

**Aus dem
Physiologischen Institut der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl Vegetative Physiologie**

Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

**Einfluss von Blutzellinteraktionen und
thrombozytären ADP-Rezeptoren auf die Aktivierung
des intravaskulären Tissue Factors**

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

vorgelegt von

Antje Klocke

aus

Starnberg

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Engelmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. W. Schramm
Priv.-Doz. Dr. A. Faußner

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2008

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

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

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

*Erstautoren

Kongressbeiträge:

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 on Fibrinolysis and Proteolysis (ISFP), München 2002.

Müller I, Alex M, Klocke A, Morgenstern E, Kotzsch M, Luther T, Preissner K, Engelmann B. Initiation of coagulation by tissue factor present on circulating microvesicles and activated platelets. 47. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Innsbruck 2003.

Müller I, Alex M, Klocke A, Morgenstern E, Kotzsch M, Luther T, Zieseniss S, Engelmann B. Microvesicle and platelet associated tissue factor promote initiation of coagulation. XIX International ISTH Congress, Birmingham 2003. Abstracts from XIX International ISTH Congress, *Thromb Haemost.* 2003 1 Suppl. 1 July, Index

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1. EINLEITUNG	8
1.1 Die Bedeutung von Tissue Factor für die Hämostase	8
1.2 Extrinsisches und intrinsisches Gerinnungssystem.....	9
1.3 Die zwei Phasen der Gerinnung.....	9
1.4 Struktur und Lokalisation des Tissue-Factor-Proteins	11
1.5 Struktur, Funktion und Lokalisation von Tissue Factor Pathway Inhibitor ..	12
1.6 Neutrophile Sekretionsprodukte und TFPI	13
1.7 Plättchen-Leukozyten-Interaktion	15
1.8 Struktur, Funktion und Inhibierung von ADP-Rezeptoren	16
1.9 Zielsetzung.....	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 MATERIAL	18
2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel	18
2.1.2 Geräte und Materialien.....	18
2.1.3 Antikörper, Gerinnungsfaktoren, Inhibitoren, Oxidoreduktasen und Proteasen	19
2.1.4 Standards, Stimulantien und Substrate	20
2.1.5 Antikoagulantien, Lösungen und Puffer	21
2.2 METHODEN	24
2.2.1 Zellisolierungen	24
2.2.1.1 Blutabnahme	24
2.2.1.2 Isolierung neutrophiler Granulozyten	24
2.2.1.3 Isolierung von Monozyten.....	25
2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität	26
2.2.1.5 Isolierung von Thrombozyten	26
2.2.1.6 Isolierung zirkulierender Mikrovesikel.....	27

2.2.1.7 Herstellung von Mikrovesikeln in vitro	27
2.2.2 Durchflußzytometrie	28
2.2.3 Thrombelastographie	29
2.2.3.1 Aufbauversuche.....	32
2.2.3.2 Proteaseinhibitoren.....	32
2.2.3.3 Sauerstoffradikalspaltende Enzyme	32
2.2.4 Faktor-Xa-Bildung	33
2.2.4.1 Coating mit VIC7	34
2.2.4.2 Inkubationsbedingungen der Proteaseinhibitoren.....	34
2.2.4.3 Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle	35
2.2.4.4 ADP-Rezeptor-Antagonisten	35
2.2.5 Plättchenfunktionsanalyse.....	35
2.2.6 Pharmakologische Studie.....	36
2.2.6.1 Untersuchung der Thrombozytenfunktion.....	38
2.2.6.2 Faktor-Xa-Bildung.....	38
2.2.7 Statistik.....	38
3. ERGEBNISSE	39
3.1 Tissue Factor auf Plättchen und zirkulierenden Mikrovesikeln fördert die kollageninduzierte Fibrinbildung im Vollblut	39
3.2 Zur funktionellen Aktivierung des intravaskulären Tissue Factor sind Mikrovesikel, Plättchen und Leukozyten nötig	40
3.3 Erhöhung der Mikrovesikelmenge führt zu einer Zunahme der Faktor-Xa- Bildung.....	42
3.4 Lokalisierung des Tissue Factors in Mikrovesikeln unterschiedlicher Ausgangszellen	43
3.5 Plättchenmikrovesikel erhöhen die Tissue-Factor-Aktivität in Plättchen- Neutrophilen-Suspensionen.....	44
3.6 Inhibierung leukozytärer Proteasen hemmt die Tissue-Factor-Aktivität	46
3.7 Inhibierung der neutrophilen Elastase senkt die Fibrinbildung im Vollblut..	48
3.8 Leukozytäre Enzyme, die Sauerstoffradikale abbauen, senken die Aktivität des intravaskulären Tissue Factor	49

3.9 Katalase und Superoxiddismutase senken die kollageninduzierte Fibrinbildung	50
3.10 Zellinteraktionen fördern die Aktivierung des intravaskulären Tissue Factors.....	51
3.11 ADP-Rezeptorenblockade inhibiert die prokoagulatorische Aktivität in Plättchen-Neutrophilen-Gemischen	52
3.12 Aspirin versus Clopidogrel – Medikamente mit Einfluß auf die Tissue-Factor-Aktivität.....	53
3.13.1 Messung der Thrombozytenfunktion im Platelet Function Analyzer	53
3.13.2 Messung der Tissue-Factor-Aktivität mittels Faktor-Xa-Bildung	54
4. DISKUSSION	56
4.1 Intravaskulärer Tissue Factor: Lokalisation und Aktivitätszustand	56
4.2 TF auf zirkulierenden Mikrovesikeln	57
4.3 TF auf Plättchen-Mikrovesikeln	58
4.4 Interaktionen zwischen Plättchen und Neutrophilen.....	59
4.5 TF-Aktivierung durch neutrophile Sekretionsprodukte: Sauerstoffradikale	62
4.6 Tissue-Factor-Aktivierung über ADP-Rezeptoren	63
4.7 Tissue Factor und Aspirin.....	64
4.8 Aktivierungsmodell für den intravaskulären Tissue Factor	65
4.9 Ausblick.....	66
5. ZUSAMMENFASSUNG	67
6. LITERATURVERZEICHNIS	69
7. DANKSAGUNG	82
8. LEBENS LAUF	83

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vereinfachtes Schema der Hämostase nach Verletzung einer Gefäßwand	8
Abb. 2: Darstellung der Blutgerinnung nach derzeitiger Vorstellung	10
Abb. 3: Bildung des inhibitorischen Xa-TFPI-VIIa-TF Komplexes	12
Abb. 4: Schematische Darstellung der ADP-Rezeptoren	17
Abb. 5: Flowcytometrische Bestimmung der Mikrovesikelkonzentration	29
Abb. 6a: Schema des thrombelastographischen Messprinzips.....	30
Abb. 6b: Graphische Darstellung der thrombelastographischen Messung	31
Abb 7: Mechanismus des Platelet Function Analyzer	36
Abb. 8: Untersuchung der kollageninduzierten Fibrinbildung in plättchenarmem/ plättchenreichem Plasma.....	40
Abb. 9: Tissue-Factor-Aktivität in Zellsuspensionen unterschiedlicher Zusammensetzung	41
Abb. 10: Steigerung der TF-Aktivität durch Erhöhung der Mikrovesikelmenge	42
Abb. 11: TF-Gehalt in Mikrovesikeln unterschiedlicher Abstammung	43
Abb. 12: Einfluß von verschiedenen in vitro hergestellten Mikrovesikeln auf die Tissue-Factor-Aktivität	44
Abb. 13: Beschichtung von Mikrovesikeln und Plättchen mit anti-Tissue-Factor- Antikörper	45
Abb. 14: Einfluß von Proteaseinhibitoren auf die TF-Aktivität	47
Abb. 15: Einfluß von Proteaseinhibitoren auf die kollageninduzierte Fibrinbildung..	48
Abb. 16: Katalase und SOD inhibieren die intravaskuläre Tissue-Factor-Aktivität...	49
Abb. 17: Katalase und SOD inhibieren die kollageninduzierte Fibrinbildung im Vollblut.....	50
Abb. 18: Plättchen-Leukozyten-Interaktionen fördern die TF-Aktivität	51
Abb. 19: Einfluß von ADP auf die TF-Aktivität	52
Abb. 20: Bestimmung der Thrombozytenfunktion nach Behandlung mit Clopidogrel und ASS.....	54
Abb. 21: Ex vivo Nachweis für die Bedeutung des P2Y ₁₂ Rezeptors bei der Aktivierung des intravaskulären TF	55
Abb. 22: Modell der TF-Aktivierung mittels Plättchen-Leukozyten-Interaktion	61
Abb. 23: Mögliche Angriffspunkte der O ₂ -Radikale bei der Aktivierung des TF	63

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-Diphosphat
AMP	Adenosin-Monophosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	Bovines Serum-Albumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of differentiation
CFT	Clot formation time
CMK	Chloromethylketon
CT	Coagulation time
CTI	Corntrypsininhibitor
EDTA	Ethylendiamin N,N,N,N-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
fMLP	N-Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
kDa	Kilo Dalton
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloprotease
ml	Milliliter
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NADPH-Oxidase	Nikotinamid-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase
nm	Nanometer
O ₂ -Radikale	Sauerstoffradikale
P	Plättchen
PAP	Plättchenarmes Plasma
PAPoM	Plättchenarmes Plasma ohne Mikrovesikel
PBS	Phosphat buffered saline
PFA	Platelet Function Analyzer
pg	Picogramm
PRP	Plättchenreiches Plasma
PRPoM	Plättchenreiches Plasma ohne Mikrovesikel
PSGL	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand
Sek	Sekunden
SOD	Superoxiddismutase
TEG	Thrombelastograph
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TIMP	Tissue Inhibitoren der Matrix-Metalloproteasen
U	Units
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
Well	Vertiefung

1. EINLEITUNG

1.1 Die Bedeutung von Tissue Factor für die Hämostase

Zwei wesentliche Vorgänge kennzeichnen den Beginn der Hämostase nach Verletzung einer Gefäßwand: Durch die Verletzung werden subendotheliale Kollagenfasern freigelegt, an welche sich Thrombozyten anheften. Die adhärennten Thrombozyten bilden einen provisorischen, mechanisch instabilen Verschluss der Gefäßwandlücke. Zeitgleich wird durch den Kontakt des Gerinnungsfaktors VII (FVII) mit dem vorwiegend im extravaskulären Gewebe lokalisierten Tissue Factor (TF) die plasmatische Gerinnung in Gang gesetzt. Im Rahmen dieses Umbaus von Plasmaproteinen entsteht Fibrin, das eine stabile Quervernetzung der Thrombozyten und damit dauerhafte Abdichtung der Läsion ermöglicht. Tissue Factor nimmt als Startprotein der plasmatischen Gerinnung eine zentrale Rolle in der Hämostase ein.

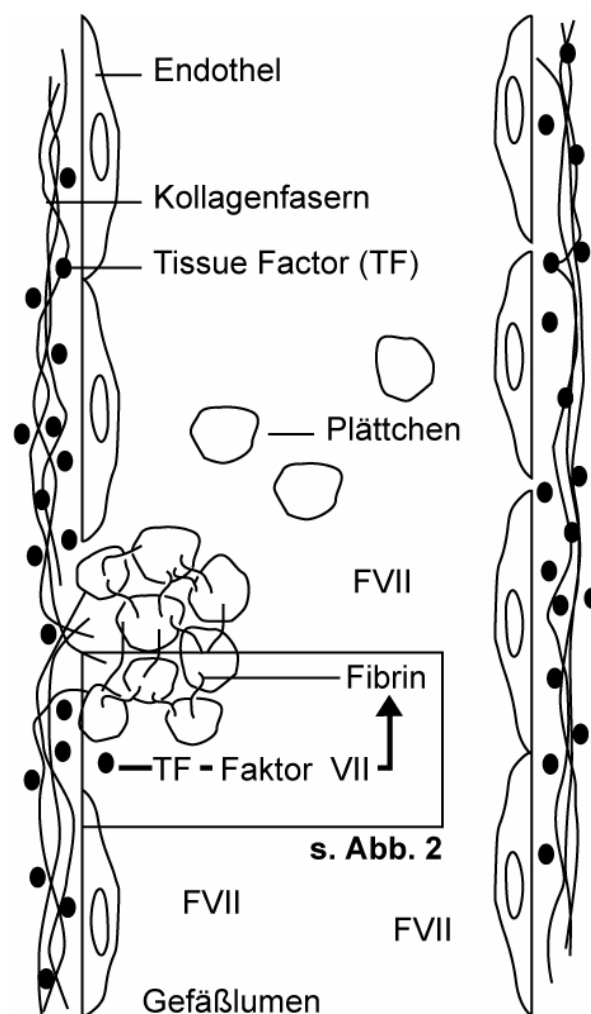


Abb. 1: Vereinfachtes Schema der Hämostase nach Verletzung einer Gefäßwand

1.2 Extrinsisches und intrinsisches Gerinnungssystem

In der Kaskadentheorie der Blutgerinnung (Davie, 1964; Macfarlane, 1964) wird bei der plasmatischen Gerinnung zwischen einem extrinsischen und einem intrinsischen System unterschieden. Die Aktivierung des extrinsischen Systems beginnt mit der Bindung der Serinprotease Faktor VII bzw. dem im Blut bereits aktiviert vorliegenden Faktor VIIa an einen gewebständigen als Tissue Factor bezeichneten Gewebekomplex. Es folgt eine Serie von Umwandlungen von Zymogenen in aktive Enzyme, die über Faktor Xa und Thrombin schließlich eine Vernetzung von Fibrinmonomeren bewirken. Das intrinsische System hingegen wird nach Kontakt mit anionischen Oberflächen durch eine Aktivierung des Gerinnungsfaktors XII ausgelöst, der im Blut, also intrinsisch, vorhanden ist (Abb. 2).

Eine strikte Trennung zwischen extrinsischem und intrinsischem Gerinnungssystem kann jedoch nicht mehr vorgenommen werden seit bekannt ist, daß der Tissue Factor/Faktor VIIa-Komplex in der Lage ist, Faktor IX zu aktivieren (Bom, 1991; Nemerson, 1982; Osterud, 1977; Rapaport, 1992). Zudem konnte gezeigt werden, daß Faktor XI unabhängig von Faktor XII durch Thrombin aktiviert werden kann (Gailani, 1993; Naito, 1991; von dem Borne, 1994). Für eine sekundäre Rolle des intrinsischen Systems beim Start der Gerinnung spricht auch die Tatsache, daß Personen mit einem genetisch veranlagten Faktor XII-Mangel keine Blutungsneigung zeigen (Lammle, 1991). Dagegen leiden Patienten mit einer Defizienz der Faktoren VII, VIII, IX und XI unter milden bis schweren hämostatischen Funktionsstörungen. Die Kontaktaktivierung der Blutgerinnung über Faktor XII, Prekallikrein und hochmolekulares Kininogen ist jedoch möglicherweise an der Gerinnungsaktivierung durch künstliche Oberflächen, beispielsweise Herzklappenprothesen, beteiligt.

Aufgrund dieser Beobachtungen ist man dazu übergegangen, den Gerinnungsprozess in zwei aufeinanderfolgende Phasen zu gliedern: eine TF-vermittelte Startphase und eine Phase der positiven Rückkopplung (Camerer, 1996).

1.3 Die zwei Phasen der Gerinnung

Während der Startphase werden nanomolare Mengen an Thrombin und picomolare Mengen an Faktor VIIa, IXa und Xa gebildet (Butenas, 1997). Sekunden nach der Gerinnungsaktivierung durch den TF/Faktor VIIa-Komplex wird dieser Prozess durch Komplexierung von Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI s.u.) mit TF, Faktor VIIa

und Faktor Xa gestoppt (Broze, 1990). Die Menge des bis dahin gebildeten Thrombins reicht jedoch aus, um die Faktoren V (Esmon, 1979), VIII (Eaton, 1986) und XI zu aktivieren und so über eine positive Rückkopplung eine Verstärkung der Gerinnung zu erreichen (Roberts, 2006)(Abb. 2). In dieser zweiten Phase bindet Faktor VIIIa zusammen mit Faktor IXa an negativ geladene Phospholipide auf der Plättchenoberfläche. Über diesen sogenannten „Tenasekomplex“ werden 50-fach höhere Mengen an Faktor Xa gebildet als direkt über den TF/Faktor VIIa-Komplex (Mann, 1999). Faktor Xa zeigt jedoch in Abwesenheit von Faktor V nur eine minimale Aktivität. Erst die Bildung des Prothrombinase-Komplexes aus Faktor Va, Faktor Xa und Prothrombin bewirkt - in Bindung an Phospholipidoberflächen - eine Zunahme der Thrombinbildung durch proteolytische Spaltung von Prothrombin um das ca. 25-fache (Kalafatis, 1994; Nemerson, 1982).

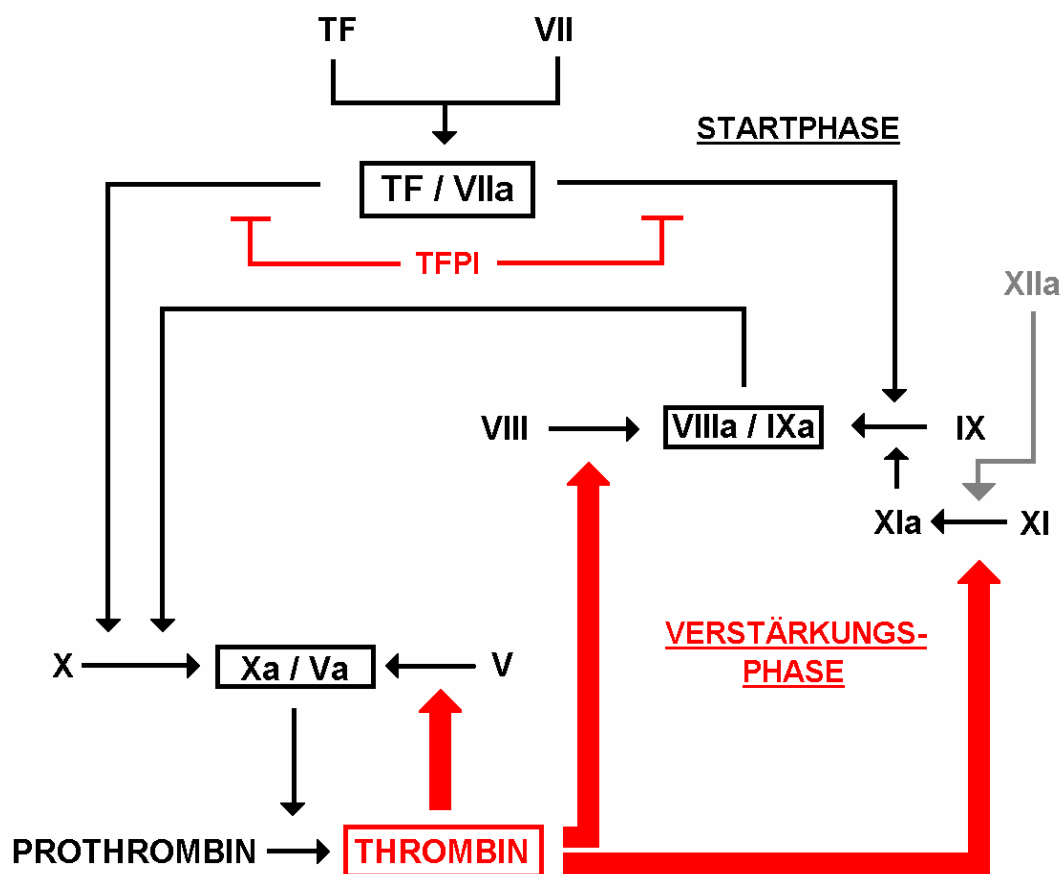


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der Blutgerinnung nach derzeitiger Vorstellung. Der Kontakt von TF mit Faktor VII bzw. Faktor VIIa löst den Start der Gerinnung aus. Nachdem der TF/VIIa-Komplex durch TFPI inhibiert wurde, aktiviert das bis dahin gebildete Thrombin die Faktoren V, VIII und XI (positive Rückkopplung = rote Pfeile). Die Aktivierung über Faktor XII (intrinsisches System) scheint im physiologischen Bereich nicht von wesentlicher Bedeutung zu sein.

1.4 Struktur und Lokalisation des Tissue-Factor-Proteins

Der Begriff Tissue Factor entstand aus der Vorstellung eines im Gewebe lokalisierten Proteins. Synonym werden die Begriffe Gewebethromboplastin und CD142 verwendet. Es handelt sich um ein 47 kDa großes, integrales Membranprotein, welches in eine große extrazelluläre Domäne (219 Aminosäuren) und zwei kleinere - die transmembranäre (23 Aminosäuren) und die cytoplasmatische (21 Aminosäuren) Domäne - gegliedert ist (Morrissey, 1987). Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei in β -Faltblattstruktur angeordneten Domänen vom Fibronektin III-Typ: TF 1 sowie TF 2 und enthält die Bindungsstelle für Faktor VII bzw. VIIa (Banner, 1996; Harlos, 1994). Für die vollständige Funktion des TF/Faktor VIIa Komplexes ist jedoch auch die transmembranäre Domäne notwendig, da sie die Bindungsaffinität für die Faktoren IX und X erhöht (Paborsky, 1991).

Gegen Ende der 80er Jahre wurde das humane TF-Gen strukturell aufgeklärt und erstmals kloniert (Morrissey, 1987; Scarpati, 1987). Schon 1965 konnte Astrup in den lebenswichtigen Organen Gehirn, Lunge und Niere größere Mengen Thromboplastin nachweisen (Astrup, 1965). Die Lokalisierung von TF in der Gefäßwand, in Organkapseln, im Epithel der Haut und einer Reihe weiterer „Grenzflächen“-Gewebe (Wilcox, 1989) führte zu der Theorie einer hämostatischen Hülle, die den Organismus bei Verletzungen vor Blutverlusten schützen soll (Drake, 1989). Bei genaueren Untersuchungen der Gefäßwand wurde TF in Fibroblasten der Adventitia gefunden (Fleck, 1990), Zellen die im intakten Gefäß nicht mit Blut in Kontakt stehen. Erste Hinweise auf einen intravaskulären TF lieferten Studien, in denen eine TF-Expressierung auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen, nach Stimulation mit Entzündungsmediatoren wie Lipopolysacchariden (LPS), Immunkomplexen oder Zytokinen, induziert werden konnte (Gregory, 1985; Schwartz, 1981). Dabei konnte auch gezeigt werden, daß stimulierte Monozyten das TF Gen de novo transskribieren können (Mackman, 1989). Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen in jüngerer Zeit geht hervor, daß eine 5-minütige Stimulation von Vollblut mit Kollagen in vitro zu einer TF-Expressierung auf der Oberfläche von Leukozyten-Thrombozyten-Komplexen führt (Zillmann, 2001). Dieser Prozess setzt voraus, daß TF im Blut – unabhängig von einer de novo-Synthese – vorhanden sein muß.

1.5 Struktur, Funktion und Lokalisation von Tissue Factor Pathway Inhibitor

TFPI ist ein multivalenter Proteaseinhibitor vom Kunitztyp, der über eine Hemmung des Faktors Xa sowie des Faktor VIIa/TF-Komplexes die TF vermittelte Blutgerinnung regulieren kann (Broze, 1987). Das auch als LACI (Lipoprotein associated coagulation inhibitor) oder EPI (extrinsic pathway inhibitor) bezeichnete Protein enthält drei inhibitorische Domänen (Kunitz 1, 2, 3) sowie einen basischen Carboxyterminus (Abb. 3). Nach dem Gerinnungsstart mit Bildung des TF/VIIa-Komplexes inaktiviert TFPI mit seiner Kunitz-Domäne 2 den neu entstandenen Faktor Xa. Anschließend bindet die Kunitz-Domäne 1 an den TF/VIIa-Komplex und es kommt zur Bildung eines quarternären, inhibitorischen Xa-TFPI-VIIa-TF Komplexes (Broze, 1990; Girard, 1989). Die Kunitz-Domäne 3 besitzt keine inhibitorische Funktion (Petersen, 1996) jedoch Bindungsstellen für Phospholipide (Valentin, 1993) und Heparin (Mine, 2002). Der Carboxyterminus scheint eine wichtige Rolle bei der Inhibierung des Faktors Xa (Wesselschmidt, 1992) sowie bei der Bindung an Zelloberflächen zu spielen (Bajaj, 2001).

