

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

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

Untersuchungen zum Startprozess der thrombusassoziierten Fibrinbildung im Mausmodell

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

vorgelegt von
Lenka Grahl
aus
Frankfurt am Main
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. B. Engelmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr.h.c. W. Schramm

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Dichgans

Priv. Doz. Dr. N. Weiss

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2007

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	3
I.1 Die Bedeutung von Tiermodellen für die Erforschung pathophysiologischer Mechanismen	3
I.1.1 Mutagenese-Strategien.....	3
I.2 Physiologische Thrombusbildung	4
I.3 Pathophysiologische Thrombusbildung	7
I.4 Die Bedeutung von Neutrophilen für die Thrombusbildung im intakten Organismus.	8
I.5 Die Rolle der Mikropartikel bei der Thrombusbildung	9
I.6 Regulierungsmechanismen des Gerinnungsstartes in vivo	10
I.7 Mausmodelle der Thrombose/Hämostase	11
I.8 Zielsetzung der Arbeit	12
II. Material und Methoden	13
II.1 Material	13
II.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	13
II.1.2 Chemikalien	14
II.1.3 Antikörper	16
II.1.4 Bakterienkultur.....	16
II.1.5 Pufferlösungen	16
II.2 Methoden	18
II.2.1 Mausmodell der arteriellen Thrombose.....	18
II.2.2 ENU-Screen der Hämostase.....	26
II.2.3 Blutabnahme	30
II.2.4 Primärzellisolierungen	30
II.2.5 Funktionelle Assays	32
II.2.6 Proteinchemische Methoden	35
III. Ergebnisse	38
III.1 Regulierungsmechanismen des Gerinnungsstartes im Mausmodell	38
III.1.1 Die Rolle von Neutrophilen für die arterielle Thrombusbildung in vivo	38

Inhaltsverzeichnis	2
<hr/>	
III.1.2	Der Einfluss von Mikropartikeln auf die Fibrinbildung 45
III.1.3	Regulierung der Fibrinbildung durch Thiol-Isomerasen 47
III.2	ENU-Screen der Thrombose/Hämostase 55
III.2.1	Primärscreen 55
III.2.2	Vererbbarkeit des veränderten Phänotyps 57
III.2.3	Linie LHE004 59
IV.	<i>Diskussion</i> 62
IV.1	Mausmodelle der arteriellen Thrombose 62
IV.2	Die Bedeutung von Serinproteasen für die Thrombusbildung 62
IV.2.1	Blutungszeit/Okklusionszeit in GECG ^{-/-} -Tieren 63
IV.2.2	Reduzierte Fibrinbildung in GECG ^{-/-} -Tieren 63
IV.2.3	Regulierung der in vivo Thrombusbildung durch TFPI 64
IV.3	Die Rolle von Mikropartikeln für die Thrombusbildung in vivo 66
IV.4	Der Einfluss von Thiol-Isomerasen auf die Fibrinbildung 68
IV.4.1	PDI-Aktivität in vivo 68
IV.4.2	Endogenes PDI reguliert die TF-abhängige Fibrinbildung in vivo 68
IV.4.3	Mechanismen der TF-Regulation durch PDI 69
IV.5	ENU-Screen der Hämostase 70
V.	<i>Appendix</i> 72
VI.	<i>Zusammenfassung</i> 73
VII.	<i>Summary</i> 74
VIII.	<i>Abkürzungen</i> 75
IX.	<i>Literaturverzeichnis</i> 77
X.	<i>Danksagung</i> 93
XI.	<i>Curriculum Vitae</i> 94

I. Einleitung

I.1 Die Bedeutung von Tiermodellen für die Erforschung pathophysiologischer Mechanismen

Modellorganismen wie die Maus (*Mus musculus*) und der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) sind für die Untersuchung universaler, biologischer Vorgänge von besonderer Bedeutung. Neue Erkenntnisse über die Pathophysiologie menschlicher Erkrankungen, die essentiell für die Prävention, Diagnostik und Therapie dieser Erkrankungen sind, können aus ethischen Gründen oftmals nur im Tiermodell gewonnen werden. Für etwa 99% der Mausgene existiert ein homologes Gen im humanen Genom (Waterston *et al.* 2002). Daher eignen sich im Besonderen Mäuse zur Erforschung der Pathomechanismen menschlicher Erkrankungen. Hierfür ist u.a. die gezielte Erforschung von Genfunktionen notwendig. Untersuchungen an mutanten Tieren stellen in diesem Zusammenhang ein wertvolles Werkzeug für die Analyse der Funktionen von Genen dar. Die Anzahl bekannter mutierter Genloci beträgt bislang jedoch lediglich 1-2% aller Mausgene (phenotype gap) (Brown *et al.* 1996; Hrabe de Angelis *et al.* 2001). Die Generierung von Mutanten bezüglich verschiedener Genloci ermöglichen somit die Entdeckung und Erforschung weiterer, bisher unbekannter Genfunktionen.

I.1.1 Mutagenese-Strategien

Die Funktionen eines Gens lassen sich prinzipiell durch unterschiedliche experimentelle Ansätze untersuchen. In der klassischen Genetik (forward genetics) werden Mutationen entweder physikalisch oder mittels chemischer Mutagene in der Keimbahn von Modellorganismen induziert (Silver 1995). Die Nachkommen dieser Tiere werden auf ihren Phänotypen hin untersucht. Anschließend wird durch gezielte Verpaarung die Vererbbarkeit des Phänotyps geprüft. Danach erfolgt die Lokalisation der ursächlichen Mutation, z.B. mittels Kopplungsanalyse. Im anderen Fall (reverse genetics) werden definierte Regionen eines Gens inaktiviert bzw. variiert und nachfolgend die Auswirkungen auf den Phänotyp untersucht. Für die Veränderungen in den entsprechenden DNA-Abschnitten stehen gegenwärtig verschiedene Methoden, wie z.B. die zielgerichtete Mutagenese sowie die Generierung transgener Organismen zur Verfügung (Capecchi 2005).

Nach dem derzeitigen Stand der Forschung stellt das von L. Russell eingeführte Mutagen N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) die effizienteste Methode der chemischen Mutagenese in der Maus dar. Die erzielten Mutationsraten liegen mit 150×10^{-5} pro Locus fünfmal höher als die wirkungsvollste Röntgenbestrahlung. Spontane Mutationen treten hingegen lediglich mit einer Frequenz von 5×10^{-6} pro Locus auf (Russell *et al.* 1979). Der ENU-vermittelte Transfer einer Ethylgruppe auf Sauerstoff- bzw. Stickstoffatome in der DNA führt zu einer Fehlerkennung und Fehlverpaarung während der nachfolgenden DNA-Replikation (Justice 2000; Noveroske *et al.* 2000). Infolgedessen entstehen über das gesamte Genom randomisiert verteilte Punktmutationen. Die durch ENU induzierte Mutationsrate ist in Spermato gonien am höchsten. Sie hängt u.a. auch von der Dosierung sowie von dem verwendeten Mausinzuchtstamm ab (Justice *et al.* 2000).

Die Generierung von Mutanten mittels ENU-Mutagenese zur Erforschung krankheitsrelevanter vererbbarer Phänotypen wird gegenwärtig weltweit angewandt. Genomweite Screens nach neuen Genen sowie neuen Funktionen bereits bekannter Gene erfolgen derzeit in unterschiedlichen Modellorganismen. Interessante Phänotypen der Hämostase bzw. Thrombose konnten mit Hilfe dieser Technologie bereits in Zebrafischen (Jagadeeswaran *et al.* 2000) aufgedeckt werden. In Mäusen sind ENU-Screens auf spezifisch sensitiviertem Hintergrund bekannt (Carpinelli *et al.* 2004; Ginsburg 2005). Diese Screens werden zum Identifizieren von Modifizierungsgenen (modifier genes) in bereits vorliegenden vererbaren thrombotischen Erkrankungen angewandt und befassen sich nicht mit veränderten Phänotypen, die aus primären Gendefekten resultieren. ENU-Screens, in denen die Blutgerinnungsfähigkeit der Tiere untersucht wird, sind in diesem Zusammenhang bislang nicht bekannt. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir seit 2003 erstmals einen Hämostasescreen in der Maus etablieren, in dem hämostatische Parameter in mutagenisierten Tieren analysiert werden.

I.2 Physiologische Thrombusbildung

Die bereits vor 150 Jahren von R. Virchow postulierte Trias zur Entstehung von Thrombosen, bestehend aus Gefäßwandveränderungen, Störungen der Hämodynamik und Änderungen der Blutzusammensetzung (Virchow 1856), besitzt nach wie vor prinzipielle Gültigkeit. Schädigungen von Gefäßwänden entstehen vor allem durch atherosklerotische Ablagerungen, aber auch durch Entzündungen der Gefäße und Gefäßverletzungen. Sie sind daher vor allem

für die Bildung arterieller Thrombosen von Bedeutung. Die Verlangsamung der Blutströmung bis hin zur Stase spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung venöser Thrombosen. Ferner begünstigen Wirbelbildungen die Thrombusbildung. Änderungen der Blutzusammensetzung, wie von Konzentrationen plasmatischer Gerinnungsfaktoren (z.B. Faktor V Leiden) fördern unter anderem die venöse Thrombose.

Gefäßwände von Arterien und Venen besitzen eine dreischichtige Wandstruktur. Sie sind zum Lumen hin mit einschichtigem Endothel ausgekleidet, auf dem die subendotheliale Basalmembran sowie eine dünne Membran aufsitzt (Membrana elastica interna). An diese erste Schicht (Tunica Intima) schließt die Tunica Media an, die aus mehreren Lagen glatter Muskelzellen sowie elastischen und kollagenen Fasern besteht. Abgeschlossen wird die Tunica Media wiederum durch eine dünne Membran (Membrana elastica externa). Die äußerste Schicht der Gefäßwand (Tunica adventitia) dient der Verankerung des Gefäßes in seiner Umgebung und enthält einen hohen Anteil an elastischen und kollagenen Fibrillen. Die Gefäßwand wird durch sympathische Nervenfasern innerviert, deren Endigungen in der Tunica adventitia münden. In dieser Schicht befinden sich zudem Fibroblasten.

Ziel des Hämostasesystems ist eine effiziente Blutstillung bei Erhaltung des Blutflusses. Die Gefäßwand ist neben den Thrombozyten und den plasmatischen Gerinnungsfaktoren wichtiger Bestandteil dieses Systems. Das intakte Gefäß verfügt über antithrombotische und prokoagulatorische Mediatorsysteme. Unverletztes Endothel verhindert die Thrombusbildung u.a. durch die Sekretion von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI₂), die die Thrombozytenadhäsion und -aggregation hemmen und deren Kontakt mit dem Endothel verhindern. Desweiteren existieren drei wichtige Inhibitorsysteme der Gerinnung (Doshi *et al.* 2002). Die Bindung von Thrombin an endotheliales Thrombomodulin aktiviert Protein C und seinen Cofaktor Protein S und führt zur Spaltung und Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren V und VIII. Heparansulfate und Glykosaminoglykane des Endothels vermitteln die Aktivität von Antithrombin III. Dieses bildet einen 1:1-Komplex mit Thrombin sowie Prothrombin, FIX und FX und inaktiviert diese dadurch. Der dritte endogene Inhibitor der Gerinnung ist Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI). Er bindet zunächst an FXa und bildet dann mit TF/FVIIa/FXa einen inhibierenden quaternären Komplex (Broze 1995). TFPI greift demnach zu einem sehr frühen Zeitpunkt in die Gerinnungskaskade ein (Abb. 1) und stellt daher den wichtigsten Inhibitor der Tissue Factor (TF)-abhängigen Gerinnung *in vivo* dar.

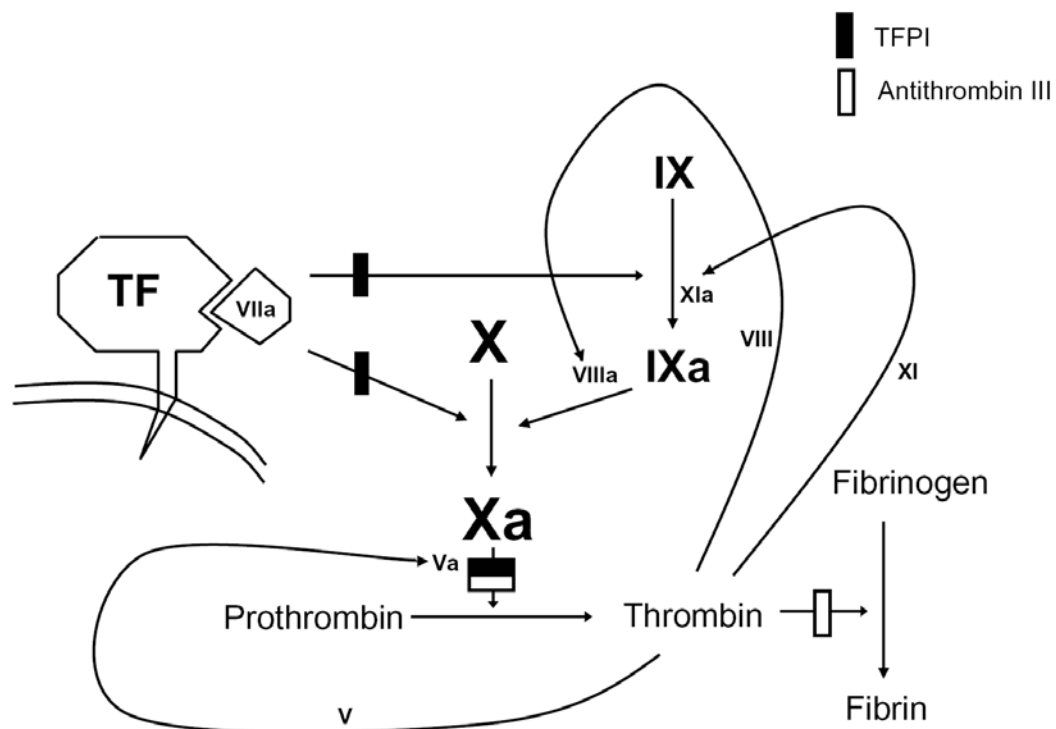


Abb. 1 Schematische Darstellung der Gerinnung (modifiziert nach Doshi *et al.* 2002)
 Die Gerinnung wird durch den TF/FVIIa –Komplex gestartet. Die nachfolgende Aktivierung des Gerinnungsfaktors X führt über die Prothrombinspaltung zur Fibrinbildung. Drei positive Rückkopplungsmechanismen sorgen für eine Amplifikation der Fibrinbildung. Die endogenen Inhibitoren TFPI und Antithrombin III sind ebenfalls eingezeichnet.

Die Hämostase wird nur dann gestartet, wenn es durch eine Schädigung der Endothelbarriere zur Freilegung der extrazellulären Matrix kommt. Hierdurch kommt es zur Bindung von von Willebrand Faktor (vWF) an subendotheliales Kollagen sowie an den GPIb-V-IX-Rezeptorkomplex von Thrombozyten. Dadurch wird die primäre Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand vermittelt. Die Sekretion von verschiedenen Speicherstoffen wie ADP und Thromboxan A₂ (TXA₂) führt zur Rekrutierung weiterer Plättchen. Schließlich kommt es durch Vernetzung der Plättchen mittels Fibrinogenbrücken zu deren Aggregation (Gawaz 2001). Gleichzeitig tritt das zentrale Starterprotein der Gerinnung TF, der bevorzugt in der Adventitia lokalisiert ist, mit dem Blutgerinnungsfaktor FVIIa in Kontakt und bildet den zentralen Initiator-Komplex der Gerinnung. Dieser vermittelt über eine Reihe kaskadenähnlicher Reaktionen (Abb. 1) die Bildung von Fibrin. Aktivierte Thrombozyten präsentieren Phosphatidylserin auf ihrer Membran und bieten damit die für die Gerinnung

notwendige prokoagulatorische Oberfläche. Das gebildete Fibrin ermöglicht eine Stabilisierung des entstehenden Plättchenthrombus.

I.3 Pathophysiologische Thrombusbildung

Arterielle Thrombosen entstehen vorwiegend auf dem Boden atherosklerotischer Wandveränderungen. Dabei wird davon ausgegangen, dass eine Dysfunktion des Endothels zentraler Auslöser der arteriellen Wandveränderungen ist (Libby 2002). Atherosklerotischer Umbau der Gefäßwände tritt vor allem an Gefäßaufzweigungen und Stellen mit turbulenten Strömungen auf. Die Folgen sind eine erhöhte Permeabilität des Gefäßes und ein damit verbundener Einstrom von LDL-Partikeln in die Intima. Innerhalb der Gefäßwände werden die LDL-Partikel chemisch modifiziert (z.B. durch Oxidation) und stimulieren die Expression von Adhäsionsmolekülen und chemoattraktiven Substanzen. Folglich docken Monozyten an das Endothel an, transmigrieren in die Intima und werden in Makrophagen transformiert. Über Scavenger-Rezeptoren sind diese in der Lage modifizierte LDL-Partikel aufzunehmen und in Schaumzellen zu differenzieren. Schließlich bilden sich atherosklerotische Plaques, die hauptsächlich aus einem nekrotischen Kern aus Lipiden und Zelldebris bestehen. Dieser nekrotische Kern wird nur durch eine fibröse Kappe von dem Blutstrom getrennt. Durch die Freisetzung proteolytischer Enzyme (Kollagenasen, Gelatinasen etc.) kommt es zur Matrixdegradation, wodurch die fibröse Kappe aufgerissen werden kann. Damit kann eine Plaqueruptur induziert werden, die zu einer schnellen Adhäsion von Thrombozyten führt (Penz *et al.* 2005). Da der nekrotische Kern von Plaques auch reich an TF ist (Libby 2002; Mallat *et al.* 1999; Migdalski *et al.* 2005; Toschi *et al.* 1997) wird gleichzeitig die Blutgerinnung aktiviert (Abb. 1). Der so gebildete Thrombus (Abscheidungsthrombus) ist thrombozytenreich und haftet der Gefäßwand fest an. Er besteht aus einem Fibrinnetzwerk, in das neben Plättchen auch Erythrozyten und Leukozyten inkorporiert sind.

Die venöse Thrombogenese unterscheidet sich grundlegend von der arteriellen Thrombogenese. Da genetisch bedingte Gerinnungsstörungen (primäre Risikofaktoren) und erworbene (sekundäre) Risikofaktoren meist simultan auftreten, spricht man bei der venösen Thrombose von einer multifaktoriellen Erkrankung (Rosendaal 1999). Venöse Thromben bilden sich bevorzugt an Stellen mit geringen Fließgeschwindigkeiten. Meist sind die Beine und das Becken betroffen. Die Stase, hervorgerufen durch Bewegungsunfähigkeit z.B. nach Operationen, langen Reisen, aber auch durch Krebserkrankungen spielt eine zentrale Rolle bei

der Entstehung von venösen Thrombosen. Die meist parallel auftretende verstärkte Gerinnungsneigung kann neben genetischen Erkrankungen (u.a. Faktor V Mutation) auch durch Schwangerschaft, orale Kontrazeptiva und Thrombophilien hervorgerufen sein (Kroegel *et al.* 2003; Mammen 1992). Die molekularen Mechanismen der venösen Thrombosen sind noch weitgehend ungeklärt. Venöse Thromben bestehen vor allem aus Fibrin und Erythrozyten mit variierenden Mengen an Leukozyten und verhältnismäßig wenigen Thrombozyten.

I.4 Die Bedeutung von Neutrophilen für die Thrombusbildung im intakten Organismus

Neutrophile Granulozyten spielen eine zentrale Rolle in Entzündungsprozessen, indem sie Pathogene phagozytieren und unschädlich machen. Neutrophile binden unter Fluss bevorzugt an Stellen turbulenter Strömung (Gefäßaufzweigungen) sowie an atherosklerotische Bereiche des Endothels (McEver 2001). Desweiteren adhären sie an aktivierte Thrombozyten, werden dabei selbst aktiviert und sezernieren chemoattraktive Substanzen, wodurch weitere Zellen rekrutiert und das Thrombuswachstum gefördert wird. Der initiale Kontakt (tethering) findet über den thrombozytären P-Selektin-Rezeptor statt, der nach Aktivierung zur Plättchenoberfläche transloziert wird. P-Selektin interagiert mit dem leukozytären Liganden PSGL-1 (Zarbock *et al.* 2006). Danach wird eine stabile Adhäsion (firm adhesion) über eine Fibrinogenbindung zwischen dem GPIIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozyten und dem leukozytären CD11b/CD18 (Mac-1)-Rezeptor vermittelt (Falanga *et al.* 2005). Neben diesen Adhäsionsmolekülen sind noch weitere Proteine an der Plättchen-Neutrophilen-Interaktion beteiligt, wie z.B. der Plättchenrezeptor CD40L und sein Bindungspartner, der leukozytäre CD40-Rezeptor. Leukozyten-Thrombozytenaggregate sind im akuten Koronarsyndrom erhöht (Furman *et al.* 2001; Ott *et al.* 1996) und werden als frühe Marker für diese Erkrankungen diskutiert.

Aktivierte Neutrophile sezernieren in azurophilen Granula gespeicherte Serinproteasen, unter anderem Cathepsin G (CG) und Elastase (GE). Diese liegen in aktiver Form vor und besitzen eine Vielzahl biologischer Aktivitäten, wie z.B. die Degradation von Matrixmolekülen (u.a. Elastin, Kollagen), die Induktion der Cytokin- und Chemokinsekretion und die Spaltung von Plasmaproteinen (Owen *et al.* 1999). Ferner sind sie in der Lage Inhibitoren des

Blutgerinnungssystemen, wie Protein C, Protein S und TFPI proteolytisch zu spalten (Falanga *et al.* 2005). CG ist zudem ein Thrombozytenagonist (Evangelista *et al.* 1993). Die Aktivierung von Neutrophilen führt ferner zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und verstärkt dadurch die Plättchenaktivierung (Li *et al.* 2000).

I.5 Die Rolle der Mikropartikel bei der Thrombusbildung

Mikropartikel sind exozytische Freisetzungserzeugnisse der Zellmembran mit einem Durchmesser von 100-800nm, die wohl von allen Zellen des Gefäßsystems, u.a. Thrombozyten, Endothelzellen, vSMC, Leukozyten und Erythrozyten abgeschnürt werden können. Sie entstehen durch Zellaktivierung, Apoptose sowie mechanischen Stress. Daher verfügen sie vermutlich über dieselben Oberflächenantigene wie ihre aktivierten Ursprungszellen (VanWijk *et al.* 2003). Es wird angenommen, dass die Vesikel aus lipidreichen Mikrodomänen (rafts) der Membran entstehen (Del Conde *et al.* 2005; Hugel *et al.* 2005). Bei den Mikropartikeln handelt es sich um eine erst vor kurzem entdeckte physiologische Blutkomponente. In Patienten mit akuten koronaren Herzerkrankungen (Bernal-Mizrachi *et al.* 2004; Biro *et al.* 2003; Mallat *et al.* 2000), Sepsis (Nieuwland *et al.* 2000) und einer Reihe weiterer Erkrankungen wurden erhöhte Mikropartikelspiegel festgestellt.

Mikropartikel weisen Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche auf und bieten somit eine prokoagulatorische Oberfläche für die beiden wichtigen Enzymkomplexe der Blutgerinnung, den Tenase- (FVIIIa, FIXa, FX, PS) und den Prothrombinase-Komplex (FVa, FXa, FII, PS) (Zwaal *et al.* 1997). Zudem präsentieren sie eine Reihe prothrombogener und proinflammatorischer Oberflächenmoleküle (Diamant *et al.* 2004; Jimenez *et al.* 2003). Aufgrund dessen besitzen sie ein hohes Adhäsionspotential und gehen leicht Interaktionen mit anderen Blutzellen ein, u.a. mit Neutrophilen (Ahn *et al.* 2004; Jy *et al.* 1995), Thrombozyten (Del Conde *et al.* 2005) und Erythrozyten (Gasser *et al.* 2005). Sie können zudem als Vermittler von Adhäsionsprozessen zwischen Leukozyten (Forlow *et al.* 2000) sowie zwischen Leukozyten und dem Endothel (Barry *et al.* 1998) fungieren. Mikropartikel präsentieren zahlreiche für die Hämostase relevante Rezeptoren und Effektoren, wie Selektine, vWF, GPIIb/IIIa, GPIb, TXA₂, Arachidonsäure etc. sowie TF (Muller *et al.* 2003) auf ihrer Oberfläche. Auf der anderen Seite exprimieren sie auch antikoagulatorische Proteine, wie z.B. TFPI (Steppich *et al.* 2005) und Protein C (Satta *et al.* 1994). Die

Charakterisierung einzelner Mikropartikelpopulationen ist gegenwärtig noch unvollständig. Das prokoagulatorische Potential verschiedener Mikropartikelpopulationen wird vor allem auf TF zurückgeführt (Berckmans *et al.* 2001; Biro *et al.* 2003; Muller *et al.* 2003). Die Relevanz TF-positiver Mikropartikel für die Fibrinbildung *in vivo* wird bislang noch kontrovers diskutiert (Chou *et al.* 2004; Day *et al.* 2004).

I.6 Regulierungsmechanismen des Gerinnungsstartes *in vivo*

TF ist das zentrale Starterprotein der Gerinnung und unterliegt daher zahlreichen Regulierungsmechanismen. Die TF-Expression variiert zwischen einzelnen Organen. Die Organe Hirn, Lunge, Herz, Niere, Haut, Plazenta, Gebärmutter und Hoden weisen hohe TF-Spiegel auf, während die Expression in Milz, Leber und Skelettmuskeln vergleichsweise gering ist (Pawlinski *et al.* 2004). Diese Verbreitung spricht für die lebenswichtige Schutzfunktion von TF. Menschen mit TF-Defizienz sind bisher nicht beschrieben, was ebenfalls eine essentielle Bedeutung des Proteins nahelegt. In Mäusen ist das vollständige Ausschalten des TF-Gens während der frühen Embryonalstadien letal, ebenso wie eine Defizienz an dem Gegenspieler TFPI (Carmeliet *et al.* 1996; Westrick *et al.* 2001). Geringe Expressionslevel (ca. 1 %) an TF sind allerdings mit dem Leben vereinbar (Parry *et al.* 1998).

Das 47kDa große TF-Protein wird im intakten Gefäß konstitutiv in Zellen der Adventitia (u.a. in Fibroblasten) exprimiert. Die Media weist nur geringe Level an TF auf, während im ruhenden Endothel kein TF exprimiert wird (Eilertsen *et al.* 2004). So ist sichergestellt, dass es ausschließlich nach Verlust der Endothelbarriere zur Bildung des TF/FVIIa-Komplexes kommt. Bislang wurde davon ausgegangen, dass Blutzellen unter physiologischen Bedingungen keinen TF aufweisen, die TF-Expression jedoch in Monozyten und in Endothelzellen unter pathologischen Umständen, wie z.B. Sepsis induziert wird. Neuere Befunde weisen aber darauf hin, dass Thrombozyten und Eosinophile einen intrazellulären Pool von TF darstellen (Moosbauer *et al.* 2007; Muller *et al.* 2003; Zillmann *et al.* 2001).

Die Existenz eines intravaskulären TF im Blutplasma unter physiologischen Bedingungen wurde erstmals 1996 (Albrecht *et al.* 1996) postuliert und ist inzwischen mehrfach bestätigt worden. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass plasmatischer TF zu einem Großteil mit Mikropartikeln assoziiert ist (Muller *et al.* 2003). Die prokoagulatorische Aktivität dieser Mikropartikel ist jedoch nur begrenzt. Anderen Befunden zufolge existiert

zudem eine lösliche, alternativ gespleißte Form des TF im Plasma (Bogdanov *et al.* 2003), die wahrscheinlich jedoch nicht zur FVII-abhängigen Thrombinbildung befähigt ist (Censarek *et al.* 2007).

Die Regulierungsmechanismen, die den inaktiven TF (encrypted) in Blutzellen und Mikropartikel in die prokoagulatorische Form umwandeln sind noch weitgehend ungeklärt. In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass Interaktionen mit anderen Zellen hierfür notwendig sind (Engelmann *et al.* 2003). Desweiteren wird die Umverteilung von TF aus lipidreichen Domänen der Membran diskutiert (Bach 2006). Auch könnten Thiol-Modifikationen von TF-Cysteinen an der Aktivierung des Gerinnungsstartes beteiligt sein.

Disulfidbindungen stabilisieren die native Konformation von Proteinen in einer fluktuierenden Umwelt und schützen sie vor schädlichen Einflüssen (Jordan *et al.* 2006). Es gibt Hinweise, dass sie zudem eine regulierende Wirkung auf die Proteinfunktion ausüben können (Hogg 2003; Schmidt *et al.* 2006). Das TF-Molekül besteht aus einer kurzen cytoplasmatischen (AS 243-263), einer transmembranen (AS 220-242) und einer langen extrazellulären (AS 1-219) Domäne. In der extrazellulären Domäne befinden sich zwei Paare von Cysteinen [(Cys186/Cys209) und (Cys49/57)], die Disulfidbrücken ausbilden können. Die Substitution der beiden membranproximalen Cysteine führt zu erheblichen Beeinträchtigungen der prokoagulatorischen Aktivität von TF (Rehemtulla *et al.* 1991).

