Aus dem Physiologischen Institut für Vegetative Physiologie der LMU München
Vorstand:
Prof. Dr. Ulrich Pohl

# Plättchenassoziierter Tissue Factor als schnell aktivierbarer, intravaskulärer Starter des menschlichen Gerinnungssystems

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

vorgelegt von

Andreas Ulrich Zillmann

aus

München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|---|---|
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. B. Engelmann |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. E. Hiller |
| Mitberichterstatter: | Prof. Dr. W. Siess |
| | Priv. Doz. Dr. N. Weiss |
| Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: | Priv. Doz. Dr. S. Zahler |
| Dekan: | Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter |

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2004

**Teile dieser Arbeit konnten in folgenden Publikationen bereits veröffentlicht werden:**

**Zillmann A.,** Luther T., Müller I., Kotzsch M., Spannagl M., Kauke T., Oelschlägel U., Zahler S., Engelmann B.
***Platelet-Associated Tissue Factor Contributes To The Collagen-Triggered Activation Of Blood Coagulation.***
Biochem Biophys Res Com, 2001, 281: 603-609

**Zillmann A.,** Müller I., Kotzsch M., Spannagl M., Zahler S., Luther T., Engelmann B.
***Collagen Stimulation Rapidly Activates Intravascular Tissue Factor.***
Atherosclerosis, 2001, Vol.2 Nr.2 Supplements, P349
Präsentation: 72. Kongress der European Atherosclerosis Society (EAS) 2001, Glasgow (20.05.2001-23.05.2001)

**Kongressbeiträge als Koautor:**

**Müller I.,** Zillmann A., Kotzsch M., Spannagl M., Zahler S., Luther T., Engelmann B.
***Platelet Tissue Factor Mediates Leukocyte Triggered Blood Coagulation.***
79. Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, 19.-22. März 2000, Universität Ulm, Deutschland, Eur J Physiol 2000, Suppl. 439, R287

**Müller I.,** Zillmann A., Kauke T., Spannagl M., Zahler S., Luther T., Engelmann B.
***Collagen Rapidly Activates Tissue Factor In Platelet-Leukocyte Complexes.***
XV European Symposium on blood platelets. 19-22 Oktober 2000, Bischoffsheim, Platelets 2001, 12, 39-57

**Müller I.,** Zillmann A., Kotzsch M., Spannagl M., Zahler S., Luther T., Engelmann B.
***Collagen Rapidly Triggers The Rapid Activation Of Platelet-Associated Tissue Factor.***
XVIII ISTH Kongress, Paris 2001. Abstracts of XVIII ISTH Congress, Thromb Haemost 85, Index

**Müller I.,** Luther T., Zillmann A., Kauke T., Kotzsch M., Klocke A., Alex M., Zieseniss S., Engelmann B.
***Location And Potential Mechanism Of Activation Of Intravascular Tissue Factor.***
16th international Congress of the International Society for Fibrinolysis and Proteolysis (ISFP), 2002, Sep. 8-13., München

**[Abb. Titelseite]**
**Komplex aus Tissue Factor und Faktor VIIa**
(Banner, 1997)

# Inhaltsverzeichnis

**Abbildungsverzeichnis** **6**
**Abkürzungsverzeichnis** **7**

**A. Einleitung** **8**

I. Blut ist ein ganz besondrer Saft 8
II. Von der Gewebethrombokinase zum Tissue Factor 8
III. Der Tissue Factor abhängige Gerinnungsweg 9
IV. Gen- und Proteinstruktur von Tissue Factor 11
V. Lokalisation von Tissue Factor im Gewebe 14
VI. Funktionen von Tissue Factor ausserhalb der Gerinnung 14
VII. Induzierbarkeit von monozytärem Tissue Factor 15
VIII. Zielsetzung 17

**B. Methodik** **18**

I. Zusammensetzung der Probandengruppe 18
II. Untersuchungsmethoden 18
II.1. Blut- und Zellpräparation 18
II.1.1. Blutentnahme 18
II.1.2. Plättchenreiches und Plättchenarmes Plasma 18
II.1.3. Plättchenisolierung 19
II.1.4. Plättchenreiches und Plättchenarmes Vollblut 19
II.1.5. Monozyten- und Granulozytenisolierung 20
II.1.6. Zellzahlbestimmung 23
II.2. Durchflußzytometrie 23
II.2.1. Messprinzip 23
II.2.2. Versuchsprotokolle zur Vollblutstimulierung mit LPS 25
II.2.3. Versuchsprotokolle zur Vollblutstimulierung mit Collagen 25
II.2.4. Versuchsprotokolle zur Stimulierung von Zellen mit Collagen 26
II.2.5. FACS-Protokoll 26
II.3. Vollblutkoagulometrie 28
II.3.1. Messprinzip 28
II.3.2. Versuchsprotokoll: Vollblut 30
II.4. Faktor Xa Bildung 31
II.4.1. Messprinzip 31
II.4.2. Versuchsprotokoll: Xa-Bildung unter Stimulation mit Collagen 31
II.5. Double-Sandwich-ELISA 31
II.5.1. Messprinzip 31
II.5.2. Versuchsprotokoll: Bestimmung des zellulären Tissue Factor-Gehalts 32
II.6. Elektronenmikroskopie 32
II.6.1. Messprinzip 32
II.6.2. Versuchsprotokoll: Vollblutzellen unter Stimulation mit Collagen 33
III. Materialien und Geräte 34
III.1. Materialien 34

III.1.1. Puffer 34
III.1.2. Blut- und Zellpräparation 34
III.1.3. Durchflußzytometrie 35
III.1.4. Vollblutkoagulometrie 35
III.1.5. Faktor Xa-Bildung 35
III.1.6. Double-Sandwich-ELISA 36
III.1.7. Elektronenmikroskopie 36
III.2. Geräte 36
IV. Statistik 37

**C. Ergebnisse 38**

I. Präsentation von Tissue Factor auf Oberflächen von Monozyten unter Langzeitstimulation mit LPS 38
II. Collagen als alternativer Kurzzeitstimulus 39
III. Plättchenabhängigkeit der leukozytären Tissue Factor-Präsentation unter Stimulation mit Collagen 41
IV. Hemmung der Tissue Factor-Präsentation auf Leukozyten 44
V. Tissue Factor-Präsentation auf isolierten Zellen 45
VI. Lokalisierung des intravaskulären Tissue Factor 47
VII. Tissue Factor aus Plättchen-Leukozyten-Komplexen ist funktionell aktiv 50

**D. Diskussion 54**

I. Tissue Factor der Gefäßwand 54
II. Intravaskulärer Tissue Factor 55
III. Plättchen-Leukozyten-Komplexe 56
IV. Ursprung des intravaskulären Tissue Factor 58
V. Tissue Factor Aktivierung 59
VI. Physiologische Bedeutung von intravaskulärem Tissue Factor 61
VII. Tissue Factor und Atherosklerose 63
VIII. Ausblick in die zukünftige Forschung 65

**E. Zusammenfassung 66**

**F. Literaturverzeichnis 68**

**G. Anhang 76**

I. Danksagung 76
II. Lebenslauf 77

# Abbildungsverzeichnis


| | | | |
|---|---|---|---|
| Abb. | Titel: | Komplex aus TF und Faktor VIIa | 1 |
| Abb. | 1: | Gerinnungsschema | 10 |
| Abb. | 2: | TF-Gen | 11 |
| Abb. | 3: | Struktur des extrazellulären Anteils von TF | 13 |
| Abb. | 4: | Monozytärer TF | 16 |
| Abb. | 5: | Das Mini Macs Verfahren zur Zellisolierung | 22 |
| Abb. | 6: | Schema FACScan | 24 |
| Abb. | 7: | Beispiel eines FACS Dotplots | 27 |
| Abb. | 8: | Thrombelastograph D | 29 |
| Abb. | 9: | Vollblutstimulation mit LPS | 38 |
| Abb. | 10: | TF-Präsentation nach Kurzzeitstimulation von Vollblut mit Collagen | 40 |
| Abb. | 11: | TF-Präsentation im Vollblut bei verschiedenen Plättchenkonzentrationen | 42 |
| Abb. | 12: | Nachweis von P-Selektin und TF in Assoziation mit Monozyten und Neutrophilen | 43 |
| Abb. | 13: | Wirkung von Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle auf die TF-Präsentation in Plättchen-Leukozyten-Konjugaten | 45 |
| Abb. | 14: | TF-Präsentation auf Oberflächen isolierter Leukozyten | 46 |
| Abb. | 15: | TF-Präsentation auf Oberflächen isolierter Plättchen | 47 |
| Abb. | 16: | TF auf der Oberfläche von adhärenten Plättchen | 48 |
| Abb. | 17: | TF Protein in isolierten Zellen | 49 |
| Abb. | 18: | TF Aktivität in Suspensionen aus isolierten Blutkomponenten | 51 |
| Abb. | 19: | TF abhängige Fibrinbildung nach Collagenstimulation von Vollblut | 52 |
| Abb. | 20: | Quantitative Auswertung der TF abhängigen Fibrinbildung nach Collagenstimulation von Vollblut | 53 |
| Abb. | 21: | TF der Gefäßwand | 55 |
| Abb. | 22: | Modell für die Aktivierung von intravaskulärem TF | 61 |
| Abb. | 23: | Mögliche Funktion des intravaskulären, plättchenassoziierten TF | 63 |

# Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| Ak | Antikörper |
| AP1 | Aktivator Protein 1 |
| AS | Aminosäure |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| CMK | Phe-Phe-Arg-Chloromethylketon |
| CTI | Corntrypsininhibitor |
| CD | Differenzierungsantigen (Cluster Of Differentiation) |
| EDTA | Ethylene Diamine Tetraacetic Acid |
| ELISA | Enzyme Linked Immuno Assay |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorter |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanat |
| IgG | Immunglobulin G |
| IgM | Immunglobulin M |
| IL | Interleukin |
| k | Rate des Thrombuswachstums [mm] |
| MA | Maximale TEG Amplitude |
| NFκb | Nekrose Factor κb |
| OPD | O-Phenylen-diamin |
| PAB | Plättchenarmes Blut |
| PAP | Plättchenarmes Plasma |
| PBMC | Peripheral Blood Mononuclear Cells |
| PBS | Phosphat Buffered Saline |
| PE | Phycoerythrin |
| PMT | Photomultiplier Tubes |
| PP | Polypropylen |
| PRB | Plättchenreiches Blut |
| PRP | Plättchenreiches Plasma |
| r | Rate der Fibrinbildung [mm] |
| TEG | Thrombelastograph |
| TF | Tissue Factor |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |

# A. Einleitung

## I. Blut ist ein ganz besondrer Saft

„Blut ist ein ganz besondrer Saft“ (Goethe, 1887) – so lässt Johann Wolfgang von Goethe seinen Mephistopheles zu Faust sprechen und in der Tat ist das Blut mit seinen vielen Aufgaben eines der wichtigsten funktionellen Einheiten im menschlichen Organismus. Durch Verletzungen der Gefäßwand ist die Integrität dieses Systems in Gefahr und es kann zu einem lebensbedrohlichen Blutverlust kommen. Um diesen Funktionsverlust des Blutkreislaufs zu verhindern ist ein Schutzmechanismus erforderlich, der von der Hämostase (Blutstillung und Blutgerinnung) bereitgestellt wird. Der sogenannte „Tissue Factor“ (TF), ein vorwiegend in der Gefäßwand lokalisiertes Membranprotein, ist an diesen Prozessen wesentlich beteiligt und gilt heute als das Starterprotein der gesamten Blutgerinnung.

## II. Von der Gewebethrombokinase zum Tissue Factor

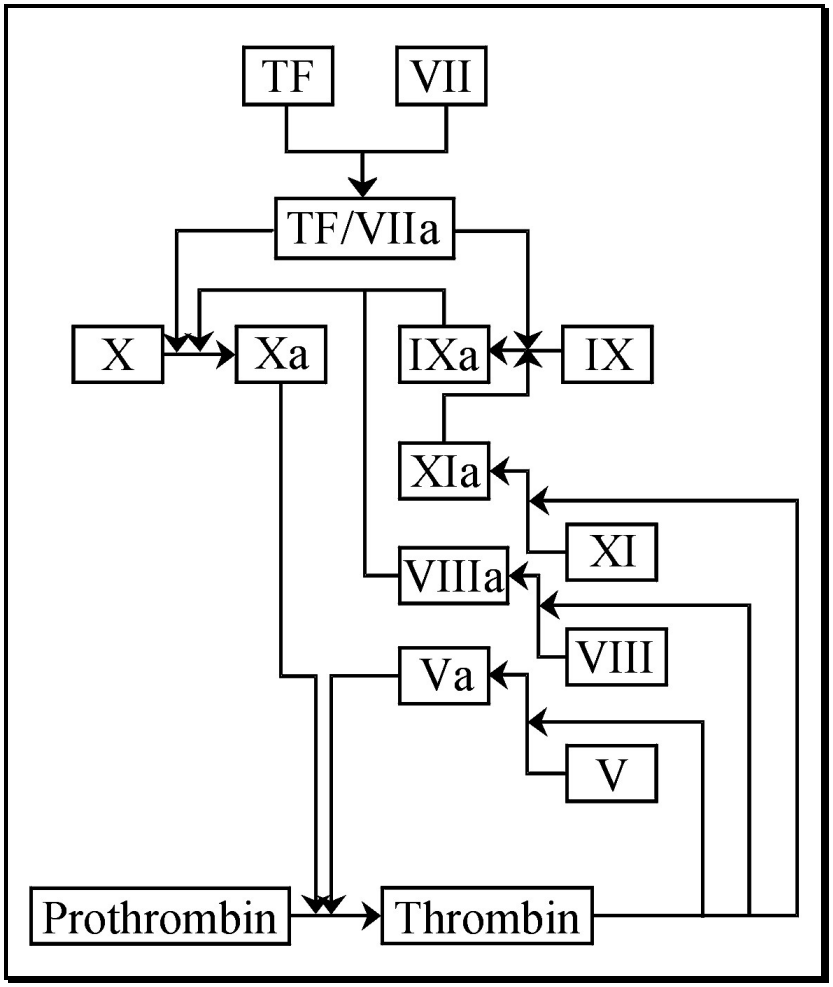
A. Schmid führte 1892 die Bezeichnung Thromboplastin in die Gerinnungslehre ein (Schmidt, 1892). Ein paar Jahre später konnte Morawitz in Kochsalzextrakten von Geweben eine Aktivität zur Umwandlung von Prothrombin in Thrombin feststellen – es gab also einen Gewebefaktor, den er Gewebethrombokinase nannte (Morawitz, 1905). Darauf aufbauend entwickelte A.J. Quick 1935 einen Prothrombintest, der bis in die heutige Zeit, bekannt unter dem Eigennamen seines Erfinders, im klinischen Alltag allgegenwärtig ist. Erst in den 80er Jahren gelang durch Bach und Broze die Reinigung und Isolierung des für die thromboplastische Aktivität verantwortlichen Proteins (Bach et al., 1981; Broze et al., 1985). Seitdem ist die Bezeichnung Tissue Factor die Gebräuchlichste, zusätzlich werden aber auch Bezeichnungen wie Gewebethromboplastin oder CD142 (CD-Nomenklatur) verwendet.

## III. Der Tissue Factor abhängige Gerinnungsweg

Im Jahre 1964 entwickelten Davie und Ratnoff die sogenannte Kaskadentheorie der plasmatischen Blutgerinnung. Dabei wird nach Auslösung der Blutgerinnung ein inaktiver Gerinnungsfaktor durch einen bereits aktivierten Faktor mittels limitierter Proteolyse in die aktive Form überführt. Dieser neu entstandene aktive Faktor stimuliert wiederum die Bildung weiterer Faktoren und es entsteht eine Aktivierungskaskade (Davie und Ratnoff, 1964; Mac Farlane 1964). Bei den Gerinnungsfaktoren handelt es sich vorwiegend um Proteasen und deren Kofaktoren. Zusätzlich werden für die Gerinnungskaskade auch $Ca^{2+}$-Ionen und Phospholipide benötigt, die unter anderem zur Bildung von Proteasenkomplexen beitragen.

Nach dem klassischen Modell werden zwei Auslösemechanismen der Blutgerinnung, ein intrinsischer und ein extrinsischer, unterschieden. Der intrinsische Anteil stellt das sogenannte Kontaktaktivierungssystem dar. Hierbei wird die Gerinnung bei Kontakt mit anionischen Oberflächen mittels Aktivierung des Faktor XII gestartet. Dieser Weg galt lange als Hauptstimulus für die Fibrinbildung. Das extrinsische System dagegen tritt dann in Aktion, wenn ein Blutgefäß verletzt wird und dadurch in der Gefäßwand gelegener (extrinsischer) TF mit dem Blut in Kontakt kommt. Es folgt eine Komplexbildung von TF mit Faktor VII/VIIa, der wiederum Faktor X aktiviert. Da Faktor X auch über den intrinsischen Weg aktiviert werden kann, werden an dieser Stelle die weiteren Schritte beider Systeme zusammengefasst. Faktor Xa führt im Prothrombinasekomplex (Va, Xa, Phospholipide, $Ca^{2+}$) zur Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin und schließlich zur Bildung von Fibrin (Nemerson und Bach 1982, Camerer 1996). Nach heutiger Ansicht scheint die Trennung der Blutgerinnung in ein extrinsisches und in ein intrinsisches System eher fragwürdig. Insbesondere deuten viele Befunde darauf hin, dass das intrinsische System unter in vivo Bedingungen keine Bedeutung als Startersystem besitzt. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass der TF/VIIa-Komplex Faktor IX direkt zu IXa aktivieren kann (Osterud und Rapaport, 1977; Bom et al., 1991; Rapaport und Rao, 1992) und somit in die intrinsische Kaskade einzugreifen vermag. Ferner ist Thrombin rückkoppelnd in der Lage, Faktor VIII und XI zu aktivieren und so das intrinsische System positiv zu verstärken (Esmon, 1979; Eaton et al., 1986; Naito und Fujikawa, 1991; Gailani und Broze, 1993). Schliesslich haben Patienten mit Faktor XII-Mangel keine

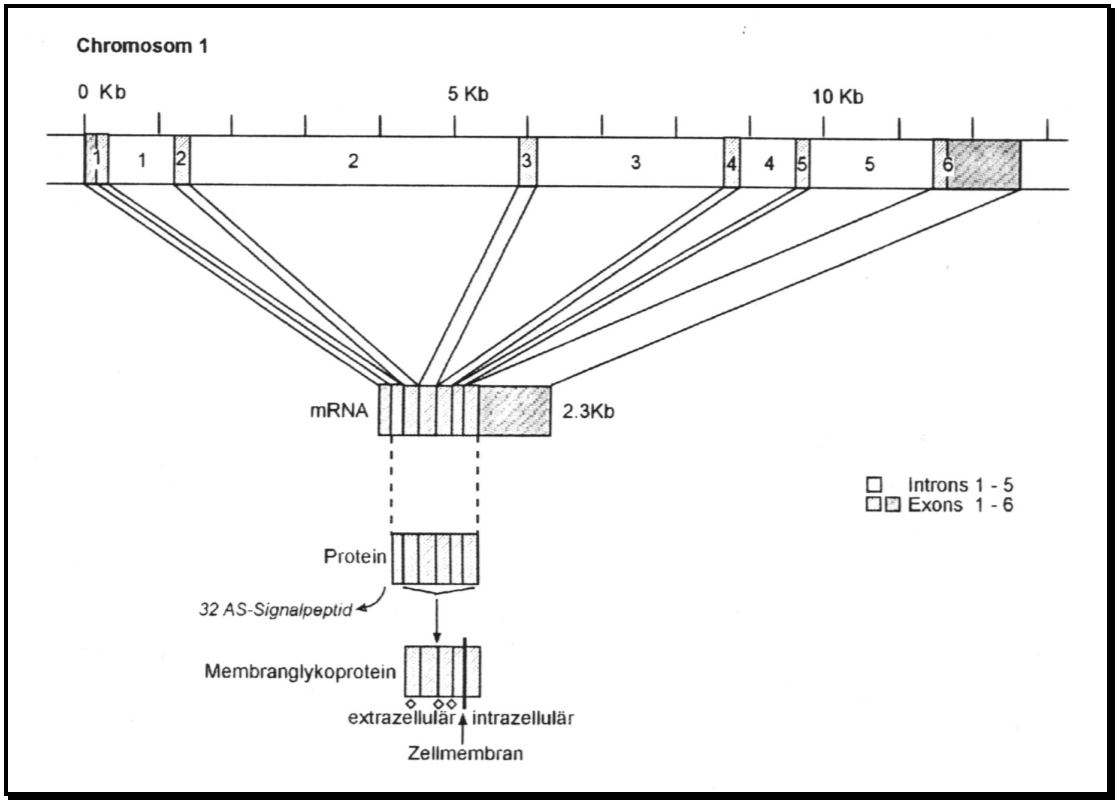
Blutungsneigungen (Furie und Furie 1988; Kienast und Ostermann, 1993). Daraus lässt sich ein neuer Aufbau der Gerinnung ableiten, wie er in Abb. 1 mit TF als zentrales Starterprotein dargestellt ist. Es handelt sich demnach eher um einen Gerinnungsprozess, der in zwei Schritten abläuft (Camerer et al., 1996). Der Gerinnungsstart wird dabei durch die Aktivierung des TF/Faktor VIIa Komplexes erreicht. Durch das dabei gebildete Thrombin werden über einen positiven Rückkopplungsmechanismus die bereits erwähnten Faktoren VIII und XI aktiviert. Vermittelt durch das Zusammenspiel zwischen dem Faktor IXa und seinem Kofaktor VIIIa kann somit bis zu einer 100-fach höheren Menge an Faktor Xa erzeugt werden als durch den TF/VIIa-Komplex alleine. Das bedeutet, dass bereits geringe Mengen an TF zum Start der Gerinnung ausreichen.




**[Abb. 1] Gerinnungsschema:**
Vereinfachte Darstellung der menschlichen Blutgerinnung. TF aktiviert komplexgebunden mit Faktor VIIa Faktor X zu Xa und Faktor IX zu IXa. Faktor Xa löst zusammen mit Faktor Va im Prothrombinasekomplex die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin aus. Thrombin wiederum vermag sowohl Fibrinogen in Fibrin zu überführen, als auch über positive Rückkopplung die Faktoren V, VIII und XI zu aktivieren.

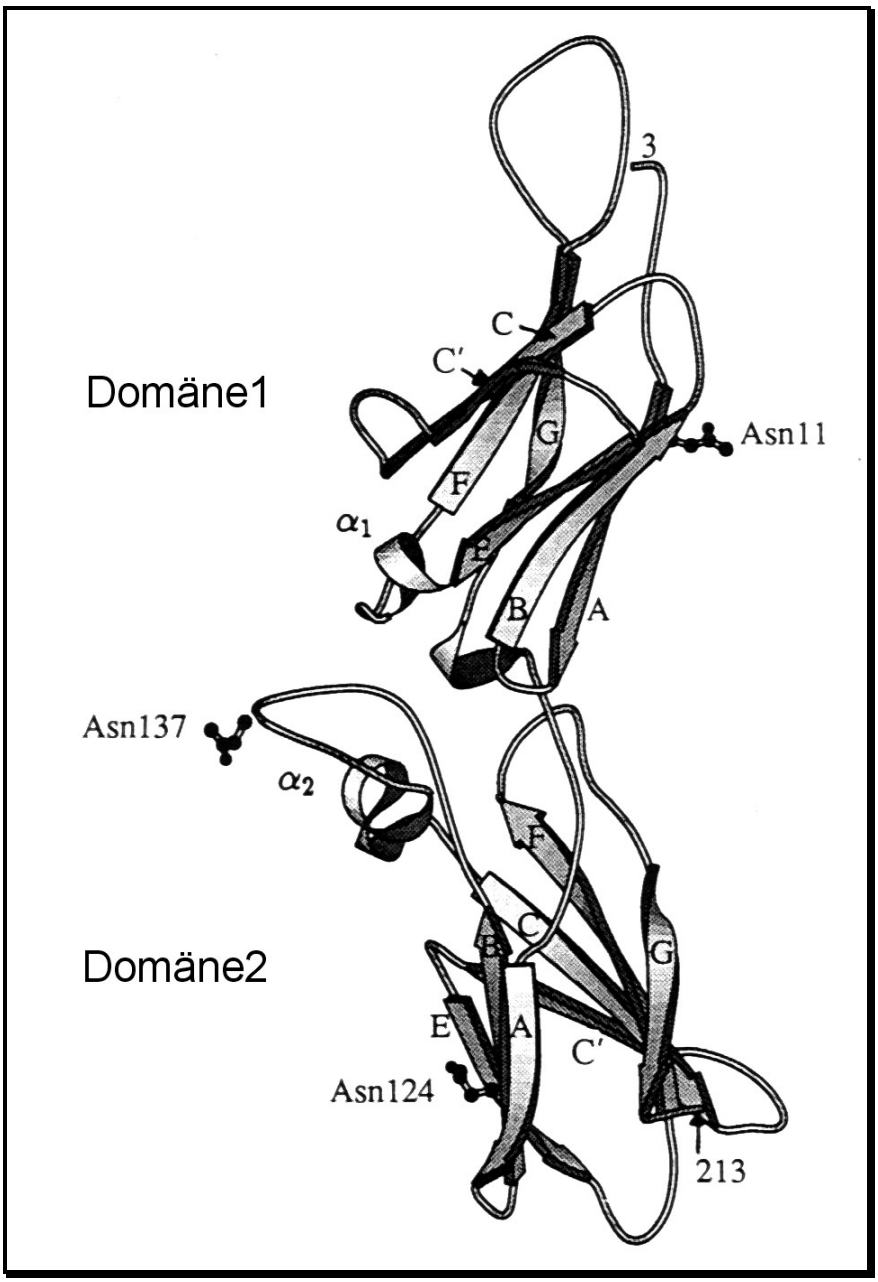
## IV. Gen- und Proteinstruktur von Tissue Factor

Das TF-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 1 (1p21-22) lokalisiert und umfasst 12,4 kBp (Carson et al., 1985; Kao et al., 1988). Das TF-Gen wurde Ende der 80er Jahre strukturell aufgeklärt und kloniert (Morrissey et al., 1987; Scarpati et al., 1987). Das Gen weist 6 Exons auf, die durch 5 Introns getrennt werden (Mackman and Morrissey 1989). Die intrazellulären, transmembranären und extrazellulären Anteile des synthetisierten Proteins werden von unterschiedlichen Exons kodiert. Das Exon 6 kodiert die intrazellulären und transmembranären Anteile, während der extrazelluläre Teil durch die Exone 2-5 kodiert wird. Das Exon 1 beinhaltet dagegen Informationen für die Initiation der Translation, das post-translationale Processing und für das Einschleusen des Proteins in die Zellmembran (Abb. 2).