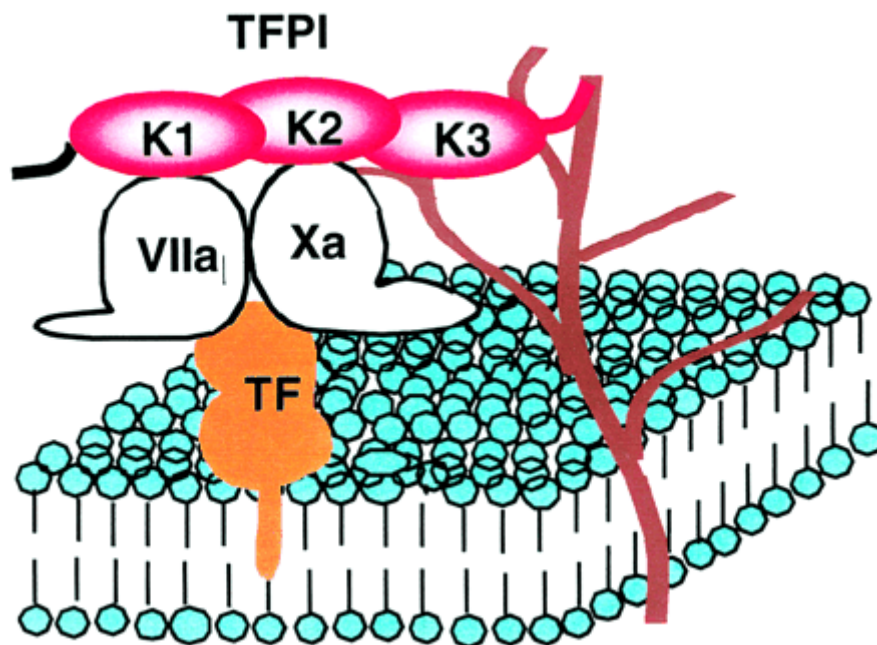


Abb. 3: Bildung des inhibitorischen Xa-TFPI-VIIa-TF Komplexes. TFPI bindet Faktor VIIa und Xa über die Kunitz-Domänen 1 und 2 sowie Proteoglykane der Zellmembran über die Kunitz-Domäne 3 und den Carboxyterminus (Kato, 2002).

In vaskulärem Gewebe und im Blut existieren verschiedene Pools von TFPI, die sich in ihrer Struktur und in ihrer inhibitorischen Aktivität unterscheiden (Broze, 1994). Der Hauptanteil von TFPI findet sich auf Endothelzellen, die wie Monozyten in der Lage sind, TFPI de novo zu synthetisieren (van der Logt, 1994). Darüber hinaus wird TFPI nach Aktivierung von Plättchen freigesetzt (Novotny, 1988) und zirkuliert im Plasma, vorrangig an Lipoproteine (LDL>HDL>VLDL) gebunden (Broze, 1987; Sanders, 1985). Nur ein Teil des im Plasma zirkulierenden TFPIs besitzt die vollständige Molekülgröße und damit die uneingeschränkte antikoagulatorische Wirkung. Die überwiegende Menge des Plasma-assoziierten TFPIs besteht aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Spaltprodukten mit nur schwacher oder fehlender inhibitorischer Aktivität (Broze, 1994; Novotny, 1989). Dagegen weist der nach Stimulation mit Agonisten wie Thrombin oder Kollagen von Plättchen freigesetzte TFPI die vollständige Molekülgröße und inhibitorische Wirksamkeit auf (Novotny, 1988).

1.6 Neutrophile Sekretionsprodukte und TFPI

Neutrophile Granulozyten setzen nach Aktivierung durch chemotaktische Faktoren z.B. im Rahmen von Entzündungen, Wundheilungsprozessen und Infektionen eine Vielzahl von Proteasen frei. Hierzu gehören die Serinproteasen Elastase und Cathepsin G sowie die Matrixmetalloproteasen (MMPs). MMPs gehören zu einer Familie von Zink-Endopeptidasen, die bisher hauptsächlich mit dem Ab- und Umbau von extrazellulärer Matrix in Verbindung gebracht wurden (Nagase, 1999). In vitro Studien aus jüngerer Zeit haben gezeigt, daß Matrixmetalloproteasen auch TFPI spalten können, wobei die Spaltung mit einem Verlust der antikoagulatorischen Funktion von TFPI einhergeht (Belaouaj, 2000; Cunningham, 2002). Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen MMPs und ihren entsprechenden endogenen Inhibitoren (TIMPs = Tissue Inhibitors of Metalloproteinases). Wird dieses Gleichgewicht durch eine verstärkte Freisetzung und Aktivierung von MMPs gestört, kommt es zum gesteigerten Abbau von extrazellulärer Matrix. Daraus können schwere Erkrankungen wie Tumorleiden (Khokha, 1989), Arthritis (Dean, 1989) oder Artherosklerose (Henney, 1991) resultieren.

Neutrophile Elastase kann verschiedene, antikoagulatorisch wirksame Proteine wie Antithrombin III (Jordan, 1987), Heparin Cofaktor II (Sie, 1987) und alpha2-Antiplasmin (Brower, 1982) proteolytisch inhibieren. Die Aktivierung von Neutrophilen

schafft also ein Milieu mit hoher proteolytischer Aktivität, welche möglicherweise einen regulatorischen Effekt auf die lokale Hämostase hat. Wie die MMPs sind auch Elastase und Cathepsin G in der Lage, TFPI in vitro zu spalten (Higuchi, 1992; Petersen, 1992). Diese Beobachtungen beruhen jedoch hauptsächlich auf in vitro Studien unter Verwendung von rekombinantem TFPI. Die Rolle der Proteasen für die proteolytische Spaltung von TFPI in vivo bzw. im zellulären Modell bedarf weiterer Untersuchungen.

Neben den Proteasen (s.o.) sezernieren aktivierte Neutrophile Sauerstoffradikale (ROS = reactive oxygen species), als deren Hauptaufgabe die Bekämpfung mikrobieller Erreger gilt. ROS werden mittels des membranständigen NADPH-Oxidase Systems der Neutrophilen aus molekularem Sauerstoff durch sequentielle, monovalente Reduktionen gebildet (Hampton, 1998). Hierbei entstehen Superoxidradikale (O_2^-), Hydrogenperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale (OH), die in unterschiedlicher Konzentration ins Plasma abgegeben werden. Enzyme wie Superoxiddismutase (SOD) oder Katalase katalysieren die Umwandlung von ROS in weniger reaktive Moleküle. Im Laufe der Zeit konnte gezeigt werden, daß ROS zusätzlich zur Keimabwehr noch weitere Funktionen im Organismus übernehmen. So sind ROS in der Lage, als second messenger die Aktivierung von Transskriptionsfaktoren verschiedenster Proteine zu regulieren. Zudem ist bekannt, daß Sauerstoffradikale Thrombozyten aktivieren können (Iuliano, 1994) und Erkrankungen des Gerinnungssystems wie Artherosklerose und Thrombosen mit einer vermehrten Bildung von ROS assoziiert sind (Ruef, 1999). Da eine Beteiligung neutrophiler Sekretionsprodukte bei der Inhibierung von TFPI zumindest in vitro schon mehrfach gezeigt werden konnte (s.o.), muß noch geklärt werden, ob auch ROS an diesem Mechanismus beteiligt sind.

1.7 Plättchen-Leukozyten-Interaktion

Thrombembolische Ereignisse, wie Herzinfarkt und Schlaganfall, gehen mit einer vermehrten Zahl von Plättchen-Neutrophilen-Aggregaten in der Blutzirkulation einher (Bazzoni, 1991; Cerletti, 1992). Eine Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und Plättchen tritt jedoch auch im physiologischen Blutkreislauf ohne eine vorangegangene Zellaktivierung auf (Rinder, 1991). Die Anheftung von Thrombozyten an neutrophile Granulozyten verläuft in einer sogenannten "Adhäsionskaskade". Sie beginnt mit der Bindung von thrombozytärem P-Selektin an P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) der Neutrophilen (Evangelista, 1996; Yang, 1999). P-Selektin ist ein α -Granula-Membranglykoprotein, das auf der Oberfläche von Plättchen nach Aktivierung durch verschiedene Agonisten wie Kollagen oder Thrombin exprimiert wird. PSGL-1 ist ein Glykoprotein-Dimer, das konstitutiv auf Leukozytenoberflächen vorhanden ist (McEver, 1997). Durch Interaktionen zwischen P-Selektin und PSGL-1 kommt es zur Aktivierung des leukozytären β 2-Integrins Mac-1 (CD 11b/CD18), welches die Zellverbindung zusätzlich stabilisiert (Evangelista, 1996). Die Identifizierung der Bindungspartner für Mac-1 auf aktivierten Plättchen ist Gegenstand derzeitiger Forschung. Es wird vermutet, daß Mac-1 über Fibrinogenbrücken an den α IIb β 3 Integrin-Komplex (Weber, 1997) sowie direkt an Glykoprotein Ib α (Simon, 2000) und das Junctional Adhesion Molecule 3 (JAM-3) (Santoso, 2002) binden kann.

Die P-Selektin-PSGL-1-Interaktion kann durch sogenannten "shear stress" oder chemotaktische Aktivierung ausgelöst werden. Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, daß eine Blockierung von P-Selektin in vivo nicht nur zu einer verminderten Anheftung von Leukozyten an Plättchen, sondern darüber hinaus zu einer Senkung der Fibrinbildung führt (Palabrica, 1992). Die Beobachtung von Tissue Factor auf Plättchen-Leukozyten-Komplexen nach Kollagenstimulation in vitro läßt eine Beteiligung von Adhäsionsrezeptoren bei der Tissue Factor-Präsentation vermuten (Zillmann, 2001). Inwieweit die Zelladhäsion zwischen Neutrophilen und Plättchen die Aktivität des intravaskulären TFs beeinflusst, muß noch geklärt werden.

1.8 Struktur, Funktion und Inhibierung von ADP-Rezeptoren

Die Thrombozytenaktivierung umfasst eine Formänderung der Zellen (shape change), die Sekretion von Thrombozytenagonisten sowie die Aggregation. Durch primäre Plättchenagonisten wie Kollagen wird eine Vielzahl von sekundären Plättchenagonisten aktiviert, wie z.B. der Arachidonsäuremetabolit Thromboxan A₂. Auch werden Proteine aus den alpha-Granula wie z.B. P-Selektin sowie Ca⁺⁺ und ADP aus dichten Granula freigesetzt (Siess, 1989). ADP gilt als einer der potentesten Thrombozytenagonisten, der die eigene Sekretion über einen positiven Rückkopplungsmechanismus fördert. Nach seiner Freisetzung in den Extrazellularraum bindet ADP an spezifische Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche. Zum jetzigen Zeitpunkt sind drei Typen von ADP-Rezeptoren bekannt (Daniel, 1998; Abb.4). P2Y1 ist über Mitglieder der Gq-Familie der G-Proteine mit der Plättchenaktivierung gekoppelt (Jantzen, 1999). Dieser Rezeptor wird für die Zunahme der Calciumionenkonzentration innerhalb von Plättchen verantwortlich gemacht, welche für den sogenannten shape change und die Plättchenaggregation notwendig ist (Jin, 1998). Einen weiteren ADP-Rezeptor stellt der Kalziumkanal P2X1 dar, dessen Beteiligung bei der Aktivierung von Plättchen allerdings umstritten ist. Der dritte ADP-Rezeptor P2Y12 ist an die Gi-Familie der G-Proteine gekoppelt (Hollopeter, 2001; Jantzen, 1999). Gi-Proteine sind für die Hemmung der cAMP-Bildung durch Adenylatzyklase verantwortlich. Erhöhte cAMP-Spiegel senken die Empfindlichkeit von Plättchen gegenüber Agonisten wie ADP selbst. Schon bevor dieser Rezeptor identifiziert wurde, wurden Medikamente entwickelt, welche die ADP-vermittelte Senkung des cAMP-Spiegels hemmen und so die Plättchenaktivierung blockieren (Gachet, 1990; Mills, 1992). Die wichtigsten zwei Vertreter dieser Art von Thrombozytenaggregationshemmern sind die Thienopyridine Clopidogrel und Ticlopidin. Die Gabe von Clopidogrel als Sekundärprophylaxe für Patienten, die ein thromboembolisches Ereignis wie einen Schlaganfall oder einen Herzinfarkt erlitten haben, ist mittlerweile Teil der Standardtherapie. Die unerwartete Beobachtung, daß Tissue Factor unter physiologischen Bedingungen in den alpha-Granula von Plättchen gespeichert wird, deren Inhalt im Rahmen der Plättchenaktivierung freigesetzt wird, macht ADP-Rezeptoren zu einem möglichen Angriffspunkt bei der Tissue Factor Aktivierung.

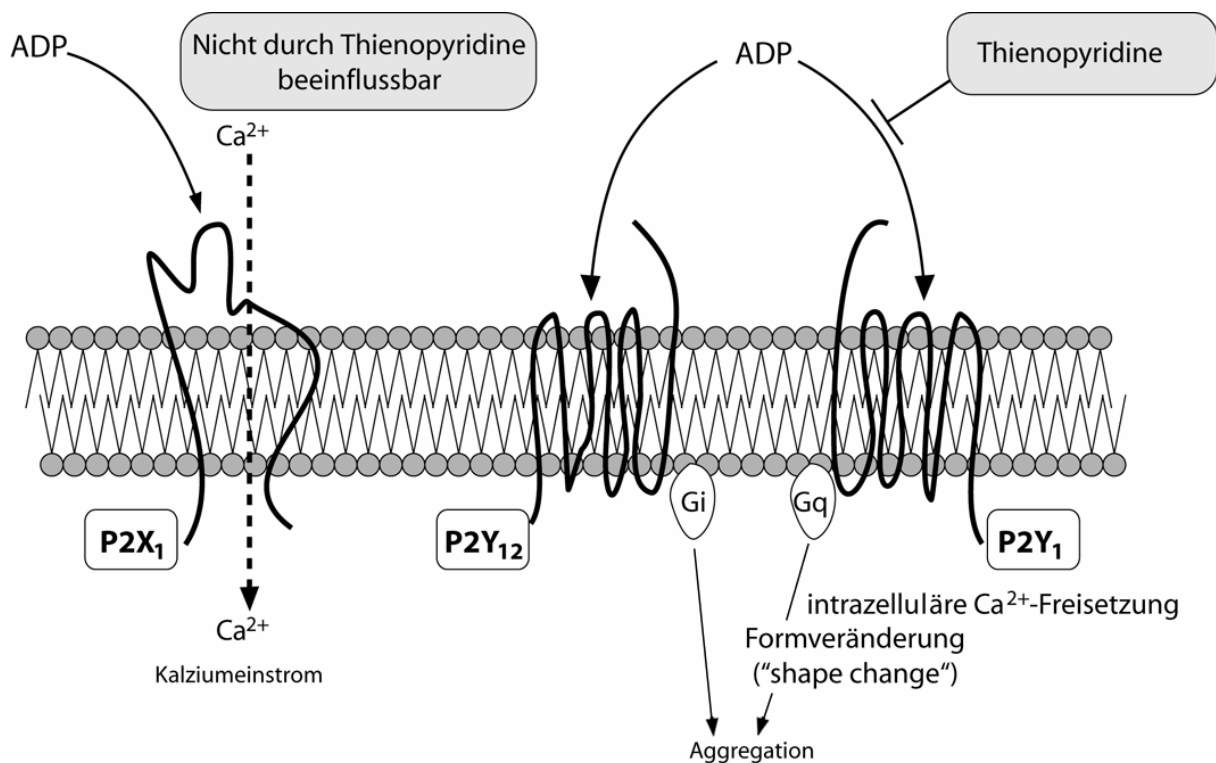


Abb. 4: Schematische Darstellung der ADP-Rezeptoren (Hollopeter, 2001)

1.9 Zielsetzung

Im Rahmen unserer Untersuchungen sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Welche Rolle spielen Interaktionen von Blutzellen untereinander und mit Mikrovesikeln bei der Aktivierung des intravaskulären Tissue Factor?
2. Sind neutrophile Sekretionsprodukte wie z.B. Sauerstoffradikale an der Aktivierung beteiligt?
3. Kann eine rezeptorvermittelte Zelladhäsion zwischen Neutrophilen und Plättchen diese Aktivierung fördern?
4. Wird die Aktivität des intravaskulären TF durch die Blockade von thrombozytären ADP-Rezeptoren beeinflusst?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

BSA Fraktion V	Serva (Heidelberg)
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
EDTA (freie Säure)	Roth (Karlsruhe)
Ficoll Paque	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Glucose	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

2.1.2 Geräte und Materialien

Geräte:

ELISA Reader Dynatech MR 7000	Dynatech Laboratories (Alexandria, USA)
Axiovert 100 Mikroskop	Carl Zeiss (Oberkochen)
Coulter Counter	Becton Dickinson (Heidelberg)
FacsScan Flow Cytometer	Becton Dickinson (Heidelberg)
Mini Macs Zellseparator	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
PFA-100 Platelet Function Analyzer	DADE Diagnostika (München)
Photometer UV 1202	Shimadzu (Duisburg)
Rotina 35 R	Hettich (Tuttlingen)
Thrombelastograph RoTEG	Pentapharm (München)
Tischzentrifuge Mikro 22 R	Hettich (Tuttlingen)
Ultrazentrifuge L8 60 M	Beckmann (München)

Materialien:

Einmalküvetten roTEG
 Falcon blue max jr. Röhrchen
 Kollagen/Epinephrin PFA-Messzellen
 Kollagen/ADP PFA-Messzellen
 Venofix Punktionsbesteck

Pentapharm München
 Falcon, Greiner Labortechnik
 DADE Diagnostika (München)
 DADE Diagnostika (München)
 Braun (Melsungen)

Zellisolation:

Microbeads Säulen MS 25+
 Nalgene Ultra Plus (3430-1610)

Miltenyi Biotech (Bergisch
 Gladbach)
 Beckmann (München)

2.1.3 Antikörper, Gerinnungsfaktoren, Inhibitoren, Oxidoreduktasen und Proteasen

Antikörper:

Maus-anti-Human Tissue Factor VI C7
 Maus-anti-Human CD 62 P
 Maus-anti-Human CD 18
 Maus-anti-Human CD 162

PD Dr. Thomas Luther (Institut
 für Pathologie TU Dresden)
 Ancell (Lausen, Schweiz)
 Calbiochem (Schwalbach)
 Calbiochem (Schwalbach)

Zellisolation:

Microbeads CD 14 Antikörper
 Microbeads CD 15 Antikörper

Miltenyi Biotech (Bergisch
 Gladbach)
 Miltenyi Biotech (Bergisch
 Gladbach)

Gerinnungsfaktoren:

Beriplex PN 500

Dade Behring (Marburg)

Inhibitoren:

AR-C69931MX	Dr. Christian Gachet (INSERM, Strasbourg, Frankreich)
Corn Trypsin Inhibitor (CTI)	Haemochrom Diagnostica (Essen)
Methoxy-o-succinyl-Ala-Ala-Pro-Val- Chloromethylketon (CMK) MRS-2179	Sigma-Aldrich (Deisenhofen) Dr. Christian Gachet (INSERM, Strasbourg, Frankreich)
Phenantrolin	Calbiochem (Schwalbach)
TIMP 1	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
TIMP 2	Calbiochem (Schwalbach)

Oxidoreduktasen:

Superoxiddismutase (SOD)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Katalase	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Proteasen:

Apyrase Grade VII, Kartoffel	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
------------------------------	-----------------------------

2.1.4 Standards, Stimulantien und Substrate***Standards:***

Thromborel	Dade Behring (Marburg)
------------	------------------------

Stimulantien:

Adenosin 5'-Diphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
N-Formyl-Methionin-Leucin- Phenylalanin (fMLP)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Kollagenreagens Horm	Nycomed (Ismaning)
Lipopolysaccharid (LPS) E. Coli	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Substrate:

S 2222	Haemochrom Diagnostica (Essen)
--------	-----------------------------------

2.1.5 Antikoagulantien, Lösungen und Puffer

Antikoagulantien:

Natriumcitrat:

Tri-Natriumcitrat 3,68 g

In 100 ml destilliertem Wasser lösen.

Puffer:

PBS (Phosphate-buffered saline):

NaCl 8,0 g

KH₂PO₄ 0,2 g

Na₂HPO₄ 2H₂O 1,4 g

KCl 0,2 g

In 1000ml destilliertem Wasser lösen, pH 7,4 mit Salzsäure einstellen.

Resuspensionspuffer:

NaCl 4,03 g

KCl 0,10 g

NaHCO₃ 0,50 g

NaH₂PO₄ 0,03 g

MgCl₂ 6H₂O 0,10 g

D-Glucose 0,45 g

HEPES 0,60 g

In 500 ml destilliertem Wasser lösen, pH 7,35 mit Salzsäure einstellen.

Thrombelastographie:

ADP-Lösung (500 µM):

ADP 2,136 mg

In 10 ml destilliertem Wasser lösen.

CaCl₂/HEPES Puffer:

10 mM HEPES 23,83 mg

100 mM CaCl₂ 147,0 mg

In 10 ml destilliertem Wasser lösen.

CTI-Lösung (5 µg/µl):

CTI 1 mg

In 200 µl destilliertem Wasser lösen, zu 20µl aliquotieren und bei - 80° C einfrieren.

Faktor-Xa-Bildung:**Beriplex (25 I.E./ml):**

Beriplex 340 I.E. (1 Vial)

Vial in 13,6 ml destilliertem Wasser lösen, zu 500 µl aliquotieren und bei -20° C einfrieren. Die Endkonzentration des Faktors VII beträgt dann 25 I.E./ml.

CaCl₂-Lösung (8 mM):

CaCl₂ 9mg

In 2 ml destilliertem Wasser lösen.

S2222 (2 mg/ml):

S2222 25 mg

In 12,5 ml destilliertem Wasser auflösen, zu 500 µl aliquotieren und bei 4° C lagern.

Thromborel (100 U/ml):

Thromborel 200 U (1 Vial)

Vial in 2 ml destilliertem Wasser lösen, zu 100 µl aliquotieren und bei -20° C einfrieren.

Zellisolation:**Antikörper-Puffer:**

EDTA (freie Säure) 0,15 g

BSA 0,50 g

In 100 ml PBS lösen, pH 7,4 mit Salzsäure einstellen. Vor Gebrauch mit Hilfe des Ultraschallstabes entgasen.

Apyrase-Lösung (0,1 U/μl):

Apyrase 100 U (1 Vial)

In 1 ml Resuspensionspuffer lösen.

Monozytenwaschpuffer:

BSA 1,5 g

Na₂EDTA 1,4 g

In 1000 ml PBS lösen, pH 7,4.

2.2 METHODEN

2.2.1 Zellisolierungen

2.2.1.1 Blutabnahme

Venöses Blut wurde durch Punktion der Vena cubiti media bei gesunden Spendern im Alter von 20–35 Jahren gewonnen. Hierbei wurde berücksichtigt, daß die Spender in den letzten 14 Tagen vor der Blutabnahme keine gerinnungsbeeinflussenden Medikamente eingenommen hatten. Das Blut wurde mit 3,18%iger Tri-Natriumcitrat Lösung antikoaguliert (1 ml Citrat/10 ml Blut) und direkt nach der Abnahme bei 170 g für 15 Min. zentrifugiert. Durch die Zentrifugation setzen sich die Erythrozyten unten im Reagenzglas ab. Darüber sammelt sich der sogenannte „buffy coat“, eine mit Leukozyten angereicherte Zwischenschicht, während sich in der obersten Schicht plättchenreiches Plasma (PRP) befindet. Die einzelnen Schichten wurden vorsichtig nacheinander abpipettiert und getrennt weiterbehandelt.

2.2.1.2 Isolierung neutrophiler Granulozyten

Für die Isolierung neutrophiler Granulozyten wurde ein Magnet-gekoppelter Antikörper benutzt, der gegen den für Neutrophile spezifischen Rezeptor CD15 gerichtet ist. Mit Hilfe von Trennsäulen, die Metallspäne enthalten und in ein Magnetfeld gebracht werden, können mit Antikörper bestückte Zellen von den übrigen Zellen einer Suspension separiert werden. Um eine konzentrierte Leukozytensuspension zu erhalten, wurde der buffy coat (2.2.1.1) erneut bei 170 g für 10 Min. zentrifugiert. Die entstandene leukozytenreiche Schicht wurde abgezogen und mit anti-CD15 Microbeads bei 4°C für 15 Min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit entgastem Antikörperpuffer 2-fach verdünnt und auf die im Magnetfeld befindlichen Säulen gegeben. Durch die magnetische Anziehung der mit Antikörper beladenen Zellen an die Säule, kam es zur Bindung der neutrophilen Granulozyten an die Säule. Durch viermaliges Spülen mit jeweils 500µl Antikörperpuffer wurden die anderen Blutzellen aus der Säule entfernt. Nach dem Spülen wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen, mit 2 ml Antikörperpuffer gefüllt und die neutrophilen Granulozyten mit einem Stempel aus der Säule eluiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde in Falconröhrchen mit

Resuspensionspuffer auf 8 ml aufgefüllt und bei 170 g für 10 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 200 µl Resuspensionspuffer gelöst.