I.7 Mausmodelle der Thrombose/Hämostase

Koronare Herzerkrankungen sind laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Haupttodesursache in den westlichen Industrienationen. Sie entstehen nach Plaqueruptur, die zur Adhäsion von Thrombozyten sowie nachfolgend zur Aktivierung der Blutgerinnung und schließlich zur Entwicklung einer arteriellen Thrombose führt. Die Erforschung der Pathogenese von Thrombosen bzw. der Mechanismen der physiologischen Blutgerinnung/Blutstillung (Hämostase) sind daher für die Anwendung vorbeugender und therapeutischer Maßnahmen unerlässlich. Das Hämostasesystem der Maus ist in vielerlei Hinsicht (vergleichbare Ausstattung hämostatisch wirksamer Proteine, ähnliche Zusammensetzung an Blutzellen etc.) mit den Bedingungen im Menschen vergleichbar (Tsakiris *et al.* 1999). Eine steigende Anzahl genetischer Mausmodelle der Hämostase (Hogan *et al.* 2002) ermöglicht die gezielte Analyse von Proteinfunktionen. Auf dieser Basis

wurde in jüngster Zeit z.B. die Bedeutsamkeit des zentralen Gerinnungsstarters TF (Falati *et al.* 2003), des Glykoproteins VI (Gruner *et al.* 2004; Massberg *et al.* 2003) sowie des plasmatischen Gerinnungsfaktors FXII (Renne *et al.* 2005) für die Thrombusbildung *in vivo* aufgedeckt.

Der parallel zur gentechnologischen Entwicklung verlaufende Fortschritt in der Entwicklung von neueren *in vivo* Modellen der Thrombusbildung (Day *et al.* 2004; Furie *et al.* 2005; Napoli *et al.* 2006) trägt zudem entscheidend zur Aufklärung der Entstehung von Thrombosen im menschlichen Organismus bei. Eines der gebräuchlichsten Modelle zur Induktion der arteriellen Thrombusbildung ist die chemische Endothelschädigung mittels FeCl₃-Applikation (Kurz *et al.* 1990). Die Reproduzierbarkeit und die Vergleichbarkeit der Thrombuszusammensetzung mit humanen arteriellen Thromben (Farrehi *et al.* 1998) bilden die entscheidenden Vorteile dieser Methode. Eine breite Anwendung finden zudem mechanische Verletzungsmodelle (Ligatur, Denudation) (Le Menn *et al.* 1981) und die Thrombusinduktion mittels Laserimpuls (Rosen *et al.* 2001).

I.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es zum einen die Mechanismen des TF-abhängigen Gerinnungsstartes während der arteriellen Thrombogenese im intakten Organismus aufzudecken. In diesem Zusammenhang sind sowohl die beteiligten zellulären Komponenten als auch Modifikationen des TF-Proteins selbst von Interesse. In einem weiteren Teil der Arbeit wurden mittels genomweiter Mutagenese neue Mausmodelle der Hämostase entwickelt, mit denen neue an der Blutgerinnung beteiligte Gene identifiziert werden sollen. Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Wie beeinflussen Neutrophilen die arterielle Thrombogenese *in vivo*? Welche molekularen Mechanismen vermitteln ihre Funktion während der Thrombusbildung?
- Beeinflussen Mikropartikel die Fibrinbildung *in vivo*? Über welchen Mechanismus?
- Welche Bedeutung haben posttranslationale Modifikationen von TF-Cysteinen für den Gerinnungsstart *in vivo*?
- Lassen sich mittels ENU-Mutagenese Mausmutanten der Hämostase generieren?
- Sind diese Mutationen stabil ins Genom integriert?

II. Material und Methoden

II.1 Material

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Merck (Darmstadt) bezogen.

II.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bakterienschüttler Certomat R HK	Braun (Melsungen)
Chromatographiesäulen	BioRad (München)
Decavetten	Trinity Biotech (Darmstadt)
Desalt Spin Columns	Pierce (Rockford, IL, USA)
Dialysierschlauch (MW 8.000-10.000)	Roth (Karlsruhe)
Durchflusszytometer	Beckman Coulter Epics XL (Krefeld)
Elektrophoresekammer Mini Trans-Blot	BioRad (München)
ELISA Reader Dynatech MR7000	Dynatech Laboratories (Alexandria, USA)
Feinwaage SBC 21	Scaltec (Heiligenstadt)
Gelelektrophoresekammer Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad (München)
Kapillaren 32mm, nicht heparinisiert	Laborteam K&K (München)
Kugelcoagulometer KC 4A	Amelung (Lemgo)
Lichtmikroskop Axiovert100	Zeiss (Jena)
microbeads CD14 und CD15-Antikörper	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
Mikrodialysierkapsel QuixSep	Roth (Karlsruhe)
MiniCycler	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Mini-MACS-Trennsäulen	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
pH-Meter	Hanna Instruments (Kehl a. Rhein)
Photometer	Spectra Rainbow TECAN (Crailsheim)

Ready Gels 7.5% Tris-HCl	BioRad (München)
Schüttler Typ KS 250 basic	IKA-Labortechnik (Staufen)
Spritzenfilter 0.2µm	Roth (Karlsruhe)
Tetraspeck microspheres 0.1µm	Molecular Probes (Eugene USA)
Thrombelastograph RoTEG	Dynabyte (München)
Ultraschallgerät Branson Sonifier Cell Disrupter B-15	Heinemann (Schwäbisch Gmünd)
Ultrazentrifuge L8 60M	Beckman (München)
Vortex Genie-2	Scientific Industries (Bohemia/NY, USA)
WaageMC1 LC 620 S	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad GFL 1083	Amersham-Buchler (Braunschweig)
Zentrifugen: Rotina 35R, Mikro 22R	Hettich (Tuttlingen)

II.1.2 Chemikalien

1kb DNA-Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
4-Hydroxy-Azo-Benzyl-2-Carboxylsäure (HABA)	IBA (Göttingen)
10x-PCR-Puffer	Promega (Mannheim)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Alexa488	Invitrogen (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma (Deisenhofen)
Anhydrotetrazyklin	IBA (Göttingen)
BSA Bovines Serum Albumin	Roth (Karlsruhe)
CaCl ₂ -Lösung 0.025mol/l	Dade Behring (Marburg)
Citrat aus S-Monovetten 9NC/PFA	Sarstedt (Nümbrecht)
DCF 5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester	Invitrogen (Karlsruhe)

Dc Protein Assay Reagenz A und B	BioRad (München)
Desthiobiotin	IBA (Göttingen)
Dextran T500 (MW 500000)	Roth (Karlsruhe)
5,5-Dithio-bis- 2-Nitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma (Deisenhofen)
DNase I	Sigma (Deisenhofen)
dNTP-Mix	Invitrogen (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Life Technologies Inc. (Eggenstein)
Fentanyl	CuraMed Pharma (Karlsruhe)
Ficoll-Paque Plus (Dichte 1.077g/ml)	Amersham Biosciences (Freiburg)
Gerinnungsfaktor VIIa, human	NovoNordisk (Bagsvaerd, Dänemark)
Gerinnungsfaktor X, human	Calbiochem (Schwalbach)
Imidazol	Roth (Karlsruhe)
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Roth (Karlsruhe)
Korntrypsininhibitor	Calbiochem (Schwalbach)
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma (Deisenhofen)
Medetomidin	Pfizer (Karlsruhe)
Midazolam	Ratiopharm (Ulm)
Molekulargewichtsmarker Pageruler Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas (St. Leon-Rot)
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen (Hilden)
Prefakit in -TDT	Pentapharm LTD (Basel, Schweiz)
Proteinase K	Boehringer (Mannheim)
RekombiPlasTin	Instrumentation Laboratory GmbH (Möln dal Schweden)
Strep-Tactin- Superflow Resin	IBA (Göttingen)
S-2222	Haemochrom Diagnostica (Essen)
Taq-DNA-Polymerase	Promega (Mannheim)

II.1.3 Antikörper

anti-fibrin II β chain (B β 15-42), Clone T2G1	Accurate Chemical (Westbury, NY, USA)
mouse IgG2a (M5409)	Sigma (Deisenhofen)
anti-PDI, Clone RL90	Affinity BioReagents (Golden, CO, USA.)
anti-rat IgG2a (R0761)	Sigma (Deisenhofen)
Maus-anti-Human TF VIC7	PD Dr. Thomas Luther (TU Dresden)
Maus IgG1 Isotyp Kontrolle M5284	Sigma (Deisenhofen)

II.1.4 Bakterienkultur

Bakterienstamm Escherichia coli BL21 Invitrogen (Karlsruhe)

Plasmide	TFPI wt, TFPI T87F/L89A	Bidzhekov, K.
	PDI wt, PDI Δ C _{1,2}	Winter, J.

Primer:

Cathepsin G locus

CGwt rev 5'-TTAGGACGAAGTCTTCTCGC-3'
 CG6s 5'-ACAAAGGTCTGGGAAGGAGACG-3'
 CG7as 5'-CAGGATTGAAGGGATGGAGACCTG-3'

Elastase locus

mel135F 5'-CATGACACCCCCACTGTCCTGTCC-3'
 mel54r 5'-CAATGCCAGTAGCATGGCAGCCAG-3'
 cre1r 5'-CAGGTAATCTCTCACATCCTCAGG-3'

Alle Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

II.1.5 Pufferlösungen

Antikörperpuffer	5mM EDTA, 0.5% BSA; in PBS pH 7.4
DNA-Auftragspuffer	50% Saccharose, 0.25%Bromphenolblau
Coomassiefärbelösung	150ml Methanol, 140ml H ₂ O, 30ml Eisessig, 0.33g Coomassie brilliant blue R

Elutionspuffer (TFPI)	100mM Tris/HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 2.5mM Desthiobiotin
FACS-Puffer	136mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl ₂ , 2.5mM CaCl ₂ , 10mM Hepes, in a.bidest pH 7.4
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	137mM NaCl, 10mM Hepes, 5.6mM Glucose, 5.4mM KCl, 4.2mM NaHCO ₃ , 1.3mM CaCl ₂ x2H ₂ O, 0.6mM MgSO ₄ , 0.5mM MgCl ₂ x6H ₂ O, 0.4mM KH ₂ PO ₄ , 0.3mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O; in a.bidest pH 7.4
Laufpuffer	250mM Glycin, 25mM Tris, 0.1%SDS
LB (Luria-Bertani) Medium	1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt in a.bidest, pH 7.5
LB-Platten	15g Bacto-Agar/l LB-Medium
Lysispuffer	50mM KCl, 10mM Tris-HCL (pH 8.3), 1.5mM MgCl ₂ , 0.45% NP-40, 0.45% Tween 20, 100µg/ml Proteinase K
Monozytenwaschpuffer	1mM EDTA, 0.15% BSA; in PBS pH 7.4
PBS (Phosphat- buffered saline)	137mM NaCl, 8mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O, 2.7mM KCl, 1.5mM KH ₂ PO ₄ ; in a.bidest pH 7.4
Regenerationspuffer (TFPI)	100mM Tris/HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM HABA
Resuspensionspuffer	138mM NaCl, 12mM NaHCO ₃ , 5mM Glucose, 5mM Hepes, 2.7mM KCl, 1mM MgCl ₂ x6H ₂ O, 0.4mM NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O; in a.bidest pH 7.35
SDS-Ladepuffer	10mM Tris/HCl (pH 6.8), 2%SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 10% Glycin, 0.1% Bromphenolblau
Tris-Borate-EDTA-Puffer (TBE)	89mM Tris-HCl, 89mM Borsäure, 2mM Na-EDTA; in a.bidest pH 8.3
Tyrode-Puffer	137mM NaCl, 12mM NaHCO ₃ , 2.6mM KCl, 0.4%BSA, 0.4% Glucose; in a.bidest
Waschpuffer (TFPI)	100mM Tris/HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA

Waschpuffer A (PDI)	20mM Na ₂ HPO ₄ pH 7.3
Waschpuffer B (PDI)	20mM Na ₂ HPO ₄ pH 7.3, 500mM NaCl

II.2 Methoden

II.2.1 Mausmodell der arteriellen Thrombose

II.2.1.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden CG- und GE-defiziente Mäuse ($GECG^{-/-}$) (Tkalcevic *et al.* 2000) sowie Wildtyp-Tiere (wt) desselben Inzuchtstammes (129Sv) verwendet. Ein Teil der Versuche erfolgte an Tieren, die statt des murinen TF 1-2% humanen TF exprimieren (low-hTF, Genotyp:mTF^{-/-}/hTF⁺)(Parry *et al.* 1998; Schabbauer *et al.* 2004). Die entsprechenden transgenen Kontrolltiere (hTF) wiesen gleiche Expressionslevel an humanem TF auf wie die Expressionslevel von murinem TF in wt-Mäusen. Alle Tiere wurden unter SPF (specific pathogen free)-Bedingungen in der Tierhaltung im Klinikums rechts der Isar gehalten und für die Experimente im Alter von 6 Wochen verwendet.

II.2.1.1.1 Zucht

Low-hTF Mäuse wurden durch Verpaarungen homozygoter Männchen (mTF^{-/-}/hTF⁺) mit heterozygoten Weibchen (mTF^{-/+}/hTF⁺) generiert und die Defizienz in den Nachkommen mittels Genotypisierung validiert. Für die Zucht der $GECG^{-/-}$ -Tiere wurden homozygote Mäuse miteinander verpaart und der Genotyp durch Genotypisierung bestimmt, wie nachfolgend exemplarisch beschrieben.

II.2.1.1.2 Genotypisierung der $GECG^{-/-}$ -Tiere

Die Genotypisierung der Nachkommen wurde anhand einer DNA-Probe durchgeführt, die aus dem Schwanzgewebe entnommen wurde. Den Mäusen wurde unter Isofluran-Inhalationsnarkose ca. 8mm der äußersten Schwanzspitze mit einem sterilen Skalpell abgetrennt und das Gewebe unter Zugabe von 400µl Lysispuffer über Nacht im

Bakterienschüttler (55°C) verdaut. Nach Inaktivierung mit Proteinase K (20 Min. bei 95°C im Wasserbad) folgte eine Zentrifugation (18900 x g, 10 Min.) des unverdauten Gewebes (Tierhaare). Das DNA-Lysat wurde direkt in der Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt.

Mittels PCR lassen sich definierte DNA-Fragmente amplifizieren und in anschließender Gelelektrophorese der Länge nach auftrennen. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Ansatz von 20µl [DNA-Lysat (2µl), dNTPmix 20mM (0.2µl), Primer 5µM (2µl), Taq-Polymerase 5U/µl (0.3µl), 10x PCR-Puffer (2µl), a.bidest ad 20µl] bei definiertem Temperaturprofil [94°C für 2 Min. (Initiale Denaturierung), 35 Zyklen [30sec. bei 94°C (Denaturierung), 30sec. bei 55°C (Primeranlagerung), 40sec. bei 72°C (Elongation)], 5 Min. 72°C (Termination), 4°C bis zur Entnahme]. Die entsprechende Primerwahl führte aufgrund der Konstruktion der transgenen Tiere auf beiden loci zu einem Produkt (CG wt/ko 330bp/442bp, GE wt/ko 189bp/325bp), so dass die Gesamtheit möglicher Genotypen unterschieden werden konnte. Die PCR-Produkte wurden nach Zugabe von 5µl DNA-Auftragspuffer auf ein Agarosegel (1.4% in TBE) aufgetragen und nach einer Laufzeit von ca. 1 Std. bei 100 Volt mit dem mitgeführten Standard (1 kb) verglichen. Die Visualisierung unter UV-Licht erfolgte nach Anfärben mit Ethidiumbromid.

II.2.1.2 Bestimmung der Blutungszeit

Die Messung der Blutungszeit diente der Bestimmung der primären Hämostasefunktion. Die Durchführung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Law *et al.* 1999 am narkotisierten Tier. Nach dem Abtrennen von ca. 1 mm Schwanzspitze mit einem sterilen Skalpell wurde mit einem saugenden Filterpapier jede volle Minute der sich bildende Blutstropfen abgetupft, ohne Druck auf die Schnittfläche auszuüben. Die Zeit bis zum Blutungsstillstand wurde 20 Min. lang gemessen. War zu diesem Zeitpunkt eine Blutstillung nicht erfolgt, koagulierte man die Gefäße, um einen weiteren Blutverlust zu verhindern.

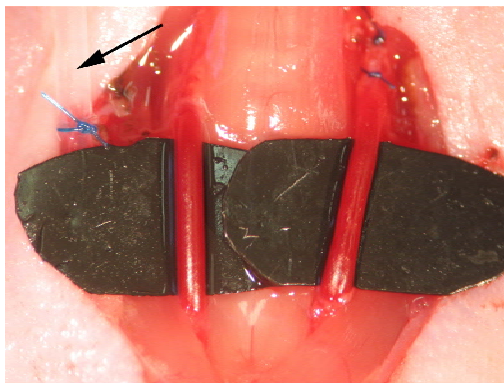
II.2.1.3 Intravitalmikroskopische Untersuchungen

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht Aufnahmen fluoreszenzmarkierter Blutbestandteile in Echtzeit am lebenden Organismus. Diese Technik weist daher neue Perspektiven der Analyse für die zeitlichen Abläufe von komplexen Prozessen *in vivo* auf.

Diese neue Technologie wurde zur Untersuchung der arteriellen Thrombusbildung erstmals 2002 (Falati *et al.* 2002) angewandt und in modifizierter Weise in der vorliegenden Arbeit verwendet.

II.2.1.3.1 Narkose und Präparation der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden durch intraperitoneale Injektion einer Kombinationsnarkose aus Midazolam (5mg/kg Körpergewicht), Medetomidin (0.5mg/kg Körpergewicht) und Fentanyl (0.05mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Anschließend wurde die Narkose mittels Isofluran während des gesamten Versuchszeitraums aufrechterhalten. Ein in der rechten Jugularvene platzierter Katheter diente der systemischen Infusion von Mikropartikeln, Antikörpern usw. Es folgte die beidseitige Freilegung der Arteria carotis communis und zur besseren Kontrastierung deren Auslagerung auf schwarze Plastikfolien (Abb. 2).



**Abb. 2 Darstellung der murinen Carotiden nach Auslagerung für die Intravitalmikroskopie
Der Jugulariskatheter ist mit einem Pfeil gekennzeichnet (M. Köllnberger, DHZ München)**

II.2.1.3.2 Versuchsdurchführung und digitale Aufzeichnung

Die digitale Aufzeichnung erfolgte an einer Untersuchungseinheit, die aus einem Mikroskop (Olympus BX51WI, Objektiv 20x), einer Lichtquelle (Olympus MT 20 Monochromator) und einer CCD Kamera (F-View, Olympus) bestand.

Der Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper in der Intravitalmikroskopie erlaubt die Analyse von Proteinen, die an der Carotis-Läsion entstehen bzw. freigesetzt werden. Zur Visualisierung wurden verschiedene Antikörper und Isotyp-Kontrollen mit dem Fluorophor Alexa-488 nach Angaben des Herstellers (<http://probes.invitrogen.com>) konjugiert. Der Reaktion ging eine 24stündige Dialyse der Antikörper in 0.1M NaHCO₃ (pH 8.3), bzw. das Auftragen auf Entsalzungssäulen voraus, um störender Amine und Ammoniumsalze zu entfernen. Für die Konjugationsreaktion wurde Alexa488 in DMSO gelöst und mit dem jeweiligen Antikörper unter Rühren inkubiert (1 Std. bei RT). Nach Entfernen des ungebundenen Fluorophors durch Dialyse in PBS, bzw. durch Auftragen auf Entsalzungssäulen wurde der Proteingehalt nach Lowry (s. Kap. II.2.6.3) bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde vorwiegend Fibrin an der Läsionsstelle nachgewiesen. Zur Erfassung der Eigenfluoreszenz der Gefäßwand wurden zunächst Fluoreszenzintensitätsmessungen in der A.carotis durchgeführt. Anschließend wurde der fluoreszenzmarkierte Antikörper systemisch über den Jugulariskatheter infundiert. Es folgte eine weitere Kontrollaufnahme. Danach wurde die Thrombusbildung durch Setzen einer definierten Läsion des Endothels induziert. Die A. carotis wurde zu diesem Zweck in der Nähe der Bifurkation mit einem Polypropylenfaden (Prolene 7-0, Ethicon, Norderstedt) ligiert (5 Min.). Durch die Ligatur wurde das Endothel standardisiert verletzt und die darunterliegende Kollagenschicht freigelegt. Alternativ wurde ein mit 10% FeCl₃-Lösung getränktes Filterpapier auf die Carotis appliziert (3 Min.). Im Anschluss erfolgten in 5minütigen Intervallen die intravitalmikroskopischen Aufnahmen bis zu 30 Min. bzw. 45 Min. nach Verletzung. Gegebenenfalls wurden zu den protokollierten Zeitpunkten weitere Antikörper etc. über den Jugulariskatheter verabreicht.

Untersuchungen zur Rekrutierung von Thrombozyten bzw. Mikropartikeln an die Läsionsstelle erfolgten mittels ex vivo Fluoreszenzmarkierung der Zellen (s.Kap. II.2.4.1 bzw. Kap. II.2.4.5) und anschließender systemischer Infusion. Markierte Thrombozyten (1.5×10^5) wurden direkt während der Ligatur appliziert. Die Zugabe von Mikropartikeln erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt (Abb. 3, Abb. 4). Nach der Zugabe der Blutkomponenten wurde die Adhäsion der Zellen über einen Zeitraum von 45 Min. dokumentiert. Für die Untersuchungen zur Leukozytenrekrutierung erfolgte die Markierung der Zellen durch intravenöse Applikation von RhodaminG6 während der 5minütigen Ligatur. Anschließend wurde die Anzahl

adhärenter Leukozyten über einen Zeitraum von 30 Min. bestimmt. Die systemische Verabreichung von Rhodamin (10-20 μ g in 0.9% NaCl) im Anschluss an die Gefäßverletzung durch FeCl₃ diente der Bestimmung der Verschlusszeit. Hierbei wurde der Blutfluss in der Carotis unter Sichtkontrolle im Mikroskop geprüft und die Zeit bis zum Stillstand des Blutstroms bestimmt.

Im Folgenden sind die detaillierten Versuchsabläufe der einzelnen Experimente dargestellt (Abb. 3, Abb. 4). Prinzipiell erfolgte nach einer Kontrollaufnahme, die der Überprüfung der korrekten Lagerung der Carotiden diente, die Infusion des zu analysierenden fluoreszenzmarkierten Proteins. Danach wurde erneut eine Kontrollaufnahme durchgeführt, um die Fluoreszenzintensität im unverletzten Gefäß zu beurteilen. Anschließend wurde die Verletzung des Endothels wie beschrieben durchgeführt. Daraufhin wurden die Fluoreszenzmessungen in 5-minütigen Intervallen vorgenommen. Gegebenenfalls erfolgte die Infusion weiterer Proteine oder Zellen zu den mit Pfeilen im Protokoll gekennzeichneten Zeitpunkten.

Die intravitale Mikroskopie ermöglichte es die Wirkung der infundierten Proteine und Zellen auf den Prozess der Thrombusentstehung in Echtzeit zu beobachten und durch digitale Aufnahmen für die anschließende quantitative Analyse zu dokumentieren. Diese Technik stellte demnach ein wertvolles Hilfsmittel für die Beurteilung der tatsächlich im lebenden Organismus stattfindenden Prozesse während der arteriellen Thrombusbildung dar.

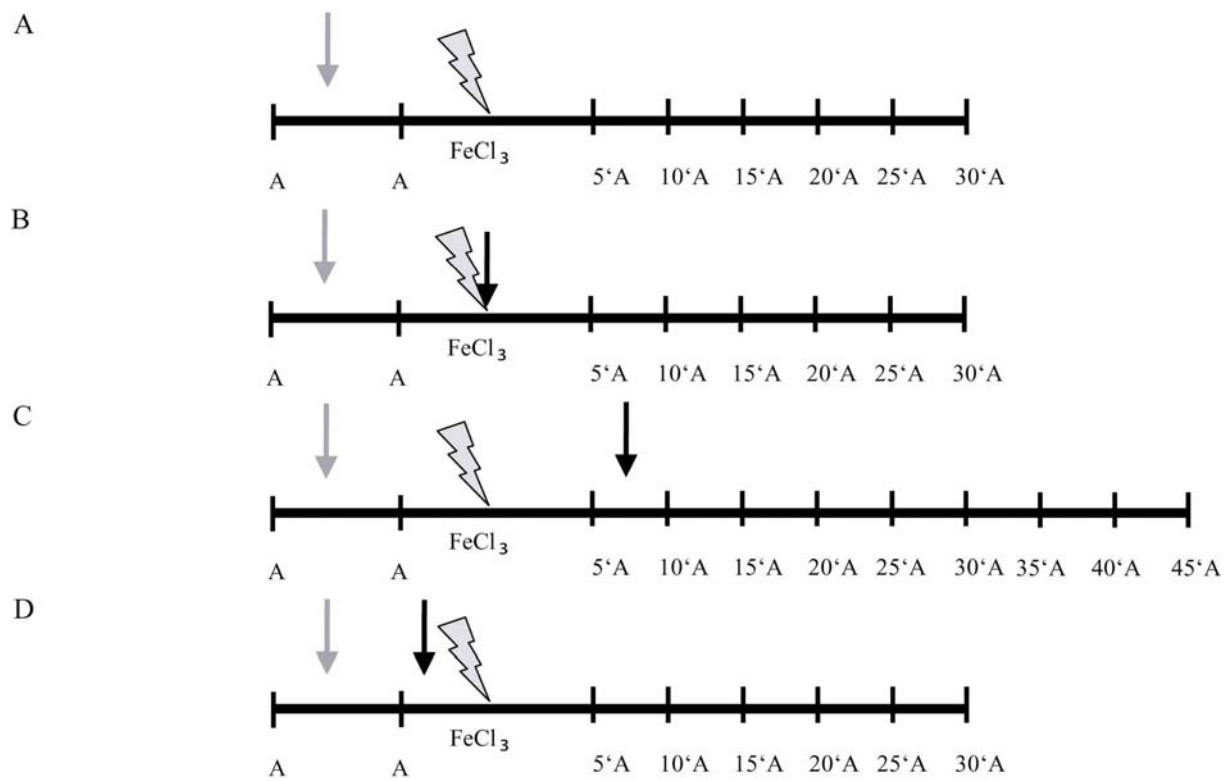


Abb. 3 Schematische Darstellung der detaillierten Versuchsabläufe in Experimenten mit FeCl₃-Schädigung.