**[Abb. 2] TF-Gen:**
Schematische Darstellung des TF Gens und dessen Transkription sowie Translation zum TF Protein (nach Edgington, 1991).

Durch die Transkription entsteht eine 2,3 kB große mRNA bzw. im Rahmen des alternativen Splicings eine mRNA mit Größen zwischen 3,1 und 3,4 kB, die schließlich in das Protein translatiert wird (Scarpati et al., 1987; Brand et al., 1991). Eine 32 Aminosäuren lange Leader-Sequenz spielt posttranslational eine wichtige Rolle beim Einschleusen des Proteins in die Zellmembran. Die Expression der TF-mRNA kann neben ihrer konstitutiven Exprimierung in bestimmten Zellen, wie zum Beispiel Monozyten und Endothelzellen, durch geeignete Stimulatoren (z.B. Interleukine, TNF$\alpha$, LPS und Komplementfaktor C5a) induziert werden (Geczy et al., 1981; Schwartz et al., 1981; Bloem et al., 1989). Dabei werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die an den Promotor des TF-Gens binden. Dabei handelt es sich um Transkriptionfaktoren wie z.B. AP-1, p65-cRel - Heterodimere der NF-$\kappa$b Familie - und SP-1 (Mackman et al., 1989, 1990, 1991; Guha et al., 2001; Pendurthi et al., 2002). Das reife full length TF Protein hat eine Größe von 47kD und liegt in glykosyliertem Zustand vor. Nach Abspaltung der 32 AS großen leader Sequenz weist das TF Protein 263 AS auf. Dabei besteht der extrazelluläre Anteil aus 219 Aminosäuren (AS), der transmembranäre Teil aus 23 AS und der intrazelluläre Anteil aus 21 AS (Edgington et al., 1991). TF wird aufgrund seiner Struktur zur Familie der Zytokinrezeptoren (Klasse II) gerechnet (Bazan et al., 1990; Edgington et al., 1991). Der extrazelluläre Anteil besteht aus zwei in einem Winkel von 120° zueinander stehenden Domänen (Abb. 3). Diese beiden Domänen sind in $\alpha$-helikalen und $\beta$-Faltblatt Strukturen angeordnet (Muller et al., 1994 und 1996; Harlos et al., 1994; Banner et al., 1996, 1997). Die Verbindung zwischen der Domäne 1 mit der Domäne 2, besonders des sog. „Binding Fingers“ der Domäne 2, stellt dabei die Kontaktstelle zu dem Faktor VII/VIIa dar (Harlos et al., 1994). Der transmembranäre Anteil dagegen erreicht durch die Verankerung in der Zellmembran die Assoziation von TF mit Zelllipiden und ist daher wichtig für die vollständige funktionelle Aktivität des TF/VIIa-Komplexes (Paborsky et al., 1991). Die Aktivität dieser Komplexe wird dabei jeweils durch die Anwesenheit von Phospholipiden und $Ca^{2+}$ verstärkt (Bach et al., 1986; Sabharwal et al., 1995). Der intrazelluläre Anteil verstärkt dazu den Rezeptorcharakter von TF durch eine intrazelluläre $Ca^{2+}$-Signalantwort nach Komplex von Faktor VII an die extracelluläre Domäne (Camerer et al., 1996). In Abb. 3 ist der extrazelluläre Anteil mit seinen beiden Domänen dargestellt. Die Zellmembran liegt dabei am unteren Rand der Abb. Der Komplex von TF und Faktor VIIa ist auf der Titelseite abgebildet (Banner, 1997).




**[Abb. 3] Struktur des extrazellulären Anteils von TF:**
Dargestellt sind die Anteile der extrazellulären Domäne des TF Proteins. Die gesamte extrazelluläre Domäne ist 219 Aminosäuren groß und in $\alpha$-helikalen bzw. $\beta$-Faltblatt Strukturen angeordnet, welche mit A-G gekennzeichnet sind. Die beiden Domänen bilden einen Winkel von 120°. Glykosylierungsstellen sind bei drei Asparagin-Seitenketten (Asn11,124 und 137) hervorgehoben. Die Darstellung erfolgte mit dem Molskript-Programm (Harlos et al., 1994)

## V. Lokalisation von Tissue Factor im Gewebe

Neben seiner Lokalisation in der Adventitia von Blutgefäßen ist TF auch noch in vielen anderen Geweben des menschlichen Organismus exprimiert (Wilcox et al., 1990). Hervorzuheben ist die hohe Expression von TF in Grenzflächen, wie zum Beispiel in Organkapseln (Drake et al., 1989; Flössel et al., 1994). Dies führte zur sogenannten „Envelope"-Hypothese, wonach ein „Umschlag" aus TF Organe bei Verlust der Integrität vor Blutverlust schützen soll. TF findet sich auch im Epithel der Haut, in den Astrozyten des Gehirns (Eddlestone et al., 1993), im Endometrium der Plazenta und im Epithel der Bowmanschen Kapsel der Nieren, also durchgängig in stark durchbluteten Organen. Weiterhin konnte TF konzentriert in den Disci intercalares adulter Herzmuskelzellen, speziell des Arbeitsmyokards, nachgewiesen werden (Luther et al., 2000). Von klinischer Bedeutung ist auch die hohe Expression von TF in atheromatösen Plaques (Thiruvikraman et al., 1996/1997). Im Bezug auf die TF-Verteilung in der Epidermis kam man dagegen auf ein anderes Verteilungsmuster. Es zeigte sich, dass TF vermehrt in den mechanisch weniger gefährdeten nicht-palmo-plantaren Hautregionen zu finden ist. Die prokoagulatorische Aktivität von TF ist in Haut- und Herzmuskelextrakten dagegen um einiges niedriger als in den oben genannten Geweben, wie zum Beispiel in der Niere. Dies spricht dafür, dass TF neben seiner Rolle in der Gerinnung auch weitere Aufgaben zu erfüllen hat.

## VI. Funktionen von Tissue Factor ausserhalb der Gerinnung

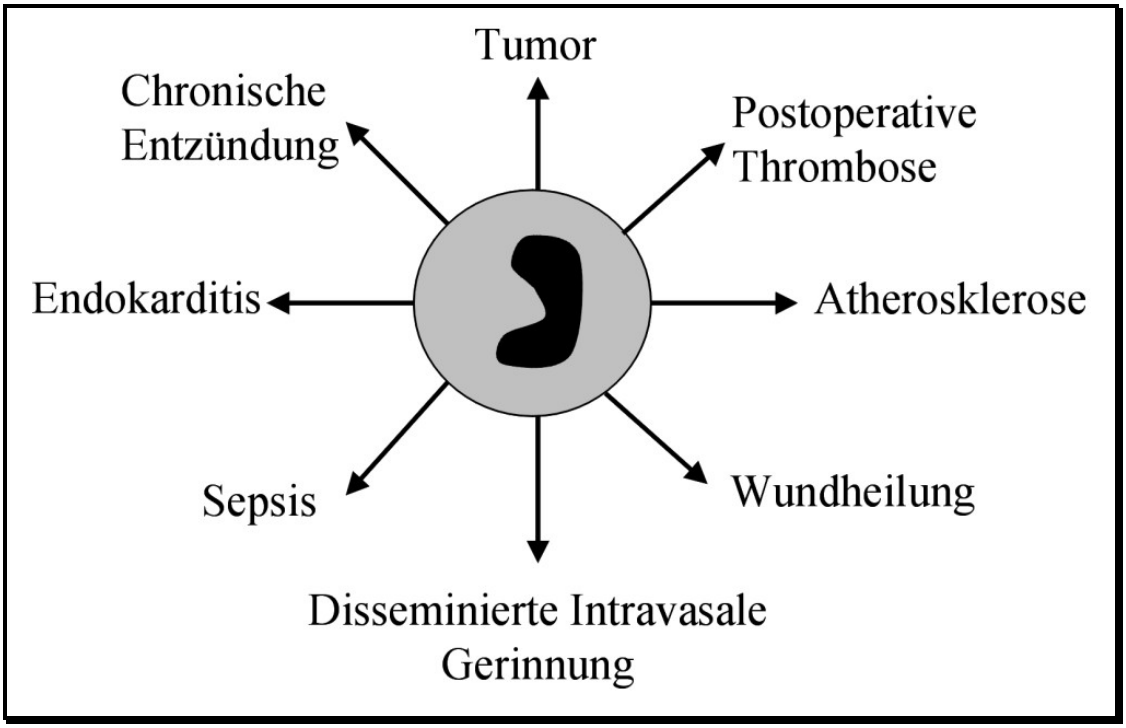
In der Embryogenese scheint das Vorhandensein von TF zwingend notwendig zu sein. TF ist im Embryo bereits vor seinem Liganden Faktor VII nachweisbar und in Geweben in hohem Maße vorhanden, in denen er im Erwachsenenalter kaum mehr vorkommt (Luther et al., 1996). Homozygote TF „Knock out" Mäuseembryos versterben zu 90% bereits in einer sehr frühen Phase der Embryogenese (Carmeliet et al., 1996). Offensichtlich spielt TF eine wesentliche Rolle für die Reifung von Gefäßen. In den TF „Knock out" Mäusen zeigte sich in der Tat ein deutliches Entwicklungsdefizit der Gefäßwand von Dottersackgefäßen. In Tumoren kann TF die

Tumorangiogenese beeinflussen und somit auch das Tumorwachstum fördern (Zhang et al., 1994). Zusätzlich wird TF von einigen Tumorgeweben konstitutiv exprimiert und kann dort prokoagulatorisch wirken (Rao, 1992; Callander et al., 1992, Sturm et al., 1992; Zhang et al., 1994; Sato et al., 1995). Ferner gibt es Hinweise dafür, dass TF auch bei der Metastasierung von Tumoren eine Rolle spielt (Mueller et al., 1992; Ruf, 2001). In einer normalerweise nicht-metastasierenden Melanoma-Zelllinie zeigten sich nach Transfektion mit dem TF-Gen multiple Metastasen (Bromberg et al., 1995). Dementsprechend konnte die Metastasierungsrate einer Melanoma-Zelllinie durch Einsatz von Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) experimentell drastisch reduziert werden (Amirkhosravi et al., 2002).
TF ist ebenfalls von Bedeutung für die Adhäsion und Transmigration von Monozyten bzw. Makrophagen durch Endothelien. Für die Reverse-Migration konnte in vitro die Bedeutung von TF bei der Passage von Monozyten durch das Endothel gezeigt werden (Randolph et al., 1998).

## VII. Induzierbarkeit von monozytärem Tissue Factor

Zu denjenigen Zellen, in denen die TF-Synthese induzierbar ist, gehören neben den Endothelzellen auch Monozyten bzw. Makrophagen. Dies ist von besonderem Interesse, da diese Zellen physiologisch in der unverletzten Blutbahn vorkommen und eine TF-abhängige Gerinnung ohne Gefäßverletzung induzieren können. Die Stimulierbarkeit der TF-Synthese in Monozyten ist bereits seit Mitte der 70er Jahre bekannt. Als Stimulanzien spielen sowohl Zytokine wie IL-1 oder TNF$\alpha$ als auch Endotoxine (LPS) eine wichtige Rolle. Monozyten exprimieren normalerweise keinen TF, doch können sie durch eine Langzeitstimulation (>30 Min.) mit Lipopoly-sacchariden (LPS) zu transkriptioneller Aktivität des TF-Gens stimuliert werden (Osterud, 1998, 2000). Hierbei zeigt sich ein wichtiger Unterschied zwischen der Stimulierbarkeit der Monozyten im Vollblut und der Stimulierbarkeit von adhärenten Monozyten in Zellkultursystemen. Letztere haben vermutlich aufgrund ihrer Voraktivierung generell eine höhere Affinität zu den genannten Stimuli (Osterud, 1998). TNF$\alpha$ und andere Zytokine fungieren in diesem Zusammenhang wahrscheinlich mehr als Verstärker denn als eigener Stimulus. Thrombozyten tragen durch direkte adhäsive Interaktionen zu der monozytären TF-Aktivität bei (Halvorsen

et al., 1993). Auch aktiviertes Endothel ist in der Lage, monozytären TF zu induzieren (Lo et al., 1995) und so eine prokoagulatorische Aktivität zu erzeugen. Der monozytäre TF spielt vermutlich bei einer ganzen Reihe von pathophysiologischen Bedingungen, wie zum Beispiel der Sepsis, der Disseminierten Intravasalen Gerinnung und der Atherosklerose, eine wichtige Rolle (Abb. 4 Osterud, 1998).




**[Abb. 4] Monozytärer TF:**
Mögliche Bedeutungen des monozytären TF bei verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen (nach Osterud, 1998).

Interessanterweise ist nach Langzeitstimulation mit LPS ein Großteil des auf Monozyten nachgewiesenen TF inaktiv und wird als „encrypted Tissue Factor“ beschrieben. Durch Koinkubation mit Thrombozyten, bzw. Granulozyten konnte unter den Bedingungen der LPS Stimulation die TF Aktivität der Monozyten freigesetzt werden (Osterud, 2001, 2003), wobei offensichtlich TF-haltige Mikropartikel von Bedeutung sind.

## VIII. Zielsetzung

Collagen ist ein entscheidender Auslöser der physiologischen Hämostase und der pathologischen Thrombose (Sixma et al., 1995, 1997). Um den Mechanismus in vitro zu reproduzieren aktivierten wir Vollblut mit Collagen. Überraschenderweise zeigte sich bereits innerhalb von wenigen Minuten ein Anstieg der TF Präsentation.
Daraus ergaben sich folgende Fragen:

1) Auf welchen Blutzellen wird TF nach Kurzzeitstimulation von Vollblut mit Collagen präsentiert?
2) Welche Rolle spielen dabei die Thrombozyten?
3) Wo genau ist der Blut-assoziierte TF lokalisiert?
4) Ist der nach Collagen-Kurzzeitstimulation präsentierte TF funktionell aktiv?

# B. Methodik

## I. Zusammensetzung der Probandengruppe

Venöses Blut wurde von weiblichen und männlichen Spendern (n>50) im Alter zwischen 23-45 Jahren gewonnen. Veränderungen des Gerinnungssystems sowie akute Infekte wurden anamnestisch ausgeschlossen. Ebenfalls wurde darauf geachtet, dass die Probanden keine die Blutgerinnung beeinflussenden Medikamente einnahmen.

## II. Untersuchungsmethoden

### II.1. Blut- und Zellpräparation

#### II.1.1. Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus einer Vene der Ellenbeuge nach vorhergegangener Hautdesinfektion mit Kodan-forte Tinktur. Zur Blutentnahme wurden ein Venenpunktionsbesteck Venofix und Kunstoffspritzen verwendet. Die Antikoagulation erfolgte durch Natriumcitrat mit einer Endkonzentration von 0,38%. Soweit nicht anders erwähnt gilt dieses Antikoagulationsprinzip für alle Ansätze. Um eine eventuell durch die Abnahme ausgelöste Aktivierung der Blutgerinnung bzw. von Plättchen auszuschließen, wurden die zuerst abgenommenen 3 ml Blut verworfen.

#### II.1.2. Plättchenreiches und Plättchenarmes Plasma

Das antikoagulierte Vollblut wurde gleich nach der Entnahme bei Raumtemperatur mittels einer 1000 µl-Pipette gleichmäßig auf 10 ml Polypropylen-Röhrchen verteilt. Zur Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) wurde das so verteilte Vollblut bei 190 x g für 15 Minuten (Min.) in der Varifuge GL zentrifugiert. Die oberen 70% des Überstandes wurden mit einer Pipette abgenommen und als PRP weiterverwertet.

Um plättchenarmes Plasma (PAP) zu gewinnen, wurde das zuvor gewonnene PRP wiederum gleichmäßig auf 10 ml Polypropylen-Röhrchen (PP-Röhrchen) verteilt. Diese wurden bei 1.000 x g für 15 Min. zentrifugiert. Die oberen 80% des Überstandes wurden mit einer Pipette abgenommen und als PAP weiterverarbeitet.

### II.1.3. Plättchenisolierung

PRP wurde auf 10 ml PP-Röhrchen verteilt und bei 390 x g für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Thrombozytenpellet wurde anschließend je nach Versuchsansatz entweder in einem dafür vorgesehenen „Resuspendierungs-Puffer“ (138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM $NaHCO_3$, 0,4 mM $NaH_2PO_4$, 5 mM D-Glucose, 1 mM MgCl, 5 mM HEPES; der pH-Wert wurde mit NaOH bzw. HCl auf 7,4 eingestellt) oder in PAP resuspendiert.

### II.1.4. Plättchenreiches und Plättchenarmes Vollblut

Um Blut mit verschiedenen Thrombozytenkonzentrationen herzustellen, wurde das folgende Verfahren angewendet. Ein Drittel des entnommenen Vollbluts wurde in mit Parafilm verschlossenen PP-Röhrchen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die anderen zwei Drittel wurden bei 190 x g für 15 Min. in PP-Röhrchen zentrifugiert. Das PRP wurde, wie oben beschrieben, mit einer Pipette abgenommen. 50% des so gewonnenen PRP wurden bei Raumtemperatur in verschlossenen PP-Röhrchen aufbewahrt. Die anderen 50% wurden bei 1.000 x g für 15 Min. zentrifugiert, um aus dem Überstand PAP zu gewinnen. Das PAP wurde anschließend ebenfalls in PP-Röhrchen pipettiert und mit Parafilm verschlossen. Aus den so entstandenen Teilen von PRP und PAP konnten nun die gewünschten Mischungsverhältnisse und damit Thrombozytenkonzentrationen hergestellt werden. In den unter III. im Ergebnisteil dargestellten Untersuchungen wurden folgende Mischungsverhältnisse verwendet (Angaben in Vol.%):

1) 100% PRP
2) 75% PRP + 25% PAP
3) 50% PRP + 50% PAP
4) 25% PRP + 75% PAP
5) 100% PAP

In einer weiteren Probe (6) wurden zuvor isolierte Thrombozyten in PAP resuspendiert. Die Thrombozytenkonzentration in dieser Probe wurde auf die von 100% PRP eingestellt.

6) 100% PAP + resuspendierte Thrombozyten

Die in PRP und PAP enthaltenen Thrombozytenzahlen wurden mittels eines Zellcounters der Firma Coulter bestimmt. Um Vollblut mit unterschiedlicher Thrombozytenkonzentration zu erhalten, wurde das aufbewahrte Drittel Vollblut bei 190 x g für 15 Min. zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde mit einer Pipette abgenommen und durch das gleiche Volumen Mischplasma ersetzt. Anschließend wurden die Erythrozyten- und Leukozytenfraktionen vorsichtig mit dem Plasma durch Pipettieren vermischt.

### II.1.5. Monozyten- und Granulozytenisolierung

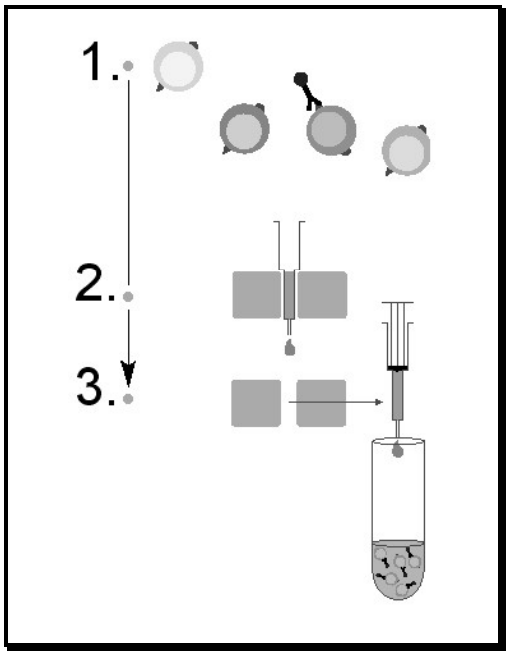
Die Blutleukozyten befinden sich nach Zentrifugation von Vollblut im so genannten „Buffy coat“. Der „Buffy coat“ befindet sich dabei zwischen den sedimentierten Erythrozyten und dem Plasma. Für die Leukozyten verwendeten wir ein Isolationsverfahren, bei dem gegen zellspezifische Oberflächen gerichtete Antikörper verwendet wurden. Dabei wurden die Antikörper zunächst mit kleinen Magnetkügelchen (MicroBeads) markiert. Anschließend wurde der „Buffy coat“ mit der Antikörperlösung inkubiert. Nach Inkubation wurde die Zellsuspension in sogenannte Mini Macs Säulen gegeben. Die durch Antigen – Antikörper – Komplexe positiv markierten Zellen verbleiben während der Passage durch ein Magnetfeld in den dafür vorgesehenen Säulen, während nicht markierte Zellen ausgewaschen werden (Positive Selektion, Abb. 5). Für die Isolation von Granulozyten wurde ein gegen CD15 gerichteter monoklonaler Antikörper verwendet. Für die Isolation der Monozyten verwendeten wir einen monoklonalen Antikörper gegen das CD14 Molekül.

Um Granulozyten aus Vollblut zu isolieren wurde das antikoagulierte Vollblut (20 ml) auf 10 ml PP-Röhrchen verteilt und bei 190 x g für 15 Min. zentrifugiert. Der „Buffy coat“ wurde nach Entfernen des Plasmaüberstands vorsichtig mit einer 1000 µl Pipette abgenommen und in einem 15 ml Falcon Blue-Max Röhrchen gesammelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Anti-human CD15 MicroBeads für 15 Min.

bei 8°C. Für eine Ausgangsmenge von 20 ml Vollblut wurden 50 µl Antikörperlösung benötigt. Während der Inkubation wurden die in Ethanol gelagerten Mini Macs Magnetsäulen mit Aqua dest. ausgespült und in die Magnetfeldhalterung gesteckt. Danach erfolgte ein erster „Leerdurchlauf“ mit mindestens 500 µl ultraschall-entgastem „Antikörper-Puffer“ (PBS + 0,15% EDTA + 0,5% BSA) je Säule. Die Antikörper-Zell Suspension wurde anschließend in 250 µl Schritten auf die Säulen verteilt. Nach dem vollständigem Durchlauf der Suspension wurde jede Säule mit 4 x 500 µl ultraschallentgastem „Antikörper-Puffer“ nachgespült, um nicht markierte Zellen zu entfernen. Die Säulen wurden aus dem Magnetfeld genommen und die mit den MicroBeads-markierten Granulozyten mittels eines Kolbens in 2 ml des „Antikörper-Puffers“ aus der Säule eluiert. Anschließend wurden die gewonnenen Zellen in 35 ml kalziumfreier PBS-Lösung suspendiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 200 x g für 10 Min.. Der Überstand wurde anschließend entfernt und das Pellet in 100 µl „Resuspendierungs-Puffer“ resuspendiert. Die Zellzahl wurde entweder unter dem Mikroskop durch Trypan Färbung in Zählkammern oder mit Hilfe des oben erwähnten Zellcounters bestimmt.

Da Monozyten nur einen kleinen Teil (6%) der Gesamtleukozyten bilden, war es notwendig, die Monozyten, vor der Inkubation mit Anti-human MicroBeads, aus einer Ausgangsmenge von 80 ml antikoaguliertem Vollblut durch einen Ficoll-Dichtegradienten zu konzentrieren. Der „Buffy coat“ wurde in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und mit PBS auf 150% des „Buffy coat“-Volumens verdünnt. Die so geschaffene Suspension wurde unter einem Abzug mit Ficoll (Dichte 1,077) langsam und vorsichtig unterschichtet. Es ist darauf zu achten, dass die so entstandenen Schichten sauber von einander getrennt sind und sich durch das Unterschichten nicht vermischen. Es folgte eine Zentrifugation bei 500 x g für 25 Min. bei 22°C. Anschließend wurde die durch die Zentrifugation entstandene Interphase mittels der Pipettierhilfe abpipettiert und in einem neuen Falcon-Röhrchen gesammelt. Die Röhrchen wurden nun ebenfalls unter dem Abzug mit sterilem „Wasch-Puffer“ (PBS + 0,13% EDTA + 0,15% Bovines Serum Albumin (BSA); pH 7,4) aufgefüllt und bei 200 x g für 10 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit der Pipettierhilfe abgenommen und verworfen. Das Röhrchen wurde erneut mit 35 ml „Wasch-Puffer“ aufgefüllt und bei 120 x g für 10 Min. bei 25°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl „Antikörper-

Puffer“ resuspendiert. In diesem Pellet sind die sogenannten Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) enthalten. Um Monozyten zu isolieren wurde die PBMC-Suspension mit Anti-human CD14 MicroBeads für 15 Min. bei 8°C in der Dunkelheit inkubiert.




**[Abb. 5] Das Mini Macs Verfahren zur Zellisolierung:**
1) Markierung der zu isolierenden Zellpopulation mit an Antikörper gebundenen Magnetkügelchen (MicroBeads)
2) Positive Selektion der markierten Zellen im Magnetfeld
3) Eluieren der in der Säule verbliebenen selektierten Zellen

Für eine Ausgangsmenge von 80 ml Vollblut waren 40 µl Antikörperlösung notwendig. Die Mini Macs Magnetsäulen wurden wie oben beschrieben vorbereitet. Zu der Suspension aus Anti-human CD14 MicroBeads (100 µl) wurden 2 ml „Antikörper-Puffer“ zugegeben. Die Suspension wurde auf mindestens zwei Mini Macs Magnetsäulen verteilt und in 250 µl-Schritten zugegeben. Um die Kontaktzeit innerhalb der Mini Macs Magnetsäulen zu erhöhen, wurde die Durchlaufgeschwindigkeit mittels Durchlaufbegrenzer herabgesetzt. Nach dem vollständigen Durchlauf der Suspension wurde jede Säule mit 4 x 500 µl „Antikörper-Puffer“ nachgespült, um nichtmarkierte Zellen zu entfernen. Die Säulen wurden aus dem Magnetfeld genommen und die Anti-human CD14 MicroBeads markierten Monozyten wurden in 2 ml „Antikörper-Puffer“ mittels eines Kolbens aus der Säule eluiert. Die Zellsuspension wurde mit 35 ml PBS verdünnt und bei 200 x g für 10 Min. zentrifugiert. Die Zellzahl-Bestimmung erfolgte analog zur Granulozytenisolation.