Um die Menge und Viabilität der Zellen zu bestimmen, wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Hierzu wurde eine 10 µl Probe aus der Neutrophilensuspension entnommen, mit 90 µl Resuspensionspuffer verdünnt und mit 100 µl Trypanblau angefärbt. Nach gründlichem Mischen wurde die Probe auf die Zählkammer aufgetragen und die Zellen unter dem Lichtmikroskop nach morphologischen Eigenschaften beurteilt und gezählt (2.2.1.4). Die Reinheit der Neutrophilen-Präparation lag durchschnittlich bei 95%.

2.2.1.3 Isolierung von Monozyten

Ähnlich wie neutrophile Granulozyten wurden Monozyten mit Hilfe eines Magnetgekoppelten Antikörpers isoliert, der in diesem Fall gegen den Monozytenspezifischen Oberflächenrezeptor CD14 gerichtet war. Die Separation der Monozyten erfolgte auch hier über Trennsäulen, die sich in einem Magnetfeld befanden. Je 10 ml des leukozytenreichen buffy coats wurden mit 10 ml PBS verdünnt, in ein 50 ml Falconröhrchen gegeben und mit 13 ml Ficoll ($d = 1,007$) unterschichtet. Das Ficoll dient dabei zum Aufbau eines Dichtegradienten. Nach einer Zentrifugation bei 260 g für 20 Min. (ohne Bremse) setzen sich Erythrozyten und Granulozyten unter dem Ficoll ab, während sich das Plasma oberhalb der Ficollschicht befindet. Zwischen Plasma und Ficoll bildet sich zusätzlich die sogenannte Interphaseschicht, in welcher Monozyten und Lymphozyten angereichert sind.

Nach Verwerfen des Plasmas wurde die monozytenreiche Interphaseschicht vorsichtig abgezogen und in 50 ml Falconröhrchen abgeführt. Um die Zellen zu waschen wurde die Suspension mit Monozytenwaschpuffer auf 40 ml aufgefüllt und bei 100 g für 10 Min. zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 400 µl entgastem Antikörperpuffer aufgenommen und mit anti-CD14 Microbeads für 15 Min. bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Verdünnen mit Antikörperpuffer auf 2 ml wurde die Suspension auf die im Magnetfeld befindliche Säule aufgetragen. Die mit Antikörper beladenen Monozyten konnten sich an die Metallspäne anheften, während die anderen Zellen durch viermaliges Spülen der Säule mit je 500 µl Antikörperpuffer entfernt wurden. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen, mit 2 ml Antikörperpuffer aufgefüllt und die Monozyten mit einem Stempel aus der Säule

eluiert. Die Monozytensuspension wurde in einem 10 ml Falconröhrchen gesammelt, mit Resuspensionspuffer auf 8 ml aufgefüllt und bei 170 g für 10 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer gelöst und die Zellzahl und Viabilität mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurde eine 15 µl Probe aus der Monozytensuspension entnommen und mit 15 µl Trypanblau angefärbt. Nach gründlichem Mischen wurde die Probe auf die Zählkammer aufgetragen und die Zellen unter dem Lichtmikroskop nach morphologischen Eigenschaften beurteilt und gezählt (2.2.1.4). Die Reinheit der Monozyten-Präparation lag hier durchschnittlich bei 90%.

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Die mit Trypanblau gemischten Proben aus den Leukozytensuspensionen (2.2.1.2, 2.2.1.3) wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Deckgläschen der Zählkammer sammelt sich ein definiertes Volumen (2 Kammern à 10 µl) der Zellsuspension an. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden jeweils 4 der 16 Quadranten in zwei Kammern ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Dieser wurde mit dem Verdünnungsfaktor und dem meßspezifischen Faktor 80 multipliziert. Geschädigte Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau ins Zellinnere auf und erscheinen blau. So konnte zwischen lebenden Zellen und Detritus differenziert werden.

2.2.1.5 Isolierung von Thrombozyten

Thrombozyten (Blutplättchen) wurden aus plättchenreichem Plasma (PRP) isoliert. Um eine Voraktivierung der Plättchen durch die Präparation zu verhindern, wurde dem PRP Apyrase zugegeben (0,2 U/ml PRP). Apyrase ist eine Adenosindiphosphatase, die ADP in AMP und freies Phosphat spaltet.

Für die Isolierung der Plättchen wurden je 2 ml PRP bei 170 g für 10 Min. zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in je 1 ml Resuspensionspuffer gelöst. Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Coulter Counters bestimmt. Um Verunreinigungen durch Leukozyten auszuschließen, wurde eine Probe der Plättchensuspension im Lichtmikroskop überprüft. Die Reinheit lag durchschnittlich bei 99%.

2.2.1.6 Isolierung zirkulierender Mikrovesikel

Zirkulierende Mikrovesikel wurden aus plättchenarmem Plasma isoliert. Für die Herstellung von PAP wurde plättchenreiches Plasma bei 1050 g für 20 Min. zentrifugiert. Um die Thrombozyten vollständig aus dem Plasma zu entfernen, wurde eine zweite Zentrifugation bei 1050 g für 20 Min. angeschlossen. Anschließend wurden je 6 ml des Überstands in Ultrazentrifugenröhrchen (Nalgene Ultra Plus) abgefüllt und bei 160.000 g für 4 h bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Das entstandene Mikrovesikelpellet wurde in je 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Mittels elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde verifiziert, daß es sich bei den durch die Präparation isolierten Partikeln um Mikrovesikel und nicht um Zellbruchstücke von Blutzellen handelt. Um die Reinheit der einzelnen Präparationen zu gewährleisten, wurden die Mikrovesikelsuspensionen im Durchflußzytometer untersucht. Dabei wurden Größe und Granularität der Mikrovesikel überprüft und ihre Zahl bestimmt (2.2.2).

Der durch die Ultrazentrifugation entstandene Überstand entspricht plättchenarmem Plasma ohne Mikrovesikel und wurde zur Herstellung von mikrovesikelfreiem plättchenreichem Plasma eingesetzt (2.2.3.1).

2.2.1.7 Herstellung von Mikrovesikeln in vitro

Sowohl Thrombozyten als auch neutrophile Granulozyten und Monozyten sind in der Lage, Mikrovesikel von ihrer Zellmembran abzuschneiden. Um die einzelnen Mikrovesikelfractionen isoliert auf ihre Wirkung untersuchen zu können, stellten wir Mikrovesikel in vitro her. Die Abschnürung der Mikrovesikel wurde durch Inkubation der isolierten Zellen mit einem entsprechenden Aktivator bewirkt. Isolierte Thrombozyten (2.2.1.5) wurden mit Thrombin (0,5 U/ml) und Kollagen (8 µg/ml) für 2 h stimuliert. Monozyten wurden mit Lipopolysaccharid (LPS 10 µg/ml) für 12 h und Neutrophile mit dem Neutrophilenstimulus fMLP (100 µM) für 2 h stimuliert. Die Temperatur während der Inkubation mit den verschiedenen Aktivatoren betrug 37°C. Zur Abtrennung der Mikrovesikel von den Mutterzellen wurden die Zellsuspensionen bei 2.240 g für 15 Min. zentrifugiert. Der die Mikrovesikel enthaltende Überstand wurde abgenommen, mit Resuspensionspuffer auf 5,5 ml verdünnt und in Ultrazentrifugenröhrchen (Nalgene Ultra Plus) abgefüllt. Durch die Zentrifugation bei 160.000 g für 90 Min. in der Ultrazentrifuge entstand ein gewaschenes

Mikrovesikelpellet. Dieses wurde in 200 µl Resuspensionspuffer gelöst. Um die Reinheit der einzelnen Präparationen zu gewährleisten, wurden auch diese Mikrovesikelsuspensionen im Durchflußzytometer untersucht. Dabei wurden wiederum Größe und Granularität der Mikrovesikel überprüft und ihre Zahl bestimmt (2.2.2). Größe und Granularität waren dabei mit den aus dem Vollblut isolierten Mikropartikeln vergleichbar (2.2.1.6).

2.2.2 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie wird unter anderem zur Identifizierung von Zellen und Mikrovesikeln eingesetzt. Hierfür werden im Durchflußzytometer Größe und Granularität der Zellen bzw. Mikrovesikel bestimmt. Nach dem Einsaugen der Probe fällt ein Laserstrahl auf die Zellen, der je nach Größe der Zellen eine mehr oder weniger starke Ablenkung erfährt. Abhängig von der Granularität der Zellen, kann der Laserstrahl die Zellen dabei mehr oder weniger gut durchdringen. Diese beiden Informationen werden in einem zweidimensionalen Bild verarbeitet, in dem die Zellen als Punktwolken nach Granularität (sideward) und Größe (forward) angeordnet sind (Abb. 5). Jeder Zelltyp nimmt eine charakteristische Position in diesem sogenannten Forward-Sideward Scatter Dotplot ein. So konnten die Mikrovesikelpräparationen auf ihre Reinheit überprüft werden.

Zur Bestimmung der Mikrovesikelkonzentration einer Suspension wurde eine 20 µl Probe entnommen und mit 480 µl Resuspensionspuffer verdünnt. Es wurden jeweils 10.000 Mikrovesikel gezählt und aus dem dafür eingezogenen Volumen die Anzahl pro Mikroliter errechnet.

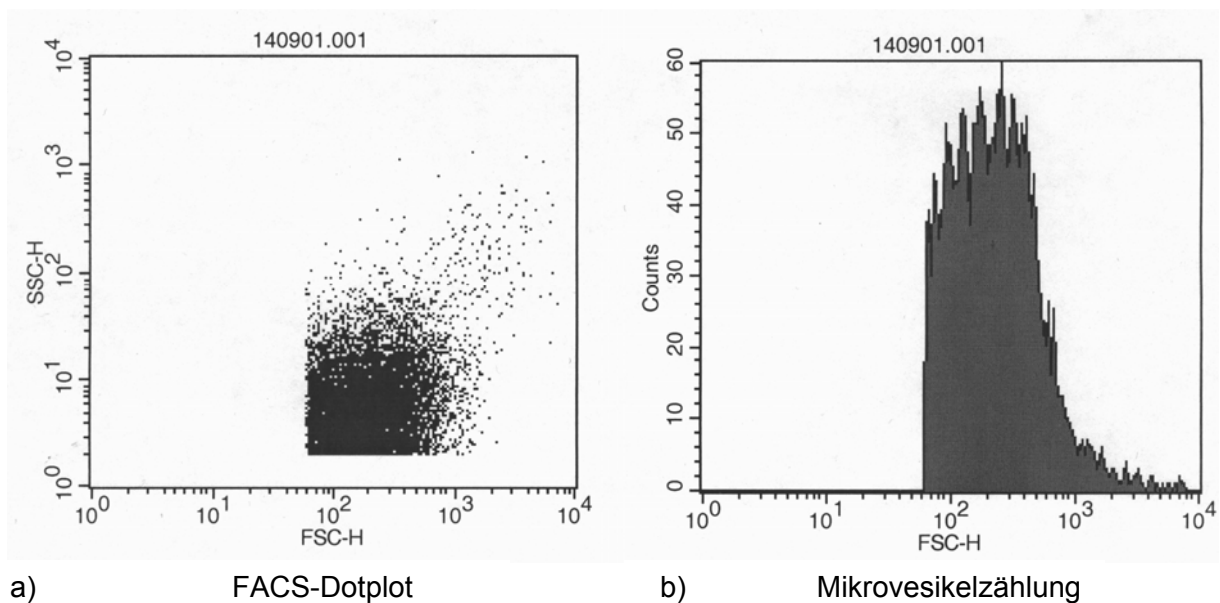


Abb. 5: a) Größe (FSC = forwardscatter) und Granularität (SSC = sidewardscatter) sowie b) die Zahl der in vitro hergestellten Mikrovesikel wurden mit Hilfe der Flowcytometrie überprüft. Repräsentatives Ergebnis einer Untersuchung von in vitro hergestellten Plättchenmikrovesikeln.

2.2.3 Thrombelastographie

Die Thrombelastographie ist eine Meßmethode zur Bestimmung der Fibrinbildungsrate in Vollblut und Plasma, unter Bedingungen, die der in vivo Situation sehr nahe kommen. Sie liefert u.a. Informationen zur Interaktion der Blutzellen mit den löslichen Gerinnungsfaktoren.

Der Thrombelastograph besteht im Wesentlichen aus zwei Teilen: einer auf 37°C geheizten Küvette und einem Stempel, dem sogenannten Elastizitätssensor. Die Blut- oder Plasmaprobe wird in die Einmalplastikküvette pipettiert. Der Elastizitätssensor taucht in die Küvette ein und führt langsame Rotationsbewegungen aus (Abb. 6 a). Die Bewegung des Sensors wird mittels einer Lichtquelle und einem Spiegel optisch abgetastet und an ein Computersystem weitergeleitet. Dort wird die Bewegung in Echtzeit auf die TEG-Amplitude umgerechnet. Wird durch einen Stimulus die Bildung von Fibrinpolymeren ausgelöst, heften sich aktivierte Thrombozyten und Fibrin an Sensor und Küvette an, wodurch die Elastizität der Probe abnimmt. Durch den sich bildenden Thrombus wird die

Drehung des Sensors erschwert. Eine Abnahme der Rotationsbewegung wird durch eine Verbreiterung der Amplitude im Thrombelastogramm wiedergegeben (Abb 6 b).

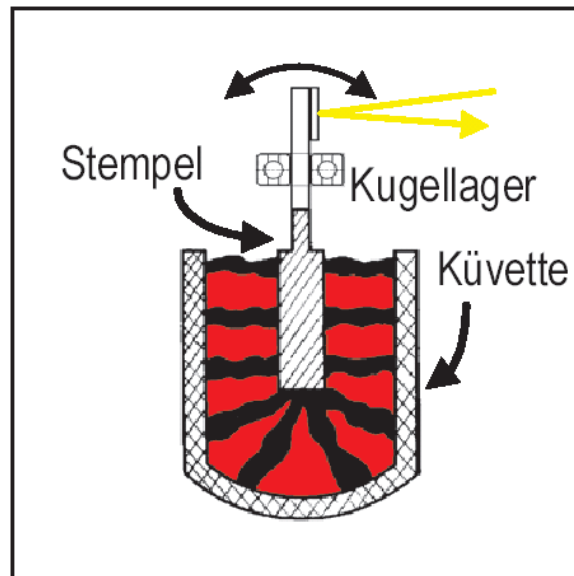


Abb. 6a: Schema des thrombelastographischen Messprinzips: Ein an einer kugellagerten Achse befestigter Stempel (Pfeil) wird in eine blutgefüllte Küvette (Pfeil) getaucht und führt eine langsame Rotationsbewegung aus. Die Rotationsbewegung wird mittels einer Lichtquelle (gelber Pfeil) und einem Spiegel erfasst (nach Calatzis, 1996).

Die Gerinnungszeit (coagulation time (CT); Reaktionszeit (r); Fibrinbildungszeit) bezeichnet dabei den Abschnitt zwischen dem Beginn der Messung und der Bildung der ersten Fibrinpolymere. Der CT-Wert liefert vor allem Informationen über die Thrombinbildung und die daran beteiligten plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Die Gerinnselformierungszeit (auch: Koagulationszeit (k); clot formation time; CFT) beginnt mit dem Ende der Fibrinbildungszeit und endet wenn die Amplitude insgesamt 20 mm umfasst. Der CFT-Wert erfasst die Dynamik der Gerinnselformierung und dabei besonders die Fibrinbildung und Polymerisation. Er hängt jedoch auch von der Thrombozytenfunktion und -zahl und von plasmatischen Gerinnungsfaktoren ab. An der höchsten Stelle der Amplitude ist die maximale Gerinnselfestigkeit (maximum clot firmness (MCF/MA)) erreicht. Sie wird in mm angegeben und hauptsächlich durch die Thrombozytenzahl und -funktion beeinflusst (Calatzis, 1996; Mallett, 1992).

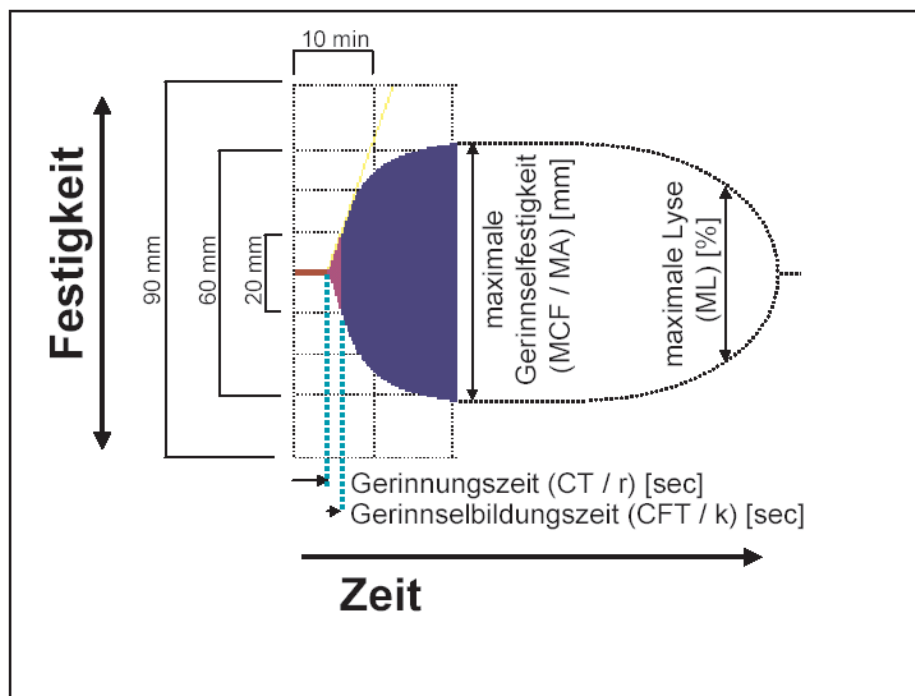


Abb. 6b: Graphische Darstellung der thrombelastographischen Messung: Gerinnungszeit (CT) = Beginn der Messung bis zur ersten Fibrinbildung / bis zur 2 mm-Amplitude; Gerinnselfestigkeitszeit = Ende der CT bis zur 20 mm-Amplitude; MA= maximale Thrombusfestigkeit (mm); ML= maximale Lyse (% der MA) (nach Vorweg, 1999)

Der Kontakt des Plasmas bzw. Vollbluts mit negativ geladenen Oberflächen führt durch die Aktivierung von Faktor XII über das intrinsische Gerinnungssystem zur Fibrinbildung. Um eine Aktivierung durch den Kontakt mit der künstlichen Oberfläche der Küvette zu verhindern, wurden die Blutproben bei der Blutentnahme mit Korntrypsininhibitor (CTI; 32µg/ml), einem spezifischen Inhibitor des Faktors XIIa (Hojima, 1980), versetzt.

Nach Inkubation mit den jeweiligen Aktivatoren bzw. Inhibitoren (2.2.3.1, 2.2.3.2, 2.2.3.3) wurde die Fibrinbildung durch Zugabe von jeweils 60 µl einer 100 mM CaCl_2 /10 mM Hepes Lösung gestartet und mit der Messung begonnen. Während der gesamten Versuchszeit (Inkubation, Stimulation und Messung) wurde die Temperatur der Proben konstant auf 37°C gehalten.

2.2.3.1 Aufbauversuche

Für die sogenannten Aufbauversuche (sequentielle Anreicherung verschiedener Blutkomponenten in Plasma) wurden jeweils 300 µl plättchenarmes Plasma (PAP, 2.2.1.6) oder plättchenreiches Plasma (PRP, 2.2.1.1) in die Küvette pipettiert. In Abhängigkeit von der Fragestellung wurde PRP mit oder ohne Mikrovesikel eingesetzt (s.u.). Alternativ wurden zu 280 µl PRP, entsprechend den Zellkonzentrationen im Vollblut, 4×10^6 Neutrophile (in 20 µl Resuspensionspuffer) zugegeben. Sämtliche Proben wurden für 1 Min. mit Adenosin 5'-Diphosphat (5 µM) und Kollagen (12 µg/ml) stimuliert.

Entnahme von Mikrovesikeln aus plättchenreichem Plasma (PRP)

Zur Herstellung von plättchenreichem Plasma ohne Mikrovesikel wurden 1,5 ml PRP bei 170 g für 10 Min. zentrifugiert (vgl. 2.2.1.5) und das entstehende Thrombozyten-Pellet in 1,5 ml PAP ohne Mikrovesikel (PAPoM) aufgenommen. PAPoM wurde im Rahmen der obengenannten Mikrovesikelisolationmethode gewonnen (2.2.1.6). Die Herstellung von PAPoM dauert bedingt durch die lange Ultrazentrifugationszeit ca. 6 h. Um die Thrombelastographiemessung nicht durch überalterte Thrombozyten zu verfälschen, wurde den jeweiligen Spendern kurz vor Ende der Ultrazentrifugation eine zweite Blutprobe zur Gewinnung des Thrombozytenpellets entnommen.

2.2.3.2 Proteaseinhibitoren

Um den Einfluß von Matrixmetalloproteasen bzw. Elastase auf die Fibrinbildung im Vollblut zu analysieren, wurden citrierte Vollblutproben (300µl) mit TIMP-1 (0,05 µg/ml), TIMP-2 (0,1 µg/ml) oder CMK (0,5 mM) für 15 Min. inkubiert. Vor dem Gerinnungsstart (2.2.3) wurden die Proben mit Adenosin 5'-Diphosphat (5 µM) und Kollagen (12 µg/ml) für 1 Min. stimuliert.

2.2.3.3 Sauerstoffradikalspaltende Enzyme

Um die Wirkung der Enzyme Superoxiddismutase und Katalase auf die Fibrinbildung zu messen, wurde Vollblut mit Kollagen oder LPS stimuliert. Nach 15-minütiger Inkubation von citriertem Vollblut (300 µl) mit dem jeweiligen Enzym (Katalase 500

U/ml; SOD 500 U/ml) wurde die Probe für 1 Min. mit Kollagen oder für 15 Min. mit LPS stimuliert. Den Kontrollproben wurde ein entsprechendes Volumen Resuspensionspuffer als Vehikel zugegeben.

2.2.4 Faktor-Xa-Bildung

Die Faktor-Xa-Bildung ist eine zentrale Methode zur Bestimmung der Tissue-Factor-Aktivität in Suspensionen isolierter Blutzellen. Faktor X wird durch den Tissue Factor/Faktor VIIa Komplex entweder direkt oder indirekt über eine Aktivierung des Faktors IX zu Faktor Xa gespalten (siehe Einleitung). Faktor Xa seinerseits spaltet das chromogene Substrat S2222. Das entstehende Spaltprodukt absorbiert Licht einer Wellenlänge von 405 nm und kann daher photometrisch bestimmt werden. Folglich nimmt die Absorption in Abhängigkeit von der Menge des neu gebildeten, funktionell aktiven Tissue Factors zu. Um die Meßbedingungen der in vivo Situation anzupassen, wurden die Zellen in einem Verhältnis entsprechend ihrer Konzentration im Vollblut eingesetzt. Dabei wurden 1×10^5 Monozyten, 1×10^6 Neutrophile, $1,5 \times 10^7$ Thrombozyten und 3×10^4 Mikrovesikel alleine oder in Kombination in einem Gesamtvolumen von 150 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Anschliessend wurde ein Gemisch aus Gerinnungsfaktoren (VII, X, IX, Protein C, Antithrombin; Beriplex) zugegeben. Somit wurden entsprechend der Situation im Vollblut auch die antikoagulatorisch wirkenden Systeme berücksichtigt.

