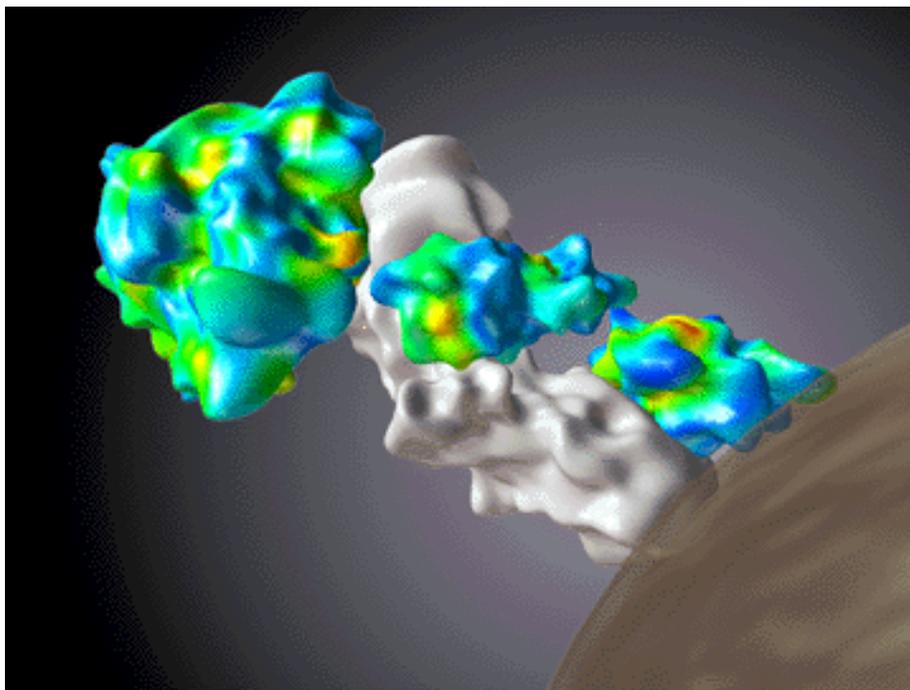


Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Funktion und Aktivierungsmechanismus eines schnell aktivierbaren intravaskulären Tissue Factor-Systems



von
Ingrid Müller
aus München
2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. med. Bernd Engelmann betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 13. Januar 2002.



.....
(Unterschrift des Autors)

Dissertation eingereicht am 16.01.2003

1. Gutachter	Prof. Dr. med. Bernd Engelmann
2. Gutachter	Prof. Dr. Martin Biel
Mündliche Prüfung am	13.03.2003

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

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

Zieseniss S, Zahler S, Müller I, Hermetter A, Engelmann B. Modified phosphatidylethanolamine as the active component of oxidized low density lipoprotein promoting platelet prothrombinase activity. *J Biol Chem* (2001), 276: 19828-19835.

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 (in Druck)*

Engelmann B, Luther T, Müller I. Intravascular tissue factor pathway - a model for rapid initiation of coagulation within the blood. *Thromb Haemost (in Druck)*

Kongressbeiträge:

Müller I, Zillmann A, Kotzsch M, Spannagl M, Zahler S, Luther T, Engelmann B. Platelet tissue factor mediates leukocyte triggered blood coagulation. 79^{er}. Kongreß der Deutschen Physiologischen Gesellschaft. 19.-22. März 2000, Universität Ulm, Deutschland. *Eur J Physiol* (2000) Suppl. 439: R 287.

Müller I, Zillmann A, Kauke T, Spannagl M, Zahler S., Luther T, Engelmann B. Collagen rapidly activates tissue factor in platelet-leukocyte complexes. XV European Symposium on blood platelets. 19.-22. Oktober 2000, Bischoffsheim. *Platelets* (2001) 12, 39-57.

Müller I, Zillmann A, Kotzsch M, Spannagl M, Zahler S, Luther T, Engelmann B. Collagen rapidly triggers the rapid activation of platelet-associated tissue factor. XVIII ISTH Congress, Paris 2001. Abstracts of XVIII ISTH Congress, *Thromb Haemost 85, Index*.

*Erstautoren

Bild auf Einband von Mahon Rao. Tissue Factor (weiß) bindet Faktor VIIa (bunt) auf einer Zellmembran (grau).

INHALTSVERZEICHNIS	1
VERWENDETE ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN	4
1. EINLEITUNG	5
1.1 <i>Tissue Factor</i> – das zentrale Starterprotein der Gerinnung	5
1.2 Struktur und Lokalisierung von <i>Tissue Factor</i>	8
1.3 Das <i>Tissue Factor</i> Gen	9
1.4 Regulation der Blutgerinnung	11
1.5 <i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i> (TFPI)	11
1.6 Struktur und Lokalisierung von TFPI	12
1.7 Proteolytische Spaltung von TFPI	13
1.8 Zielsetzung	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel	16
2.1.2 Fertiglösungen	16
2.1.3 Geräte und Materialien	16
2.1.4 Antikörper, Inhibitoren, Proteasen und Gerinnungsfaktoren	17
2.1.5 Marker, Standards, Stimulantien und Substrate	18
2.1.6 Antikoagulantien und Puffer	18
2.2 Methoden	22
2.2.1 Zellsolierungen	22
2.2.1.1 Blutabnahme	22
2.2.1.2 Monozytenisolierung	23
2.2.1.3 Präparation der neutrophilen Granulozyten	24
2.2.1.4 Isolierung der Plättchen	24
2.2.1.5 Mikrovesikelisolation	25
2.2.1.6 Herstellung und Isolierung von Mikrovesikeln in vitro	25
2.2.1.7 Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität	26
2.2.2 Flowcytometrie	26
2.2.2.1 Vollblut	27
2.2.2.2 Isolierte Plättchen	27

2.2.2.3 Isolierte Mikrovesikel.....	28
2.2.2.4 Mikrovesikel im Vollblut.....	28
2.2.3 Cellsorter.....	28
2.2.4 Proteinchemische Methoden.....	29
2.2.4.1 Zellaufarbeitung für die SDS Page.....	29
2.2.4.2 Proteinbestimmungen.....	29
2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid Elektrophorese (SDS-PAGE).....	30
2.2.4.4 Western Blot.....	30
2.2.4.5. Natives Gel.....	31
2.2.5 Laserscan Mikroskopie.....	32
2.2.6 Faktor Xa Bildung.....	32
2.2.7 Thrombelastographie.....	33
2.2.8 Elektronenmikroskopie.....	35
2.2.9 Chemilumineszenz Messung.....	36
2.2.10 <i>Double Sandwich</i> ELISA.....	36
2.2.11 Statistik.....	37
3. ERGEBNISSE.....	38
3.1 Schnelle Präsentation von <i>Tissue Factor</i> in Plättchen-Leukozyten- Konjugaten.....	38
3.2 Plättchenabhängigkeit der Präsentation von <i>Tissue Factor</i> auf Leukozyten.....	39
3.3 Lokalisierung des intravaskulären <i>Tissue Factors</i>	40
3.4 <i>Tissue Factor</i> isolierter Plättchen ist funktionell inaktiv.....	43
3.5 Leukozyten-assoziiertes <i>Tissue Factor</i> löst im Vollblut Fibrinbildung aus.....	44
3.6 Leukozyten-Plättchen-Konjugate aktivieren den thrombozytären <i>Tissue Factor</i>	47
3.7 Inhibitoren leukozytärer Proteasen vermindern die Faktor Xa Bildung.....	50
3.8 TFPI wird von leukozytären Proteasen gespalten.....	51
3.9 Reaktive Sauerstoffspezies fördern die <i>Tissue Factor</i> Präsentation von Plättchen.....	53
3.10 Mikrovesikel sind konstitutiv im Blut vorhanden.....	54
3.11 Mikrovesikel adhärieren nach Stimulation an Leukozyten und Plättchen.....	56

3.12 Zirkulierende Mikrovesikel enthalten <i>Tissue Factor</i>	57
3.13 Mikrovesikel fördern die Fibrinbildung.....	59
4. DISKUSSION	60
4.1 Intravaskulärer <i>Tissue Factor</i>	60
4.2 Plättchen-Leukozyten-Interaktionen.....	61
4.3 Lokalisierung des intravaskulären <i>Tissue Factors</i> in Thrombozyten.....	63
4.4 Lokalisierung von <i>Tissue Factor</i> auf Mikrovesikeln.....	64
4.5 Aktivierung des intravaskulären <i>Tissue Factors</i>	66
4.6 Leukozytäre Proteasen inaktivieren TFPI.....	67
4.7 Mechanismus der Aktivierung des intravaskulären <i>Tissue Factors</i>	69
4.8 In vivo Relevanz des intravaskulären <i>Tissue Factors</i>	70
4.9 Ausblick.....	72
5. ZUSAMMENFASSUNG	74
6. LITERATURVERZEICHNIS	76

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

α_1 -AT	α_1 -Antitrypsin
α_1 -ACT	α_1 -Antichymotrypsin
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovines Serum-Albumin
Ca ²⁺	Calcium
CFT	Clot Formation Time
CMK	Chloromethylketon
CT	Coagulation Time
CTI	Corntrypsinihibitor
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation
E.Coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N,N-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-immunosorbent Assay
EPI	Extrinsic Pathway Inhibitor
F	Faktor
FITC	Flouresceinisothiocyanat
fMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
GP	Glucoprotein
HMW-Kininogen	High Molecular Weight Kininogen
I.E.	Internationale Einheiten
IgG	Immunoglobulin G
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
LACI	Lipoprotein-associated coagulation inhibitor
LPS	Lipopolysaccharid
Min.	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MW	Mittelwert
m-RNA	messenger RNA
PAP	Plättchenarmes Plasma
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin
PL	Phospholipide
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRP	Plättchenreiches Plasma
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S.D.	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Std.	Stunde(n)
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TEG	Thrombelastograph
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TF	<i>Tissue Factor</i>
TFPI	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
TIMP	<i>Tissue</i> Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen

1. EINLEITUNG

1.1 *Tissue Factor* – das zentrale Starterprotein der Gerinnung

Seit über 100 Jahren ist bekannt, daß ein Gewebefaktor (Schmidt, 1892; Morawitz, 1905) existiert, der die Blutgerinnung auslöst. Doch erst in den letzten 10-20 Jahren wurde dieses Protein isoliert (Bach, 1981; Broze et al., 1985), charakterisiert und im Rahmen einer einheitlichen Nomenklatur der Begriff *Tissue Factor* (Gewebe-thromboplastin; CD142) geprägt. Diese Bezeichnung beruht auf der Vorstellung, daß *Tissue Factor* im Gewebe lokalisiert ist und erst nach einer Gefäßverletzung in Kontakt mit Blut kommt.

Die Grundlagen unserer Vorstellung vom Ablauf der Blutgerinnung beruhen auf den 1964 erschienenen Publikationen über die sogenannte Wasserfall-Theorie (Davie & Ratnoff, 1964; Mac Farlane, 1964). Dieser Theorie liegt die Vorstellung zugrunde, daß in einer kaskadenartigen Reaktion Zymogene durch Serinproteasen und Kofaktoren in aktive Enzyme überführt werden. Der Startprozess der Gerinnung führt zur Bildung von Faktor Xa, der Prothrombin aktiviert und somit zur Fibrinbildung führt. Das sogenannte extrinsische System der Gerinnung wird dabei auf exogenem Wege durch den *Tissue Factor* gestartet, der im Gewebe vor allem in der Gefäßwand und in Organkapseln lokalisiert ist (Drake et al., 1989), um im Falle einer Gefäßverletzung das Organ und den Körper vor Blutverlusten zu schützen. Das intrinsische System, das sogenannte Kontaktaktivierungssystem, wird nach Kontakt mit anionischen Oberflächen durch eine Aktivierung des Blutgerinnungsfaktors XII ausgelöst, der im Blut, also intrinsisch, vorhanden ist.

Die Grenze zwischen intrinsischem und extrinsischem System kann heute allerdings nicht mehr so strikt gezogen werden. Es konnte gezeigt werden, daß der Gerinnungsfaktor IX des intrinsischen Systems durch den *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex aktiviert wird (Osterud & Rappaport, 1977; Nemerson & Bach, 1982; Bom et al., 1991; Rapaport & Rao, 1992). Thrombin ist außerdem in der Lage unabhängig von einer Aktivierung des Faktors XII den Faktor XI zu aktivieren (Gailani & Broze, 1993; Naito & Fujikawa, 1991; Broze & Gailani, 1993; Abb.1). Die physiologische Bedeutung des intrinsischen Systems, als eines Hauptaktivators der Fibrinbildung, wird vollends in Zweifel gezogen, seitdem bekannt wurde, daß bei Patienten mit Defekten der Kontaktaktivierungsfaktoren (Faktor XII, Prekallikrein, HMW-Kininogen)

keine Blutungsneigungen vorliegen (Kienast & Ostermann, 1993). Das intrinsische System spielt nach heutigen Kenntnissen vorwiegend eine Rolle bei Kontakt von Blut mit künstlichen Oberflächen, wie z. B. bei Bypass-Operationen. Defizienzen an Faktoren des extrinsischen Systems wie Faktor VII, X, V und II (Prothrombin) sind dagegen meist letal. Patienten mit Mutationen des *Tissue factor* Gens sind bisher nicht bekannt. All diese Hinweise führten zu einem neuen Gerinnungsschema, in dem die Gewichtung der Initiation der Blutgerinnung auf Seiten des *Tissue Factors* liegt. Der *Tissue Factor* der Gefäßwand ist Rezeptor und Kofaktor (Bach, 1988; Nemerson, 1988; Rapaport, 1991; Carson & Brozna, 1993) für den Blutgerinnungsfaktor VII oder den im Blut bereits aktiviert vorliegenden Faktor VIIa (Abb. 1). Der *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex startet die Gerinnung durch die Aktivierung der Zymogene Faktor IX und Faktor X. Dadurch entstehen geringe Mengen Thrombin, die zu einer teilweisen Aktivierung der Plättchen und einer quantitativen Umsetzung der Kofaktoren V (Esmon, 1979) und VIII (Eaton, 1986) führen. In einem zweiten Schritt wird über einen positiven Rückkopplungsmechanismus die Gerinnung verstärkt. Dabei bildet der Kofaktor VIIIa mit dem Faktor IXa auf Membranoberflächen einen Komplex, der zur Bildung einer 50- bis 100-fachen größeren Menge an Faktor Xa im Vergleich zum *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex führt. Zusätzlich bildet Faktor Xa mit dem Kofaktor Va und Prothrombin den sogenannten Prothrombinase-Komplex (Nemerson & Bach, 1982; Kalafatis, 1994), der zu einer 25-fachen Verstärkung der Thrombinbildung und schließlich zur Bildung eines stabilen Fibringerinnsels führt. Es reichen also bereits geringe Mengen von *Tissue Factor* aus, um ein Gefäß zu verschließen.

Neben der Initiation der physiologischen Blutgerinnung ist *Tissue Factor* auch an der disseminierten intravaskulären Gerinnung (DIC) bei Sepsis (Rivers, 1992), sowie bei postoperativen Thrombosen und in der Artherosklerose beteiligt (Landers, 1994; Libby, 2000). In den letzten Jahren wurden weitere Funktionen des *Tissue Factors* in der Angiogenese der Embryonalentwicklung (Carmeliet et al., 1996; Bugge, 1996), der Tumorangiogenese (Zhang, 1994; Shoji, 1997) und für die Migration bzw. Transmigration von monozytären Zellen durch Endothelzellen beobachtet (Randolph, 1998).

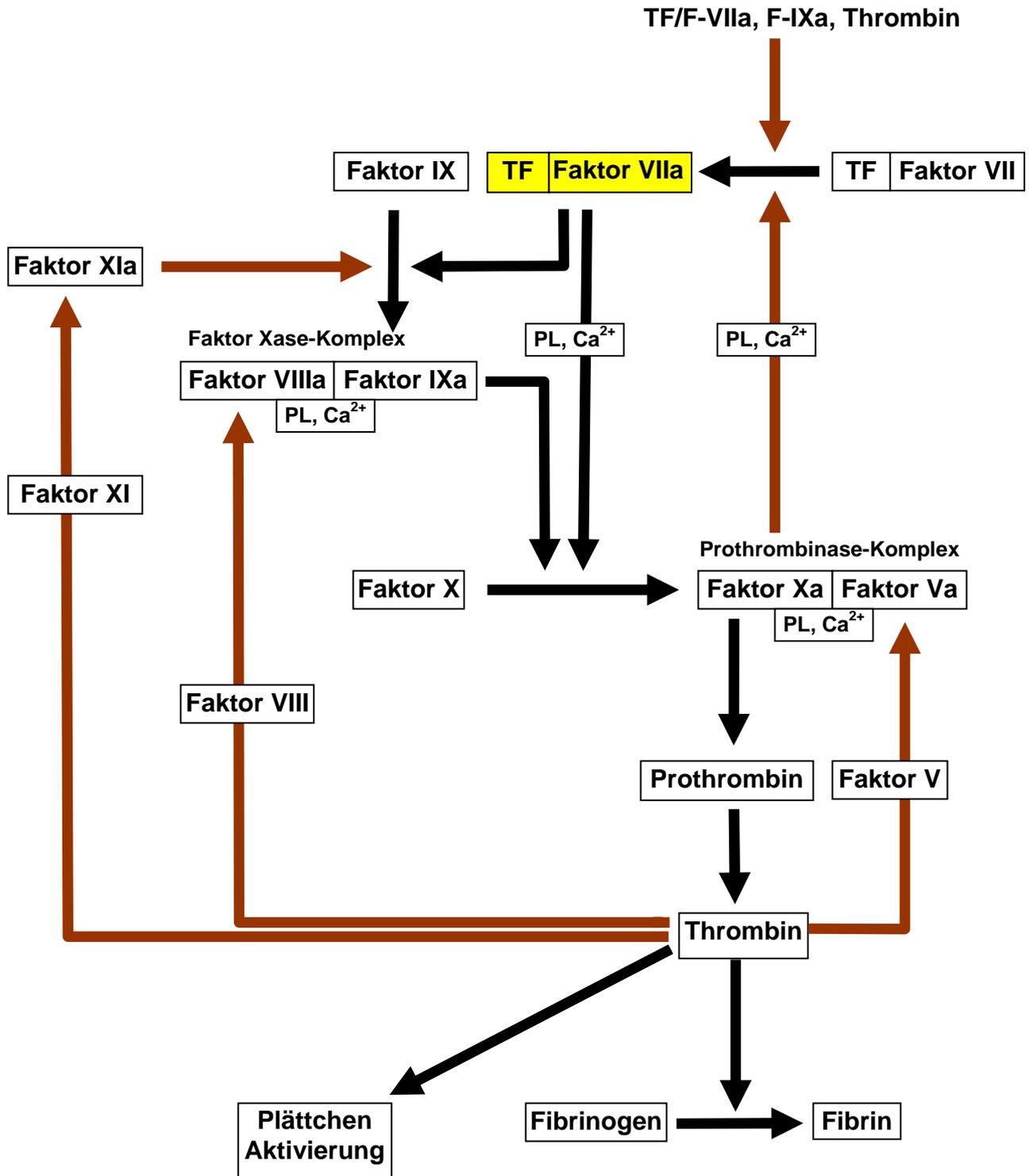


Abb. 1: Die Initiationsphase der Blutgerinnung ist charakterisiert durch die Bildung femto- bis picomolarer Mengen an Faktor VIIa, IXa, Xa, nanomolarer Mengen an Thrombin, eine fast quantitative Aktivierung der Kofaktoren V und VIII und eine teilweise Aktivierung der Plättchen. Die Verstärkungsphase ist durch eine quantitative Aktivierung von Prothrombin, eine vollständige Aktivierung der Plättchen und die Bildung eines stabilen Thrombus gekennzeichnet. Rote Pfeile = positive Rückkopplung; PL = Phospholipide

1.2 Struktur und Lokalisierung von *Tissue Factor*

Tissue Factor ist ein glykosyliertes, 47 kDa großes Protein, das aufgrund seiner Tertiärstruktur der Familie der Cytokinrezeptoren (Interleukin 10, Interferon γ) zugeordnet wird (Bazan, 1990). *Tissue Factor* ist ein Polypeptid, das aus 295 Aminosäuren synthetisiert wird. Nach Abspaltung einer *leader* Sequenz besteht das reife Protein aus 263 Aminosäuren, das in einer extrazellulären Domäne mit 219 Aminosäuren (Abb. 2), einer 23 Aminosäuren langen membrangängigen Domäne, gefolgt von einer kurzen zytoplasmatischen Domäne mit 21 Aminosäuren organisiert ist (Edgington, 1991). Die extrazelluläre Domäne enthält 2 Disulfidverbindungen und 3 Glykosylierungsstellen.