### II.1.6. Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl der isolierten Granulozyten und Monozyten wurden Neubauer-Zählkammern, für die Thrombozytenbestimmung ein Zell-Counter der Firma Coulter verwendet. Für die Zählung in den Zählkammern wurde eine 1:10 Verdünnung der Zellsuspension mit Resuspensionpuffer hergestellt. Diese wurde mit dem gleichen Volumen an Trypanblau gefärbt. Die Auszählung erfolgte unter dem Mikroskop. Jeweils vier, der in Quadranten aufgeteilten Zählkammer, wurden ausgezählt. Durch das darin genau definierte Volumen konnte unter Einbeziehung der Verdünnungsfaktoren die Zellzahl der Ausgangssuspension ermittelt werden. Gleichzeitig konnte durch die Färbung die Vitalität der Zellen abgeschätzt werden.

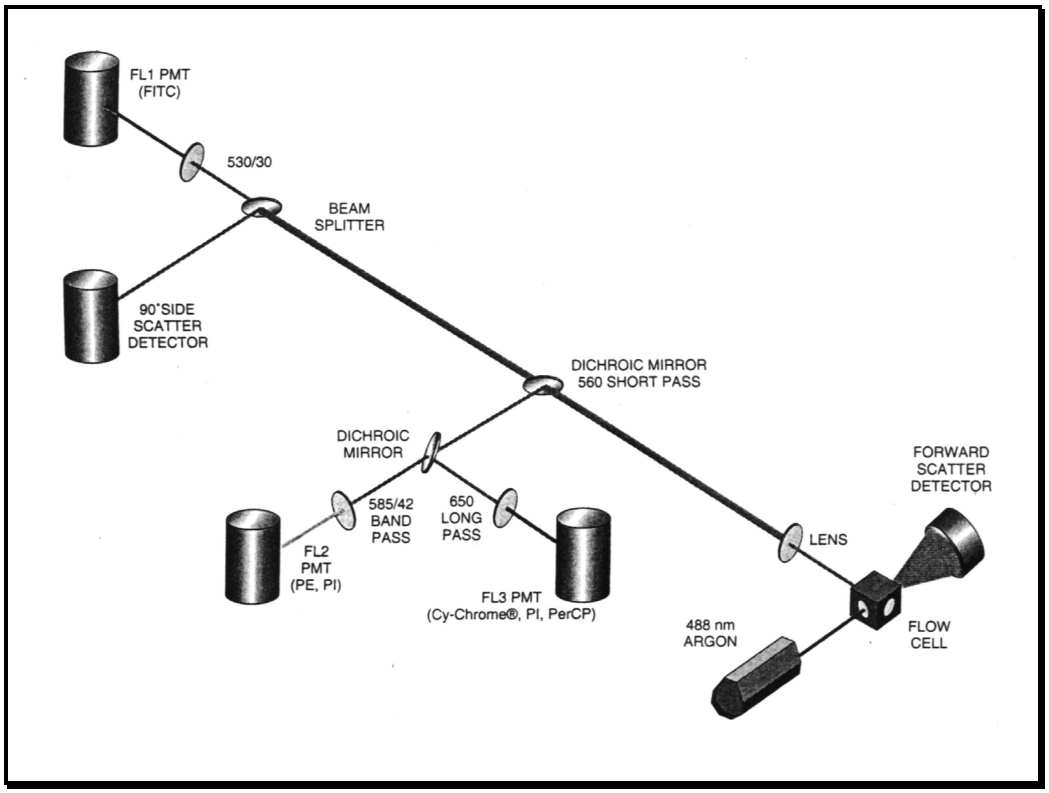
## II.2. Durchflußzytometrie

### II.2.1. Messprinzip

Die Durchflußzytometrie ist ein optisches Verfahren, bei dem die Zellen in einer Suspension einzeln einen Laserstrahl durchlaufen. Dabei wird das Laserlicht abgeschwächt und gestreut. Abschwächung und Streuung werden über Detektoren gemessen, wodurch sich Informationen über Struktur und Typ der betreffenden Zellen ergeben. Weiter besteht die Möglichkeit, Antigene auf oder in den Zellen durch fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper zu detektieren. Bei dem verwendeten Durchflußzytometer (FACS; Fluorescence-Activated Cell Sorter) handelt es sich um ein FACScan der Firma Becton Dickinson. Es verwendet einen Argon Laser mit 488 nm Wellenlänge. Die durch das Laserlicht angeregten Farbstoffe emittieren Licht größerer Wellenlänge, welches über Photo-multiplier-tubes (PMT) FL1-3 gemessen wird. Ein FACScan-Schema ist in Abb. 6 dargestellt. Die gewonnenen Daten wurden auf der Festplatte des angeschlossenen Rechners gespeichert und mit dem WinMDI Programm ausgewertet.

Folgende Parameter können bei einer Zelle simultan bestimmt werden:

- forward scatter; Aussage über Zellgröße
- sideward scatter; Aussage über Zellgranularität
- FL1; detektiert Fluoreszenzintensität von Fluorescein isothiocyanate (FITC); Emissionsmaximum um 520 nm
- FL2; detektiert Fluoreszenzintensität von Phycoerythrin (PE); Emissionsmaximum um 575 nm
- FL3; detektiert Fluoreszenzintensität von Cy-Chrome; Emissionsmaximum um 670 nm




**[Abb. 6] Schema FACScan:**
Dargestellt ist der schematische Aufbau eines FACScan mit einem einzelnen Argon-Laser und fünf verschiedenen Detektionsparametern. Zwei Detektoren sind für Forward (Zellgröße) und Sideward (Zellgranularität) Scatter. Die Zellen durchlaufen dabei einzeln die sog. „Flow Cell“. Über die drei PMTs und die dazugehörenden Filter wird die Floureszenzintensität (FL1-3) jeder Zelle bestimmt.
http://www.pharmingen.com/protocols/flow-cytometry/fluorochrome_absorb.shtml

### II.2.2. Versuchsprotokolle zur Vollblutstimulierung mit LPS

Je 1 ml antikoaguliertes Vollblut wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Für Leerwert, Positiv- und Negativ-Kontrolle wurde genauso verfahren. Nach Zugabe von LPS (10 µg/ml) wurde das Blut-LPS Gemisch durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Die Leerwert- und Kontrollproben erhielten das Äquivalent der LPS-Trägerlösung. Anschließend wurden alle Proben bei 37°C im Wasserbad für einen Zeitraum von 2 Std. inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 100 µl des stimulierten Blutes mit 1 ml Lysing Solution verdünnt.

### II.2.3. Versuchsprotokolle zur Vollblutstimulierung mit Collagen

In den folgenden Abschnitten werden Versuchsprotokolle beschrieben, in denen antikoaguliertes Vollblut unter verschiedenen Bedingungen mit Collagen (Typ I) (Stocklösung: 1 µg gelöst in 1 µl isotoner Glucoselösung) stimuliert wurde. Dabei gilt für jeden Versuchsaufbau folgendes Prinzip:
1 ml antikoaguliertes Vollblut wurde mit Collagen oder der Glukose-Trägerlösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 37°C im Wasserbad stimuliert. Die Inkubationszeit und die Collagen Konzentrationen variieren dabei mit den Versuchen. Bei längeren Inkubationszeiten wurde die Probe, um Sedimentierung zu vermeiden, durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren erneut gemischt. Die Stimulation wurde durch Pipettieren von je 100 µl Probe in 1 ml einer Lysing Solution gestoppt.
Bei Verwendung von Antikörpern wurde das Vollblut mit einem Anti-CD40L-Antikörper (100 µg/ml) bzw. einem Anti-P-Selektin-Antikörper (10 µg/ml) für 30 Min. bei 37°C im Waserbad vorinkubiert und anschließend stimuliert.
Zusätzlich zu den jeweils beschriebenen Proben wurden auch Proben für Leerwert, Positiv-Kontrolle und Negativ-, bzw. Iso-Antikörper-Kontrolle angefertigt. Um eine Äquivalenz bezüglich der Trägerlösung des Collagens herzustellen, wurde in jede dieser unstimulierten Proben an Stelle des Collagens die entsprechende Menge isotoner Glucoselösung pipettiert. Die unstimulierten Leerwert- und Kontrollproben wurden ansonsten in gleicher Weise behandelt, wie die mit Collagen stimulierten Proben.

### II.2.4. Versuchsprotokolle zur Stimulierung von Zellen mit Collagen

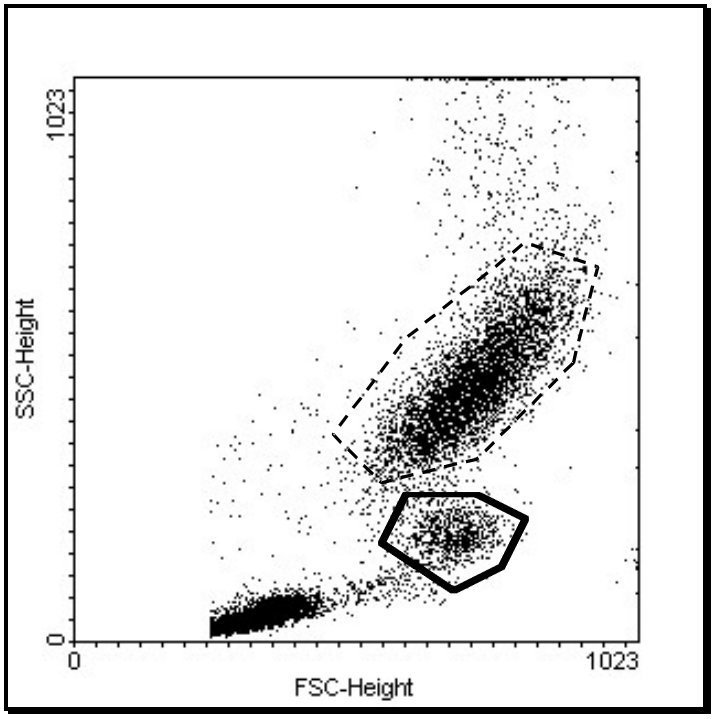
Im Folgenden werden Versuchsprotokolle beschrieben, in denen isolierte Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten einzeln oder gemischt, mit Collagen stimuliert wurden. Die Zellzahl entspricht jeweils den physiologischen Verhältnissen in Vollblut. Für Granulozyten wurden 6 x $10^6$/ml, für Monozyten 5 x $10^5$/ml und für Thrombozyten 2 x $10^8$/ml verwendet.
Je 500 µl der jeweiligen Zellsuspension wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 37°C im Wasserbad mit Collagen stimuliert. Um Antigene auf Leukozyten zu messen wurden 200 µl der Zellsuspension in 1ml Lysing Solution pipettiert. Für die Messung von Antigenen auf Thrombozyten wurden 100 µl der jeweiligen Probe in 1 ml Cell-fix pipettiert und so die Stimulation gestoppt. Für Leerwert- und Kontrollproben gilt die bereits beschriebene Verfahrensweise.

### II.2.5. FACS-Protokoll

Aus den zu analysierenden Vollblutproben wurden je 100 µl Vollblut entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, in dem sich bereits 1 ml Lysing Solution (Becton Dickinson) befand. Das Blut wurde mit der Lysing Solution durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Die Suspension wurde für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurden die durch die Stimulation der Zellen hervorgerufenen Reaktionen gestoppt, die Leukozyten fixiert und die Erythrozyten lysiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Reaktionsgefäße bei 1.100 x g für 5 Min. zentrifugiert. Danach zeigte sich ein deutliches Leukozyten-Pellet am Boden des Gefäßes. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen, während das Pellet mit den jeweiligen Antikörpern für 15 Min. in der Dunkelheit inkubiert wurde. Durch anschließendes Verdünnen mit 1 ml PBS und erneutem Zentrifugieren bei 1.100 x g für 5 Min. wurde die Zell-Antikörpersuspension gewaschen und nach Dekantieren des Überstandes von dem ungebundenen Antikörper befreit. Das Pellet wurde anschließend in 0,5 ml PBS resuspendiert. Um das Ausbleichen der an die Antikörper gekoppelten Farbstoffe zu vermeiden, wurden die Proben bis zur anschließenden Messung in der Dunkelheit aufbewahrt. Nach entsprechender Einstellung des FACScan Zytometers wurden pro Probe 10.000 Gesamtereignisse gezählt und als „file“ auf der Festplatte gespeichert (Abb. 7).

Für die Messung von Leukozyten aus isolierten Zellproben wurde wie beim Vollblut verfahren. Bei Monozyten wurde das Verfahren wegen der geringeren Zellzahl um einen Waschschritt verkürzt.

Zur Messung von Thrombozyten wurden 100 µl der in Cell-fix verdünnten Zellsuspension nach 30 Min. Inkubation bei 1.200 x g für 5 Min. zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Thrombozytenpellet mit den jeweiligen Antikörpern für 15 Min. in der Dunkelheit inkubiert und anschließend mit 0,5 ml Cell wash aufgefüllt und gemischt. Am FACScan wurde eine thrombozytenspezifische Einstellung gewählt und ebenfalls 10.000 Gesamtereignisse gemessen.




**[Abb. 7] Beispiel eines FACS Dotplots:**
Dargestellt ist ein FACS-Dotplot mit typischer Einstellung für Leukozyten. Jeder Punkt wird durch zwei Größen im Koordinatensystem bestimmt und entspricht einer Zelle oder einem entsprechenden Partikel: Größe (FSC = forwardscatter) und Granularität (SSC = sidewardscatter). Die gestrichelte Umrandung zeigt Neutrophile Granulozyten, die durchgezogene Monozyten.

In der Durchflusszytometrie wurden je Ansatz folgende Antikörper verwendet:

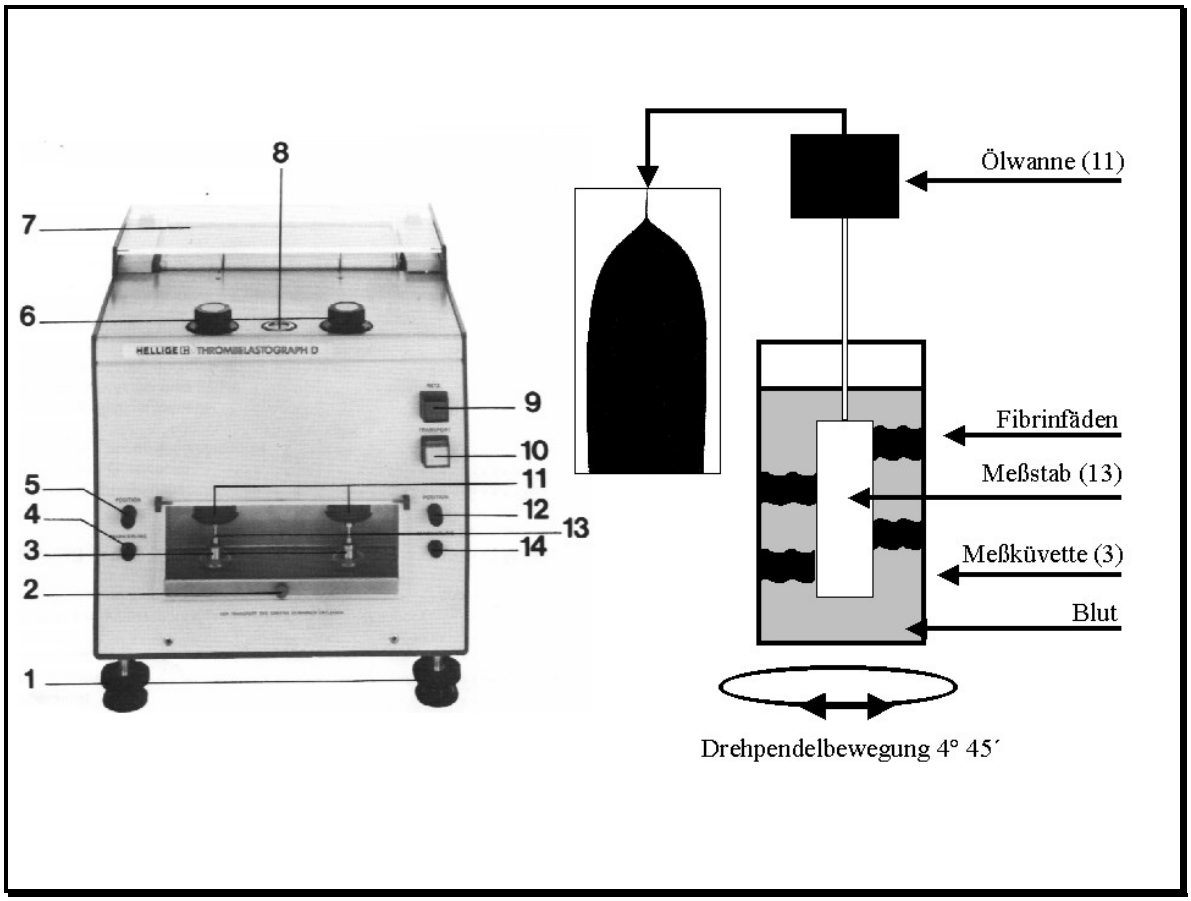
Für die Bestimmung der Monozytenpopulation wurden 0,5 µg eines Anti-CD14-Antikörpers (PE) benützt. Die Neutrophilen Granulozyten wurden mit 1 µg eines Anti-CD15-Antikörpers (PE) markiert. Zur FACS-Messung des TF-Antigens verwendeten wir 1 µg eines Anti-TF-Antikörpers (FITC). Als Negativkontrolle wurde 1 µg eines Maus IgG Isotyps (FITC) eingesetzt. Die Thrombozyten wurden durch einen Anti-CD62P-Antikörper (PE) detektiert.

Als Auswertungssoftware wurde das Programm WinMDI (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry) Version 2.8 von Joseph Trotter verwendet. Es kann unter http://facs.scripps.edu/software.html bezogen werden.

## II.3. Vollblutkoagulometrie

### II.3.1. Messprinzip

Bei der Vollblutkoagulometrie handelt es sich um ein mechanisches Verfahren mit dem der Blutgerinnungsablauf bis hin zur Fibrinolyse registriert werden kann. Das von uns verwendete Gerät ist in Abb. 8 abgebildet. Eine antikoagulierte Blutprobe wird in einer vorgewärmten (37°C) Kunststoffküvette **(3)** in eine Drehpendelbewegung versetzt. Diese Bewegung entspricht 4° 45´ um die Küvettenachse. Diese Drehpendelbewegung wird in 2 Phasen eingeteilt: eine 10 Sekunden lange Bewegungsphase und eine je 1 Sekunden lange Ruhephase am Ende der Bewegung. Ein in die Probe versenkter Meßstab **(13)**, ebenfalls aus Kunststoff, befindet sich in der Mitte der Küvette. Wird die Blutprobe rekalzifiziert und damit das Gerinnungssystem aktiviert, bilden sich zwischen der Küvetteninnenwand und dem sich in Ruhe befindenden Meßstab Fibrinfäden aus. Bei fortgeschrittener Fibrinbildung reichen die ausgebildeten Fibrinfäden aus, um den Meßstab in dieser Drehpendelbewegung auszulenken. Diese Auslenkung wird von einem mit Ölwannen **(11)** gedämpften Meßsystem registriert und über ein Schreibwerk auf Thermoregistrierpapier abgebildet.




**[Abb. 8] Thrombelastograph D:**

**(1)** verstellbare Füße
**(2)** Plexiglasabdeckung der Meßeinrichtungen
**(3)** Meßküvetten (Kunststoff) zum Aufnehmen der Proben
**(4) (14)** Taste „Markierung“ zum Festsetzen des Startpunktes
**(5) (12)** Nulllinienregler „Position“
**(6)** Drehknöpfe zum Herablassen der Meßstäbe
**(7)** Plexiglasabdeckung des Registrierteils
**(8)** Wasserwaage zum waagerechten Aufstellen des Gerätes
**(9)** Netzschalter
**(10)** Schalter zum Ein- und Ausschalten des Papiertransports
**(11)** Ölwannen für die Dämpfung des Meßsystems
**(13)** Meßstäbe

Für die Auswertung sind folgende Werte von Bedeutung:

r: Rate der Fibrinbildung [mm]; entspricht der Strecke ab Messbeginn bis der Ausschlag des Schreibers größer als 1mm ist; Papiervorschub 2 mm/Minute

k: Rate des Thrombuswachstums [mm], Strecke zwischen r und der Amplitude = 20 mm

MA: bezeichnet die maximale Amplitude im Ausschlag des Schreibers

### II.3.2. Versuchsprotokoll: Vollblut

5 Min. vor der Messung wurden die Kunststoffküvette und der Meßstab in das Gerät verbracht. Anschließend wurden 300 µl antikoaguliertes (citriertes) Vollblut in die Küvette pipettiert. Durch die Zugabe von 60 µl einer Kalzium-Lösung (100 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, pH 7,4) wurde die Gerinnung aktiviert. Die Probe wurde sofort durch Heben und Senken des Meßstabes gemischt und der Startzeitpunkt durch Drücken der Markierungstaste gekennzeichnet. Die Messung erfolgte im Allgemeinen bis die maximale Amplitude (MA) erreicht wurde.

Zur Stimulation mit Collagen wurde den Proben unmittelbar vor der Rekalzifizierung die entsprechende Menge Collagen bzw. Trägerlösung hinzupipettiert.

Um die Fibrinbildung in stimulierten Proben zu hemmen, wurde das Vollblut 30 Min. vor Messbeginn mit je 20 µg/ml der Anti-TF-Antikörper VIC7, VD8 oder deren Kombination bei 37°C vorinkubiert. Ebenfalls mit 30 Min. Vorinkubation wurde ein Anti-P-Selektin-Antikörper (10 µg/ml) eingesetzt.

Als weitere Möglichkeit die Fibrinbildung zu hemmen, verwendeten wir die inaktive Form des Faktor VIIa ($VIIa_i$). Zur Herstellung wurden 2,4 mg Faktor VIIa in 1,3 ml eines HEPES/NaCl-Puffers gelöst. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der 10-fachen molaren Menge (0,268 mg) von Phe-Phe-Arg-Chloromethylketon (CMK) über den Zeitraum von einer Stunde bei Raumtemperatur. Um freies CMK zu entfernen und zur Aufreinigung des Proteins wurde die Lösung in Centricons gefüllt und mit einem Ausschlussgewicht von 10 kD bei 1050 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine mehrfache Spülung der Centricons mit dem HEPES/NaCl-Puffer. Der Faktor $VIIa_i$ wurde dem Vollblut in einer Konzentration von 500 nM zugegeben und anschließend mit der Rekalzifizierung der Probe begonnen.

Zum Ausschluß der Beteiligung des Kontaktaktivierungssystems diente der Corntrypsininhibitor (CTI). CTI ist ein Hemmstoff der Oberflächenaktivierung. Das frisch abgenommene antikoagulierte Vollblut wurde in der Abnahmespritze mit einer Endkonzentration von 32 µg/ml inkubiert. Anschließend konnte das so präparierte Blut im TEG weiterverarbeitet werden.

## II.4. Faktor Xa Bildung

### II.4.1. Messprinzip

Um entstandenen Faktor Xa messen zu können verwendeten wir ein ELISA-Assay, in dem der Umsatz eines Faktor Xa spezifischen Substrates zum Nachweis diente. Als Substrat für den Faktor Xa wurde das S2222 verwendet. Dieses Substrat wird spezifisch durch Faktor Xa gespalten und das daraus resultierende Produkt kann in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt werden.

### II.4.2. Versuchsprotokoll: Xa Bildung unter Stimulation mit Collagen

In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden jeweils alleine oder zusammen isolierte Monozyten (2 x $10^3$/µl), Neutrophile Granulozyten (2 x $10^4$/µl), Thrombozyten (3 x $10^5$/µl) resuspendiert. Anschließend wurden die gelösten Zellen in einem Wasserbad ebenfalls bei 37°C für 5 Min mit 12 µg/ml Collagen stimuliert. Danach wurde die Messung durch Hinzufügen von 50 µl $CaCl_2$ (8 mM) und 100 µl einer Lösung bestehend aus 225 µl Beriplex (25 I.E./ml) + 400 µl Substrat S2222 (2 mg/ml) + 3,375 ml Resuspensionspuffer in einer 96 Well Platte eines ELISA-Readers bei Raumtemperatur gestartet. Die Messung erfolgte über 30 Min.. Zu jedem Ansatz wurde eine Standardreihe mit rekombinantem TF unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

## II.5. Double-Sandwich-ELISA

### II.5.1. Messprinzip

Um die Konzentration von TF in Zelllysaten zu bestimmen, wurde ein Double-Sandwich-ELISA verwendet. Dabei wird zuerst eine Mikrotiterplatte mit einem gegen das zu messende Protein gerichteten Antikörper beschichtet. Die durch Gefrier-Tauzyklen lysierten Zellen werden aufbereitet und das Lysat in die Mikrotiterplatten gegeben. Ein zweiter gegen TF gerichteter peroxidasegekoppelter Anti-TF-Antikörper wird hinzugegeben. Dadurch wird ein Substrat umgesetzt, dessen Abbauprodukte mit

dem Photometer gemessen werden können. Anhand einer Standardkurve wird gleichzeitig der Proteingehalt in den Zelllysaten gemessen.

### II.5.2. Versuchsprotokoll: Bestimmung des zellulären Tissue Factor-Gehaltes

Blutzellen (Monozyten, Neutrophile Granulozyten und Thrombozyten) wurden wie oben beschrieben isoliert und in mehreren Gefrier- und Tauzyklen (-20°C) lysiert. Danach wurden die Zelllysate in einer Detergenslösung (0,05 M Tris/HCl; 0,1 M NaCl; 0,1% TritonX-100; 5 mM EDTA bei pH7,6) für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Die Mikrotiterplatten wurden parallel mit 50 µl des Anti-TF-Antikörpers VIC12 (10 µg/ml) bei 4°C für 20 Std. inkubiert. Die Platten konnten nach zweimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer und einer einstündigen Waschpufferinkubation zur Minimierung unspezifischer Bindungen mit je 50 µl der Zelllysate gefüllt werden. Die Inkubation erfolgte über 2 Std. bei 37°C. Anschließend wurde ein zweiter peroxidasegekoppelter Anti-TF-Antikörper (VIC7) zugegeben und für weitere 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Als Substrat diente O-Phenylen-diamin (OPD). Anschließend erfolgte die Messung bei 492 nm. Für die Standardkurve wurde rekombinanter TF verwendet.