Gruppe	Tierstamm	analysiertes Protein (fluoreszenzmarkiert)	weitere Proteine, Zellen etc.
A	1	129Sv-Tiere	α -FbAlexa488 (10 μ g)
	2	GECG ^{-/-} -Mäuse	
B	1	GECG ^{-/-} -Mäuse	nMP (2x10 ⁶)
	2	GECG ^{-/-} -Mäuse	N (5x10 ⁶)
C	GECG ^{-/-} -Mäuse	α -FbAlexa488 (10 μ g)	Elastase
D	1	129Sv-Tiere	nTFPI (3 μ g)
	2	GECG ^{-/-} -Mäuse	nTFPI (3 μ g)
	3	129Sv-Tiere	TFPI T87F/L89A (3 μ g)
	4	GECG ^{-/-} -Mäuse	TFPI T87F/L89A (3 μ g)

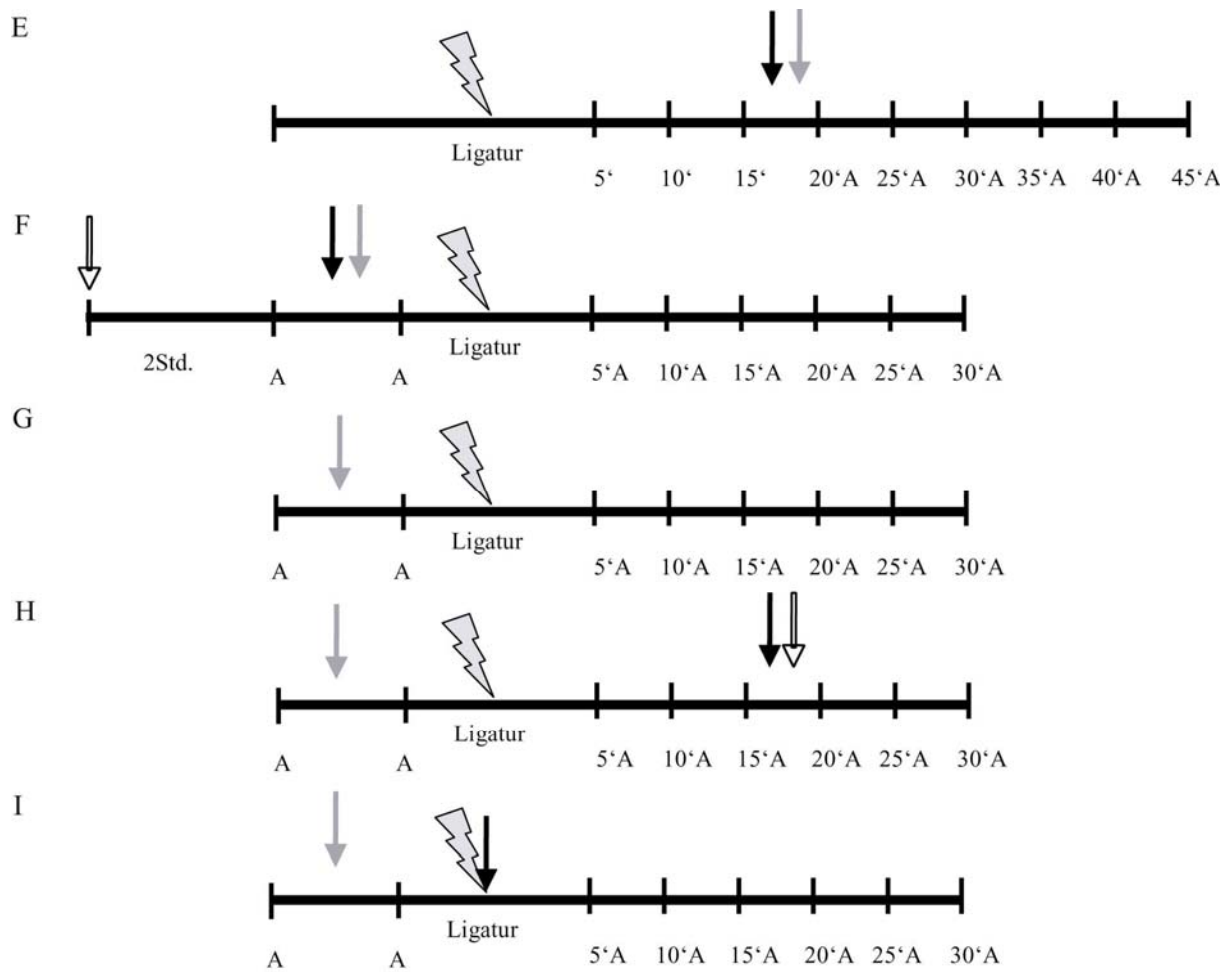


Abb. 4 Schematische Darstellung der detaillierten Versuchsabläufe in Experimenten mit Ligaturverletzung

Gruppe	Tierstamm	analysiertes Protein (fluoreszenzmarkiert)	weitere Proteine, Zellen etc.
E	1	129Sv-Tiere	DCF-markierte mMP (10^7)
	2	129Sv-Tiere	DCF-markierte mMP (10^7) IgG (800µg)
	3	129Sv-Tiere	DCF-markierte mMP (10^7) α-PDI (800µg)
F	1	129Sv-Tiere	Vehikelkontrolle (PBS)
	2	129Sv-Tiere	mMP (10^7)
	3	129Sv-Tiere	mMP (α-TF) (10^7)
	4	129Sv-Tiere	mMP (10^7)
	5	hTF-Mäuse	α-PDI (800µg)
	6	hTF-Mäuse	IgG (800µg)
	7	hTF-Mäuse	α-GPVI (6mg/kg ip), α-PDI (800µg)
	8	hTF-Mäuse	α-GPVI (6mg/kg ip), IgG (800µg)

G	1	129Sv-Tiere	IgGAlexa488 (200µg)	
	2	129Sv-Tiere	α-PDIAlexa488 (200µg)	
	3	low-hTF-Mäuse	α-FbAlexa488 (30µg)	
	4	hTF-Mäuse	α-FbAlexa488 (30µg)	
H	1	129Sv-Tiere	α-FbAlexa488 (50µg)	α-PDI (800µg), mMP (10 ⁷)
	2	129Sv-Tiere	α-FbAlexa488 (50µg)	IgG (800µg), mMP (10 ⁷)
	3	129Sv-Tiere	α-FbAlexa488 (50µg)	α-PDI (800µg), mMP (DTNB) (10 ⁷)
	4	129Sv-Tiere	α-FbAlexa488 (50µg)	IgG (800µg), mMP (DTNB) (10 ⁷)
I	1	hTF-Mäuse	α-FbAlexa488 (30µg)	nPDI (200µg)
	2	hTF-Mäuse	α-FbAlexa488 (30µg)	PDIΔC1,2 (200µg)

Die Applikation der Antikörper bzw. Proteine erfolgte zum dargestellten Zeitpunkt und in der angegebenen Reihenfolge. Alle Konzentrationen sind, soweit nicht anders angegeben pro Tier zu verstehen. α-GPVI-Antikörper (clone IF 5-1-11 E. Kremmer, bzw. IgG-Kontrolle anti-rat IgG2a (R0761, Sigma, Deisenhofen), Elastase (Sigma, Deisenhofen)

A=Aufnahme, Fb=Fibrin, nMP=humane neutrophile Mikropartikel, mMP=humane monozytäre Mikropartikel, nTFPI=natives, rekombinantes TFPI, nPDI=natives, rekombinantes PDI, N=Neutrophile

II.2.1.3.3 Auswertung und Statistik

Die Erfassung und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Softwareprogramme Cell/R (Olympus) und Vision (TillPhotonics). Für die Ausdehnung des Thrombus wurde das fibrinpositive Areal mit der Software Cap Image ausgemessen und ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software Sigmastat, die Gruppen wurden durch ANOVA verglichen.

II.2.2 ENU-Screen der Hämostase

Der seit 1997 laufende Münchener ENU-Maus-Mutagenese-Screen ist Teil des Deutschen Humangenomprojektes und dient der systematischen Erzeugung und Charakterisierung von krankheitsrelevanten Mausmodellen (<http://www.gsf.de/ieg/groups/genome/enu.html>, (Hrabe de Angelis *et al.* 2000). Auf dieser Basis wurde 2003 von der Arbeitsgruppe Prof. Engelmann ein Hämostasescreen etabliert. Hierbei wurden phänotypische Merkmale vererbbarer Veränderungen der Blutgerinnung untersucht. Die Haltung und Zucht der Tiere erfolgte unter SPF-Bedingungen in der Tierhaltung der GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit) sowie im MVG (Moorversuchsgut Badersfeld).

II.2.2.1 Mutagenisierung

Entsprechend den Regularien des ENU-Mutagenese-Projektes erhielten männliche C3HeB/FeJ-Mäuse (C3H) im Alter von 10-14 Wochen im wöchentlichen Abstand dreimal eine intraperitoneale Injektion von je 90mg ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) pro kg Körpergewicht. Nach Ablauf der Sterilitätsphase (6-8 Wochen) erfolgte die Verpaarung mit weiblichen C3HeB/FeJ-Mäusen. Die Nachkommen wurden auf phänotypische Veränderungen hin untersucht.

II.2.2.2 Zuchtstrategien

II.2.2.2.1 Zuchtschema für dominante bzw. rezessive Mutationen

Im Hämostasescreen wurde die F1-Generation mittels Kugelkoagulometrie (Kap.II.2.5.2) auf dominant auftretende Veränderungen des Phänotyps hin untersucht (Abb. 5). Im Falle einer Abweichung der Gerinnungszeit um +/- 2Standardabweichungen (SD) von einem Mittelwert, der an 50 wt-Tieren ermittelt worden war, erfolgte eine zweite Messung nach 2-3 Wochen. Bei erneutem Abweichen der Messwerte wurden die Tiere als auffällig bezüglich ihres Blutgerinnungsverhaltens vermerkt. Die anschließende Verpaarung mit wt-Mäusen (Confirmation Cross) diente der Prüfung der Vererbbarkeit des auffälligen Merkmals. In 10-15 Nachkommen (F2-Generation) dieser Kreuzung wurde die Gerinnungszeit bestimmt (nach Mendel zeigen theoretisch 50% denselben auffälligen Phänotyp). Eine erneute Abweichung

des Messwertes vom Mittelwert bestätigte die Vererbbarkeit des auffälligen Merkmals. Die Tiere, die einen veränderten Phänotyp bezüglich der Blutgerinnung aufwiesen, wurden nach Wiederholung der Messung mit wt-Tieren verpaart, um eine neue Mauslinie zu etablieren.

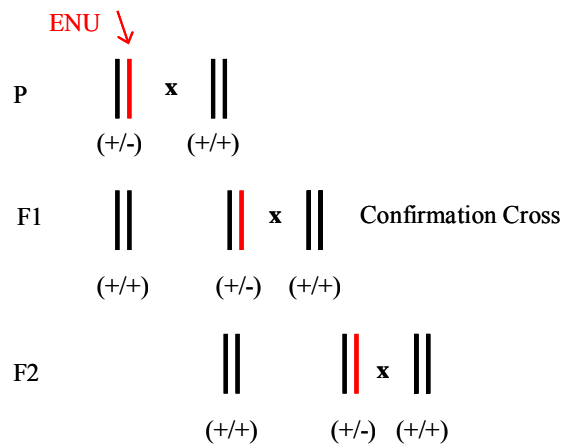


Abb. 5 Zuchtschema für dominante Mutationen, modifiziert nach

<http://www.gsf.de/ieg/groups/genome/enu.html>

ENU-mutagenisierte Männchen wurden mit wt-Tieren verpaart. Die Nachkommen (F1) wurden auf Veränderungen bezüglich ihrer Blutgerinnung untersucht. Auffällige Tiere wurden mit wt-Tieren verpaart (Confirmation Cross) und die Gerinnungszeit in den Nachkommen (F2) bestimmt. Tiere mit veränderter Blutgerinnung wurden im Anschluss mit wt-Tieren verpaart, um eine neue Linie zu gründen.

P= Parentalgeneration, F1= 1. Filialgeneration, F2= 2. Filialgeneration

Die Identifizierung rezessiv vererbter Mutationen erfolgte durch Verpaarung männlicher Tiere der F1-Generation mit wt-Mäusen (Abb. 6). Dabei wurden auffällige Phänotypen vorher ausgeschlossen. Die weiblichen Nachkommen wurden erneut mit den F1-Männchen verpaart und die Gerinnungszeit in 20 Nachkommen in der F3-Generation bestimmt (nach Mendel sind 1/8 homozygot bzgl. des auffälligen Phänotyps). Die Messungen wurden zweimal wiederholt. Die Tiere mit verändertem Phänotyp wurden im Confirmation Cross je nach Geschlecht mit F1-Männchen bzw. F2-Weibchen verpaart. Im Falle einer Vererbbarkeit des auffälligen Merkmals erzeugten sie in der F4-Generation in der Regel 50% positive Nachkommen, wie nach den Mendelschen Gesetzen zu erwarten (Abb. 6, Schema A). Bei fehlender Verfügbarkeit der F1- bzw. F2-Tiere erfolgte eine Kreuzung mit wt-Tieren und

anschließendem Intercross, der in der F5-Generation 25% Tiere mit auffälligem Phänotyp hervorbrachte (Abb. 6, Schema B).

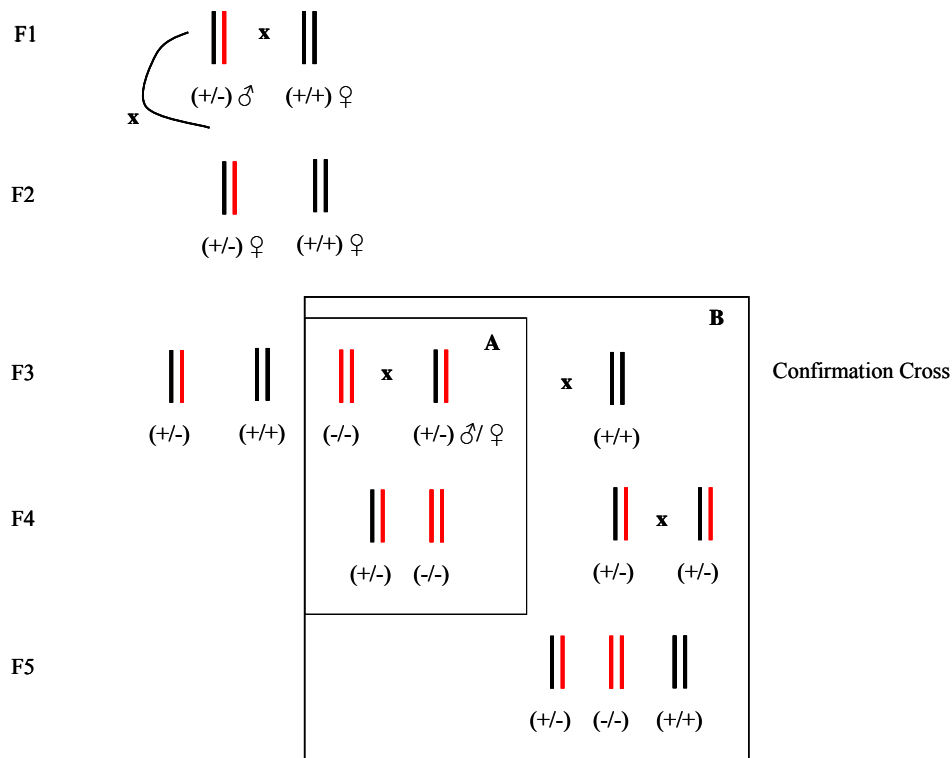


Abb. 6 Zuchtschema für rezessive Mutationen, modifiziert nach

<http://www.gsf.de/ieg/groups/genome/enu.html>;

Männliche Nachkommen ENU-mutagenisierter Männchen (F1) wurden mit wt-Tieren verpaart und die weiblichen Nachkommen erneut mit den F1-Männchen gekreuzt. In den Nachkommen dieser Kreuzung (F3) wurde die Gerinnungszeit gemessen. Auffällige Tiere wurden mit F1-Männchen bzw. F2-Weibchen (A), bzw. mit wt-Tieren (B) verpaart (Confirmation Cross).

P= Parentalgeneration, F1= 1. Filialgeneration, F2= 2. Filialgeneration

II.2.2.2.2 Auszucht (*Outcross*) und Rückzucht (*Backcross*)

Die Kopplungsanalyse dient der Überprüfung einer genetischen Kopplung zwischen Mutation und DNA-Markern bekannten Ortes (bsp. Mikrosatelliten). Dadurch kann die Lokalisation der Mutation im Genom (Silver 1995) detektiert werden. Die genetische Distanz wird anhand der Rekombinationsrate zwischen den Chromosomen geschätzt. Die Lage der Mikrosatelliten unterscheidet sich zwischen Mausinzuchtstämmen und ermöglicht dadurch eine Zuordnung der Mutation zum Mausstamm.

Für eine Kopplungsanalyse wurde die im Hämostasestest etablierte, dominante Linie LHE004 gewählt. Die Tiere dieser Linie wiesen in den Messungen stark verkürzte Blutgerinnungszeiten auf. Die auffälligen Tiere der Linie LHE004 wurden auf einen anderen Inzuchtstamm C57/BL6 (BL6) ausgekreuzt (*Outcross*). Die entstandenen Nachkommen mit auffälligem Phänotyp (mischerbige mutante F1-Hybridtiere, Abb. 7 links) wurden anschließend mit der Parentalgeneration (BL 6 wt) rückgekreuzt (*Backcross*, Abb. 7 rechts), um mischerbige Nachkommen F2 für eine zukünftig geplante Kopplungsanalyse zu gewinnen.

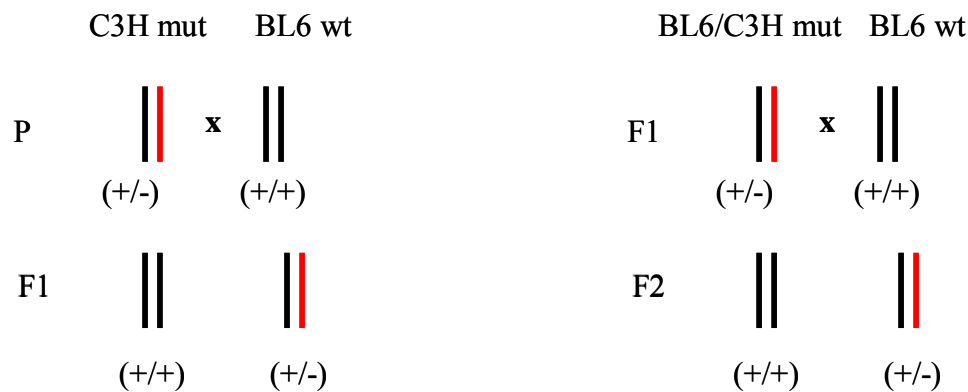


Abb. 7 Zuchtschema für eine Auszucht (links) bzw. Rückzucht (rechts)
Auffällige Tiere wurden mit wt-Tieren des Stammes BL6 wt gekreuzt (links) und die auffälligen Nachkommen (F1, BL6/C3H mut) mit wt-Tieren des BL6 Stammes rückgekreuzt.
P= Parentalgeneration, F1= 1. Filialgeneration, F2= 2. Filialgeneration
mut: mutiert, wt: wildtyp

II.2.3 Blutabnahme

Venöses Blut wurde von gesunden Spendern aus der Cubitalvene in mit Tri-Natriumcitrat (0.38% Endkonzentration) gefüllte Spritzen überführt. Bei Mäusen erfolgte die Blutentnahme (etwa 1-2ml/Maus) unter Isofluran-Inhalationsnarkose durch Herzpunktion in Citratspritzen (170µl/Spritze) bzw. durch Punktion des retrobulbären Venenplexus in vorbereitete EppendorfgeläÙe (s. Kap II.2.5.2).

II.2.4 Primärzellisolierungen

II.2.4.1 Isolierung muriner Thrombozyten

Für die Thrombozytenpräparation wurde murines Vollblut (1-2ml) mit Tyrode-Puffer (pH6.5) auf ein Endvolumen von 2ml aufgefüllt und zentrifugiert (70 x g, 20 Min.). Nach vorsichtiger Abnahme des plättchenreichen Plasmas (PRP) und Zugabe von Tyrode-Puffer (pH6.5) auf ein Endvolumen von 4ml erfolgte die Markierung mit Rhodamin B (6µl/ml PRP 2 Min., RT). Die mittels Zentrifugation (720 x g, 10 Min.) pelletierten Thrombozyten wurden in Tyrode-Puffer (250µl pH6.5, 250µl pH7.4) resuspendiert und vor Verwendung nochmals gewaschen (720 x g, 10 Min.).

II.2.4.2 Isolierung humaner Monozyten

Die Isolierung von humanen Monozyten erfolgte aus dem leukozytenreichen buffy coat, der nach Zentrifugation des Vollblutes (180 x g, 15 Min.) vorsichtig abgenommen wurde. Die Überschichtung und anschließende Dichtegradientenzentrifugation (280 x g, 25 Min.) des verdünnten buffy coats (1:3 mit PBS) mit Ficoll (1:3) führte zur Anreicherung von mononukleären Zellen in der Interphase. Die Inkubation der gewaschenen Zellsuspension (210 x g, 10 Min. in Monozyten-Waschpuffer) mit einem an microbeads magnetisch gekoppelten anti-CD14 Antikörper (15 Min., 4°C) ermöglichte die Separation über selektive Säulen. Die Elution der Monozyten erfolgte mit Antikörper-Puffer nach Spülen mit dem dreifachen SV und anschließendem Entfernen der Säulen aus dem Magnetfeld. Die Monozytenpräparation (Reinheit 95%) wurde durch eine Zentrifugation bei 210 x g für 10 Min. beendet. Die Monozyten wurden mit 10ng/ml LPS (3×10^6 Zellen/ml 37°C, 4 Std.)

aktiviert, um die TF-Expression in den Zellen zu induzieren. Vor der weiteren Verwendung wurden die Monozyten drei Waschschritten unterzogen (210 x g, 5 Min.).

II.2.4.3 Isolierung humaner Neutrophiler

Neutrophile Granulozyten wurden aus humanem Blut modifiziert nach (Boyum 1968) isoliert. Das Vollblut wurde mittels Dextran-Sedimentation von Erythrozyten gereinigt und in nachfolgender Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation die Neutrophilen angereichert.

Die Sedimentation der Erythrozyten trat 30-45 Min. nach Durchmischung des Vollblutes mit Dextran (3% in HBSS, 2:1) ein. Die weitere Separation aus dem Überstand erfolgte durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (1:1, 160 x g, 30 Min.), nach deren Ablauf sich Granulozyten, Erythrozyten und tote Zellen als Sediment absetzten. Auf einen Waschvorgang mit HBSS (110 x g, 10 Min.) folgte die Lyse der verbliebenen Erythrozyten mit 1ml a.bidest und eine abschließende Zentrifugation in HBSS (110 x g, 10 Min.). Die Präparation neutrophiler Granulozyten erfolgte alternativ mittels magnetisch-gekoppeltem Antikörper (microbeads anti-CD15, 15 Min., 4°C) aus dem angereicherten (180 x g, 10 Min.) buffy coat. Die CD15-positiven Zellen wurden nach der magnetischen Separation über selektive Säulen mit Antikörper-Puffer eluiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation der Zellen bei 110 x g, für 10 Min. Die pelletierten Zellen wurden nachfolgend in Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Reinheit der Neutrophilen betrug in beiden Verfahren ca. 95%.

II.2.4.4 Bestimmung der Zellzahl, Reinheit und Zellviabilität

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

II.2.4.5 Generierung und Isolierung von Mikropartikeln in vitro

Frisch isolierte Neutrophile (6×10^6) wurden für 2 Std. bei 37°C mit fMLP (100µM) aktiviert, um Neutrophilen-spezifische Mikropartikel zu gewinnen. Für die Herstellung von Mikropartikeln aus Monozyten erfolgte die Aktivierung von 3×10^6 Zellen mit 10µg/ml LPS für 14 Std. Nach Abzentrifugation der Neutrophilen bzw. Monozyten (3960 x g, 15 Min.), sowie Aufteilen des Überstandes in 250µl- Anteile wurden die Mikropartikel durch zweifache Zentrifugation bei 17740 x g für 30 Min. gewonnen und für die FACS-Analyse in 100µl PBS aufgenommen.

Auf monozytären Mikropartikeln exprimierter TF wurde in einigen Versuchsansätzen durch Inkubation mit einem α -TF-Antikörper (Endkonzentration 0.5µg/ml 30 Min., 37°C) blockiert. Ein abschließender Waschvorgang (17740 x g für 30 Min.) in PBS diente dem Entfernen ungebundener Antikörpermoleküle. Kontroll-Mikropartikel wurden entsprechend mit IgG behandelt. Die Fluoreszenzmarkierung monozytärer Mikropartikel für in vivo Rekrutierungsexperimente erfolgte durch eine 10minütige Inkubation mit 5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (DCF; 1:100) und anschließendem Waschvorgang (17740 x g für 30 Min.). In einigen Experimenten wurden monozytäre Mikropartikel mit dem Thiolreagenz DTNB (5mM für 20 Min., RT) behandelt und ungebundenes DTNB vor der Verwendung durch Zentrifugation (17740 x g für 30 Min. in PBS) entfernt.

II.2.5 Funktionelle Assays

II.2.5.1 Thrombelastographie

Die Thrombelastographie (TEG) ermöglicht die Messung der Fibrinbildung im Vollblut. Damit lassen sich funktionelle Analysen des Blutgerinnungssystem durchführen, die die Situation in vivo simulieren. Das Prinzip basiert darauf, dass ein sich vor und zurück bewegender Stempel in ein Gefäß mit Vollblut taucht und bei der Bildung von Fibrinpolymeren einen Widerstand erfährt. Dieser wird detektiert und spiegelt sich in der Auslenkung eines Schreibers wider. Neben der Fibrinbildungsrate (coagulation time, CT) wird unter anderem auch die Thrombuswachstumsrate (clot formation time, CFT) erfasst.

Murines Vollblut wurde in einer Spritze mit Citrat (1:10) und Korntrypsininhibitor (CTI; 32µg/ml, Inhibitor des intrinsischen Systems) abgenommen und 100µl Blut pro Ansatz verwendet. Für TEG-Experimente im Rahmen des ENU-Screens erfolgte die Blutabnahme retroorbital (Kap. II.2.5.2) in ein mit den oben genannten Konzentrationen an Citrat und CTI vorbereitetes Eppendorfgefäß. Die Gerinnung wurde nach Zugabe der Aktivatoren (Kollagen 14µg/ml bzw. 25µl RekombiPlasTin (1:5000)), sowie ggfs. monozytären Mikropartikeln mittels 45µl CaCl₂ (200mM) gestartet.

II.2.5.2 Kugelkoagulometrie

Die Kugelkoagulometrie ist eine Methode zur Bestimmung der Gerinnungszeit im Vollblut, die sowohl zelluläre als auch plasmatische Faktoren berücksichtigt. Eine Edelstahlkugel, die sich auf dem Boden einer schräg gelagerten, um ihre Längsachse rotierenden Küvette befindet, wird durch die Bildung von Fibrinpolymeren zum Sistieren gebracht. Ein magnetischer Sensor detektiert das Signal und stoppt die Zeitmessung. Die einfache und rasche Durchführbarkeit stellen die entscheidenden Vorteile gegenüber der Thrombelastographie für eine Anwendung mit hohen Durchsatzraten dar.

Die mit Hilfe einer Kapillare retroorbital durchgeführte Blutentnahme (100µl) erfolgte bei Mäusen (12-14Wochen, C3H) unter Diethylnarkose. Dazu wurde ein mit 20µl Citrat bestücktes Eppendorfgefäß verwendet. Nach kurzem Vortexen (2s) des Blut-Citratgemisches wurden für Doppelbestimmungen pro Tier je 50µl in vorbereitete Decavetten (50µl CaCl₂-Lösung, 50µl der 1:1000 verdünnten RekombiPlasTin-Lösung) zupipettiert und die Zeitmessung gestartet.

II.2.5.3 Faktor Xa Bildung

Die funktionelle TF-Aktivität kann mittels eines zweistufigen Assays über die Bildung des Gerinnungsfaktors Xa bestimmt werden. Dieser spaltet das Substrat S2222 zu einem bei 405nm absorbierenden Produkt und ermöglicht dadurch eine photometrische Quantifizierung.

Aktivierete Monozyten (2×10^4 in 50µl/Doppelbestimmung) (vgl. Kap.II.2.4.2) wurden mit der Thiol-Isomerase PDI (Endkonzentration 50µg/ml, 20 Min., RT) inkubiert. In parallelen

Versuchsansätzen erfolgte zudem eine Vorbehandlung der aktivierten Zellen mit einem anti-TF-Antikörper (Endkonzentration 10µg/ml, 20 Min., RT) bzw. mit 5,5-Dithio-bis- 2-Nitrobenzoesäure (DTNB) (Endkonzentration 5mM, Vorinkubation für 5 Min. bei RT). Die Zellen wurden nach der Inkubation gewaschen (210 x g, 5 Min.) und anschließend in Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Proben (20µl), sowie je 20µl einer Konzentrationsreihe mit rekombinantem TF wurden in eine mit 20µl CaCl₂ (50mM) bestückte 96-Mikrotiterplatte gefüllt und nach Zugabe des Gerinnungsfaktors VIIa (Endkonzentration 25nM) für 15 Min. bei RT inkubiert. Es folgten die Zugabe des Gerinnungsfaktors X (Endkonzentration 250nM) und eine weitere Inkubation (30 Min. bei RT). Direkt nach Zugabe des chromogenen Substrates S2222 erfolgte die Messung der optischen Dichte über einen Zeitraum von 36 Min. in einem ELISA Reader.

II.2.5.4 Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting FACS)

Die Durchflusszytometrie wurde in der vorliegenden Arbeit für die quantitative Analyse von aus Vollblut isolierten Mikropartikeln verwendet. Diese Methode ermöglicht die Erfassung verschiedener Eigenschaften einer Zelle, wie z.B. deren Größe und Granularität. Ein Laserstrahl trifft auf eine Zelle und erfährt eine Lichtstreuung, die proportional zur Zellgröße ist und im forward scatter dargestellt wird (FSC). Die Lichtstreuung im 90°-Winkel ist proportional zur Granularität der Zellen (sideward scatter SSC). Auf diese Weise entsteht ein zweidimensionales Bild der Zellen.

Zur quantitativen Analyse von Mikropartikeln wurden 5µl der Mikropartikelsuspension in 350µl FACS-Puffer (gefiltert, 0.2µm) aufgenommen und im FACS im FSC/SSC analysiert. Zusätzlich wurden beads definierter Größe eingesetzt, um die Mikropartikel einer Größe zuordnen zu können.