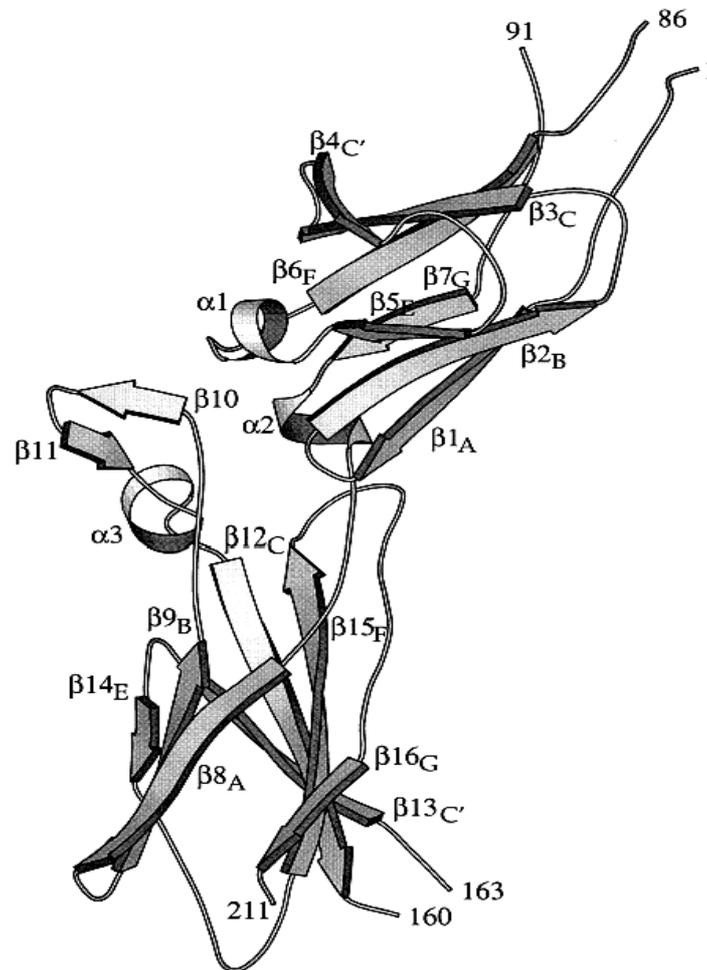


Abb. 2: Darstellung der extrazellulären Domäne des humanen *Tissue Factors* (Muller, 1996). Die extrazelluläre Domäne besteht aus 2 Modulen mit Fibronectin III Struktur. Die 3 α -helikalen Segmente wurden mit $\alpha 1$ -3, die β -Faltblattstrukturen wurden mit $\beta 1a$ - $\beta 16g$ bezeichnet. Modul 1 beinhaltet die Segmente $\beta 1a$ bis $\beta 7g$, das zweite Modul beinhaltet $\beta 8a$ - $\beta 16g$. Die Struktur wurde in dem Programm Molscript dargestellt (Kraulis, 1991).

Die extrazelluläre Domäne des *Tissue Factors* besteht aus 2 Modulen (Fibronectin Typ III Domänen) mit β -Faltblattstruktur, die einen Winkel von 120° einschließen und an die der Faktor VII/VIIa gebunden ist (Muller, 1994; Harlos, 1994; Banner, 1996). Die Bindung an *Tissue Factor* führt zu einer allosterischen Aktivierung (Edgington, 1997) des Faktors VIIa und verstärkt somit die Hydrolyse von Faktor X um den Faktor 2×10^7 im Vergleich zu Faktor VIIa alleine. Außerdem steigert *Tissue Factor* die Aktivierbarkeit des Faktors VII durch die Faktoren Xa, IXa, Thrombin und den *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex (Autoaktivierung) (Broze, 1980; Bajaj, 1981; Davie, 1991). Die transmembranäre Domäne von *Tissue Factor* ist für eine vollständige funktionelle Aktivität des *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplexes essentiell, da sie die Bindungsaffinität der Faktoren X und IX an den *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex erhöht (Paborsky, 1991). Die intrazelluläre Domäne spielt möglicherweise eine Rolle in einem Faktor VIIa bedingten intrazellulären Kalziuminflux, der mit der proteolytischen Aktivität des Komplexes in Zusammenhang zu stehen scheint (Versteeg, 2001; Camerer et al., 1996).

In immunologischen Untersuchungen wurde Gewebethromboplastin in hohen Konzentrationen in Gehirn, Lunge, Plazenta und Niere gefunden (Astrup, 1965; Drake, 1989), in Organen also, die auf Grund ihrer Wichtigkeit eines besonders hohen Schutzes bedürfen. Genauere Untersuchungen der Gewebe zeigten eine Lokalisation des *Tissue Factors* in den Fibroblasten der Adventitia, in Organkapseln, im Epithel der Haut, in der Bowman'schen Kapsel der Niere und in den Astrozyten des Gehirns (Wilcox et al., 1990; Eddlestone et al., 1993; Mackmann et al., 1993). Dieses Verteilungsmuster stimmt mit der Hypothese von Drake (Drake, 1989) überein, der die Verteilung des *Tissue Factors* in Grenzflächen um Organe und in der Gefäßwand als einen sogenannten *Haemostatic Envelope* bezeichnete, der im Falle einer Gefäßverletzung den Körper vor Blutverlusten schützt.

1.3 Das *Tissue Factor* Gen

Das menschliche *Tissue Factor* Gen umfaßt 12,4 kBp und ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert (Carson et al., 1985; Kato et al., 1988). Die strukturelle Aufklärung des humanen *Tissue Factor* Gens fand zusammen mit der Klonierung des Gens Ende der 80er Jahre statt (Morrissett et al., 1987; Scarpati et al., 1987). Es besteht aus 6 Exons, die durch 5 Introns getrennt werden (Mackmann et al., 1989). Die Exons 2 bis

5 kodieren dabei die extrazelluläre Domäne des *Tissue Factors*, während Exon 6 den zytoplasmatischen und den transmembranären Teil des *Tissue Factors* kodiert. Exon 1 dagegen beinhaltet genetische Informationen für die Initiation der Translation und eine Sequenz, die für die posttranslationale Prozessierung und das Einschleusen von *Tissue Factor* in die Zellmembran verantwortlich ist.

Die Transkription des Gens führt zu einer 2,3 kBp großen m-RNA oder zu Transkripten mit einer Größe von 3,1-3,4 kBp, die durch alternatives Splicing erzeugt werden. Die letztgenannten Transkripte enthalten zusätzlich das erste Intron und sind daher inaktiv (Brand, 1991).

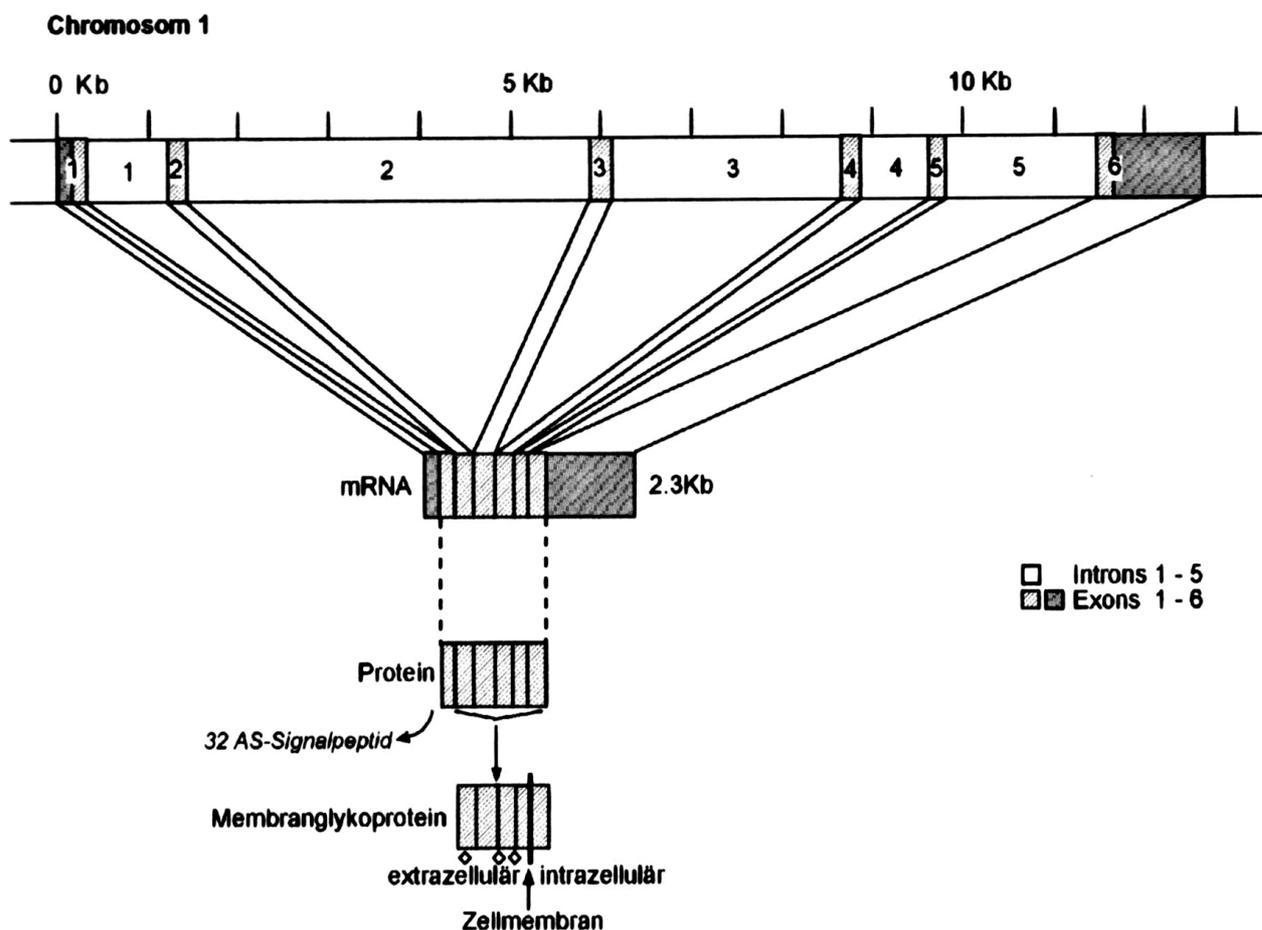


Abb. 3: Schematische Darstellung des *Tissue Factor* Gens, der m-RNA und des Proteins (Edgington, 1991)

Während der *Tissue Factor* in Zellen der Gefäßwand konstitutiv exprimiert wird, ist seit einigen Jahren bekannt, daß die Expression des *Tissue Factors* in anderen Zellen des Gefäßsystems (Monozyten und Endothelzellen) induziert werden kann. Die Induktion wird durch eine Stimulation mit Entzündungsmediatoren (u.a.

Interleukine, Komplementfaktor C5a, PMA, Lipopolysaccharide) und Wachstumsfaktoren ausgelöst (Geczy et al., 1981; Schwartz & Edgington, 1981; Bloem 1989). Die Regulation der *Tissue Factor* Expression wird dabei auf der Transkriptionsebene reguliert (Edgington, 1991). In der Promoterregion des *Tissue Factor* Gens konnten Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (Mackmann et al., 1990). Es handelt sich dabei um Erkennungssequenzen für AP-1, NF- κ b, SP-1 und EGR-1. Die physiologische Bedeutung der Induktion der *Tissue Factor* Expression ist bis heute aber ungeklärt.

1.4 Regulation der Blutgerinnung

Die Blutgerinnung stellt einen Schutz- und Abwehrmechanismus des Körpers dar, der den Körper vor Blutverlusten schützen soll. Eine Regulation der Blutgerinnung ist unverzichtbar, um die Blutgerinnung nur auf den Bereich der Gefäßverletzung zu begrenzen. Daher ist eine Vielzahl unterschiedlicher antikoagulatorischer Mechanismen im Blut vorhanden. Die Gerinnung wird dabei durch eine Inhibierung von aktivierten Gerinnungsfaktoren (Proteaseninhibitoren: Antithrombin III, α 2-Macroglobulin, *Tissue Factor Pathway Inhibitor*) oder eine Inaktivierung der aktivierten Faktoren reguliert (Protein C System). Während Antithrombin III dabei zur Dissoziation des *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplexes führt (Rao, 1995), stabilisiert *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) den Komplex, in dem es selbst einen quaternären Komplex mit *Tissue Factor*, Faktor VIIa und Faktor Xa bildet (Dickinson, 1997). Zusätzlich vermittelt TFPI vermutlich auch eine *Downregulation* des *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplexes durch eine Internalisierung und Degradierung des Komplexes (Hamik, 1999; Iakhiaev, 1999).

1.5 *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI)

TFPI ist einer der wichtigsten Inhibitoren der physiologischen Blutgerinnung, da er bereits kurz nach der Initiierung der Gerinnung den *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex inhibiert. Bereits 1950 wurden Studien veröffentlicht, in denen ein endogener Faktor des Blutes beschrieben wurde, der die extrinsische Gerinnung hemmen sollte. Für Verwirrung sorgten unterschiedliche Bezeichnungen des Inhibitors

wie *extrinsic pathway inhibitor* (EPI) oder *lipoprotein-associated coagulation inhibitor* (LACI). 1988 wurde das Protein schließlich isoliert, charakterisiert (Wun, 1988) und 1991 durch die Internationale Gesellschaft für Thrombose und Haemostase die einheitliche Bezeichnung *Tissue Factor Pathway Inhibitor* eingeführt.

1.6 Struktur und Lokalisierung von TFPI

TFPI besteht aus einem negativ geladenen N-Terminus, 3 hintereinander geschalteten Kunitz-Typ-Domänen und einem basischen Carboxy-Terminus (Wun, 1988; Broze, 1990). Sobald geringe Mengen an Faktor Xa durch den *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex gebildet wurden, inaktiviert TFPI mit seiner Kunitz-Domäne 2 den Faktor Xa im aktiven Zentrum. Die Kunitz-Domäne 1 bindet anschließend den *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex und inhibiert Faktor VIIa im aktiven Zentrum (Girard, 1989; Broze, 1990). Die Kunitz-Domäne 3 ist nicht funktionell inhibitorisch (Petersen, 1996). Sie ist für die Vermittlung einer Zellbindung und für die Interaktion mit Heparin (Enjyoji, 1995) und Lipoproteinen (Valentin, 1993) verantwortlich (Abb. 4). Der Carboxyterminus ist essentiell für die antikoagulatorische Aktivität von TFPI (Nordfang, 1991) und für eine vollständige Inhibierung des Faktors Xa (Wesselschmidt, 1992).

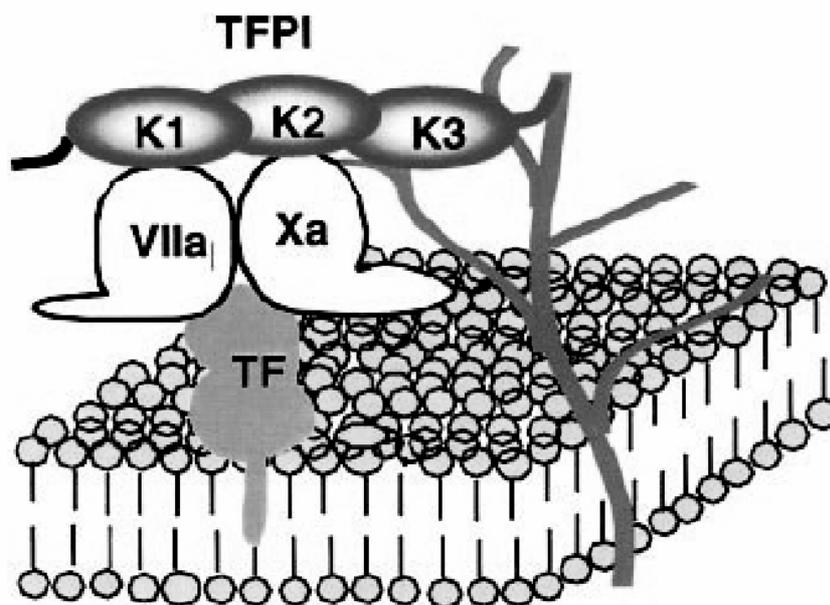


Abb. 4: TFPI bindet Faktor VIIa und Faktor Xa mit der Kunitz-Domäne 1 bzw. 2. Die Bindung an Proteoglykane der Zelle wird durch eine Interaktion mit dem carboxyterminalen Ende und der Kunitz-Domäne 3 vermittelt (Kato, 2002)

TFPI wird hauptsächlich von Endothelzellen, aber auch in stimulierten Monozyten synthetisiert (Van der Logt, 1994). In einer Untersuchung unterschiedlicher Gewebe mit Hilfe von Northern Blots fand man außerdem eine Expression von TFPI in der Mikrovaskulatur von Lunge, Leber, Niere, Herz, Skelettmuskel und Gehirn (Bajaj, 1999). Im Gefäß gibt es 3 verschiedene Pools an TFPI, die sich in ihrer Struktur und damit in ihrer inhibitorischen Aktivität unterscheiden (Broze, 1994). Der Hauptanteil von TFPI ist an der Oberfläche des Endothels lokalisiert. Die Bindung an das Endothel wird durch eine unspezifische Assoziation mit heparansulfatierten Proteoglykanen, wie Syndecanen oder Glypikanen vermittelt. Außerdem wurde endotheliales TFPI in glykolipidreichen Mikrodomänen, den sogenannten *Caveolae* gefunden (Lupu, 1997), die an Vorgängen wie Endozytose und Transzytose (Simionescu, 1991), Regulation der Oberflächen-assoziierten Proteolyse und der Signaltransduktion (Anderson, 1993; Stahl, 1995) beteiligt sind. TFPI ist in den *Caveolae* an Glykosylphosphatidylinositol verankerte Glypikane gebunden und reguliert die proteolytische Funktion des *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplexes möglicherweise durch Translokation des *Tissue Factor*/Faktor VIIa/Faktor Xa Komplexes in *Caveolae* (Sevinsky, 1996; Lupu, 1997). Der TFPI des Endothels besitzt seine volle Länge (45 kDa) und ist daher maximal inhibitorisch wirksam. Ein weiterer Teil des TFPIs (70-85%) ist im Plasma an Lipoproteine (LDL>HDL>VLDL) gebunden (Sanders, 1985; Broze, 1987). Das Molekulargewicht des Plasma-assoziierten TFPIs ist heterogen (34-45 kDa). Die unterschiedlichen Molekulargewichte lassen sich auf unterschiedliche Spaltprodukte des Carboxyterminus, der Kunitz-Domäne 3 und der Bildung unterschiedlicher Disulfidkomplexe mit Apo A II zurückführen (Novotny 1989; Broze, 1994). Plasma-TFPI besitzt daher nur eine schwache inhibitorische Wirkung. Ca. 8% an TFPI im Vollblut ist außerdem in Plättchen lokalisiert (45-47 kDa) und wird nach Stimulation mit Plättchenagonisten (Thrombin, Kollagen) freigesetzt (Novotny, 1988). Der in den Plättchen gespeicherte TFPI ist aufgrund seiner vollständigen Länge maximal inhibitorisch wirksam.

