heparininduzierten Thrombozytopenien.<sup>73; 27; 47</sup> Diese Erkrankungen zeichnen sich durch ein erhöhtes thrombotisches Risiko aus. Im Gegensatz dazu zeigen Patienten, die ein erhöhtes Blutungsrisiko aufweisen, wie beispielsweise Patienten mit Scott Syndrom, eine deutlich verminderte MP-Bildung.<sup>13; 62</sup> Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die durch atherosklerotische Plaques induzierte Fibrinbildung nach Entfernung der zirkulierenden MP aus PPP deutlich reduziert ist.

Während also zirkulierende MP für die Plaque-induzierte Blutgerinnung im PPP eine erhebliche Rolle spielen, wurde im PRP und im Vollblut nach Entfernung der MP keine signifikante Veränderung der Gerinnungszeit festgestellt. Diese Differenz könnte auf die Unterschiede der verschiedenen Ansätze bezüglich An- bzw. Abwesenheit von Thrombozyten zurückzuführen sein. Es scheint in der Tat plausibel, dass die starke prokoagulatorische Eigenschaft der Thrombozyten die Wirkung der durch MP hervorgerufenen Beschleunigung der Blutgerinnung überlagert. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass *in vivo* an präferentiellen Lokalisationen von Plaques durch Änderungen der Strömung des Blutflusses Thrombozyten-freie

Regionen entstehen können.

MP können intravaskulären TF tragen. Die Fähigkeit dieses zirkulierenden TF, die Fibrinbildung ohne einen Aktivierungsstimulus zu starten, ist limitiert. Dies ist offensichtlich notwendig, um die Aktivierung der Gerinnungskaskade in gesundem Blutgefäß zu verhindern. Dies könnte in der Tat lebensgefährlich sein, da eine intravaskuläre Thrombusbildung zu kompletten Obstruktionen mit nachfolgender Ischämie führen kann. In der Versuchsreihe im PPP zeigte sich deutlich, dass durch den Einsatz von TF-Antikörpern die Blutgerinnungszeit stark herabgesetzt wird (vgl. Abb 16) – und zwar in einem beinahe ebenso großen Maße wie bei vollständiger Entfernung der MP. Dies lässt darauf schließen, dass der MP-assoziierte TF an der Plaque-induzierten Fibrinbildung im PPP zu einem erheblichen Teil beteiligt ist. Dies gilt insbesondere für die PPP(+) Plaques. Interessanterweise konnte zu PPP-negativen Plaques eine Plaque-induzierte Fibrinbildung durch Zugabe von PDI erreicht werden. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass Thrombozyten an der Plaque-induzierten Fibrinbildung entscheidend beteiligt sind. Aktivierte Thrombozyten sezernieren bekannterweise Thiol Isomerasen, im Besonderen PDI. Die Hauptfunktion dieses Proteins besteht in ihrer Wirkung auf die oxidative Faltung von Proteinen im ER. PDI, das normalerweise ein ER-Retentionsignal besitzt, wird auch von einer Vielzahl von Zellen sezerniert, unter anderem von Hepatozyten, exokrinen Zellen des Pankreas, Endothelzellen und aktivierten Thrombozyten.<sup>71</sup> Es ist daher davon auszugehen, dass aktivierte Thrombozyten durch Sekretion von PDI den inaktiven Plaque-assoziierten TF aktivieren können. Nach PDI-Stimulierung verhält sich ein PPP-negativer Plaque ähnlich prokoagulatorisch wie ein PPP-positiver Plaque. Ebenfalls konnten wir zeigen, dass Lipide des Plaquekerns Thrombozyten aktivieren und zu einer gesteigerten TF-Expression an der thrombozytären Oberfläche führen können. Ob die durch Plaquelipide aktivierten Thrombozyten auch PDI sezernieren, was wiederum den Plaque-assoziierten TF aktivieren könnte, ist noch unklar und Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

Die von Monozyten freigesetzten MP verstärkten im Vergleich zu MP aus anderen Zellspezies bzw. im Vergleich zu der Gesamtpopulation der zirkulierenden MP die Plaque-induzierte Gerinnungsaktivierung am deutlichsten. Dies ist von besonderer