Nach Inkubation mit Antikörpern oder inhibitorisch wirkenden Substanzen (2.2.4.1 - 2.2.4.4) wurden die Zellsuspensionen für 5 Min. mit 12 µg/ml Kollagen bei 37°C im Wasserbad stimuliert. Anschließend wurden die Proben in eine 96 Well Platte pipettiert. Um die Meßgenauigkeit durch eine Dreifachbestimmung zu erhöhen, wurde jeweils eine Probe auf 3 Wells (50 µl/Well) aufgeteilt und nach der Messung ein Mittelwert berechnet. Zur Umrechnung der optischen Dichte auf den Grad der Aktivität (Units/ml) wurde bei jeder Messung eine Standardkurve ermittelt. Hierzu wurde ein Teil der Wells anstelle von Zellsuspensionen mit rekombinantem humanem Tissue Factor definierter Aktivität befüllt. Dabei wurden sechs verschiedene Konzentrationen in aufsteigender Reihenfolge eingesetzt (0,05 mU/ml, 0,1 mU/ml, 0,2 mU/ml, 0,4 mU/ml, 0,8 mU/ml und 1,6 mU/ml). Direkt vor Beginn der Messung wurde jedem Well 50 µl einer Calciumchlorid-Lösung und 100 µl einer Lösung aus Resuspensionspuffer, Substrat S2222 und Beriplex (3,375 ml

Resuspensionspuffer, 400 µl S2222, 225 µl Beriplex) zugegeben. Anschließend wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers die Zunahme der optischen Dichte über einen Zeitraum von 30 Min. photometrisch bestimmt. Die Messung wurde bei Raumtemperatur vorgenommen.

2.2.4.1 Coating mit VIC7

Um die Zellspezifität des funktionell aktiven Tissue Factor zu bestimmen, wurden Zellen und Mikrovesikel selektiv mit dem Anti-Tissue-Factor- Antikörper VIC7 beschichtet. Hierzu wurden isolierte Neutrophile oder Plättchen mit 10 µg/ml VIC7 für 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit Resuspensionspuffer ca. 10-fach verdünnt und bei 170 g für 10 Min. gewaschen. Das entstandene Pellet wurde in Resuspensionspuffer aufgenommen, die Zellen gezählt und ihre Viabilität überprüft (2.2.1.4). Die gecoateten Zellen wurden in entsprechender Konzentration mit Plättchen oder Neutrophilen und Mikrovesikeln gemischt, mit Resuspensionspuffer auf ein Gesamtvolumen von 150 µl verdünnt und mit Kollagen stimuliert (2.2.4).

Der Effekt des Mikrovesikel-Coatings wurde sowohl an den aus dem Blut isolierten zirkulierenden Mikrovesikeln (2.2.1.6) als auch an in vitro hergestellten Plättchenmikrovesikeln (2.2.1.7) untersucht. Die Mikrovesikel wurden ebenfalls mit 10 µg/ml VIC7 für 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Da die Antikörperkonzentrationen durch Zugabe der Mikrovesikelsuspensionen zu dem Gesamtansatz um ca. 50 verdünnt wurden, entfiel ein aufwendiger Waschvorgang der Mikrovesikel. Statt dessen wurde der Kontrollprobe eine entsprechende Menge Antikörper zugegeben.

2.2.4.2 Inkubationsbedingungen der Proteaseinhibitoren

Suspensionen aus Plättchen, in vitro hergestellten Plättchenmikrovesikeln und Leukozyten (Neutrophile oder Monozyten) wurden für 10 Min. mit Chloromethylketon (CMK), TIMP-1 (0,05 µg/ml), TIMP-2 (0,1 µg/ml) oder 1,10-Phenanthrolin-Monohydrat (1 mM) bei 37°C im Wasserbad inkubiert (2.2.4). Dabei wurde CMK alleine (0,5 mM) oder in Kombination (0,25 mM) mit den obengenannten Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen eingesetzt.

2.2.4.3 Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle

Suspensionen aus Neutrophilen, Plättchen und in vitro hergestellten Plättchenmikrovesikeln (2.2.1.7) wurden mit Anti-CD18 Antikörper (20 µg/ml), Anti-CD162 Antikörper (10 µg/ml) oder Anti-CD62P Antikörper (10 µg/ml) bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend mit Kollagen stimuliert (2.2.4). Die Inkubationszeit betrug dabei 15 Min. (Anti-CD 18, Anti-CD 162) bzw. 30 Min. (Anti-CD 62P). Bei einer Kombination von Anti-CD18 Antikörpern und Anti-CD162 Antikörpern wurden jeweils 10 µg/ml eingesetzt.

2.2.4.4 ADP-Rezeptor-Antagonisten

Die ADP-Rezeptor-Antagonisten AR-C069931MX (0,5 µM) bzw. MRS-2179 (50 µM) wurden 1 Min. vor Beginn der Kollagenstimulation (2.2.4) zu Suspensionen aus isolierten Plättchen und Neutrophilen zugegeben. Auch hier betrug die Temperatur während der Inkubation 37°C.

2.2.5 Plättchenfunktionsanalyse

Der Platelet Function Analyzer (Abb. 7) stellt ein dynamisches in vitro Modell eines verletzten Gefäßes dar, mit welchem Thrombozytenfunktionsstörungen nachgewiesen werden können. Dazu wird eine citrierte Vollblutprobe (800 µl) in eine spezielle Patrone pipettiert, die ein Reservoir (6) und eine Kapillare (7) enthält. Eine motorbetriebene Spritze (1) baut mit Hilfe eines Drucktransducers (2) über der Patrone ein Vakuum auf. Durch den negativen Druck wird das Blut aus dem Reservoir in die Kapillare gesaugt. So werden mit der in vivo Situation vergleichbare Flußbedingungen geschaffen. Der Kapillare nachgeschaltet, befindet sich eine Membran mit zentraler Öffnung (5). Abhängig von der Patronenart ist diese Membran mit Kollagen und ADP oder Kollagen und Epinephrin beschichtet. Dieser Bereich simuliert eine Gefäßverletzung. Wie in vivo adhären und aggregieren die Plättchen an der Öffnung, bis sie vollständig verschlossen ist und der Blutfluß zum Stillstand kommt. Der Blutfluß durch die Öffnung wird über Sensoren eines Mikroprozessors (3) gemessen und das Ergebnis als Verschlußzeit in Sekunden dokumentiert.

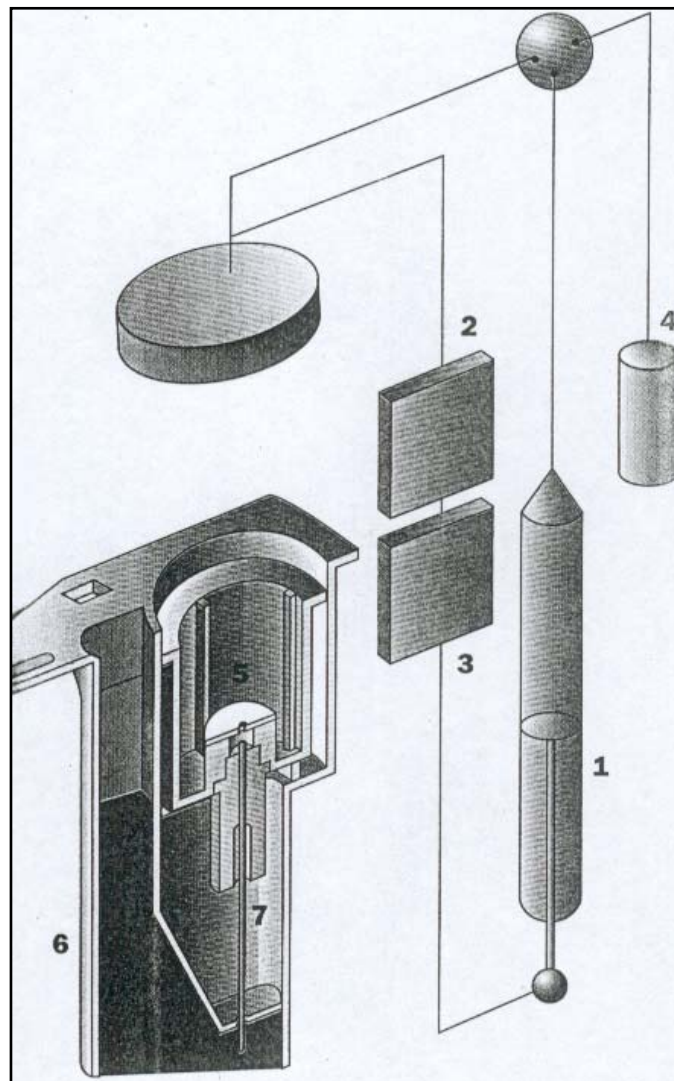


Abb 7: Mechanismus des Platelet Function Analyzer (1) Motorbetriebene Spritze, (2) Drucktransducer, (3) Mikroprozessor, (4) Startlösung zur Befeuchtung der Membran, (5) Membran mit zentraler Öffnung, (6) Reservoir, (7) Kapillare, (Bedienungsanleitung für PFA 100).

2.2.6 Pharmakologische Studie

Die pharmakologische Studie zur Erforschung des Effekts von Acetylsalicylsäure und Clopidogrel auf die Tissue Factor Aktivierung wurde als ex vivo Untersuchung durchgeführt. Hierfür wurden acht Probanden im Alter von 23 – 29 Jahren ausgewählt, bei denen in einer ärztlichen Untersuchung Vorerkrankungen, speziell auch im Hinblick auf das hämostatische System, ausgeschlossen wurden. Die Studie

wurde in drei Abschnitte unterteilt (Tab. 1). In der ersten Phase nahmen die Probanden für vier Tage Clopidogrel (300 mg als Aufsättigungsdosis am ersten Tag und je 75 mg an den Folgetagen) ein. Daraufhin folgte eine 3-wöchige Einnahmepause, um eine weitgehende Elimination des Arzneistoffes aus dem Körper zu gewährleisten. In der zweiten Phase nahmen die Probanden für vier Tage 100 mg/Tag Acetylsalicylsäure ein. Nach einer erneuten 3-wöchigen Einnahmepause wurden den Probanden, erneut für vier Tage, beide Medikamente zusammen verabreicht. Die Dosis entsprach dabei den vorangegangenen Phasen (1.Tag: 300 mg Clopidogrel plus 100 mg Acetylsalicylsäure; Folgetage: 75 mg Clopidogrel plus 100 mg Acetylsalicylsäure).

Die Blutabnahme (2.2.1) erfolgte jeweils morgens vor der Medikamenteneinnahme am ersten und zweiten Einnahmetag sowie am ersten Tag nach der letzten Einnahme (Tag 5). Wir danken Herrn Prof. Dr. med. W. Schramm, Herrn Dr. med. M. Spannagl und Frau Dr. med. K. Kilgert, Abteilung für Hämostaseologie, Medizinische Klinik Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München, für die freundliche Unterstützung.

	<u>1. Phase:</u> Clopidogrel		3 wöchige Einnahme- pause	<u>2. Phase:</u> ASS		3 wöchige Einnahme- pause	<u>3. Phase:</u> Clopidogrel + ASS	
Tag 1	300 mg	+		100 mg	+		300 mg + 100 mg	+
Tag 2	75 mg	+		100 mg	+		75 mg + 100 mg	+
Tag 3	75 mg			100 mg			75 mg + 100 mg	
Tag 4	75 mg			100 mg			75 mg + 100 mg	
Tag 5		+			+			+

Tab. 1: Schema zum Studienaufbau der Erforschung der Wirkung von Acetylsalicylsäure und Clopidogrel auf die Tissue Factor Aktivierung; Blutentnahme: +

Die citrierten Vollblutproben wurden an Tag 1, 2 und 5 in der Thrombelastographie (2.2.3) und im Platelet Function Analyzer (s.u.) untersucht. An den Tagen 1 und 5 wurden zusätzliche Bestimmungen mit Hilfe der Flowcytometrie (2.2.2) und der Faktor Xa Bildung (s.u.) vorgenommen.

2.2.6.1 Untersuchung der Thrombozytenfunktion

Der Einfluß der Medikamente auf die Thrombozytenfunktion wurde bei allen drei Blutentnahmen mit Hilfe des Platelet Function Analyzers überprüft.

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden je 800 µl der citrierten Vollblutprobe in zwei unterschiedlich beschichtete Patronen (Kollagen und Epinephrin / Kollagen und ADP) pipettiert und die Verschußzeit im Platelet Function Analyzer bestimmt (2.2.5).

2.2.6.2 Faktor-Xa-Bildung

Im Rahmen der pharmakologischen Studie wurde die Tissue Factor Aktivität mittels der Faktor Xa Bildung in Plättchen-Neutrophilen-Gemischen vor und nach 4-tägiger Medikamenteneinnahme des Probanden gemessen (2.2.4). Die Zellisolation (2.1.2; 2.1.5) erfolgte direkt im Anschluß an die Blutentnahme.

2.2.7 Statistik

Die statistische Signifikanz *p wurde mit der Software Sigma Stat (Jandel Cooperation) berechnet. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte bei Normalverteilung mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) für multiple Vergleiche, waren die Daten nicht normal verteilt wurde der Mann-Whitney-Rank-Sum Test verwendet. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung ausgedrückt. Die p-Werte < 0,05 wurden als signifikant bezeichnet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Tissue Factor auf Plättchen und zirkulierenden Mikrovesikeln fördert die kollageninduzierte Fibrinbildung im Vollblut

Um die Bedeutung zirkulierender Mikrovesikel sowie neutrophiler Granulozyten und Thrombozyten für die funktionelle Aktivität des intravaskulären Tissue Factor zu untersuchen führten wir sogenannte thrombelastographische Aufbauversuche durch. Hierbei wurde die kollageninduzierte Fibrinbildung im Plasma mittels Thrombelastographie in An- bzw. Abwesenheit der zu untersuchenden Komponenten bestimmt. Frühere elektronenmikroskopische Untersuchungen hatten gezeigt, daß eine 5-minütige Stimulation von Vollblut mit Kollagen zu einer TF-Exprimierung auf der Oberfläche von, an Leukozyten adhärierte, Thrombozyten führt. Zudem war bekannt, daß die durch Stimulation mit Kollagen (Typ I) ausgelöste Fibrinbildung im Vollblut durch verschiedene Inhibitoren des Tissue Factor/Faktor VIIa-Komplexes gehemmt werden kann (Zillmann, 2001).

Zur Messung der TF-abhängigen Fibrinbildung wurde Plasma bzw. Vollblut mit Kollagen und ADP stimuliert und recalcifiziert. Den Plasmaproben wurden Plättchen oder Mikrovesikel selektiv entnommen und/oder neutrophile Granulozyten zugegeben. Für plättchenarmes Plasma (PAP) betrug die Gerinnungszeit (CT) bis zur Bildung der ersten Fibrinpolymere mehr als 1600 s (Spur I; Abb. 8). Eine deutlich höhere Fibrinbildungsrate wurde im stimulierten (ADP + Kollagen, s.o.) plättchenreichen Plasma (PRP) gemessen (Spur II; Abb. 8). Durch eine selektive Entnahme der Mikrovesikel aus plättchenreichem Plasma wurde die Gerinnungszeit verlängert (Spur III; Abb. 8). Um einen möglichen Einfluß der Präparation von mikrovesikelfreiem PRP auf die Meßergebnisse zu detektieren, führten wir Kontrollmessungen durch. Dazu wurden dem mikrovesikelfreien PRP vor der Messung die (während der Präparation) isolierten Mikrovesikel wieder zugefügt. Im Vergleich zu "unbehandeltem PRP" konnte kein wesentlicher Unterschied in der Gerinnungs- (CT) und Gerinnselfbildungszeit (CFT) gefunden werden. Die Zugabe neutrophiler Granulozyten (Spur IV; Abb. 8) oder von Monozyten (Daten nicht gezeigt) zum plättchenreichen Plasma führte zu einer Verkürzung der Gerinnungszeit. Unter diesen Bedingungen wurde ein mit dem Vollblut vergleichbarer Wert erreicht (vgl. Spur VI; Abb. 8). Die selektive Entnahme der Mikrovesikel resultierte auch hier in einer Reduktion der Fibrinbildung (Spur V; Abb. 8). Der

Einfluß der Mikrovesikel, errechnet aus den Differenzen in der Fibrinbildungszeit von PRP und mikrovesikelfreiem PRP (Spur II und III; Abb. 8) in An- oder Abwesenheit von neutrophilen Granulozyten (Spur IV und V; Abb. 8), entspricht einer Verlängerung der Fibrinbildungszeit um 540s in beiden Fällen. Diese Daten weisen darauf hin, daß die kollageninduzierte Fibrinbildung wesentlich vom Vorhandensein zirkulierender Mikropartikel abhängt. Ferner konnte ein additiver Effekt von Plättchen, Neutrophilen und Mikrovesikeln gezeigt werden (Abb. 8).

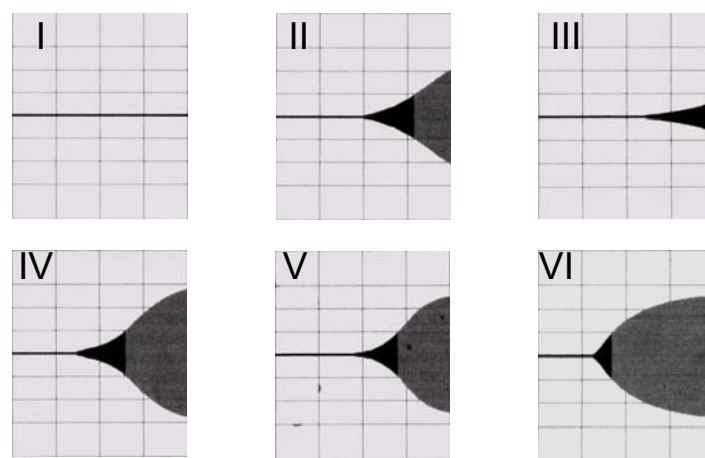


Abb. 8: Untersuchung der kollageninduzierten Fibrinbildung in plättchenarmem/ plättchenreichem Plasma vor bzw. nach Zugabe von Neutrophilen u./o. Mikrovesikeln. Fibrinbildungszeit (CT) und Thrombuswachstum (CFT) wurden nach Recalcifizierung mit Hilfe der Thrombelastographie gemessen. I: PAP; II: PRP; III: PRP ohne Mikrovesikel; IV: PRP und Neutrophile; V: PRP und Neutrophile ohne Mikrovesikel; VI: Vollblut

3.2 Zur funktionellen Aktivierung des intravaskulären Tissue Factor sind Mikrovesikel, Plättchen und Leukozyten nötig

Die Ergebnisse der thrombelastographischen Untersuchungen von Vollblut und Plasma legten eine Beteiligung sowohl von zirkulierenden Mikrovesikeln als auch von Thrombozyten und Leukozyten bei der Aktivierung des intravaskulären Tissue Factors nahe. Um die Tissue-Factor-Aktivität mittels isolierter Blutkomponenten zu untersuchen und Hinweise auf mögliche Aktivierungsmechanismen zu erhalten, wurde die Aktivierung von Faktor X in mit Kollagen stimulierten Zell-Mikrovesikel-

Suspensionen bestimmt. Hierbei handelt es sich um einen einstufigen Gerinnungstest, der auf der Aktivierung des Faktors X durch den Tissue Factor/Faktor VIIa Komplex beruht (siehe Einleitung). Aus der Menge des neu gebildeten Faktors Xa lässt sich die funktionelle Aktivität des Tissue Factors bestimmen.

Isolierte Mikrovesikel zeigten keine prokoagulatorische Aktivität. Nach Zugabe von Monozyten zu den Mikrovesikeln kam es zu einer Zunahme der Faktor-Xa-Bildung. Ein deutlich stärkerer Effekt ließ sich durch die gleichzeitige Zugabe von Plättchen und Leukozyten (neutrophile Granulozyten oder Monozyten) erzielen, wodurch die Faktor-Xa-Bildung um mehr als das Dreißigfache zunahm. Hierbei wurden vergleichbare Ergebnisse durch Zugabe von Monozyten oder Neutrophilen erzielt (Abb 9).

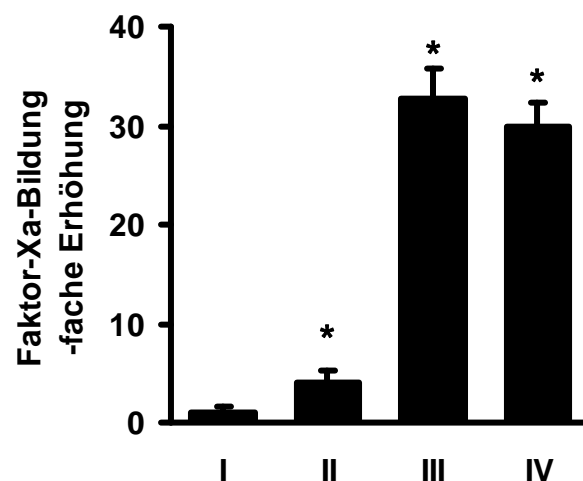


Abb. 9: Tissue-Factor-Aktivität in Zellsuspensionen unterschiedlicher Zusammensetzung in Anwesenheit von zirkulierenden (präformierten) Mikrovesikeln. Die Messung erfolgte nach 5-minütiger Kollagenstimulation. I: Zirkulierende (aus Plasma isolierte) Mikrovesikel; II: Mikrovesikel und Monozyten; III: Mikrovesikel, Monozyten und Plättchen; IV: Mikrovesikel, Plättchen und Neutrophile. Die Werte auf der y-Achse geben die –fache Erhöhung der Faktor-Xa-Bildung in Bezug auf isolierte Mikrovesikel (I) an. n=3; * p<0,05 (vs. I)

Es war bereits bekannt, daß die Stimulierung von isolierten Plättchen mit Kollagen nur zu einem geringen Anstieg der Faktor-Xa-Bildung führt. Ebenso wußten wir aus früheren Experimenten zur Tissue-Factor-Bestimmung mittels Doppel-Sandwich-ELISA, dass isolierte Neutrophile keinen Tissue Factor enthalten. Daher mussten wir annehmen, dass die Zunahme der Tissue-Factor-Aktivität durch Interaktionen

zwischen Neutrophilen und Plättchen beziehungsweise Mikrovesikeln begründet ist. Unser besonderes Augenmerk galt dabei neutrophilen Sekretionsprodukten (3.6 – 3.8).

3.3 Erhöhung der Mikrovesikelmenge führt zu einer Zunahme der Faktor-Xa-Bildung

Erhöhte Mengen von Mikrovesikeln werden bei einer Reihe von Erkrankungen wie etwa kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet, die mit einem erhöhten Risiko thrombembolischer Ereignisse assoziiert sind. Wir untersuchten, ob ein Zusammenhang zwischen der Menge zirkulierender Mikrovesikel und der Tissue-Factor-Aktivität besteht. Hierfür wurde erneut die Faktor-Xa-Bildung in Suspensionen isolierter Blutzellen gemessen. Eine Erhöhung der Mikrovesikelzahl bis zur zehnfachen Menge, ohne Änderung der Konzentration der anderen Komponenten, führte zu einer drastischen Zunahme der Faktor-Xa-Bildung. Dies konnte sowohl in der Kombination mit Neutrophilen als auch, noch ausgeprägter, nach Zugabe von Neutrophilen und Plättchen beobachtet werden.

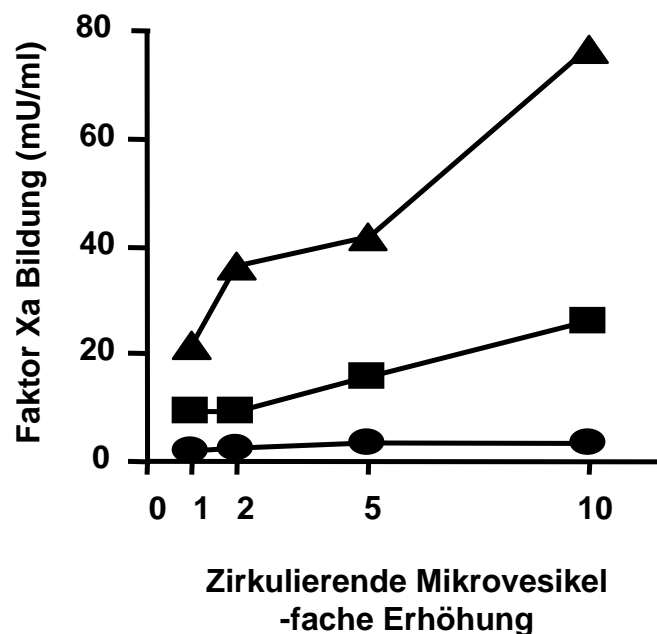


Abb. 10: Durch Erhöhung der Zahl der Mikrovesikel in Suspensionen mit einer konstanten Menge an Blutzellen wird die Faktor-X-Aktivierung gesteigert. ●: Mikrovesikel; ■: Mikrovesikel und Neutrophile; ▲: Mikrovesikel, Neutrophile und Plättchen. Die Werte auf der y-Achse geben die -fache Erhöhung der Mikrovesikel verglichen mit der Ausgangssituation an (3×10^4 , definiert als "1"). Repräsentatives Experiment aus 5 Versuchen.