1.7 Proteolytische Spaltung von TFPI

In Entzündungsreaktionen, bei der Wundheilung und bei Infektionen setzen stimulierte Leukozyten Proteasen frei. In in vitro Experimenten konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, daß einige dieser Proteasen wie Elastase (Petersen, 1992;

Higuchi, 1992), Cathepsin G (Petersen, 1992) oder Matrix-Metalloproteinasen (Belaouaj, 2000; Cunningham, 2002) in der Lage sind, TFPI zu spalten. Auch Proteasen, die unmittelbar eine Rolle für die Gerinnung spielen, wie Thrombin (Ohkura, 1997), Faktor Xa (Salemink, 1998) und Plasmin (Stalboerger, 2001), führten zu TFPI Spaltprodukten (Abb. 5). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß eine Spaltung von TFPI mit einem Verlust oder einer Verminderung der funktionellen Inhibierung von *Tissue Factor* einher geht (Wesselschmidt, 1992; Higuchi, 1992; Salemink, 1998). Dies stimmt auch mit den Ergebnissen über eine geringe Aktivität des Plasma-assoziierten TFPIs überein, der vor allem am carboxyterminalen Ende unvollständig ist. Da diese Erkenntnisse aber vor allem auf in vivo Experimenten beruhen, muß noch geklärt werden, ob eine Inaktivierung von TFPI durch Proteolyse in vivo für physiologische oder pathologische Prozesse tatsächlich eine Rolle spielt.

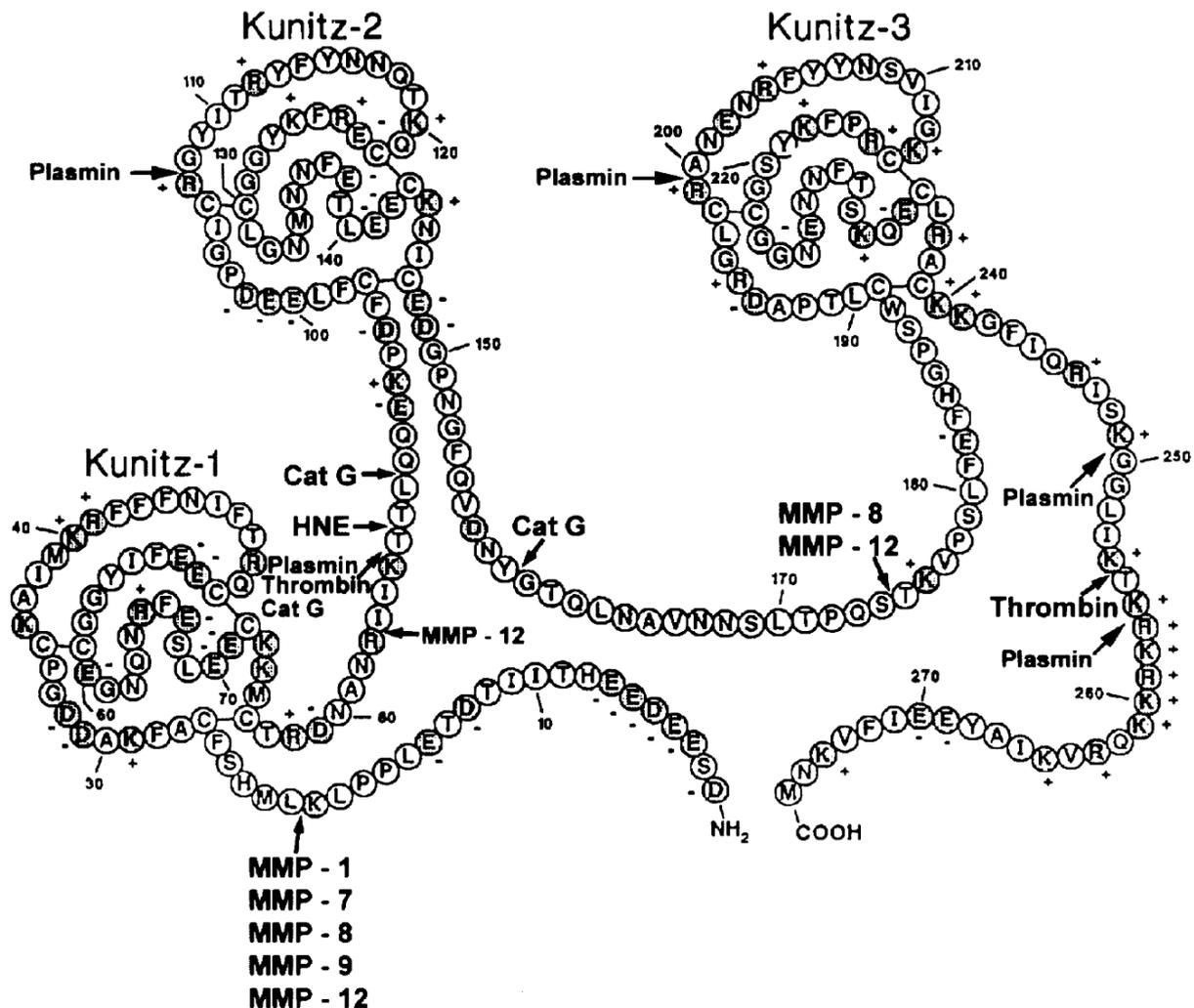


Abb. 5: Spaltung von TFPI durch Thrombin, Plasmin, Cathepsin G, Elastase und Matrix-Metalloproteinasen (Cunningham, 2002)

1.8 Zielsetzung

Aufgrund der unerwarteten Beobachtung, daß *Tissue Factor* nach Stimulation von Vollblut mit fibrillärem Kollagen innerhalb von wenigen Minuten in Plättchen-Leukozyten-Komplexen präsentiert wurde, sollten die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Welches ist die Quelle des intravaskulären *Tissue Factors*?
2. Welche Rolle spielen hierbei Plättchen und zirkulierende Mikrovesikel?
3. Über welchen Mechanismus wird der intravaskuläre *Tissue Factor* funktionell aktiviert?
4. Welche Bedeutung hat dabei TFPI, der physiologische Antagonist des *Tissue Factor* initiierten Gerinnungsweges?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth (Karlsruhe)
BSA Fraktion V	Serva (Heidelberg)
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Phe-Phe-Arg-Chloromethylketon (CMK)	Bachem (Heidelberg)
EDTA (freie Säure)	Roth (Karlsruhe)
Ficoll Paque	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Glucose	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Pferdeserum	Serva (Heidelberg)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Quinacrin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Trichloessigsäure (TCA)	Roth (Karlsruhe)
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth (Karlsruhe)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

2.1.2 Fertiglösungen

Facs:

Lysing Solution	Becton Dickinson (Heidelberg)
Cellfix	Becton Dickinson (Heidelberg)

Western Blot:

BCA Protein Assay Reagens	Biorad (München)
Bradford Protein Assay Reagens	Biorad (München)
Rotiphorese 30	Roth (Karlsruhe)

2.1.3 Geräte und Materialien

Materialien:

Western Blot:

Hyperfilm MP (18x24 cm RPN1675K)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Gel Blotting Papier (10426892)	Schleicher und Schuell (Dassel)
Hybond ECL (Nitrocellulosemembran)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

Zellisolation:

Microbeads Säulen MS 25 ⁺	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
Nalgene Ultra Plus (3430-1610)	Beckmann (München)

Geräte:

ELISA Reader Dynatech MR 7000	Dynatech Laboratories (Alexandria, USA)
Multiphor II (Blotting Anlage)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Coulter Counter	Becton Dickinson (Heidelberg)
Laserscan LSM 410	Zeiss (Oberkochen)
FacsScan Flow Cytometer	Becton Dickinson (Heidelberg)
Miniprotean 3 (Gelgießstand)	Biorad (München)
Mini Macs Zellseparator	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
Photometer UV 1202	Shimadzu (Duisburg)
Power Supply P25	Biometra (Göttingen)
Luminometer LB 9702	Berthold (Bundoor, Australien)
Thrombelastograph D	Hellige (Freiburg)
Thrombelastograph RoTEG	Dynabyte GmbH (München)
Rotina 35 R	Hettich (Tuttlingen)
Tischzentrifuge Mikro 22 R	Hettich (Tuttlingen)
Ultrazentrifuge L8 60 M	Beckmann (München)

2.1.4 Antikörper, Inhibitoren, Proteasen und Gerinnungsfaktoren**Antikörper:**

Maus-anti-Human MMP-9 Antikörper	Calbiochem (Schwalbach)
Maus-anti-Human <i>Tissue Factor</i> VIC7	PD Dr. Thomas Luther (Institut für Pathologie, TU Dresden)
Maus-anti-Human <i>Tissue Factor</i> VD8	PD Dr. Thomas Luther (Institut für Pathologie, TU Dresden)
Maus-anti-Human (Mab) <i>Tissue Factor</i> (4504)	American Diagnostica (Pfungstadt)
Maus-anti-Human CD40L	Prof. Dr. R. Kroscek (Berlin)
Maus-anti-Human CD62P (MA-6200)	Endogen (Woburn, USA)
Maus IgG1 Negativ Kontrolle (M5284)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Maus IgG1 Negativ Kontrolle (MCA928)	Biozol (Eching)
Maus-anti-Human TFPI (4904)	American Diagnostica (Pfungstadt)
Ziege-anti-Human SRBI	Prof. Dr. H. Hauser (Schweiz)

Zellisolation:

Microbeads CD14 Antikörper (502-01)	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
Microbeads CD15 Antikörper (466-01)	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)

Western Blot:

Anti-Kaninchen IgG Peroxidasekonjugat (401353)	Calbiochem (Schwalbach)
Anti-Maus IgG Peroxidasekonjugat (401253)	Calbiochem (Schwalbach)
Kaninchen-anti-Human (Polyklonal) TFPI (4901)	American Diagnostica (Pfungstadt)

Laserscan:

Maus-anti-Human CD62P	Ancell (Lausen, Schweiz)
Maus-anti-Human CD18	Calbiochem (Schwalbach)
Maus-anti-Human CD162	Calbiochem (Schwalbach)

Fluoreszenz markierte Antikörper/Proteine für die Flowcytometrie/Cellsorter:

Annexin V FITC (MP13199)	Mo Bi Tec (Göttingen)
Maus IgG1 Negativ Kontrolle FITC (MCA928F)	Biozol (Eching)
Maus IgG2a Negativ Kontrolle PE (MCA929PE)	Biozol (Eching)
Maus-anti-Human CD15 PE (30575X)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Maus-anti-Human CD15 PE (LC160)	Biotrend (Köln)
Maus-anti-Human CD42b FITC (31134X)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Maus-anti-Human CD14 PE (LC156)	Biotrend (Köln)
Maus-anti-Human CD14 APC (555399)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Maus-anti-Human CD66b FITC (555724)	BD Pharmingen (Heidelberg)
Maus-anti-Human TF FITC (9010-5079)	Biotrend (Köln)

Maus-anti-Human TF FITC (4508)	American Diagnostica (Pfungstadt)
Maus-anti-Human CD62P PE (MCA769PE)	Biozol (Eching)
Ratte-anti-Human CD235a PE (MCA506PE)	Biozol (Eching)

Inhibitoren:

α_1 -Antichymotrypsin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
α_1 -Antitrypsin (A-9024)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Corn Trypsin Inhibitor	Haemochrom Diagnostica (Essen)
Methoxy-o-succinyl-Ala-Ala-Pro-Val-CMK	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth (Karlsruhe)

Proteasen:

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

Gerinnungsfaktoren:

Humaner Faktor VIIa, Novo Seven 120	Novo Nordisk (Bagsvaerd, Dänemark)
Beriplex PN 500	Behring (Marburg)

2.1.5 Marker, Standards, Stimulantien und Substrate**Marker:**

Farbmarker (Wide range C3437)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
-------------------------------	-----------------------------

Standards:

Gamma Globulin	Biorad (München)
Thromborel S	Dade Behring (Marburg)
Thromboplastin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Stimulantien:

Thrombin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Lipopolysaccharid (LPS) E. Coli	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Kollagenreagens Horm	Nycomed (Ismaning)
Kalziumionophor A23187	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

Substrate:

S 2222	Haemochrom Diagnostica (Essen)
o-Phenylendiamin	Fluka (Neu-Ulm)

2.1.6 Antikoagulantien und Puffer**Antikoagulantien:**

Natriumcitrat:	
Tri-Natriumcitrat	3,68 g
In 100 ml destilliertem Wasser lösen.	

Puffer:PBS (*Phosphate-buffered saline*):

NaCl	8,00 g
KH ₂ PO ₄	0,20 g
Na ₂ HPO ₄ ×2 H ₂ O	1,40 g
KCl	0,20 g

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

Resuspensionspuffer:

NaCl	4,03 g
KCl	0,10 g
NaHCO ₃	0,50 g
NaH ₂ PO ₄	0,03 g
MgCl ₂ ×6 H ₂ O	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:CaCl₂/Hepes Puffer:

10 mM Hepes	23,83 mg
100 mM CaCl ₂	147 mg

In 10 ml destilliertem Wasser lösen.

Faktor Xa Bildung:CaCl₂-Lösung (8 mM):

CaCl ₂	9 mg
-------------------	------

In 2 ml destilliertem Wasser auflösen.

Beriplex (25 I.E./ml):

Vial lösen in 13,6 ml destilliertem Wasser. In dem gelösten Vial beträgt die Endkonzentration des Faktors VII 25 I.E./ml.

S2222:

S2222	25 mg
-------	-------

In 12,5 ml destilliertem Wasser auflösen, zu 500 µl aliquotieren und bei -20°C einfrieren.

Thromborel:

Das Vial in 2 ml Wasser lösen (100 U/ml).

Der Standard wurde zu je 100 µl (10 U/ml) aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Zellisolation:

Monozyten-Waschpuffer:

BSA	1,50 g
Na ₂ EDTA	1,40 g

In 1000 ml PBS lösen, pH 7,4.

Antikörper-Puffer:

EDTA (freie Säure)	0,15 g
BSA	0,50 g

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

Thrombozyten-Waschpuffer:

NaCl	8,06 g
KCl	0,22 g
MgCl ₂	0,20 g
HEPES	3,57 g
EDTA	2,92 g
Glucose	0,90 g
Tri-Natriumcitrat	1,89 g
Apyrase	0,05 g

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

Western Blot:

Tris/EDTA Puffer:

Tris	121 mg
EDTA	29,50 mg

In 10 ml destilliertem Wasser lösen.

PMSF:

PMSF	14,57 mg
------	----------

In 10 ml Ethanol lösen.

Lysepuffer:

Tris/EDTA Puffer	8,90 ml
Triton-X 100 10 %	1 ml
PMSF/Ethanol	100 µl

Sammelgel 5 % (denaturierend):

Dest. Wasser	3,00 ml
Tris 0,5 mM pH 6,8	1,25 ml
SDS 10 %	0,05 ml
Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid)	0,66 ml
APS 10 %	25 µl
TEMED	5 µl

Trenngel 12 % (denaturierend):

Dest. Wasser	5 ml
Tris 1,5 mM pH 8,8	3,75 ml
SDS 10 %	0,15 ml
Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid)	6,00 ml
APS 10 %	75 µl
TEMED	7,50 µl

Sammelgel 4 % (nativ):

Dest. Wasser	3,00 ml
Tris 0,5 mM pH 6,8	1,20 ml
Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid)	0,66 ml
APS 10 %	25 µl
TEMED	5 µl

Trenngel 5 % (nativ):

Dest. Wasser	16,9 ml
Tris 1,5 mM pH 8,8	7,50 ml
Rotiphorese 30 (Acrylamid/Bisacrylamid)	5,00 ml
APS 10 %	75 µl
TEMED	7,50 µl

Tris 1,5 M, pH 8,8:

Tris	182 g
------	-------

In 1000 ml destilliertem Wasser lösen, mit konzentrierter Salzsäure auf pH 8,8 einstellen.

Tris 0,5 M, pH 6,8:

Tris	60,57 g
------	---------

In 1000 ml destilliertem Wasser lösen, mit konzentrierter Salzsäure auf pH 6,8 einstellen.

Laufpuffer 5-fach (denaturierend):

Tris	6,05 g
Glycin	28,80 g
SDS 10 %	10 ml

Ad 200 ml mit destilliertem Wasser. Vor Gebrauch mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnen.

Laufpuffer (nativ):

Tris	3,00 g
Glycin	14,40 g

In 1000 ml destilliertem Wasser lösen.

Probenpuffer 4-fach:

Tris pH 6,8	2,50 ml
SDS 10 %	4 ml
Glycerol	4 ml
Bromphenolblau 0,1 % in Ethanol	2 ml

Probenpuffer 4-fach (nativ):

Glycerol	0,40 g
Bromphenolblau 0,1 % in Ethanol	80 µl

Transferpuffer:

Tris	5,80 g
Glycin	2,90 g
SDS 10 %	3,70 ml
Methanol	100 ml

In 900 ml destilliertem Wasser lösen.

Blocking Puffer:

NaCl	1,17 g
Tris 5 mM, pH 7,5	5 ml
BSA	3 g
Tween 20	0,05 g
Pferdeserum 10 %	10 ml

Mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen.

Tris 5 mM, pH 7,5:

Tris	60,57 mg
------	----------

In 100 ml destilliertem Wasser lösen, pH 7,5.

TBS 10-fach:

Tris	24,20 g
NaCl	80 g

In 1000 ml destilliertem Wasser lösen, pH 7,6.

TBS/T 0,3 %:

TBS 10-fach 1:10 verdünnen mit destilliertem Wasser. Zugabe von Tween 20 (3 ml/1000ml).

Luminol 250 mM:

Luminol	44,30 mg
---------	----------

in 1 ml DMSO lösen.

Coumarsäure 90 mM:

Coumarsäure	14,80 mg
-------------	----------

in 1 ml DMSO lösen.

ECL 1:

Tris 1,5 mM, pH 8,5	3,30 ml
Luminol 250 mM	0,50 ml
Coumarsäure 90 mM	0,22 ml
Mit destilliertem Wasser auf 50 ml auffüllen.	

ECL 2:

Tris 1,5 mM, pH 8,5	3,30 ml
H ₂ O ₂ 30 %	0,03 ml
Mit destilliertem Wasser auf 50 ml auffüllen.	

Elektronenmikroskopie:

PBS/EDTA Puffer:

EDTA	14,61 mg
In 10 ml PBS lösen. Lösung mit Spritzenfilter 0,2 µm steril filtrieren.	

Phosphatpuffer 0,1 M:

KH ₂ PO ₄	0,02 g
Na ₂ HPO ₄	0,12 g
In 200 ml destilliertem Wasser lösen, pH 7,4. Vor Gebrauch steril filtrieren.	

Paraformaldehyd 2 % in 0,1 M Phosphatpuffer:

Paraformaldehyd	0,20 g
In 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer bei 65°C lösen. Die Lösung muß vor Gebrauch immer frisch hergestellt werden.	

Double Sandwich ELISA:

Tris/HCl	0,1 M
NaCl	0,1 M
Triton X-100	0,1 %
EDTA	5 mM
In destilliertem Wasser lösen; pH 7,6.	

VIIa₂:

Hepes/NaCl Puffer

Hepes	2,38 g
NaCl	8,18 g
In 1000 ml destilliertem Wasser lösen, pH 7,4.	

2.2 Methoden**2.2.1 Zellisolierungen****2.2.1.1 Blutabnahme**

Venöses Blut wurde von gesunden Spendern (Alter 20-35 Jahre) erhalten, die mindestens 14 Tage vor der Blutspende keine blutgerinnungsbeeinflussende Medikamente einnahmen. Das Blut wurde mit 3,18 %iger Tri-Natriumcitrat Lösung antikoaguliert (1 ml Citrat/10 ml Blut) und bei 170×g für 15 Min. zentrifugiert. Hierdurch erhielt man eine obere plättchenreiche Schicht, das plättchenreiche

Plasma (PRP), sowie eine weiße Zwischenschicht, den sogenannten *Buffy coat*, in dem die Leukozyten enthalten waren. In der unteren Schicht befanden sich vorwiegend die Erythrozyten.