Bedeutung für das Verständnis der Gerinnungsaktivierung bei Infektionen, da Monozyten in der Lage sind, substantielle Mengen an TF unter Langzeitstimulation mit Entzündungsmediatoren zu synthetisieren.<sup>48</sup> Dies ist offensichtlich im Rahmen akuter und chronischer Entzündungsprozesse von erheblicher Wichtigkeit. So spielt monozytärer TF nachgewiesenermaßen eine entscheidende Rolle beim Start der Gerinnung im Rahmen der Disseminierten Intravasalen Gerinnung (DIC).<sup>49</sup> Hieraus ist zu folgern, dass die Funktion des monozytären TF unter pathologischen Bedingungen wie im Fall der Atherosklerose möglicherweise eine größere Rolle spielt als in der physiologischen Situation.

## 4.2 Bedeutung des intravaskulären TF

Neben zellulär gebundenem TF konnte TF-Protein auch im Plasma nachgewiesen werden.<sup>1</sup> Besonders hohe Mengen an TF wurden dabei im Plasma von Patienten mit Erkrankungen wie Myokardinfarkt<sup>67</sup> oder instabiler Angina pectoris<sup>39</sup> gefunden. Möglicherweise ist dies der Grund für die erhöhte Thrombogenität des Blutes, welche mit diesen Erkrankungen einhergeht. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, daß der Plasma-TF zumindest teilweise mit zirkulierenden MP assoziiert ist.<sup>43</sup> Ebenfalls fand man, dass stimulierte Monozyten, Plättchen und Eosinophile das TF-Gen *de novo* transkribieren können.<sup>33</sup> Aus neueren Studien mittels Elektronenmikroskopie geht hervor, dass es nach Stimulation von Vollblut mit Kollagen *in vitro* innerhalb von Minuten zu einer TF-Exposition auf der Oberfläche von Leukozyten-Thrombozyten-Komplexen kommt.<sup>77</sup> Dieser Prozess setzt voraus, dass TF präformiert im Blut vorhanden sein muß.

Als Aktivator der Blutgerinnungskaskade ist TF auch im Hinblick auf die pathologischen Vorgänge im Rahmen einer atherosklerotischen Erkrankung von zentraler Bedeutung. Dabei könnte auch dem Plasma-TF eine funktionelle Bedeutung zukommen,<sup>39; 67</sup> da eine erhöhte Konzentration von intravaskulärem TF an der Bildung von Thrombosen beteiligt sein könnte.<sup>33</sup> In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass MP und Thrombozyten die Hauptlokalisation von präformiertem, intravaskulärem TF im physiologischen Zustand sind.<sup>43</sup> Die Fähigkeit des zirkulierenden TF (blood borne) die Fibrinbildung zu initiieren, ist limitiert. Dies ist notwendig, um die

Aktivierung der Gerinnungskaskade in gesundem Blutgefäß zu verhindern, was potentiell lebensgefährlich sein kann, da eine Thrombusformierung zu kompletten Obstruktionen mit nachfolgender Ischämie führen kann. Studien an unterschiedlichen Zelltypen zeigen, dass TF in funktionell latentem Zustand präsentiert sein kann (encrypted oder cryptic TF).<sup>3</sup> Dies gilt v.a. für den intravaskulären TF.

Durch Ruptur eines atherosklerotischen Plaques werden Lipide des Plaquekerns gegenüber dem Blut exponiert. Wir konnten zeigen, dass die TF-Expression auf der Thrombozytenoberfläche durch Stimulation mit isolierten Plaquelipiden ansteigt. Inwieweit dies entscheidend für das *in vivo* nachfolgende Geschehen ist, bleibt zu klären. Es ist jedoch zu erwarten, dass dies zur Thrombusbildung bei Atherosklerose beiträgt. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass aktivierte Thrombozyten über Sekretion von PDI zur weiteren Aktivierung des Plaque-assoziierten TF führen könnten. In der Tat kann die prokoagulatorische Aktivität des zirkulierenden TF durch Interaktionen zwischen MPs und PDI aus aktivierten Thrombozyten getriggert werden.<sup>43</sup> Dies könnte auch im Falle der arteriellen Thrombose von Bedeutung sein, da es nach Plaqueruptur zur Interaktion TF-exponierter MP mit aktivierten Thrombozyten kommt. Allen bisherigen Studien und den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge ist davon auszugehen, dass es durch das Zusammenspiel von Plaque-assoziiertem TF und intravaskulärem TF zu massiven Steigerungen der Fibrinbildung im Gefäß kommen kann. Von besonderem Interesse ist in dieser pathophysiologischen Konstellation die Rolle des Plaque-assoziierten TF, der hauptsächlich monozytären Ursprungs ist. In der Tat kommt es in Gegenwart von monozytären MP zu einer erhöhten Fibrinbildung nach Exposition von Plaquematerial.