## II.6. Elektronenmikroskopie

### II.6.1. Messprinzip

Die von einer Glühkathode ausgehenden Elektronen werden beschleunigt und mittels eines Kondensors gebündelt. Anschließend durchstrahlen die Elektronen die ultradünn geschnittene Probe. Der Elektronenstrahl durchläuft elektromagnetische Linsen und das vergrößerte Bild kann anschließend dargestellt werden. Um das TF-Antigen darzustellen, wird ein doppeltes Antikörperverfahren benutzt. Als erster Antikörper wurde ein gegen das Oberflächenantigen gerichteter Antikörper aus der Maus verwendet. Ein zweiter, goldmarkierter, Anti-Maus-Antikörper aus der Ziege wurde eingesetzt, um den ersten Antikörper zu detektieren. Über die Goldmarkierung kann nun elektronenmikroskopisch das Oberflächenantigen auf der Zelle lokalisiert werden.

### II.6.2. Versuchsprotokoll: Vollblutzellen unter Stimulation mit Collagen

Vollblut wurde mit einer Collagen Konzentration von 12 µg/ml bei 37°C für 5 Min. stimuliert. Anschließend wurden Anti-TF-Antikörper (VD8, VIC7) mit einer Konzentration von je 10 µg/ml bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes wurden pro Probe 100 µl mit 1 ml Lysing Solution verdünnt und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die fixierten Leukozyten wurden, wie unter II.2.5. beschrieben, gewaschen und für 1 Std. bei 37°C mit einem goldmarkierten Anti-Maus-IgG-Antikörper (10 nM) behandelt. Zuletzt wurden Ultradünnschnitte angefertigt, die dann mit dem Elektronenmikroskop untersucht wurden.

Die Untersuchungen zum Double-Sandwich-ELISA und der Elektronenmikroskopie wurden in Kooperation mit Herrn PD Dr. Thomas Luther, Institut für Pathologie, Dresden, durchgeführt.

# III. Materialien und Geräte

## III.1. Materialien

### III.1.1. Puffer

**Antikörperpuffer:**

| | |
|---|---|
| EDTA, 0,15% | Roth, Karlsruhe |
| BSA Fraktion V, 0,5% | Serva, Heidelberg |

gelöst in PBS, pH auf 7,4 eingestellt, entgast

**ELISA Waschpuffer:**

| | |
|---|---|
| 0,02M Phosphatpuffer | |
| 0,15M NaCl | Roth, Karlsruhe |
| 4% Gelatine | |
| 0,05% Tween | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

pH bei 7,6

**HEPES/NaCl-Puffer:**

| | |
|---|---|
| HEPES, 2,38g | Roth, Karlsruhe |
| NaCl, 8,18g | Roth, Karlsruhe |

gelöst in 1000ml Aqua dest., pH bei 7,4

**Inkubationspuffer:**

| | |
|---|---|
| 0,05M Tris/HCl | Roth, Karlsruhe |
| 0,1M NaCl | Roth, Karlsruhe |
| 0,1% Triton X-100 | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| 5mM EDTA | Roth, Karlsruhe |

pH bei 7,6

**Resuspendierungspuffer:**

| | |
|---|---|
| NaCl, 138mM | Roth, Karlsruhe |
| KCl, 2,7mM | Roth, Karlsruhe |
| $NaHCO_3$, 12mM | Roth, Karlsruhe |
| $NaH_2PO_4$, 0,4mM | Roth, Karlsruhe |
| D-Glucose, 5mM | Roth, Karlsruhe |
| MgCl, 1mM | Roth, Karlsruhe |
| HEPES, 5mM | Roth, Karlsruhe |

pH mit NaOH, bzw. HCl auf 7,4 eingestellt, entgast

**TEG Kalziumpuffer:**

| | |
|---|---|
| $CaCl_2$, 100mM | Roth, Karlsruhe |
| HEPES, 10mM | Roth, Karlsruhe |

gelöst in Aqua dest. pH bei 7,4

**Waschpuffer:**

| | |
|---|---|
| EDTA, 0,13% | Roth, Karlsruhe |
| BSA Fraktion V, 0,15% | Serva, Heidelberg |

gelöst in PBS, pH auf 7,4 eingestellt, entgast

### III.1.2. Blut- und Zellpräparation

| | |
|---|---|
| Antikörper: | |
| CD14 Microbeads | Miltenyi, Biotech, Bergisch Gladbach |
| CD15 Microbeads | Miltenyi, Biotech, Bergisch Gladbach |
| CMK | Bachem, Heidelberg |
| Einmalspritzen 10ml, 20ml | Braun, Melsungen |
| Falcon blue max jr. Röhrchen | Falcon, Greiner Labortechnik |
| Ficoll Paque | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| HCl | Roth, Karlsruhe |
| Kodan-Tinktur FORTE | Schülke Mayr, Norderstedt |

| | |
|---|---|
| NaOH | Roth, Karlsruhe |
| PBS | Sigma-Alderich, Deisenhofen |
| Polypropylenröhrchen 10 ml | Greiner Labortechnik, |
| Trinatriumcitrat Dihydrat | Roth, Karlsruhe |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Venofix-Punktionsbesteck | Braun, Melsungen |

### III.1.3. Durchflußzytometrie

| | |
|---|---|
| Antikörper: | |
| Mouse-anti-human CD40L | Prof. Dr. R Kroscek, Berlin |
| Mouse-anti-human CD62P | Endogen, Woburn USA |
| Antikörper, fluoreszenzmarkiert: | |
| Mouse-anti-human CD14 PE (C156) | Leinco, Ballwin |
| Mouse-anti-human CD15 PE (C160) | Leinco, Ballwin |
| Mouse-anti-human CD62P PE (MCA 769 PE) | Serotec über Biozol, Eching |
| Mouse-anti-human TF FITC (4508CJ) | American Diagnostica, Pfungstadt |
| Mouse-anti-human TF FITC (9010-5079) | Biotrend, Köln |
| Mouse IgGI Negativ Kontrolle FITC (MCA928F) | Serotec über Biozol, Eching |
| Cell Fix Fertiglösung | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Cell Wash Fertiglösung | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Collagen Typ I (Kollagenreagens Horm) | Nycomed Amersham, Ismaning |
| Glukose D(+) | Merck, Darmstadt |
| Inhibitoren: | |
| $\alpha_1$-ACT | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| $\alpha_1$-AT | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| LPS aus E.coli | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Lysing Solution Fertiglösung | Becton Dickinson, Heidelberg |
| PBS | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Reaktionsgefäße Plastibrand 1,5 ml | Brand, Wertheim |

### III.1.4. Vollblutkoagulometrie

| | |
|---|---|
| Antikörper: | |
| Mouse-anti-human CD62P | Endogen, Woburn USA |
| Mouse-anti-human TF VD8 | PD Dr. Luther, Inst. für Pathologie, Dresden |
| Mouse-anti-human TF VIC7 | PD Dr. Luther, Inst. für Pathologie, Dresden |
| Mouse-IgGI Negativ Kontrolle | Biozol, Eching |
| Collagen TypI (Kollagenreagens Horm) | Nycomed Amersham, Ismaning |
| Inhibitoren: | |
| CTI | Haemochrom Diagnostica, Essen |
| Faktor VIIa Novo seven 120, human | Novo Nordisk, Bagsvaerd Dänemark |
| Öl zur Probenabdeckung | Hellige, Freiburg |

### III.1.5. Faktor Xa Bildung

| | |
|---|---|
| Beriplex PN 500 | Behring, Marburg |
| $CaCl_2$ gelöst in Aqua dest. 8 mM | Roth, Karlsruhe |
| Collagen TypI (Kollagenreagens Horm) | Nycomed Amersham, Ismaning |
| Substrat S2222 | Haemochrom Diagnostica, Essen |

### III.1.6. Double-Sandwich ELISA

| | |
|---|---|
| Antikörper: | |
| Mouse-anti-human TF VIC7(peroxidase+) | PD Dr. Luther, Inst. für Pathologie, Dresden |
| Mouse-anti-human TF VIC12 | PD Dr. Luther, Inst. für Pathologie, Dresden |
| Substrat OPD (O-Phenylen-diamin) | Fluka, Schweiz |

### III.1.7. Elektronenmikroskopie

| | |
|---|---|
| Antikörper: | |
| Mouse-anti-human TF VD8 | PD Dr. Luther, Inst. für Pathologie, Dresden |
| Mouse-anti-human TF VIC7 | PD Dr. Luther, Inst. für Pathologie, Dresden |
| Collagen TypI (Kollagenreagens Horm) | Nycomed Amersham, Ismaning |
| Lysing Solution Fertiglösung | Becton Dickinson, Heidelberg |

## III.2. Geräte

| | |
|---|---|
| Coulter Counter | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| ELISA Reader Dynatech MR 7000 | Dynatech Laboratories, Alexandria, USA |
| FACScan Durchflusszytometer | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Lamin Air Abzugsystem | Heraeus Instruments, Hanau |
| Mini Macs Zellseparationssäulen MS $25^{+}$ | Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach |
| Pipetman – Pipetten | Abimed, Langenfeld |
| Pipetus Akku Pipettierhilfe | Abimed, Langenfeld |
| Thrombelastograph D | Hellige, Freiburg |
| Küvetten | Dynabyte, München |
| Messstifte | Dynabyte, München |
| Papier | Hellige, Freiburg |
| Zentrifugen: | |
| Biofuge 13 | Heraeus Instruments, Hanau |
| Labofuge 400 (R) | Heraeus Instruments, Hanau |
| Nalgene Ultra Plus | Beckmann, München |
| Varifuge GL | Heraeus Instruments, Hanau |

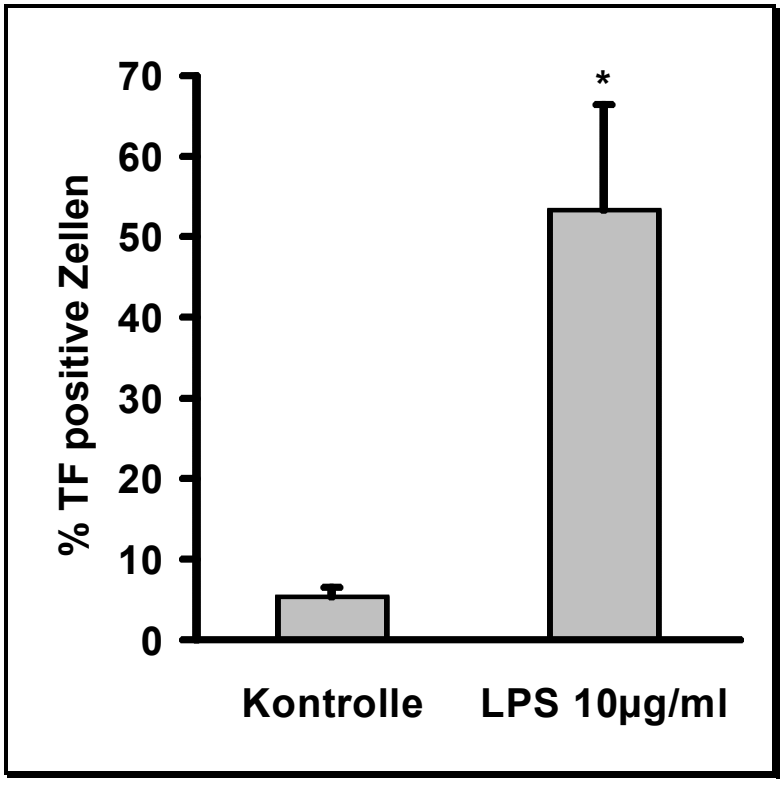
## IV. Statistik

Die Statistik wurde mit dem Computerprogramm Jandel Scientific SigmaStat für Windows Version 1.0 erstellt. Als signifikant gelten Werte mit $p<0,05$. Sie sind in den Abbildungen mit einem ***** gekennzeichnet. Zum Vergleich der einzelnen Mittelwerte wurden bei Normalverteilung der ungepaarte t-Test verwendet. Bei Nicht-Normalverteilung wurde der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test angewendet.

# C. Ergebnisse

## I. Präsentation von Tissue Factor auf Oberflächen von Monozyten unter Langzeitstimulation mit LPS

Es ist schon seit längerem bekannt, dass die Transkription des TF-Gens der Monozyten durch Langzeitstimulation mit Lipopolysaccharide (LPS) induziert wird (Osterud, 1998). Um die Regulation der TF-Synthese im Vollblut zu analysieren, stimulierten wir antikoaguliertes Vollblut mit 10 µg/ml LPS bei 37°C über 2 Std.. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Zelloberfläche CD14-positiver Zellen (vorwiegend Monozyten) auf TF-Antigen hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die LPS-Stimulation den Prozentsatz TF-positiver Zellen von 5,3 +/-1,2 auf 53,3 +/- 13,1 erhöhte (Abb. 9).



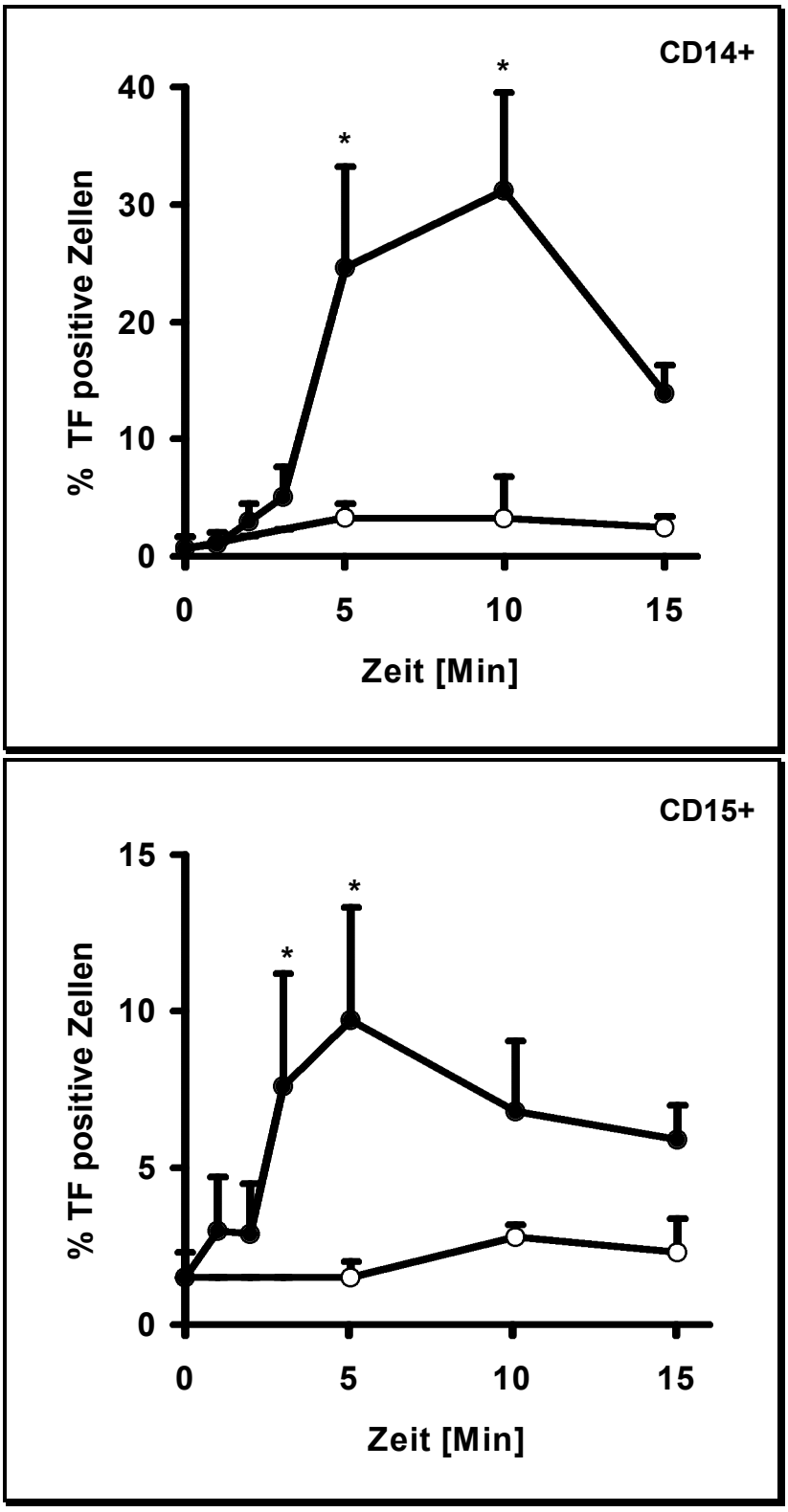

**[Abb. 9] Vollblutstimulation mit LPS:**
Vollblut wurde über 2 Std. bei 37°C mit 10 µg/ml LPS stimuliert. Die Zellen wurden fixiert und mit dem Anti-TF-Antikörper (FITC) inkubiert. Die CD14-positiven Zellen (Monozyten) zeigten dabei einen ca. 10-fachen Anstieg der TF-Präsentation. n=5, *$p<0,05$ gegenüber der Kontrolle.

## II. Collagen als alternativer Kurzzeitstimulus

Um die Bedeutung des physiologisch wie pathophysiologisch relevanten Stimulus für die Hämostase zu untersuchen, stimulierten wir Vollblut über 2 Std. bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen von Collagen TypI (1 µg/ml, 5 µg/ml, 8 µg/ml, 12 µg/ml, 15 µg/ml). Dabei ergab sich, dass eine Konzentration von 12 µg/ml am wirkungsvollsten war. Mit dieser Collagen-Konzentration war ein der LPS-Stimulation vergleichbarer 10facher Anstieg an TF-positiven Monozyten zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt). Die Monozytenpopulation wurde dabei sowohl durch ihre typische Position im Durchflusszytometrie-Dotplot als auch durch die maximale Bindung von Anti-CD14- Antikörpern identifiziert. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass durch die Stimulation Komplexe mehrerer Monozyten mit hohem CD14+ Niveau das Ergebnis verfälschten. Nun wurden auch Versuchsansätze mit kürzerer Stimulationszeit durchgeführt.

Dabei zeigte sich überraschenderweise, dass bereits innerhalb der ersten 5-10 Min. die Assoziation von TF-Antigen mit den Zelloberflächen der CD14-positiven Monozyten stark anstieg (Abb. 10). Nach 5 und 10 Min. waren die Werte in der Tat signifikant erhöht. Ein Maximum wurde nach 10 Min. Collagen Stimulation erreicht. Damit war bereits nach zehn Min. mehr als 50 % des Wertes an TF positiven Zellen erreicht, der nach einer zweistündigen Stimulation mit LPS oder Collagen beobachtet worden war.

Erstaunlicherweise war der TF-Anstieg nicht nur auf Monozyten beschränkt, sondern auch auf Neutrophilen nachweisbar. Die Neutrophilen wurden dabei analog zu den Monozyten durch ihre Position im Dotplot und die maximale Bindung an Anti-CD15-Antikörpern identifiziert. Bereits nach 5 Min. konnte hier ein erstes Maximum TF positiver Neutrophiler festgestellt werden (9,7 +/- 1,5; Abb. 9). Die für jeden Zeitpunkt mitgeführte Kontrolle zeigte dagegen für beide Zellpopulationen keinen Anstieg. Daraus ergab sich der unerwartete Befund, dass unter Collagen Stimulation bereits innerhalb der ersten 5 Min. eine TF-Präsentation in Assoziation mit Monozyten und Neutrophilen im Vollblut beobachtet werden konnte.




**[Abb. 10] TF-Präsentation nach Kurzzeitstimulation von Vollblut mit Collagen:**
Vollblut wurde für 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15 Min. mit/ohne Collagen (12 µg/ml) bei 37°C stimuliert und anschließend fixiert. CD14+ Zellen (Monozyten) (obere Abb.) und CD15+ Zellen (Neutrophile) (untere Abb.) wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und die Präsentation von TF Antigen mit der Durchflusszytometrie in den verschiedenen Zellpopulationen gemessen.
○ = ohne Collagen (Kontrolle)
● = mit Collagen
Die dargestellten Werte wurden mit Hilfe der Negativ Kontrolle korrigiert. n=10
*$p<0,05$ gegenüber der Kontrolle

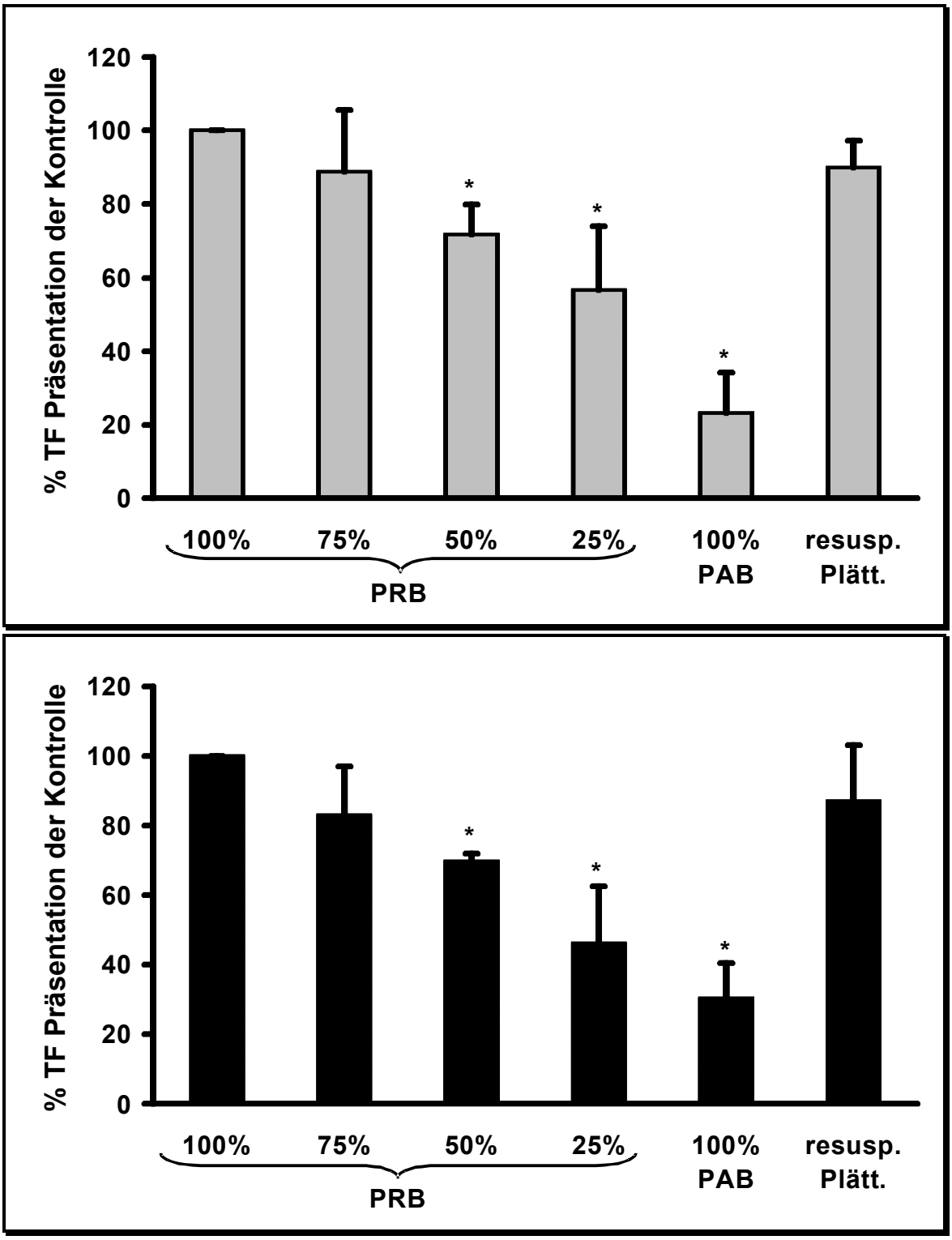
## III. Plättchenabhängigkeit der leukozytären Tissue Factor Präsentation unter Stimulation mit Collagen

Collagen ist ein starker Plättchenagonist. Gleichzeitig wirkt Collagen aber eher nur gering aktivierend auf Monozyten und Neutrophile, insbesondere während einer Kurzzeitstimulation. Daher war es wichtig zu wissen, welche Rolle die Thrombozyten bei der Blut-assoziierten TF-Präsentation spielten. Zu diesem Zweck wurden dem Vollblut gesunder Spender die Thrombozyten durch Herstellen von Vollblut mit verschiedener Plättchenkonzentration stufenweise entzogen. In einem weiteren Ansatz wurden isolierte Plättchen dem PAB in physiologischer Konzentration wieder zugeführt und resuspendiert. Anschließend wurde das so präparierte Vollblut für 5 Min. bei 37°C mit Collagen stimuliert, die Reaktion mit Lysing Solution gestoppt und die Zellen fixiert. Die Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und in der Durchflusszytometrie auf die Präsentation von TF-Antigen in den Leukozytenfraktionen untersucht.