2.2.1.2 Monozytenisolierung

Für die Isolierung der Monozyten wurde die Bindung eines Magnet-gekoppelten Antikörpers genutzt, der gegen einen monozyten-spezifischen Oberflächenrezeptor (CD14) gerichtet war (Abb. 6). Je 15 ml des leukozytenreichen *Buffy coats* wurden in einem 50 ml Falconröhrchen mit 5 ml PBS verdünnt und mit 13 ml Ficoll ($d = 1,007$) unterschichtet. Anschließend wurde bei $260\times g$ für 25 Min. (ohne Bremse) zentrifugiert. Dabei bildete sich ein Gradient aus einer Plasmaschicht und einer Interphase, die aufgrund ihrer geringeren Dichte auf der Ficollschicht lokalisiert war und somit von dem Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten getrennt werden konnte. Die Plasmaschicht wurde verworfen. Die Interphase, in der sich die mononukleären Leukozyten (vorwiegend Monozyten und Lymphozyten) befanden, wurde in einem 50 ml Falconröhrchen gesammelt und mit Monozytenwaschpuffer bei $100\times g$ für 10 Min. gewaschen. Das gewonnene Pellet wurde in $400\ \mu\text{l}$ Antikörperpuffer aufgenommen. Nach Zugabe des anti-CD14 Microbeads Antikörpers wurde die Zellsuspension 15 Min. bei 4°C inkubiert und anschließend mit dem Antikörperpuffer verdünnt. Die Zellsuspension wurde auf die gespülten Säulen aufgetragen und dreimal mit je $500\ \mu\text{l}$ Antikörperpuffer gespült. Nach dem Entfernen der Säulen aus dem Magnetfeld wurde die Säule mit je 2 ml Antikörperpuffer aufgefüllt und die Monozyten mit einem Stempel aus der Säule eluiert. Die Monozytensuspension wurde in einem Falconröhrchen mit Resuspensionspuffer aufgefüllt und bei $170\times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde in $200\ \mu\text{l}$ Resuspensionspuffer aufgenommen und die Zellzahl und Viabilität mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Reinheit der Monozyten wurde im Lichtmikroskop anhand der morphologischen Merkmale der Zellen bestimmt und lag durchschnittlich bei 90 %.

2.2.1.3 Präparation der neutrophilen Granulozyten

Auch die Isolierung der neutrophilen Granulozyten (Neutrophile) erfolgte über die Bindung an einen magnetisch-konjugierten Antikörper, der gegen einen zellspezifischen Oberflächenrezeptor der Neutrophilen (CD15) gerichtet war (Abb. 6). Der *Buffy coat* von 50 ml Vollblut wurde in einem Falconröhrchen gesammelt und nach Zugabe des anti-CD15 Microbeads Antikörpers für 15 Min. im Kühlschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit Antikörperpuffer verdünnt und auf die gespülten Säulen aufgetragen. Nach dreimaligem Spülen mit dem Antikörperpuffer wurden die Säulen aus dem Magnetfeld entfernt und die Neutrophilen mit 2 ml Antikörperpuffer aus den Säulen eluiert. Die Zellsuspension wurde in einem Falconröhrchen mit Resuspensionspuffer aufgefüllt und bei 170xg 10 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl und Viabilität der Zellsuspension mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Reinheit der Neutrophilenpräparation wurde anhand morphologischer Eigenschaften lichtmikroskopisch bestimmt und lag durchschnittlich bei ca. 95 %.

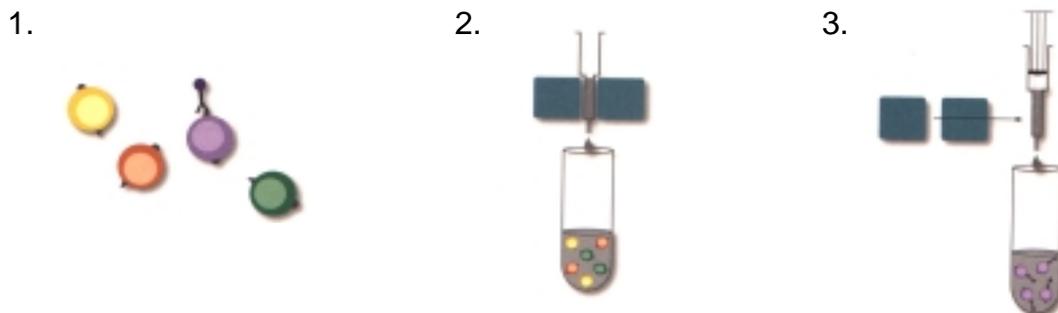


Abb. 6:

1. Der magnetisch-konjugierte Antikörper wird über einen spezifischen Zellrezeptor an eine Zelle gebunden.
2. Die gelabelten Zellen werden über ein Magnetfeld in der Säule gebunden.
3. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld können die Zellen eluiert werden.

2.2.1.4 Isolierung der Plättchen

Die Blutplättchen (Thrombozyten) wurden aus dem Plättchenreichen Plasma (PRP) isoliert. PRP wurde mit Apyrase (0,475 U/ml PRP) oder Apyrase und Iloprost (10 ng/ml PRP) versetzt, um eine Plättchenaktivierung während der Präparation zu verhindern. Je 2 ml PRP wurden bei 170xg für 10 Min. zentrifugiert. Das Plättchenpellet wurde noch einmal mit Thrombozyten-Waschpuffer gewaschen oder sofort in Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Plättchenzahl wurde durch Zählen

im Coulter Counter bestimmt. Die Verunreinigung der Thrombozyten mit Leukozyten wurde unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Die Reinheit der Plättchen lag bei 99 %.

2.2.1.5 Mikrovesikelisolation

In dem Plasmaanteil des Blutes gesunder Probanden finden sich Mikrovesikel, die Abschnürungen der Zellmembran (Mikropartikel) oder von intrazellulären Organellen (Exosomen) der Zellen des Gefäßsystems darstellen. Zur Isolierung der Mikrovesikel wurde das plättchenreiche Plasma zunächst bei $1.050\times g$ für 20 Min. zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung der Plättchen wurde das Plasma ein weiteres Mal bei $1.050\times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde das nun plättchenfreie Plasma in Ultrazentrifugenröhrchen (Nalgene Ultra Plus) abgefüllt und bei $160.000\times g$ für 4 Std. bei $4^{\circ}C$ zentrifugiert. Das mikropartikelfreie Plasma wurde verworfen und das die Mikrovesikel enthaltende Pellet in 1 ml Resuspensionspuffer gelöst. Um auszuschließen, daß es sich bei dem Pellet um Zellbruchstücke von Blutzellen handelt, wurden die Mikrovesikel mit einem Elektronenmikroskop auf ihre Morphologie analysiert (Abb. 7).

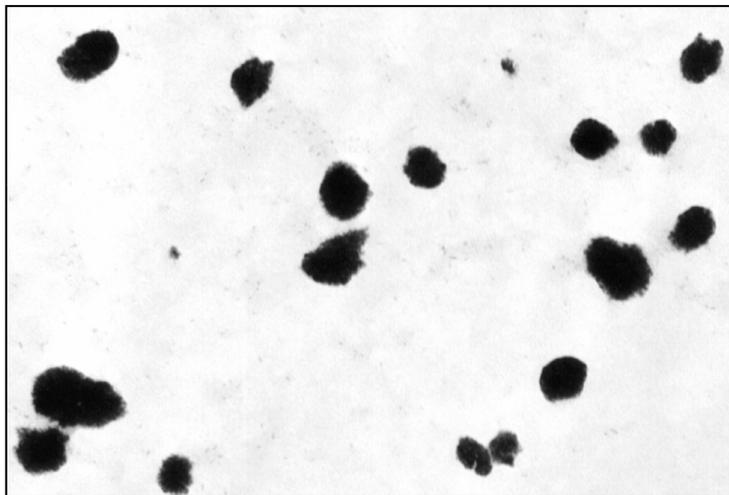


Abb. 7: Elektronenmikroskopische Aufnahme: aus dem Plasma gesunder Spender isolierte zirkulierende Mikrovesikel. Die Durchmesser der Mikrovesikel dieser Präparation lagen zwischen 100 - 250 nm.

2.2.1.6 Herstellung und Isolierung von Mikrovesikeln in vitro

Isolierte Plättchen (2×10^9 ; 2.1.1.4) wurden für 30 Min. mit Kollagen ($8\ \mu g/ml$) und Thrombin ($0,5\ U/ml$) bei $37^{\circ}C$ stimuliert. Zur Abtrennung der Mikrovesikel von den

Plättchen wurde die Zellsuspension anschließend für 15 Min. bei 2.240xg zentrifugiert. Zur Herstellung von in vitro Mikrovessikeln aus Neutrophilen, wurden Neutrophile (5×10^6 ; 2.1.1.3) mit dem neutrophilenspezifischen Stimulus fMLP (100 μ M) für 2 Std. bei 37°C inkubiert. Die Neutrophilen wurden bei 2.240xg abzentrifugiert. Die mikrovessikelhaltigen Überstände wurden mittels Western Blot auf *Tissue Factor* Antigen untersucht.

2.2.1.7 Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Die isolierten Blutzellen (Monozyten, Neutrophile) wurden 1:10 mit Resuspensionspuffer verdünnt, mit dem gleichen Volumen Trypanblau gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter dem Deckgläschen der Zählkammer sammelt sich ein definiertes Volumen der Zellsuspension an. Die Anzahl der Zellen pro Mikroliter ließ sich durch Auszählen von jeweils vier Quadranten und der Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor und dem meßspezifischen Faktor 80 ermitteln. Zusätzlich konnte die Viabilität der Zellen überprüft werden, da tote Zellen durch die Aufnahme des Farbstoffes blau gefärbt wurden.

2.2.2 Flowcytometrie

Die *Flowcytometrie* dient unter anderem zur Bestimmung der Oberflächenexpression von Proteinen auf Zellmembranen. Dabei werden fluoreszenzmarkierte Antikörper (z.B. FITC-, PE- oder APC-konjugierte Antikörper) verwendet, die an die Proteine der Zellmembran binden. Nach Anregung mit einem Laser kann die Fluoreszenzzunahme im Vergleich zu einer ungefärbten Probe (Leerwert) gemessen werden. Da die genannten Fluoreszenzfarbstoffe ein unterschiedliches Fluoreszenzmaximum aufweisen, können auch Mehrfachfärbungen durchgeführt werden, um z.B. eine Zelle durch einen spezifischen Marker zu identifizieren und gleichzeitig die Expressionsänderung eines Zellmembranproteins zu ermitteln. Die Zellen können in der Flowcytometrie nicht nur durch spezifische Marker identifiziert werden, sondern auch durch ihre Position in dem sogenannten *Forward-Sideward Scatter Dotplot*. Nach dem Einsaugen der Probe fällt ein Laserstrahl auf die Zellen, der je nach Größe der Zellen eine mehr oder weniger starke Ablenkung erfährt.

Zusätzlich kann der Laserstrahl je nach Granularität der Zellen die Zelle besser oder schlechter durchdringen. Aus diesen beiden Informationen wird ein zweidimensionales Bild erstellt, in dem die Zellen als Punktwolken nach Granularität (*sideward*) und Größe (*forward*) angeordnet sind.

2.2.2.1 Vollblut

100 µl citriertes Vollblut wurde mit oder ohne Stimulus im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach Entnahme aus dem Wasserbad wurde das Vollblut mit 1 ml *Lysingsolution* versetzt und 30 Min. bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge bei 2.260×g für 5 Min. wurde der Überstand abdekantiert. Das Pellet wurde in einem Restvolumen von 50 µl mit je 5 µl der anti-CD14- oder anti-CD15-Antikörperlösung gefärbt und für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der ungebundene Antikörper mit 1000 µl PBS Lösung gewaschen. Der Überstand wurde erneut abdekantiert und die Zellen in einem Volumen von 50 µl mit 5 µl (0,5 µg) der anti-TF-Antikörperlösung gefärbt. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde die Probe wiederum mit 1000 µl PBS Lösung aufgefüllt. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet in 500 µl PBS gelöst und die Präsentation von *Tissue Factor* auf der Zelloberfläche in einem *Flowcytometer* bestimmt. Um zu untersuchen, ob die *Tissue Factor* Präsentation von der Anwesenheit der Plättchen abhängt, wurden die Plättchen aus dem Vollblut entnommen. Dafür wurde Vollblut bei 170×g für 15 Min. zentrifugiert (siehe 2.2.1.1). Aus dem plättchenreichen Plasma wurden die Plättchen für 10 Min. bei 1.000×g abzentrifugiert. Das plättchenarme Plasma wurde anschließend wieder mit dem restlichen Blut vermischt und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

2.2.2.2 Isolierte Plättchen

Die Plättchen wurden nach der Isolierung in einer Zellzahl von 3×10^8 Plättchen/ml eingesetzt. Je 100 µl der Plättchensuspension wurde mit oder ohne Stimulus im Wasserbad bei 37°C inkubiert und nach der Entnahme aus dem Wasserbad mit 900 µl Cellfix für 30 Min. bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen bei 2.260×g für 5 Min. abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in einem Volumen von 50 µl PBS gelöst und mit je 5 µl (0,5 µg) der jeweiligen

Antikörperlösung gefärbt. Nach 15-minütigem Inkubieren im Dunkeln wurde die Probe mit 1000 µl PBS Lösung gewaschen und das Pellet mit PBS auf 500 µl aufgefüllt.

2.2.2.3 Isolierte Mikrovesikel

Die Mikrovesikel wurden aus 25 ml PRP isoliert und in einem Volumen von 1 ml Resuspensionspuffer resuspendiert. Je 50 µl der Mikrovesikellösung wurden mit 5 µl (0,5 µg) der Antikörperlösung im Dunkeln für 15 Min. gefärbt. Anschließend wurde die Lösung mit PBS auf 500 µl aufgefüllt.

2.2.2.4 Mikrovesikel im Vollblut

5 µl Vollblut wurde mit 45 µl PBS verdünnt und mit 5 µl der Antikörperlösung gefärbt (s.o.). Anschließend wurde die Probe auf ein Volumen von 2500 µl mit PBS aufgefüllt und je 500 µl der Lösung für die Bestimmung im *Flowcytometer* vorbereitet.

2.2.3 Cellsorter

Bei dem Cellsorter handelt es sich um ein *Flowcytometer*, das mit der zusätzlichen Funktion ausgestattet ist, unterschiedlich angefärbte Zellen durch Exposition in einem elektrischen Feld voneinander zu trennen. Diese Methode wurde dazu verwendet, um die im humanen Plasma befindlichen Mikrovesikel nach ihrem zellulären Ursprung zu trennen. Mikrovesikel wurden aus 200 ml Vollblut isoliert (2.2.1.5) und in 1 ml Resuspensionspuffer gelöst. Anschließend wurden je 100 µl der Mikrovesikelsuspension mit je 30 µl der Antikörperlösungen (CD14 APC, CD66b FITC und CD42b PE) einfach angefärbt. Um eine Überlappung der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, wurden die Fluoreszenzintensitäten der einfach gefärbten Proben untereinander abgeglichen. Das restliche Probenvolumen wurde mit je 180 µl Antikörperlösung 3-fach gefärbt (CD14 APC, CD66b FITC und CD42b). Die Ansätze wurden 15 Min. im Dunkeln inkubiert und vor dem Messen wegen der hohen Viskosität der Proben noch einmal 5-fach verdünnt. Die Messung erfolgte am Cellsorter bei Herrn Dr. D. Busch, im Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene des Klinikums Rechts der Isar, der TU München.

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Zellaufarbeitung für die SDS PAGE

Neutrophile und Plättchen wurden isoliert (2.2.1.3; 2.2.1.4) und in einer Konzentration von 1×10^5 Neutrophile/ μl bzw. 1×10^6 Plättchen/ μl in Resuspensionspuffer resuspendiert. Die Proben wurden mit Kollagen (12 $\mu\text{g/ml}$), Thrombin (0,01 U/mL) unter Zugabe einer 15 mM CaCl_2 Lösung für 15 Min. bei 37°C stimuliert. Anschließend wurde bei $2.260 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde im Lysispuffer unter Zugabe von 2000 U/ml Aprotinin aufgenommen, ca. 1 Std. auf Eis gerührt und die Zellsuspension bei $18.990 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Proteinbestimmung zur Durchführung von Western Blots eingesetzt.

2.2.4.2 Proteinbestimmungen

Als Standard für die Proteinbestimmung wurde γ -Globulin der Firma Biorad in einer Konzentration von 120 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ in Aqua bidest. gelöst.

Der Standard wurde in einer Verdünnungsreihe jeweils 1:1 mit doppelt destilliertem Wasser auf 60 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, 30 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$, 15 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ und 7,5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ verdünnt.

Protein Bestimmung nach Bradford:

Jeweils 100 μl des Standards wurden in ein Reagenzglas gegeben. Das zu bestimmende Protein wurde verdünnt und jeweils 100 μl der Verdünnung in ein Reagenzglas gegeben. Das Bradford Reagens wurde 1:5 mit Aqua bidest. verdünnt und 2,5 ml der Mischung zu den Standards und Proteinlösungen pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Aus der Standard-Kurve und dem Verdünnungsfaktor des Proteins wurde die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

Protein Bestimmung mit der BCA-Methode

Jeweils 5 μl des Standards und der Probe wurden in eine 96 Loch-Platte pipettiert und 25 μl der Lösung A und 200 μl der Lösung B des Biorad BCA Proteinbestimmungsassays zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Min.

wurde die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 700 nm gemessen. Aus der Standard-Kurve und dem Verdünnungsgrad der Probe konnte der Proteingehalt ermittelt werden.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins im elektrischen Feld hängt neben der Größe des Proteins auch von der Ladung ab. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine mit Natriumdodecylsulfat denaturiert und erhalten dadurch eine definierte negative Ladung. Um zusätzlich eine schärfere Bandentrennung zu erreichen wird über dem Trenngel ein Sammelgel gegossen, in dem die Proteine fokussiert werden. Da die zu trennenden Proteine ein Molekulargewicht von 47 kDa aufweisen, wurde in den meisten Fällen ein Gel mit 12 % Acrylamid eingesetzt. Nach der Proteinbestimmung der aufgearbeiteten Proben wurden jeweils 50 µg der Probe in einem Reaktionsgefäß mit einem Viertel des Probenvolumens des 4-fach Probenpuffers gemischt, kurz zentrifugiert und 3 Min. bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 140 Volt. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde ein Farbmarker verwendet, in dem Proteine mit definiertem Molekulargewicht enthalten sind.

2.2.4.4 Western Blot

Der Western Blot dient der Identifizierung von Proteinen in komplexen Proteingemischen mittels spezifischer Antikörper. Nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS PAGE (2.2.4.3) wurden diese auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgte der Nachweis des Proteins mit einem spezifischen Antikörper, der mit Hilfe eines zweiten Peroxidase-gekoppelten Antikörpers visualisiert werden konnte.

Das Gel wurde nach der Auftrennung der Proteine ca. 1 Min. im Transferpuffer equilibriert. Das Filterpapier, das als Ionenresevoir diente, sowie die Nitrocellulosemembran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und ebenfalls

in Transferpuffer (ca. 5 Min.) gegeben. Anschließend wurden die Bestandteile in folgender Reihenfolge auf die Anode gelegt:



Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in der Regel innerhalb von 90 Min. bei 35 mA. Die Amperzahl des Transfers errechnete sich dabei aus dem Produkt der Fläche des Gels mit dem Faktor 0,7. Die Effizienz des Transfers wurde durch eine Färbung mit Ponceau S-Lösung überprüft. Nach dem Entfärben der Membran mit TBS/T wurden zum Verhindern von unspezifischen Bindungen die Membran 90 Min. in *Blocking Buffer* gelegt. Anschließend wurde die Membran für weitere 90 Min. mit dem ersten Antikörper (10 µg/ml in *Blocking Buffer*) bei Raumtemperatur inkubiert. Der ungebundene und unspezifisch gebundene Antikörper wurde durch 3-maliges Waschen mit TBS/T Puffer für 10 Min. entfernt. Der Peroxidase gebundene Sekundärantikörper wurde 60 Min. mit der Membran inkubiert und nach 3-maligem Waschen mit TBS/T in eine Plastikfolie gelegt. Zur Visualisierung der spezifischen Proteinbanden wurde eine 1:1 Mischung aus ECL1 und ECL2 auf die Membran aufgetragen und nach 1 Min. aus der Plastikfolie gestrichen. Anschließend wurde ein Röntgenfilm für 1-6 Min. auf die Folie gelegt und im Filmentwicklungsgerät (Kodak) entwickelt.