### 4.3 Bedeutung des im Lipidkern enthaltenen TF

Gerade im Zusammenhang mit Plaquerupturen kommt TF auf verschiedene Weise eine bedeutende Rolle zu.<sup>42</sup> In der Tat enthalten Plaques selbst ebenfalls TF-präsentierende MP, die v.a. von Monozyten/Makrophagen und glatten Muskelzellen freigesetzt werden.<sup>69</sup> Diese im Plaque entstandenen MP sind deshalb stark thrombogen.<sup>34; 74</sup>

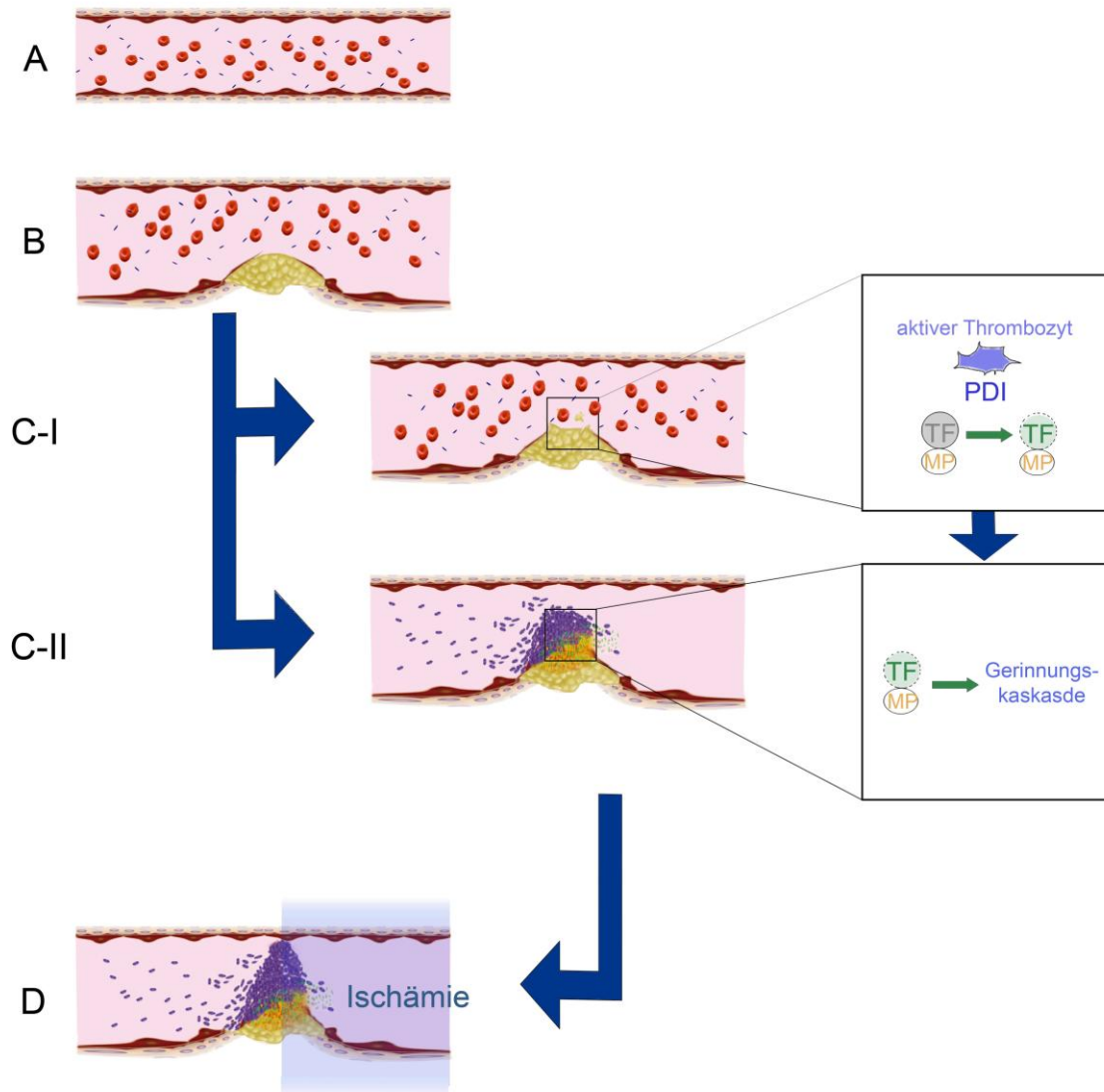
Der TF auf den MP im Lipidkern des Atheroskleroseplaques kann entweder bereits aktiviert sein (decrypted TF), wie im Falle der PPP-positiven Plaques oder aber in einem passiven Zustand vorliegen, in dem er von außen aktiviert werden muss, wie im Falle der PPP-negativen Plaques.