3.4 Lokalisierung des Tissue Factors in Mikrovesikeln unterschiedlicher Ausgangszellen

Die in der Thrombelastographie und Faktor-Xa-Bildung untersuchten zirkulierenden Mikrovesikel stammen aus unterschiedlichen Blut- und Gefäßwandzellen, wobei der größte Anteil thrombozytären Ursprungs ist. Um die Anwesenheit von Tissue Factor in den verschiedenen Mikrovesikel-Populationen zu untersuchen, erzeugten wir Mikrovesikel unter in vitro Bedingungen. Nach Stimulation von plättchenreichem Plasma mit Thrombin und Kollagen (Thrombin 12,5 mU/ml; Kollagen 8 µg/ml) wurden Plättchen-Mikrovesikel aus dem Überstand gewonnen. In einem vergleichbaren Verfahren wurden Neutrophile mit fMLP (10^{-4} mM) stimuliert und die entstandenen Mikrovesikel wiederum aus den Überständen isoliert.

Der Tissue-Factor-Gehalt der Mikropartikel wurde mit Hilfe eines Doppel-Sandwich-ELISA gemessen. In den Plättchenmikrovesikeln wurde eine Tissue-Factor-Konzentration von 27 pg/ml ermittelt. In den Neutrophilen-Mikrovesikeln lag der Wert unter der Nachweisgrenze (Abb 3.4). Dies entspricht früheren Messungen in den Ausgangszellen, in denen ebenfalls kein Tissue-Factor-Protein nachgewiesen werden konnte.

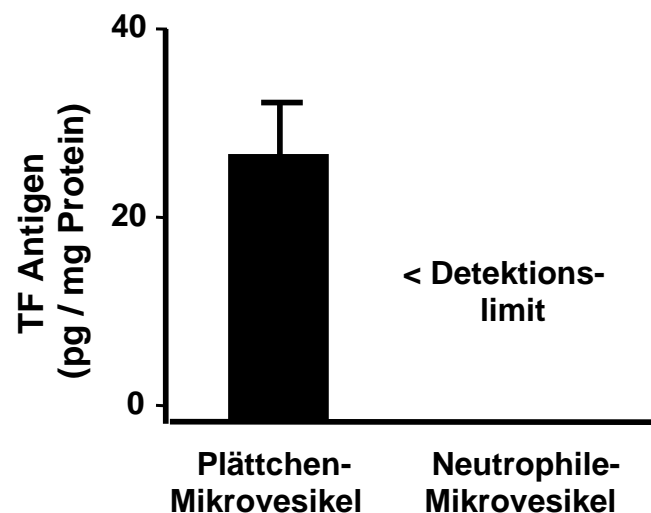


Abb. 11: Gehalt an Tissue Factor in Plättchenmikrovesikeln und Neutrophilen-Mikrovesikeln wurde mittels Doppel-Sandwich-ELISA bestimmt. Das Tissue-Factor-Protein in Neutrophilen-Mikrovesikeln lag unterhalb der Nachweisgrenze. n = 3

3.5 Plättchenmikrovesikel erhöhen die Tissue-Factor-Aktivität in Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen

Vergleichbar zu den zirkulierenden Mikrovesikeln (3.2), ergab die Bestimmung der Faktor-Xa-Bildung in Suspensionen aus in vitro hergestellten Mikrovesikeln keine prokoagulatorische Aktivität. Dies galt sowohl für Plättchen-Mikrovesikel als auch für Mikrovesikel, die neutrophilen Granulozyten oder Monozyten entstammen (Abb 3.5a). Daher gingen wir davon aus, daß der in Plättchenmikrovesikeln nachgewiesene Tissue Factor (3.4) per se funktionell inaktiv ist. Die (bereits bekannte) prokoagulatorische Aktivität von Neutrophilen-Plättchen-Suspensionen konnte jedoch durch Zugabe von in vitro hergestellten Plättchenmikrovesikeln deutlich erhöht werden. Monozytäre Mikrovesikel führten hier ebenfalls zu einer Zunahme der Faktor-Xa-Bildung. Dagegen zeigten Neutrophile-Mikrovesikel keinen Effekt (Abb 3.5b). Die Menge der zugegebenen Mikrovesikel entsprach der im Vollblut gemessenen Menge zirkulierender Mikrovesikel. Dies bedeutet, dass die Gesamtfraktion durch eine einzelne Mikrovesikelpopulation ersetzt wurde. Dabei wurden die in vitro hergestellten Mikrovesikel mit Hilfe des Flowcytometers gezählt (2.2.2).

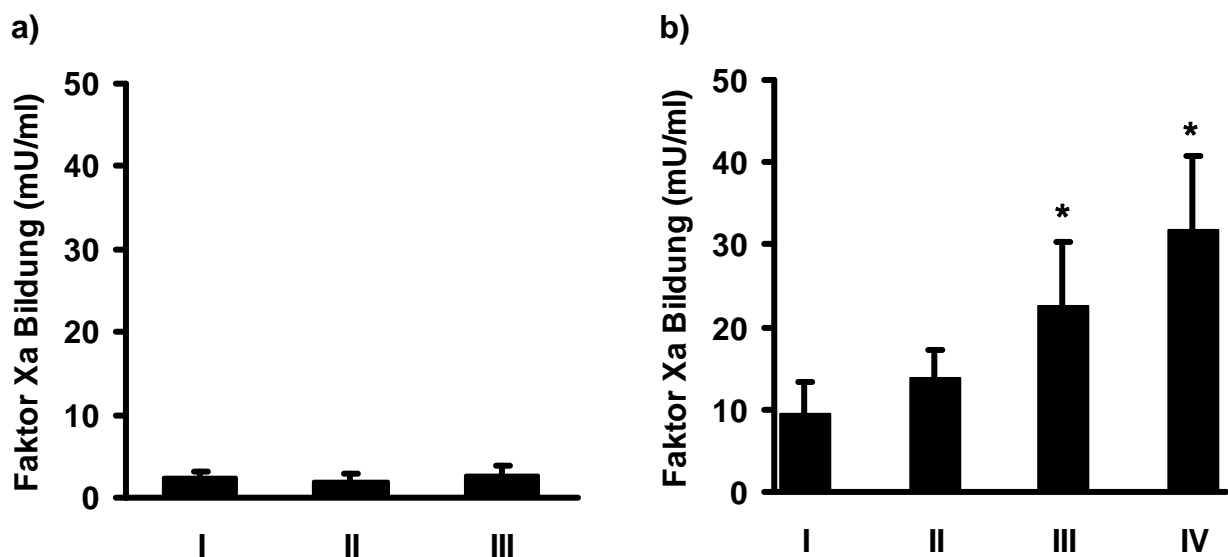


Abb. 12: Einfluß von verschiedenen in vitro hergestellten Mikrovesikeln auf die Tissue-Factor-Aktivität. Die Messungen erfolgten nach 5-minütiger Stimulation mit Kollagen.

a) in vitro hergestellte Mikrovesikel alleine:

I: Neutrophile-Mikrovesikel; II: Monozyten-Mikrovesikel; III: Plättchen-Mikrovesikel.

b) Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen:

I: ohne Mikrovesikel; II: mit Neutrophilen-Mikrovesikeln; III: mit Monozyten-Mikrovesikeln; IV: mit Plättchen-Mikrovesikeln. n=4; * p<0,05 (vs. I)

Um sicherzustellen, dass die Faktor-X-Aktivierung durch die Mikrovesikel und aktivierten Plättchen tatsächlich über Tissue Factor erfolgt, wurden Coating-Versuche durchgeführt (Abb 13). Hierbei wurden die einzelnen Blutzellen und Mikrovesikel selektiv mit einem anti-Tissue-Factor-Antikörper beschichtet und die prokoagulatorische Aktivität der Zellsuspensionen mit Hilfe der Faktor-Xa-Bildung gemessen. In Suspensionen aus Neutrophilen, Plättchen und zirkulierenden Mikrovesikeln beziehungsweise Plättchen-Mikrovesikeln wurde jeweils eine Komponente mit dem anti-Tissue-Factor VIC7 (10 µg/ml) vorinkubiert, gewaschen und schließlich zusammen mit den anderen

Zellen mit Kollagen stimuliert. Nach Antikörper-Beschichtung von Neutrophilen war keine Änderung der prokoagulatorischen Aktivität festzustellen. Dagegen zeigten Zellsuspensionen, in denen Plättchen oder Mikrovesikel mit VIC7 vorinkubiert waren einen Rückgang der Faktor-Xa-Bildung um mehr als 40 Prozent. Dies galt sowohl für ex vivo gewonnene zirkulierende Mikrovesikel als auch für die in vitro hergestellten Plättchen-Mikrovesikel.

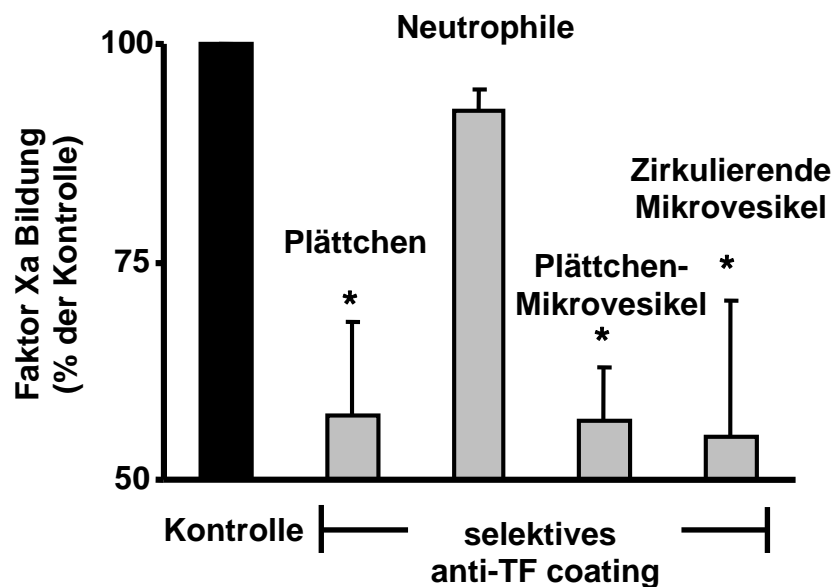


Abb. 13: Beschichtung von Mikrovesikeln und Plättchen mit anti-Tissue-Factor-Antikörper senkt die Faktor-Xa-Bildung. Mikrovesikel, Neutrophile und Plättchen wurden selektiv für 20 Min mit Anti-Tissue-Factor-Antikörper vorinkubiert, gewaschen und für 5 Min zusammen mit den anderen Blutkomponenten inkubiert (Kollagenstimulation). Der Kontrollwert wurde mit allen Komponenten ohne Antikörper bestimmt. n = 4; * p<0,05 (vs. Kontrolle)

Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass neutrophile Mikrovesikel keinen Tissue Factor enthalten, in Plättchenmikrovesikeln jedoch funktionell inaktiver Tissue Factor vorhanden ist, der durch Interaktionen mit Neutrophilen und Plättchen aktiviert werden kann.

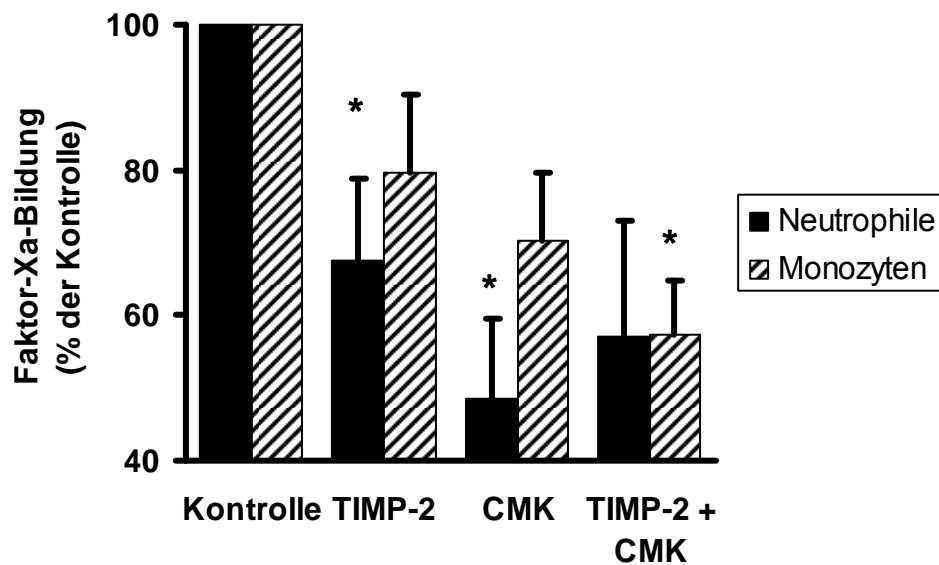
3.6 Inhibierung leukozytärer Proteasen hemmt die Tissue-Factor-Aktivität

Aktivierte Neutrophile und Monozyten sezernieren eine Vielzahl von Proteasen, darunter auch Matrixmetalloproteasen und Elastase. Matrixmetalloproteasen sind in der Lage, *in vitro* TFPI, jedoch nicht Tissue Factor, Faktor VII oder Faktor Xa zu spalten (Belaouaj, 2000). Elastase, eine vorwiegend von Neutrophilen sezernierte Serinprotease, besitzt ebenfalls die Fähigkeit zur TFPI-Spaltung (Higuchi, 1992). Um zu überprüfen, ob leukozytäre Proteasen an der Aktivierung des Plättchen- bzw. Mikrovesikel-assoziierten Tissue Factor beteiligt sind, wurden die Wirkungen verschiedener Proteaseinhibitoren auf die Faktor-Xa-Bildung getestet. Hierbei wurde die Tissue-Factor-Aktivität in Gemischen aus Leukozyten (Neutrophilen oder Monozyten), Plättchen und Mikrovesikeln nach Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor gemessen.

Nach Vorinkubation mit TIMP-2 (0,1 µg/ml), einem endogenen Inhibitor der Matrixmetalloproteasen, sank die prokoagulatorische Aktivität in Mikrovesikel-Plättchen-Neutrophilen-Gemischen um ca. 30%. In Neutrophilen-Plättchen-Mikrovesikel-Suspensionen führte Chloromethylketon (CMK: 0,5 mM), ein Inhibitor der neutrophilen Elastase, zu einer Hemmung der prokoagulatorischen Aktivität um mehr als 50%. Nach Zugabe von Monozyten anstelle von Neutrophilen wurde die Faktor-Xa-Bildung deutlich weniger gesenkt. Hierbei konnte jedoch durch Kombination von TIMP-2 und CMK ein additiver Hemmeffekt beobachtet werden, während in den Neutrophilen-Plättchen-Mikrovesikel-Gemischen durch CMK allein schon ein maximaler Effekt erreicht war.

Um sicher zu gehen, daß durch gleichzeitige Inhibierung der neutrophilen Elastase und der Matrixmetalloproteasen die Faktor-Xa-Bildung nicht weiter gesenkt werden kann, wurden noch weitere Inhibitoren der MMPs (TIMP-1 (0,5 µg/ml) und Phenanthrolin (1 mM)) zusammen mit CMK eingesetzt (Abb 14).

a)



b)

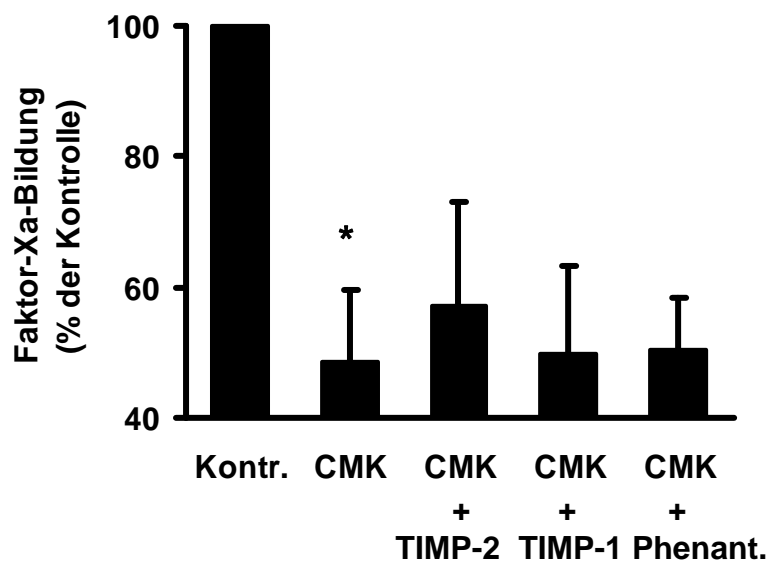


Abb. 14: Tissue-Factor-Aktivität in Leukozyten-Plättchen-Mikrovesikel-Gemischen nach Vorinkubation mit Proteaseinhibitoren. a) Inhibierung der Elastase durch CMK (0,5 mM) und der Matrixmetalloproteasen durch TIMP-2 (0,1 µg/ml). n=3
b) Kombination von CMK (0,25 mM) mit verschiedenen Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen (TIMP-1 (0,05 µg/ml), TIMP-2 (0,1 µg/ml) oder Phenanthrolin (1 mM)) in Neutrophilen-Plättchen-Mikrovesikel-Gemischen zeigte keinen zusätzlichen Effekt. n=3; * p<0,05 (vs. Kontrolle)

3.7 Inhibierung der neutrophilen Elastase senkt die Fibrinbildung im Vollblut

Vollblut wurde mit den Proteaseinhibitoren CMK (0,5 mM s.o.) und TIMP-2 (0,1 µg/ml) inkubiert und die kollageninduzierte Fibrinbildung im Thrombelastogramm gemessen. Die Inkubation mit CMK führte zu einer klaren Verlängerung der Fibrinbildungszeit. Ein Effekt von TIMP-2 war nicht nachweisbar. Somit scheint der neutrophilen Elastase auch bei der Tissue-Factor-Aktivierung im Vollblut eine Bedeutung zuzukommen.

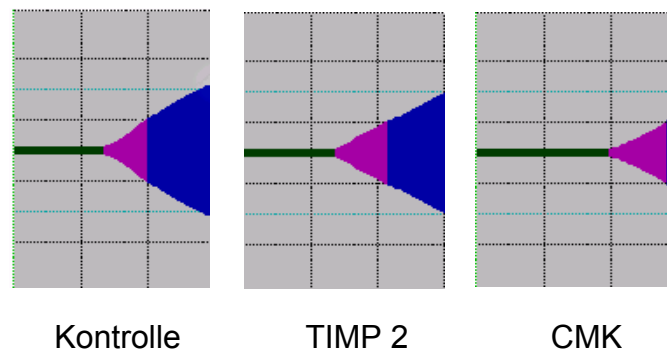


Abb. 15: Kollageninduzierte Fibrinbildung im Thrombelastogramm. Vollblut wurde mit TIMP-2 (Inhibitor verschiedener Matrixmetalloproteasen; 0,1 µg/ml) oder Chloromethylketon (CMK, Inhibitor der neutrophilen Elastase; 0,5 mM) vorinkubiert. Repräsentatives Ergebnis aus vier Versuchen.

3.8 Leukozytäre Enzyme, die Sauerstoffradikale abbauen, senken die Aktivität des intravaskulären Tissue Factor

Die Funktion der neutrophilen Granulozyten bei der Aktivierung des intravaskulären Tissue Factor legt eine Beteiligung neutrophiler Sekretionsprodukte nahe. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Sekretionsprodukte sind (neben den Proteasen) die Sauerstoffradikale. Das durch das NADPH-Oxidase-System der neutrophilen Granulozyten hergestellte Hydrogenperoxid sowie Superoxidanionen können mit Hilfe von Enzymen wie Katalase und Superoxiddismutase zu weniger reaktiven Molekülen abgebaut werden.

Wir untersuchten zunächst die Wirkung von Katalase und Superoxiddismutase auf die Tissue-Factor-Aktivität in Gemischen aus Plättchen, Neutrophilen und Plättchen-Mikrovesikeln mit Hilfe der Faktor-Xa-Bildung (vgl.3.6).

Die Tissue-Factor-Aktivität in Suspensionen aus Mikrovesikeln, Plättchen und neutrophilen Granulozyten konnte durch Zugabe von Katalase bzw. SOD deutlich gesenkt werden (Abb. 3.9). Ein additiver Effekt durch Vorinkubation mit beiden Enzymen war jedoch nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

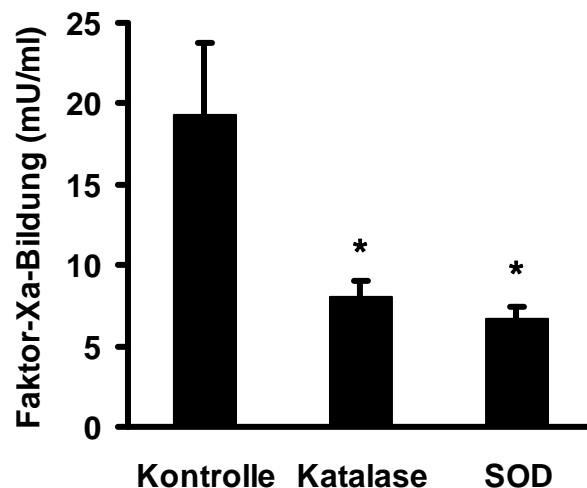


Abb. 16: Katalase und SOD inhibieren die intravaskuläre Tissue-Factor-Aktivität. Die Faktor-Xa-Bildung in Suspensionen aus Plättchen, Plättchenmikrovesikeln und Neutrophilen wird durch Katalase (250 U/ml) und SOD (12 µg/ml) gesenkt. n=5; * p<0,05 (vs Kontrolle = Kollagen)

3.9 Katalase und Superoxiddismutase senken die kollageninduzierte Fibrinbildung

Nachdem eine hemmende Wirkung von Katalase und Superoxiddismutase auf die Aktivität des intravaskulären Tissue Factor in Suspensionen isolierter Blutzellen und Mikrovesikel gezeigt werden konnte, untersuchten wir die Wirkung der beiden Enzyme im Vollblut. Die 15-minütige Inkubation des Vollblutes mit Katalase vor Zugabe des Kollagens bewirkte nahezu eine Verdopplung der Fibrinbildungszeit. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Vorinkubation mit Superoxiddismutase.

Wurde das Vollblut anstelle von Kollagen mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert, veränderte Katalase die Fibrinbildungsrate kaum. LPS bewirkt nach mehrstündiger Inkubation eine transkriptionelle Aktivierung der Tissue-Factor-Expression in Monozyten (Meszaros, 1994).