2.2.4.5 Natives Gel

Die Polyacrylamid Gelelektrophorese und der Western Blot für ein natives Gel entsprechen den unter 2.2.4.3 und 2.2.4.4 angegebenen Bedingungen. Lediglich die Zusammensetzung des Probenpuffers, des Laufpuffers und des Gels sind verändert, da kein SDS enthalten ist. Das Laufverhalten der Proteine im nativen Gel ergibt sich daher aus der Ladung und dem Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine.

2.2.5 Laserscan Mikroskopie

Bei dem Laserscan Mikroskop handelt es sich um ein Fluoreszenzmikroskop, das gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie in der Lage ist, Fluoreszenzfarbstoffe in einzelnen Zellschichten anzuzeigen. Damit konnte u.a. überprüft werden, ob ein Fluorophor auf der Zellmembran oder innerhalb der Zelle lokalisiert ist. Wir haben Mikrovesikel, die aufgrund ihrer Größe teilweise nicht im Lichtmikroskop zu erkennen sind, mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt um ihre Adhäsion an Zellen zu untersuchen. Mikrovesikel wurden aus 100 ml Blut isoliert (2.2.1.5) und in 9 ml Resuspensionspuffer gelöst. Um die Lipidmembran spezifisch anzufärben wurde 1 ml einer 1 mM Lösung von Quinacrin zugesetzt und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Durch eine 1-stündige Zentrifugation bei 160.000×g und 4°C wurde der überschüssige Farbstoff entfernt. Die gefärbten Mikrovesikel wurden anschließend in 200 µl Resuspensionspuffer gelöst. Neutrophile und Plättchen wurden isoliert (2.1.1.3; 2.1.1.4) und in einer Konzentration von 1×10^6 Neutrophilen/ml bzw. 1×10^7 Plättchen/ml resuspendiert. Um die Adhäsion der Mikrovesikel an die Zellen zu analysieren, wurden 40 µl der Mikrovesikellösung zu einigen Proben pipettiert. Alle Proben wurden auf ein Gesamtvolumen von 200 µl gebracht. Zur Charakterisierung der beteiligten Adhäsionsmoleküle wurden die Zellen vor Zugabe der Mikrovesikel mit Antikörper gegen Adhärenzrezeptoren für 10 Min. vorinkubiert. Die Proben wurden ohne oder mit Kollagen (12 µg/ml) für 5 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert und die ungebundenen Mikrovesikel in einer Eppendorffzentrifuge bei 2.260×g abzentrifugiert. Jeweils 20 µl der Probe wurde auf einen Objektträger aufgetragen. Um die Adhäsion der Zellen auf dem Untergrund sicher zu stellen, wurden 20 µl einer 5 mM CaCl₂ Lösung zugegeben und mit einem Deckgläschen fixiert. Die Proben wurden mit Hilfe eines Laserscanmikroskops analysiert. Die Fluoreszenz von Quinacrin wurde bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm bestimmt.

2.2.6 Faktor Xa Bildung

Die funktionelle Aktivität von *Tissue Factor* läßt sich aus der Bildung des aktivierten Faktors X (Faktor Xa) bestimmen. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, spaltet der *Tissue Faktor*/Faktor VIIa Komplex den Faktor X entweder direkt oder indirekt über eine Faktor IX Aktivierung. Der gebildete Faktor Xa spaltet das Substrat S2222. Dabei

entsteht ein Produkt das bei 405 nm absorbiert und dadurch photometrisch bestimmt werden kann.

Die Blutgerinnungsfaktoren wurden dabei in Form des Arzneimittels Beriplex zugefügt, das neben den Gerinnungsfaktoren VII, X, IX zusätzlich auch die im Blut enthaltenen anticoagulatorischen Proteasen Antithrombin und Protein C enthält. Somit werden entsprechend den Bedingungen im Vollblut nicht nur die prokoagulatorischen, sondern auch die antikoagulatorischen Bedingungen berücksichtigt. Die isolierten Blutzellen (vgl. 2.2.1.2-2.2.1.4) wurden zur Messung der prokoagulatorischen Aktivität in einem Verhältnis entsprechend ihrer Konzentration im Blut eingesetzt. Dabei wurden 1×10^5 Monozyten, 1×10^6 Neutrophile und $1,5 \times 10^7$ Plättchen alleine oder in Kombination mit anderen Zellen in einem Gesamtvolumen von 50 μ l des Resuspensionspuffer aufgenommen. Im Falle der Zugabe von Antikörpern oder anderer Substanzen (Inhibitoren) wurden die Zellen für 10-20 Min. bei 37°C vorinkubiert. Im Allgemeinen wurden die Zellen für 5 Min. bei 37°C im Wasserbad mit 12 μ g/ml Kollagen stimuliert. Nach Abschluß der Kollagen Stimulierung wurden die Proben in eine 96 Loch Platte pipettiert. Zur Umrechnung der optischen Dichte in Units/ml wurde bei jeder Messung eine Konzentrationsreihe unter Verwendung eines rekombinanten humanen *Tissue Factors* ermittelt (0,05 mU/ml, 0,1 mU/ml, 0,2 mU/ml, 0,4 mU/ml, 0,8 mU/ml und 1,6 mU/ml). Nach Zugabe von je 50 μ l CaCl_2 Lösung und 100 μ l einer Lösung aus Resuspensionspuffer, Substrat S2222 und Beriplex (3,375 ml Resuspensionspuffer, 400 μ l S2222, 225 μ l Beriplex) zu den Proben und den Standards wurde der Anstieg der optischen Dichte über einen Zeitraum von 30 Min. mit einem ELISA Reader photometrisch bei Raumtemperatur bestimmt.

2.2.7 Thrombelastographie

Die Thrombelastographie stellt gegenwärtig die einzige anerkannte Methode zur Bestimmung der Fibrinbildungsrate im Vollblut dar und erlaubt daher eine funktionelle Erfassung des Blutgerinnungssystems unter Bedingungen, die der in vivo Situation nahe kommt. Das Prinzip des Thrombelastographen beruht darauf, daß ein Stempel der sich langsam vor und zurück bewegt, in ein Gefäß mit Vollblut taucht. Wird nun durch einen Stimulus die Bildung von Fibrinpolymeren ausgelöst, so wird der Bewegung des Stempels ein Widerstand entgegengesetzt, der sich in der

Auslenkung eines Schreibers widerspiegelt. Die Fibrinbildungsrate (*coagulation time*; CT) und die Thrombuswachstumsrate (*clot formation time*; CFT) werden dabei in Sekunden angegeben.

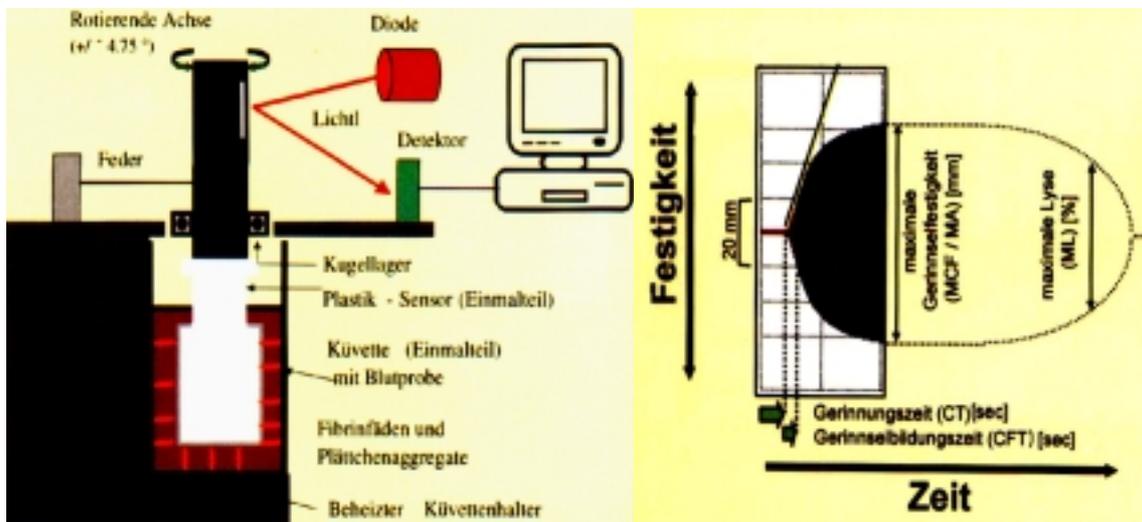


Abb. 8: Links: Aufbau eines Thrombelastographen; Rechts: Bestimmung der Gerinnungszeit (CT, *clotting time*; Zeit bis zum Beginn der Gerinnungsbildung) und der Gerinnungsbildungszeit (CFT, *clot formation time*; Zeit ab Beginn der Gerinnungsbildung bis zum Erreichen der Amplitude von 20 mm)

Vollblut wurde in einer Spritze mit Citrat ohne oder mit Korntrypsininhibitor (CTI; 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$) abgenommen. 300 μl Blut wurden in ein TEG Cap pipettiert und ohne/mit Kollagen (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt. Durch die Zugabe von 60 μl einer 100 mM $\text{CaCl}_2/10 \text{ mM}$ Hepes Lösung wurde die Gerinnung gestartet. Der Zusatz von Antikörpern und Inhibitoren erfolgte immer vor der Stimulation. Für die LPS Stimulation wurde das Vollblut zunächst für 3 Std. mit LPS in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vorinkubiert und anschließend die CaCl_2 -Lösung bzw. Kollagen zugegeben. Im Falle der Leukozytenentnahme wurde das frisch gewonnene Blut bei 170xg zentrifugiert und der *Buffy coat* entnommen. Die Mikrovesikel wurden aus dem Blut durch Zentrifugation des mikrovesikelhaltigen Plasmas bei 200.000xg entfernt. Das mikrovesikelfreie Plasma (2.2.1.5) wurde anschließend wieder mit dem restlichen Blut vermischt. Für die Kontrolle (mikrovesikelhaltiges Blut) wurden die Mikrovesikel vor der Zugabe zum Blut wieder im mikrovesikelfreiem Plasma gelöst.

Herstellung des im aktiven Zentrum inaktivierten Faktors VIIa (VIIa_i) für TEG-Messungen und Faktor Xa Bildung

Der Faktor VIIa (2,4 mg; Novoseven) wurden in 1,3 ml eines Hepes/NaCl Puffers gelöst und mit der 10-fachen molaren Menge von Phe-Phe-Arg-Chloromethylketon (0,268 mg CMK) 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in Centricons mit einem Ausschlussgewicht von 10 kDa bei 1.050xg zentrifugiert, um freies CMK zu entfernen. Die Centricons wurden mehrfach mit dem Hepes/NaCl Puffer gespült. Die Umsetzung des Faktors VIIa zu dem im aktiven Zentrum inhibierten Faktor VIIa (VIIa_i) erfolgt im Verhältnis 1:1 und wurde anschließend mit Hilfe der Thrombelastographie überprüft.

2.2.8 Elektronenmikroskopie

Um die Durchmesser und Morphologie der im Blut befindlichen Mikrovesikel zu analysieren (Abb. 7), wurden die Mikrovesikel aus 50 ml Vollblut isoliert und in 100 µl PBS/EDTA Puffer gelöst. Anschließend wurden die Mikrovesikel mit dem gleichen Volumen einer 2 %igen Paraformaldehydlösung über Nacht bei 4°C fixiert. Nach Einbettung in Methylzellulose wurden die Mikropartikel im Elektronenmikroskop des Anatomischen Instituts der LMU München in Kooperation mit Frau Dr. Mechthild Stöckelhuber analysiert.

Mikrovesikel wurden außerdem im stimulierten Vollblut (Kollagen 12 µg/ml) auf eine *Tissue Factor* Präsentation untersucht. Dafür wurde das Blut nach einer 10-minütigen Stimulation für 30 Min. mit dem anti-*Tissue Factor* Antikörper VIC7 (10 µg/ml) inkubiert. Das Blut wurde mit *Lysingsolution* lysiert und fixiert. Der anti-*Tissue Factor* Antikörper wurde mit einem goldgelabelten Zweitantikörper (Ø 10 nm) visualisiert und mit Hilfe der Elektronenmikroskopie untersucht.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen unstimulierter Plättchen entstanden in Kooperation mit Professor Dr. Eberhard Morgenstern, Medizinische Biologie der Universität des Saarlandes. Gewaschene isolierte Plättchen wurden mittels einer Kryofixationseinheit auf einem Metallspiegel fixiert und anschließend gefriergetrocknet. Serielle Schnitte des Präparates wurden angefertigt. Das Präparat wurde 1 Std. mit einem anti-*Tissue Factor* Antikörper (VD8; 1 Std., 20°C) inkubiert und mit einem goldgelabelten Zweitantikörper (Ø 6 nm; 20 µg/ml) visualisiert

(1 Std., 20°C). Die Proben wurden mit einem Elektronenmikroskop EM 109 untersucht.

2.2.9 Chemilumineszenz Messung

Die Bestimmung der zellulären Bildung bzw. Freisetzung von Superoxidanion erfolgte mittels Chemilumineszenz. Dabei wurde der Chemilumineszenz-Farbstoff L012 verwendet, der mit einer hohen Spezifität und Sensitivität Superoxidanion nachweisen kann. Bei dieser Methode wird der Anstieg emittierter Photonen pro Zeiteinheit (*Relative light units* = RLU/Sekunde) bei 550 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers gemessen. Neutrophile wurden isoliert (2.1.1.3) und in einer Zellzahl von 50.000 Neutrophile/240 µl Resuspensionspuffer eingestellt. Nach Zugabe von 30 µl einer 23 mM CaCl₂ Lösung und 30 µl einer 1000 µM L012-Lösung wurde die basale Superoxidanion Produktion der Zellen gemessen, bis sich ein konstanter Wert einstellte. Anschließend wurden die Zellen mit Kollagen (12 µg/ml) stimuliert.

2.2.10 Double Sandwich ELISA

Isolierte Monozyten (Cellsorter), Neutrophile (2.2.1.3) und Plättchen (2.2.1.4) wurden durch wiederholtes einfrieren (-20°C) und auftauen lysiert und der enthaltene *Tissue Factor* durch eine 30-minütige Inkubation (37°C) in einem 0,1 %igen Tritonpuffer solubilisiert. Nach Bindung des *Tissue Factor* Antikörpers IID8 (10 µg/ml) an eine Mikrotiterplatte wurden die Zelllysate für 2 Std. mit dem Antikörper inkubiert. Nach 3-maligem Waschen wurde der Peroxidase-gekoppelte *Tissue Factor* Antikörper VIC7 zugegeben (2 Std.) und nach Zugabe des Substrates o-Phenylendiamin die Absorption mit einem Photometer bei 492 nm gemessen. Die *Tissue Factor* Konzentration wurde mit Hilfe einer Standardkurve aus humanem *Tissue Factor* Protein bestimmt.

2.2.11 Statistik

Die statistische Signifikanz *p wurde mit der Software Stat Win (Jandel Cooperation) berechnet. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte mit Hilfe des t-Testes (bei Normalverteilung) oder des Mann-Whitney-Rank-Sum-Tests (bei Nicht-normalverteilung der Werte). Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ausgedrückt. Die *p-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant bezeichnet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Schnelle Präsentation von *Tissue Factor* in Plättchen-Leukozyten-Komplexen

Um den Einfluß einer Langzeitstimulation von Monozyten auf den Gerinnungsstart über den *Tissue Factor* zu untersuchen, wurde neben den bereits als aktivierend bekannten Lipopolysacchariden auch der physiologische Stimulus Kollagen analysiert. Zu diesem Zwecke wurde Vollblut bis zu 120 Min. mit Kollagen (Typ 1; 12 µg/ml) stimuliert und sofort fixiert. Im Vollblut wurden anschließend die Leukozytenfraktionen auf einen Anstieg von *Tissue Factor* Antigen in der *Flowcytometrie* analysiert. Dabei ergab sich unerwarteterweise innerhalb weniger Minuten ein signifikanter Anstieg von *Tissue Factor* Antigen auf der Oberfläche von CD15- und CD14-positiven Blutkomponenten. Die CD15- und CD14-positiven Zellen wurden nach ihrer Größe und Granularität als Neutrophile und Monozyten identifiziert. Ein Maximum der *Tissue Factor* Präsentation auf der Oberfläche der Neutrophilenfraktion wurde bereits nach 5 Min. erreicht. Die *Tissue Factor* Exposition auf den Monozyten zeigte ein Maximum nach 10-minütiger Stimulation mit Kollagen (Abb. 9).

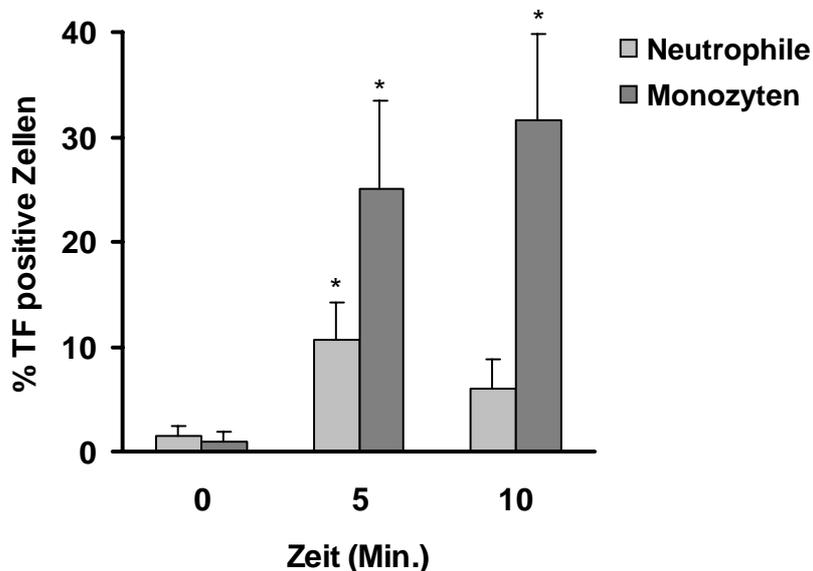


Abb. 9: Vollblut wurde für unterschiedliche Zeitintervalle mit Kollagen stimuliert, fixiert und mit FITC gelabeltem anti-*Tissue Factor* Antikörper (0,5 µg/50 µl) gefärbt. Die Präsentation von *Tissue Factor* Antigen assoziiert mit Neutrophilen oder Monozyten wurde in der *Flowcytometrie* gemessen. Die Werte wurden mit Hilfe der Negativ-Kontrolle korrigiert. n=6; *p<0,05 (gegen 0 Min.-Wert)

Um den optimalen Anstieg der *Tissue Factor* Präsentation zu erfassen, wurde in den folgenden Versuchen jeweils 5 Min. mit Kollagen stimuliert, da nach diesem Zeitintervall sowohl in der Monozyten- wie auch in der Neutrophilenfraktion ein signifikanter Anstieg des *Tissue Factor* Antigens zu verzeichnen war.

3.2 Plättchenabhängigkeit der Präsentation von *Tissue Factor* auf Leukozyten

Da Kollagen ein starker Plättchenagonist ist, wurde die Rolle der Thrombozyten für die Präsentation des intravaskulären *Tissue Factors* untersucht. Plättchenarmes Vollblut und plättchenreiches Vollblut wurde mit Kollagen inkubiert und die Leukozytenfraktion auf das *Tissue Factor* Antigen mittels *Flowcytometrie* untersucht. Eine Reduktion der Plättchenzahl im Blut verminderte die mit den Monozyten und Neutrophilen assoziierte *Tissue Factor* Präsentation (Abb. 10).