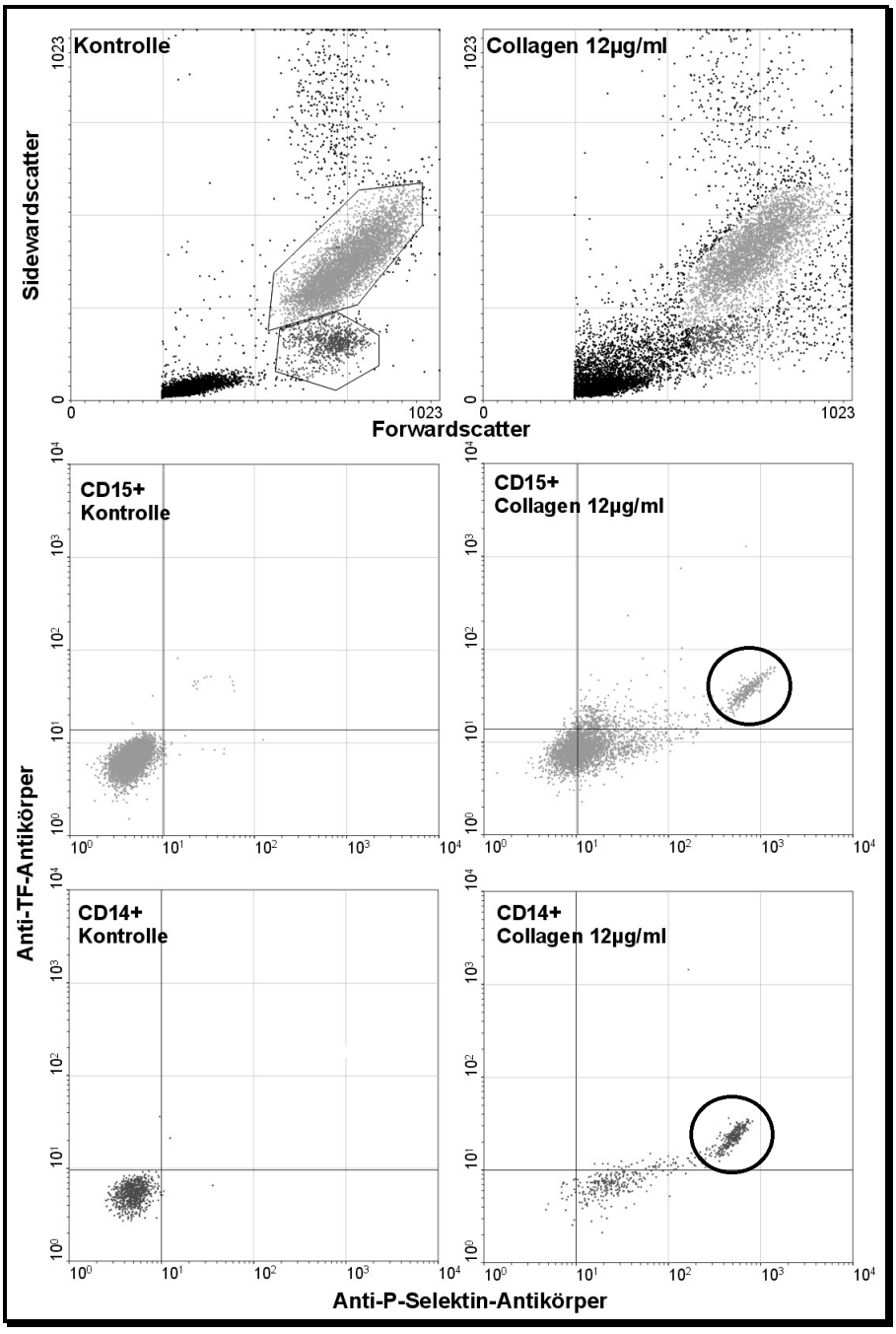
Dabei zeigte sich mit abnehmendem Plättchengehalt sowohl für die CD14-positiven Zellen als auch für die CD15-positiven Zellen eine Abnahme der TF-positiven Zellen (Abb. 11). Im Falle der untersuchten Monozyten war die TF Präsentation in PAB auf unter 25% des Kontrollwertes reduziert (23,2% +/- 11). Wurden diesem PAB Thrombozyten in physiologischer Konzentration wieder hinzugefügt, so konnte das Messergebnis wieder auf etwa 90% des Kontrollwertes angehoben werden (89,9% +/- 7,4).

Für die CD15-positiven Zellen war das Ergebnis dem der Monozyten vergleichbar. Im PAB zeigte sich eine 70 %ige Reduktion (30,3 +/- 10,3) im Vergleich zur Kontrolle. Durch Zugabe der Thrombozyten ergab sich eine TF Präsentation von 87,1 % +/- 16 der Kontrolle. In beiden Leukozytenpopulationen wurden statistisch signifikante Reduktionen ($*p<0,05$) der TF Präsentation im Vergleich zur Kontrolle gefunden.

Die Ergebnisse zeigten, dass Plättchen im Vollblutsystem für die schnelle, collagenstimulierte TF-Präsentation in Assoziation mit Monozyten und Granulozyten eine entscheidende Rolle spielen.




**[Abb. 11]**
**TF-Präsentation im Vollblut bei verschiedenen Plättchenkonzentrationen:**
Plättchenreiches und Plättchen-armes Vollblut wurde in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (100%PRB 0%PAB, 75%PRB 25%PAB, 50%PRB 50%PAB, 25%PRB 75%PAB, 0%PRB 100%PAB, 100%PAB+resusp. Plättchen) mit 12 µg/ml Collagen bei 37°C für 5 Min stimuliert. Die Zellen wurden anschl. fixiert, mit zellspezifischen Antikörpern inkubiert und die TF Antigen Präsentation auf der Zelloberfläche mit der Durchflusszytometrie gemessen.
Oberer Teil (Graue Säulen):Monozyten, n=6
Unterer Teil (Schwarze Säulen): Neutrophile, n=6
*$p<0,05$ gegenüber der Kontrolle (100%PRB)




**[Abb. 12] Nachweis von P-Selektin und TF in Assoziation mit Monozyten und Neutrophilen:**

Vollblut wurde für 5 Min. bei 37°C mit Collagen stimuliert, anschließend die Zellen fixiert und mit Anti-P-Selektin und Anti-TF-Antikörper inkubiert. Die Leukozytenfraktionen wurden mit der Durchflusszytometrie gemessen und durch ihre typische Lage im Dotplot detektiert.

Oben links: Kontrolle mit dargestellten Leukozytenfraktionen (Sideward- gegen Forwardscatter) Großes Polygon: CD15+, kleines Polygon CD14+

Oben rechts: Collagenstimulation (Sideward- gegen Forwardscatter)

Mitte links: CD15-positive Zellen, Kontrolle (Anti-TF- gegen Anti-P-Selektin-Antikörper Fluoreszenz)

Mitte rechts: CD15-positive Zellen nach Collagenstimulation (Anti-TF- gegen Anti-P-Selektin-Antikörper Fluoreszenz)

Unten links: CD14-positive Zellen, Kontrolle (Anti-TF- gegen Anti-P-Selektin-Antikörper Fluoreszenz)

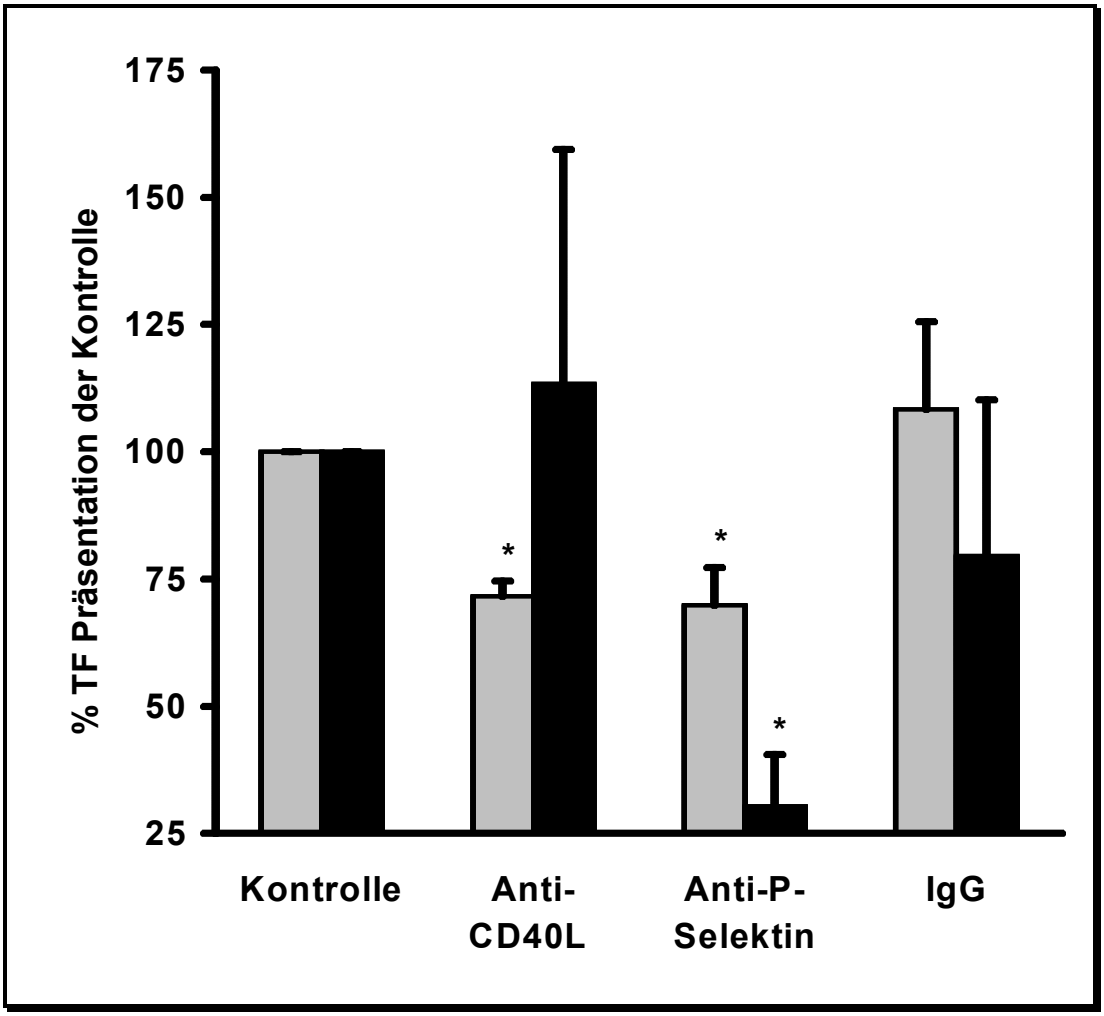
Unten rechts: CD14-positive Zellen nach Collagenstimulation (Anti-TF- gegen Anti-P-Selektin-Antikörper Fluoreszenz)

Die eingekreisten Zellen entsprechen maximaler Anti-P-Selektin- und Anti-TF-Antikörper Fluoreszenz in den stimulierten Proben.

Daher fragten wir uns, ob die TF-Präsentation möglicherweise nur mit denjenigen Leukozytenfraktionen assoziiert war, die gleichzeitig Plättchen gebunden hatten (Plättchen-Leukozyten-Konjugate). Zu diesem Zweck wurden die Leukozytenfraktionen zusätzlich mit einem fluoreszenzmarkierten Anti-P-Selektin-Antikörper inkubiert, einem Oberflächenmarker für aktivierte Plättchen. Die Leukozytenfraktionen wurden aufgrund des gleichen Emissionslevels der Markierung der Anti-P-Selektin- und Anti-CD14/15-Antikörper durch ihre typische Lage im forward/sideward scatter Koordinatensystem identifiziert. Bei der Analyse wurden die beiden Fluoreszenzstärken in einem logarithmischen Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen. Dabei zeigte sich sowohl für die Monozytenfraktion als auch für die Neutrophilen, dass diejenigen Zellen die größte TF-Fluoreszenz aufwiesen, die sich auch am stärksten in der P-Selektin Fluoreszenz anfärbten (Kreise in Abb. 12). Im Gegensatz dazu wurde in den beiden Leukozytenfraktionen ohne P-Selektinfärbung kein Anstieg der TF-Fluoreszenz gemessen. Hieraus liess sich folgern, dass TF in Plättchen-Leukozyten-Konjugaten, aber nicht auf der Oberfläche der plättchenfreien Neutrophilen und Monozyten präsentiert wurde.

## IV. Hemmung der Tissue Factor-Präsentation auf Leukozyten

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse erschien daher für die TF-Präsentation auf Leukozytenoberflächen nicht nur die Menge an Thrombozyten im stimulierten Vollblut wichtig zu sein, sondern auch die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten. Um diese Interaktion zu hemmen, wurde Vollblut mit Antikörpern gegen Adhäsionsproteine inkubiert, welche die Plättchenadhäsion an Neutrophile und Monozyten vermitteln (u.a. P-Selektin, CD40L). Die TF-Präsentation in Assoziation mit den Monozyten konnte sowohl durch den Anti-CD40L-Antikörper als auch durch die Zugabe des Anti-P-Selektin-Antikörpers um ca. ein Drittel reduziert werden. Die Negativ Kontrolle erbrachte dagegen keinen Unterschied. Die mit Neutrophilen assoziierte TF-Präsentation wurde durch den Anti-P-Selektin-Antikörper um 70% vermindert. Dagegen wurde im Falle des Anti-CD40L-Antikörpers keine Verminderung festgestellt. Die mit dem Kontrollantikörper behandelten Werte unterschieden sich nicht von der Kontrolle (Abb. 13).

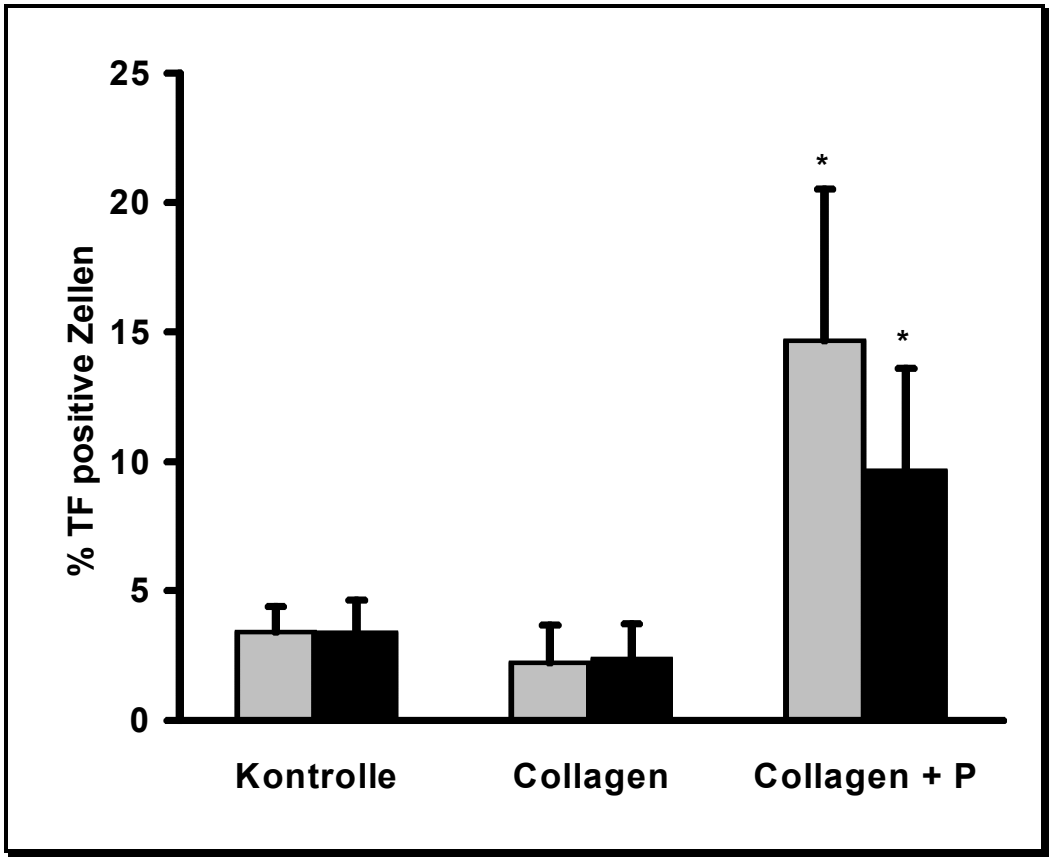



**[Abb. 13] Wirkung von Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle auf die TF-Präsentation in Plättchen-Leukozyten-Konjugaten:**
Vollblut wurde mit Anti-CD40L- oder Anti-P-Selektin oder dem Äquivalent an Kontroll-IgG für 30 Min. vorinkubiert und anschließend Collagen (12 µg/ml) für 5 Min. bei 37°C stimuliert. Die Reaktion wurde mit Lysing-Solution gestoppt, die Zellen mit fluoreszendierenden Antikörpern inkubiert und die TF Präsentation auf den Leukozytenfraktionen mit der Durchflusszytometrie gemessen. Die Ergebnisse wurden in Prozent der Kontrolle umgerechnet.
Graue Säulen: Monozyten, n=5
Schwarze Säulen: Neutrophile Granulozyten, n=4
*$p<0,05$ gegenüber der Kontrolle

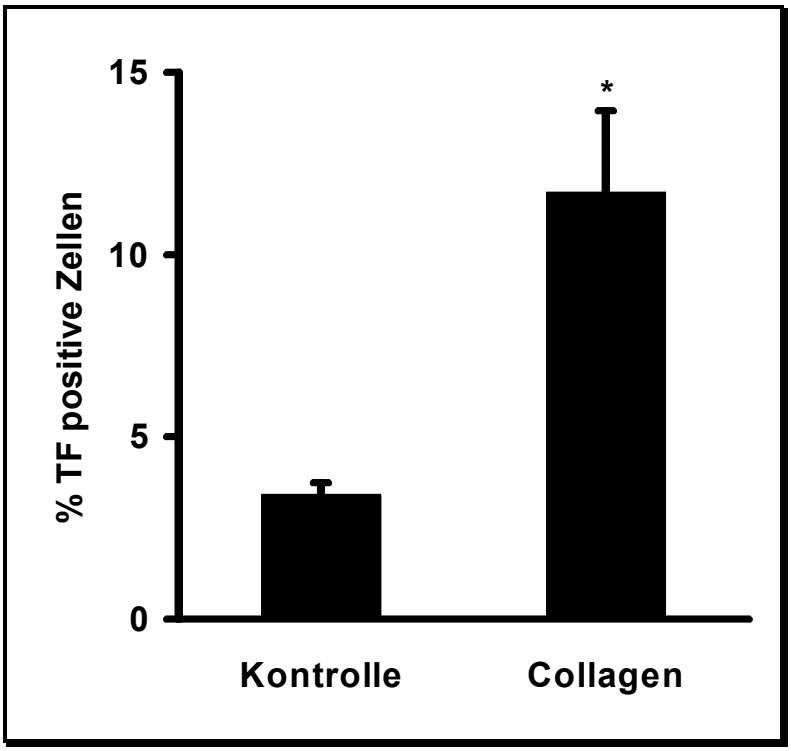
## V. Tissue Factor-Präsentation auf isolierten Zellen

Zur Komplettierung der im Vollblutsystem erhaltenen Ergebnisse, untersuchten wir als nächstes, ob auch isolierte Blutzellen nach Kurzzeitstimulation mit Collagen TF präsentieren würden. Dazu wurden die einzelnen Leukozytenfraktionen und Thrombozyten aus frisch gewonnenem antikoaguliertem Vollblut gesunder Spender isoliert und in Pufferlösungen resuspendiert. Die so erstellten Zellsuspensionen

wurden analog zu den Vollblutversuchen mit Collagen (TypI) für 5 Min. stimuliert. Dabei zeigte sich, dass weder die isolierten Monozyten noch die isolierten Granulozyten nach Stimulation TF auf ihrer Oberfläche präsentierten (Abb. 14). Wurden allerdings den Leukozytenfraktionen zusätzlich Thrombozyten zugefügt, so konnte die Präsentation von TF auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Ein wichtiger Befund ergab sich nach Stimulierung der isolierten Plättchen in Abwesenheit der Leukozytenfraktionen. Wir beobachteten, dass die Stimulierung der isolierten Thrombozyten mit Collagen zu einer direkten Präsentation von TF auf der Thrombozytenoberfläche führt (Abb. 15).




**[Abb. 14] TF-Präsentation auf Oberflächen isolierter Leukozyten:**
In Resuspendierungspuffer gelöste isolierte Zellen (Monozyten 5 x $10^5$ /ml, Neutrophile Granulozyten 6 x $10^6$ /ml und Thrombozyten (P) 2 x $10^8$ /ml) wurden alleine oder in Kombination bei 37°C für 5 Min. mit Collagen (12 µg/ml) stimuliert und mit fluoreszierenden Antikörpern inkubiert.
Graue Säulen: Monozyten, n=8
Schwarze Säulen: Neutrophile Granulozyten, n=8
+P: unter Zusatz von Thrombozyten 2 x $10^8$ /ml, n=8
*$p<0,05$ gegenüber der Kontrolle (unstimuliert)

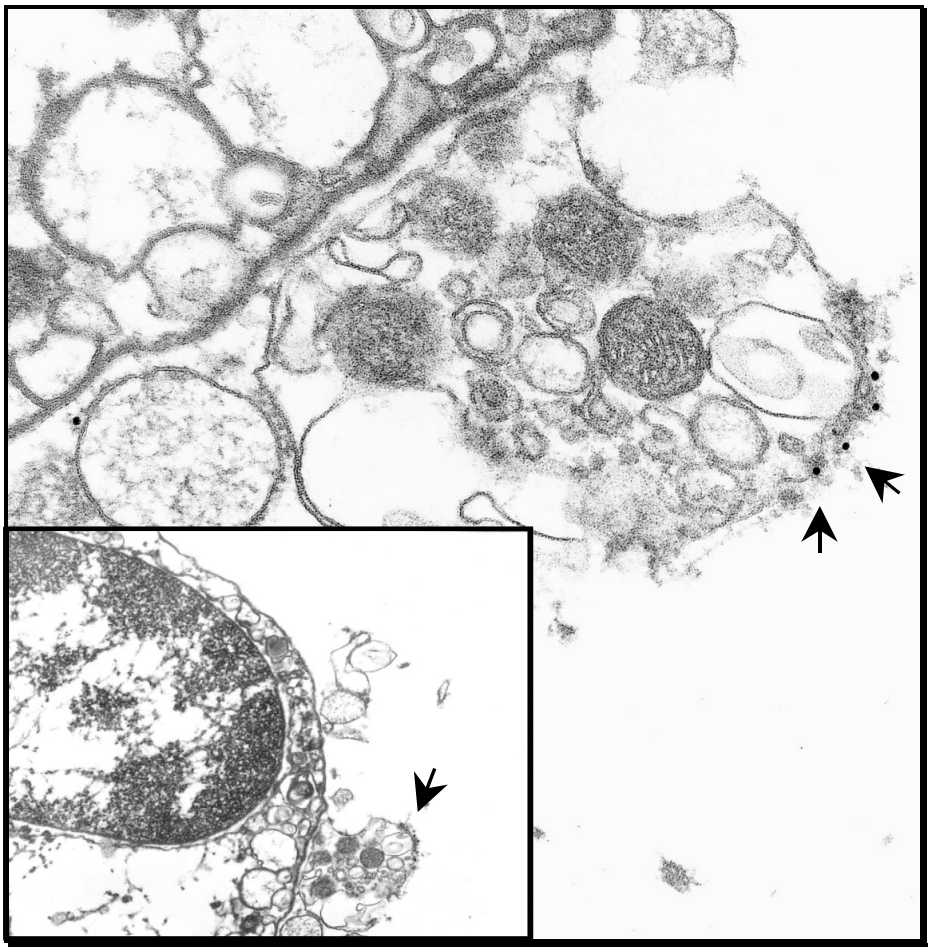



**[Abb. 15] TF-Präsentation auf Oberflächen isolierter Plättchen:**
In Resuspendierungspuffer gelöste, isolierte Plättchen (2 x $10^8$/ml) wurden bei 37°C für 5 Min. mit Collagen (12 µg/ml) stimuliert, in Cell fix fixiert und mit dem Anti-TF-Antikörper markiert. n=5; *$p<0,05$ gegenüber der Kontrolle

## VI. Lokalisierung des intravaskulären Tissue Factor

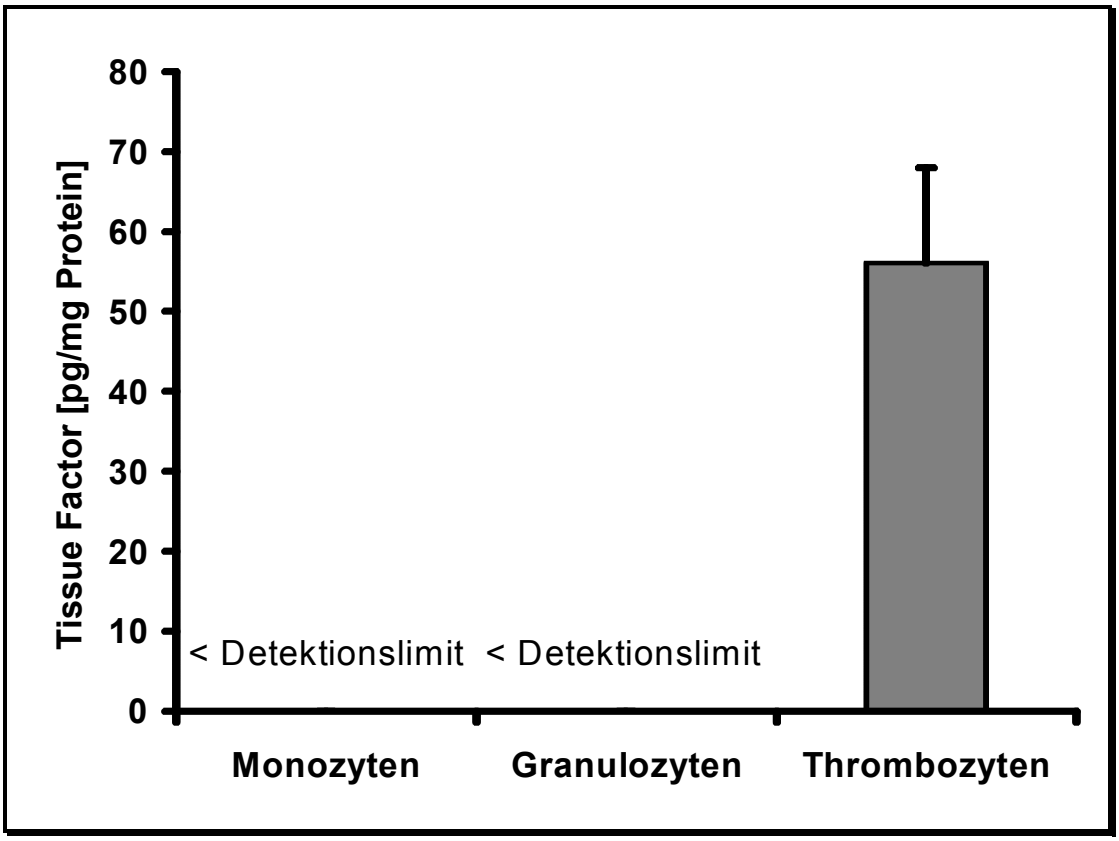
Sowohl im isolierten System als auch im Vollblut war die mit den Leukozyten assoziierte TF-Präsentation auf Leukozyten nach Collagenstimulation abhängig von der Anwesenheit der Thrombozyten. Weiterhin waren nur diejenigen Leukozyten TF positiv, die auch durch den Plättchenmarker P-Selektin angefärbt werden konnten. Wir untersuchten nun elektronenmikroskopisch, ob das TF Molekül in der Leukozytenmembran oder möglicherweise sogar auf den an die Leukozyten adhärenten Plättchen lokalisiert war. Collagen stimuliertes Vollblut wurde mit Anti-TF-Antikörper inkubiert und der primäre Antikörper wurde durch einen Sekundären Antikörper in der Elektronenmikroskopie dargestellt.