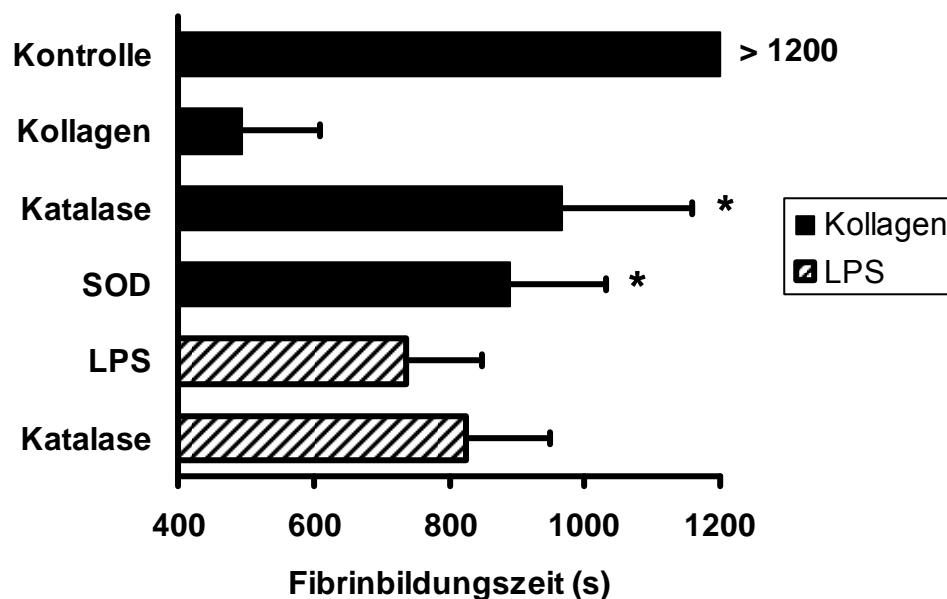


Abb. 17: Die kollageninduzierte Fibrinbildung im Vollblut wird durch Katalase (250 U/ml) und SOD (12 µg/ml) gesenkt. Nach Stimulation des Vollbluts mit LPS zeigt Katalase keine hemmende Wirkung auf die Fibrinbildung. Kontrolle: unstimuliertes Vollblut. Mittelwerte ± Standardabweichung (n=5); * p<0,05 (vs Kollagen)

3.10 Zellinteraktionen fördern die Aktivierung des intravaskulären Tissue Factors

Aus Untersuchungen mittels konfokaler Laserscanmikroskopie war bekannt, daß Mikrovesikel und Plättchen nach Kurzzeitstimulation mit Kollagen an Neutrophile und, in geringerem Maße, auch an Monozyten adhäreren. Wir wollten überprüfen, ob sich diese Zellinteraktionen auf die Tissue-Factor-Aktivität auswirken. Hierzu wurde die Tissue-Factor-Aktivität in Plättchen-Mikrovesikel-Neutrophilen-Gemischen nach Inkubation mit Antikörpern gegen Adhäsionsproteine gemessen. Dabei untersuchten wir die Rolle der Adhäsionsrezeptoren Mac-1, PSGL-1 und P-Selektin. Durch Vorinkubation der Zellsuspensionen mit einem Antikörper gegen P-Selektin konnte eine deutliche Abnahme der Tissue-Factor-Aktivität beobachtet werden. P-Selektin ist ein plättchenassoziiertes Adhäsionsrezeptor, der mit dem PSGL-1-Adhäsionsprotein auf Leukozyten interagiert. Auch die Blockade von PSGL-1 und des leukozytären Mac-1 hemmte die prokoagulatorische Aktivität der Zellsuspensionen. Der hier beobachtete additive Effekt war jedoch nicht stärker als bei Zugabe von anti-P-Selektin allein. Zusammen deuten diese Daten darauf hin, daß der Zell-Zell-Kontakt zwischen Plättchen bzw. Mikrovesikeln und Neutrophilen eine wesentliche Rolle bei der kollageninduzierten Tissue Factor Aktivierung spielt.

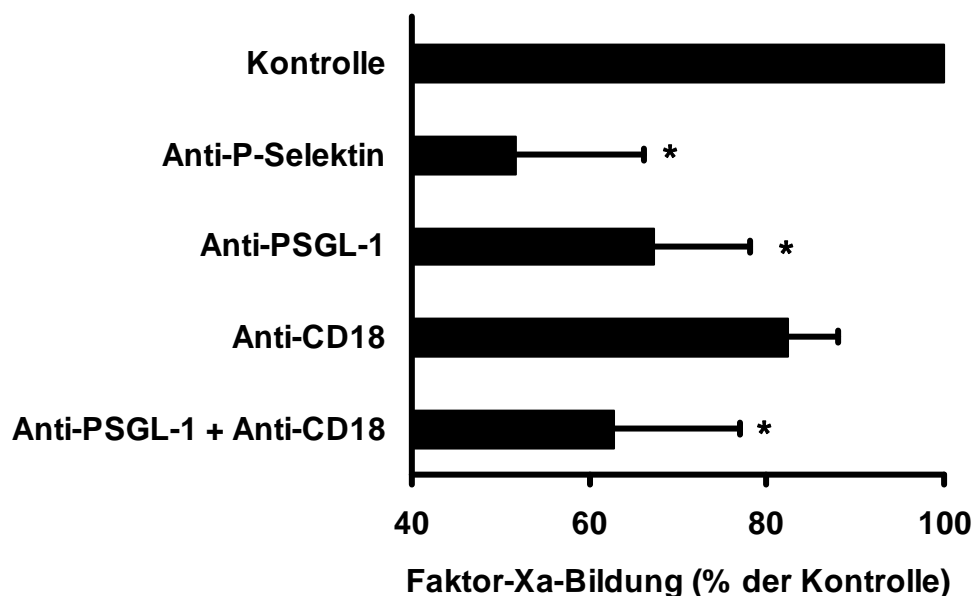


Abb. 18: Gemische aus Mikrovesikeln, Plättchen und Neutrophilen wurden für 5 Minuten mit Kollagen (12µg/ml) stimuliert und die Faktor-Xa-Bildung gemessen. Nach Vorinkubation mit Antikörpern gegen Adhäsionsrezeptoren nahm die prokoagulatorische Aktivität in den Suspensionen ab. n = 3; * p<0,05 (vs Kollagen alleine)

3.11 ADP-Rezeptorenblockade inhibiert die prokoagulatorische Aktivität in Plättchen-Neutrophilen-Gemischen

ADP ist ein wichtiger Plättchenaktivator, der u. a. die Ankopplung der Plättchen an den wachsenden Thrombus ermöglicht. Für diese Effekte sind vor allem die ADP-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 verantwortlich (Gachet, 1997). Wir wollten klären, ob durch Blockade dieser Rezeptoren auch die Tissue-Factor-Aktivität gesenkt werden kann.

Hierzu untersuchten wir die Faktor-Xa-Bildung in mit ADP-Rezeptorblockern vorinkubierten Zellsuspensionen aus Plättchen und Neutrophilen. Die Wirkung der Blockade der ADP-Rezeptoren wurde sowohl in vitro als auch ex vivo untersucht. In einem In-vitro-Modell wurden die Zellsuspensionen direkt mit den inhibitorisch wirksamen Substanzen AR-C69931MX (Inhibierung des P2Y12-Rezeptors) und MRS-2179 (Inhibierung des P2Y1-Rezeptors) inkubiert. Beide Substanzen führten zu einem deutlichen Rückgang der Tissue Factor Aktivität.

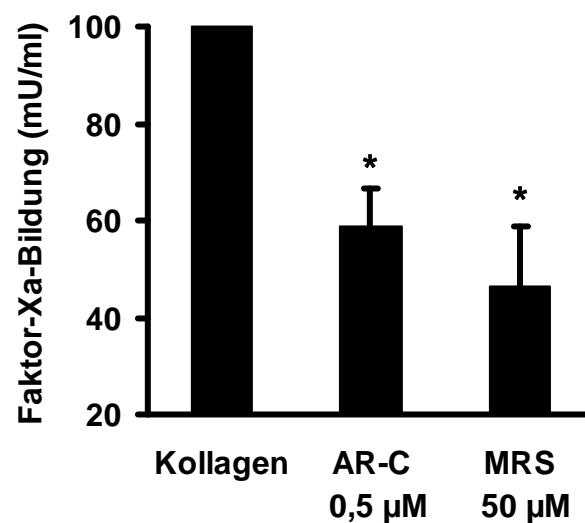


Abb. 19: Die Tissue-Factor-Aktivität in Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen wird durch Inkubation mit den ADP-Rezeptor-Blockern AR-C69931MX sowie MRS-2179 gesenkt. * $p < 0,05$ (vs Kollagen)

3.12 Aspirin versus Clopidogrel – Medikamente mit Einfluß auf die Tissue-Factor-Aktivität

In einer pharmakologischen Studie untersuchten wir unter ex-vivo-Bedingungen den Einfluß der Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure und Clopidogrel auf die Thrombozytenaktivität und die Tissue-Factor-Aktivität in Plättchen-Neutrophilen-Gemischen. Die Tissue-Factor-Aktivität wurde mit Hilfe der Faktor-Xa-Bildung bestimmt (3.13.2), die Thrombozytenaktivität im „Platelet Function Analyzer“ gemessen (3.13.1). Insgesamt wurden Blutproben von acht Probanden untersucht. Die Probanden erhielten während der ersten Studienphase für vier Tage Clopidogrel nach drei Wochen Einnahmepause für vier Tage Acetylsalicylsäure und nach weiteren drei Wochen für vier Tage beide Medikamente zusammen. Die Blutabnahme erfolgte jeweils vor Einnahme der Medikamente, 24h nach der ersten Einnahme und einen Tag nach der letzten Einnahme (2.2.6).

3.13.1 Messung der Thrombozytenfunktion im Platelet Function Analyzer

Zunächst überprüften wir die Wirkung der Medikamente auf die Thrombozytenfunktion mit Hilfe des Platelet Function Analyzers. Diese Methode wird zur "Abschätzung" der Plättchen-abhängigen primären Hämostase im Zitrat-Blut verwendet. Hierbei wird die Zeit gemessen, in der die Plättchen in der Lage sind, eine kleine Öffnung in einer mit Kollagen und Epinephrin oder Kollagen und ADP beschichteten Membran zu verschließen. Das System untersucht die Thrombozytenfunktion unter dem Einfluß hoher Scherkräfte wie sie unter in-vivo-Bedingungen bei Gefäßwandverletzungen gefunden werden. Wie erwartet führte die 4-tägige Einnahme von Aspirin zu einer deutlichen Einschränkung der Thrombozytenfunktion. Bereits 24 h nach der Einnahme der ersten Acetylsalicylsäuredosis (100 mg) war eine Zunahme der Verschußzeit um ca. 25% meßbar. Unter Clopidogrel konnte in diesem System keine Hemmung der Thrombozytenaktivität gemessen werden, ebenso bestand kein signifikanter additiver Effekt der beiden Medikamente.

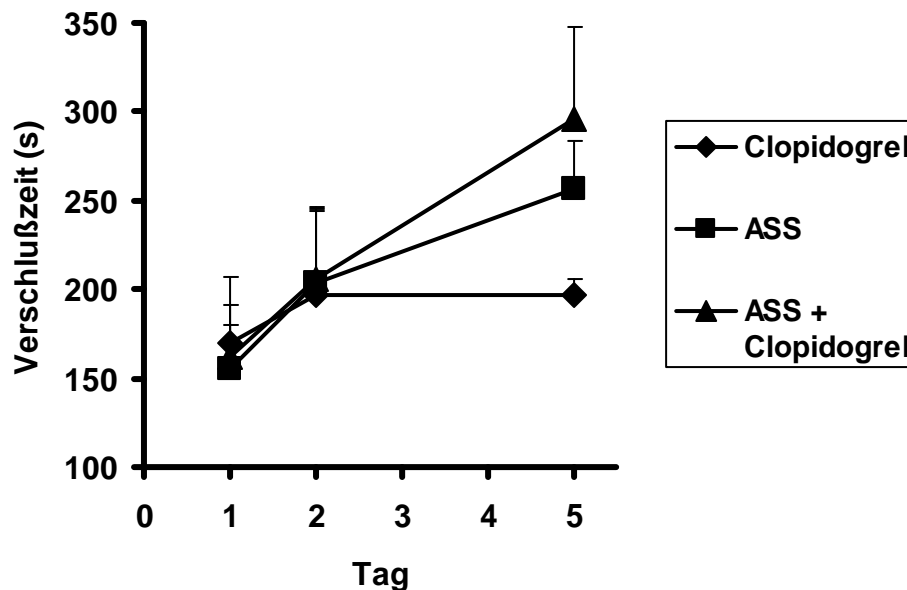


Abb. 20: Messung der Verschlußzeit im Platelet Function Analyzer unter „shear stress“-Bedingungen zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion (Membranbeschichtung mit Kollagen und Epinephrin). Die erste Messung erfolgte vor Einnahme der Medikamente, die zweite Messung nach 24h und die dritte Messung nach 5 Tagen (24h nach der letzten Einnahme). n = 7; * p<0,05 (vs Clopidogrel/Tag 1)

3.13.2 Messung der Tissue-Factor-Aktivität mittels Faktor-Xa-Bildung

Um den Einfluß von Clopidogrel und Acetylsalicylsäure auf die Aktivität des intravaskulären Tissue Factors zu untersuchen, bestimmten wir die Faktor Xa Bildung in Gemischen aus Thrombozyten und Neutrophilen. Clopidogrel ist ein selektiver Inhibitor des ADP-Rezeptors P2Y₁₂. Acetylsalicylsäure hemmt die Biosynthese des Plättchenagonisten Thromboxan A₂. Für die Untersuchung wurden die Zellen aus Blutproben der Probanden isoliert und mit Kollagen stimuliert.

Nach 4-tägiger Behandlung mit Clopidogrel konnte ein deutlicher Rückgang der Tissue Factor Aktivität im Vergleich zur Messung vor Behandlungsbeginn festgestellt werden (Abb. 21a). Messungen nach 4-tägiger Behandlung mit Acetylsalicylsäure zeigten keine Veränderung der prokoagulatorischen Aktivität (Abb. 21b). Interessanterweise war nach 4-tägiger Clopidogrel-Einnahme auch die kollageninduzierte TF-Präsentation auf Monozyten (CD14⁺ Zellen) im Vollblut

reduziert (Abb 21c). Acetylsalicylsäure hatte keinen Effekt auf die TF-Präsentation auf CD14⁺ Zellen (Abb.21d). Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die Resultate unserer in vitro Experimente und unterstreichen die Bedeutung des P2Y₁₂ Rezeptors für die Aktivierung des intravaskulären TF.

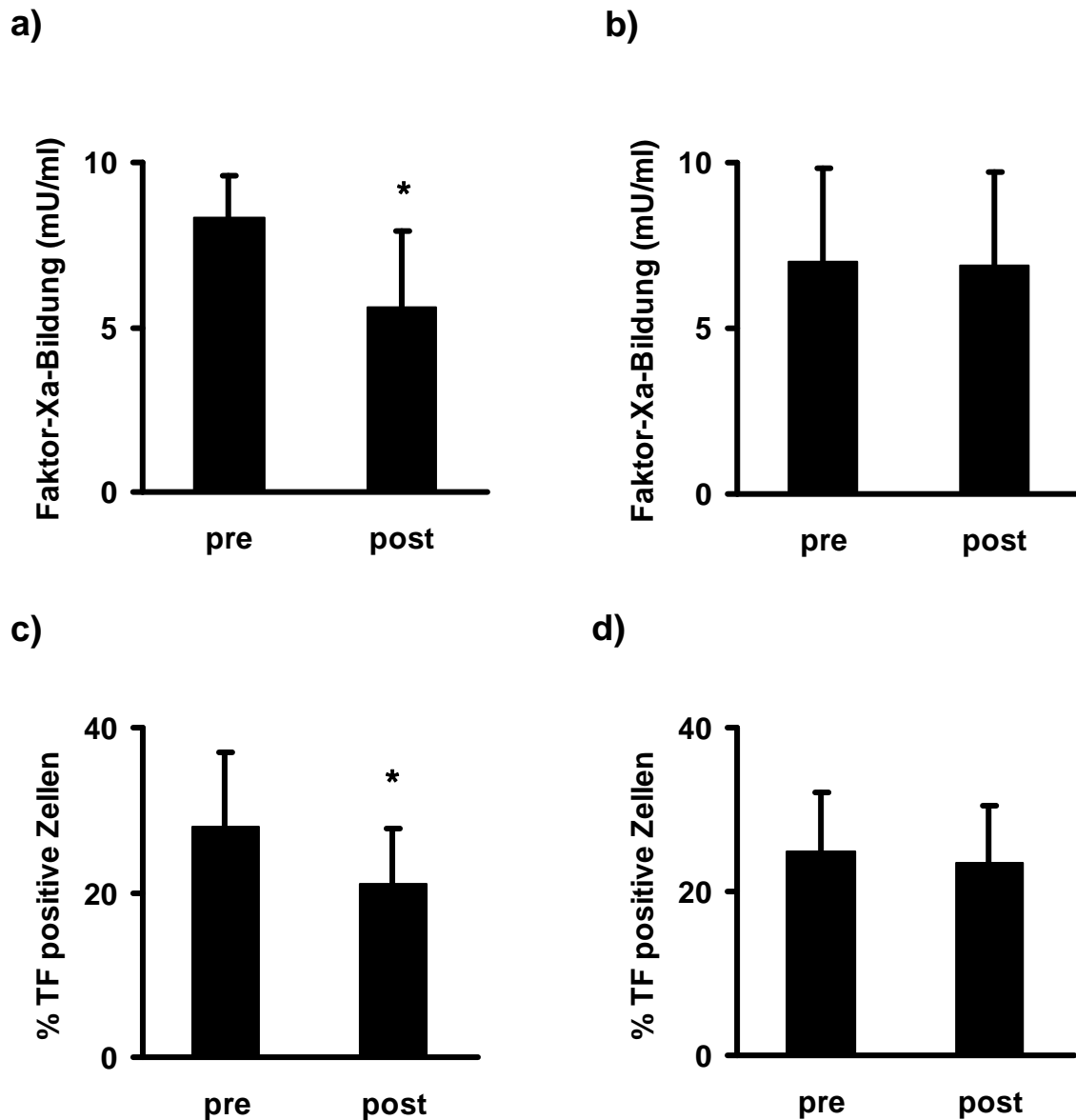


Abb. 21: Ex vivo Nachweis für die Bedeutung des P2Y₁₂-Rezeptors bei der Aktivierung des intravaskulären TF. Faktor-Xa-Bildung in Plättchen-Neutrophilen-Gemischen (a/b) und kollageninduzierte TF-Präsentation auf CD14⁺ Zellen (c/d) vor (pre) und nach (post) 4-tägiger Einnahme von Clopidogrel (Tagesdosis 75mg nach einmaliger Aufsättigungsdosis von 300mg) (a/c) oder Acetylsalicylsäure (Tagesdosis 100mg) (b/d). n = 8; * p<0,05 (vs Kollagen)

4. DISKUSSION

4.1 Intravaskulärer Tissue Factor: Lokalisation und Aktivitätszustand

Nach Verletzung der Gefäßwand kommt das Blut mit subendothelialer Matrix in Kontakt. Hierzu gehört Kollagen (Typ I, III, VI) welches als Adhäsionspartner für Thrombozyten dient und auch deren Aktivierung fördert (Kunicki, 2002). Daneben wird subendothelial gelegener TF für plasmatische Gerinnungsfaktoren zugänglich, wodurch die Bildung des TF/Faktor-VIIa-Komplexes ermöglicht wird, der hauptverantwortlich für die Fibrinbildung ist. Die an Kollagenfasern adhärierenden Thrombozyten bilden zusammen mit Leukozyten einen lumenwärts wachsenden Thrombus, der durch das neu gebildete Fibrin stabilisiert wird. Grundlage für unsere Untersuchungen war die Beobachtung, daß bereits nach 5-minütiger Stimulation von Vollblut mit Kollagen in vitro, TF auf der Oberfläche von Plättchen-Leukozyten-Komplexen erscheint (Zillmann, 2001). In Übereinstimmung hiermit wurden in einem In-vitro-Perfusionsmodell von Giesen et al. nach Kontakt von Blut mit kollagenbeschichtetem Glas TF-haltige Thromben gefunden (Giesen, 1999). Diese Beobachtungen setzen das Vorhandensein von TF im Blut - unabhängig von der Lokalisation in der Gefäßwand - voraus. Die Aktivität dieses intravaskulären TF war sowohl im Faktor-Xa-Bildungstest, als auch in Vollblutgerinnungstests nachweisbar. Ziel war es nun, die Funktion der einzelnen Blutbestandteile für die Aktivierung des intravaskulären TF zu untersuchen.

Mittels Elektronenmikroskopie konnte TF-Protein im offenen Kannalikulärsystem und in alpha-Granula von nicht aktivierten Thrombozyten sowie auf zirkulierenden Mikrovesikeln nachgewiesen werden (Müller, 2003; Siddiqui, 2002). Die unerwartete Entdeckung eines funktionellen Spleißosoms in den kernlosen Plättchen (Denis, 2005) und der nachfolgende Nachweis einer Prä-Messenger-RNA von TF gibt einen möglichen Hinweis auf die Quelle des Plättchen-assoziierten TF. Die TF-Prä-Messenger-RNA in Plättchen kann durch Spleißen in reife mRNA umgewandelt werden (Schwertz, 2006). Möglicherweise nehmen Thrombozyten zusätzlich TF auch aus dem Plasma auf, wie bereits für andere prokoagulatorische Proteine der alpha-Granula beschrieben (Camire, 1998; Handagama, 1990; Lopez-Vilchez, 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass aktivierte Thrombozyten und zirkulierende Mikrovesikel die TF-abhängige Fibrinbildung im Plasma nach

Kollagenstimulation fördern. Der Mikrovesikel- und Plättchen-assoziierte TF war jedoch funktionell inaktiv. Dies steht im Einklang mit der Vorstellung, daß TF posttranslational in einer kryptischen Form ohne prokoagulatorische Aktivität auf der Zelloberfläche vorliegt (Bach, 2006). Zu den möglichen Aktivierungsfaktoren dieses sog. "encrypted" TF zählen Proteasen (Bach, 1998) , Komplementfaktoren (Carson, 1990), Ca^{2+} (Bach, 1990) und Apoptose (Greeno, 1996). Interessanterweise wurde in unseren Untersuchungen der intravaskuläre TF durch Inkubation mit Neutrophilen (oder Monozyten) aktiviert. Ebenso wurde die kollageninduzierte Fibrinbildung und das Thrombuswachstum im Plasma durch Zugabe von Leukozyten verstärkt. Nach schneller Zellisolation durch Zellsortierung wurde weder in Monozyten noch in Neutrophilen TF-Protein gefunden (Zillmann, 2001). Die Fähigkeit von Monozyten zur Proteinbiosynthese von TF ist bereits mehrfach gezeigt worden (Osterud, 2001). Kürzlich wurde von Maugeri et al. auch das Vorhandensein von TF-mRNA sowie eine TF-Expression in polymorphkernigen Neutrophilen postuliert (Maugeri, 2006). In einer Arbeit von Osterud et al. (Osterud, 2000) fand man geringe Mengen TF-Protein auf Neutrophilen, die jedoch auf eine Verunreinigung mit Monozyten zurückgeführt wurden. Wir gehen davon aus, daß für eine TF-Präsentation innerhalb von Minuten, wie sie für den physiologischen Gerinnungsstart erforderlich ist, eine Neusynthese zuviel Zeit benötigt. Eine Beschichtung von Neutrophilen mit Anti-TF-Antikörper konnte die TF-Aktivität in Mikrovesikel-Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen nicht senken. Diese Beobachtungen führten uns zu der Annahme, daß die Aktivierung des Plättchen- und Mikrovesikel-assoziierten TF vom Vorhandensein von Leukozyten abhängt, Leukozyten selbst jedoch keinen präformierten TF enthalten. Die Rolle der Monozyten muß dennoch kritisch betrachtet werden, da eine Induktion der TF-Synthese im Rahmen der Zellisolierung nicht ausgeschlossen werden kann.

4.2 TF auf zirkulierenden Mikrovesikeln

Neben der zellulären Verteilung des intravaskulären TF konnte das TF-Protein auch im Plasma nachgewiesen werden (Albrecht, 1996). Dabei wurden im Plasma von Patienten mit Erkrankungen wie Myokardinfarkt (Suefuji, 1997) oder instabiler Angina pectoris (Misumi, 1998) besonders hohe Mengen an TF gefunden. Möglicherweise stellt dies eine Ursache für die erhöhte Thrombogenität des Blutes dar, welche mit diesen Erkrankungen einhergeht. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben

gezeigt, daß der Plasma-TF zumindest teilweise mit zirkulierenden Mikrovesikeln assoziiert ist (Müller, 2003). Mikrovesikel sind Abschnürungen von Zellmembranen mit einer Größe von 100 nm bis 1 µm im Durchmesser, die als Folge einer Zellaktivierung, bei mechanischer Belastung durch Scherkräfte oder bei Reifungsprozessen bzw. Apoptose abgegeben werden (Heijnen, 1999; Miyazaki, 1996; Reininger, 2006; Satta, 1994). Wir konnten zeigen, daß Mikrovesikel-assoziiertes TF sowohl im Plasma als auch in Suspensionen aus isolierten Blutkörperchen die TF-vermittelte Gerinnung nachhaltig fördert. Umgekehrt wurde durch Entnahme der Mikrovesikel aus dem Plasma die Fibrinbildung gesenkt bzw. führte die Beschichtung der Mikrovesikel mit Anti-TF Antikörper zu einem deutlichen Rückgang der prokoagulatorischen Aktivität. Möglicherweise ist jedoch nicht allein der TF-Gehalt für die prokoagulatorische Wirkung der Mikrovesikel verantwortlich. Zirkulierende Mikrovesikel präsentieren auf ihrer Oberfläche negativ geladene Phospholipide, die als Bindungsstellen für Gerinnungsfaktoren die Gerinnung fördern können (Berckmans, 2001; Nieuwland, 1997). Hinweise für eine physiologische Bedeutung der Mikrovesikel in vivo liefern Untersuchungen von Patienten mit Scott Syndrom. Bei dieser Erkrankung, die mit reduzierter Mikrovesikelbildung einhergeht, leiden die Patienten unter einem erhöhten Blutungsrisiko (Castaman, 1997; Solum, 1999).