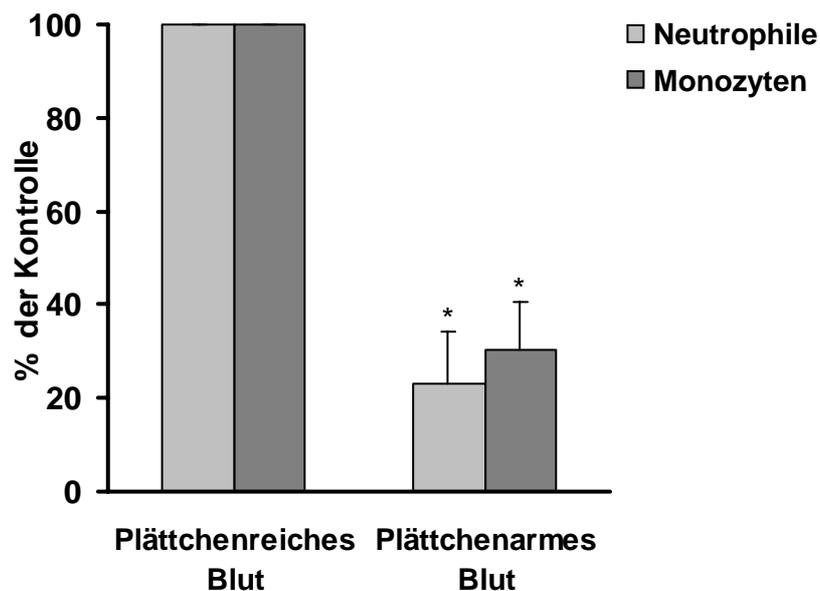


Abb. 10: Plättchenreiches und plättchenarmes Vollblut wurde für 5 Min. mit Kollagen (12 µg/ml) stimuliert und die Exposition von *Tissue Factor* in den Leukozytenfraktionen untersucht. Kontrolle (plättchenreiches Blut) = 100 %; n=6; *p<0,05 (gegen Kontrolle)

3.3 Lokalisierung des Intravaskulären *Tissue Factors*

Aufgrund der kurzen Stimulationsperiode war eine de novo Synthese von *Tissue Factor* auszuschließen. Wir gingen daher davon aus, daß es sich bei dem auf der Oberfläche der Leukozyten präsentierten *Tissue Factor* um präformiert vorhandenes Protein handelte. Um die Lokalisierung des präformierten *Tissue Factors* im Blut zu erfassen, wurden Lysate von isolierten Plättchen, Neutrophilen und Monozyten auf ihren *Tissue Factor* Gehalt mit Hilfe eines *Double Sandwich* ELISAs untersucht. Während in den Neutrophilen und den Monozyten kein *Tissue Factor* nachweisbar war, enthielten die Plättchen überraschenderweise *Tissue Factor* in einer Konzentration von 56 pg/mg Protein (Tab.1).

Tab. 1: Der *Tissue Factor* Gehalt isolierter Zellen wurde mit Hilfe des *Double Sandwich* ELISAs ermittelt. Mittelwerte \pm Standardabweichung; n=4

	Monozyten	Neutrophile	Plättchen
<i>Tissue Factor</i> (pg/mg Protein)	<Detektionslimit	<Detektionslimit	56 \pm 12

Isolierte Plättchen und Neutrophile wurden außerdem in einem nativen Gel aufgetrennt und auf *Tissue Factor* Antigen mit Hilfe eines Western Blots untersucht. In Plättchen konnte unter Verwendung von zwei verschiedenen Antikörpern, die gegen verschiedene Epitope der extrazellulären Domäne des *Tissue Factors* gerichtet sind, *Tissue Factor* Antigen festgestellt werden. In Neutrophilen wurde hingegen kein *Tissue Factor* gefunden (Abb.11).

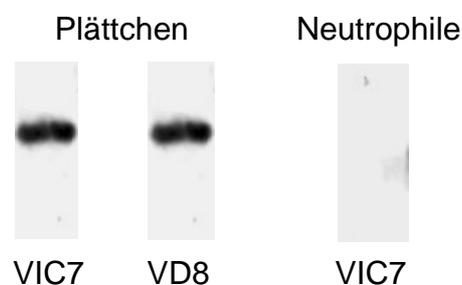


Abb. 11: Analyse der Anwesenheit von *Tissue Factor* in unstimulierten Plättchen und Neutrophilen mittels Western Blot. Die Zellen wurden in einem nativen 5 % Gel aufgetrennt und mit dem anti-*Tissue Factor* Antikörper VD8 (10 μ g/ml) oder VIC7 (10 μ g/ml) gefärbt. n=3

Die intrazelluläre Lokalisation des *Tissue Factors* in den unstimulierten Thrombozyten wurde schließlich mittels Elektronenmikroskopie analysiert. Dabei wurde *Tissue Factor* hauptsächlich in den α -Granula (G) und dem *open canalicular system* (OCS) gefunden (Abb. 12 a-d). Innerhalb der α -Granula war der *Tissue Factor* mit der Membran assoziiert (Abb. 12 a) oder in der Matrix lokalisiert (12 c-d). Ein Teil des Plättchen *Tissue Factors* wurde außerdem in Clustern an der Plättchenoberfläche (PO) nachgewiesen (Abb. 12 a, d). In den dichten Granula, den Mitochondrien und im Cytoplasma der Plättchen war kein *Tissue Factor* vorhanden.

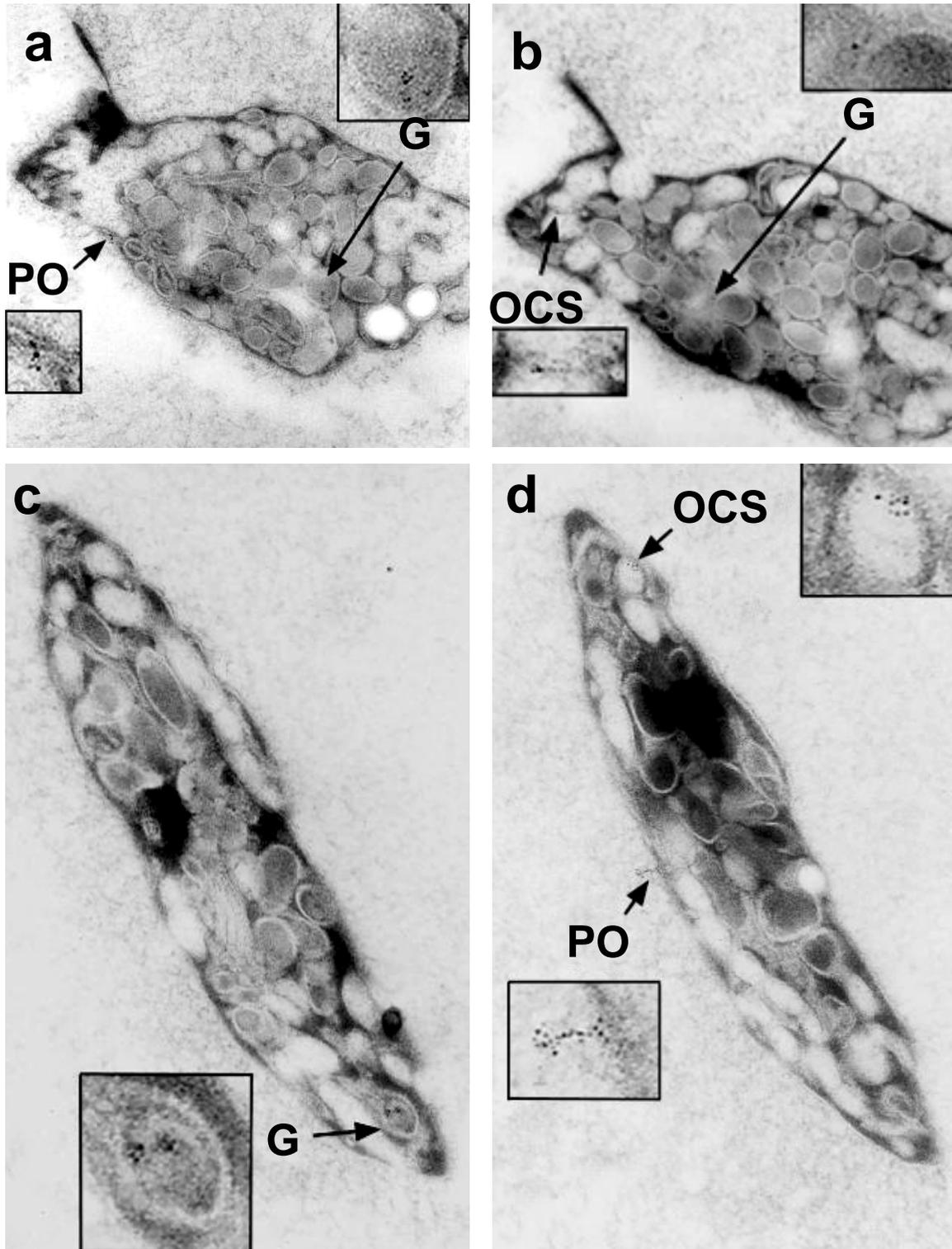


Abb. 12: Gewaschene isolierte Plättchen wurden fixiert und Gefrierschnitte des Präparates angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem anti-*Tissue Factor* Antikörper VD8 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für eine Stunde (20°C) inkubiert. Nach Zugabe des goldmarkierten Zweitantikörpers (Partikel mit 6 nm Durchmesser; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurden die Schnitte mit Hilfe eines Elektronenmikroskops auf *Tissue Factor* Antigen untersucht.

3.4 *Tissue Factor* isolierter intakter Plättchen ist funktionell inaktiv

Nachdem die Anwesenheit von *Tissue Factor* in den Plättchen durch verschiedene Methoden nachgewiesen war, untersuchten wir ob der intravaskuläre *Tissue Factor* der Plättchen durch Stimulierung auf der Zellmembran präsentiert wird. Tatsächlich führte die Stimulation isolierter Plättchen zu einem Anstieg von *Tissue Factor* Antigen auf der Plättchenoberfläche (Abb. 13a). Das Ausmaß der *Tissue Factor* Präsentation hing dabei vom Stimulus ab. ADP, ein schwacher Plättchenagonist, hatte nur einen geringen Einfluß auf die *Tissue Factor* Präsentation. Kollagen und Thrombin dagegen führten zu einem signifikanten Anstieg der *Tissue Factor* Exposition. Parallel zu der genannten Exposition wurde der Aktivierungsgrad der Plättchen anhand der P-Selektin Präsentation auf der Zellmembran der Plättchen bestimmt (Abb. 13b).

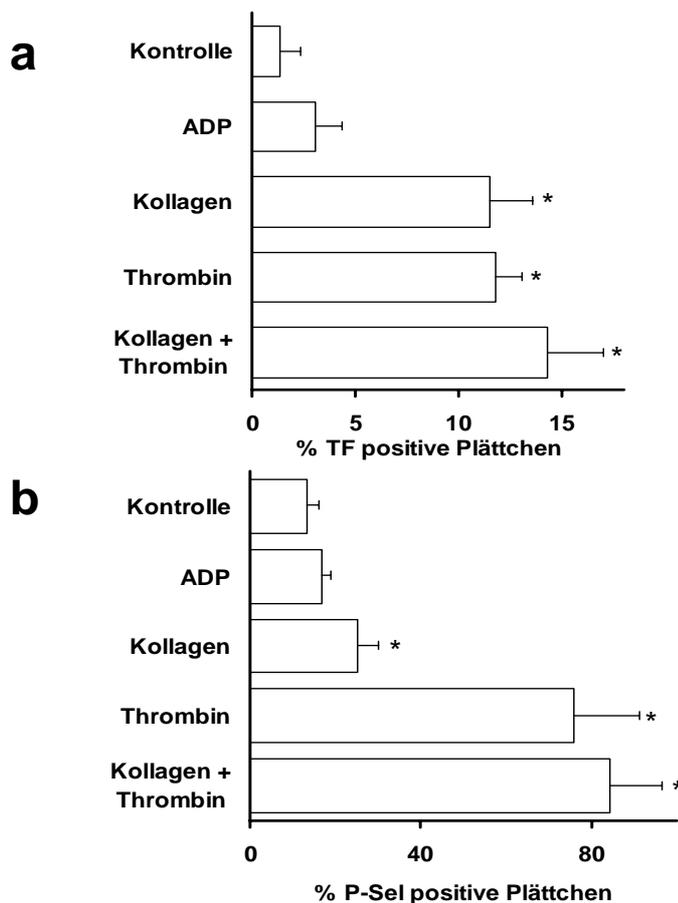


Abb 13: a) *Tissue Factor* Präsentation auf der Oberfläche stimulierter Plättchen. Isolierte Plättchen wurden mit ADP (10 μ M), Kollagen (12 μ g/ml), Thrombin (0,1 U/ml) und Kollagen (5 μ g/ml) + Thrombin (0,1 U/ml) stimuliert und die *Tissue Factor* Exposition mit Hilfe der *Flowcytometrie* gemessen. b) Die P-Selektin Exposition der Plättchen wurde durch die verschiedenen Agonisten auf ähnliche Weise stimuliert wie die *Tissue Factor* Präsentation. n=6; *p<0,05 (gegen Kontrolle = unstimulierte Plättchen)

Als nächstes überprüften wir, ob der auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten präsentierte *Tissue Factor* funktionell aktiv war. Hierbei wurde ein einstufiger Gerinnungstest verwendet, der auf der Aktivierung des Faktors X durch den *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex basiert. Die prokoagulatorische Aktivität isolierter Plättchen wurde vor und nach Stimulation mit Kollagen analysiert. Der Plättchen-*Tissue Factor* erwies sich dabei als funktionell inaktiv. Erst eine Stimulation der Thrombozyten mit dem Kalziumionophor A23187 führte zu einer deutlichen Steigerung der Faktor Xa Bildung. Die prokoagulatorische Aktivität wurde zu 50 % durch den anti-*Tissue Factor* Antikörper VIC7 gehemmt (Abb. 14).

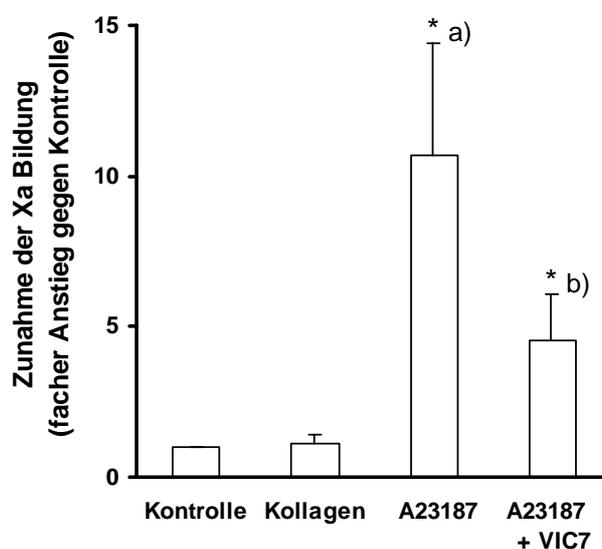


Abb. 14: Isolierte Plättchen wurden stimuliert und die funktionelle Aktivität des *Tissue Factors* mit Hilfe der Faktor Xa Bildung untersucht. Eine 5-minütige Inkubation mit Kollagen (12 µg/ml) führte zu keinem Anstieg der prokoagulatorische Aktivität. Erst die Stimulation mit dem Kalziumionophor A23187 (3 µM) förderte die Faktor Xa Bildung. Kontrolle = unstimulierte Plättchen; n=4; *p<0,05 a) vs. Kontrolle; b) vs. A23187 stimulierte Plättchen

3.5. Leukozyten-assoziiertes *Tissue Factor* löst im Vollblut Fibrinbildung aus

Zur Untersuchung der funktionellen Aktivität des Plättchen-assoziierten *Tissue Factors* im Vollblut wurde die Auswirkung von Kollagen auf die Fibrinbildung mit Hilfe der Thrombelastographie gemessen. Mittels Thrombelastographie kann die Fibrinbildung im Vollblut unter nahezu physiologischen Bedingungen gemessen werden. Die Zugabe von Kollagen (12 µg/ml) zum Vollblut erhöhte sowohl die Fibrinbildungsrate (*coagulation time*; CT), als auch das Thrombuswachstum (*clot formation time*; CFT) (Abb. 15; Tab. 2). Der im aktiven Zentrum inaktivierte Faktor

VIIa (VIIa_i), der mit einer höheren Affinität an *Tissue Factor* bindet als Faktor VIIa, wie auch der anti-*Tissue Factor* Antikörper VIC7 bewirkten eine Verzögerung der Fibrinbildung und des Thrombuswachstums im stimulierten Vollblut. Die Negativ-Kontrolle hatte keinen Effekt auf die Fibrinbildung. Die Fibrinbildung konnte also durch zwei voneinander unabhängige Inhibitoren des *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplexes gehemmt werden. Die durch Kollagen induzierte Fibrinbildung wurde demnach durch den *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex ausgelöst.

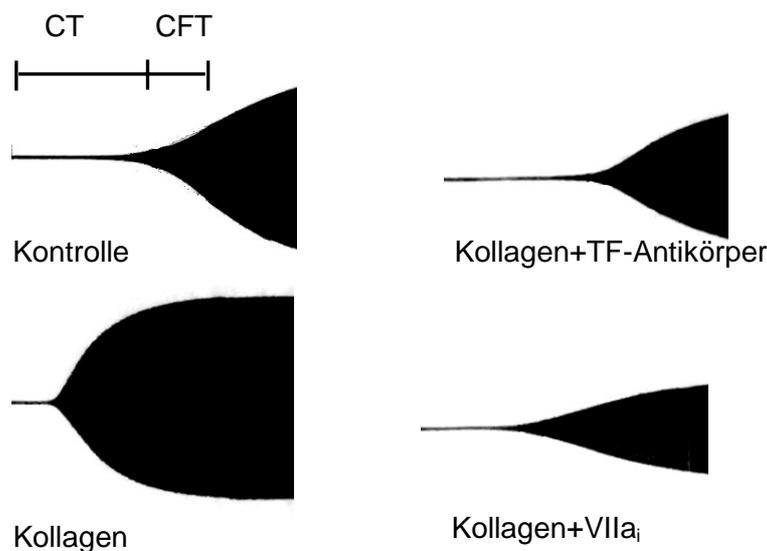


Abb. 15: Fibrinbildungsrate (CT) und Thrombuswachstum (CFT) wurden im Vollblut nach Recalcifizierung mit Hilfe der Thrombelastographie bestimmt. Der Anstieg der Fibrinbildungsrate und des Thrombuswachstums nach Stimulation mit Kollagen (12 µg/ml) wird durch den *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex ausgelöst, da sowohl VIIa_i (500 nM) als auch der anti-*Tissue Factor* Antikörper VIC7 (20 µg/ml) die Fibrinbildung und das Thrombuswachstum hemmen

Um sicher zu gehen, daß in der Thrombelastographie wirklich die Fibrinbildung gemessen wird, wurde das Vollblut zusätzlich mit Hirudin (30 ng/ml) antikoaguliert. Hirudin inhibiert selektiv Thrombin. Die Fibrinbildung konnte durch Hirudin vollständig gehemmt werden (Kollagen: CT=1223 s ± 195 s; Kollagen + Hirudin: CT>1800 s). Eine 3-stündige Inkubation von Vollblut mit Lipopolysaccharid (LPS 1 µg/ml), das eine transkriptionelle Aktivierung der *Tissue Factor* Expression bei Monozyten bewirkt, führte zu einer ähnlichen Fibrinbildungsrate wie Kollagen. Die Zugabe von Kollagen (12 µg/ml) zu LPS stimuliertem Vollblut führte zu einer zusätzlichen Verstärkung der Fibrinbildung (Tab. 2).

Tab. 2: Fibrinbildung und Thrombuswachstum nach Aktivierung von Vollblut mit verschiedenen Stimuli. MW \pm S.D.; n=10; *p<0,05 (gegen Kollagen stimuliertes Blut)

	Kontrolle	Kollagen	VIC7	Vllai	LPS	LPS + Kollagen	IgG
CT (s)	728 \pm 138*	414 \pm 98	712 \pm 148*	648 \pm 86*	385 \pm 13	272 \pm 60	426 \pm 83
CFT (s)	362 \pm 74	206 \pm 88	522 \pm 128*	422 \pm 138	289 \pm 66	370 \pm 59	470 \pm 167

Der Kontakt von Blut mit künstlichen Oberflächen führt im Allgemeinen zu einer Aktivierung des intrinsischen Systems der Gerinnung. Um die Oberflächenaktivierung zu hemmen, wurde das Blut mit Korntrypsininhibitor (CTI; 32 μ g/ml), einem spezifischen Inhibitor des Faktors XIIa, vorinkubiert. Auch nach Hemmung des Kontaktaktivierungssystems bewirkte Kollagen eine Steigerung der Fibrinbildung. Die Kollagen stimulierte Fibrinbildung wurde auch unter diesen Bedingungen durch den anti-*Tissue Factor* Antikörper VIC7 (20 μ g/ml) gehemmt (Abb. 16; Tab. 3).