Die Berechnung der Mikropartikelanzahl N/l Plasma erfolgte nach der in Nieuwland *et al.* 2000 dargestellten Formel:

$$N = (100/5) \times (355/60) \times (10^6/250)$$

100 (Gesamtvolumen der Mikropartikel-Suspension); 5 (Volumen an Mikropartikel-Suspension); 355 (Gesamtvolumen vor Analyse); 60 (analysiertes Volumen); 10⁶ (Anzahl der µl/l); 250 (Originalvolumen an Plasma)

II.2.6 Proteinchemische Methoden

II.2.6.1 Transformation kompetenter Bakterien

Die Produktion von rekombinantem Protein in *E. coli* erforderte zunächst eine Transformation kompetenter Zellen mit dem gewünschten Plasmid. Dies diente der Übertragung der genetischen Information für den entsprechenden Genabschnitt in die Bakterienzellen. Im Anschluss erfolgte eine Vermehrung der Zellen und somit zahlreicher Kopien des Zielproteins.

Die entsprechende Plasmid-DNA (ca. 80ng) wurde mit 50µl kompetenten BL21-Zellen für 30 Min. auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock (40s im Wasserbad bei 42°C), eine 2-minütige Inkubation auf Eis und nach Zugabe von 300µl LB-Medium eine einstündige Inkubation bei 37°C im Bakterienschüttler. Die Suspension wurde auf LB-Platten (Ampicillin 50µg/ml) ausplattiert. Die Selektion (24 Std., 37°C) über die Antibiotikumresistenz gewährleistete eine exklusive Vermehrung transformierter Bakterien. Eine Kolonie wurde gepickt und in 6ml LB-Medium unter Zugabe von Ampicillin (50µg/ml) angeimpft, bei 37°C und 180Upm für 24 Std. inkubiert und nachfolgend als Vorkultur für die Proteinexpression verwendet.

II.2.6.2 Rekombinante Proteinexpression und Aufreinigung

Neben den beiden nativen Formen der Proteine TFPI und PDI wurde je eine mutierte Variante des Proteins hergestellt. Die mutierte Form von TFPI (T87F/L89A) weist Aminosäure-Substitutionen an der proteolytischen Spaltstelle für die Serinproteasen Elastase (Position 87) und Cathepsin G (Position 89) auf. In der untersuchten PDI-Variante (PDI Δ C_{1,2}) wurden die redox-aktiven Cysteine durch Alanin ersetzt, wodurch die Oxidoreduktase-Funktion des Enzyms verloren geht, wohingegen die Chaperoneaktivität erhalten ist (Winter *et al.* 2002).

II.2.6.2.1 Expression und Aufreinigung von rTFPI mit Strep-Tag II

Das Strep-Tag Aufreinigungssystem basiert auf der hochselektiven Bindung von Strep-Tag II Fusionsproteinen an Strep-Tactin. Das rekombinante TFPI ist mit einer acht Aminosäure langen Erkennungssequenz fusioniert (Strep-Tag), die an immobilisiertes Strep-Tactin bindet

und daher über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann. Die kompetitive Bindung von Desthiobiotin an Strep-Tactin ermöglicht die Elution des Zielproteins.

Für die Proteinexpression wurde 1l LB-Medium (50µg/ml Ampicillin) mit einer Vorkultur (6ml BL21 E.coli) angeimpft und bei 37°C und 180Upm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.4 inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Anhydrotetrazyklin (2µg/ml). Nach dessen Zugabe erfolgte die Synthese des Proteins für 2 Std. bei 120Upm (RT). Die Bakterienkultur wurde nach der Inkubation abzentrifugiert (3130 x g, 30 Min.), die Zellen in 10ml Waschpuffer aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung vollständig lysiert. Es folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte (7040 x g für 15 Min. bei 10°C, 35000 x g für 45 Min. bei 4°C), um Zellfragmente zu entfernen und die Menge an Gesamtprotein zu reduzieren. Das Proteinlysate wurde auf Strep-Tactin II (2ml) beladene, äquilibrierte (10ml Waschpuffer) Chromatographiesäulen aufgetragen und diese nachfolgend mit dem dreifachen Säulenvolumen an Waschpuffer gespült. Anschließend erfolgte die Elution des Proteins in 5 Fraktionen zu je 600µl. Die Regeneration der Säulen mit HABA-haltigem Puffer ermöglichte ihre Wiederverwendung.

II.2.6.2.2 Expression und Aufreinigung von rPDI

Die Aufreinigung von rPDI und seiner mutierten Variante erfolgte über Affinitätschromatographie mit Ni²⁺-NTA-Agarose als Trägermaterial. Das Zielprotein trägt einen Hexahistidintag und wird selektiv an Ni²⁺-Ionen zu einem Komplex gebunden. Imidazol konkurriert mit den Histidinen um die Bindungsplätze und eignet sich daher als Elutionsreagenz.

Die Herstellung von rPDI und seiner mutierten Variante fand in E.coli (BL21) statt. Die Inkubation der Bakterien (Vorkultur 3ml) in 500ml LB-Medium (Ampicillin (50µg/ml)) erfolgte im Bakterienrührer (37°C, 180Upm) bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.6. Die IPTG-induzierte (1mM) Synthese des Proteins wurde nach 3stündiger Dauer (37°C, 180Upm) durch Abzentrifugation des Mediums (4891 x g für 30 Min.) beendet, die Zellen anschließend resuspendiert (10ml Puffer A, 4 Units DNase) und bei -80°C eingefroren. Zwei nachfolgende Gefrier/Tau-Zyklen sowie die Ultraschallbehandlung auf Eis dienten dem vollständigen Aufschluss der Zellen. Die Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (4891 x g, 30 Min. RT) und nachfolgende Filtration (0.2µm) entfernt. Die selektive Bindung des Proteins erfolgte

während einer einstündigen Inkubation des Proteinlysates mit Ni²⁺-NTA-Agarose (4ml:1ml) im Schüttelinkubator bei 4°C. Nach der Inkubation wurden Chromatographiesäulen mit dieser Suspension beladen und die Säule anschließend mit einem Säulenvolumen (SV) an Waschpuffer A gespült. Es folgten Waschschrte mit dem fünffachen SV an Waschpuffer B, bevor die Säule mit je einem SV an Puffer B (mit aufsteigendem Imidazolgradienten 10mM, 30mM, 50mM, 250mM) gespült wurde.

II.2.6.2.3 Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE lassen sich Proteine ihrer Größe nach auftrennen. SDS denaturiert Proteine und verleiht ihnen eine einheitlich, negative Ladung, sodass die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld fortan ausschließlich von ihrem Molekulargewicht abhängig ist.

Die zu analysierenden Proteinproben (10µl) wurden mit SDS-Ladepuffer (5µl) versetzt und mit einem mitgeführten Molekulargewichtsmarker auf ein Polyacrylamidgel (7.5%) in Laufpuffer geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 150mV nach ca. 1 Std. Das Anfärben der Proteine mit Coomassie-färbelösung (30 Min. RT, Entfärbung mit a.bidest) zeigte, dass die isolierten Proteine das erwartete Molekulargewicht aufwiesen (TFPI 35kDa, PDI 55kDa) und bestätigte damit eine korrekte Proteinherstellung. Die höchsten Proteinkonzentrationen befanden sich in Fraktion 2 (TFPI) bzw. in der 50mM-Imidazolfraktion (PDI).

II.2.6.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte photometrisch bei 700nm nach der Methode von Lowry (Lowry *et al.* 1951). Diese basiert darauf, dass Kupferionen (25µl Lösung A) mit dem zu analysierenden Protein (5µl) einen Komplex bilden, der durch Zugabe eines Folin-Phenolhaltigen Reagenzes (200µl Lösung B) reduziert wird. Die resultierende Blaufärbung (nach 15 Min.) wird unter Verwendung einer BSA-Standardkurve zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt.

III. Ergebnisse

III.1 Regulierungsmechanismen des Gerinnungsstartes im Mausmodell

III.1.1 Die Rolle von Neutrophilen für die arterielle Thrombusbildung in vivo

Die Möglichkeit, die Fibrinbildung im arteriellen System in vivo in Echtzeit zu untersuchen ermöglichte es erstmals, die Rolle der Neutrophilen für die Gerinnungsaktivierung zu analysieren, die noch weitgehend ungeklärt ist. Hierbei galten den Funktionen der neutrophilen Serinproteasen CG und GE das besondere Interesse. Um die Bedeutung von CG und GE für die arterielle Thrombusbildung in vivo zu erfassen, wurden Tiere verwendet, die eine doppelte Gendefizienz für die Serinproteasen aufwiesen (GECG^{-/-}-Mäuse).

III.1.1.1 Blutungszeit

Im Laufe der Präparation der Gefäße für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen traten bei GECG^{-/-}-Tieren vermehrt Blutungen auf. Daher wurde die Blutungszeit nach Abtrennen des Schwanzendes in Kontrolltieren (wt) und GECG^{-/-}-Tieren bestimmt. Dabei wurde beobachtet, dass die GECG^{-/-}-Tiere eine doppelt so lange Blutungszeit aufweisen wie die entsprechenden wt-Tiere (Abb. 8).

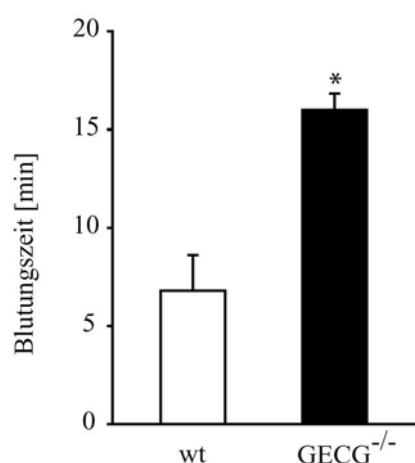


Abb. 8 Blutungszeit in GECG^{-/-}-Tieren vs. Kontrolltieren (wt).

Messung der Blutungszeit nach Abtrennen des Schwanzendes. Mittelwerte \pm SD, n=3-15, *p<0.05 vs. Kontrolle

III.1.1.2 Die Thrombusbildung

Das Endothel im Bereich der A.carotis wurde mittels einer 5-minütigen Ligatur bzw. durch 3-minütige Applikation einer 10% FeCl₃-Lösung verletzt. Dies führte sowohl in wt-Mäusen als auch in GECG^{-/-}-Tieren zur Thrombusbildung im geschädigten Areal. In wt-Tieren bewirkte der entstandene Thrombus durchschnittlich 7 Min. nach Setzen der Verletzung (FeCl₃-Applikation) eine vollständige Okklusion des Gefäßes (Abb. 9). In den GECG^{-/-}-Tieren kam es hingegen erst nach durchschnittlich doppelt so langer Zeit zum Verschluss der Carotis.

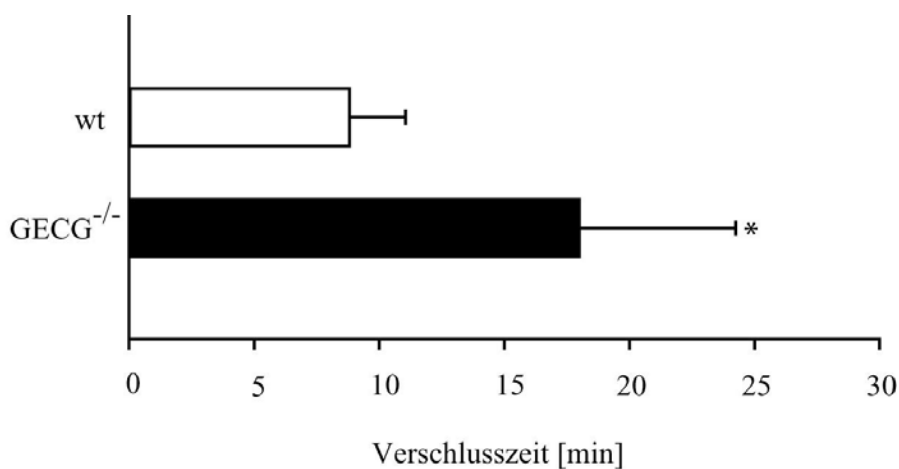


Abb. 9 Okklusionszeiten nach FeCl₃-Applikation in GECG^{-/-}-Tieren vs. Kontrolltieren (wt).

Messung der Zeit bis zum vollständigen Verschluss der A. carotis nach FeCl₃-Verletzung unter Sichtkontrolle im Mikroskop.

Mittelwerte \pm SD, n=3-13, *p<0.05 vs. Kontrolle

III.1.1.3 Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten

Nach Verletzung des Endothels kommt es in der Regel zu einer schnellen Rekrutierung von Thrombozyten und zeitlich etwas verzögert von Leukozyten an die geschädigte Region. Wir untersuchten daher, ob es bei den GECG^{-/-}-Tieren zu einem veränderten Rekrutierungsverhalten der Blutzellen kommt. Hierfür wurden den Tieren DCF-markierte Thrombozyten bzw. Rhodamin zum Anfärben der Leukozyten während der Verletzung (Ligatur) infundiert und die Rekrutierung der Zellen an das verletzte Areal durch Auszählung quantifiziert. Die in GECG^{-/-}-Tieren über einen Zeitraum von 30-45 Min. ermittelte Anzahl rekrutierter Zellen wurde mit der Anzahl rekrutierter Zellen in wt-Tieren verglichen. Die

Anzahl adhärenter Thrombozyten im verletzten Gefäßabschnitt variierte zwischen $GECG^{-/-}$ -Tieren und Kontrolltieren nicht (Abb. 10 links). Die Läsionsstelle wies in defizienten Tieren gegenüber wt-Tieren hingegen eine etwas erhöhte Anzahl rekrutierter Leukozyten auf (Abb. 10 rechts).

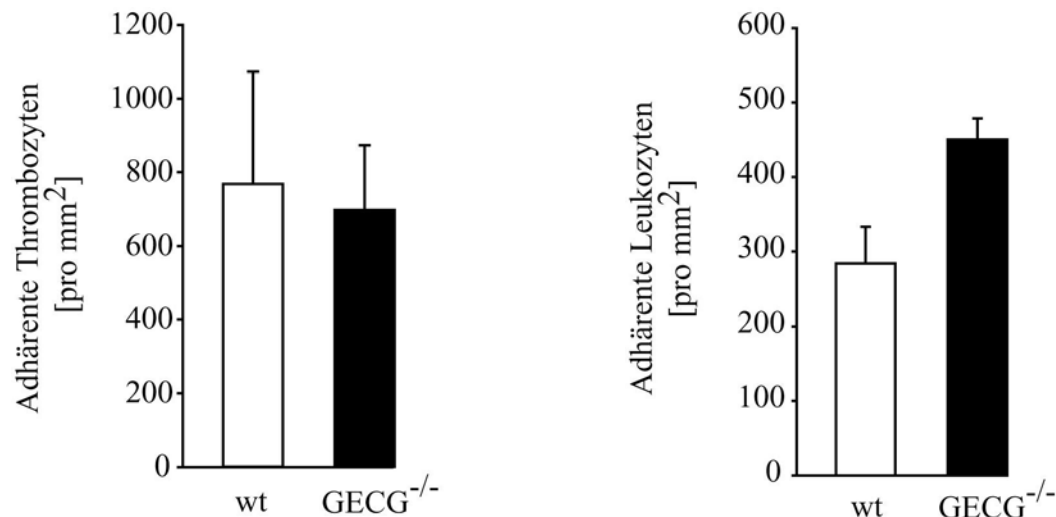


Abb. 10 Thrombozyten- und Leukozytenrekrutierung in $GECG^{-/-}$ -Tieren vs. Kontrolltieren (wt).

Bestimmung der Anzahl adhärenter Thrombozyten bzw. Leukozyten nach Ligatur. Dargestellt ist die Anzahl fluoreszierender Zellen pro mm² des geschädigten Gefäßabschnittes. Mittelwerte \pm SD

III.1.1.4 Die Fibrinbildung

Die Bildung von Fibrin an der Gefäßverletzungsstelle in der A.carotis wurde mittels Intravitalmikroskopie analysiert, dokumentiert und im Anschluss quantifiziert. Hierzu wurde ein markierter anti-Fibrin-Antikörper eingesetzt. Die Spezifität des Anti-Fibrin-Antikörpers wurde in einem vergleichbaren Thrombosemodell in der Maus nachgewiesen (Falati *et al.* 2002). Außerdem wurde im Western Blot gezeigt, dass der Antikörper Fibrin, nicht aber Fibrinogen erkennt.

Die Entwicklung des entstandenen Thrombus konnte über das Fibrin-positive Areal verfolgt werden. Der Thrombus wuchs stets von der geschädigten Region aus in Richtung Lumen und verdichtete sich anfänglich zu lokalen, wolkenähnlichen Fibrinansammlungen (Abb. 11a). Im

Gegensatz zum geschädigten Areal nach Verletzung durch Ligatur (vgl. Abb. 17) nahm die verletzte Region nach FeCl_3 -Verletzung eine wesentlich größere Fläche ein (Abb. 11a, wt).

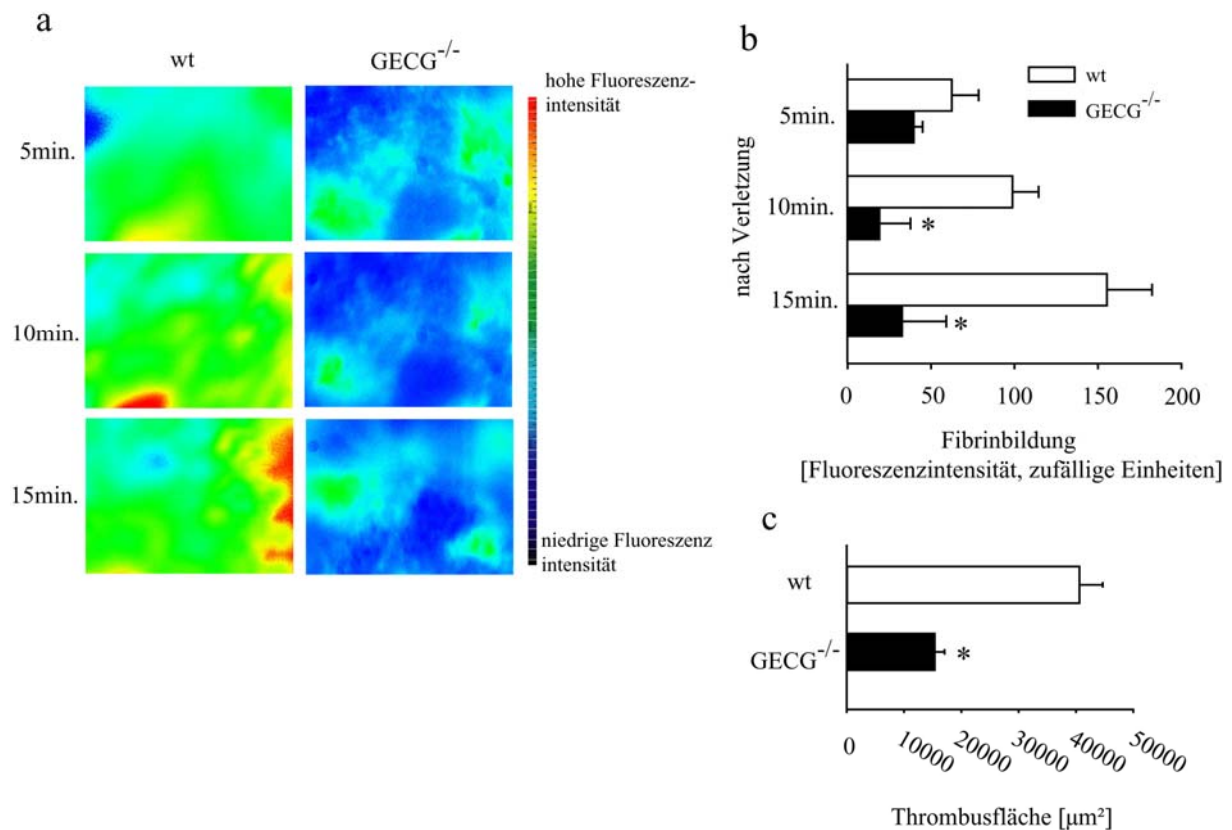


Abb. 11 Fibrinbildung in GECG^{-/-}-Tieren vs. Kontrolltieren (wt) nach FeCl_3 -Gefäßverletzung der A. carotis.

a) Messung des Fibrinsignal in wt vs. GECG^{-/-}-Tieren am verletzten Gefäßabschnitt zu den Zeitpunkten 5 Min., 10 Min., und 15 Min. nach Gefäßverletzung.

b) Messung der Fibrinbildung (quantitative Darstellung) in wt vs. GECG^{-/-}-Tieren zu den Zeitpunkten 5 Min., 10 Min., und 15 Min. nach Gefäßverletzung. Mittelwerte \pm SD, n=5-8 *p<0.05 vs. wt

c) Bestimmung der Thrombusfläche in wt vs. GECG^{-/-}-Tieren zum Zeitpunkt 15 Min. nach Gefäßverletzung.

Mittelwerte \pm SD, n=4-8, *p<0.05 vs. wt. Der genaue Versuchsablauf ist Protokoll A1 bzw. A2 zu entnehmen.

Die Fibrinbildung war in GECG^{-/-}-Tieren deutlich vermindert (Abb. 11a-c). In Kontrollmäusen stieg die Fibrinbildung nach FeCl_3 -Verletzung stetig an und erstreckte sich bereits nach 5 Min. über einen Großteil des Gefäßquerschnittes. Die detektierten Fluoreszenzwerte stiegen im weiteren Zeitverlauf linear an und erreichten nach 15 Min. das ca. 3fache des Ausgangswertes (Abb. 11b). Im Anschluss war keine Zunahme der

Fluoreszenz zu verzeichnen (vgl. Abb. 13a, Kontrolle, daher sind die Werte 15-30 Min. nach FeCl₃-Verletzung nicht im Einzelnen aufgeführt). In GECG^{-/-}-Tieren konnte kurz nach Setzen der Verletzung ebenfalls Fibrin detektiert werden. Das Fibrinsignal blieb im Gegensatz zum Zuwachs der Fluoreszenzintensität in den wt-Tieren über den gesamten Zeitraum annähernd gleich (Abb. 11a, b). Die Fibrinbildung war in den GECG^{-/-}-Tieren selbst 15 Min. nach Verletzung nicht merklich fortgeschritten, sondern wies eine abnehmende Tendenz auf. Die lokal erhöhten Fibrinsignale zeigten keine zeitabhängige Veränderung (Abb. 11a). Die Ausdehnung des Thrombus spiegelte die Unterschiede in der Fibrinbildung in Kontrolltieren vs. GECG^{-/-}-Mäusen wider. In Kontrolltieren nahm der Thrombus eine fast 4fach größere Fläche ein (Abb. 11c).

III.1.1.5 Die Rolle von Neutrophilen für die Fibrinbildung

Um zu dokumentieren, dass das Fehlen von GE bzw. CG tatsächlich für die reduzierte Fibrinbildung bei GECG^{-/-}-Tieren verantwortlich ist, wurden Neutrophile bzw. neutrophile Mikropartikel in die GECG^{-/-}-Tiere infundiert.

Die in den Tieren der einzelnen Gruppen detektierten Fluoreszenzwerte unterschieden sich 5 Min. nach FeCl₃-Verletzung kaum (Abb. 12a). Die Administration von Neutrophilen bewirkte jedoch im weiteren Zeitverlauf einen nahezu linearen Anstieg der Fluoreszenzintensität gegenüber unbehandelten GECG^{-/-}-Tieren, denen ein entsprechendes Volumen an physiologischer Kochsalzlösung infundiert wurde. Die Applikation von neutrophilen Mikropartikeln induzierte ebenfalls eine vermehrte Fibrinbildung gegenüber der Kontrolle, die nach 10 Min. (Abb. 12a) nicht weiter anstieg.

Die Infusion von isolierter GE führte zu einem deutlichen Anstieg des Fibrin-positiven Areals. Das Thrombusareal war in der Tat nach der systemischen Infusion von GE um das 4.5fache erhöht (Abb. 12b).

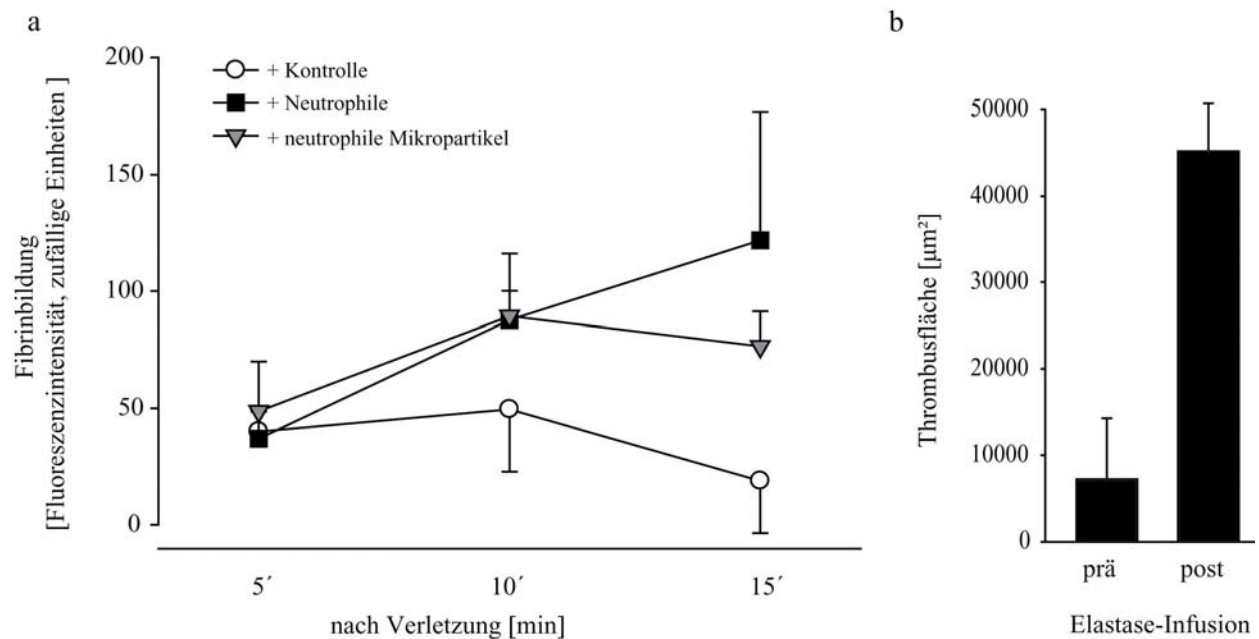


Abb. 12 Fibrinbildung am verletzten Gefäßabschnitt (FeCl_3) in $\text{GECG}^{-/-}$ -Mäusen nach verschiedenen Rescueansätzen.

a) Messung der Fibrinbildung nach Applikation von neutrophilen Mikropartikeln bzw. Neutrophilen. Mittelwerte \pm SD, n=2-5. Der detaillierte Versuchsablauf ist Protokoll B1 bzw. B2 zu entnehmen.

b) Fibrin-positives Areal vor vs. nach Applikation von isolierter GE. Mittelwerte \pm SD, n=2. Tiere wurden nach Protokoll C behandelt.

III.1.1.6 Der Einfluss von nTFPI auf die Fibrinbildung

Um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die der veränderten Thrombusbildung in den $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren zugrunde liegen, wurde der Einfluss von nTFPI und seiner proteaseresistenten Variante auf die Fibrinbildung bestimmt.

Die Infusion von nTFPI sowie der proteaseresistenten Variante T87F/L89A in wt-Tiere reduzierte die Fibrinbildung nach FeCl_3 -Verletzung um mehr als 50% gegenüber den mit Vehikeln behandelten Kontrolltieren (Abb. 13a, 5 Min.). In den anschließenden 10 Min. stieg das Fluoreszenzsignal in den Kontrolltieren und den mit nTFPI behandelten Tieren deutlich an. Demgegenüber kam es nach T87F/L89A-Administration zu einem wesentlich geringeren Anstieg der Fibrinbildung (Abb. 13a). Im weiteren Verlauf (15-30 Min. nach FeCl_3 -Verletzung) blieb das Fluoreszenzsignal in den unbehandelten Tieren nahezu unverändert, während die Fibrinbildung in den mit nTFPI behandelten Tieren weiterhin anstieg bis die Signalstärke nahezu diejenige der Kontrollgruppe erreichte. Nach Applikation von

T87F/L89A war auch nach 30 Min. noch eine deutliche Steigerung der Fibrinbildung zu verzeichnen (Abb. 13a).