Interessanterweise fanden wir, dass es nach Inkubation von PPP-Plaques mit PDI zu dieser Aktivierung kommt. Daraus kann gefolgert werden, dass PPP-negative Plaques prinzipiell durch Zugabe von PDI in PPP-positive Plaques umgewandelt werden können. Hingegen waren bei PPP-positiven Plaques durch Zugabe von PDI keine Verkürzung der Fibrinbildungszeit nachweisbar. Im Umkehrschluss zeigt sich bei Inkubation des Plaquematerials mit Anti-PDI-Antikörpern eine deutliche Senkung der prokoagulatorischen Aktivität, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Inhibition von PDI eine Vermeidung der TF-Aktivität bedingt. Da in beiden Versuchsreihen jeweils PDI oder Anti-PDI-Antikörper direkt mit dem Plaquematerial inkubiert wurden, ist davon auszugehen, dass hierbei dem Einfluss von PDI auf den im Lipidkern enthaltenen TF eine entscheidende Rolle zukommt und nicht nur, wie in anderen Arbeiten gezeigt wurde, dem zirkulierenden TF. Unsere Ergebnisse zeigen, dass PDI TF via Redoxreaktionen aktivieren kann. Das schließt jedoch nicht die Möglichkeit aus, dass weitere Mechanismen TF aktivieren können.

PDI wird nicht nur durch aktivierte Thrombozyten freigesetzt, sondern auch bei Schädigung der Gefäßwandzellen.<sup>36</sup> Besonders die Aktivität des MP-assoziierten TF wird durch Thrombozyten sezerniertes PDI gesteigert.<sup>57</sup> In derselben Arbeit wurde beobachtet, dass die Stimulation von MP-assoziiertem TF durch aktivierte Thrombozyten nach Inhibition von PDI gehemmt wird.<sup>36</sup> In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass atherosklerotische PPP-negative Plaques nach Inkubation mit PDI deutlich prokoagulatorisch wirksam sind. Damit wurde eine ähnlich schnelle Fibrinbildung ohne Thrombozyten erreicht, wie sie sonst nur in PRP angetroffen wurde.

Disulfid Isomerasen könnten damit zu Beginn der pathologischen Fibrinbildung die Blutgerinnung triggern. Diese Erkenntnisse könnten Ansätze in der therapeutischen Intervention, Behandlung und Prävention von Erkrankungen ergeben, die durch athe-

rosklerotische Plaques ausgelöst werden, wie Myokardinfarkte und Schlaganfälle.



**Abbildung 23:** Ruptur atherosklerotischer Plaque.

(A) Darstellung eines gesunden Gefäßes.

(B) Dargestellt ist ein atherosklerotischer Plaque, der die Durchblutung nur geringfügig beeinflusst. Nach Jahrzehnte-langer Progression kann es zur Plaque-ruptur kommen.

(C-I) PPP-negativer Plaque ist initial inaktiv; erst durch Kontakt mit aktivierten Thrombozyten aus der Blutstrombahn kann der TF über PDI aktiviert werden (→C-II).