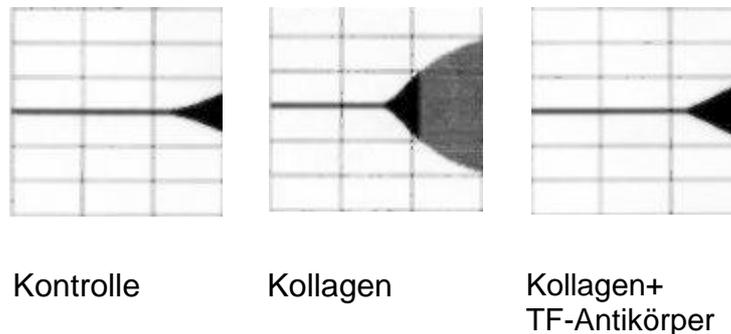


Abb. 16: Vollblut wurde mit CTI (32 μ g/ml) vorinkubiert, um das Kontaktaktivierungssystem der Gerinnung zu hemmen. Kollagen (12 μ g/ml) fördert auch nach Hemmung des Kontaktaktivierungssystems die Fibrinbildung in der Thrombelastographie.

Tab. 3: Mittelwert und Standardabweichungen der Thrombelastographie unter CTI Bedingungen (32 μ g/ml). n=5; *p<0,05 (gegen Kollagen stimuliertes Blut)

mit CTI	Kontrolle	Kollagen	VIC7
CT (s)	1223 \pm 195*	858 \pm 189	1262 \pm 179*
CFT (s)	647 \pm 143*	367 \pm 77	521 \pm 105

3.6 Leukozyten-Plättchen-Konjugate aktivieren den thrombozytären *Tissue Factor*

Da die aktivierten Plättchen alleine die Bildung von Faktor X nicht stimulierten, im stimulierten Vollblut aber die Fibrinbildung auslösten, mußte der Plättchen-*Tissue Factor* funktionell inhibiert sein. Die Lokalisation des Plättchen-*Tissue Factors* in Plättchen-Leukozyten-Komplexen im Vollblut gab uns einen ersten Hinweis, daß möglicherweise Leukozyten eine Rolle in der Aktivierung des intravaskulären *Tissue Factors* spielen. Isolierte Monozyten und Neutrophile alleine wiesen ebenfalls keine prokoagulatorische Aktivität nach Stimulation mit Kollagen auf. Jedoch kam es in Suspensionen aus isolierten Neutrophilen und Plättchen bzw. isolierten Monozyten und Plättchen zu einer deutlichen Steigerung der Faktor Xa Bildung nach Stimulation mit Kollagen (Abb. 17). Bei Anwesenheit von Plättchen, Neutrophilen und Monozyten war eine zusätzliche Verstärkung der Faktor Xa Bildung festzustellen.

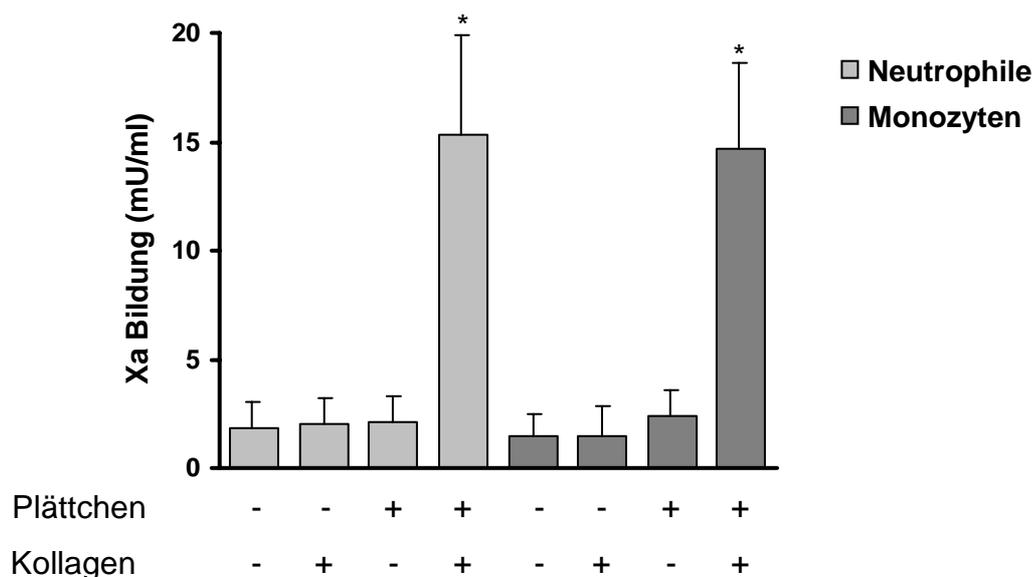


Abb. 17: Kollagen fördert die prokoagulatorische Aktivität in Plättchen-Leukozyten-Suspensionen. Isolierte Monozyten (1×10^5) oder isolierte Neutrophile (1×10^6) wurden 5 Min. mit oder ohne Kollagen ($12 \mu\text{g/ml}$) inkubiert. In weiteren Ansätzen der Plättchen-Leukozyten-Suspensionen wurden isolierte Plättchen (1×10^7) vor der Kollagen Stimulation zugegeben. $n=10$; $*p<0,05$ (gegen unstimulierte Plättchen)

Die in den Plättchen-Leukozyten-Suspensionen beobachtete Faktor Xa Bildung konnte durch die spezifischen anti-*Tissue Factor* Antikörper VIC7, VD8 und 4504 nahezu vollständig gehemmt werden. Die Antikörper sind gegen verschiedene Epitope der extrazellulären Domäne im *Tissue Factor* gerichtet. Auch der im aktiven

Zentrum inaktivierte Faktor VIIa (VIIa_i) inhibierte die Bildung des Faktors Xa fast vollständig. Damit wurde gezeigt, daß der *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex für die Aktivierung des Faktors X in den Suspensionen aus Plättchen und Leukozyten verantwortlich ist. (Abb. 18).

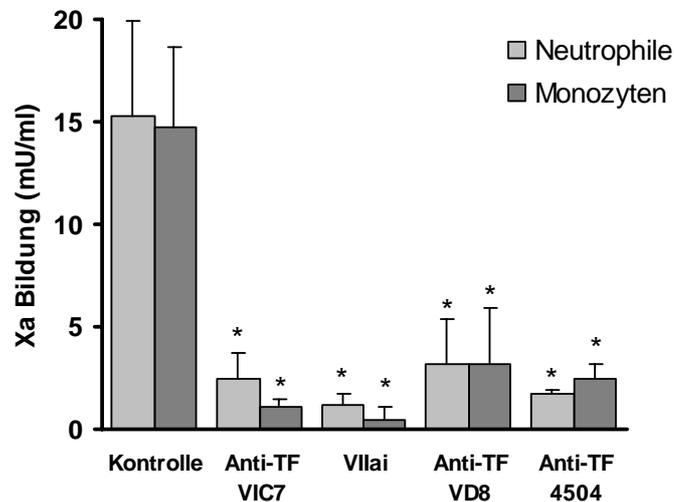


Abb. 18: Die Faktor Xa Bildung in Kollagen (12 µg/ml) stimulierten Plättchen-Leukozyten-Suspensionen wurde durch VIIa_i (10 nM) sowie durch die anti-*Tissue Factor* Antikörper VIC7 (20 µg/ml), VD8 (20 µg/ml) und 4504 (20 µg/ml) gehemmt. n=6; *p<0,05 (gegen Kontrolle = Plättchen-Leukozyten-Suspensionen)

In Anwesenheit eines Antikörpers gegen P-Selektin, einem Plättchenrezeptor, der die Adhäsion der Thrombozyten an Neutrophile und Monozyten vermittelt, nahm die Faktor Xa Bildung ab (Abb. 19). Nach Zugabe eines Antikörpers gegen CD40L, einem weiteren Adhäsionsprotein der Plättchen, war die Faktor Xa Bildung tendenziell vermindert. Der Kontroll-Antikörper zeigte keinen Effekt. Die Ergebnisse ließen vermuten, daß eine Adhäsion der Plättchen an die Neutrophilen und Monozyten für die funktionelle Aktivierung des Plättchen-*Tissue Factors* essentiell war. Um zu überprüfen, ob dies auch im Vollblut der Fall war, wurde die Fibrinbildungsrate und das Thrombuswachstum in Anwesenheit des anti-P-Selektin Antikörpers analysiert. In der Tat reduzierte der Antikörper die Fibrinbildung. Ein ähnlicher Effekt wurde durch die Entnahme der Leukozyten aus dem Blut erzielt, wogegen die Zugabe der Leukozyten zum Vollblut die Fibrinbildung wieder beschleunigte (Abb. 20).

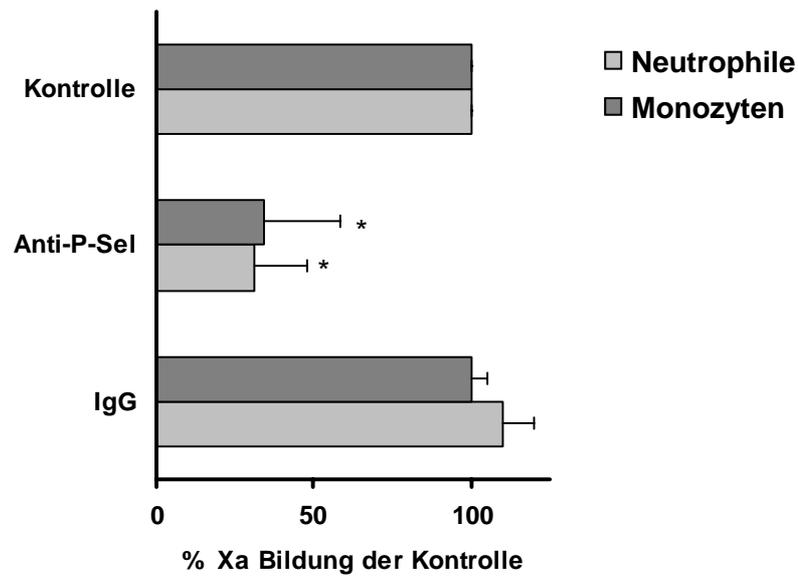


Abb. 19: Plättchen-Monozyten- und Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen wurden ohne bzw. mit anti-P-Selektin Antikörper (10 µg/ml) vorinkubiert und mit Kollagen (12 µg/ml) stimuliert. Kontrolle = Plättchen-Leukozyten-Suspensionen; n=5; *p<0,05 (gegen Kontrolle)

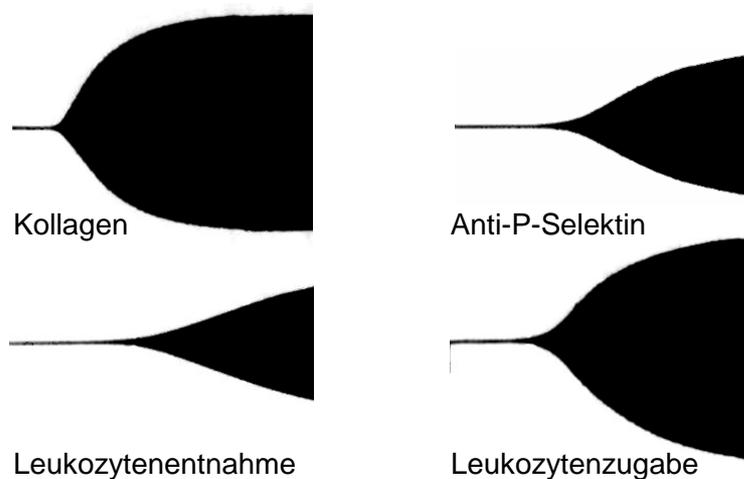


Abb. 20: Einfluß einer Hemmung der Plättchen-Leukozyten-Interaktion auf die Fibrinbildung. Die Zugabe des anti-P-Selektin Antikörpers (20 µg/ml) zu Kollagen (12 µg/ml) stimuliertem Vollblut sowie die Leukozytenentnahme verzögerten die Fibrinbildung und die Gerinnungsbildung. Nach Wiedergabe des *Buffy coats* kommt es zu einer Verkürzung der *CT* und *CFT*.

3.7 Inhibitoren leukozytärer Proteasen vermindern die Faktor Xa Bildung

Nach den bisherigen Ergebnissen war davon auszugehen, daß der Plättchen-*Tissue Factor* per se in einem funktionell inaktiven Zustand vorlag und erst durch die Interaktion mit den Neutrophilen (und Monozyten) aktiviert wurde. Wir prüften zunächst, ob der in den Plättchen vorhandene *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI), der physiologische Inhibitor des *Tissue Factors*, an der Inaktivierung des *Tissue Factors* beteiligt war. Stimulierte Plättchen setzen innerhalb weniger Minuten nach ihrer Aktivierung TFPI frei (Novotny, 1988). Sobald Faktor X durch den *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex aktiviert wird, ist TFPI in der Lage diesen Komplex durch Bildung eines quaternären Komplexes zu inhibieren. Tatsächlich führte die Zugabe eines anti-TFPI Antikörpers zu isolierten Plättchen zu einer 7-fachen Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität. Außerdem ist bekannt, daß aktivierte Leukozyten Proteasen sezernieren, die TFPI spalten können. Um zu überprüfen, ob Serinproteasen der Neutrophilen an der Aktivierung des *Tissue Factors* beteiligt waren, wurden den Neutrophilen-Plättchen-Suspensionen spezifische Inhibitoren gegen Serinproteasen zugegeben. In Anwesenheit von α_1 -Antitrypsin, einem Inhibitor der neutrophilen Elastase, war die Xa Bildung um mehr als 50 % gehemmt. α_1 -Antichymotrypsin, ein Inhibitor der Serinprotease Cathepsin G, reduzierte die prokoagulatorischen Aktivität nicht signifikant (Abb. 21).

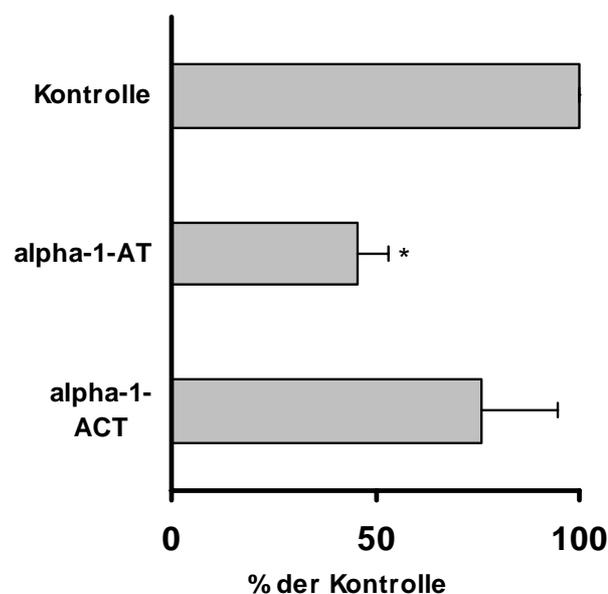


Abb 21: Gemische aus isolierten Neutrophilen und Plättchen wurden mit bzw. ohne α_1 -Antitrypsin (10 $\mu\text{g/ml}$) bzw. α_1 -Antichymotrypsin (10 $\mu\text{g/ml}$) für 10 Min. vorinkubiert und mit Kollagen stimuliert. n=4; *p<0,05 (gegen Kontrolle = Neutrophilen-Plättchen-Suspension)

3.8 TFPI wird von leukozytären Proteasen gespalten

Um zu überprüfen, ob die funktionelle Aktivierung des Plättchen-*Tissue Factors* möglicherweise über eine Inaktivierung von TFPI durch leukozytäre Proteasen vermittelt wird, wurden Suspensionen aus Plättchen und Neutrophilen stimuliert und mit Hilfe eines Western Blots auf Spaltprodukte des TFPIs untersucht. Als Kontrolle wurden isolierte aktivierte Plättchen und Neutrophile eingesetzt. Während in der Fraktion der stimulierten isolierten Plättchen lediglich die Bande eines *full length* TFPIs (47 kDa) vorhanden war, fanden sich in der aktivierten Suspension aus stimulierten Plättchen und Neutrophilen Abbauprodukte des TFPIs. Neutrophile wurden als Negativ-Kontrolle eingesetzt, da sie kein TFPI Protein enthielten (Abb. 22).

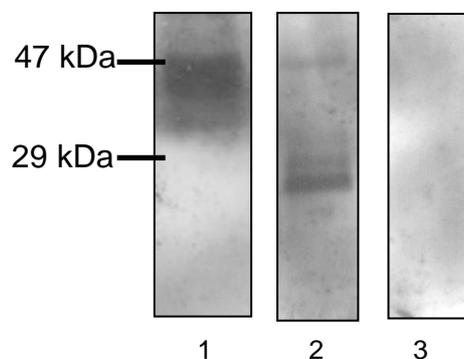


Abb. 22: Isolierte Plättchen und Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen wurden mit Kollagen (12 $\mu\text{g/ml}$) und Thrombin (0,01 U/ml) in einem kalziumhaltigen Puffer (15 mM) stimuliert und mit Hilfe eines Western Blots auf TFPI untersucht. Die Abbauprodukte des TFPI wurden mit einem polyklonalen anti-TFPI Antikörper (10 $\mu\text{g/ml}$) nachgewiesen. 1: stimulierte Plättchen; 2: stimulierte Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen; 3: stimulierte Neutrophile;

Inkubiert man die Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen vor ihrer Stimulation mit Antikörpern gegen die Adhäsionsrezeptoren P-Selektin, PSGL-1 und CD18, die die Interaktion zwischen Plättchen und Neutrophilen vermittelten, so wurde der Abbau von TFPI gehemmt (Abb 23).

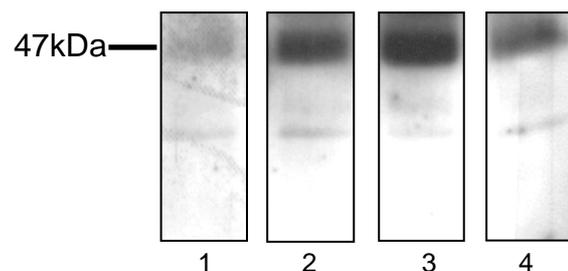


Abb. 23: Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen wurden vor der Kollagen Stimulation mit je 20 $\mu\text{g/ml}$ eines Antikörpers gegen P-Selektin (2), PSGL-1 (3) und CD18 (4) inkubiert. Als Kontrolle diente die Plättchen-Neutrophilen-Suspension alleine (1).

Für die Identifizierung der beteiligten Proteasen am Abbau von TFPI wurden die aktivierten Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen mit spezifischen Inhibitoren gegen leukozytäre Proteasen inkubiert. Als Inhibitoren der Elastase und von Cathepsin G wurden CMK bzw. α_1 -Antitrypsin eingesetzt. Dabei bestätigte sich die Beteiligung der Serinproteasen Elastase und Cathepsin G an der Inaktivierung von TFPI (Abb. 24).

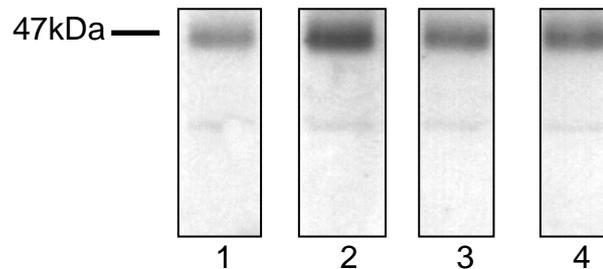


Abb. 24: Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen (1) wurden mit Inhibitoren der Elastase: 1mM CMK (2) und 20 $\mu\text{g/ml}$ α_1 -Antitrypsin (3), sowie mit 20 $\mu\text{g/ml}$ α_1 -Antichymotrypsin (4), einem Inhibitor von Cathepsin G, inkubiert.

Die Inkubation der Plättchen-Neutrophilen-Gemische mit TIMP-2, einem spezifischen Inhibitor von Matrix-Metalloproteinasen, sowie mit Phenanthrolin, einem unspezifischen Inhibitor von Matrix-Metalloproteinasen, hemmten ebenfalls den Abbau von TFPI. Hieraus ergab sich, daß auch Matrix-Metalloproteasen, an der Inaktivierung von TFPI beteiligt sein könnten (Abb. 25).