Die Administration von nTFPI in wt-Tiere führte zu einer Reduktion der Fibrinbildung um etwa 30% (Abb. 13b, 15 Min.). Die mutierte Variante verminderte die Fibrinbildung zum gleichen Zeitpunkt um 70% (Abb. 13b). In den $GECG^{-/-}$ -Tieren war interessanterweise kein Unterschied der hemmenden Wirkung von nTFPI und T87F/L89A zu verzeichnen (Abb. 13b). Dies deutet darauf hin, dass GE und CG in den wt-Tieren tatsächlich die Inhibierung der Gerinnung durch TFPI korrigieren konnten und dass die GE-abhängige Proteolyse von TFPI die Fibrinbildung in vivo reguliert.

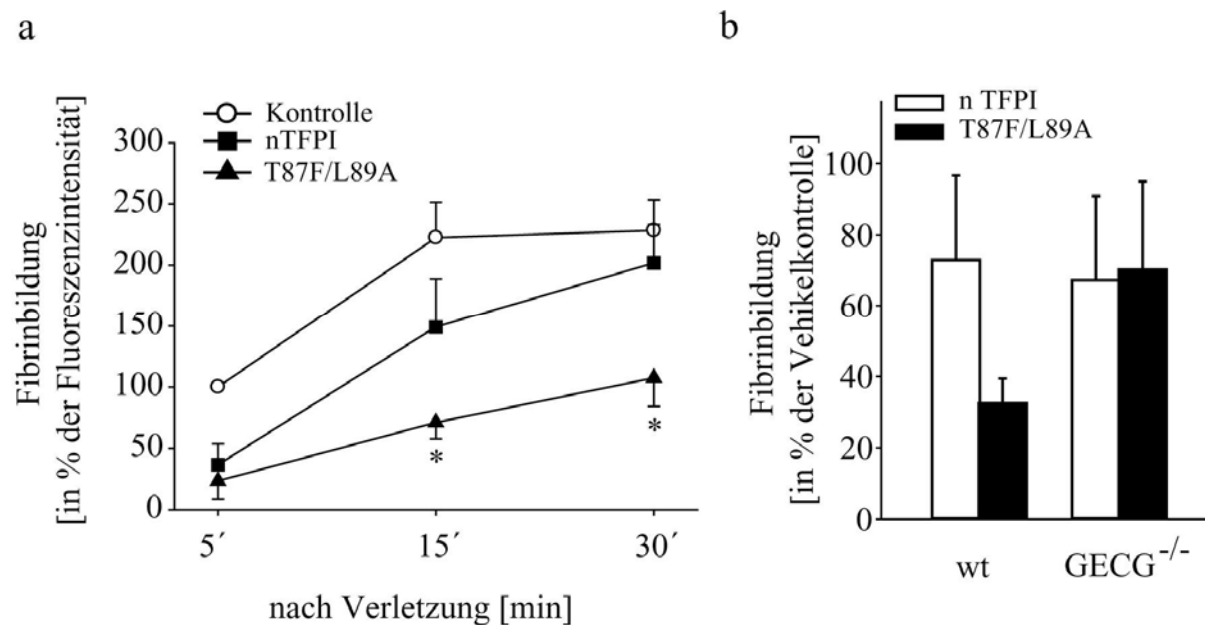


Abb. 13 Fibrinbildung nach Gefäßverletzung ($FeCl_3$) und Administration von nTFPI bzw. T87F/L89A.

a) Messung der Fibrinbildung in wt-Tieren nach Administration von nTFPI bzw. T87F/L89A.

Mittelwerte \pm SD, n=4-16, *p<0.05 vs. Kontrolle

b) Messung der Fibrinbildung in wt vs. $GECG^{-/-}$ -Mäusen nach Applikation von nTFPI bzw. T87F/L89A zum Zeitpunkt 15 Min. nach Verletzung Mittelwerte \pm SD, n=7-10. Die Tiere wurden nach Protokoll D1-D4 behandelt.

III.1.2 Der Einfluss von Mikropartikeln auf die Fibrinbildung

Die Bedeutung von Mikropartikeln für die Fibrinbildung während der arteriellen Thrombogenese wurde mit Hilfe von humanen Mikropartikeln monozytären Ursprungs untersucht.

Ex vivo fluoreszenzmarkierte Mikropartikel wurden durch systemische Administration in den Blutkreislauf von wt-Mäusen infundiert. Wir beobachteten, dass die Mikropartikel an die Läsionsstelle rekrutiert wurden und dort adhärten (Abb. 14). Die Adhärenz der Mikropartikel außerhalb der geschädigten Region war hingegen minimal. Abgesehen vom verletzten Areal hatten Mikropartikel keinen Kontakt mit der Gefäßwand und ließen sich im Blutstrom mitverfolgen. Das punktuelle Fluoreszenzsignal der Mikropartikel unterschied sich deutlich vom homogenen Fluoreszenzsignal des Fibrins (Abb. 15b).

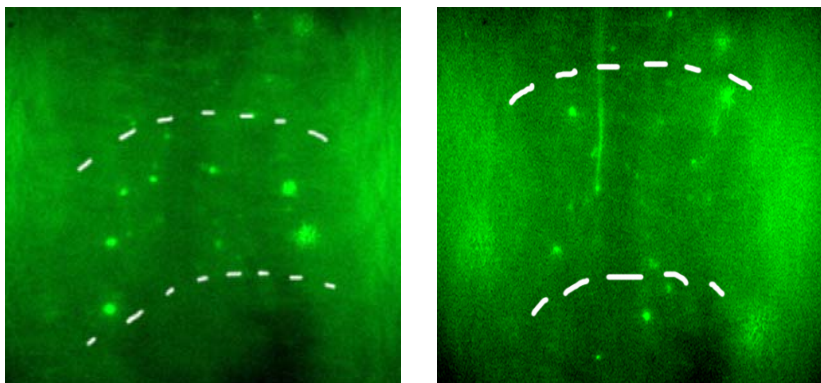


Abb. 14 Selektive Rekrutierung von Mikropartikeln an die Gefäßverletzungsstelle an der A. carotis.

Fluoreszenzmarkierte Mikropartikel zum Zeitpunkt 35 Min. nach Ligatur an der Läsionsstelle. Die Mikropartikel waren ausschließlich am verletzten Gefäßabschnitt adhären. Die eingezeichneten Umrisslinien markieren die Ligaturstelle. Die Tiere wurden nach Protokoll E1 behandelt.

Die Infusion von Mikropartikeln führte bereits 5 Min. nach der Verletzung zu einer gegenüber unbehandelten Kontrolltieren vermehrten Fibrinbildung an der Ligaturstelle (Abb. 15a, b). Das Signal konnte anhand der charakteristischen Ligaturstelle eindeutig der geschädigten Region zugeordnet werden. Unverletztes Endothel erzeugte hingegen keine messbare Fluoreszenz. Parallele Versuchsansätze unter Verwendung einer Alexa488-konjugierten Isotypkontrolle verifizierten die Spezifität des Fibrinsignals (Abb. 15b-IV). Das

Fluoreszenzsignal erstreckte sich zudem über den gesamten Gefäßdurchmesser (Abb. 15b-II), während die Fibrinbildung in Kontrolltieren zu demselben Zeitpunkt lediglich am Wandbereich des Gefäßes nachzuweisen war (Abb. 15b-I). Dies verdeutlicht, dass die Fibrinbildung in mit Mikropartikeln behandelten Tieren weiter fortgeschritten war, als in den Kontrolltieren. 30 Min. nach Ligatur wiesen die mit Mikropartikel behandelten Tiere ein um 40% höheres Fluoreszenzsignal auf (Abb. 15a), als die Kontrolltiere ohne Mikropartikelinfusion.

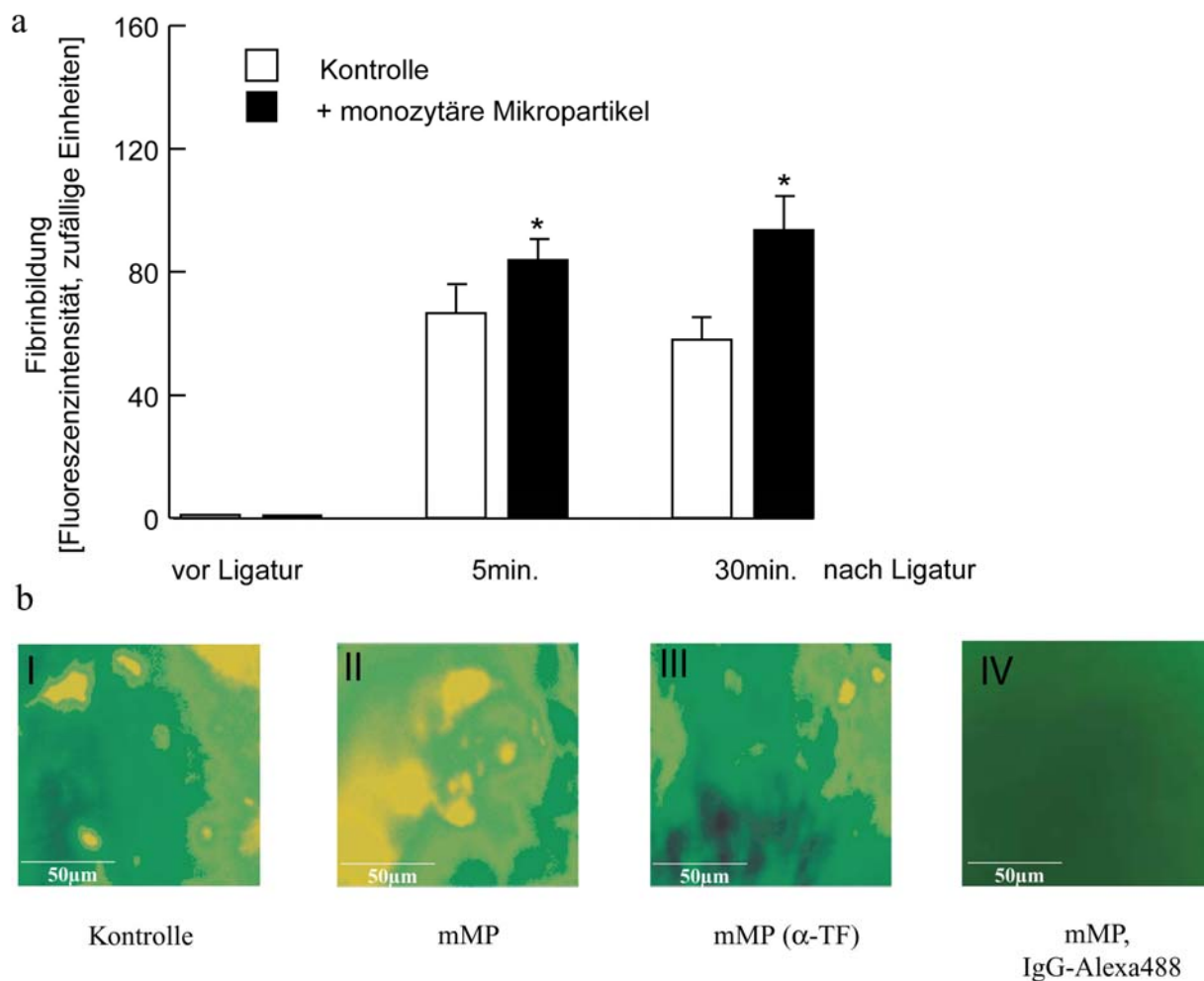


Abb. 15 Fibrinbildung an der Gefäßverletzungsstelle nach Mikropartikel-Zugabe.

Die Zugabe von Mikropartikeln führte in vivo zu einer gesteigerten Fibrinbildung. Die gesteigerte Fibrinbildung ließ sich durch die Hemmung von TF vollständig inhibieren.

a) An der Ligaturstelle gemessene mittlere Fluoreszenzintensitäten zu den Zeitpunkten vor Ligatur, 5 Min. und 30 Min. nach Ligatur in Kontrolltieren vs. mMP-behandelten Tieren. Mittelwerte \pm SD, n=4-5, *p<0.05 vs. Kontrolle. Der Versuchsablauf ist Protokoll F1-F2 zu entnehmen.
b) Fibrinbildung an der Ligaturstelle in Kontrolltieren vs. mMP-behandelten Tieren (5 Min. nach Verletzung). I. Vehikelkontrolle, II. mMP-behandeltes Tier, III. mMP (α -TF)-behandeltes Tier, IV. Infusion von mMP und IgG-Alexa488 statt des Alexa488-markierten α -Fibrin-Antikörpers. Der detaillierte Versuchsablauf ist Protokoll F1-F4 zu entnehmen. mMP=humane monozytäre Mikropartikel

In weiteren Ansätzen wurden die monozytären Mikropartikel zu murinem Vollblut zugegeben. Dadurch verkürzte sich die Fibrinbildungszeit um 70% (Abb. 16-II). Die Vorbehandlung der Mikropartikel mit einem anti-TF-Antikörper verhinderte die fibrinfördernde Wirkung der Mikropartikel vollständig (Abb. 16-III). In vivo Experimente bestätigten den inhibitorischen Effekt der mit anti-TF-Antikörper behandelten Mikropartikel (Abb. 15b-III). Die Infusion von Mikropartikeln, die mit einem Kontrollantikörper vorbehandelt waren, beeinträchtigte den aktivierenden Effekt der Mikropartikel dagegen nicht (Abb. 16-IV).

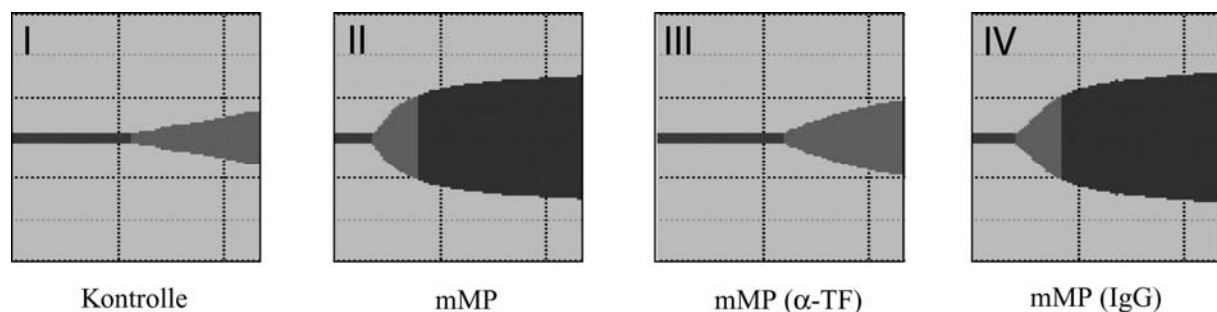


Abb. 16 Fibrinbildungsrate in murinem, kollagenstimuliertem (14µg/ml) Vollblut nach Rekalzifizierung.

Die Zugabe von Mikropartikeln zu Vollblut führte in einem ex vivo System zu einer TF-abhängigen Steigerung der Fibrinbildung.

I. Vollblut, II. mMP-versetztes Vollblut, III. mMP (α-TF) versetztes Vollblut, IV. mMP (IgG) versetztes Vollblut. Durch vertikale Linien getrennte Abschnitte entsprechen 60s. Es wurden 1.1×10^5 mMP/Ansatz verwendet. mMP=humane monozytäre Mikropartikel; α-TF= anti-TF-Antikörper

III.1.3 Regulierung der Fibrinbildung durch Thiol-Isomerasen

Voruntersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass TF durch die Thiol-Isomerase PDI reguliert wird. Auf dieser Basis wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob PDI auch die TF-abhängige Fibrinbildung reguliert und welche Mechanismen dem zugrunde liegen. Hierbei war zunächst von Interesse, ob PDI an der Gefäßverletzungsstelle exponiert wird. Für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen der endogenen PDI-Aktivität wurde ein fluoreszenzmarkierter anti-PDI-Antikörper verwendet.

Die intakte Carotis zeigte keinerlei Immunfärbung gegen PDI bzw. eine fluoreszenzmarkierte Isotypkontrolle (Abb. 17). Im verletzten Gefäß hingegen war ein hohes, über die gesamte

Läsionsstelle homogen verbreitetes Fluoreszenzsignal zu detektieren. Das Signal der parallel verwendeten Isotypkontrolle war im Vergleich dazu wesentlich niedriger. Unverletztes Endothel außerhalb der Ligaturstelle zeigte keine messbare PDI-Färbung.

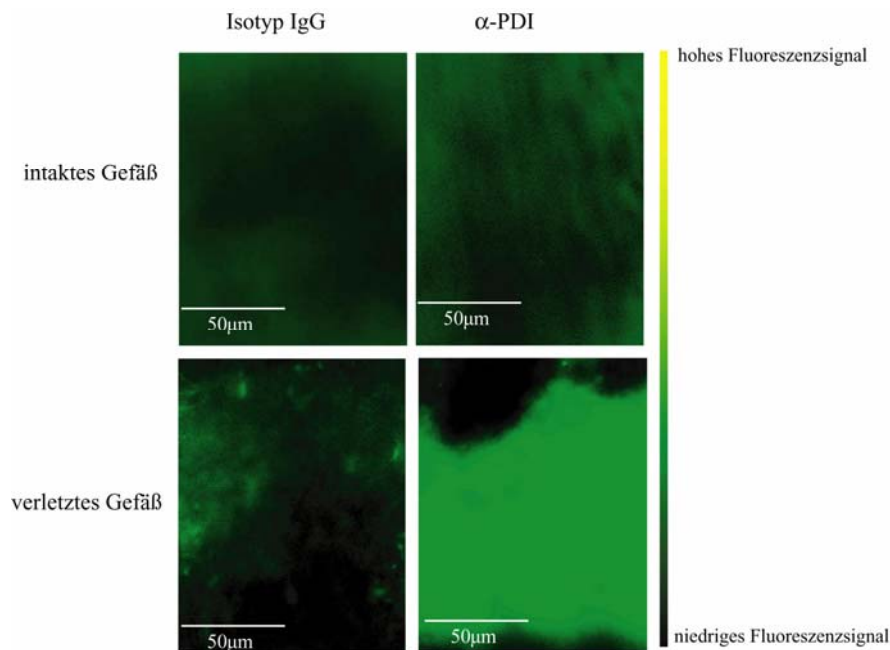


Abb. 17 Freisetzung von PDI an der Ligaturstelle.

Messung des Fluoreszenzsignals am verletzten Gefäßabschnitt im intakten vs. verletzten Gefäß von wt-Tieren nach Infusion eines Alexa488-markierten anti-PDI-Antikörpers bzw. eines mit Alexa488 markierten Isotypantikörpers. Die Tiere wurden nach Protokoll G1-G2 behandelt.

Die Verwendung des transgenen Mausstammes low-hTF ermöglichte die Erforschung der TF-Abhängigkeit der Fibrinbildung in vivo. Low-hTF-Tiere zeigten kein messbares Fibrinsignal an der verletzten Gefäßregion (Abb. 18). In Kontrolltieren (hTF) war hingegen ein deutliches Fluoreszenzsignal zu sehen. Dabei war die Fluoreszenz auf die Ligaturstelle begrenzt. Dies bestätigt, dass die arterielle Fibrinbildung nahezu vollständig TF-abhängig ist.

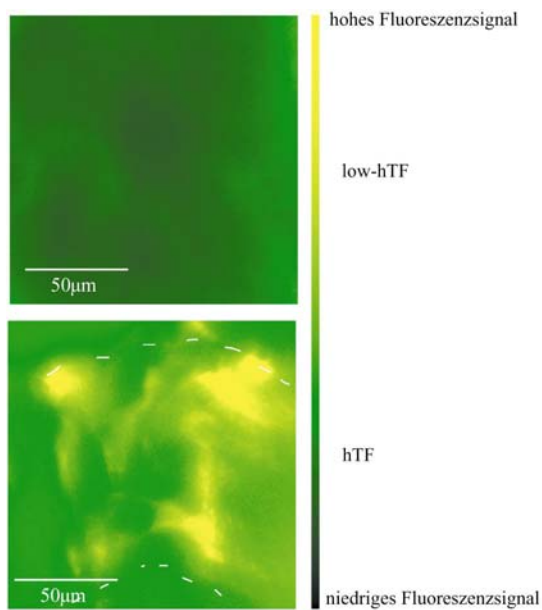


Abb. 18 Fibrinbildung in low-hTF und Kontrolltieren (hTF) an der Ligaturstelle.

Messung der Fibrinbildung nach Ligatur der A.carotis. Die eingezeichneten Umrisslinien markieren die Ligaturstelle. Die Tiere wurden nach Protokoll G3-G4 behandelt.

Nach Verabreichung eines gegen PDI gerichteten Antikörpers war die Fibrinbildung in den hTF-Tieren deutlich reduziert (Abb. 19a). Um zu prüfen, ob dabei die Hemmung der Thrombozytenaktivität durch den anti-PDI-Antikörper eine Rolle spielt, wurde die Thrombozytenrekrutierung durch Inhibition des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI gehemmt (Abb. 19b). Die Infusion des anti-PDI-Antikörpers verminderte die Fibrinbildung in α -GPVI-behandelten Tieren (Abb. 19a). Ebenso war die Fibrinbildung in Mäusen reduziert, deren GPVI-Rezeptor nicht blockiert wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass PDI direkt die TF-induzierte Fibrinbildung stimuliert.

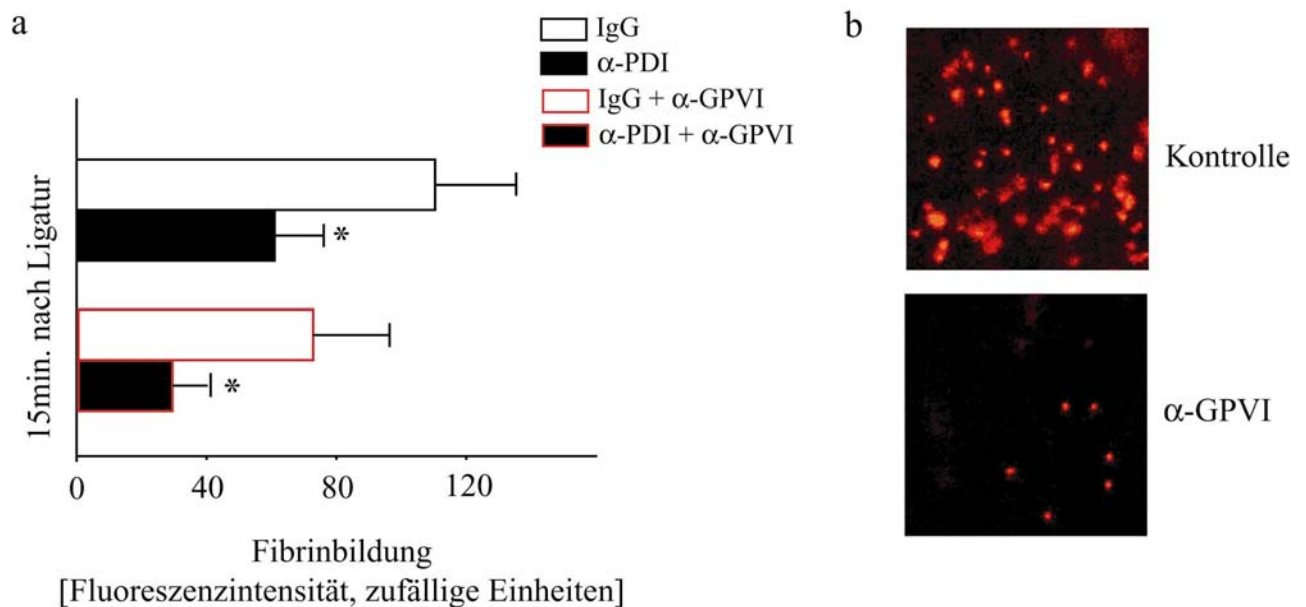


Abb. 19 Fibrinbildung nach Inhibition der PDI-Aktivität.

Die Hemmung der PDI-Aktivität führte zu einer verminderten Fibrinbildung, unabhängig von der Thrombozytenrekrutierung.

a) Fibrinbildung in α -PDI- vs. IgG-behandelten Tieren mit und ohne GPVI-Inhibition zum Zeitpunkt 15 Min. nach Ligatur.

Mittelwerte \pm SD, n=3-4, *p<0.05 gegenüber IgG bzw. IgG + α -GPVI behandelten Tieren.

b) Hemmung der Thrombozytenrekrutierung durch Infusion eines anti-GPVI-Antikörpers. Dargestellt sind die adhärensten fluoreszenzmarkierten Thrombozyten in der verletzten Gefäßregion. Die Tiere wurden nach Protokoll F5-8. behandelt.

Nach Infusion von TF-positiven Mikropartikeln wurde ein erheblicher Anstieg des Fibrinsignals beobachtet (Abb. 20a). Das Fluoreszenzsignal erhöhte sich bereits wenige Minuten nach Mikropartikelinfusion. Tiere, die nach Mikropartikelinfusion einen anti-PDI-Antikörper appliziert bekommen hatten, zeigen indessen keinen Anstieg. In diesen Tieren blieb die Fibrinbildung nahezu unverändert gegenüber dem Zeitpunkt vor Mikropartikelinfusion. Die Applikation des anti-PDI-Antikörpers hatte zu keinem der gemessenen Zeitpunkte eine signifikante Wirkung auf die Mikropartikelrekrutierung an die geschädigte Gefäßregion (Abb. 20b).

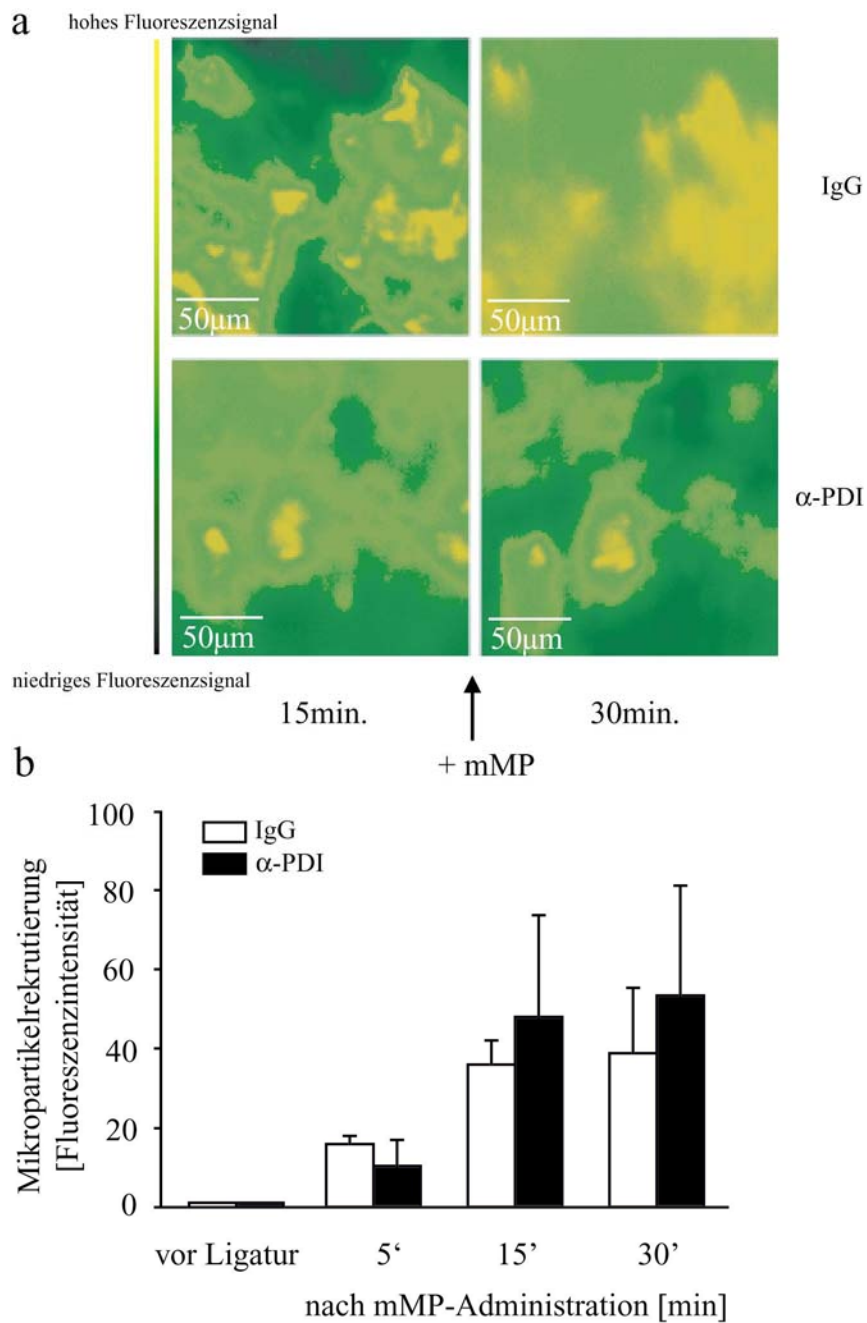


Abb. 20 Fibrinbildung durch Mikropartikel-Infusion vor/nach Inhibition der PDI-Aktivität.