Dabei zeigte sich, dass das TF Antigen auf der Zellmembran von Blutkomponenten nachweisbar war, die an Leukozyten angelagert waren. Nach Zugabe eines Anti-P-Selektin-Antikörpers konnten diese Partikel nicht nachgewiesen werden. Auch die Morphologie der TF-präsentierenden Blutkomponenten deutete auf Thrombozyten hin. Demzufolge befand sich das TF Antigen auf Thrombozyten innerhalb von Plättchen-Leukozyten-Komplexen.



**[Abb. 16] TF auf der Oberfläche von adhärenten Plättchen:**
Elektronenmikroskopische Aufnahme mit 32.000-facher (bzw. 7.000-facher kleines Bild links) Vergrößerung. Vollblut wurde für 5 Min. mit 12 µg/ml Collagen stimuliert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und mit Anti-TF-Antikörpern (VIC7,VD8, je 10 µg/ml) für 30 Min. inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und mit einem goldmarkierten Anti-Mouse-IgG-Antikörper (10 nM) markiert. Die Markierung (Pfeile) zeigt das TF-Antigen auf Plättchen, die einem Monozyt angelagert sind. In der unstimulierten Kontrolle konnte kein TF Antigen nachgewiesen werden.

Da eine de novo Synthese von TF in den Zellen aufgrund der kurzen Stimulationszeit auszuschließen war, musste es sich bei dem präsentierten TF um präformierten TF handeln. Um den Ursprung dieses präformierten TF zu ermitteln, wurden Lysate aus Monozyten, Neutrophilen und Thrombozyten mit einem Double-Sandwich-ELISA auf ihren TF-Gehalt untersucht. Dabei konnte weder in den Monozyten, noch in den Neutrophilen TF nachgewiesen werden. Jedoch enthielten die Thrombozyten durchschnittlich 56 pg/mg Zellprotein (Abb. 17).




**[Abb. 17] TF Protein in isolierten Zellen:**
Isolierte Zellen (Monozyten, Neutrophile Granulozyten und Thrombozyten) wurden durch mehrere Gefrier- (-20°C) und Tauzyklen lysiert und das TF Protein durch eine Inkubation mit 60 µl 0,05 M Tris/HCl; 0,1 M NaCl; 0,1% Triton X-100; 5 mM EDTA bei pH 7,6 gelöst. Je 50 µl der Proben wurden in eine mit dem Anti-TF-Antikörper VIC12 beschichtete ELISA-Platte gegeben und dort für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte eine erneute Inkubation mit 50 µl eines peroxidasegekoppelten zweiten Anti-TF-Antikörpers (VIC7). Die Messung erfolgte mit dem Substrat OPD in einem ELISA-Reader. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer Standardkurve (rekombinanter TF) in pg/mg Zellprotein umgerechnet.

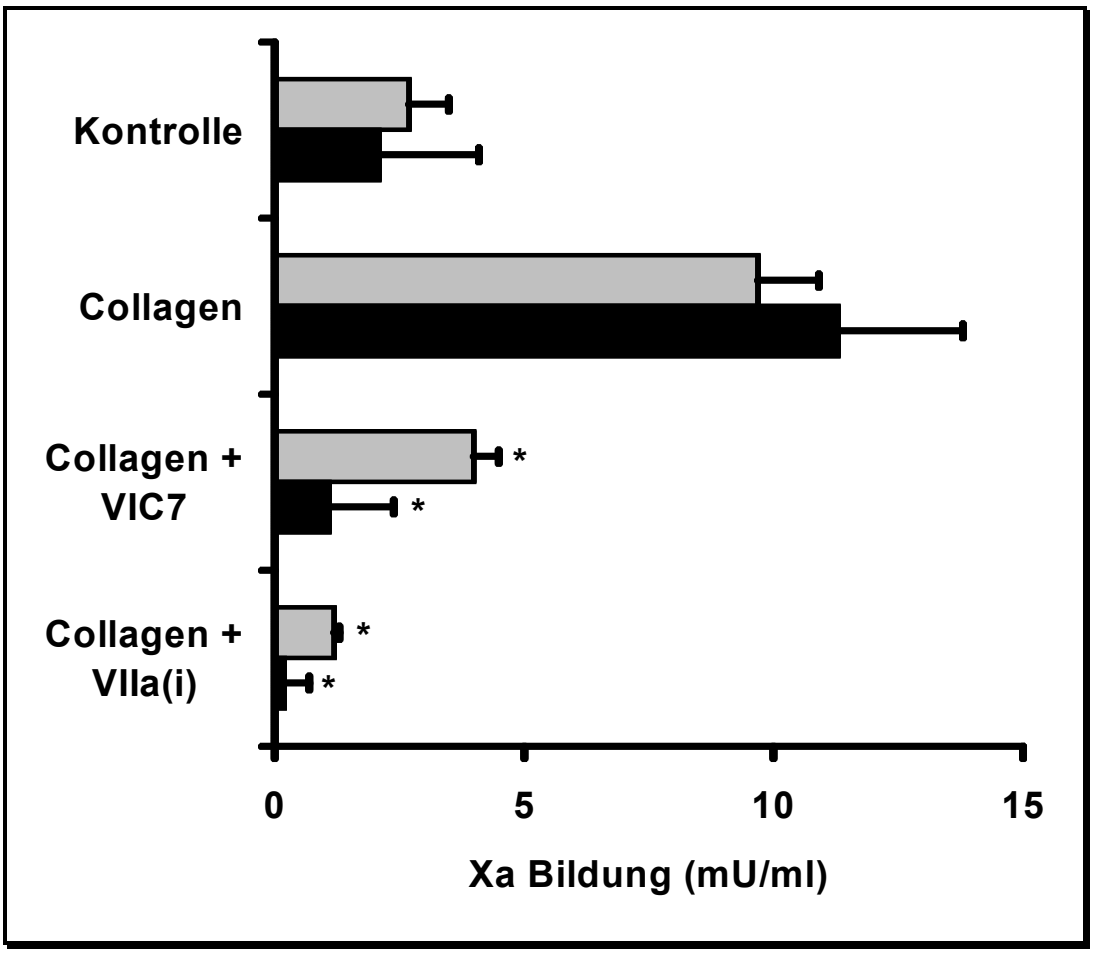
Zusammengenommen lassen diese Befunde vermuten, dass der in den Plättchen-Leukozyten-Komplexen lokalisierte TF aus den Thrombozyten stammte und die in der Durchflusszytometrie gemessene TF-Präsentation von den Plättchen ausging.

## VII. Tissue Factor aus Plättchen-Leukozyten-Komplexen ist funktionell aktiv

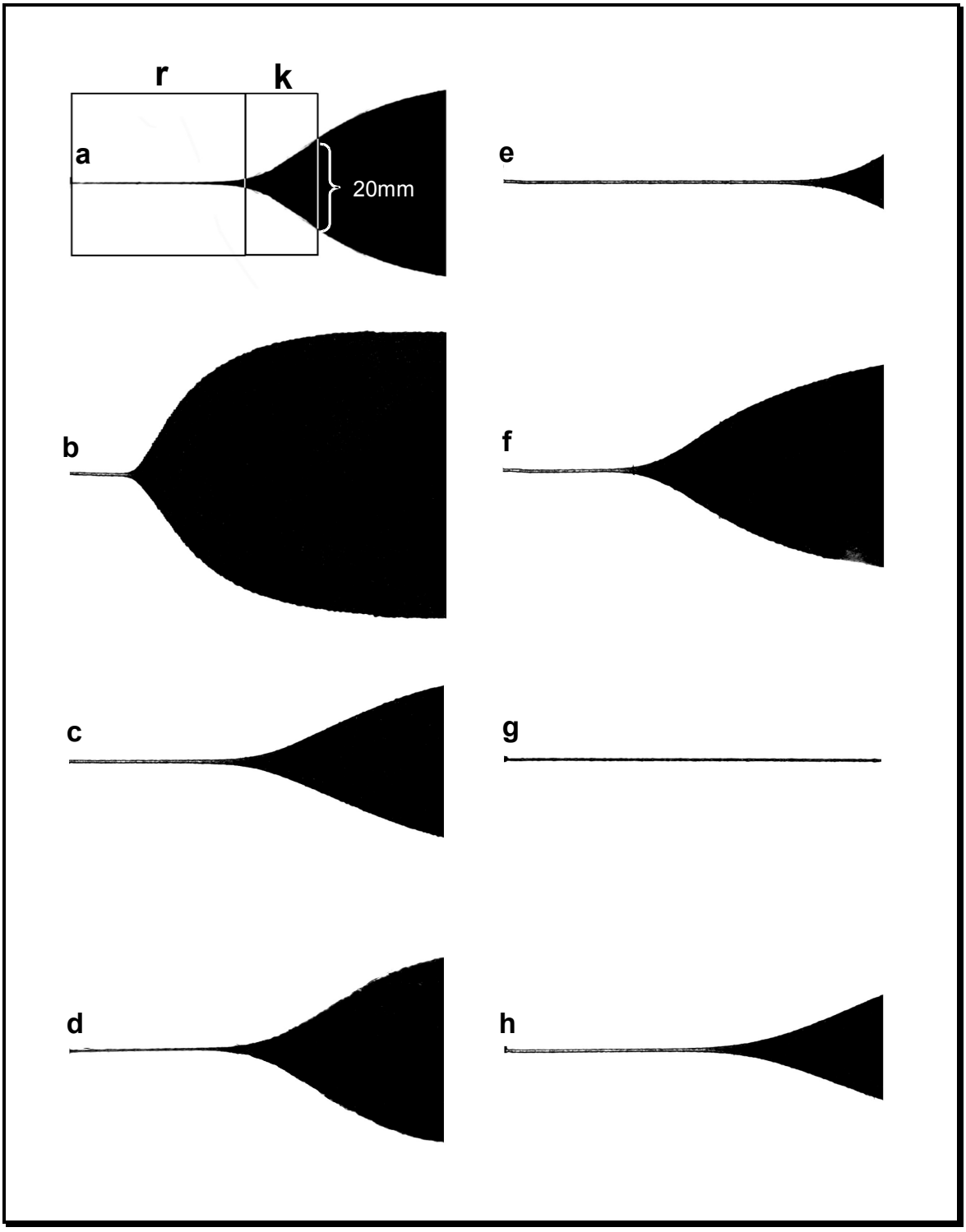
Aus den bisherigen Ergebnissen ging hervor, dass die 5 Min. Stimulation von Vollblut mit Collagen eine deutliche TF-Präsentation in Leukozyten-Plättchen-Komplexen auslöst. Der schnell präsentierte TF stammte daher vorwiegend aus den Thrombozyten. Es stellte sich nun die Frage, ob der intravaskuläre TF auch funktionell von Bedeutung war.

Zu diesem Zweck wurde die prokoagulatorische Aktivität von TF über den Nachweis der Aktivierung von Faktor X in Suspensionen aus isolierten Blutzellen analysiert. In Suspensionen aus isolierten Blutkomponenten alleine (Thrombozyten, Neutrophilen und Monozyten) konnte keine TF-Aktivität nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich sowohl für die Suspension aus Monozyten und Thrombozyten, als auch für die Neutrophilen-Thrombozytensuspensionen ein deutlicher Anstieg der Faktor Xa-Bildung (Abb. 18). Um nachzuweisen, dass TF für diesen Anstieg verantwortlich ist, wurden die Ansätze entweder mit dem Anti-TF-Antikörper VIC7 oder dem im aktiven Zentrum inhibierten Faktor VIIa ($VIIa_i$) (10 nM) inkubiert. Für beide Zellsuspensionen wurde dabei beobachtet, dass der Anti-TF-Antikörper und der Faktor $VIIa_i$ die Xa-Bildung nahezu maximal hemmten (Abb. 18). Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass für die funktionelle Aktivierung des blutassoziierten TF die Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten von besonderer Wichtigkeit ist. Danach analysierten wir, ob Collagen auch im Vollblut den Gerinnungsstart über den intravaskulären TF stimulieren würde. Die Fibrinbildung im Vollblut wurde mittels Vollblutkoagulometrie erfasst. Rekalzifiziertes Vollblut wurde mit Collagen stimuliert und die Messung sofort nach der Zugabe von Collagen und Rekalzifizierung gestartet. In den dargestellten Versuchsansätzen war das Vollblut Kunststoffoberflächen ausgesetzt. Um die dadurch ausgelöste Stimulierung des Kontaktaktivierungssystems zu hemmen, wurde eine zweite Versuchsreihe unter Vorinkubation mit Corntrypsininhibitor (CTI, 32 µg/ml) durchgeführt, einem spezifischen Inhibitor von Faktor XIIa. Nach Collagenstimulation (12 µg/ml) kam es zu einer deutlichen Verkürzung der Fibrinbildungsrate (r-Wert, Abb. 19+20). Gleichzeitig war auch die Rate des Thrombuswachstums beschleunigt (k-Wert). Durch den Zusatz des Anti-TF-Antikörpers VIC7 bzw. von Faktor $VIIa_i$ wurden die Veränderungen der Gerinnungsparameter wieder aufgehoben. Die Ergebnisse sind in Abb. 19+20

dargestellt. Auch nach Hemmung der Kontaktaktivierung zeigte sich durch Collagenstimulation eine deutlich schnellere Fibrinbildung und ein beschleunigtes Thrombuswachstum. Beide Gerinnungsparameter wurden durch den Anti-TF-Antikörper bzw. den Faktor $VIIa_i$ gehemmt. Hieraus ergab sich, dass Collagen tatsächlich direkt die Fibrinbildung fördert. Dieser Collageneffekt wird offensichtlich durch Aktivierung des blutassoziierten TF/VIIa-Komplexes vermittelt.

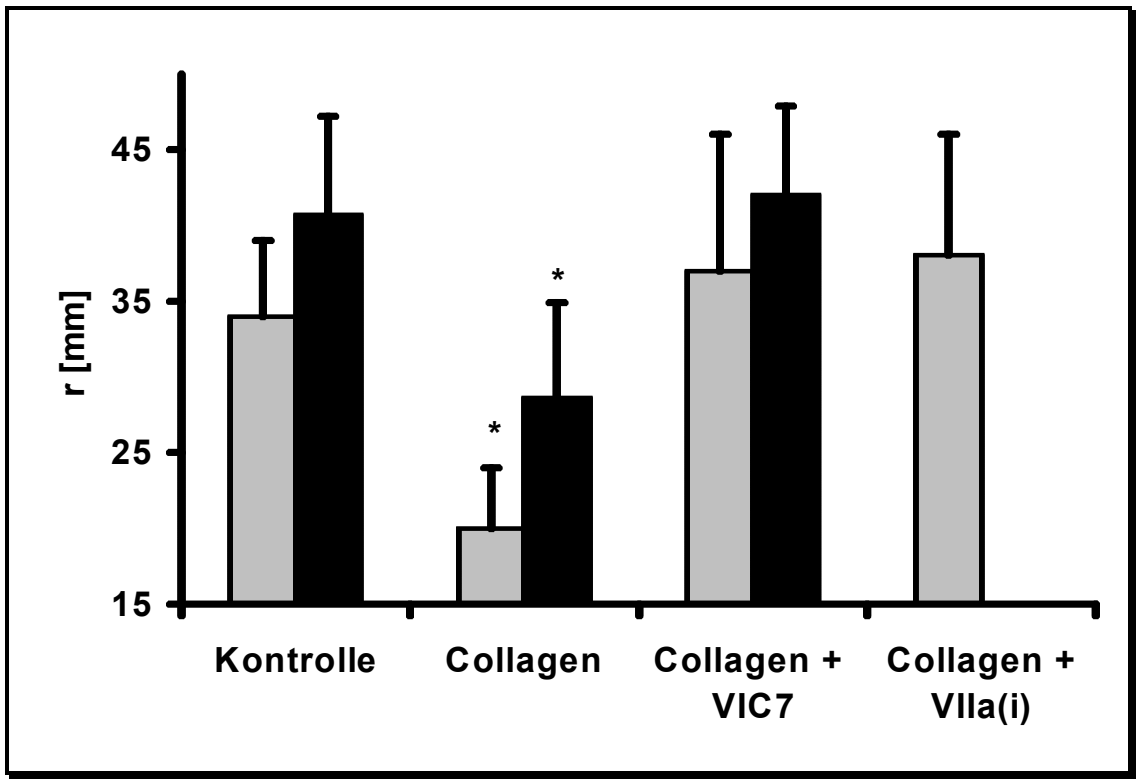


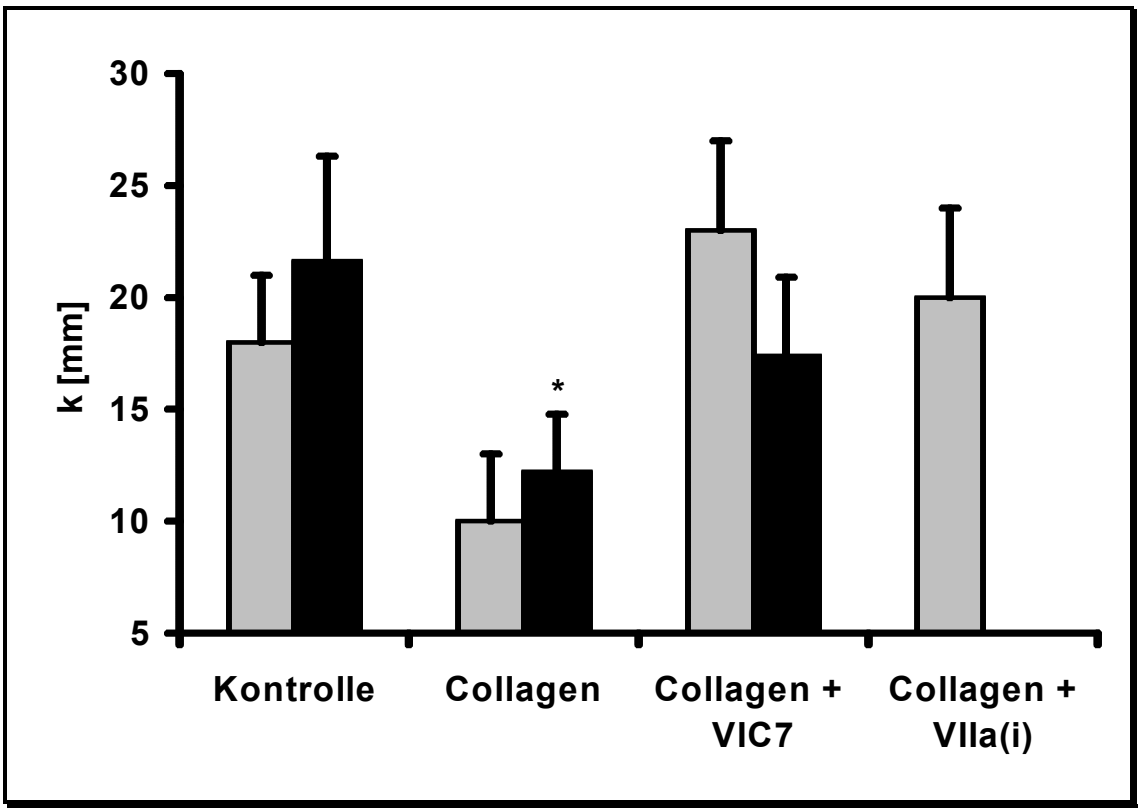

**[Abb. 18] TF Aktivität in Suspensionen aus isolierten Blutkomponenten:**
Isolierte Blutzellen (Monozyten (2 x $10^3$/µl), Neutrophile Granulozyten (2 x $10^4$/µl) und Thrombozyten (3 x $10^5$/µl)) wurden mit Collagen inkubiert und die Faktor Xa-Bildung [mU/ml] bestimmt. Anti-TF-Antikörper VIC7 (20 µg/ml) oder der Faktor $VIIa_i$ (10 nM) wurden zu den angegebenen Proben hinzugefügt.
Graue Säulen: Monozyten+Thrombozyten; n=6
Schwarze Säulen: Neutrophile Granulozyten+Thrombozyten; n=7
*$p<0,05$ gegenüber Collagenstimulation alleine




**[Abb. 19]**
**TF abhängige Fibrinbildung nach Collagenstimulation von Vollblut:**
Citriertes Vollblut wurde mit Collagen stimuliert und rekalzifiziert. r = Rate der Fibrinbildung; k = Rate des Thrombuswachstums

| | | | |
|---|---|---|---|
| **a-d:** | ohne Korntrypsininhibitor (CTI) | **b/f:** | Collagen (12 µg/ml) |
| **e-h:** | mit CTI (32 µg/ml) | **c/g:** | Collagen + $VIIa_i$ (500 nM) |
| **a/e:** | unstimulierte Kontrolle | **d/h:** | Collagen + VIC7 (20 µg/ml) |



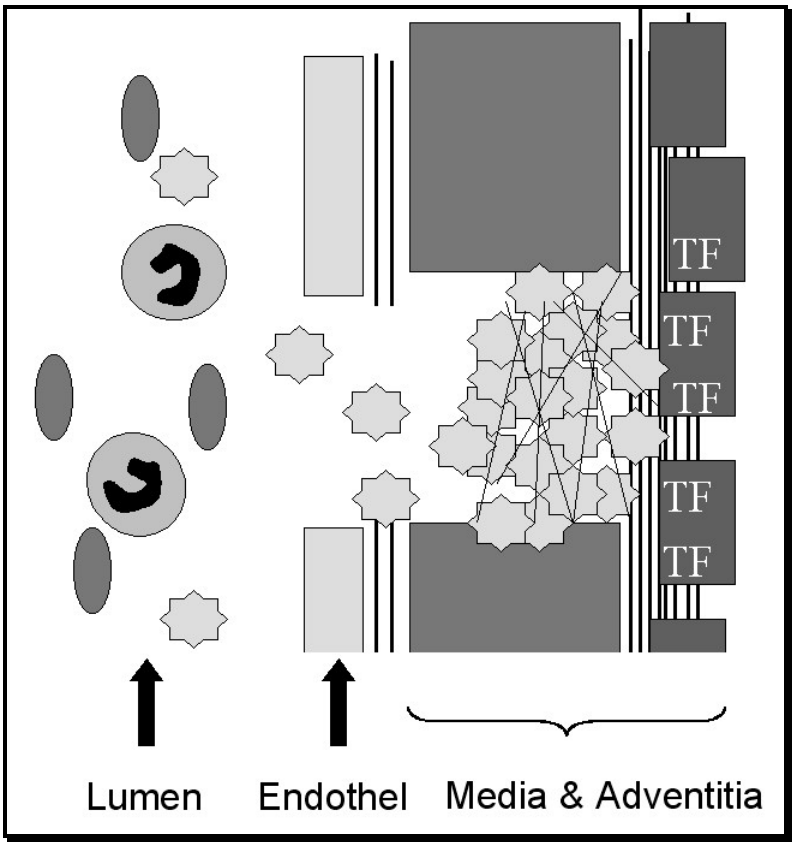

**[Abb. 20] Quantitative Auswertung der TF abhängigen Fibrinbildung nach Collagenstimulation von Vollblut:**
Citriertes Vollblut wurde mit Collagen stimuliert und rekalzifiziert. r = Rate der Fibrinbildung; k = Rate des Thrombuswachstums
Graue Säulen: ohne Korntrypsininhibitor (CTI), n=10
Schwarze Säulen: mit CTI (32 µg/ml), n=5
*$p<0,05$ gegenüber der Kontrolle

# D. Diskussion

## I. Tissue Factor der Gefäßwand

TF gilt mittlerweile als das zentrale Starterprotein der Blutgerinnung. Nach Verletzung der Gefäßwand und Zerstörung der Endothelbarriere tritt Blut in Kontakt mit tieferen Gefäßwandstrukturen, in denen zellulär gebundener TF exprimiert wird. Gleichzeitig adhärieren Thrombozyten an das subendotheliale Collagen und bilden einen ersten, noch instabilen Verschluß des verletzten Gefäßes. Die Gerinnungskomponenten des Blutes haben durch den Defekt zunächst freien Zugang zu dem in der Gefäßwand exprimierten TF, so dass die Komplexbildung von TF mit Faktor VII/VIIa und Faktor Xa erfolgen kann, welches wiederum die proteolytische Spaltung von Prothrombin zu Thrombin vermittelt. Die proteolytische Aktivität des Faktor VIIa wird dabei durch die Komplexbildung mit TF und unter Anwesenheit von $Ca^{2+}$ und Phospholipiden um das $2*10^7$-fache gesteigert (Butenas und Mann, 2002). Der durch die Thrombozyten primär verschlossene Defekt ist aber noch instabil und kann nur durch die Bildung von Fibrin stabilisiert und verfestigt werden (Abb. 21). Dabei wird der Defekt durch einen lumenwärts wachsenden Thrombus gedeckt.

Um den einmal initiierten Gerinnungsablauf räumlich und zeitlich einzugrenzen, existiert eine ganze Reihe von spezifischen Antagonisten der Blutgerinnung. Für die TF-abhängige Startphase ist dabei vor allem der sog. Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) von Bedeutung. TFPI bindet an den Komplex aus TF/VIIa/Xa aber auch an Faktor Xa alleine. Ausserdem tragen Protein S, Protein C, Antithrombin III und andere Komponenten wesentlich zur Eindämmung der Gerinnung bei (Butenas und Mann, 2002). Es wird vermutet, dass durch die strikte räumliche Trennung des Gefäßwand TF von den plasmatischen Gerinnungsfaktoren, speziell dem Faktor VII, sichergestellt wird, dass bei intaktem Endothel die Blutgerinnung nicht gestartet werden kann. Dies steht auch in Übereinstimmung mit der eingangs erwähnten „Envelope“-Hypothese, bei der Gefäße und Organe durch einen „Umschlag“ aus TF vor Blutverlusten bei Verletzung geschützt werden sollen.