Erhöhte Mengen an zirkulierenden Mikrovesikeln wurden z. B. im Blut von Patienten mit Sepsis (Nieuwland, 2000) oder akutem Koronarsyndrom (Mallat, 2000) gemessen. Die verstärkte Thrombogenität des Blutes betroffener Patienten in vivo steht im Einklang mit den Ergebnissen unserer in-vitro-Untersuchungen. Durch eine selektive Erhöhung der physiologischen Mikrovesikelmenge in Suspensionen aus Plättchen und Neutrophilen konnte die prokoagulatorische Aktivität erheblich gesteigert werden.

4.3 TF auf Plättchen-Mikrovesikeln

Zirkulierende Mikrovesikel entstehen aus unterschiedlichen Zellen wie Leukozyten, Endothelzellen, Plättchen und Erythrozyten. Im gesunden Organismus stellen die Plättchen-Mikrovesikel mit ca. zwei Drittel der Gesamtmenge den möglicherweise größten Anteil (Berckmans, 2001). Wir untersuchten in vitro hergestellte Mikrovesikel unterschiedlicher Genese auf ihren TF-Gehalt. Vergleichbar mit der Situation in den

"Mutterzellen" konnte TF-Protein in Plättchen-Mikrovesikeln, jedoch nicht in Neutrophilen-Mikrovesikeln nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde nach Sorten der zirkulierenden Mikrovesikel anhand ihrer spezifischen Oberflächenproteine, TF-Protein in Mikrovesikeln thrombozytären Ursprungs gefunden. Bei der Untersuchung der funktionellen Aktivität des Mikrovesikel-assoziierten TF stellte sich heraus, daß auch Plättchenmikrovesikel nur in Anwesenheit von Plättchen und Neutrophilen eine prokoagulatorische Wirkung entfalten. Das Vorhandensein von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin auf Plättchen-Mikrovesikeln ermöglicht eine Interaktion mit Leukozyten (Scholz, 2002). Vergleichbar mit Plättchen-Leukozyten-Interaktionen scheint dies die TF-Aktivierung zu fördern (s. u.). Neben dem TF-Gehalt ist die prokoagulatorische Wirkung möglicherweise darin begründet, daß Plättchen-Mikrovesikel eine höhere Dichte von Rezeptoren für Faktoren des Tenase- und des Prothrombinasekomplexes besitzen als Plättchen selbst (Sims, 1988). Mikrovesikel gelten zudem als Transportvehikel. Plättchen-Mikrovesikel sind in der Lage gelöstes Fibrinogen zu binden und zu einem wachsenden Thrombus zu transportieren (Holme, 1998; Morel, 2006).

Auch für die monozytären Mikrovesikel konnten wir eine prokoagulatorische Wirkung feststellen. Die Erklärung liegt vermutlich in der Präparation durch Langzeitstimulation von Monozyten mit LPS. Frühere Studien zeigen, daß Monozyten nach Stimulation mit Endotoxinen neben der Neusynthese von TF auch TF-exprimierende Mikrovesikel freisetzen (Osterud, 2001; Satta, 1994). Zusammengefasst deuten unsere Untersuchungen darauf hin, daß Plättchen-Mikrovesikel für den prokoagulatorischen Effekt der zirkulierenden Mikrovesikel - unter physiologischen Bedingungen - hauptsächlich verantwortlich sind.

4.4 Interaktionen zwischen Plättchen und Neutrophilen

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten durch aktivierte Plättchen ist für das Wachstum von Thromben in vivo von erheblicher Bedeutung. Das Thrombuswachstum beginnt zunächst mit einer Anheftung von Plättchen am Ort der Gefäßverletzung. Gleichzeitig bewegen sich die Neutrophilen langsam an der Oberfläche der aktivierten, P-Selektin exprimierenden Plättchen entlang (rolling) und bleiben schließlich, vermittelt über PSGL-1, haften (membrane tethering) (Buttrum,

1993; Moore, 1995). Im folgenden kommt es über eine Aktivierung des leukozytären $\beta 2$ -Integrins Mac-1 (CD 11b/ CD 18) zu einer festen Verbindung (firm adhesion) zwischen Thrombozyt und neutrophilem Granulozyt (Diacovo, 1996). Diese Verbindung scheint hauptsächlich über eine Fibrinogenbrücke zwischen Mac-1 und dem thrombozytären Integrin-Komplex GPIIb/IIIa stabilisiert zu werden (Weber, 1997). Auf welche Weise Plättchen-Leukozyten-Interaktionen die Gerinnung mit nachfolgender Fibrinbildung beeinflussen, ist noch nicht vollständig geklärt. Interaktionen von Leukozyten und Plättchen können die Fibrinbildung jedoch unter verschiedenen experimentellen Bedingungen fördern (Kirchhofer, 1993). Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, daß eine Blockierung von P-Selektin in vivo neben einer verminderten Anheftung von Leukozyten an Plättchen zu einer Senkung der Fibrinbildung führt (Palabrica, 1992). Hierfür liefert die Beobachtung einer TF-Expression auf Plättchen-Leukozyten-Aggregaten nach Kollagenstimulation (Müller, 2003; Zillmann, 2001) eine mögliche Erklärung. Wir konnten zeigen, daß sowohl die Hemmung des thrombozytären Adhäsionsproteins P-Selektin als auch des leukozytären Counterrezeptors PSGL-1 die TF-Aktivität in Plättchen-Neutrophilen-Mikrovesikel-Suspensionen reduziert. Desgleichen ergaben Arbeiten zur monozytären TF-Expression, daß eine P-Selektin-vermittelte Interaktion mit Plättchen die prokoagulatorische Wirkung des TF verstärken kann (Goel, 2001; Lorenzet, 1998). Die beobachtete Fibrinbildung kann also möglicherweise durch Aktivierung des intravaskulären TF vermittelt sein, welche über eine Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten ermöglicht wird.

Die P-Selektin-vermittelte Adhäsion von Plättchen an Neutrophile wird für die Bildung eines „restricted microenvironment“ verantwortlich gemacht, in welchem lokal hohe Konzentrationen von neutrophilen Sekretionsprodukten vorhanden sind (de Gaetano, 1999; Evangelista, 1991). Insbesondere wurde nach Interaktionen von Neutrophilen mit Plättchen eine erhöhte Sekretion von Sauerstoffradikalen beobachtet (Clark, 1980; Tsuji, 1994). Gleichzeitig bietet der enge Zell-Zell-Kontakt Schutz für neutrophile Proteasen vor Antiproteinasen aus dem Plasma (Evangelista, 1993)(Abb. 22).

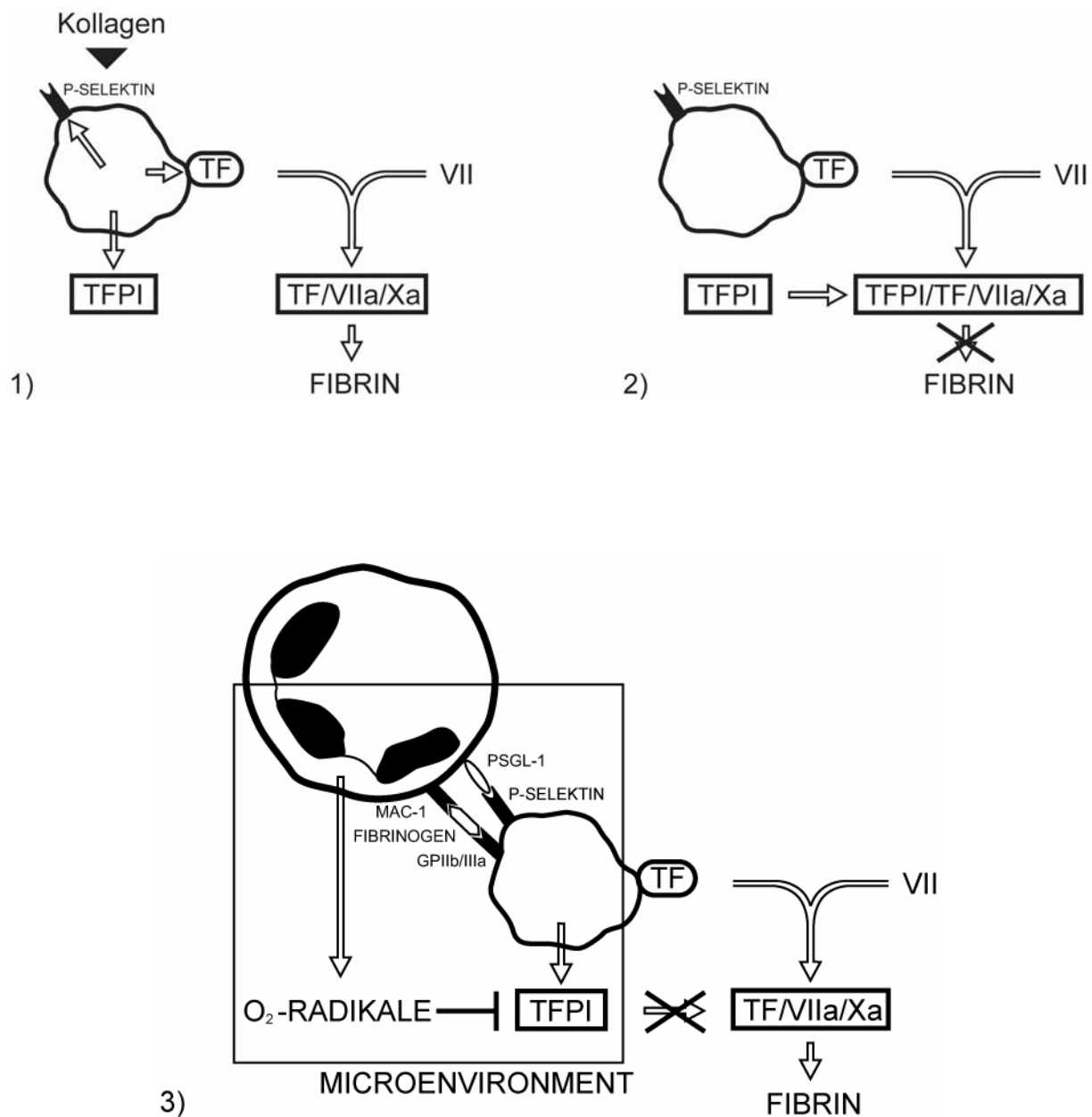


Abb. 22: Bedeutung der Plättchen-Leukozyten-Interaktion für die Fibrinbildung
 1) Plättchenaktivierung durch Kollagen. 2) Bildung des inhibitorischen Xa-TFPI-VIIa-TF-Komplexes 3) Mögliche Inaktivierung von TFPI durch O₂-Radikale aus neutrophilen Granulozyten (prinzipiell nach Engelman, 2003). Auch die prokoagulatorische Aktivität des in aktivierten Neutrophilen exprimierten TF (Ritis, 2006) würde über diesen Mechanismus gezeigt.

4.5 TF-Aktivierung durch neutrophile Sekretionsprodukte: Sauerstoffradikale

Sauerstoffradikale (reactive oxygen species; ROS) werden über das membranständige NADPH-Oxidase System der Neutrophilen aus molekularem Sauerstoff gebildet. Hierbei entstehen Superoxidradikale ($O_2^{\cdot-}$), Hydrogenperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale ($OH\cdot$), die in unterschiedlicher Konzentration ins Plasma abgegeben werden. Neben der Abtötung fremder Erreger im Organismus können ROS die Adhäsion von Plättchen verstärken und zusammen mit neutrophilen Proteasen deren Aggregation und Sekretion bewirken. Im Gegenzug fördern aktivierte Plättchen die Freisetzung von ROS (Bazzoni, 1991; Nagata, 1993).

Wir konnten durch eine enzymvermittelte Senkung der ROS-Konzentration die Aktivität des Plättchen- und Mikrovesikel-assoziierten TF deutlich vermindern. Die Wirkung der radikalspaltenden Enzyme zeigte sich sowohl im Vollblut als auch in einer Suspension aus isolierten Plättchen, Neutrophilen und Mikrovesikeln. Schon vor unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß Hydrogenperoxid kryptischen TF auf der Oberfläche von glatten Muskelzellen der Gefäßwand aktivieren kann (Penn, 1999). Kürzlich postulierten Chen et al. eine Aktivierung von TF auf der Zelloberfläche durch Oxidation. Nach Kurzzeitstimulation mit oxidierenden Substanzen wurde die Ausbildung von Disulfid-Brücken im membrannahen Teil der extrazellulären Domäne des TF-Proteins beobachtet, was mit einer erheblichen Zunahme der prokoagulatorischen Aktivität einherging (Chen, 2006). Wir vermuten zudem, daß Sauerstoffradikale – ähnlich wie neutrophile Proteasen – in der Lage sind, TFPI zu inaktivieren, der in größeren Mengen von aktivierten Thrombozyten sezerniert wird. In Übereinstimmung hiermit beobachteten Lesnik et al. (Lesnik, 1995), daß an LDL gebundener TFPI durch Sauerstoffradikale gehemmt werden kann.

Da Adhäsionen zwischen Plättchen und Neutrophilen für die TF-Aktivierung notwendig sind, könnten auch Adhäsionsmoleküle Angriffspunkt der Sauerstoffradikale darstellen. Sellak et al. (Sellak, 1994) postulierten eine schnelle Zunahme der Adhäsion von Endothelzellen an Neutrophile nach Inkubation mit Sauerstoffradikalen. Mittels flowcytometrischer Messungen konnte jedoch bereits gezeigt werden, daß Sauerstoffradikale die Adhäsion von Plättchen an Neutrophile nicht beeinflussen (Daten nicht gezeigt).

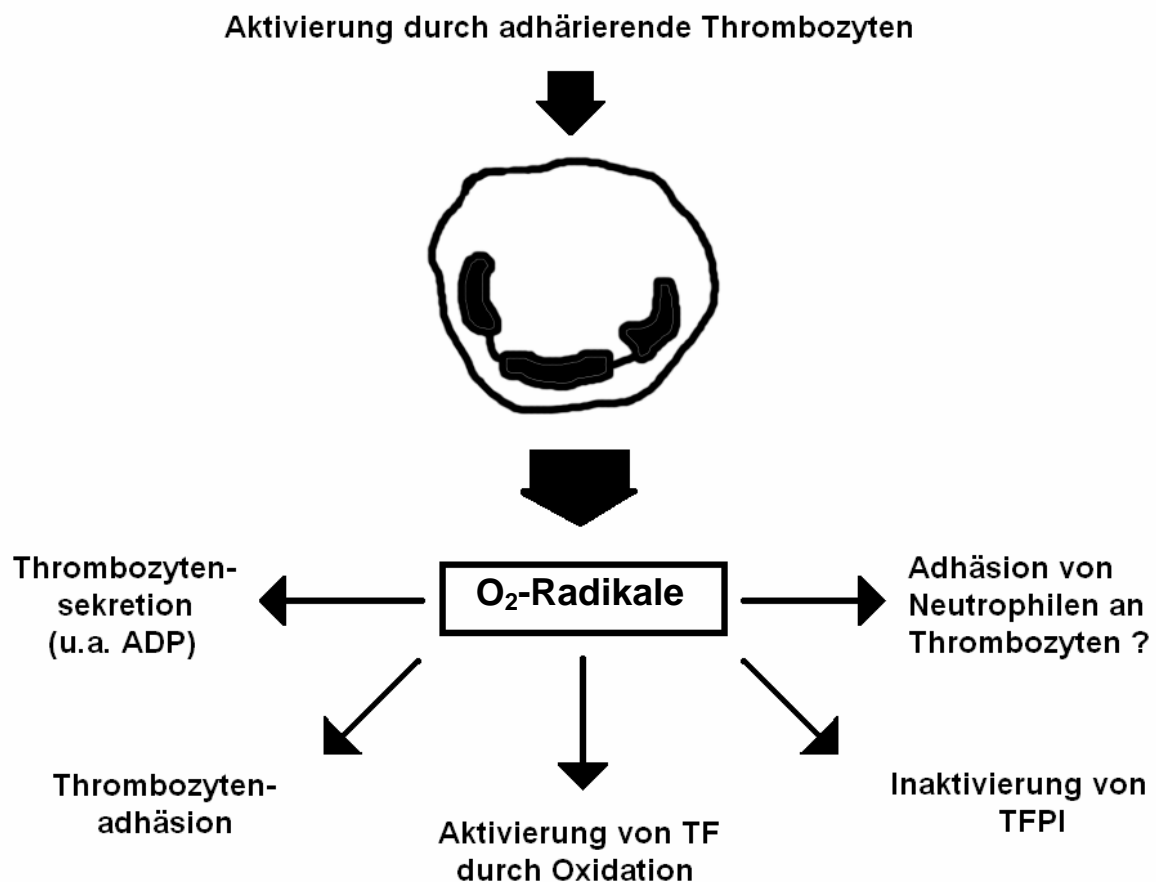


Abb. 23: Mögliche Angriffspunkte für die von neutrophilen Granulozyten sezernierten O_2 -Radikale im Rahmen der TF-Aktivierung

4.6 Tissue-Factor-Aktivierung über ADP-Rezeptoren

Frühere Untersuchungen (s. o.) haben gezeigt, daß Plättchen TF enthalten, der möglicherweise im Rahmen der Plättchenaktivierung ins Plasma abgegeben werden kann (Müller, 2003; Scholz, 2002; Siddiqui, 2002). Da ADP bei der Plättchenaktivierung eine Verst rkerfunktion innehat, untersuchten wir, ob ADP bzw. ADP-Rezeptoren die Aktivität des intravaskulären TF beeinflussen. Unter In-vivo-Bedingungen ist der Kontakt von Plättchen mit subendotheliale Kollagen der Hauptauslöser für die ADP-vermittelte Plättchenaktivierung. Tatsächlich führte eine Blockade der ADP-Rezeptoren $P2Y_1$ und $P2Y_{12}$ (siehe Einleitung) zu einem deutlichen Rückgang der prokoagulatorischen Aktivität in kollagenstimulierten Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen. Als Inhibitoren wurden MRS-2179 und AR-

C69931MX eingesetzt, die selektiv P2Y₁ bzw. P2Y₁₂ blockieren (Moro, 1998; Ingall, 1999). Beide Substanzen konnten die TF-Aktivität etwa auf die Hälfte reduzieren. Unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführte ex vivo Analysen nach Blockade des P2Y₁₂-Rezeptors, in diesem Fall durch Clopidogrel, einem Standardpräparat zur Sekundärprophylaxe nach Herzinfarkt, zeigten ebenso eine teilweise Hemmung der TF-Aktivität. Der inhibitorische Effekt von Clopidogrel war jedoch weniger ausgeprägt als die Blockade von P2Y₁₂ mit AR-C69931MX in vitro. Die Ursache hierfür liegt vermutlich in der für die Studie verwendeten Standarddosierung von Clopidogrel, die nur eine unvollständige Hemmung der ADP-vermittelten Plättchenaktivierung bewirken kann (Cadroy, 2000). Bisher existieren noch keine Pharmaka, mit denen eine Blockade des P2Y₁-Rezeptors ex vivo geprüft werden könnte. Eine verlängerte Blutungszeit aufgrund einer verminderten Plättchenaggregation wurde sowohl in P2Y₁-defizienten Mäusen als auch in Patienten mit einem genetischen Defekt des P2Y₁₂-Rezeptors gefunden (Fabre, 1999; Hollopeter, 2001; Leon, 1999). Auf welchem Wege ADP die TF-Aktivität fördert, muß noch geklärt werden. Wie alle Plättchenagonisten kann ADP im Rahmen der Plättchenaktivierung eine Freisetzung von alpha-Granula induzieren (Siess, 1989). Alpha-Granula enthalten neben P-Selektin, wie kürzlich gezeigt wurde, auch TF, der nach Kollagenstimulation auf der Plättchenoberfläche präsentiert wird (Leon, 2004). Eine mögliche Erklärung liegt auch in der Fähigkeit von ADP, über den P2Y₁₂-Rezeptor die Bildung von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten zu fördern. Sowohl in vitro als auch ex vivo führte die Hemmung des P2Y₁₂-Rezeptors mit AR-C69931MX bzw. Clopidogrel zu einer verminderten Expression von P-Selektin und einer Reduzierung der Plättchen-Leukozyten-Aggregate (Storey, 2002; Klinkhardt, 2002). Zusammenfassend deuten unsere Daten daraufhin, daß ADP - möglicherweise über die Freisetzung von TF und/oder die vermehrte Bildung von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten - eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung des intravaskulären TF spielt.

4.7 Tissue Factor und Aspirin

In unseren ex vivo Untersuchungen konnte Aspirin den TF-vermittelten Gerinnungsstart auf der Plättchenoberfläche nicht hemmen. Die Anwesenheit von sogenannten „Aspirin-Non-Respondern“ unter den Probanden konnten durch

Messungen mittels Platelet Function Analyzer weitgehend ausgeschlossen werden. Alle Probanden zeigten eine zu erwartende Einschränkung der Thrombozytenfunktion nach Aspiringabe. Bereits eine Einmaldosis von 100 mg Aspirin blockiert über die irreversible Hemmung der Cyclooxygenase 1 (COX-1) die Biosynthese des Plättchenagonisten Thromboxan A₂ (Roth, 1975). Plättchen synthetisieren und sezernieren Thromboxan A₂ nach Stimulation mit Thrombin, Kollagen oder ADP. Thrombin ist jedoch auch in Abwesenheit von Thromboxan A₂ in der Lage, Plättchen zu aktivieren (Clutton, 2001). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnte auch in früheren Studien kein Hinweis für eine Beteiligung von Thromboxan A₂ bei der TF-vermittelten Thrombinbildung gefunden werden (Butenas, 2001; Kjalke, 1997). Darüber hinaus ist bereits bekannt, daß die Bildung von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten sowie die Expression von P-Selektin durch Aspirin nicht gehemmt werden kann (Storey, 2002). Aufgrund der Ergebnisse anderer Autoren und eigener Beobachtungen ist es sehr unwahrscheinlich, daß Aspirin die Aktivität des intravaskulären TF beeinflusst.

4.8 Aktivierungsmodell für den intravaskulären Tissue Factor

Unsere bisherigen Beobachtungen ermöglichen es, ein Aktivierungsmodell für den intravaskulären Tissue Factor zu postulieren. Durch Stimulation von Plättchen mit Kollagen kommt es zur Freisetzung von ADP sowie zur Degranulation von alpha-Granula, wobei unter anderem Tissue Factor und P-Selektin freigesetzt bzw. auf der Plättchenoberfläche präsentiert werden. ADP übernimmt im Zuge einer positiven Rückkopplung eine Verstärkerfunktion bei der Degranulation von alpha-Granula und ist so in der Lage die TF-Präsentation zu fördern. Zusätzlich kommt es zur Abscherung von Plättchen-Mikrovesikeln, die sowohl TF als auch P-Selektin präsentieren. Sie unterstützen nach Anheftung an Leukozyten zusammen mit präformierten zirkulierenden Mikrovesikeln die prokoagulatorische Aktivität im Gefäß. Durch Kontakt von thrombozytärem TF mit dem plasmatischen Faktor VII kommt es über den TF/Faktor VIIa-Komplex zur Aktivierung des Faktors X mit nachfolgender Fibrinbildung. Gleichzeitig setzen aktivierte Plättchen TFPI frei, der den ternären TF/Faktor VIIa/FaktorXa-Komplex inhibiert.

Vermittelt über eine P-Selektin-abhängige Adhäsionskaskade lagern sich neutrophile Granulozyten bzw. Monozyten an die aktivierten Thrombozyten und Mikrovesikel an.