(C-II) PPP-positiver Plaque. Hier ist der TF der im Lipidkern sich befindenden MP bereits aktiv. Die Gerinnungskaskade wird direkt aktiviert.

(D) Als Konsequenz aus C-I und C-II bildet sich ein Thrombus, der das betroffene Gefäß verschließt, wodurch das nachgeschaltete Gewebe ischämisch wird.

#### **4.4 Ausblick**

Erkenntnisse zur Bedeutung von MP und von Plaque-assoziiertem bzw. atherosklerotischem TF für die Thrombogenese nach Ruptur eines Atheroskleroseplaques könnten entscheidend zur Verbesserung der Präventionsmaßnahmen bei Herzinfarkt und Schlaganfall beitragen. So könnte beispielsweise bei Patienten mit PPP-negativen Plaques die Aktivierung des TF durch aktivierte Thrombozyten unterdrückt werden. Für viele Studien zur Entwicklung neuer gerinnungshemmender Medikamente ist TF einer der wichtigsten Ansatzpunkte. In diesem Zusammenhang kann die Kenntnis über die molekulare Pathophysiologie der arteriellen Thrombose und der TF-haltigen Mikropartikel des Lipidkerns dazu beitragen, die komplexen Abläufe in der pathologischen Aktivierung der Blutgerinnung besser zu verstehen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Lipidkern ist ein besonders thrombogener Teil atherosklerotischer Plaques. Wenn der Lipidkern durch Ruptur des Plaques gegenüber dem Blutfluss exponiert wird, bildet sich schnell ein Thrombus, der das betroffene Gefäß verschließen kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass zirkulierende MP beim Start der Blutgerinnungskaskade von Bedeutung sein können. Nach Inkubation der MP mit Anti-TF-Antikörpern kommt es zu einer deutlichen Hemmung ihrer gerinnungsaktivierenden Eigenschaften. Eine besondere Rolle spielen hierbei TF-exponierende monozytäre MP. In der Tat konnte gezeigt werden, dass monozytäre MP die stärkste prokoagulatorische Wirkung nach Stimulation von Blut mit Plaquematerial aufweisen.

Die Exposition des thrombozytären TF ist nach Stimulation mit Lipidextrakten aus dem Atheroskleroseplaque moderat erhöht. Jedoch erweisen sich Thrombozyten in Verbindung mit Plaquematerial als stark thrombogen. Es wird vermutet, dass aktivierte Thrombozyten in der Lage sind, TF im Plaque zu aktivieren. Ein Erklärungsansatz stützt sich dabei auf die Rolle der Thiol Isomerase PDI, die von einer Vielzahl von Zellen sezerniert oder an deren Oberfläche präsentiert wird. Inkubiert man Plaques, die per se die Gerinnungskaskade nur geringfügig beeinflussen, mit PDI, so kommt es zu einer deutlichen Steigerung der prokoagulatorischen Wirkung der Plaques.

Dieser Umstand führt zu der Erkenntnis, dass allein die Anwesenheit von zirkulierenden MP ausreicht, um die komplette Gerinnungskaskade nach durch Plaqueruptur zu aktivieren. Diese Erkenntnisse können von Bedeutung sein für ein weiterführendes Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge bei der Aktivierung der Blutgerinnung durch Atheroskleroseplaques.