Die Hemmung der PDI-Aktivität verminderte die durch TF-positive Mikropartikel induzierte Fibrinbildung.

a) Fibrinbildung vor/nach Mikropartikel-Infusion in Gegenwart von α -PDI.

b) Mikropartikelrekrutierung nach PDI-Hemmung. Mittelwerte \pm SD, n=2-3 Die Tiere wurden nach Protokoll H1-2 behandelt, für mMP-Rekrutierungsversuche nach E2-3. mMP=humane monozytäre Mikropartikel

Um zu prüfen, ob die Wirkung des Mikropartikel-assoziierten TF durch einen redoxabhängigen Prozess in vivo induziert wird, wurden die freien Thiole von TF mit DTNB derivatisiert.

Hierdurch wurde die fibrinfördernde Wirkung von Mikropartikeln vollständig gehemmt (Abb. 21a). Die Fibrinbildung war gegenüber Kontrolltieren in der Tat unverändert. Unter diesen Bedingungen war zudem keine hemmende Wirkung des anti-PDI-Antikörpers auf die Fibrinbildung zu beobachten (Abb. 21b). Diese Ergebnisse zeigen, dass die PDI-Inhibition die durch Redoxmechanismen induzierte Aktivierung des Gerinnungsstartes hemmt.

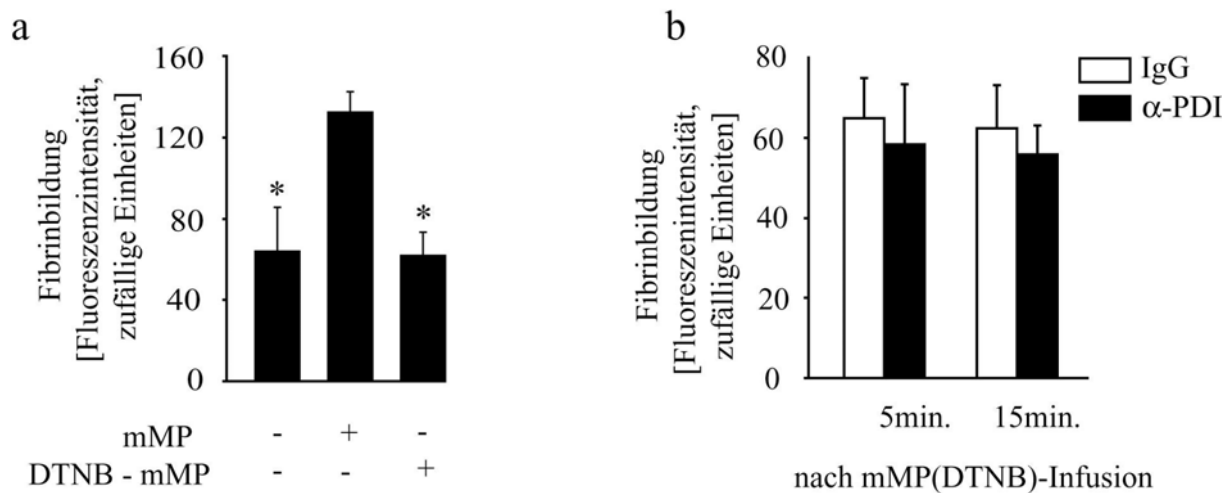


Abb. 21 Fibrinbildung an der Ligaturstelle nach Infusion von DTNB-behandelten Mikropartikeln.

Die Vorbehandlung der Mikropartikel mit DTNB führte zu einer verminderten Fibrinbildung. Unter diesen Bedingungen bewirkte die Inhibition der PDI-Aktivität keine Reduktion der Fibrinbildung.

a) Fibrinbildung nach mMP (DTNB)-Infusion in IgG bzw. α -PDI-behandelten Tieren. Mittelwerte \pm SD, n=2. Der detaillierte Versuchablauf ist Protokoll H3-E4 zu entnehmen.

b) Fibrinbildung in Kontrolltieren vs. mMP-Behandlung vs. mMP (DTNB)-Behandlung zum Zeitpunkt 10 Min. nach Infusion. Mittelwerte \pm SD, n=2-10, *p<0.05 vs. mMP-behandelter Gruppe. Die Tiere wurden nach Protokoll F1, H2 bzw. H4 behandelt. mMP=humane monozytäre Mikropartikel

Um die Wirkung von PDI auf den Gerinnungsstart direkt zu analysieren, wurde das rekombinante Protein in die Blutbahn der Mäuse infundiert. Dies bewirkte einen 1.4fachen Anstieg der Fibrinbildung im Bereich der Läsion (Abb. 22). Die Fibrinbildung war auf den verletzten Gefäßabschnitt begrenzt. Die Applikation einer Variante von PDI (PDI Δ C1,2), die keine Oxidoreduktase-Aktivität aufweist, aber eine unveränderte Chaperone-Aktivität besitzt, induzierte dagegen eine Reduktion der Fibrinbildung gegenüber der Kontrolle. Dies zeigt, dass die Steigerung der TF-abhängigen Fibrinbildung durch PDI von der Thiol-Isomerase-Aktivität des Proteins abhängt.

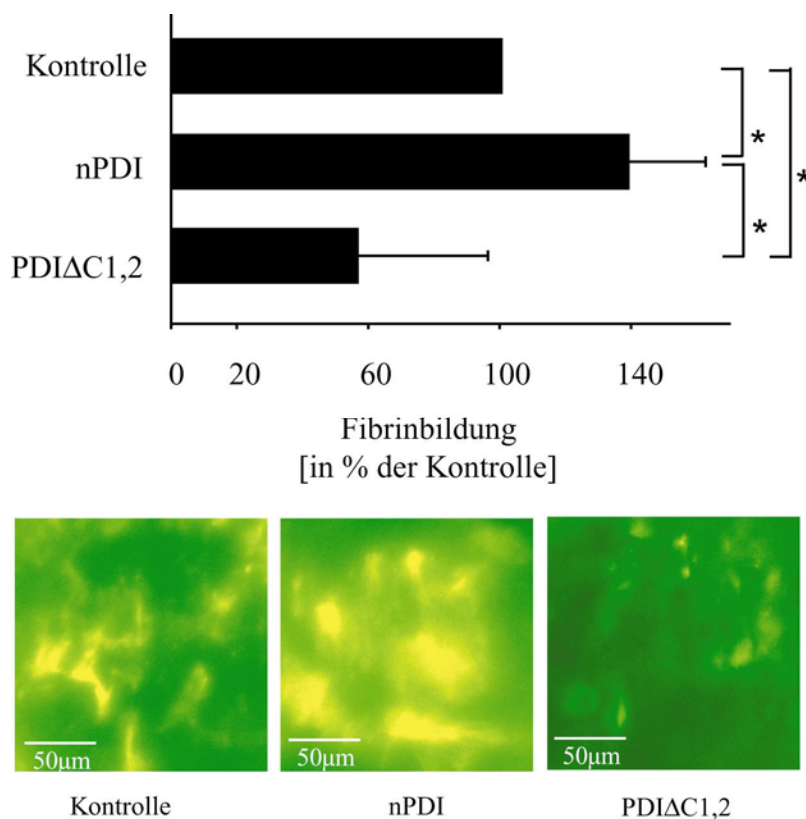


Abb. 22 Einfluss von exogenem PDI auf die Fibrinbildung in vivo.

Die Infusion von rekombinantem PDI führte zu einer Steigerung der Fibrinbildung, wohingegen die Infusion der varianten Form (PDI Δ C1,2) die Fibrinbildung verminderte.

Die Fibrinbildung wurde 10 Min. nach Verletzung an der verletzten Gefäßregion in Kontroll- vs. nPDI- bzw. PDI Δ C1,2-behandelten Tieren bestimmt. Mittelwerte \pm SD, n=4-5 *p<0.05. Der detaillierte Versuchablauf ist in Protokoll I1-I2 dargestellt.

In weiteren Ansätzen wurde das nPDI zu aktivierten Monozyten zugegeben. Dies führte zu einem Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität (3fach) gegenüber der Kontrolle (Abb. 23) und bestätigte die in vivo gewonnenen Ergebnisse (Abb. 22). Die Vorbehandlung der aktivierten Monozyten mit DTNB inhibierte die gerinnungsfördernde Wirkung nach nPDI Zugabe vollständig. Die prokoagulatorische Aktivität entsprach in etwa derjenigen von unbehandelten Monozyten. Eine Vorinkubation der Monozyten mit einem anti-TF-Antikörper und anschließender PDI-Zugabe führte ebenfalls zu einer geringeren Bildung des Gerinnungsfaktors Xa. Diese Ergebnisse bekräftigen, dass PDI den TF-abhängigen Gerinnungsstart durch Redoxmechanismen fördert.

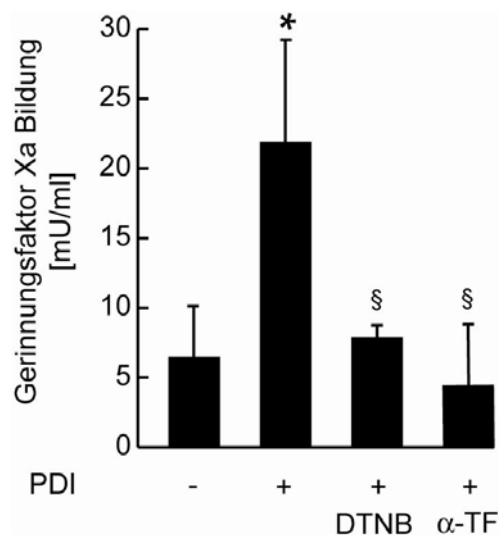


Abb. 23 Einfluss von exogenem PDI auf die prokoagulatorische Aktivität

Messung des entstandenen Gerinnungsfaktors Xa in nPDI-behandelten Monozyten. Mittelwerte \pm SD, n=4-7 *p<0.05 vs. unbehandelte Monozyten. §p<0.05 vs. Monozyten (PDI).

III.2 ENU-Screen der Thrombose/Hämostase

III.2.1 Primärscreen

Um neue Gene der Hämostase bzw. neue Funktionen bereits bekannter Gene zu identifizieren wurde ein genomweiter Hämostasestest in der Maus etabliert. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu dienen, neue krankheitsrelevante Mausmodelle in der Hämostase verfügbar zu machen.

Im Hämostasestest wurden über einen Zeitraum von 41 Monaten (30.04.2003 bis 30.09.2006) insgesamt 6932 Nachkommen mutagenisierter Männchen mittels Kugelkoagulometrie (Kap.II.2.5.2) auf Abweichungen der Gerinnungsfähigkeit des Blutes getestet. Es erfolgten separate Screens für dominant-vererbbare und rezessiv-vererbbare Merkmale (Kap. II.2.2.2.1). Für beide Screens wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere verwendet. Das Verteilungsmuster der verwendeten Tiere ist Abb. 24 zu entnehmen.

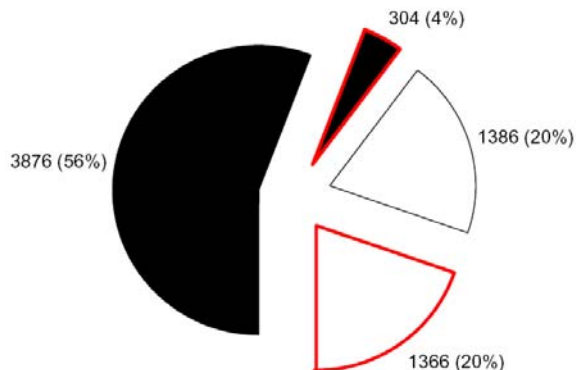


Abb. 24 Anzahl der im Primärscreen getesteten Tiere.

Dargestellt ist neben den absoluten Werten auch der prozentuale Anteil an der Gesamtanzahl. schwarz: dominant; weiß: rezessiv; rot-begrenzte Fläche: weibliche Tiere; schwarz-begrenzte Fläche: männliche Tiere

Die gemessenen Gerinnungszeiten unterlagen tagesabhängigen Schwankungen (Abb. 25a). Die Messung wurde als abweichend bewertet, wenn der bestimmte Wert um 2 SD vom Tagesmittel abwich. Der über den gesamten Zeitraum aller Messungen bestimmte Mittelwert von 75.41s (± 18.62) diente lediglich als Richtwert. Als Beispiel für die Schwankungsbreiten

sind die einzelnen Tagesmittelwerte für den Standort Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (GSF) dargestellt (Abb. 25b). Hierbei wird deutlich, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen dem rezessivem und dem dominantem Screen auftraten. Die tageszeitliche Schwankungen der Mittelwerte aus den Kugelkoagulometriemessungen deuten auf eine mögliche Sensitivität der Blutparameter gegenüber Temperatur- und Luftdruckveränderungen hin.

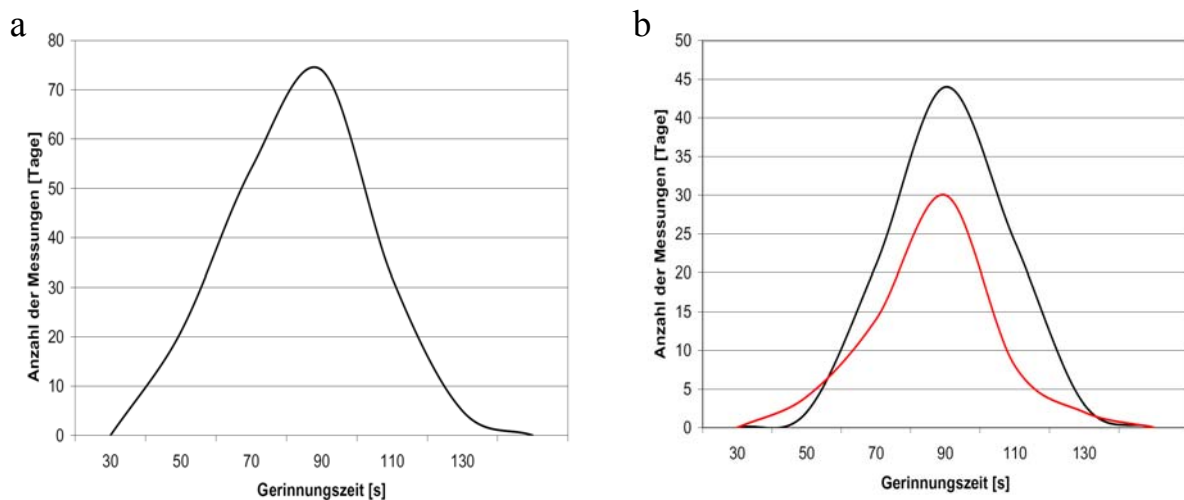


Abb. 25 Tagesmittelwerte der Gerinnungszeiten.

Die Tagesmittelwerte unterlagen zum Teil deutlichen Schwankungen. Die Tagesmittelwerte setzten sich aus Einzelmessungen von 20-40 Tieren zusammen.

a) Tagesmittelwerte der Gerinnungszeiten am Standort GSF und MVG. n= 186 Tage

b) Tagesmittelwerte der Gerinnungszeiten am Standort GSF. schwarz: dominant, rot: rezessiv. n= 152 Tage
MVG: Moorversuchsgut Badersfeld; GSF: Gesellschaft für Umwelt und Gesundheit

In 12.6% der Fälle (871 Tiere) wichen die Messungen um 2SD vom Tagesmittelwert ab. Diese Tiere wurden daher als potentielle Mutanten weiteruntersucht. Das Verteilungsmuster der auffälligen Tiere ist in Abb. 26a dargestellt und entspricht in etwa dem Verteilungsmuster der Ausgangssituation (Abb. 24). Etwa 40% der auffälligen Tiere zeigten eine verkürzte Gerinnungszeit, 57% wiesen hingegen erhöhte Werte auf (Abb. 26b). In etwa 3% der Fälle wich der gemessene Wert alternierend in die eine und andere Richtung ab. Zur Bestätigung der Abweichung wurde die Messung der Gerinnungszeit in allen verfügbaren, auffälligen Tieren (807 Tiere) nach 2-3 Wochen wiederholt. Dabei bestätigte sich der Phänotyp in etwa 30% der Fälle.

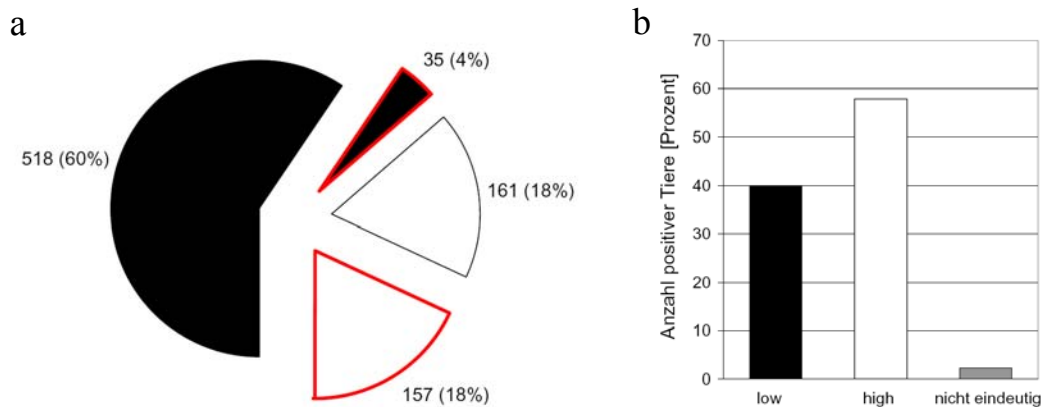


Abb. 26 Verteilungsmuster der Tiere mit abweichendem Phänotyp im Hämostasestest.

a) Verteilungsmuster nach Geschlecht und dominantem/rezessivem Screen.

b) Verteilungsmuster nach Blutgerinnungszeit.

Dargestellt ist neben den absoluten Werten auch der prozentuale Anteil an der Gesamtanzahl.

schwarz: dominant; weiß: rezessiv; rot-begrenzte Fläche: weibliche Tiere; schwarz-begrenzte Fläche: männliche Tiere; low: verkürzte Gerinnungszeit; high: verlängerte Gerinnungszeit; nicht eindeutig: alternierender Phänotyp. n=871

III.2.2 Vererbbarkeit des veränderten Phänotyps

Die Vererbbarkeit der auffälligen Merkmale wurde in 166 Fällen (20% der auffälligen Tiere, entspricht ca. 2.6% der insgesamt im Primärscreen untersuchten Tiere) durch Verpaarung mit wt-Tieren auf demselben genetischen Hintergrund geprüft (Confirmation Cross, Kap.II.2.2.2.1). Die Prüfung auf Vererbbarkeit wurde aus Platzgründen nicht bei allen auffälligen Merkmalen unternommen. Darüberhinaus standen aufgrund todes-, sowie altersbedingten Wegfalls nicht mehr alle auffälligen Tiere für eine weitere Kreuzung zur Verfügung. Das Verteilungsmuster der für die Confirmation Crosses verwendeten Tiere ist in Abb. 27 dargestellt und entspricht dem Verteilungsmuster der auffälligen Tiere (Abb. 26), sowie der Verteilung der Ausgangstiere (Abb. 24). Eine verlängerte Gerinnungszeit wurde in etwa 52% der Fälle, eine verkürzte in ca. 40% registriert.

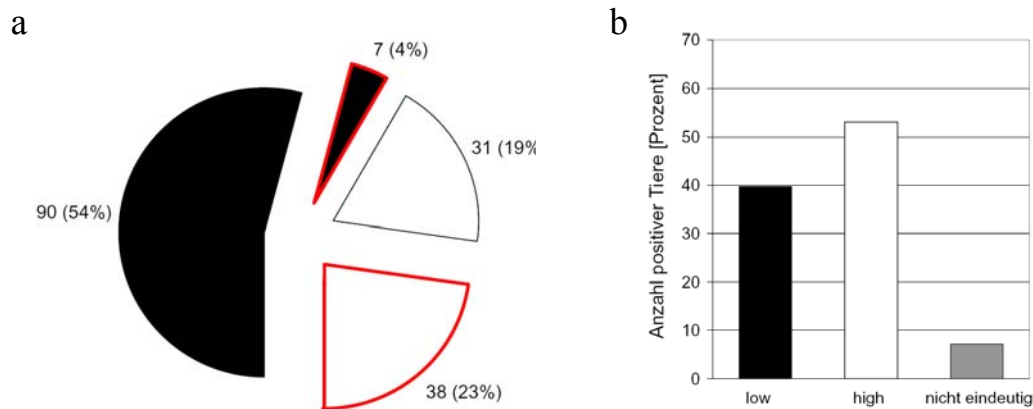


Abb. 27 Verteilungsmuster der Tiere mit verändertem Hämostase-Phänotyp vor Confirmation Cross.

a) Verteilungsmuster nach Geschlecht und dominantem/rezessivem Screen.

b) Verteilungsmuster nach Blutgerinnungszeit.

Dargestellt ist neben den absoluten Werten auch der prozentuale Anteil an der Gesamtanzahl.

schwarz: dominant; weiß: rezessiv; rot-begrenzte Fläche: weibliche Tiere; schwarz-begrenzte Fläche: männliche Tiere; low: verkürzte Gerinnungszeit; high: verlängerte Gerinnungszeit; nicht eindeutig: alternierender Phänotyp; n=166

Die Nachkommen aus diesen Kreuzungen wurden wiederum mittels Kugelkoagulometrie (Kap. II.2.5.2) auf die Gerinnungsfähigkeit ihres Blutes geprüft. In 44 Fällen (26.5%) wurde das auffällige Merkmal in der nachfolgenden Generation (F2 bzw. F4/F5) bestätigt und stabile Linien etabliert. Aus den übrigen Verpaarungen gingen zum Teil keine Nachkommen hervor, oder es konnte in den Nachkommen keine veränderte Gerinnungszeit detektiert werden. In einigen Fällen war die Penetranz der veränderten Gerinnungsfähigkeit des Blutes unter den Nachkommen sehr gering und wurde daher nicht weiterverfolgt. Das Verteilungsmuster der etablierten Linien ist Abb. 28 zu entnehmen.

Die Entnahme und das anschließende Einfrieren von Spermaproben auffälliger Männchen jeder einzelnen Linie diente der Kryokonservierung und ermöglicht eine spätere Charakterisierung aller etablierten Linien.

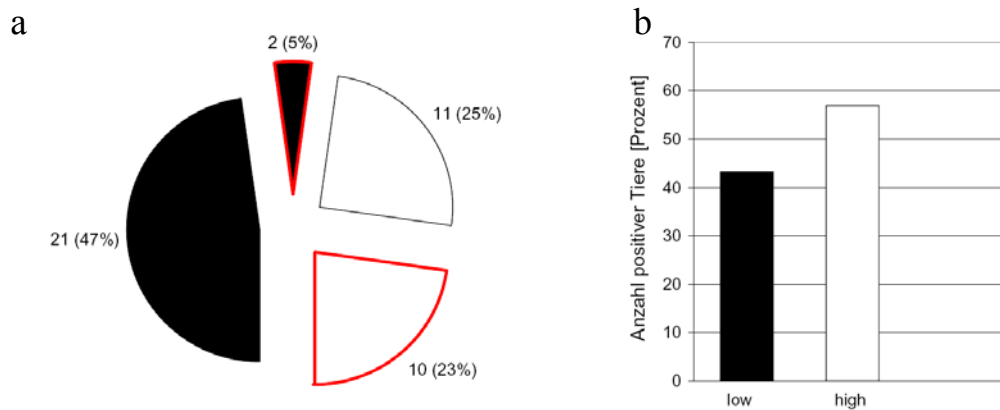


Abb. 28 Verteilungsmuster der im Hämostasescreen etablierten Linien mit stabilem vererbbaarem Phänotyp.

a) Verteilungsmuster nach Geschlecht und dominantem/rezessivem Screen.

b) Verteilungsmuster nach Blutgerinnungszeit

Dargestellt ist neben den absoluten Werten auch der prozentuale Anteil an der Gesamtanzahl.

schwarz: dominant; weiß: rezessiv; rot-begrenzte Fläche: weibliche Tiere; schwarz-begrenzte Fläche: männliche Tiere; low: verkürzte Gerinnungszeit; high: verlängerte Gerinnungszeit. n=44

III.2.3 Linie LHE004

Die Linie LHE004 (low hemostasis 004) wurde für die weitere Analyse ausgewählt, da eine gute Züchtung erfolgte und ein deutlicher Phänotyp in den Nachkommen nachgewiesen werden konnte. Die Nachkommen der F2-Generation zeigten zu 25% verkürzte Gerinnungszeiten (Abb. 29). Dies zeigt, dass die Blutgerinnungsfähigkeit in diesen Tieren signifikant erhöht ist. Tiere mit einer Gerinnungszeit von unter 60s wurden in dem verwendeten Gerinnungsassay selten gemessen. In den wenigen Fällen, in denen Messwerte von unter 60s detektiert wurden, starben die Tiere, bevor eine zweite Messung vorgenommen werden konnte. Dies deutet daraufhin, dass Tiere mit diesen Gerinnungszeiten vermutlich aufgrund tödlicher Vasookklusionen nicht lebensfähig sind. In diesem Hinblick ist der stabile und signifikante Unterschied von $\Delta 11s$ zwischen den Mittelwerten der wt-Tiere und der auffälligen Tiere der Linie LHE004 in der Tat beachtlich.

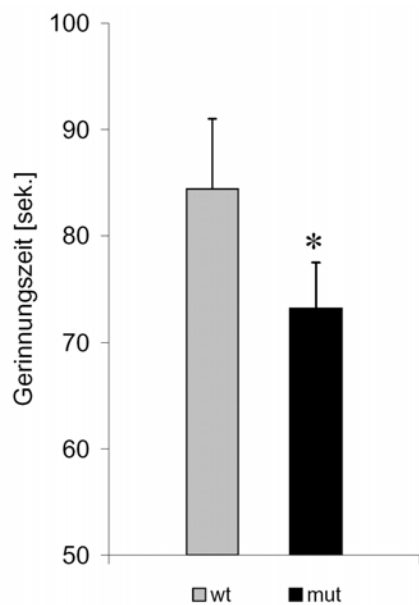


Abb. 29 Gerinnungszeiten in den Nachkommen der F2-Generation der Linie LHE004.

Bestimmung der Fibrinbildung mittels Kugelkoagulometrie. Mittelwerte \pm SD, n=16 *p<0.05. wt: wildtyp, mut: mutiert

Die Fibrinbildungszeit wurde in den Nachkommen der F2-Generation auch mittels Thrombelastographie zur Validierung des auffälligen Phänotyps untersucht. Die Fibrinbildungsrate ist in LHE004-Tieren, die potentieller Träger der Mutation sind, merklich vermindert, wie aus dem in Abb. 30 dargestellten repräsentativen Beispiel ersichtlich.

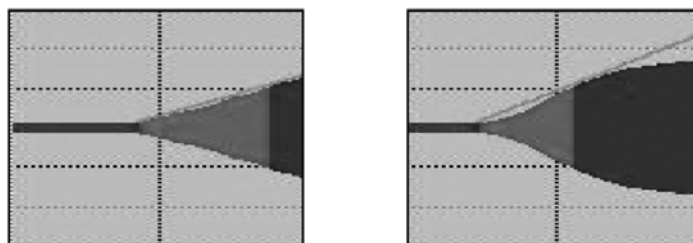


Abb. 30 Fibrinbildungszeit in wt (links) vs. LHE004-Tier (rechts).

Die Fibrinbildung ist in dem LHE004-Tier mit stabilverändertem Hämostase-Phänotyp deutlich verkürzt. Durch vertikale Linien getrennte Abschnitte entsprechen 600s.

Für die geplante Kopplungsanalyse zur Identifizierung des betroffenen Gens wurden positive Tiere der LHE004 mit Tieren des Inzuchtstammes C57/BL6 verpaart (outcross, Kap.II.2.2.2.2) und die Nachkommen mittels Kugelkoagulometrie auf die Blutgerinnungsfähigkeit geprüft. Die Bestimmung der Gerinnungszeit erfolgte in 32 Nachkommen und war in 31.3% der Fälle verkürzt (Abb. 31a). Diese auffälligen Tiere wurden erneut mit C57/BL6-Tieren verpaart (backcross, Kap. II.2.2.2.2) und wiederum die Gerinnungszeit in den Nachkommen bestimmt. In 12.3% der Nachkommen (von insgesamt 433 Tieren) konnte eine verkürzte Gerinnungszeit reproduziert werden (Abb. 31b) und genetisches Material für die bevorstehende Kopplungsanalyse gewonnen werden.