**[Abb. 21] TF der Gefäßwand:**
Der in der Media und Adventitia der Gefäßwand konstitutiv exprimierte TF tritt nach Endothelverletzung in Kontakt mit plasmatischen Gerinnungskomponenten. Thrombozyten bilden zuerst einen lockeren Gefäßverschluß, welcher durch die von TF initiierte Fibrinbildung verfestigt wird.

## II. Intravaskulärer Tissue Factor

Monozyten stellen die einzigen bekannten Blutzellen dar, die nach Langzeitstimulation mit Entzündungsmediatoren, wie z.B. LPS zur Exprimierung von funktionellem TF fähig sind (Osterud, 1998). Dies ist besonders in Hinblick auf akute und chronische Entzündungsprozesse von Bedeutung. So spielt monozytärer TF nachgewiesenerweise eine entscheidende Rolle beim Start der Gerinnung im Rahmen der Disseminierten Intravasalen Gerinnung (DIC) und bei einer Reihe pathologischer Prozesse (Osterud, 1998). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Funktion des monozytären TF unter Langzeitstimulation, wie bereits erwähnt, eher im pathologischen als im physiologischen Rahmen eine Rolle spielt. Für die physiologische Gerinnung sind offensichtlich kürzere Stimulationszeiten und andere Stimulatoren erforderlich. Um dieser Frage nachzugehen, testeten wir in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Collagen, des für die Startphase der gesamten

Hämostase entscheidenden Matrixproteins. Unerwarteterweise wurde nach Collagenstimulation (TypI) bereits innerhalb der ersten fünf Min. im Vollblut ein Anstieg von TF in Assoziation mit Monozyten und Neutrophilen Granulozyten beobachtet. Aufgrund dieses eher kurzen Zeitraums schien eine de novo Synthese von TF unwahrscheinlich. Die Aktivität des Leukozyten-assoziierten, intravaskulären TF war sowohl im Xa-Bildungstest, als auch in Vollblutgerinnungstests nachweisbar. Die in der Vollblutkoagulometrie ermittelte Fibrinbildung war auch nach Blockierung des Kontaktaktivierungssystems durch CTI (Hemmung des Faktor XIIa) vorhanden. Unsere Beobachtung wurde durch eine Publikation von Giesen et al. prinzipiell bestätigt. Die Autoren fanden, dass Blut, welches über collagenbeschichtetes Glas perfundiert worden war, innerhalb von Minuten in der Lage war, TF enthaltende Thromben zu bilden. Da in diesem Modell das Vorhandensein von TF in dem collagenbeschichteten Glas ausgeschlossen war, musste der entstandene TF aus dem Blut und seinen Bestandteilen stammen und somit *blood borne* sein (Giesen et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse konnten auch in anderen Modellen erreicht werden. Desweiteren zeigen Ergebnisse der selben Arbeitsgruppe die Möglichkeit, dass TF mittels alternativen Splicings gelöst im zirkulierenden Blut existieren kann. Auch dieser gelöste TF besitzt in Anwesenheit von Phospholipiden die Fähigkeit zu prokoagulatorischer Aktivität (Bogdanov et al., 2003). Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass schnell aktivierbarer TF auch intravaskulär vorhanden ist und bei Bedarf eine ausreichende Fibrinbildung auslösen kann.

## III. Plättchen-Leukozyten-Komplexe

Die TF Präsentation nach fünf minütiger Collagen Stimulation in Assoziation mit Monozyten und Neutrophilen Granulozyten war streng abhängig von der Anwesenheit der Thrombozyten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen ergaben, dass nur Konjugate von Plättchen bzw. von Mikropartikeln mit Leukozyten Träger des TF-Antigens waren. Der intravaskuläre TF der Plättchen-Leukozyten-Komplexe war sowohl im Vollblut als auch im isolierten System nachweisbar. Isolierte Monozyten und Neutrophile Granulozyten alleine zeigten nach Collagen Stimulation keine TF Präsentation. Bei isolierten Plättchen dagegen war eine deutliche TF Präsentation

unter Stimulationsbedingungen zu beobachten. Jedoch war der von den Plättchen präsentierte TF nicht funktionell aktiv. Ein derartiger inaktiver TF wird auch als „encrypted“ TF bezeichnet. Osterud zeigte 2001, dass, allerdings nach LPS-Stimulation, nur ca. 10-20% der aufgrund der TF Expression zu erwartenden monozytären TF-Aktivität tatsächlich messbar war (Osterud, 2001). Durch Koinkubation mit Plättchen konnte diese Aktivität gesteigert werden. Dabei zeigte sich, dass vermutlich sowohl die Adhäsionsproteine CD15 und P-Selektin als auch leukozytäre bzw. thrombozytäre Mikropartikel an der Entschlüsselung des „encrypted“ TF beteiligt waren. In Zusammenhang mit unseren Ergebnissen legte dies den Verdacht nahe, dass für die Aktivität von TF der Kontakt zwischen Leukozyten und Plättchen wichtig war. Leukozyten und Plättchen können nach Stimulierung auf verschiedene Weise vor allem durch die Vermittlung von Adhäsionsmolekülen miteinander interagieren. Durch die Adhäsion können sich die beiden zellulären Partner unter anderem auch gegenseitig aktivieren. So können zum Beispiel Plättchen die Freisetzung von Proteasen oder Chemokinen in den Neutrophilen auslösen.

Für den adhäsiven Kontakt zwischen Leukozyten und Plättchen sind diverse Adhäsionsproteine notwendig. Nach Stimulation der Plättchen mit Collagen, Thrombin oder anderen Aktivatoren wird die P-Selektin Präsentation auf deren Oberfläche ausgelöst. Konstitutiv exprimiertes PSGL-1 und CD15 bilden den leukozytären Gegenpart zu P-Selektin (CD62P). Diese Verbindung über P-Selektin stellt dabei den ersten Schritt der Plättchen-Leukozyten Verbindung dar (Furie, 1995). Weitere Verbindungen zwischen Leukozyten und Plättchen können über CD40 – CD40L (CD154) und durch Fibrinogenbrücken zwischen GPIIb/IIIa und CD11b/CD18 hergestellt werden (Weber et al., 1997). In dieser Arbeit beobachteten wir, dass ein Anti-P-Selektin-Antikörper, bzw ein Anti-CD40L-Antikörper die TF Assoziation mit Monozyten zu hemmen vermochte. Für die TF Präsentation in Assoziation mit den Neutrophilen Granulozyten war der Anti-P-Selektin-Antikörper im Gegensatz zu dem Anti-CD40L-Antikörper jedoch erheblich wirkungsvoller. Außerdem waren nur diejenigen Leukozyten am stärksten positiv für TF, die auch gleichzeitig das stärkste Signal für P-Selektin aufwiesen, also mit Plättchen komplexiert waren. Auch in der Vollblutkoagulometrie konnte der hemmende Effekt einer Zugabe von Anti-P-Selektin-Antikörper nachgewiesen werden. Zusammen ergaben diese Ergebnisse einen deutlichen Hinweis auf die Bedeutung der

Plättchen-Leukozyten Interaktion und Komplexbildung für die Collagen-stimulierte, intravaskuläre TF Präsentation. Die so gewonnenen Erkenntnisse warfen eine Reihe weiterer Fragen auf. Primär zu klären war dabei die Herkunft des mit den Plättchen-Leukozyten-Konjugaten assoziierten TF. Ausserdem war es notwendig, mehr über dessen Aktivierung zu erfahren. Letztlich war noch die Rolle des intravaskulären TF sowohl in der physiologischen als auch in der pathologischen Blutgerinnung zu erörtern. In den folgenden Abschnitten wird darauf genauer eingegangen.

## IV. Ursprung des intravaskulären Tissue Factor

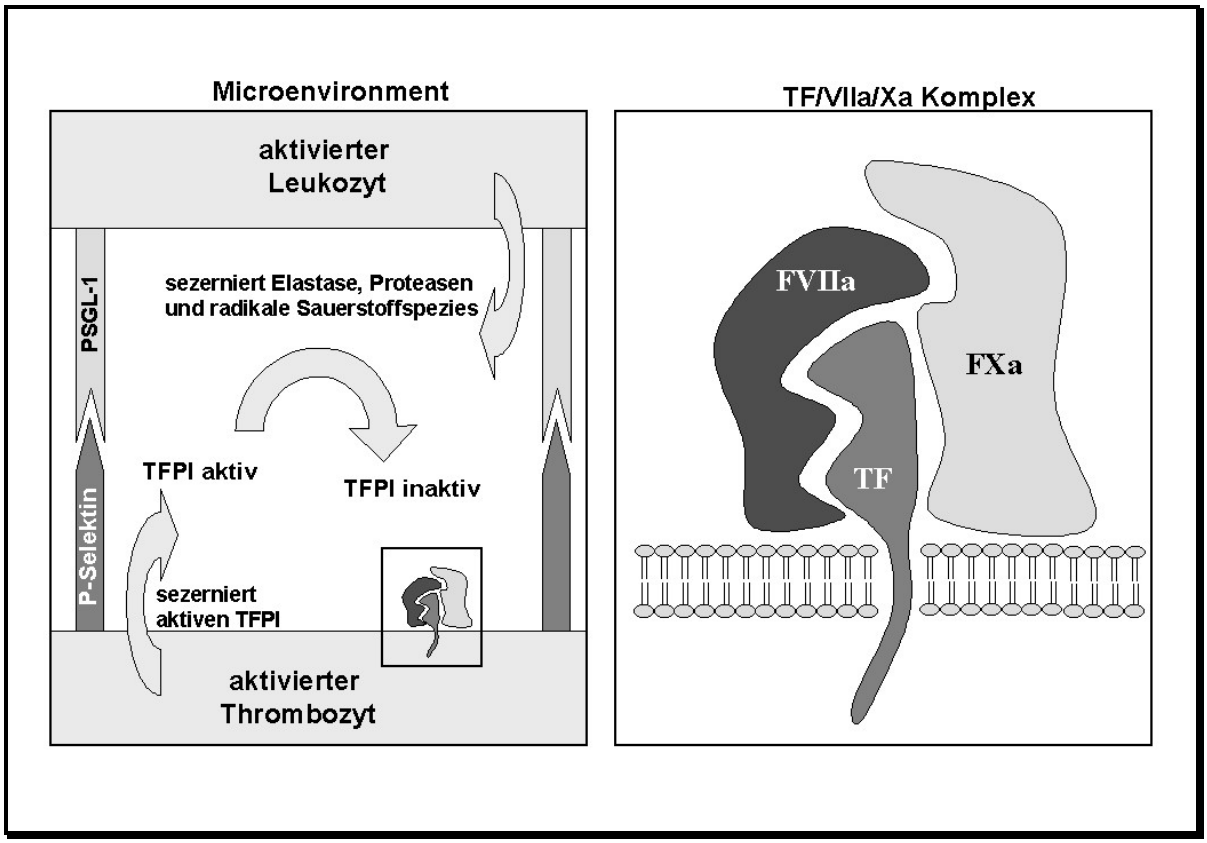
Monozyten sind unter Langzeitstimulation in der Lage TF zu synthetisieren und zu exprimieren. Doch aufgrund der kurzen Stimulationszeit erschien eine de novo Synthese von TF, die für die Collagen induzierte TF Präsentation benötigt wurde, eher unwahrscheinlich. Folglich musste in den Plättchen-Leukozyten Komplexen ein präformierter TF vorhanden sein, der nach Stimulation auf der Zelloberfläche präsentiert wurde. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten das TF-Antigen auf der Zelloberfläche von Plättchen, die an Monozyten und Neutrophilen adhärierten. In der Double-Sandwich-ELISA Bestimmung fand sich kein TF-Protein in frisch isolierten Neutrophilen Granulozyten und auch nicht in Monozyten. Hingegen war in den Thrombozyten erstaunlicherweise TF-Antigen nachweisbar. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen fanden Müller et al. in immunogold-gefärbten Präparaten gefriergetrockneter Plättchen TF in den $\alpha$-Granula und dem „open cannalicular system“ (Müller et al., 2003). Thrombozyten besitzen aber offensichtlich nicht die Möglichkeit, TF zu synthetisieren, da für TF in den Plättchen und ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, keine mRNA aufgefunden wurde. Bereits seit einigen Jahren ist bekannt, dass der Plasmaanteil des Blutes unter physiologischen Bedingungen TF enthält (Albrecht et al., 1996, Misumi et al., 1998). Erhöhte TF Gehalte im Plasma wurden unter anderem bei Patienten mit Herzinfarkt und instabiler Angina Pektoris gefunden, was auf die hämostatische Bedeutung des Plasma TF hinweisen könnte (Suefuji et al., 1997, Misumi et al., 1998). Dieser Plasma TF könnte eine potenzielle Quelle für den plättchenassoziierten TF bilden. Ferner zeigten Rauch et al., dass TF prinzipiell über Mikrovesikel von Leukozyten auf

Plättchen transferiert werden können (Rauch et al., 2000); allerdings unter Langzeitstimulation von Monozyten mit LPS, was die physiologische Relevanz dieser Befunde als fraglich erscheinen lässt. Andererseits wurde gezeigt, dass von aktivierten Plättchen abgeschnürte Mikrovesikel TF auf Monozyten übertragen werden können (Scholz, 2002). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Mikrovesikel und Thrombozyten die Hauptlokalisation von präformiertem, intravaskulärem TF sind (Müller et al., 2003). Dies weist darauf hin, dass Plättchen einen Speicher für intravaskulären TF darstellen. Da Thrombozyten TF nicht synthetisieren können und keine TF mRNA gefunden wurde, bleibt der eigentliche Ursprung des intravaskulären TF ungeklärt und ist Gegenstand weiterer Forschung.

## V. Tissue Factor Aktivierung

Für die Aktivierung von inaktivem, sog. „encrypted“ TF existieren verschiedene Modelle: Nach Bach erhöht sich die prokoagulatorische Aktivität von TF exprimierenden Zellen, wenn diese $Ca^{2+}$ Ionophoren ausgesetzt sind (Bach, 1998). In diesem Modell liegt TF auf intakten Zellen als Dimer vor. Es wird vermutet, dass durch $Ca^{2+}$ Einstrom in das Cytoplasma ein Calmodulin abhängiger Mechanismus aktiviert wird, der zur Änderung der quaternären Struktur von TF führt. Dabei werden aus einem TF Dimer zwei TF Monomere gebildet und das prokoagulatorisch aktive Zentrum freigelegt. Sowohl Dimer als auch Monomer binden an Faktor VII, jedoch kann nur in der monomeren Form ein aktiver TF-VIIa-Komplex gebildet werden. Von Carson et al. wurde in diesem Zusammenhang weiterhin vermutet, dass der cytoplasmatische TF Anteil keinen Einfluss auf diese Ver- bzw. Entschlüsselung der prokoagulatorischen Aktivität von TF hat (Carson et al., 2000).
Ausserdem besteht die Möglichkeit, dass TF reiche, monozytäre Partikel über CD15 und P-Selektin mit thrombozytären Mikropartikeln interagieren und so unter anderem Partikel mit entschlüsselter TF Aktivität entstehen (Osterud, 2001, 2003).
Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen aber einen diametral anderen Aktivierungsmechanismus für den schnell aktivierbaren intravaskulären TF vermuten. Aktives TF Antigen war nur in stimulierten Zell-Komplexen zu finden, in isolierten Leukozyten dagegen nicht. Thrombozyten präsentierten zwar TF nach

Stimulation, dieser erwies sich aber als koagulatorisch inaktiv. Zwischen den über Adhäsionsproteine (z.B. PSGL-1, P-Selektin) aneinander gebundenen Plättchen und Leukozyten entsteht ein sogenanntes Microenvironment – ein Raum, der gegen seine Umgebung abgeschottet ist (Evangelista et al., 1991). Der plasmatische Einfluß z.B durch Antiproteasen, ist dadurch minimiert. Wenn nun Thrombozyten aufgrund z.B. einer Gefäßverletzung durch freiliegendes Collagen aktiviert werden, können sie über Adhäsionsproteine mit Neutrophilen interagieren und dadurch ein derartiges Microenvironment bilden. Gleichzeitig wird offensichtlich TF aus den alpha-Granula an die Zelloberfläche transloziert und präsentiert. Plättchen sezernieren bekannterweise nach Aktivierung beträchtliche Mengen an TFPI (Novotny et al., 1988). TFPI bindet mittels zweier Domänen (Kunitz 1 und 2) an Faktor VIIa und Faktor X und blockiert damit den ternären Komplex aus TF/FVIIa/FXa (Camerer et al., 1996). Von Neutrophilen Granulozyten sezernierte Elastase ist in der Lage TFPI zu spalten und damit dessen Funktion zu inaktivieren (Petersen et al., 1992, Higuchi et al., 1992). Von Neutrophilen Granulozyten sezernierte Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies stehen vermutlich ebenfalls in Zusammenhang mit der Inhibierung von TFPI (Engelmann et al., 2003, Müller et al., 2003). Durch diese im Microenvironment gezielt gehemmte Wirkung von TFPI könnte TF seine prokoagulatorische Wirkung entfalten und zur Initiierung der Fibrinbildung führen (Abb. 22). Nach dieser Hypothese wird von einer gleichzeitig zur TF Präsentation stattfindenden gezielten Inaktivierung von TF Inhibitoren, allen voran TFPI, ausgegangen. Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse könnte dieses Aktivierungsmodell sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen eine mögliche Antwort auf die Frage der schnellen TF Aktivierung liefern. In Übereinstimmung mit diesem Modell stehen jüngste Resultate von Falati et al. . Diese Autoren zeigten am Tiermodell, dass arterielle Thromben bei Mäusen mit fehlender PSGL-1 bzw. P-Selektin Expression im Gegensatz zum Wildtyp nur geringe Mengen an TF und Fibrin aufwiesen (Falati et al., 2003).




**[Abb. 22] Modell für die Aktivierung von intravaskulärem TF:**
Aktivierte Thrombozyten (Plättchen) sind via Adhäsionsproteine mit Leukozyten komplexiert. Im Zell-Zell-Zwischenraum wird ein vor äußeren Bedingungen weitgehend geschütztes Microenvironment gebildet. Durch die von den Leukozyten sezernierte Elastase und weitere Proteasen wird TFPI inaktiviert wodurch die TF-Aktivität freigelegt werden könnte. Rechts: Inset der linken Abb. (nach Engelmann et al., 2003)

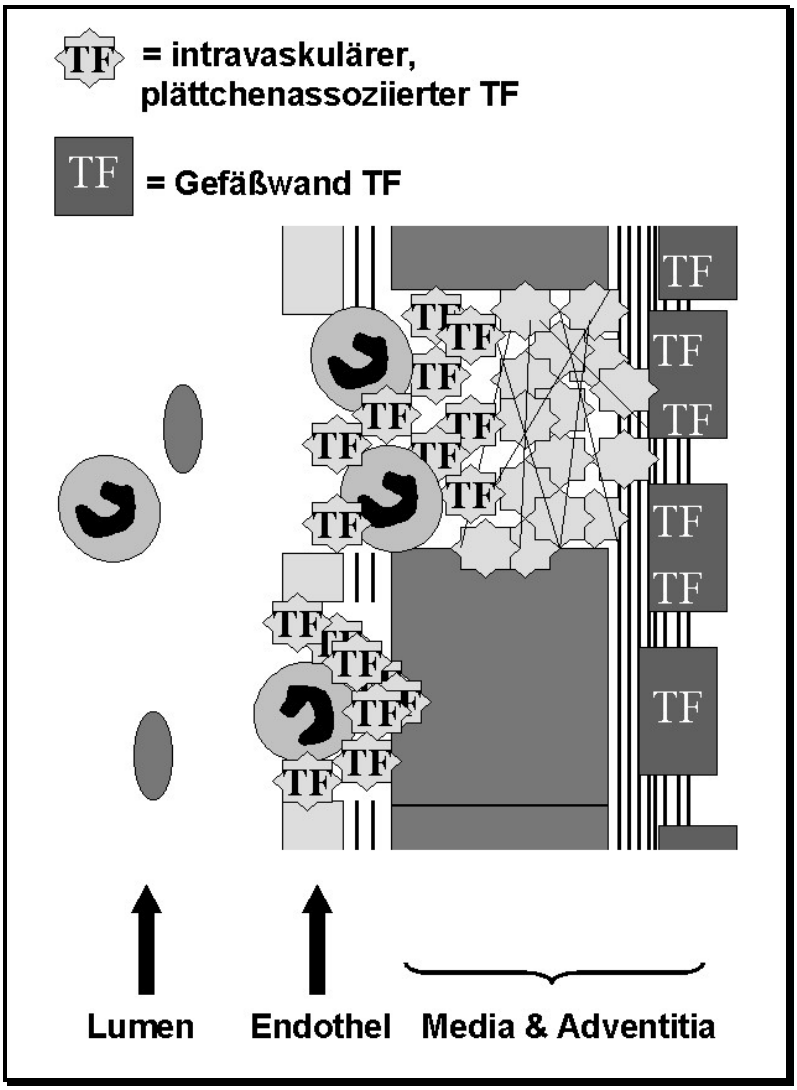
## VI. Physiologische Bedeutung von intravaskulärem Tissue Factor

Wie bereits erwähnt, gilt der TF der Gefäßwand als initialer Starter der Gerinnung von physiologischen, aber auch von pathologischen Prozessen. Plättchen, die mit subendothelialen Strukturen in Kontakt kommen, werden durch das Matrixprotein Collagen aktiviert. Dadurch wird ein erster noch instabiler Thrombus gebildet. Durch die Gefäßverletzung in der Media und Adventitia der Gefäßwand konstitutiv exprimierter TF führt zur ternären Komplexbildung von TF/FVIIa/FXa. Der dabei gebildete Faktor Xa muß nun durch Diffusion in den Prothrombinasekomplex eingeschleust werden, der üblicherweise auf der Oberfläche von Thrombozyten abläuft. Die für den Faktor Xa dabei notwendige Diffusionsstrecke zu dem lumenwärts wachsenden Thrombus ist beträchtlich. So zeigte Nemerson et al., dass

ein Protein in der Größenordnung von TF für eine Diffusionsstrecke von 1mm ca. 3h benötigt (Nemerson et al., 2002). Dies lässt vermuten, dass neben dem eigentlichen Gerinnungsstart durch TF in der Gefäßwand weitere Startprozesse im wachsenden Thrombus notwendig sind, um zu einer ausreichenden Fibrinbildung zu führen. Der von uns erstmals beschriebene, in Thrombozyten-Leukozyten-Komplexen präsentierte, intravaskuläre TF könnte diese Anforderung erfüllen.

Dass Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen im Rahmen der Thrombose prinzipiell eine Rolle spielen können, wurde bereits im Tiermodell gezeigt (Sakariassen et al., 1990, Kirchhofer et al., 1997). Des Weiteren zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass durch das Vorhandensein von TF an der Oberfläche von aktivierten Plättchen die gesamte Gerinnungskaskade auf der Zellmembran der Thrombozyten ablaufen kann.

Insgesamt gesehen läge damit die physiologische Bedeutung des intravaskuläre TF in diesem Modell bei dem Erhalt der Fibrinbildung im wachsenden Thrombus (Abb. 23). Damit besteht keine Notwendigkeit mehr, Diffusionsprozesse für FXa zu postulieren. Weiterhin könnte das Modell des intravaskulären TF die Thrombusbildung ohne Beteiligung tieferer Strukturen der Gefäßwand bei nur kleinen und nicht vollständigen Endotheldefekten erklären. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Collageninjektion in die Blutbahn zu einer schellen fibringestützten Thrombusbildung ohne Endothelverletzung führte (Di Minno et al., 1983). Neuere Erkenntnisse zeigen darüber hinaus, dass neben Anteilen der Gefäßwand vor allem Blutkomponenten zu dem Wachstum des gebildeten Thrombus beitragen (Karnicki et al., 2002).




**[Abb. 23] Mögliche Funktion des intravaskulären, plättchenassoziierten TF:**
Nach Gefäßverletzung adhärieren Thrombozyten an die freiliegenden Strukturen der Gefäßwand und werden durch Collagenkontakt aktiviert. Anschließend wird die Fibrinbildung zur Stabilisierung des Thrombus durch den TF der Gefäßwand gestartet (weiß markierter TF). Für die Stabilisierung des lumenwärts wachsenden Thrombus wird die Fibrinbildung durch TF intravaskulären Ursprungs (schwarz markierter TF) in Plättchen-Leukozyten-Komplexen aufrecht erhalten. Damit könnte durch den intravaskulären TF unter u.a. auch die Fibrinbildung bei oberflächlichen Defekten gewährleistet sein.

## VII. Tissue Factor und Atherosklerose

Herz-Kreislauferkrankungen bilden in den Industrienationen die häufigste Todesursache im Erwachsenenalter. Im Vordergrund steht dabei vor allem die Atherosklerose mit ihren Folgeerkankungen, wie zum Beispiel Angina Pectoris, Myokard- und Hirninfarkt. Den auslösenden Faktor für einen akuten Herzinfarkt stellt dabei vor allem die Ruptur eines atherosklerotischen Plaque mit nachfolgender Thrombose dar (Fuster V. et al. (1+2), 1992). Atherosklerotische Plaques bestehen

unter anderem aus cholesterinbeladenen Makrophagen (Schaumzellen) und glatten Muskelzellen, ausserdem sind sie reich an extrazellulären Lipiden, Cholesterin und Collagen (I und III). Gerade im Zusammenhang mit Plaquerupturen spielt TF in verschiedener Weise eine bedeutende Rolle (Moons et al., 2002). Vor allem Makrophagen und glatte Muskelzellen exprimieren innerhalb des Plaques teilweise beträchtliche Mengen an TF (Thiruvikraman et al., 1996). Interessanterweise scheint die TF Aktivität durch die gleichzeitige Anwesenheit von TFPI stark vermindert zu sein (Caplice et al., 1998). Zusätzlich findet sich bei Patienten mit instabiler Angina Pektoris, akutem Herzinfarkt oder akutem Schlaganfall ein erhöhter Plasmaspiegel an TF (Misumi et al., 1998; Suefuji et al., 1997, He et al., 2002). Gleichzeitig kann aber bei instabiler Angina und Myokardinfarkt auch ein erhöhter Plasmaspiegel für TFPI gemessen werden. Dagegen scheint bei cerebralen Insulten die TFPI Konzentration im Plasma eher erniedrigt zu sein. Sambola et al. konnte ausserdem eine direkte Korrelation zwischen hohen Werten an Plasma TF und kardiovaskulären Risikofaktoren, wie z.B. Diabetes mellitus Typ2, Hyperlipidämie und Rauchen feststellen (Sambola et al., 2003).