## 6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Titelbild – Tissue Faktor im atherosklerotischen Plaque
Abbildung 2	Lipidbilayermembran
Abbildung 3	TF/VIIa-Komplex
Abbildung 4	Blutgerinnungskaskade
Abbildung 5	Neurophile Granulozytenisolation
Abbildung 6	Monozytenisolation
Abbildung 7	TEG
Abbildung 8	Forward scatter/Side scatter im FACS
Abbildung 9	Prinzip der Messung der Faktor Xa- Bildung
Abbildung 10	Fibrinbildungszeit in PPP mit und ohne MP
Abbildung 11	Wirkung der MP auf die Plaqueinduzierte Fibrinbildung im Vollblut
Abbildung 12	Fibrinbildungszeit in PRP mit MP
Abbildung 13	Ersatz von MP, durch MP unterschiedlicher Spezies in PPP
Abbildung 14	PPP-positiven Plaques in VB mit MP unterschiedlichen Ursprungs
Abbildung 15	Von Monozyten abstammenden MP in Vollblut stimuliert mit PPP-negativen Plaques
Abbildung 16	Fibrinbildung bei Anti-TF-behandelten MP
Abbildung 17	FACS Auswertung vor bzw. nach Stimulation der Thrombozyten mit Lipiden aus dem Plaquekern
Abbildung 18	Xa Aktivitätsmessung, Thrombozyten alleine, Plaquematerial alleine, und Thrombozyten mit Plaquematerial inkubiert
Abbildung 19	PPP-negative Plaques in PPP nach Inkubation mit PDI
Abbildung 20	Xa-Aktivität bei Inkubation des Plaque-Thrombozyten-Gemischs mit Antikörpern die gegen PDI
Abbildung 21	PPP negatives Plaques im PPP und Plaque nach Inkubation mit Glutathion im TEG.
Abbildung 22	Balkendiagramm Plaque mit Anti-PDI-Antikörper
Abbildung 23	Atherosklerosplaqueruptur



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Albrecht S, Kotzsch M, Siegert C, Luther T, Grossmann H, Grosser M, Müller M. Detection of circulating tissue factor and factor VII in a normal population. *Thromb Haemost.* 1996;75:772-777.
2. Arnér ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. [Eur J Biochem.](#) 2000;267:6102-9.
3. Bach RR. Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:456-61.
4. Bacon C, Cary N, Davenport A. Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta. *Circ Res.* 1996;79: 794-801.
5. Bénédicte Hugel, M Carmen Martínez, Corinne Kunzelmann and Jean-Marie Freyssinet. Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiol.* 2005;20:22-27.
6. Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, and Zwaal RF. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1439: 317–330.
7. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternative spliced human Tissue Factor: a circulating soluble, thrombogenic protein. *Nat Med.* 2003;9:458-462
8. Braun LT. Cardiovascular disease: strategies for risk assessment and modification. *J Cardiovasc Nurs.* 2006;21:20-45.
9. Broze GJ Jr. Tissue factor pathway of coagulation: factor VII, tissue factor, and tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Hemost.* 1995;74:90-3
10. Camera M, Giesen PL, Fallon J, Aufiero BM, Taubmann M, Tremoli E, Nemerson Y. Cooperation between VEGF and TNF- $\alpha$  is necessary for exposure of active TF on the surface of human endothelial cells. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:531-537.
11. Carmeliet P, Mackam N, Moons L, Luther T, Gressens P, van Valaenderen I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Muller M, Risau W, Edgington T, Collen D. Role of TF in embryonic blood vessel development. *Nature.* 1996;383:73-75
12. Carson SD, Henry WM, Shows TB. Tissue factor gene localized to human chromosome 1 (1pter–1p21). *Science.* 1985;229:991.
13. Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet

- microvesicle generation. *Br J Haematol.* 1997;96:458-63.
14. Cermak J, Kay NS, Bach RR, Bella J, Jacob HS, Vercellotti GM. C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize TF. *Blood.* 1993;82:513-520.
  15. Chamberlain JC, Galton DJ. Genetic susceptibility to atherosclerosis. *Med Bull.* 1990;46:917-40.
  16. Fassio, Sitia R. Formation, isomerisation and reduction of disulphide bonds during protein quality control in the endoplasmic reticulum. *Histochem. Cell Biol.* 2002;117:151– 7.
  17. Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D; Shah PK, Badimon L. Characterization of the reactive thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol.* 1994;23:1562-1569
  18. Frand A.R, Cuozzo J.W, Kaiser C.A. Pathways for protein disulphide bond formation, *Trends Cell Biol.* 2000;10:3 – 10.
  19. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH. Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertens Suppl.* 1992;10:43-50.
  20. Gailani D, Broze GJ Jr Factor XI activation by thrombin and factor Xia. *Semin Thromb Hemost.* 1993;19:396-404.
  21. Gilbert H.F, Lyles M.M. Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer. *Biochem.* 1991;30: 613–619
  22. Gilbert HF, Morjana NA. [Catalysis of protein folding by agarose-immobilized protein disulfide isomerase.](#) *Protein Expr Purif.* 1994;5:144-8.
  23. Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Methods Enzymol.* 1998;290:26–50.
  24. Guha M, Mackmann N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathway and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biochem.* 2002;277:32124-32.
  25. Hegele R.A. Gene-environment interactions in atherosclerosis *Mol Cell Biochem.* 1992;113:177-86.
  26. Helenius A, Quality control in the secretory assembly line, *Philos.Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 2001;356:147–50.
  27. Holme PA, Brosstad F, Solum NO. The difference between platelet and plasma FXIII used to study the mechanism of platelet microvesicle formation. *Thromb Haemost.* 1993;70:681-6.
  28. Hwang C, Sinsky A.J, Lodish H.F. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 1992;257:1496–1502.