Aufgrund des engen Kontakts zwischen den Zellmembranen kommt es zur Bildung eines sogenannten „microenvironment“. Ausgelöst durch die Zellinteraktion werden in diesen Raum große Mengen Sauerstoffradikale sezerniert, die in der Lage sind, sowohl TFPI zu hemmen als auch TF durch Oxidation direkt zu aktivieren.

4.9 Ausblick

In dieser Arbeit wurde der Aktivierungsmechanismus des intravaskulären Tissue Factor weiter aufgeklärt. Im Verlauf der Arbeit ergaben sich jedoch verschiedene Detailfragen, die Gegenstand zukünftiger Forschung sein werden. So ist beispielsweise das Zusammenspiel neutrophiler Proteasen und Sauerstoffradikale bei der Aktivierung von TF bzw. der Inaktivierung von TFPI noch nicht vollständig geklärt. Auch ist unklar welche Rolle intravaskulärer TF bei der Pathogenese von thromboembolischen Ereignissen spielt. Da bisher keine lebenden Menschen mit einem Defekt im Tissue Factor Gen bekannt sind, muß die In-vivo-Relevanz des zirkulierenden TF einschließlich der Aktivierungsmechanismen noch in Tiermodellen bestätigt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Subendothelial lokalisierter Tissue Factor bildet das wichtigste Startsignal für die Blutgerinnung. Unter physiologischen Bedingungen verhindert die Endothelbarriere den Kontakt von TF mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren und damit den Gerinnungsstart. Neue Untersuchungen haben gezeigt, daß präformierter TF in ruhenden Plättchen gespeichert ist. Nach Kontakt mit Kollagen wird dieser TF auf der Plättchenoberfläche und auf zirkulierenden Mikrovesikeln exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit fanden wir, daß für die funktionelle Aktivierung des intravaskulären TF Interaktionen von Plättchen, Neutrophilen und Mikrovesikeln notwendig sind. Die TF-Aktivität sowie die TF-abhängige Fibrinbildung wurden in einem System aus isolierten Blutzellen und parallel in einem der In-vivo-Situation nahestehenden Vollblutsystem gemessen. Neben zirkulierenden Mikrovesikeln wurden auch in vitro hergestellte Mikrovesikel eingesetzt und mittels ELISA auf ihren TF-Gehalt untersucht. Dabei zeigte sich, daß in Analogie zu den „Mutterzellen“ Plättchen-Mikrovesikel TF enthalten, während in Neutrophilen-Mikrovesikeln kein TF nachweisbar war. Die Förderung der thrombozytären TF-Aktivität durch Neutrophile lässt sich vermutlich durch die Fähigkeit der Leukozyten erklären mittels sezernierter Sauerstoffradikale (und Proteasen) TF zu aktivieren und seinen physiologischen Antagonisten TFPI zu hemmen. TFPI ist ein physiologischer Antagonist des TF, der von aktivierten Thrombozyten sezerniert wird. Für die Aktivierung des thrombozytären TF ist die Adhäsion von Plättchen an Leukozyten notwendig. Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle für den Plättchen-Leukozyten-Kontakt, wie P-Selektin oder PSGL-1, reduzierten die TF-Aktivität. Da das von aktivierten Plättchen sezernierte ADP die Plättchen-Leukozyten-Adhäsion und die TF-Freisetzung aus alpha-Granula fördert, bildet das ADP-System ein interessantes Ziel für pharmakologische Interventionen. Tatsächlich konnte durch Blockierung des ADP-Rezeptors P2Y₁₂ die Aktivität des blutassoziierten TF merklich gesenkt werden. Dies wurde im Rahmen einer Studie mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel ex vivo und in in-vitro-Analysen beobachtet. Zusammen mit früheren Arbeiten ermöglicht die vorliegende Studie eine substantielle Erweiterung des Modells der schnellen Aktivierung der Blutgerinnung durch intravaskulären TF.

Der im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Aktivierungsmechanismus zeigt, daß das ADP-Amplifikationssystem der Thrombozyten und Sauerstoffradikale der

Neutrophilen von erheblicher Bedeutung für die Aktivierung des intravaskulären TF sind. Für die pathologische Bedeutung dieser im Rahmen thromboembolischer Ereignisse bestehen bereits zahlreiche Hinweise.

6. LITERATURVERZEICHNIS

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

Astrup T. Assay and content of tissue thromboplastin in different organs. *Thromb Diath Haemorrh.* 1965; 14: 401-416.

Bach RR. Tissue Factor Encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 456-461.

Bach RR. Mechanism of tissue factor activation on cells. *Blood Coagulation & Fibrinolysis.* 1998; 9: 37-43.

Bach R, Rifkin DB. Expression of tissue factor procoagulant activity: regulation by cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 6995-6999.

Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, Bajaj SP. Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.* 2001; 86: 959-972.

Banner DW, D'Arcy A, Chene C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchhofer D. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature.* 1996; 380: 41-46.

Bazzoni G, Dejana E, Del Maschio A. Platelet-neutrophil interactions: possible relevance in the pathogenesis and inflammation. *Haematologica.* 1991; 76: 491-499

Belaouaj AA, Li A, Wun TC, Welgus HG, Shapiro SD. Matrix metalloproteinases cleave tissue factor pathway inhibitor. Effects on coagulation. *J Biol Chem.* 2000; 275: 27123-27128.

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

Bom VJ, van Hinsbergh VW, Reinalda-Poot HH, Mohanlal RW, Bertina RM. Extrinsic activation of human coagulation factors IX and X on the endothelial surface. *Thromb Haemost.* 1991; 66: 283-291.

- Brower MS, Harpel PC. Proteolytic cleavage and inactivation of alpha 2-plasmin inhibitor and C1 inactivator by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J Biol Chem*. 1982; 257: 9849-9854.
- Broze GJ, Jr., Girard TJ, Novotny WF. Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry*. 1990; 29: 7539-7546.
- Broze GJ, Jr., Lange GW, Duffin KL, MacPhail L. Heterogeneity of plasma tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994; 5: 551-559.
- Broze GJ, Jr., Miletich JP. Characterization of the inhibition of tissue factor in serum. *Blood*. 1987; 69: 150-155.
- Butenas S, Cawthern KM, van't Veer C, DiLorenzo ME, Lock JB, Mann KG. Antiplatelet agents in tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*. 2001; 97: 2314-2322.
- Butenas S, van 't Veer C, Mann KG. Evaluation of the initiation phase of blood coagulation using ultrasensitive assays for serine proteases. *J Biol Chem*. 1997; 272: 21527-21533.
- Buttrum SM, Hatton R, Nash GB. Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood*. 1993; 82: 1165-1174
- Cadroy Y, Dupouy D, Boneu B, Plaisancie H. Polymorphonuclear leukocytes modulate tissue factor production by mononuclear cells: role of reactive oxygen species. *J Immunol*. 2000; 164: 3822-3828.
- Calatzis An, Kling M, Calatzis AI, Mielke L, Hippl R, Stemberger A. Fast and specific coagulation monitoring through modified thrombelastography. *Ann of Hematol*. 1996; Suppl. 92.
- Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res*. 1996; 81: 1-41.
- Camire RM, Pollak ES, Kaushansky K, Tracy PB. Secretable human platelet-derived factor V originates from the plasma pool. *Blood*. 1998; 92: 3035-3041.
- Carson SD, Johnson DR. Consecutive enzyme cascades: complement activation at the cell surface triggers increased tissue factor activity. *Blood*. 1990; 76: 361-367.

Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br J Haematol.* 1997; 96: 458-463.

Cerletti C, Evangelista V, De Gaetano G. Polymorphonuclear leucocyte-dependent modulation of platelet function: relevance to the pathogenesis of thrombosis. *Pharmacol Res.* 1992; 26: 261-268.

Chen VM, Ahamed J, Versteeg HH, Berndt MC, Ruf W, Hogg PJ. Evidence for Activation of Tissue Factor by an Allosteric Disulfide Bond. *Biochemistry.* 2006; 45: 12020-12028.

Clark RA, Klebanoff SJ. Neutrophil-platelet interaction mediated by myeloperoxidase and hydrogen peroxide. *J Immunol.* 1980; 124: 399-405.

Clutton P, Folts JD, Freedman JE. Pharmacological control of platelet function. *Pharmacol Res.* 2001; 44: 255-264.

Cunningham AC, Hasty KA, Enghild JJ, Mast AE. Structural and functional characterization of tissue factor pathway inhibitor following degradation by matrix metalloproteinase-8. *Biochem J.* 2002; 367: 451-458.

Daniel JL, Dangelmaier C, Jin J, Ashby B, Smith JB, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem.* 1998; 273: 2024-2029.

Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science.* 1964; 145: 1310-1312.

de Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V. Recent advances in platelet-polymorphonuclear leukocyte interaction. *Haemostasis.* 1999; 29: 41-49.

Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF, Jr. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest.* 1989; 84: 678-685.

Denis MM, Tolley ND, Bunting M et al. Escaping the Nuclear Confines: Signal-Dependent Pre-mRNA Splicing in Anucleate Platelets. *Cell.* 2005; 122: 379-391

Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood.* 1996; 88: 146-157.

Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol.* 1989; 134: 1087-1097.

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

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

Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, Martelli N, Polischuk R, McGregor JL, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18. *Blood.* 1996; 88: 4183-4194.

Evangelista V, Piccardoni P, White JG, de Gaetano G, Cerletti C. Cathepsin G-dependent platelet stimulation by activated polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by antiproteases: role of P-selectin mediated cell-cell adhesion. *Blood.* 1993; 81: 2947-2957.

Evangelista V, Rajtar G, de Gaetano G, White JG, Cerletti C. Platelet activation by fMLP-stimulated polymorphonuclear leukocytes: the activity of cathepsin G is not prevented by antiproteases. *Blood.* 1991; 77: 2379-2388.

Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, Koller BH. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med.* 1999; 5: 1199-1202.

Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI, Varki N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res.* 1990; 59: 421-437.

Gachet C, Cazenave JP, Ohlmann P, Bouloux C, Defreyn G, Driot F, Maffrand JP. The thienopyridine ticlopidine selectively prevents the inhibitory effects of ADP but not of adrenaline on cAMP levels raised by stimulation of the adenylate cyclase of human platelets by PGE1. *Biochem Pharmacol.* 1990; 40: 2683-2687.

Gachet C, Hechler B, Leon C, Vial C, Leray C, Ohlmann P, Cazenave JP. Activation of ADP receptors and platelet function. *Thromb Haemost.* 1997; 78: 271-275.

Gailani D, Broze GJ, Jr. Factor XII-independent activation of factor XI in plasma: effects of sulfatides on tissue factor-induced coagulation. *Blood.* 1993; 82: 813-819.

Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 2311-2315.

Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, Likert KM, Brown SG, Miletich JP, Broze GJ, Jr. Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature.* 1989; 338: 518-520.

Goel MS, Diamond SL. Neutrophil enhancement of fibrin deposition under flow through platelet-dependent and -independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 2093-2098.

Greeno EW, Bach RR, Moldow CF. Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. *Lab Invest.* 1996; 75: 281-289.

Gregory SA, Edgington TS. Tissue factor induction in human monocytes. Two distinct mechanisms displayed by different alloantigen-responsive T cell clones. *J Clin Invest.* 1985; 76: 2440-2445.

Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998; 92: 3007-3017.

Handagama P, Rappolee DA, Werb Z, Levin J, Bainton DF. Platelet alpha-granule fibrinogen, albumin, and immunoglobulin G are not synthesized by rat and mouse megakaryocytes. *J Clin Invest.* 1990; 86: 1364-1368.

Harlos K, Martin DM, O'Brien DP, Jones EY, Stuart DI, Polikarpov I, Miller A, Tuddenham EG, Boys CW. Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. *Nature.* 1994; 370: 662-666.

Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood.* 1999; 94: 3791-3799.

Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry R, Murphy G, Humphries S. Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 8154-8158.

Higuchi DA, Wun TC, Likert KM, Broze GJ, Jr. The effect of leukocyte elastase on tissue factor pathway inhibitor. *Blood*. 1992; 79: 1712-1719.

Hojima Y, Pierce JV, Pisano JJ. Hageman factor fragment inhibitor in corn seeds: purification and characterization. *Thromb Res*. 1980; 20: 149-162.

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

Holme PA, Solum NO, Brosstad F, Pedersen T, Kveine M. Microvesicles bind soluble fibrinogen, adhere to immobilized fibrinogen and coaggregate with platelets. *Thromb Haemost*. 1998; 79:389-394

Ingall AH, Dixon J, Bailey A, Coombs ME, Cox D, McInally JI, Hunt SF, Kindon ND, Teobald BJ, Willis PA, Humphries RG, Leff P, Clegg JA, Smith JA, Tomlinson W. Antagonists of the platelet P2T receptor: a novel approach to antithrombotic therapy. *J Med Chem*. 1999; 42: 213-220

Iuliano L, Pedersen JZ, Pratico D, Rotilio G, Violi F. Role of hydroxyl radicals in the activation of human platelets. *Eur J Biochem*. 1994; 221: 695-704.

Jantzen HM, Gousset L, Bhaskar V, Vincent D, Tai A, Reynolds EE, Conley PB. Evidence for two distinct G-protein-coupled ADP receptors mediating platelet activation. *Thromb Haemost*. 1999; 81: 111-117.

Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem*. 1998; 273: 2030-2034.

Jordan RE, Kilpatrick J, Nelson RM. Heparin promotes the inactivation of antithrombin by neutrophil elastase. *Science*. 1987; 237: 777-779.

Kalafatis M, Swords NA, Rand MD, Mann KG. Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1227: 113-129.

Kato H. Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor: basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 539-548.

Khokha R, Denhardt DT. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases: a review of their role in tumorigenesis and tissue invasion. *Invasion Metastasis.* 1989; 9: 391-405.

Kirchhofer D, Sakariassen KS, Clozel M, Tschopp TB, Hadvary P, Nemerson Y, Baumgartner HR. Relationship between tissue factor expression and deposition of fibrin, platelets, and leukocytes on cultured endothelial cells under venous blood flow conditions. *Blood.* 1993; 81: 2050-2058.

Kjalke M, Oliver JA, Monroe DM, Hoffman M, Ezban M, Hedner U, Roberts HR. The effect of active site-inhibited factor VIIa on tissue factor-initiated coagulation using platelets before and after aspirin administration. *Thromb Haemost.* 1997; 78: 1202-1208.

Klinkhardt U, Graff J, Harder S. Clopidogrel, but not abciximab, reduces platelet leukocyte conjugates and P-selectin expression in a human ex vivo in vitro model. *Clin Pharmacol Ther.* 2002; 71: 176-185

Lammle B, Wuillemin WA, Huber I, Krauskopf M, Zurcher C, Pflugshaupt R, Furlan M. Thromboembolism and bleeding tendency in congenital factor XII deficiency--a study on 74 subjects from 14 Swiss families. *Thromb Haemost.* 1991; 65: 117-121.

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

Leon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, Dierich A, LeMeur M, Cazenave JP, Gachet C. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest.* 1999; 104: 1731-1737.

Lesnik P, Dentan C, Vonica A, Moreau M, Chapman MJ. Tissue factor pathway inhibitor activity associated with LDL is inactivated by cell- and copper-mediated oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 1121-1130.

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

Lorenzet R, Napoleone E, Celi A, Pellegrini G, Di Santo A. Cell-cell interaction and tissue factor expression. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998; 9 Suppl 1: S49-59.

Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature*. 1964; 202: 498-499.

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

Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000; 101: 841-843.

Mallet SV, Cox DJ. Thrombelastography. *Br J Anaesth*. 1992; 69: 307-313.

Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb Haemost*. 1999; 82: 165-174.

McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest*. 1997; 100: S97-103.

Mills DC, Puri R, Hu CJ, Minniti C, Grana G, Freedman MD, Colman RF, Colman RW. Clopidogrel inhibits the binding of ADP analogues to the receptor mediating inhibition of platelet adenylate cyclase. *Arterioscler Thromb*. 1992; 12: 430-436.

Mine S, Yamazaki T, Miyata T, Hara S, Kato H. Structural mechanism for heparin-binding of the third Kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor. *Biochemistry*. 2002; 41: 78-85.

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.

Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, Komiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S. High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood*. 1996; 88: 3456-3464.

Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol*. 1995; 128: 661-671.

Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM. Procoagulant Microparticles: Disrupting the Vascular Homeostasis Equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 2594-2604

Moro S, Guo D, Camaioni E, Boyer JL, Harden TK, Jacobson KA. Human P2Y₁ receptor: molecular modeling and site-directed mutagenesis as tools to identify agonist and antagonist recognition sites. *J Med Chem.* 1998; 41: 1456-1466

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

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

Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999; 274: 21491-21494.

Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, Hanai N, Irimura T. Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). *J Immunol.* 1993; 151: 3267-3273.

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: 7353-7358.

Nemerson Y, Bach R. Tissue factor revisited. *Prog Hemost Thromb.* 1982; 6: 237-261.

Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood.* 2000; 95: 930-935.

Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PG, ten Have K, Eijssman L, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation.* 1997; 96: 3534-3541.

Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ, Jr. Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood.* 1988; 72: 2020-2025.

Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ, Jr. Purification and characterization of the lipoprotein-associated coagulation inhibitor from human plasma. *J Biol Chem.* 1989; 264: 18832-18837.

Osterud B. The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Semin Hematol.* 2001; 38: 2-5.

Osterud B, Rao LV, Olsen JO. Induction of tissue factor expression in whole blood: lack of evidence for the presence of tissue factor expression in granulocytes. *Thromb Haemost.* 2000; 83: 861-867.

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

Paborsky LR, Caras IW, Fisher KL, Gorman CM. 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.

Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature.* 1992; 359: 848-851.

Penn MS, Patel CV, Cui MZ, DiCorleto PE, Chisolm GM. LDL increases inactive tissue factor on vascular smooth muscle cell surfaces: hydrogen peroxide activates latent cell surface tissue factor. *Circulation.* 1999; 99: 1753-1759.

Petersen LC, Bjorn SE, Nordfang O. Effect of leukocyte proteinases on tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost.* 1992; 67: 537-541.

Petersen LC, Bjorn SE, Olsen OH, Nordfang O, Norris F, Norris K. Inhibitory properties of separate recombinant Kunitz-type-protease-inhibitor domains from tissue-factor-pathway inhibitor. *Eur J Biochem.* 1996; 235: 310-316.

Rapaport SI, Rao LV. Initiation and regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Arterioscler Thromb.* 1992; 12: 1111-1121.

Reininger AJ, Heijnen HF, Schumann H, Specht HM, Schramm W, Ruggeri ZM. Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood.* 2006; 107: 3537-3545.

- Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR. Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood*. 1991; 78: 1760-1769.
- Ritis K, Doumas M, Mastellos D, Micheli A, Giaglis S, Magotti P, Rafail S, Kartalis G, Sideras P, Lambris JD. A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol*. 2006; 177: 4794-7802.
- Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. *Semin Thromb Hemost*. 2006; 32 Suppl 1: 32-38.
- Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest*. 1975; 56: 624-632.
- Ruef J, Peter K, Nordt TK, Runge MS, Kubler W, Bode C. Oxidative stress and atherosclerosis: its relationship to growth factors, thrombus formation and therapeutic approaches. *Thromb Haemost*. 1999; 82 Suppl 1: 32-37.
- Sanders NL, Bajaj SP, Zivelin A, Rapaport SI. Inhibition of tissue factor/factor VIIa activity in plasma requires factor X and an additional plasma component. *Blood*. 1985; 66: 204-212.
- Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med*. 2002; 196: 679-691.
- Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, Hedman H, Freyssinet JM. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol*. 1994; 153: 3245-3255.
- Scarpati EM, Wen D, Broze GJ, Jr., Miletich JP, Flandermeyer RR, Siegel NR, Sadler JE. Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry*. 1987; 26: 5234-5238.
- 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: 1033-1038.
- Schwartz BS, Edgington TS. Immune complex-induced human monocyte procoagulant activity. I. a rapid unidirectional lymphocyte-instructed pathway. *J Exp Med*. 1981; 154: 892-906.

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

Sellak H, Franzini E, Hakim J, Pasquier C. Reactive oxygen species rapidly increase endothelial ICAM-1 ability to bind neutrophils without detectable upregulation. *Blood*. 1994; 83: 2669-2677.

Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets*. 2002; 13: 247-253.

Sie P, Dupouy D, Dol F, Boneu B. Inactivation of heparin cofactor II by polymorphonuclear leukocytes. *Thromb Res*. 1987; 47: 657-664.

Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev*. 1989; 69: 58-178.

Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 2000; 5: 415-418.

Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ. Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem*. 1988; 263: 18205-18212

Solum NO. Procoagulant expression in platelets and defects leading to clinical disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 2841-2846.

Storey RF, Judge HM, Wilcox RG, Heptinstall S. Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y₁₂ receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin. *Thromb Haemost*. 2002; 88: 488-494.

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

Taubman MB, Giesen PL, Schechter AD, Nemerson Y. Regulation of the procoagulant response to arterial injury. *Thromb Haemost*. 1999; 82: 801-805.

Tsuji T, Nagata K, Koike J, Todoroki N, Irimura T. Induction of superoxide anion production from monocytes and neutrophils by activated platelets through the P-selectin-sialyl Lewis X interaction. *J Leukoc Biol*. 1994; 56: 583-587.

Valentin S, Nordfang O, Bregengard C, Wildgoose P. Evidence that the C-terminus of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) is essential for its in vitro and in vivo interaction with lipoproteins. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1993; 4: 713-720.

van der Logt CP, Dirven RJ, Reitsma PH, Bertina RM. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in monocytes in response to bacterial lipopolysaccharide and phorbol ester. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994; 5: 211-220.

von dem Borne PA, Koppelman SJ, Bouma BN, Meijers JC. Surface independent factor XI activation by thrombin in the presence of high molecular weight kininogen. *Thromb Haemost*. 1994; 72: 397-402.

Vorweg M, Calatzis A, Schindler A, Doehn M. Management of coagulation in multiple trauma patients using a new monitoring method. *Hemost Thromb*. 1999; Suppl 2538.

Weber C, Springer TA. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to α IIb β 3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest*. 1997; 100: 2085-2093.

Wesselschmidt R, Likert K, Girard T, Wun TC, Broze GJ, Jr. Tissue factor pathway inhibitor: the carboxy-terminus is required for optimal inhibition of factor Xa. *Blood*. 1992; 79: 2004-2010.

Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86: 2839-2843.

Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost*. 1999; 81: 1-7.

Zillmann A, Luther T, Muller I, Kotzsch M, Spannagl M, Kauke T, Oelschlagel U, Zahler S, Engelmann B. Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 281: 603-609.

7. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. B. Engelmann, der mir nicht nur die Möglichkeit zur vorliegenden Dissertation gab, sondern mich jederzeit auf zuvorkommende Weise beriet und leitete.

Herzlich danken möchte ich auch Prof. Dr. med. W. Schramm, Priv.-Doz. Dr. med. M. Spannagl und Dr. med. K. Kilgert für ihre tatkräftige Unterstützung bei der klinischen Studie.

Ich bedanke mich ferner bei Herrn PD Dr. T. Luther, Institut für Pathologie TU Dresden für die Kooperation bei den Double-Sandwich-ELISA-Bestimmungen und die Bereitstellung von Antikörpern.

Schliesslich danke ich ganz besonders meinen Mitdoktoranden Dr. rer. nat. Ingrid Müller und T. Moosbauer sowie den unzähligen "Blutspendern", ohne deren Engagement diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Und natürlich: DANKE MEIKE!

8. LEBENSLAUF

ANTJE KLOCKE

geboren am 27. März 1976

in Starnberg

Eltern: Dr. rer. nat. Helmut Klocke, Physiker
Gunild Klocke, Oberstudienrätin

Kind: Carlotta Malwine Mammen, geb. 05.03.2005

SCHULAUSBILDUNG

09/1982 – 06/1986 Besuch der Volksschule Pöcking am Starnberger See

09/1986 – 06/1995 Besuch des Gymnasiums Tutzing

Juni 1995 Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

10/1996 – 03/1998 Studium der Architektur an der Technischen Universität München

1998-2004 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München

November 2004 Drittes Staatsexamen

PROMOTIONSARBEIT

4/2001 - 3/2008 Promotionsarbeit am Physiologischen Institut der Ludwigs-Maximilian-Universität München
Experimenteller Teil: 2001-2002

ÄRZTLICHE TÄTIGKEIT

seit Februar 2006 Assistenzärztin in der Augenklinik Herzog Carl Theodor,
Praxis Prof. Riedel/Prof. Heider