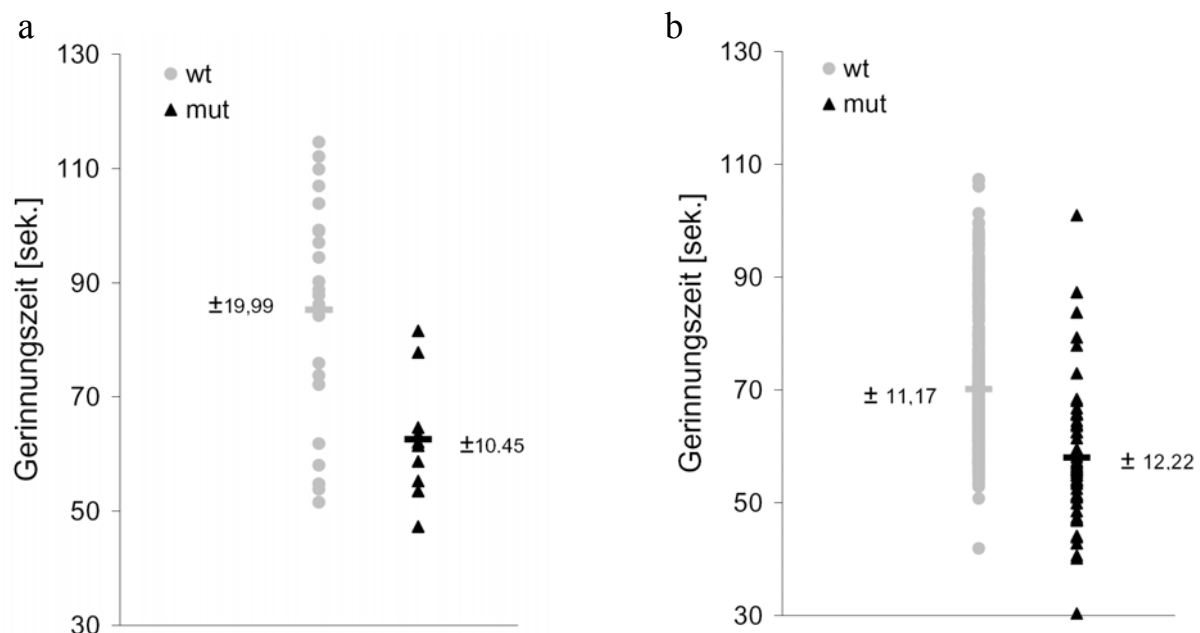


Abb. 31 Bestimmung der Fibrinbildung in den Nachkommen des Outcrosses bzw. Backcrosses mittels Kugelkoagulometrie.

a) Gerinnungszeit in den Nachkommen des Outcrosses.

b) Gerinnungszeit in den Nachkommen des Backcrosses.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Gerinnungszeit von Nachkommen aus dem Outcross (links) bzw. Backcross (rechts) der Linie LHE004. wt: wildtyp, mut: mutiert

IV. Diskussion

IV.1 Mausmodelle der arteriellen Thrombose

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene arterielle Thrombosemodelle in der Maus angewandt, um die Fibrinbildung in Echtzeit im lebenden Organismus zu untersuchen. Obwohl Mausmodelle nicht den Ansprüchen genügen können, die Situation im Menschen vollständig zu reproduzieren, lassen sich viele wertvolle Hinweise auf Regulationsmechanismen im Mausmodell gewinnen, die auch im humanen System von Bedeutung sind. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit und der Ähnlichkeit der entstandenen Thromben mit humanen Thromben wurde das FeCl₃-Verletzungsmodell gewählt (Farrehi *et al.* 1998; Kurz *et al.* 1990). Dabei ist entscheidend, dass die Applikation von FeCl₃ zur Bildung plättchenreicher Thromben führte, wie sie auch in humanen arteriellen Thromben vorkommen (Farrehi *et al.* 1998). Desweiteren erfolgte die Thrombusbildung in dem gewähltem Verletzungsmodell in demselben zeitlichen Rahmen wie im menschlichen Organismus (Day *et al.* 2004; Nieswandt *et al.* 2005). Eine weitere Ähnlichkeit mit der Thrombusbildung im Menschen ist der Verlust der Integrität der Endothelschicht (Day *et al.* 2004). Die Experimente zur *in vivo* Fibrinbildung wurden in einem zweiten Thrombosemodell, dem Ligaturmodell wiederholt, um potentielle Fehlerquellen des FeCl₃-Verletzungsmodells auszuschließen. Diese Daten sind aus Gründen der Übersicht nicht gesondert im Ergebnisteil aufgeführt. Die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Fibrinantikörpers mit hoher Spezifität (Falati *et al.* 2003) ermöglichte die Visualisierung von akkumulierendem Fibrin an der Läsionsstelle. Damit konnte die Bildung von Fibrin als Endprodukt der Gerinnungskaskade und essentielle Komponente arterieller Thromben direkt verfolgt werden, wodurch weitergehende Aussagen über die Mechanismen der arteriellen Thrombogenese getroffen werden können.

IV.2 Die Bedeutung von Serinproteasen für die Thrombusbildung

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Bedeutung von Neutrophilen und insbesondere deren Serinproteasen CG und GE für die Thrombusbildung *in vivo* zu untersuchen. Die verwendeten GECG^{-/-}-Tiere zeichnet eine beeinträchtigte Resistenz gegenüber bestimmten bakteriellen Erregern auf (Tkalcevic *et al.* 2000). Hingegen weisen die Tiere eine normale

Chemotaxis und Genese von Neutrophilen auf. Auch die Rekrutierung der Neutrophilen an den Entzündungsherd ist in den $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren normal (Tkalcevic *et al.* 2000). Die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ist dagegen beeinträchtigt (Raptis *et al.* 2005). In jüngsten Untersuchungen konnte ein thrombus- und fibrinfördernder Effekt durch GE aufgezeigt werden. Diese Untersuchungen basieren auf histologischen Untersuchungen GE-defizienter Tiere (Hirahashi *et al.* 2006). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten $\text{GECG}^{-/-}$ -Tiere wurden bisher nicht auf hämostatische Parameter geprüft.

IV.2.1 Blutungszeit/Okklusionszeit in $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren

Wir beobachteten, dass $\text{GECG}^{-/-}$ -Tiere während der Präparation stärker zu Blutungen neigten als Kontrolltiere und konnten eine verlängerte Blutungszeit bei den Tieren nachweisen. In wt-Tieren (129Sv) lagen die Blutungszeiten, übereinstimmend mit der Literatur (Gruner *et al.* 2004; Renne *et al.* 2005) bei etwa 7 Min. Eine verlängerte Blutung deutet auf eine Störung der primären Hämostase hin und wird häufig bei Tieren mit genetischen Defizienzen an Adhäsionsrezeptoren und anderen thrombozytären Zellproteinen wie $\text{GPIb}\alpha$ und vWF detektiert (Nieswandt *et al.* 2005). Die Rekrutierung der Thrombozyten an die verletzte Läsion war in $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren unbeeinträchtigt, daher kann eine veränderte Thrombozytenadhäsion als Ursache für die verlängerte Blutungszeit ausgeschlossen werden. Die deutlich verlängerten Verschlusszeiten im FeCl_3 -Modell implizieren eine defekte Thrombusbildung in den $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren. Da weder in der Thrombozyten- noch der Leukozytenadhäsion signifikante Unterschiede zwischen den $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren und den Kontrolltieren detektiert wurden, ist davon auszugehen, dass die beeinträchtigte Thrombusbildung einen direkten Effekt der fehlenden Serinproteasen darstellt.

IV.2.2 Reduzierte Fibrinbildung in $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren

Die Fibrinbildung war in den $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren übereinstimmend mit der defekten Thrombusbildung deutlich reduziert. Trotz lokaler Fibrinansammlungen konnte sich kein kompakter Thrombus ausbilden und das Gefäß verschließen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass trotz normaler Thrombozyten- und Neutrophilenrekrutierung an den verletzten Gefäßabschnitt die Gerinnung in den $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren nicht gestartet werden konnte.

Da die Infusion von humanen Neutrophilen in physiologischer Konzentration die normale Fibrinbildung in den $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren wiederherstellen konnte, ist die verminderte Fibrinbildung auf eine Defizienz der Proteasen in Neutrophilen, und nicht auf andere CG und GE tragende Zellen, wie z.B. Monozyten (Owen *et al.* 1999) zurückzuführen. Die hohe Homologie zwischen murinen und humanen Genen für CG und GE (Aveskogh *et al.* 1997) schließen ferner einen Spezies-spezifischen Effekt aus. Die Wiederherstellung der Fibrinbildung wurde zu einem hohen Anteil ebenfalls durch die Infusion humaner neutrophiler Mikropartikel erlangt. Da neutrophile Mikropartikel entsprechend ihren Ursprungszellen GE (Berckmans *et al.* 2002) und CG enthalten, bestätigen die Resultate eine Beteiligung der Serinproteasen an der Fibrinbildung. Der anfänglich identische Fibrinanstieg nach Infusion von Neutrophilen und neutrophilen Mikropartikeln lässt sich durch die schnelle Rekrutierung der beiden Zelltypen an den wachsenden Thrombus erklären. Im weiteren Zeitverlauf war ein Fibrinanstieg nur nach Neutrophilenadministration zu verzeichnen. Potentielle Ursachen hierfür könnten in der Menge applizierter neutrophiler Mikropartikel bzw. der geringeren Menge an verfügbaren Serinproteasen in den neutrophilen Mikropartikeln liegen. Denkbar wäre weiterhin eine beginnende Clearance der neutrophilen Mikropartikel, die das Absinken der Fibrinbildung zu diesem späteren Zeitpunkt bewirkt. Die Wiederherstellung der Fibrinbildung nach Verabreichung von isolierter GE bestätigt definitiv, dass die für die Initialisierung der Gerinnung verantwortlichen Komponenten der Neutrophilen bzw. neutrophilen Mikropartikel die untersuchten Serinproteasen darstellen.

IV.2.3 Regulierung der in vivo Thrombusbildung durch TFPI

Für die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die zu einer reduzierten Fibrinbildung in $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren führten, untersuchten wir die Rolle von TFPI, dem zentralen Antagonisten des Gerinnungsstartes. Wir fanden, dass die systemische Infusion von rekombinantem TFPI (rTFPI) in wt-Tiere bereits 5 Min. nach Verletzung eine Reduktion der Fibrinbildung um mehr als 50% induzierte (Abb. 13b). Im Einklang damit führt eine Überexpression von TFPI im Tiermodell zu einer verminderten Thrombusbildung (Zoldhelyi *et al.* 2000). Reduzierte Spiegel an endogenem TFPI sind hingegen mit einer erhöhten Thrombusbildung assoziiert (Ragni *et al.* 2000).

Im weiteren Zeitverlauf war die Fibrinbildungsrate jedoch unverändert. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Inaktivierung von TFPI in beiden Versuchsgruppen gleichschnell und in

gleichem Ausmaß geschah. In dem angewandten Thrombosemodell (FeCl_3) war infolge der Gefäßschädigung und der damit verbundenen fortwährenden Freisetzung von TF aus der Gefäßwand keine vollständige Hemmung der Fibrinbildung zu erwarten. Die Fibrinbildung erreichte in wt-Tieren nach 15 Min. ein Plateau, wohingegen in den rTFPI-behandelten Tieren ein weiterer Fibrinzuwachs bis zum Niveau der Kontrolltiere zu verzeichnen war. Dies bestätigt, dass in den rTFPI-behandelten Tieren die maximale Fibrinbildung nach Inaktivierung des exogen zugeführten rTFPI erreicht wird.

Bekannterweise können die neutrophilen Serinproteasen GE und CG TFPI *in vitro* spalten (Petersen *et al.* 1992). Diese Spaltung geht mit einer verminderten Hemmung von TF und somit einer erhöhten prokoagulatorischen Aktivität einher (Higuchi *et al.* 1992). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gelang es, TFPI-Mutanten herzustellen, deren Spaltungsstellen für CG und GE mutiert sind (Bidzhekov 2005) und die aufgrund dessen resistent gegenüber der proteolytischen Spaltung durch die genannten Serinproteasen sind. Die Administration von einer dieser TFPI-Varianten (T87F/L89A) bewirkte zunächst eine vergleichbare Hemmung der Fibrinbildung wie die nicht-mutierte Form. Im weiteren zeitlichen Verlauf jedoch zeigten die mit T87F/L89A-behandelten Tiere eine deutlich verminderte Fibrinbildungsrate. Nach Applikation des proteaseresistenten TFPI persistierte demnach die hemmende Wirkung von TFPI. Dies zeigt, dass die Spaltung von TFPI unter *in vivo* Bedingungen erheblich an der Thrombusbildung beteiligt ist. Diese Ergebnisse implizieren desweiteren, dass die Serinproteasen GE und CG für die TFPI-Spaltung im intakten Organismus verantwortlich sind.

Die Infusion von nativem TFPI in $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren bewirkte eine prozentual vergleichbare Reduktion der Fibrinbildung wie die Administration in wt-Tiere. Hingegen war nach Infusion von T87F/L89A ein deutlicher Unterschied zwischen $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren und wt-Tieren festzustellen. Die Infusion von mutiertem TFPI führte in den $\text{GECG}^{-/-}$ -Tieren im Gegensatz zu den wt-Tieren zu keiner weiteren Reduktion der Fibrinbildung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Serinproteasen GE und CG den Gerinnungsstart *in vivo* aktivieren, indem sie TFPI spalten. Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen erstmals, dass die Serinproteasen CG und GE im intakten Organismus für die arterielle Thrombusbildung essentiell sind.

Die Lokalisation und die genauen Mechanismen der TFPI-Spaltung sind noch weitgehend ungeklärt. Es ist mehrfach beschrieben worden, dass in dem von Plättchen und Neutrophilen über PSGL-1/P-Selectin-Bindung gebildeten „microenvironment“ (Evangelista *et al.* 2003)

Serpine ihre inhibierende Funktion nicht entfalten können (de Gaetano *et al.* 1999; Evangelista *et al.* 1993). Diese Situation entspricht den Verhältnissen im arteriellen Thrombus. Auch neutrophile Mikropartikel könnten Bestandteile dieses interzellulären Verbundes sein. Das von Thrombozyten bzw. thrombozytären Mikropartikeln nach Aktivierung freigesetzte TFPI (Maroney *et al.* 2006; Novotny *et al.* 1988) wird nach den vorliegenden Ergebnissen von den aus neutrophilen und neutrophilen Mikropartikeln freier werdenden Serinproteasen GE und CG gespalten und initiiert die Gerinnung am wachsenden Thrombus. Thrombozyten setzen TFPI nach Aktivierung mit Kollagen und Thrombin frei (Maroney *et al.* 2006). Im fibrinreichen Plättchenthrombus sind Thrombozyten diesen beiden Agonisten ausgesetzt und sezernieren daher TFPI. Dennoch bleibt die genaue Lokalisation der TFPI-Spaltung ungeklärt. Aufgrund der Verteilung der beteiligten Komponenten wäre eine Spaltung auf der Plättchenoberfläche, im interzellulären Raum oder auf der Neutrophilen-Oberfläche denkbar. Neutrophil extracellular traps (NETs) sind vor kurzem entdeckte (Brinkmann *et al.* 2004) Strukturen, die von aktivierten Neutrophilen freigesetzt werden. Die aus DNA und Elastase bestehenden NETs spielen eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von Bakterien (Brinkmann *et al.* 2004; Urban *et al.* 2006; Wartha *et al.* 2007). Arbeiten aus unserer Gruppe deuten zudem daraufhin, dass die externalisierten Nukleosomen eine Matrix für die TFPI-Spaltung durch Elastase darstellen könnten.

IV.3 Die Rolle von Mikropartikeln für die Thrombusbildung in vivo

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Intravitalmikroskopie dokumentiert werden, dass humane monozytäre Mikropartikel in vivo in einem arteriellen Thrombosemodell der Maus an die Läsionsstelle rekrutiert werden und dort adhären (Abb. 14). Die Aktivierung von Monozyten induziert deren TF-Expression und führt zur Abschnürung TF-haltiger Mikropartikel (Satta *et al.* 1994). Bereits 1999 konnte in vitro gezeigt werden, dass nach Perfusion Kollagen-beschichteter Glasplatten mit humanem Blut TF-positive Mikropartikel an den entstehenden Thrombus adhären (Giesen *et al.* 1999). In einem Lasermodell der Thrombose in vivo wurde in der Tat dokumentiert, dass Mikropartikel in den Thrombus inkorporiert werden (Falati *et al.* 2003).

In unseren Untersuchungen führten monozytäre Mikropartikel in vitro und in vivo zu einer deutlichen Steigerung der Fibrinbildung. Die auffällig schnelle Wirkung der Mikropartikel auf die Fibrinbildung in vivo ist durch die schnelle Rekrutierung der Mikropartikel an den

verletzten Gefäßabschnitt zu erklären. Die Rekrutierung von Mikropartikeln an den wachsenden Thrombus findet im Tiermodell schneller statt als die Rekrutierung von Leukozyten (Gross *et al.* 2005) und ist daher möglicherweise von erheblicher Bedeutung für das Thrombuswachstum. Das hohe prokoagulatorische Potential der Mikropartikel verkürzte die Fibrinbildungszeit deutlich. Im Tiermodell bewirkte die Mikropartikel-Infusion bereits 5 Min. nach Verletzung einen signifikanten Fibrinanstieg und bestätigte damit die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse. Der fibrinfördernde Effekt war 30 Min. nach Verletzung noch weiter fortgeschritten. Dies unterstreicht die adhäsiven Eigenschaften der Mikropartikel, die auch die Rekrutierung von Thrombozyten und Leukozyten steigern können und dadurch das Thrombuswachstum fördern. Das prokoagulatorische Potential der Mikropartikel ist nahezu ausschließlich TF-abhängig. Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Vorbehandlung der Mikropartikel mit einem monoklonalen Antikörper gegen TF den fibrinfördernden Effekt *in vitro* und *in vivo* vollständig aufhebt. Diese Befunde stimmen mit *in vitro* Ergebnissen überein, die TF als prokoagulatorische Komponente von Mikropartikel identifiziert haben (Muller *et al.* 2003; Sturk-Maquelin *et al.* 2003).

Es ist mittlerweile weitgehend anerkannt, dass unter physiologischen Bedingungen neben dem vaskulären TF eine intravaskuläre Form von TF existiert (Engelmann *et al.* 2003; Giesen *et al.* 1999; Osterud *et al.* 2006). Über die Rolle des intravaskulären TF für die Thrombusbildung *in vivo*, der zu einem erheblichen Teil mit Mikropartikeln assoziiert ist (Muller *et al.* 2003), besteht hingegen noch kein Konsens. In einem Laserverletzungsmodell der arteriellen Thrombose wurde eine klare Beteiligung hämatopoetischen TF für die Fibrinbildung nachgewiesen (Chou *et al.* 2004). Dies konnte in einem photochemischen Verletzungsmodell hingegen nicht bestätigt werden (Day *et al.* 2005). In dem hier angewandten Thrombosemodell der FeCl₃-induzierten Verletzung stellt aufgrund der massiven Verletzung vermutlich vorwiegend der TF der Gefäßwand den zentralen Auslöser der Fibrinbildung dar. Die vorliegenden Resultate zeigen jedoch, dass auch der Mikropartikelgebundene TF zur Fibrinbildung *in vivo* beiträgt. Auch konnte eine wichtige Rolle der Mikropartikel für das Thrombuswachstum ermittelt werden. Die Diskrepanz zwischen den einzelnen Untersuchungen könnte durch die unterschiedlichen Verletzungsmodelle bedingt sein. Da es im Lasermodell zu einer schnellen Rekrutierung TF-positiver Mikropartikel kommt und sehr frühe Zeitpunkte analysiert werden, ist die Bedeutung des mikropartikelären TF in diesem Modell möglicherweise eher evident als in makrovaskulären

Verletzungsmodellen, in denen die Thrombusbildung zumeist über lange Zeiträume untersucht werden.

IV.4 Der Einfluss von Thiol-Isomerasen auf die Fibrinbildung

IV.4.1 PDI-Aktivität in vivo

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass nach Verletzung des Endothels die Thiol-Isomerase PDI massiv an der Läsion freigesetzt wird. Das Fluoreszenzsignal war auf die verletzte Region begrenzt. Die Homogenität des Signals deutet darauf hin, dass PDI nicht nur aus Thrombozyten (Essex *et al.* 1995), sondern zu einem erheblichen Teil auch aus Zellen der Gefäßwand freigesetzt wird. PDI gewährleistet im rER die korrekte Faltung von Proteinen. Die genaue Funktion von extrazellulärem PDI ist hingegen noch weitgehend ungeklärt (Turano *et al.* 2002).

IV.4.2 Endogenes PDI reguliert die TF-abhängige Fibrinbildung in vivo

Zur Analyse der Bedeutung von PDI für die Fibrinbildung in vivo wurde das Ligaturmodell zur Induktion der arteriellen Thrombusbildung angewandt. Da die Fibrinbildung in low-hTF-Mäusen (Parry *et al.* 1998) gering war (Abb. 18), jedoch in hTF-Mäusen deutlich sichtbar war, ist davon auszugehen, dass die Fibrinbildung in vivo in diesem Verletzungsmodell direkt durch TF gestartet wird.

Nach Hemmung der PDI-Aktivität war die TF-abhängige Fibrinbildung erheblich reduziert (Abb. 19a). Die Herkunft des aktiven PDI wurde durch Verabreichung eines funktional inhibierenden GPVI-Antikörpers geprüft. Nach Hemmung der Adhäsion von Thrombozyten im verletzten Areal durch den anti-GPVI-Antikörper (Abb. 19a,b), war gleichwohl eine Reduktion der Fibrinbildung zu verzeichnen. Diese Resultate zeigen, dass vornehmlich aus den verletzten Gefäßwandzellen freigesetztes PDI für die Regulation der TF-abhängigen Fibrinbildung verantwortlich ist. Auch die durch Mikropartikel-gebundenen TF induzierte Fibrinbildung war nach Inhibition von PDI vermindert (Abb. 20a). Eine Wirkung des anti-PDI-Antikörpers auf die Rekrutierung von Mikropartikeln konnte ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass PDI TF während verschiedener Phasen der Thrombusbildung aktivieren kann.

IV.4.3 Mechanismen der TF-Regulation durch PDI

Es ist bekannt, dass das membranproximale Cysteinpaar (Cys186/Cys209) in der extrazellulären Domäne von TF für dessen prokoagulatorische Aktivität erforderlich ist (Rehemtulla *et al.* 1991). Aufgrund seiner besonderen Lage und Struktur ist dieses Cysteinpaar für Modifikationen durch Thiol-Isomerasen prädestiniert (Banner *et al.* 1996). Die Thiol-Isomerase PDI ist in der Lage, Enzyme zu oxidieren, zu reduzieren und zu isomerisieren (Ellgaard *et al.* 2005). Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, die der TF-Regulation durch PDI *in vivo* zugrunde liegen, wurden Mikropartikel vor der systemischen Infusion in den murinen Blutkreislauf mit dem Thiolreagenz DTNB behandelt. DTNB derivatisiert freie Thiole und wurde eingesetzt, um zu prüfen, ob es sich bei der TF-Regulation durch PDI um einen redoxsensitiven Mechanismus handelt.

Wir konnten zeigen, dass die Vorbehandlung von TF-positiven Mikropartikeln mit DTNB in der Tat den fibrinfördernden Effekt von TF-Mikropartikeln vollständig inhibiert. Die beobachtete Reduktion in der Fibrinbildung ist darauf zurückzuführen, dass nach Derivatisierung der freien Thiole keine Disulfidbrückenbildung stattfinden kann. Eine Änderung der Disulfidbrücken durch Thiol-Isomerasen kann erwiesenermaßen zu einer schnellen Änderung der Proteinfunktion führen (Patel *et al.* 2004). Desweiteren konnten wir nach DTNB-Vorbehandlung keine Hemmung durch den anti-PDI-Antikörper erzielen. Dies bestätigt die Vermutung, dass die Oxidation der Thiole in Disulfidbrücken durch den Antikörper blockiert wird. Neuere Untersuchungen bestätigen, dass die Spaltung der Disulfidbrücke Cys186-Cys209 zu einer verminderten prokoagulatorischen Aktivität führt (Ahamed *et al.* 2006). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass PDI die Disulfidbrückenbindung des Cysteinpaars Cys186/Cys209 von TF induziert und dadurch eine schnelle Änderung der TF-Funktion bewirkt.

Zur weiteren Überprüfung des oben beschriebenen Mechanismus wurde den Tieren im arteriellen Thrombosemodell exogenes PDI infundiert. Hierbei wurde eine gesteigerte Fibrinbildung beobachtet, die mit der verminderten Fibrinbildung nach anti-PDI-Antikörper konform ist. Die Verabreichung von exogenem PDI verstärkt demnach die Wirkung von

endogenem PDI. Endogenes PDI wird vermutlich nicht ausreichend freigesetzt, um den gesamten Pool an kryptischem TF zu aktivieren. Die Verabreichung einer mutierten Variante des Proteins (PDI Δ C1,2) mit Verlust der Oxidoreduktase-Funktion bei unbeeinträchtigten Substratbindungseigenschaften (Winter *et al.* 2002) führte indessen zu einer Reduktion der Fibrinbildung im Tiermodell. Endogenes PDI induziert demnach eine TF-Oxidation und erhöht damit dessen prokoagulatorische Aktivität. Zusammenfassend dokumentieren unsere Beobachtungen erstmals *in vivo*, dass nach einer Verletzung PDI aus Thrombozyten und Zellen der Gefäßwand an der Läsion freigesetzt wird. Dieses PDI führt über die Bildung von Disulfidbrücken zu einer Aktivierung des verschlüsselten TF auf Zelloberflächen und induziert daher die Fibrinbildung *in vivo*.

IV.5 ENU-Screen der Hämostase

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen genomweiten ENU-Hämostasescreen zu etablieren. Zur Bestimmung des Hämostase-Phänotyps wurde die Messung der Gerinnungszeit mittels Kugelkoagulometrie verwendet. Diese konnte schnell und mit hohen Durchsatzraten durchgeführt werden. Die gemessenen Mittelwerte wiesen starke Schwankungen auf, für die eine circadiane Schwankung der Blutgerinnungsfähigkeit (Bertolucci *et al.* 2005) verantwortlich sein könnte. Der Test ermöglichte die Identifikation von auffällenden Phänotypen im dominanten und im rezessiven Screen. Die Vererbbarkeit von Mutationen war in beiden Screens mit etwa gleicher Wahrscheinlichkeit festzustellen. Der geringfügig erhöhte Anteil im rezessiven Screen etablierter Linien deutet möglicherweise auf eine stärkere Stabilität der Integration rezessiver Mutationen ins Genom hin. Mutationen der Hämostase konnten unabhängig vom Geschlecht der Tiere detektiert werden. Die Vererbung der Mutation ist ebenfalls geschlechtsunspezifisch. Der angewandte Hämostasescreen eignet sich somit für die Generierung von stabilen mutanten Mauslinien der Hämostase.

ENU induziert neben vererbbaaren Mutationen auch Proteinmodifikationen, die nicht vererbt werden (Noveroske *et al.* 2000), daher werden bis zu 50% der detektierten Mutationen nicht auf die nächste Generation übertragen (Justice 2000). Im Hämostasescreen wurden etwa 25% der auffälligen Phänotypen vererbt (Kap. III.2.2). Diese Penetranz liegt somit deutlich unter der erwarteten Penetranz. Sie ist unter Umständen dadurch zu erklären, dass auf besonders

auffällige Abweichungen fokussiert wurde und Phänotypen mit weniger deutlich abweichenden Gerinnungszeiten nicht weiterverfolgt wurden. Desweiteren gingen nicht aus allen angesetzten Verpaarungen Nachkommen hervor. Dies mag unter anderem am fortgeschrittenen Alter der Tiere sowie an der Mutation selber liegen. In diesem Zusammenhang sind in der Literatur Auffindungsraten der in ENU-Screens generierten Mutationen von 2% der Gesamtnachkommen beschrieben (Brown *et al.* 2001). Die im Hämostasescreen stabilen mutanten Mauslinien führten zu einer über alle generierten Nachkommen ermittelten Aufdeckungsrate von 1.2% und decken sich demnach mit den Literaturangaben.

Der Hämostasescreen ermöglicht die Detektion von Mutationen, die zu einer verstärkten Blutgerinnung führen (low), so wie die Identifikation von Mutationen, die zu einer verminderten Gerinnungsfähigkeit (high) führen. Der prozentuale Anteil der auffälligen Phänotypen mit verlängerter Gerinnungszeit lag etwas höher, und lässt sich vermutlich zum Teil auf die Methode zurückführen, die in diese Richtung mehr Spielraum bietet. Tiere mit extrem verkürzten Gerinnungszeiten sind zudem wahrscheinlich nicht lebensfähig, da keine Messwerte unter etwa 50s bestimmt wurden. Das Auftreten alternierender Phänotypen lässt sich unter anderem durch die in einigen Fällen offensichtlich nicht ausreichende Regenerationszeit von 2-3 Wochen zwischen den Messungen erklären. Auffällige Gerinnungszeiten in die eine oder andere Richtung wurden grundsätzlich ähnlich vererbt, da die Verteilung low/high unter den Nachkommen (Abb. 28) der Verteilung der auffälligen Tiere (Abb. 26) und der Verteilung der angesetzten Verpaarungen (Abb. 27) entsprach.