29. Kawano H, Tsuji H, Nishimura H, Kimura S, Yano S, Ukimura N, Kunieda Y, Yoshizumi M, Sugano T, Nakagawa K, Masuda H, Sawada S, Nakagawa M. Serotonin induces the expression of TF and plasminogen activator inhibitor-1 in cultured rat aortic endothelial cells. *Blood*. 2001;97:1697-1702.
30. Kienast J, Ostermann H. Blood coagulation and fibrinolysis. *Kardiol*. 1993;82:65-9.
31. Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000;247:349-58.
32. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complications by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and TF. *Circ*. 1997;96:396-399.
33. Mackmann N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human Tissue Factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochem*. 1989;28:1755-1762.
34. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circ*. 1999;99:348-53.
35. Mallika V, Goswami B, Rajappa M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. *Angio*. 2007;58:513-22.
36. Manukyan D, von Bruehl ML, Massberg S, Engelmann B. PDI as a trigger for TF-dependent fibrin generation; *Thrombosis Research* 2008;122:19-22.
37. Meisel SR, Xu XP, Edgington TS, Dimayuga P, Kaul S, Lee S, Fishbein MC, Cercek B, Shah PK. Differentiation of adherent human monocytes into macrophages markedly enhances TF protein expression and procoagulant activity. *Atheroscl*. 2002;161:35-43.
38. Miserez AR, Keller U. Differences in the phenotypic characteristics of subjects with familial defective apolipoprotein B-100 and familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1719-29
39. Misumi K, Ogawa H, Yasue H, Soejima H, Suefuji H, Nishiyama K, Takazoe K, Kugiyama K, Tsuji I, Kumeda K, Nakamura S. Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 1998;81:22-6.
40. Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T et al. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* 1996;88: 3456-64.
41. Miyoshi H, Umeshita K, Sakon M. Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide – induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology* 1996;110:1897-1904.
42. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis

- equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2594-604.
43. Müller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets *FASEB J.* 2003;17:476-8.
  44. Napoleone E, Di Santo A, Lorenzet R. Monocytes upregulate endothelial cell expression of TF: a role for cell-cell contact and cross-talk. *Blood.* 1997;89:541-549.
  45. Nemerson Y, Bach R. Tissue factor revisited. *Prog Hemost Thromb.* 1982;6:237-61.
  46. Neumann F.J, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, Schömig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circ.* 1995;92:748-55.
  47. Ogura H, Kawasaki T, Tanaka H, Koh T, Tanaka R, Ozeki Y, Hosotsubo H, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H. Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis. *J Trauma.* 2001;50:801-9.
  48. Osterud B. The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Semin Hematol.* 2001;38:2-5.
  49. Osterud B., Tissue Factor: A complex biological role. *Thromb Haemost.* 1997;78:755-8.
  50. Ott I, Fischer E.G, Miyai Y, Müller B.M, Ruf W. A role for Tissue Factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280, *Cell Bio.* 1998; 82:938-42.
  51. Petit L, Lesnik P, Datchet C, Moreau M, Chapman M.J. Tissue Factor Pathway Inhibitor is expressed by human monocyte-derived macrophages, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:309-15.
  52. Pitney W, Dacie J. A simple method of studying the generation of thrombin in recalcified plasma. *J Clin Pathol* 1953;6:9.
  53. Pschyrembel 2002;259:126-7.
  54. Pyo R, Sato Y, Mackmann N, Taubman M. Mice deficient in Tissue Factor demonstrate attenuated intima hyperplasia in response to vascular injury and decreased smooth muscle cell migration. *Thromb Haemost.* 2004;92:451-8.
  55. Rapaport S, Rao L. Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Arterioscler Thromb.* 1992;12:1111-21.
  56. Rauch U, Osende J, Fuster V, Badimon J, Fayad Z, Chesebro J. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: Pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 2001;134:224-38.