Dabei besteht die Hauptgefahr in der plötzlichen Ruptur eines instabilen Plaque mit Freisetzung von TF und Collagen. Da es sich hier ebenfalls um ein Akutereignis handelt, könnte neben dem aus dem Plaque stammenden TF auch der in dieser Arbeit vorgestellte schnell aktivierbare, intravaskuläre TF besonders in Hinblick auf die Fibrinbildung im wachsenden Thrombus eine bedeutende Rolle spielen. Freigelegtes Collagen könnte Plättchen aktivieren, die mit Hilfe von Adhäsionsproteinen Komplexe mit Neutrophilen Granulozyten bilden. Im Microenvironment entstünde ein aktiver TF, der zur Fibrinbildung im wachsenden Thrombus beiträgt. Schlußfolgernd könnte schnell aktivierbarer TF nicht nur bei der Thrombusbildung während eines Herzinfarkts sondern auch bei cerebralen Insulten und anderen pathologischen Gerinnungsvorgängen, wie bei der akuten Lungenembolie, eine wichtige Rolle spielen.

## VIII. Ausblick in die zukünftige Forschung

Neben der Klärung des zellulären Ursprungs des intravaskulären, plättchen-assoziierten TF wird vor allem der Mechanismus seiner intravaskulären Aktivierung weiter aufzuklären sein. Ausserdem gilt es, seine Rolle in nichthaemostatischen Prozessen sowie in pathologischen Vorgängen, wie Herz-Kreislauferkrankungen und Tumorleiden genauer zu studieren. Derzeit sind TF und TFPI der Angriffspunkt für viele Studien zur Entwicklung neuer gerinnungshemmender Medikamente. In diesem Zusammenhang kann die Kenntnis über die Physiologie des schnell aktivierbaren intravaskulären TF dazu beitragen, die komplexen Abläufe in der menschlichen Blutgerinnung besser zu verstehen.

# E. Zusammenfassung

Der Tissue Factor (TF) der Gefäßwand gilt heute als der wichtigste Starter der menschlichen Blutgerinnung. Es wird davon ausgegangen, dass die Lokalisation von TF innerhalb der Gefäßwand unter physiologischen Verhältnissen eine strikte Trennung von den plasmatischen Gerinnungsfaktoren gewährleistet, so dass es unter physiologischen Bedingungen nur nach Wegfallen der endothelialen Barriere zur Bildung des TF/VIIa-Komplexes und dort zur Auslösung der Blutgerinnung kommt. Nach der bisherigen Lehrmeinung stellen Monozyten die einzigen bekannten Blutzellen dar, die nach Langzeitstimulationsbedingungen in der Lage sind, TF zu synthetisieren und zu exprimieren. Der monozytäre TF spielt vor allem bei der Pathogenese der Sepsis und der damit assoziierten Disseminierten Intravasalen Gerinnung (DIC) eine wichtige Rolle.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass TF bereits nach einer fünf minütigen Stimulation von Vollblut mit fibrillärem Kollagen in Monozyten-Plättchen-Komplexen und Neutrophilen-Plättchen-Komplexen gemessen wurde. Die TF Präsentation in den Leukozyten-Plättchen-Komplexen war streng abhängig von der vorhandenen Plättchenzahl. Mit Hilfe von Vollblutgerinnungsmodellen und prokoagulatorischen Assays konnte gezeigt werden, dass der schnell präsentierte Tissue Factor funktionell aktiv war und somit die Fibrinbildung auslöste. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass das TF Antigen auf der Oberfläche von Plättchen vorhanden war, die sich in Konjugaten mit Leukozyten befanden. Um die Frage nach dem Ursprung dieses intravaskulären TF zu klären, wurden Monozyten, Neutrophile Granulozyten und Plättchen auf ihren Gehalt an TF Protein mit einem Double-Sandwich-ELISA untersucht. Dabei konnte nur in den Plättchen TF Antigen nachgewiesen werden. Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass TF in der Tat in den $\alpha$-Granula und dem „open cannanicular system“ der Plättchen lokalisiert ist. In den Plättchen und in deren Vorläuferzellen war keine m-RNA für TF vorhanden. So bleibt die letztendliche Quelle des intravaskulären TF bis auf weiteres ungeklärt. Durch Hemmung von Adhäsionsproteinen, die die Interaktion von Plättchen mit Leukozyten vermitteln, wie P-Selektin und CD40L, konnte die TF-Präsentation in den Plättchen-Leukozyten-Komplexen inhibiert werden. Daher ist davon auszugehen, dass mehrere Adhäsionsproteine an dem Prozess der Präsentation von intravaskulärem TF beteiligt sind.

Ein aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit abgeleitetes Modell der Aktivierung des intravaskulären TF geht davon aus, dass in dem zwischen Leukozyten und Plättchen entstandenen Microenvironment ein von dem Plasma weitgehend unabhängiger Raum entsteht. In diesem Microenvironment wird möglicherweise der von den aktivierten Plättchen sezernierte TFPI durch die leukozytenassoziierte Elastase sowie weitere Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies inaktiviert. TF kann damit zusammen mit FVIIa und FXa die Gerinnung starten. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die gesamte Blutgerinnung auf der Oberfläche von Plättchen stattfinden kann. Der intravaskuläre TF spielt vermutlicherweise eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gerinnung innerhalb des lumenwärts wachsenden Thrombus. Somit kann die Fibrinbildung gezielt dort aktiviert werden, wo sie benötigt wird, um den Thrombus zu stabilisieren. Das Vorhandensein eines schnell aktivierbaren, intravaskulären Tissue Factor Systems stellt ein neues Konzept dar, um sowohl den physiologischen als auch den pathologischen Gerinnungsstart besser zu verstehen.

# F. Literaturverzeichnis

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

**Amirkhosravi A.,** Meyer T., Chang J.Y., Amaya M., Siddiqui F., Desai H., Francis JL. Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. Thromb. Haemost. 2002, 87(6): 930-936

**Bach R.R.,** Nemerson Y., Konigsberg W., Purification and characterization of bovine tissue factor. J. Biol. Chem. 1981, 256: 8324-8331

**Bach R.R.,** Gentry R., Nemerson Y. Factor VII binding tissue factor in reconstituted phospholipid vesicles: Induction of cooperativity by phosphatidylserine. Biochemistry, 1986, 25(14): 4007-4020

**Bach R.R.,** Mechanism of tissue factor activation on cells. Blood Coag. Fibrinolys., 1998, 9(1): S37-S43

**Banner D.W.,** Dárcy A., Chene C., Winkler F.K., Guha A., Konigsberg W.H., Nemerson Y., Kirchofer D. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. Nature, 1996, 380: 41-46

**Banner D.W.,** The Factor VIIa/Tissue Factor Complex. Thromb Haemost. 1997, 78(1): 512-515

**Bazan J.F.** Structural design and molecular evolution of a cytokine superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990, 87: 6934-6938

**Bloem L.J.,** Chen L., Konigsberg W.H., Bach R. Serum stimulation of quiescent human fibroblasts induces the synthesis of tissue factor m-RNA followed by the appearance of tissue factor antigen and procoagulant activity. J. Cell. Phys 1989, 139: 418-423

**Bogdanov V.Y.,** Balasubramanian V., Hathcock J., Vele O., Lieb M., Nemerson Y. Alternativley spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. Nature Medicine, 2003, Vol 9, Num 4, 458-462

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

**Brand K.,** Fowler B.J., Edgington T.S., Mackman N. Tissue Factor m-RNA in THP-1 monocytic cells is regulated at both transcriptional and posttranscriptional levels in response to lipopolysaccharide. Mol. Cell Biol. 1991, 11: 4732-4738

**Bromberg M.E.,** Garen A., Königsberg W.H. Increasing expression of tissue factor in human melanoma cells induces metastasis in a murine model. Thromb Haemost, Suppl. XIVth International Congress on Thrombosis and Haemostasis, 1995 Abstract 1060

**Broze G.J.,** Leykam J.E., Schwartz B.D., Miletich J.P. Purification of human brain tissue factor. J. Biol. Chem. 1985, 260: 10917-10920

**Butenas S.,** Mann K.G., Blood Coagulation. Biochemistry (Moscow), 2002, 67(1): 3-12

**Callander N.S.,** Varki N., Rao L.V. Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. Cancer, 1992, 70(5): 1194-1201

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

**Caplice N.M.,** Mueske C.S., Kleppe L.S., Simari R.D. Presence of tissue factor pathway inhibitor in human atherosclerotic plaques is associated with reduced tissue factor activity. Circulation, 1998, 98: 1051-1057

**Carmeliet P.,** Mackman N., Moons L., Luther T., Gressens P., Van Vlaenderen I., Demunck H., Kasper M., Greier G., Evrard P., Müller M., Risau W., Edgington TS., Collen D. Role of tissue factor in embryotic blood vessel development. 1996, Nature 383: 73-75

**Carson S.D.,** Henry W.M., Shows T.B. Tissue factor gene localized to human chromosome 1. Science 1985, 229: 991-993

**Carson S.D.,** Bromberg M.E. Tissue Factor Encryption/de-encryption Is not Altered in the Absence of the Cytoplasmic Domain. Thromb. Haemost., 2000, 84: 657-63

**Davie E.W.,** Ratnoff O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. Science 1964, 145: 1310-1333

**Di Minno G.,** Silver M.J. Mouse antithrombotic assay: A simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. J. Pharmacol. Exp. 1983, 225: 57-60

**Drake D.A.,** Morrissey J.H., Edgington T.S. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Am. J. Pathol., 1989, 134: 1087-1097

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

**Eddlestone M.,** de la Torre J.C., Oldstone M.B.A., Loskutoff D.J., Edgington T.S., Mackman N. Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central nervous system. J. Clin. Invest. 1993, 92: 349-358

**Edgington T.S.,** Mackman N., Brand K., Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. Thromb. Haemost. 1991, 66(1) 67-79

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

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

**Evangelista V.,** Rajtar G., de Gawtano G., White J.G., Cerletti C. Platelet activation by fMLP stimulated polymorphonuclear leukocytes: The activity of Catepsin G is not prevented by antiproteinases. Blood, 1991, 77: 2379-2388

**Falati S.,** Liu Q., Gross P., Merill-Skoloff G., Chou J., Vandendries E., Celi A., Croce K., Furie B.C., Furie B. Accumulation of Tissue Factor into Developing Thrombi In Vivo Is Dependent upon Microparticle P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and Platelet P-Selektin. J Exp Med., 2003, 197(11): 1585-98

**Flössel C.,** Luther T., Müller M., Albrecht S., Kasper M. Immunohistochemical detection of tissue factor (TF) on paraffin sections of routinely fixed human tissue. Histochemistry, 1994, 101:449-453

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

**Furie B.,** Furie B.C. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-Selectin and the P-Selectin ligand PSGL-1. Thromb. Haemost. 1995, 74: 224-227

**Fuster V.,** Badimon L., Badimon J.J., Chesebro J.H. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). New Engl J Med, 1992, 326: 242-250

**Fuster V.,** Badimon L., Badimon J.J., Chesebro J.H. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). New Engl J Med, 1992, 326: 310-318

**Gailani D.,** Broze G.J. Factor XII-independent activation of factor XI in plasma: effects of sulfatidases on tissue factor-induced coagulation. Blood 1993, 82: 813-819

**Geczy C.L.,** Hopper K.E. A mechanism of migration inhibition in delayed-type hypersensitivity reactions. Lymphokines promote procoagulant activity of macrophages in vitro. J. immunol. 1981, 126: 1059-1064

**Giesen P.L.A.,** Rauch U., Bohrmann B., Kling D., Roque M., Fallon J.T., Badimon J., Himber J., Riederer M., Nemerson Y. Blood borne tissue factor: Another view of thrombosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96: 2311-2315

**Goethe J.W. v.** , Goethes Werke. Faust, der Tragödie erster Teil, Vers 1740, Hrsg. im Auftrage der Großherzogin Sophie von Sachsen. Abt. 1. Bd. 14. Bearb. von Erich Schmidt. Weimar: Hermann Böhlau, 1887.

**Guha M.,** Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes, Cell Signal. 2001, 13(2): 85-94

**Halvorsen H.,** Olsen J.O., Osterud B. Granulocytes enhance LPS-induced tissue factor activity in monocytes via an interaction with platelets. J. Leukok. Biol. 1993, 54: 275-282

**Harlos K.,** Martin D.M.A., O´Brien D.P., Jones E.Y., Stuart D.I., Polikarpov I., Miller Atuddenham E.G.D., Boys C.W.G. Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. Nature, 1994, 370: 662-666

**He M.,** Wen Z., He X., Xiong S., Liu F., Xu J., Li J., Xie Q., Jian Z., Chen F., Xioa B., Pu X., He S. Observation on tissue factor pathway and some other coagulation parameters during the onset of acute cerebrocardiac thrombotic diseases. Thromb Res. 2002, 107: 223-228

**Higuchi D.A.,** Wun T.C., Likert K.M., Broze G.J. The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. Blood, 1992, 79: 1712-1719

**Kao F.T.,** Hartz J, Horton R., Nemerson Y., Carson S.D. Regional assignment of human tissue factor gene to chromosome 1p21-p22. Somatic Cell Mol. Gen. 1988, 14: 407-410

**Karnicki K.,** Komorowicz E., Fass D.N., Owen W.G., Mc Bane R.D. Influence of anatomical location on arterial thrombosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002, 22: 342-347

**Kinast J.,** Ostermann H. Blutgerinnung und Fibrinolyse. Z Kardiol., 1993, 82: 65-69

**Kirchhofer D.,** Riederer M.A., Baumgartner H.R. Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. Blood, 1997, 89: 1270-1278

**Lo S.K.,** Cheung A., Zheng Q., Silverstein R.L. Induction of tissue factor on monocytes by adhesion to endothelial cells. J. Immunol. 1995, 154(9): 4768-4777

**Luther T.,** Flössel C., Mackman N., Bierhaus A., Kasper M., Sage E.H., Iruela-Arispe L., Großmann H., Ströhlein A., Zhang Y., Nawroth P.P., Carmeliet P., Loskutoff D.J., Müller M. Tissue Factor expression during human and mouse development. Am. J. Pathol. 1996, 149: 101-113

**Luther T.,** Dittert D.D., Kotzsch M., Erlich J., Albrecht S., Mackman N., Müller M. Functional implication of tissue factor localization to cell-cell contacts in myocardium. J Pathol. 2000, 192 (1): 121-130

**Mac Farlane R.G.** An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biological amplifier. Nature 1964, 202: 498

**Mackman N.,** Morrissey J.H., Fowler B., Edgington T.S. Complete sequence of the human tissue factor gene a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. Biochemistry, 1989, 28: 1755-1762

**Mackman N.,** Fowler B.J., Edgington T.S., Morrissey J.H. Functional analysis of the human tissue factor promoter and induction by serum. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990, 87: 2254-2258

**Mackman N.,** Brand K., Edgington T.S. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. J. Exp. Med. 1991, 174: 1517-1526

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

**Moons H.M.,** Levi M., Peters R.J.G. Tissue factor and coronary artery disease. Cardiovasc. Res. 2002, 53: 313-325

**Morawitz P.,** Die Chemie der Blutgerinnung. Ergebnisse der Physiologie, biologischen und experimentellen Pharmakologie. Ergebn. Physiol. 1905; 4: 307-322

**Morrissey J.H.,** Fakhrai H., Edgington T.S. Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. Cell 1987, 50: 129-135

**Mueller B.M.,** Reisfeld R.A., Edgington T.S., Ruf W. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient haematogenous metastasis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89(24): 11832-11836

**Müller I.,** Klocke A., Alex M., Kotzsch M., Luther T., Morgenstern E., Zieseniss S., Zahler S., Preissner K., Engelmann B. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. express article, FASEB J., 2003, 17(3): 476-478

**Muller Y.A.,** Ultsch M.H., Kelley R.F, de Vos A.M. Structure of the extracellular domain of human tissue factor: location of the factor VIIa binding site. Biochemistry 1994, 33: 10864-10870

**Muller Y.A.,** Ultsch M.H., de Vos A.M. The crystal structure of the extracellular domain of human tissue factor refined to 1,7 Angstroem resolution. J. Biol. Mol. 1996, 256: 144-159

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

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

**Nemerson Y.** A simple experiment an a weakening paradigm: the contribution of blood to propensity of thrombus formation. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 2002, 22: 1369

**Novotny W.F.,** Girard T.J., Miletich L.P., Broze G.J. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. Blood, 1988, 72: 2020-2025

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

**Osterud B.** Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. Blood Coag. Fibrinol. 1998, 9(Suppl 1): S9-S14

**Osterud B.,** Rao L.V., Olsen J.O. Induction of tissue factor expression in whole blood: lack of evidence for the presence of tissue factor expression in granulocytes. Thromb. Haemost. 2000, 83(6): 861-867

**Osterud B.,** The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. Semin Haematol 2001, 38(4 Suppl. 12): 2-5

**Osterud B.,** The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. Dis Mon. 2003, 49(1): 7-13

**Paborsky L.R.,** Cras I.W., Fisher K.L., Goman C.M. Lipid association, but not the transmembrane domain is required for tissue factor activity. Substitution of the transmembrane domain with a phosphatidylinositol anchor. J. Biol. Chem. 1991, 266: 21911-21916

**Pendurthi U.R.,** Meng F., Mackman N., Rao L.V. Mechanism of resveratol-mediated suppression of tissue factor gene expression. Thromb. Haemost. 2002, 87(1): 155-162

**Petersen L.C.,** Bjorn S.E., Nordfang O. Effect of leukocyte proteinases on tissue factor pathway inhibitor. Thromb. Haemost. 1992, 67: 537-541

**Randolph G.J.,** Luther T., Albrecht S., Magdolen V., Muller W.A. Role of tissue factor in adhesion of mononuclear Phagocytes to an trafficking through endothelium in vitro. Blood, 1998, 92(11): 4167-4177

**Randolph G.J.,** Beaulieu S., Lebeque S., Steinman R.M., Muller W.A. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. Science, 1998, 282: 480-483

**Rao L.V.** Tissue factor as a tumor procoagulant (Review). Cancer Metastasis Rev. 1992, 11(3-4): 249-266

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

**Rauch U.,** Bonderman D., Bohrmann B., Badimon J.J., Himber J., Riederer M.A., Nemerson Y. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. Blood, 2000, 96(1): 170-175

**Ruf W.,** Molecular regulation of blood clotting in tumor biology. Haemostasis, 2001 (31) Suppl 1: 5-7

**Sabharwal A.K.,** Birktoft J.J., Gorka J., Wildgoose P., Petersen L.C., Bajaj S.P. High affinity $Ca^{2+}$ binding site in the serine protease domain of human factor VIIa and its role in tissue factor binding and develoment of catalytic activity. J. Biol. Chem. 1995, 270 (26): 15523-15530

**Sakariassen K.S.,** Joss R., Muggli R., Kuhn H., Tschopp T.B., Sage H., Baumgartner T.R. Collagen type III induces ex vivo thrombogenesis in humans. Role of platelets and leukocytes in deposition of fibrin. Arteriosklerosis, 1990, 10: 276-284

**Sambola A.,** Osende J., Hathcock J., Degen M., Nemerson Y., Fuster V., Crandall J., Badimon J.J. Role of Risk Factors in the Modulation of Tissue Factor Activity and Blood Thrombogenicity. Circulation, 2003, 25: 973-977

**Sato N.,** Takahashi H., Kishi K., Shibata A. A synthesis of tissue factor in leukemic cell lines. Thromb Haemost, Suppl. XIVth International Congress on Thrombosis and Haemostasis, 1995 Abstract 1079

**Scarpati E.M.,** We D., Broze G.J., Miletich J.P., Flandersmeyer R.R., Siegel N.R., Sadler J.E. Human tissue factor cDNA sequence and chromosome localization of the gene. Biochemistry 1987, 26: 5234-5238

**Schmidt A.,** Zur Blutlehre. Leipzig: FCW Vogel Verlag 1892

**Scholz T.,** Temmler U., Krause S., Heptinstall S., Losche W. Transfer of Tissue Factor from Platelets to Monocytes: Role of Platelet-Derived Microvesicles and CD62P. Thromb Haemost, 2002, 88(6): 1033-8

**Schwartz B.S.,** Edgington T.S. Immunecomplex induced human monocyte procoagulant activity. A rapid unindirectional lymphocyte instructed pathway. J. Exp. Med. 1981, 154: 892-906

**Sixma J.J.,** Van Zanten G.H., Saelman E.U.M., Verkleji M. Lankhof H., Nieuvenhuis K., De Groot P.G. Platelet adhesion to Collagen, Thromb. Haemost. 1995, 74(1): 454-459

**Sixma J.J.,** Van Zanten G.H., Huizinga E.G. Van der Plas R.M., Verkley M., Wu Y., Gros P., De Groot P.G. Platelet adhesion to Collagen: an Update. Thromb. Haemost. 1997, 78(1): 434-438

**Sturm U.,** Luther T., Albrecht S., Flössel C., Grossmann H., Müller M. Immunohistochemical detection of tissue factor in normal and abnormal human mamary glands using monoclonal antibodies. Virchows Archiv-A. Pathol. Anat. Histopathol. 1992, 421(2): 79-86

**Suefuji H.,** Ogawa H., Yasue H., Kaikita K., Soejima H., Motoyama T., Mizuno Y., Oshima S., Saito T., Tsuji I., Kumeda K., Kamikubo Y., Nakamura S. Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarktion. Am. Heart J. 1997, 134: 253-259

**Thiruvikraman S.V.,** Guha A., Roboz J., Taubman M.B., Nemerson Y., Fallon J.T. In situ localization of tissue factor in human atherosklerotic plaques by binding of dogoxigenin-labeled factors VIIa and X. Lab Invest. 1996, 75: 451-461 (erratum: Lab. Invest. 1997, 76: 297-299)

**Weber, C.,** Springer T.A. Neutrophil accumulation on activated, surface adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alpha II beta III and stimulated by by platelet-activatin factor. J. Clin. Invest. 1997, 100: 2085-2093

**Wilcox J.N.,** Smith K.M., Schwartz S.M., Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 2839-2843

**Zhang Y.,** Bachmann S., Hemmer C., Van Lunzen J., Von Stemm A., Kern P., Dietrich M., Ziegler R., Waldherr R., Nawroth P.P. Vascular origin of Kaposi´s sarcoma. Expression of leukocyte adhesion molecule-1, thrombmodulin and tissue factor. Am. J. Pathol. 1994, 144(1): 51-59

**Zhang Y.,** Deng Y., Luther T., Müller M., Ziegler R., Waldherr R., Stern D.M., Nawroth P.P. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. J. Clin. Invest., 1994, 94(3): 1320-1327

# G. Anhang

## I. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. B. Engelmann für die Themenstellung zu dieser Arbeit, die Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Experimente und die Durchsicht dieser Arbeit an deren Gelingen er einen großen Anteil hat. Durch seine freundliche Unterstützung konnte ich bereits Teile dieser Arbeit in einer Originalarbeit und mehreren Abstracts veröffentlichen.
Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Pohl für die Bereitstellung der technischen Geräte in den Räumlichkeiten des Physiologischen Institutes.

Bei Frau S. Zieseniss möchte ich mich vor allem für Ihre große freundschaftliche Unterstützung im Laboralltag bedanken. Darüberhinaus verdanke ich Ihr viele methodische Grundkenntnisse der Laborarbeit.
Ich bedanke mich ferner bei Herrn PD Dr. S. Zahler für die Einarbeitung und Unterstützung am Durchflusszytometer und die stets hilfreiche Beratung während der ganzen Arbeit.

Ausserdem möchte ich Herrn PD Dr. T. Luther, Institut für Pathologie TU Dresden, meinen Dank aussprechen für die Kooperation in der Elektronenmikroskopie und der Double-Sandwich-ELISA-Bestimmungen, sowie für die Bereitstellung von Antikörpern.
Für die Unterstützung in der Vollblutkoagulometrie und in der Durchflusszytometrie bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. M. Spannagl und Herrn Dr. M. Angstwurm aus der Abt. für Haemostaseologie in der Med. Klinik in der Ziemsenstrasse.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei meinen Mitdoktoranden Frau Dr. I. Müller, Frau T. Kauke, Frau S. Urban und Frau S. Klein bedanken, die mich freundschaftlich unterstützt haben.
Mein Dank gilt ausserdem allen hier nichtgenannten Mitgliedern des Physiologischen Instituts, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.
Zuletzt gilt mein herzlicher Dank meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums stets unterstützt hat.

## II. Lebenslauf

**Persönliche Daten:**

| | |
|---|---|
| **Name:** | **Zillmann, Andreas Ulrich** |
| Geburtsdatum: | 06.04.1975 |
| Anschrift: | Gebelestraße 22,<br>81679 München |
| Telefon: | 089 987367 |
| Mobil: | 0179 7992151 |
| e-mail: | andreas.zillmann@web.de |
| Familienstand: | ledig |
| Eltern | Ulrich Zillmann und<br>Elisabeth Zillmann |

**Schulbildung:**

| | |
|---|---|
| 1981-1985 | Grundschule an der Gebelestrasse, München |
| 1985-1994 | Luitpoldgymnasium München, mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig<br>Abschluß: Abitur |

**Zivildienst:**

| | |
|---|---|
| 08/1994-10/1995 | Zivildienst im Krankenhaus München Harlaching, Abteilung für Augenheilkunde, für die Dauer von 15 Monaten |

**Hochschulbildung:**

| | |
|---|---|
| 10/1995 - 11/2002 | Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München |
| 08/1997 | Physikum |
| 08/1998 | Erstes Staatsexamen |
| 09/2001 | Zweites Staatsexamen |
| 10/2001-<br>09/2002 | Praktisches Jahr |
| 11/2002 | Drittes Staatsexamen |

**Promotionsarbeit:**

| | |
|---|---|
| Seit 1998 | Doktorarbeit im Physiologischen Institut der LMU<br>Experimenteller Teil: 1998-2000 |