Die mittels Kugelkoagulometrie gewonnenen Gerinnungszeiten ließen sich in thrombelastographischen Analysen bestätigen (Abb. 30) und untermauern die angewandte Messmethode. Die in der Linie LHE004 verkürzte Gerinnungszeit war auch nach Auszucht und anschließender Rückzucht auf einen anderen Inzuchtstamm in den Nachkommen festzustellen (Abb. 31) und bestätigt die stabile Integration ins murine Genom.

Es bestehen erste Hinweise, dass die verkürzte Gerinnungszeit in den Tieren der Linie LHE004 mit einer vorzeitigen Bildung von Thrombin einhergeht (Appendix V). Eine umfassende phänotypische Charakterisierung der Mutation könnte darüber Aufschluss geben. Weiterführend ist es ferner von Interesse, die genaue Lokalisierung der Mutation im Genom durch eine Kopplungsanalyse zu identifizieren und mit den übrigen etablierten Linien ebenso zu verfahren.

V. Appendix

Der Thrombindynamiktest beschreibt zum einen den Zeitpunkt der ersten Detektion von Thrombin und zum anderen die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit des beigefügten Thrombinsubstrates. Erste Untersuchungen an auffälligen Nachkommen des Backcrosses der mutanten Linie LHE004 sind Abb. 32 zu entnehmen. In vier der fünf untersuchten Mutanten ließen sich zu einem früheren Zeitpunkt Thrombin nachweisen, als in den beiden mitgeführten Geschwister-Kontrolltieren. Eine der Mutanten zeigte zudem eine deutlich erhöhte Umsetzungsrate.

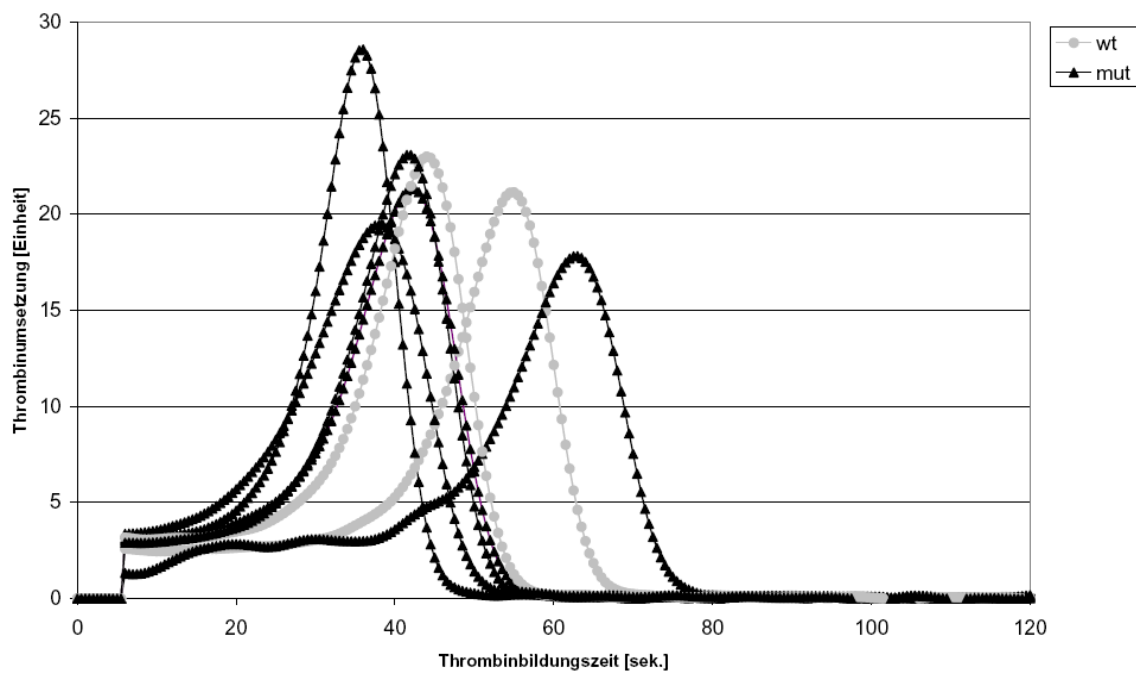


Abb. 32 Thrombindynamiktest in LHE004-Nachkommen des Backcrosses

VI. Zusammenfassung

Akute Koronarerkrankungen stellen direkte Folgen arterieller Thrombosen dar und bilden die Haupttodesursache in den Industrienationen. Einige der molekularen Mechanismen der Pathogenese von arteriellen Thrombosen wurden in den letzten Jahren unter in vitro Bedingungen charakterisiert. Ihre Relevanz im intakten Organismus wird erst durch die Analyse der arteriellen Thrombogenese in vivo ersichtlich. Die bislang etablierten Tiermodelle der Thrombose/Hämostase reflektieren wahrscheinlich nur einen geringen Anteil der bei Patienten mit thrombotischen Erkrankungen beobachteten Veränderungen. Ein Ziel dieser Arbeit bestand daher darin, neue krankheitsrelevante Mausmodelle der Thrombose/Hämostase zu etablieren. Mittels chemischer Mutagenese wurden in Mäusen zufällig über das gesamte Genom verteilte Mutationen induziert und die Fibrinbildung in den Nachkommen geprüft. Ausgehend von phänotypisch auffälligen Tieren konnten mehrere, über Generationen hinweg stabile Mauslinien mit Blutgerinnungsstörungen gezüchtet werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde mittels eines arteriellen Thrombosemodelles in der Maus erstmals die Bedeutung von Serinproteasen der neutrophilen Granulozyten für die Thrombusbildung nachgewiesen. Intravitalmikroskopische Untersuchungen in GECG-defizienten Tieren identifizierten diese Serinproteasen als entscheidende Mediatoren für eine stabile Thrombusbildung. Dabei wurde die proteolytische Inaktivierung von TFPI, des Inhibitors des Gerinnungsstartes, durch die Serinproteasen als zugrunde liegender Mechanismus ermittelt.

Desweiteren konnte ein zentraler neuer Mechanismus der initialen Gerinnungsaktivierung etabliert werden. Nach endothelialer Schädigung wurde eine massive Freisetzung der Thiol-Isomerase PDI beobachtet, die über die Aktivierung des zentralen gerinnungsstartenden Proteins TF die Fibrinbildung in vivo induzierte. Demzufolge bewirkte die Inhibition der endogenen PDI-Aktivität eine Verminderung der TF-abhängigen Fibrinbildung. Untersuchungen mit TF-positiven Mikropartikeln zeigten, dass PDI intravasalen TF über einen redoxabhängigen Mechanismus aktiviert.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgedeckten Regulierungsmechanismen der Fibrinbildung in vivo tragen zum Verständnis der komplexen Pathologie der arteriellen Thrombogenese im Menschen bei und weisen daher neue Perspektiven für therapeutische Ansätze auf.

VII. Summary

Coronary heart disease, which is decisively induced by arterial thrombosis, represents the leading cause of death in industrialized countries. Some of the underlying molecular mechanisms triggering the pathogenesis of arterial thrombosis have been described in recent years under *in vitro* conditions. However to study their physiologic relevance, animal models of thrombosis/hemostasis are indispensable. Due to the immense progress in gene technology and in *in vivo* imaging techniques over the past few years multiple new models of thrombosis have been generated. Yet these animal models represent only a small fraction of the phenotypes observed in patients with thrombotic diseases. It was the aim of the present investigation to establish new mouse models of inherited diseases for arterial and venous thrombosis. Chemical mutagenesis was used to induce randomized mutations in the murine genome. Offsprings were screened for abnormal phenotypes of fibrin formation. Thereby a series of mutant mouse lines with stable inheritable phenotypes for blood coagulation were generated.

In a mouse model of arterial thrombosis, the relevance of neutrophil serine proteases for thrombus formation was assessed. Analysis using intravital microscopy revealed that the neutrophil serine proteases GE and CG represent essential mediators for thrombus stabilization *in vivo*. This was found to be due to the ability of the serine proteases to cleave and inactivate TFPI, the main inhibitor of the coagulation start.

In addition a central new mechanism of the initial activation of blood coagulation was identified. The thiol-Isomerase PDI was observed to be massively exposed at the vessel injury site. Inhibition of the endogenous PDI activity suppressed the TF-dependent formation of fibrin. In particular, PDI activated intravascular TF carried by microparticles via redox-sensitive modifications of the TF molecule.

The described regulatory mechanisms of fibrin formation *in vivo* substantially contribute to increase our understanding of the complex pathology of arterial thrombogenesis in humans and point to new perspectives for therapeutic interventions.

VIII. Abkürzungen

ADP Adenosindiphosphat

AS Aminosäuren

bp Basenpaare

BL6 Mäuse des Inzuchtstammes C57/BL6

BSA Bovines Serum Albumin

CG Cathepsin G

C3H Mäuse des Inzuchtstammes C3HeB/FeJ

DTNB 5-Dithio-bis- 2-Nitrobenzoesäure

ENU N-Ethyl-N-Nitrosourea

F Faktor

FeCl₃ 10%Eisen III-Chlorid-Lösung

F₁ 1.Filialgeneration

F₂ 2.Filialgeneration

GE Granulocyte elastase

GP Glykoprotein

IgG Immunoglobulin G

hTF humaner Tissue Factor

kb Kilobasenpaare

kDa Kilo Dalton

ko Knock-out

LDL Low density lipoprotein

Min. Minuten

MP Mikropartikel

mMP monozytäre Mikropartikel

mTF muriner Tissue Factor

nMP neutrophile Mikropartikel

nPDI native, rekombinante Protein Disulfid Isomerase

nTFPI nativer, rekombinanter Tissue Factor Pathway Inhibitor

P Parentalgeneration

PDI Protein Disulfid Isomerase

PDI Δ C1,2 rekombinante, mutierte Variante von PDI

PPP Platelet Poor Plasma

PRP Platelet Rich Plasma

rPDI rekominante Protein Disulfid Isomerase

rTFPI rekominanter Tissue Factor Pathway Inhibitor

RT Raumtemperatur

s Sekunden

SD Standardabweichung

SPF specific pathogen free

TF Tissue Factor

TFPI Tissue Factor Pathway Inhibitor

T87F/L89A rekombinante, proteaseresistente Form von TFPI

TXA₂ Thromboxan A₂

Upm Umdrehungen pro Minute

wt Wildtyp

vWF von Willebrand Faktor

IX. Literaturverzeichnis

Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, Ruf W (2006) Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13932-7.

Ahn YS, Jy W, Jimenez JJ, Horstman LL (2004) More on: cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* **2**, 1215-6.

Albrecht S, Kotsch M, Siegert G, Luther T, Grossmann H, Grosser M, Muller M (1996) Detection of circulating tissue factor and factor VII in a normal population. *Thromb Haemost* **75**, 772-7.

Aveskogh M, Lutzelschwab C, Huang MR, Hellman L (1997) Characterization of cDNA clones encoding mouse proteinase 3 (myeloblastine) and cathepsin G. *Immunogenetics* **46**, 181-91.

Bach RR (2006) Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 456-61.

Banner DW, D'Arcy A, Chene C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchhofer D (1996) The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* **380**, 41-6.

Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA (1998) Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* **102**, 136-44.

Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A (2001) Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* **85**, 639-46.

Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, Boing AN, Romijn FP, Kraan MC, Breedveld FC, Hack CE, Sturk A (2002) Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum* **46**, 2857-66.

Bernal-Mizrachi L, Jy W, *et al.* (2004) Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* **97**, 439-46.

Bertolucci C, Pinotti M, Colognesi I, Foa A, Bernardi F, Portaluppi F (2005) Circadian rhythms in mouse blood coagulation. *J Biol Rhythms* **20**, 219-24.

Bidzhekov K (2005) Investigations on endothelial maturation and anticoagulant properties. *Dissertation, LMU*.

Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, Sturk A, Nieuwland R (2003) Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost* **1**, 2561-8.

Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y (2003) Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* **9**, 458-62.

Boyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **97**, 77-89.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532-5.

Brown SD, Balling R (2001) Systematic approaches to mouse mutagenesis. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 268-73.

Brown SD, Peters J (1996) Combining mutagenesis and genomics in the mouse--closing the phenotype gap. *Trends Genet* **12**, 433-5.

Broze GJ, Jr. (1995) Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annu Rev Med* **46**, 103-12.

Capecchi MR (2005) Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* **6**, 507-12.

Carmeliet P, Mackman N, *et al.* (1996) Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* **383**, 73-5.

Carpinelli MR, Hilton DJ, *et al.* (2004) Suppressor screen in Mpl^{-/-} mice: c-Myb mutation causes supraphysiological production of platelets in the absence of thrombopoietin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6553-8.

Censarek P, Bobbe A, Grandoch M, Schror K, Weber AA (2007) Alternatively spliced human tissue factor (asHTF) is not pro-coagulant. *Thromb Haemost* **97**, 11-4.

Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B (2004) Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* **104**, 3190-7.

Day SM, Reeve JL, Myers DD, Fay WP (2004) Murine thrombosis models. *Thromb Haemost* **92**, 486-94.

Day SM, Reeve JL, Pedersen B, Farris DM, Myers DD, Im M, Wakefield TW, Mackman N, Fay WP (2005) Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood* **105**, 192-8.

de Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V (1999) Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis* **29**, 41-9.

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

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

Doshi SN, Marmur JD (2002) Evolving role of tissue factor and its pathway inhibitor. *Crit Care Med* **30**, S241-50.

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

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

Engelmann B, Luther T, Muller I (2003) Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Thromb Haemost* **89**, 3-8.

Essex DW, Chen K, Swiatkowska M (1995) Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. *Blood* **86**, 2168-73.

Evangelista V, Manarini S, Coller BS, Smyth SS (2003) Role of P-selectin, beta2-integrins, and Src tyrosine kinases in mouse neutrophil-platelet adhesion. *J Thromb Haemost* **1**, 1048-54.

Evangelista V, Piccardoni P, White JG, de Gaetano G, Cerletti C (1993) Cathepsin G-dependent platelet stimulation by activated polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by antiproteinases: role of P-selectin-mediated cell-cell adhesion. *Blood* **81**, 2947-57.

Falanga A, Marchetti M, Barbui T, Smith CW (2005) Pathogenesis of thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: the role of neutrophils. *Semin Hematol* **42**, 239-47.

Falati S, Gross P, Merrill-Skoloff G, Furie BC, Furie B (2002) Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med* **8**, 1175-81.

Falati S, Liu Q, *et al.* (2003) Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* **197**, 1585-98.

Farrehi PM, Ozaki CK, Carmeliet P, Fay WP (1998) Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice. *Circulation* **97**, 1002-8.

Forlow SB, McEver RP, Nollert MU (2000) Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* **95**, 1317-23.

Furie B, Furie BC (2005) Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest* **115**, 3355-62.

Furman MI, Barnard MR, *et al.* (2001) Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **38**, 1002-6.

Gasser O, Schifferli JA (2005) Microparticles released by human neutrophils adhere to erythrocytes in the presence of complement. *Exp Cell Res* **307**, 381-7.

Gawaz M (2001) 'Blood platelets - physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases.' (Thieme: New York)

Giesen PL, Rauch U, *et al.* (1999) Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2311-5.

Ginsburg D (2005) Identifying novel genetic determinants of hemostatic balance. *J Thromb Haemost* **3**, 1561-8.

Gross PL, Furie BC, Merrill-Skoloff G, Chou J, Furie B (2005) Leukocyte-versus microparticle-mediated tissue factor transfer during arteriolar thrombus development. *J Leukoc Biol* **78**, 1318-26.

Gruner S, Prostedna M, Aktas B, Moers A, Schulte V, Krieg T, Offermanns S, Eckes B, Nieswandt B (2004) Anti-glycoprotein VI treatment severely compromises hemostasis in mice with reduced alpha2beta1 levels or concomitant aspirin therapy. *Circulation* **110**, 2946-51.

Higuchi DA, Wun TC, Likert KM, Broze GJ, Jr. (1992) The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. *Blood* **79**, 1712-9.

Hirahashi J, Mekala D, Van Ziffle J, Xiao L, Saffaripour S, Wagner DD, Shapiro SD, Lowell C, Mayadas TN (2006) Mac-1 signaling via Src-family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombohemorrhagic vasculopathy. *Immunity* **25**, 271-83.

Hogan KA, Weiler H, Lord ST (2002) Mouse models in coagulation. *Thromb Haemost* **87**, 563-74.

Hogg PJ (2003) Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem Sci* **28**, 210-4.

Hrabe de Angelis M, Strivens M (2001) Large-scale production of mouse phenotypes: the search for animal models for inherited diseases in humans. *Brief Bioinform* **2**, 170-80.

Hrabe de Angelis MH, Flaswinkel H, *et al.* (2000) Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet* **25**, 444-7.

Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM (2005) Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology (Bethesda)* **20**, 22-27.

Jagadeeswaran P, Gregory M, Johnson S, Thankavel B (2000) Haemostatic screening and identification of zebrafish mutants with coagulation pathway defects: an approach to identifying novel haemostatic genes in man. *Br J Haematol* **110**, 946-56.

Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS (2003) Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* **109**, 175-80.

Jordan PA, Gibbins JM (2006) Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal* **8**, 312-24.

Justice MJ (2000) Capitalizing on large-scale mouse mutagenesis screens. *Nat Rev Genet* **1**, 109-15.

Justice MJ, Carpenter DA, *et al.* (2000) Effects of ENU dosage on mouse strains. *Mamm Genome* **11**, 484-8.

Jy W, Mao WW, Horstman L, Tao J, Ahn YS (1995) Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood Cells Mol Dis* **21**, 217-31; discussion 231a.

Kroegel C, Reissig A (2003) Principle mechanisms underlying venous thromboembolism: epidemiology, risk factors, pathophysiology and pathogenesis. *Respiration* **70**, 7-30.

Kurz KD, Main BW, Sandusky GE (1990) Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res* **60**, 269-80.

Law DA, DeGuzman FR, Heiser P, Ministri-Madrid K, Killeen N, Phillips DR (1999) Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIb beta3 signalling and platelet function. *Nature* **401**, 808-11.

Le Menn R, Bara L, Samama M (1981) Ultrastructure of a model of thrombogenesis induced by mechanical injury. *J Submicrosc Cytol* **13**, 537-49.

Li N, Hu H, Lindqvist M, Wikstrom-Jonsson E, Goodall AH, Hjemdahl P (2000) Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 2702-8.

Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868-74.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.

Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A (2000) Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* **101**, 841-3.

Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A (1999) Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* **99**, 348-53.

Mammen EF (1992) Pathogenesis of venous thrombosis. *Chest* **102**, 640S-644S.

Maroney SA, Haberichter SL, Friese P, Collins ML, Ferrel JP, Dale GL, Mast AE (2006) Active tissue factor pathway inhibitor is expressed on the surface of coated-platelets. *Blood*.

Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhofer D, Heinzmann U, Nieswandt B (2003) A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* **197**, 41-9.

McEver RP (2001) Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* **86**, 746-56.

Migdalski A, Kotschy M, Jawien A (2005) Tissue factor, tissue factor pathway inhibitor and vascular endothelial growth factor-a in carotid atherosclerotic plaques. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **30**, 41-7.

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

Muller I, Klocke A, *et al.* (2003) Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *Faseb J* **17**, 476-8.

Napoli C, De Nigris F, Pignalosa O, Lerman A, Sica G, Fiorito C, Sica V, Chade A, Lerman LO (2006) In vivo veritas: thrombosis mechanisms in animal models. *Scand J Clin Lab Invest* **66**, 407-27.

Nieswandt B, Aktas B, Moers A, Sachs UJ (2005) Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models. *J Thromb Haemost* **3**, 1725-36.

Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A (2000) Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* **95**, 930-5.

Noveroske JK, Weber JS, Justice MJ (2000) The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse. *Mamm Genome* **11**, 478-83.

Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ, Jr. (1988) Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood* **72**, 2020-5.

Osterud B, Bjorklid E (2006) Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost* **32**, 11-23.

Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A (1996) Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* **94**, 1239-46.

Owen CA, Campbell EJ (1999) The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol* **65**, 137-50.

Parry GC, Erlich JH, Carmeliet P, Luther T, Mackman N (1998) Low levels of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice. *J Clin Invest* **101**, 560-9.

Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE, Shapiro L (2004) Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* **304**, 1154-8.

Pawlinski R, Pedersen B, Erlich J, Mackman N (2004) Role of tissue factor in haemostasis, thrombosis, angiogenesis and inflammation: lessons from low tissue factor mice. *Thromb Haemost* **92**, 444-50.

Penz S, Reininger AJ, *et al.* (2005) Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *Faseb J* **19**, 898-909.

Petersen LC, Bjorn SE, Nordfang O (1992) Effect of leukocyte proteinases on tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* **67**, 537-41.

Ragni M, Golino P, *et al.* (2000) Endogenous tissue factor pathway inhibitor modulates thrombus formation in an in vivo model of rabbit carotid artery stenosis and endothelial injury. *Circulation* **102**, 113-7.

Raptis SZ, Shapiro SD, Simmons PM, Cheng AM, Pham CT (2005) Serine protease cathepsin g regulates adhesion-dependent neutrophil effector functions by modulating integrin clustering. *Immunity* **22**, 679-91.

Rehemtulla A, Ruf W, Edgington TS (1991) The integrity of the cysteine 186-cysteine 209 bond of the second disulfide loop of tissue factor is required for binding of factor VII. *J Biol Chem* **266**, 10294-9.

Renne T, Pozgajova M, Gruner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, Gailani D, Nieswandt B (2005) Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* **202**, 271-81.

Rosen ED, Raymond S, Zollman A, Noria F, Sandoval-Cooper M, Shulman A, Merz JL, Castellino FJ (2001) Laser-induced noninvasive vascular injury models in mice generate platelet- and coagulation-dependent thrombi. *Am J Pathol* **158**, 1613-22.

Rosendaal FR (1999) Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* **353**, 1167-73.

Russell WL, Kelly EM, Hunsicker PR, Bangham JW, Maddux SC, Phipps EL (1979) Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 5818-9.

Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, Hedman H, Freyssinet JM (1994) Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* **153**, 3245-55.

Schabbauer G, Tencati M, Pedersen B, Pawlinski R, Mackman N (2004) PI3K-Akt pathway suppresses coagulation and inflammation in endotoxemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1963-9.

Schmidt B, Ho L, Hogg PJ (2006) Allosteric disulfide bonds. *Biochemistry* **45**, 7429-33.

Silver LM (1995) 'Mouse genetics - Concepts and applications.' (University Press: Oxford)

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

Sturk-Maquelin KN, Nieuwland R, Romijn FP, Eijnsman L, Hack CE, Sturk A (2003) Pro- and non-coagulant forms of non-cell-bound tissue factor in vivo. *J Thromb Haemost* **1**, 1920-6.

Tkalcevic J, Novelli M, Phylactides M, Iredale JP, Segal AW, Roes J (2000) Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* **12**, 201-10.

Toschi V, Gallo R, *et al.* (1997) Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* **95**, 594-9.

Tsakiris DA, Scudder L, HodiVala-Dilke K, Hynes RO, Coller BS (1999) Hemostasis in the mouse (*Mus musculus*): a review. *Thromb Haemost* **81**, 177-88.

Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A (2002) Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol* **193**, 154-63.

Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A (2006) Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* **8**, 668-76.

VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R (2003) Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* **59**, 277-87.

Virchow R (1856) 'Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin.' (Meidinger, Frankfurt a. M.)

Wartha F, Beiter K, Normark S, Henriques-Normark B (2007) Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **10**, 52-6.

Waterston RH, Lindblad-Toh K, *et al.* (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-62.

Westrick RJ, Bodary PF, Xu Z, Shen YC, Broze GJ, Eitzman DT (2001) Deficiency of tissue factor pathway inhibitor promotes atherosclerosis and thrombosis in mice. *Circulation* **103**, 3044-6.

Winter J, Klappa P, Freedman RB, Lilie H, Rudolph R (2002) Catalytic activity and chaperone function of human protein-disulfide isomerase are required for the efficient refolding of proinsulin. *J Biol Chem* **277**, 310-7.

Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K (2006) Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.*

Zillmann A, Luther T, Muller I, Kotzsch M, Spannagl M, Kauke T, Oelschlagel U, Zahler S, Engelmann B (2001) Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 603-9.

Zoldhelyi P, McNatt J, Shelat HS, Yamamoto Y, Chen ZQ, Willerson JT (2000) Thromboresistance of balloon-injured porcine carotid arteries after local gene transfer of human tissue factor pathway inhibitor. *Circulation* **101**, 289-95.

Zwaal RF, Schroit AJ (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* **89**, 1121-32.

X. Danksagung

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

allen voran Prof. Dr. Bernd Engelmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Betreuung und umfassende Unterstützung der letzten Jahre,

Prof. Dr. Dr. h.c. Seidel für die Möglichkeit, die Experimente am Institut für Klinische Chemie durchführen zu können,

Priv.-Doz. Dr. Steffen Massberg, für die Zusammenarbeit und Unterstützung bei den intravitalmikroskopischen Untersuchungen,

Priv.-Doz. Dr. M. Spannagl für die Unterstützung bei der Betreuung des ENU-Screens,

Prof. Dr. M. Hrade de Angelis für die Möglichkeit den ENU-Screen der Hämostase in der GSF durchführen zu können, sowie Dr. S. Wagner, Dr. D. Soewarto und Dr. B. Rathkolb für die gute Zusammenarbeit im ENU-Screen,

allen Tierpflegern und dem technischen Personal der GSF und des MVG für die sachkundige Versorgung der Tiere und die Probenentnahmen,

allen Mitglieder der Arbeitsgruppe, insbesondere, Tini, Kiril, Silke, Susi, Katja, Berid, Verena, Christoph und Davit für die nette Hilfsbereitschaft und Arbeitsatmosphäre,

Pia und Prof. Peter Lohse für die ständige Bereitschaft in Notsituationen helfend zur Seite zu stehen,

den Mitgliedern der AG Massberg, insbesondere Ildiko, Malu, Uschi, Susanne und Maria für die herzliche und freundliche Unterstützung und die zahlreichen Erklärungen,

meinen Eltern und Brüdern, und vor allem meinem Mann, die mich unermüdlich unterstützten und mir Kraft gaben, diese Arbeit zu vollenden.

XI. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Lenka Grahl, geb. Matousek
Geburtstag- und ort: 28.11.1977, Frankfurt am Main

wissenschaftliche Tätigkeit

05/2006 bestandene Promotionsvorprüfung zum Dr. rer. biol. hum.
seit 09/2003 naturwissenschaftliche Doktorandin am Institut für Klinische Chemie in der Arbeitsgruppe Vaskuläre Biologie und Hämostase (Prof. Dr. B. Engelmann) an der LMU München
Deutsches Genomforschungsprojekt- ENU-Mutagenese
DFG-Forschergruppe "Prävention des Ischämie-Reperfusionsschadens"

Weitere Qualifikationen

02/ 2005 Versuchstierkundlicherkurs (TIZ-BIFO) nach FELASA-Richtlinien

Ausbildung

03/2003 Diplom in Biologie an der J.W.Goethe-Universität in Frankfurt/Main
09/1997-11/2002 Biologiestudium an der J.W. Goethe-Universität in Frankfurt/Main
1988-1997 Wöhlergymnasium in Frankfurt/Main

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

J. Horstkotte, **L. Matousek**, P. Lange, R. Hinkel, M.L. von Brühl, B. Engelmann, C. Kupatt (2006). Wildtype Ischemic Microparticles Rescue Postischemic Leukocyte Recruitment in Icam-1/P-Selectin^{-/-} Mice. *J Vasc Res.* 43:42 (Abstract)

C. Reinhardt, **L. Grahl**, K. Bidzhekov, E. Morgenstern, B. Engelmann (2006). Neutrophil surface proteases - activators of the intravascular tissue factor. *Acta Physiologica Congress* (Abstract Number 13585)

M. Köllnberger, M.L. von Brühl, **L. Grahl**, C. Schulz, B. Engelmann, S. Massberg (2006). Distinct cellular interactions regulate arterial and venous thrombosis. *J Vasc Res.* 43(Suppl1):66 (Abstract)

C. Reinhardt, M.L. von Brühl, **L. Grahl**, D. Manukyan, B. Altmann, S. Dlugai, I. Konrad, N. Mackman, S. Massberg, B. Engelmann (2007). Thiol isomerases Control Tissue factor-dependent Fibrin Generation. (*submitted*)

L. Grahl, S. Massberg, K. Bidzhekov, I. Konrad, E. Kennerknecht, C. Reinhardt, J. Roes, B. Engelmann. Recruitment of neutrophil elastase and cathepsin G to the nascent thrombus regulates blood coagulation. (*in preparation*)

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

Lenka Grahl