57. Reinhardt C, von Bruehl M, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, Dlugai S, Hess S, Konrad I, Orschiecht L, Mackman N, Ruddock L, Massberg S, Engelmann B. Protein disulfid Isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest* 2008;118:1110-22.
58. Rulf W, Edgington T. Structural biologie of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J.*1994;8:385-90.
59. Scarpati E, Wen D, Broze G Jr, Miletich J, Flandermeyer R, Siegel N, Sadler J. Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochem.* 1987;26:5234.
60. Schechter A, Giesen P, Taby O, Rosenfield C, Rossikhina M, Fyfe B, Kohtz D, Fallon J, Nemerson Y, Taubmann M. TF expression in human arterial smooth muscle cells: TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation. *J Clin Invest.* 1997;100:2276-85.
61. Scholz T, Temmler U, Lösche W. Platelet-derived mircovesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. *Plat.* 2004;15:109-15
62. Sims P, Faioni E, Wiedmer T, Shattil S. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from platelets surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol chem.* 1988;263:18205-12.
63. Statistisches Bundesamt Deutschland 2004 Todesursachen in Deutschland – 2004;12:4.
64. Steffel J, Akhmedov A, Greutert H, Luscher T, Tanner F. Histamine induces TF expression: implications for acute coronary syndromes. *Circ.* 2005;112:341-9.
65. Steffel J, Hermann M, Greutert H, Gay S, Luscher T, Ruschitzka F, Tanner F. Celecoxib decreases endothelial TF expression through inhibition of c- Jun terminal NH2 kinase phosphorylation. *Circ.* 2005;111:1685-9.
66. Steffel J, Luscher T, Tanner F. Tissue Factor in Cardiovascular Diseases Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Circ.* 2006;113:722-31.
67. Suefuji H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Soejima H, Motoyama T, Mizuno Y, Oshima S, Saito T, Tsuji I, Kumeda K, Kamikubo Y, Nakamura S. Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 1997;134:253-9.
68. Taubman M, Marmur J, Rosenfield C, Guha A, Nichtberger S, Nemerson Y. Agonist-mediated tissue factor expression in cultured vascular smooth muscle cells. Role of Ca<sup>2+</sup> mobilization and protein kinase C activation. *J Clin Invest* 1993;91:547.
69. Thiruvikraman S, Guha A, Roboz J, Taubman M, Nemerson Y, Fallon J. In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin-labeled factors VIIa and X. *Lab Invest.* 1996;75:451-61.

- 
70. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon J, Gertz D, Fernandez-Ortiz A, Chesebro J, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon J. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circ.* 1997;95:594-9.
  71. Turano, S. Coppari, F. Altieri, A. Ferraro. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J. Cell. Physiol.* 2002;193:154-63.
  72. VanWijk M, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticle in cardiovascular diseases. *Cardiovas Res.* 2003;59:277-87.
  73. Warkentin T, Hayward C, Boshkov L, Santos A, Sheppard J, Bode A, Kelton J. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* 1994;84:3691-9
  74. Wilcox J, Smith K, Schwartz S, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:2839.
  75. Wolberg A, Monroe D, Roberts H, Hoffmann M. TF de-encryption: ionophore treatment induces changes in TF activity by phosphatidylserine-dependent and independent mechanisms. *Blood Cagul Fibrinolysis.* 1999;10:201-10.
  76. Wolf P. The nature and significance of platelet in human plasma. *Br J Haematol* 1967;13:269-88.
  77. Zillmann A, Luther T, Müller I, Kotsch M, Spannagel M, Kauke T, Oelschlägel U, Zahler S, Engelmann B Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281:603-9.

## Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Bernd Engelmann für die Betreuung dieser Arbeit sowie den Mitarbeitern des Insituts für Klinische Chemie für die Kooperation.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für die unerschöpfliche emotionale Unterstützung sowie Frau Verena Haringer für die vielen gemeinsam verbrachten Stunden im Labor.