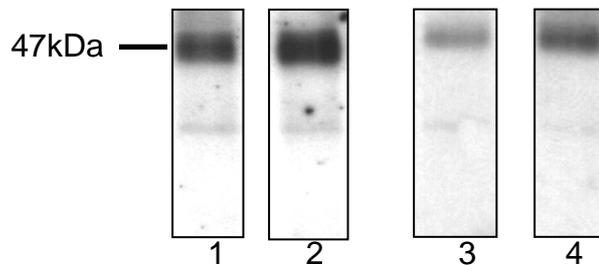


Abb. 25: Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen (1 und 3) wurden mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ TIMP-2 (2) und 15 μM Phenanthrolin (4) inkubiert

3.9 Reaktive Sauerstoffspezies fördern die *Tissue Factor* Präsentation von Plättchen

Stimulierte Leukozyten setzen neben Proteasen auch reaktive Sauerstoffspezies frei. Um die sezernierten Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies abzuschätzen, wurden Neutrophile isoliert und die Menge an Superoxidanionen ohne und mit Kollagen Stimulation mit Hilfe der Chemilumineszenz gemessen. Bei dieser Methode wird ein Farbstoff (L012) durch die freigesetzten Superoxidanionen zur Fluoreszenz angeregt. 10 s nach Kollagen Zugabe stieg die Menge an Superoxidanionen beträchtlich an (Abb. 26).

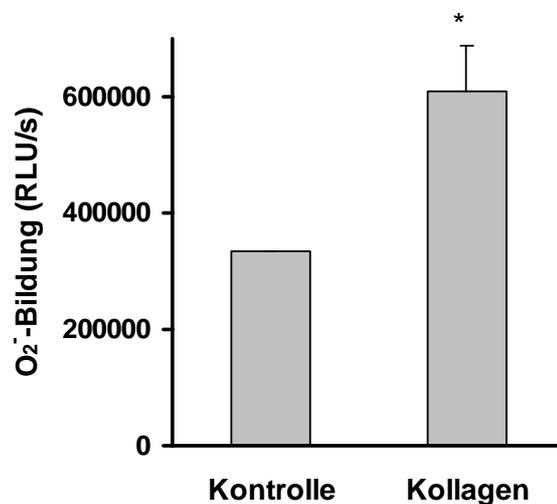


Abb. 26: Die Superoxidanion (O_2^-)-Bildung isolierter Neutrophiler nach Zugabe von Kollagen (12 $\mu\text{g/ml}$) wurde mittels Chemilumineszenz gemessen. Die Standardabweichung der Kontrolle ist aufgrund der geringen Abweichung nicht sichtbar. * $p < 0,05$

Um zu testen, ob die Plättchen durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aktiviert wurden, wurden Plättchen mit Wasserstoffperoxid behandelt. Dies führte zu einem ausgeprägten Anstieg der P-Selektin Freisetzung (Abb. 27a). Auch die *Tissue Factor* Präsentation der mit Wasserstoffperoxid stimulierten Plättchen war deutlich erhöht. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, daß die reaktiven Sauerstoffspezies der Neutrophilen die *Tissue Factor* Präsentation der Plättchen verstärken (Abb. 27b).

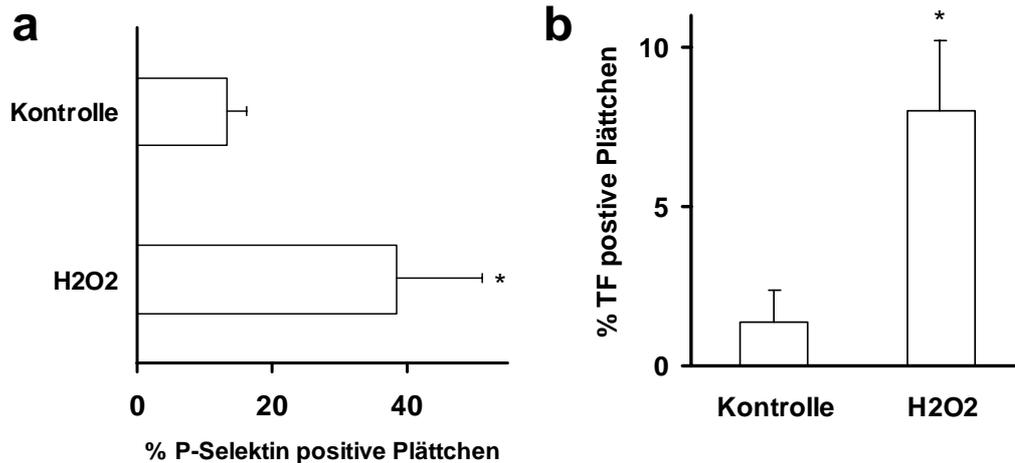


Abb. 27: a) P-Selektin Exposition und b) *Tissue Factor* Präsentation nach Stimulation isolierter Plättchen mit H_2O_2 (1 mM) für 5 Min. Die Plättchen wurden nach der Stimulation fixiert und mit anti-P-Selektin Antikörper (5 μl) bzw. anti-*Tissue Factor* Antikörper (5 μl) gefärbt; n=4; p<0,05 (gegen Kontrolle = unstimulierte Plättchen)

3.10 Mikrovesikel sind konstitutiv im Blut vorhanden

Frühere Befunde lassen vermuten, daß von Blutzellen abgegebene Mikrovesikel *Tissue Factor* enthalten könnten (Berckmans, 2001). Um dies zu überprüfen, analysierten wir, ob Blut gesunder Spender zirkulierende Mikrovesikel enthielt. Bei der Analyse von Plasma mit Hilfe der *Flowcytometrie* wurde charakteristischerweise in einem Größenbereich, der unter demjenigen der Plättchen liegt, Strukturen beobachtet, die Mikrovesikel darstellen könnten. Mikrovesikel sind Abschnürungen der Zellmembran (Mikropartikel) oder von intrazellulären Organellen (Exosomen), die vor allem von stimulierten Blutzellen abgegeben werden. Wir isolierten Mikrovesikel mittels Ultrazentrifugation aus dem Plasma und färbten sie mit spezifischen Oberflächenmarkern für Blutzellen an, um die Herkunft der Mikrovesikel zu bestimmen (Abb. 28). Die Mikrovesikel des von uns untersuchten Plasmas gesunder Spender stammten in erster Linie aus Plättchen (P-Selektin positiv). Bekannterweise sind Thrombozyten leicht aktivierbar und geben schnell Mikropartikel ab. Außerdem wurden Mikrovesikel aus Monozyten (CD14 positiv), Neutrophilen (CD15 positiv) und in geringeren Anzahl von Endothelzellen (E-Selektin positiv) gefunden. Zusätzlich wurden die Mikrovesikel noch mit Annexin V angefärbt, um den Grad der Exposition von Phosphatidylserin zu bestimmen, ein Maß für die prokoagulatorische Aktivität der Mikrovesikel.

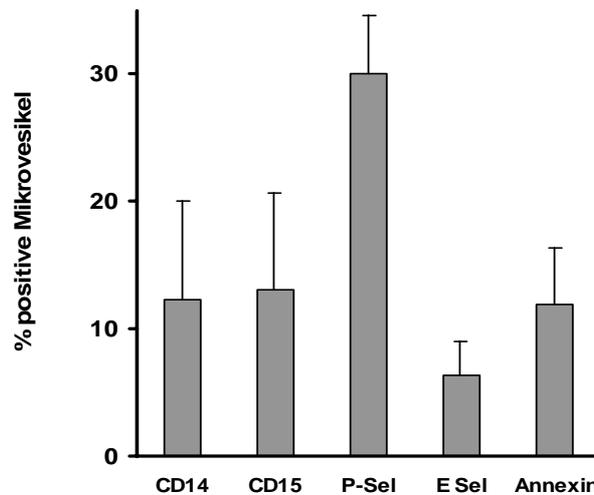


Abb. 28: Mikrovesikel wurde durch Ultrazentrifugation aus dem Plasma isoliert und mit Antikörperlösungen (je 5 μ l) gegen die angeführten spezifischen Oberflächenrezeptoren bzw. exprimiertes Phosphatidylserin angefärbt. n=10; die Oberflächenmoleküle sind charakteristisch für die folgenden Zellen: CD14: vorwiegend Monozyten; CD15: Neutrophile; P-Sel: vorwiegend Plättchen; E-Selektin: Endothelzellen

Um auszuschließen, daß die Mikrovesikel erst bei ihrer Isolation aus stimulierten Zellen freigesetzt wurden, wurde die Zellspezifität der Mikrovesikel auch in Vollblut untersucht. Dabei wurden vergleichbare Ergebnisse ermittelt, wie in den isolierten Mikrovesikel-Suspensionen (Abb. 29). Zirkulierende Mikrovesikel sind damit konstitutiv im Plasma von gesunden Probanden vorhanden.

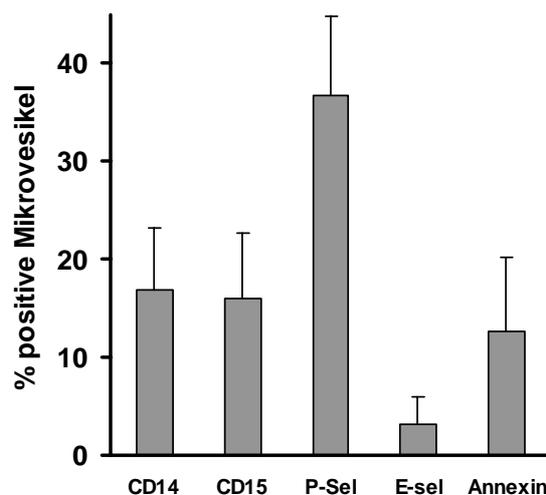


Abb. 29: Mikrovesikel wurden im Vollblut mit je 5 μ l der Antikörperlösungen gegen spezifische Oberflächenmarker der Blutzellen angefärbt und mit Hilfe der *Flowcytometrie* analysiert. n=10;

3.11 Mikrovesikel adhäreren nach Stimulation an Leukozyten und Plättchen

Da zirkulierende Mikrovesikel die gleichen Oberflächenproteine wie ihre Ursprungszellen präsentieren, untersuchten wir ob Mikrovesikel in der Lage sind, an stimulierte Neutrophile und Plättchen zu adhäreren. Die Mikrovesikel wurden nach ihrer Isolierung mit einem fluoreszierenden Membranfarbstoff (Quinacrin) angefärbt und zu isolierten Neutrophilen gegeben. Suspensionen aus Mikrovesikeln und Neutrophilen wurden mit Kollagen stimuliert und die ungebundenen Mikropartikel gewegewaschen. Um die beteiligten Adhäsionsproteine zu untersuchen wurden die Mikrovesikel mit Antikörpern gegen die Adhäsionsrezeptoren Mac-1, PSGL-1 und P-Selektin vorinkubiert. Dabei fanden wir, daß die Zugabe der Antikörper die Adhäsion der Mikrovesikel an die Neutrophilen deutlich hemmte (Abb. 30).

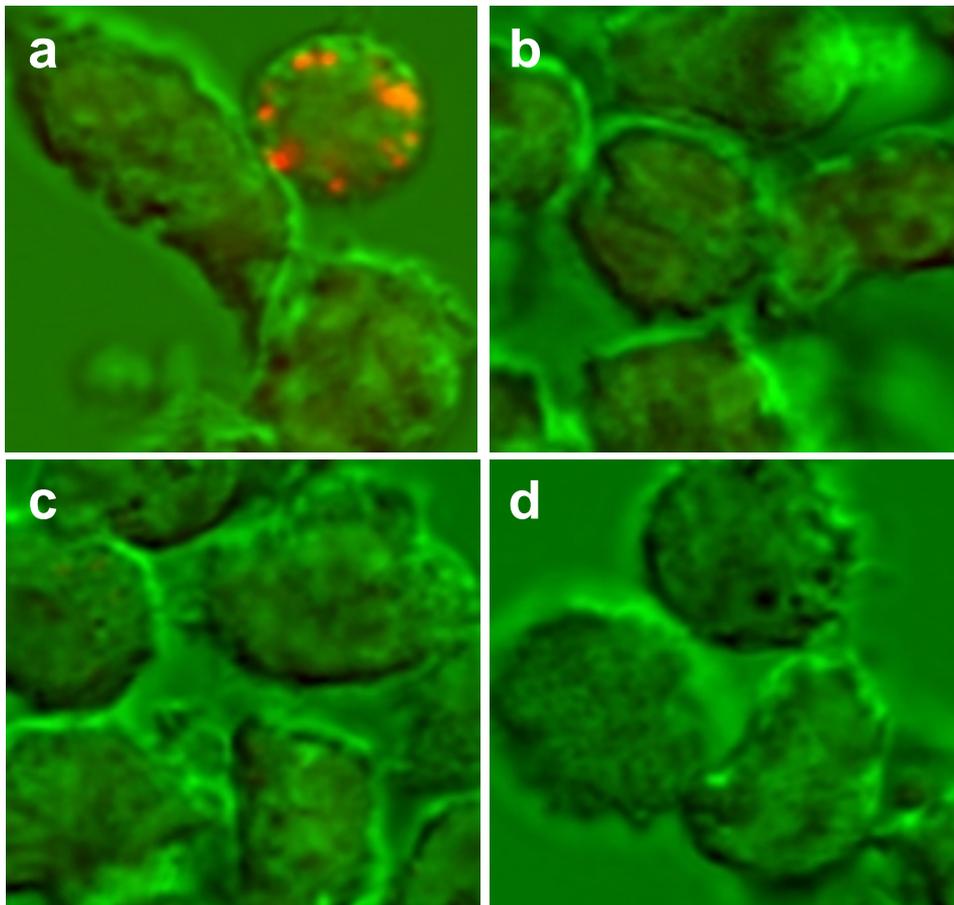


Abb. 30: a) Quinacrin-markierte Mikrovesikel (rot) wurden zu isolierten Neutrophilen gegeben und die Suspension mit Kollagen (12 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie wurde die Adhärenz der Mikrovesikel an Neutrophile untersucht. Die verwendeten Antikörper waren: b) anti-P-Selektin (10 $\mu\text{g/ml}$), c) anti-PSGL-1 (10 $\mu\text{g/ml}$) und d) anti-CD18 (Mac-1; 10 $\mu\text{g/ml}$). Die Fluoreszenz des Membranfarbstoffes wurde bei 510 nm angeregt.

Die isolierten Mikrovesikel adhärten darüberhinaus auch an isolierte Plättchen. (Abb. 31).

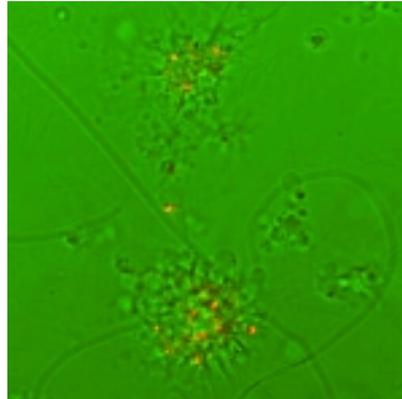


Abb. 31: Isolierte Plättchen wurden mit Quniacrin-markierten Mikrovesikeln inkubiert und mit Kollagen (12 µg/ml) stimuliert.

3.12 Zirkulierende Mikrovesikel enthalten *Tissue Factor*

Um zu untersuchen, ob zirkulierende Mikrovesikel *Tissue Factor* enthalten und aus welchen Blutzellen die *Tissue Factor*-haltigen Mikrovesikel stammten, wurden die zirkulierenden Mikropartikel aus dem Plasma isoliert und mit spezifischen Oberflächenproteinen von Plättchen (CD42b) und Neutrophilen (CD66b) angefärbt. Mit Hilfe des *Cellsorters* wurden die gefärbten Mikrovesikel von den restlichen Mikrovesikeln abgetrennt (Abb. 32).

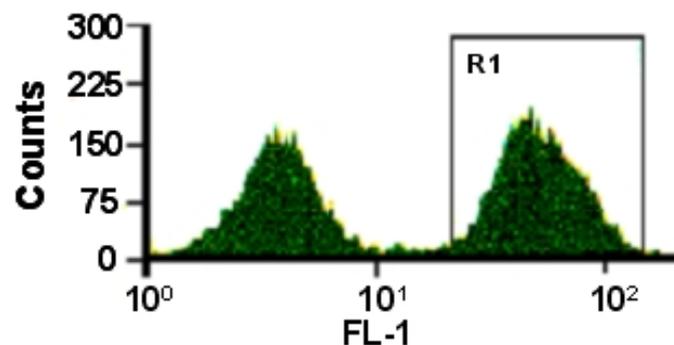


Abb. 32: Plättchen-Mikrovesikel wurden mit einem *Cellsorter* aus dem Gesamtpool der zirkulierenden Mikrovesikel des Blutes abgetrennt. In R1 befinden sich die CD42b positiven Zellen (Plättchen-Mikrovesikel).

Die CD42b- und CD66b-positiven Mikrovesikel wurden zusammen mit den in vitro hergestellten Mikrovesikeln von Plättchen und Neutrophilen auf einem 12 % igen SDS Gel aufgetrennt und mit einem Immuno-Western Blot auf die Anwesenheit von *Tissue Factor* Protein untersucht. *Tissue Factor* war sowohl in den CD42b positiven

zirkulierenden Mikrovesikeln, wie auch in den in vitro hergestellten Plättchen-Mikrovesikeln vorhanden. Mikrovesikel aus Neutrophilen enthielten keinen *Tissue Factor* (Abb. 33).

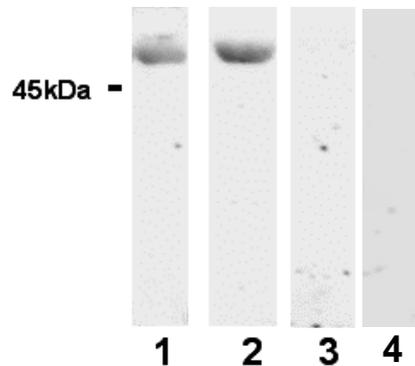


Abb. 33: Nachweis von *Tissue Factor* in CD42b positiven Mikrovesikeln (Spur 1) und in in vitro, durch Stimulierung von Plättchen gewonnenen Mikrovesikeln (Spur 2). Die Immuno-Western Blots wurden unter Verwendung eines rabbit-anti-*Tissue Factor* Antikörpers untersucht. Aus dem Blut isolierte CD66b positive Mikrovesikel (Spur 3) und Mikrovesikel stimulierter Neutrophile (Spur 4) wiesen keinen *Tissue Factor* auf

Im Kollagen (12 $\mu\text{g/ml}$) stimulierten Vollblut ließ sich *Tissue Factor* elektronenmikroskopisch ebenfalls auf der Oberfläche von Mikrovesikeln nachweisen. Die Bilayerstruktur der Mikrovesikelmembran ist deutlich sichtbar. Die charakteristische Größe der Mikrovesikel liegt bei 200 - 600 nm (Abb. 34).

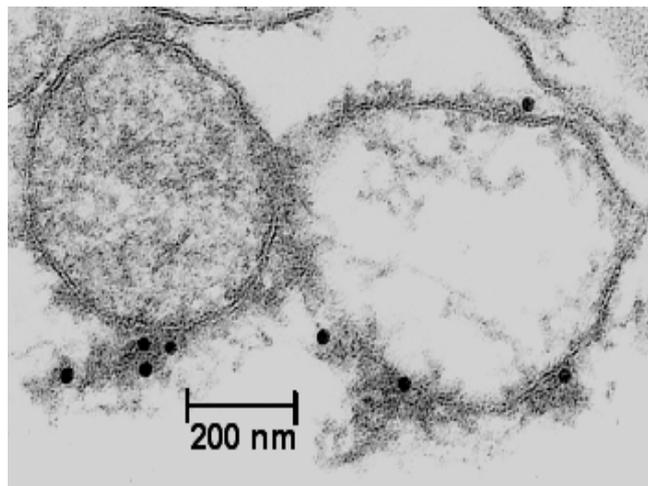


Abb. 34: Stimuliertes Vollblut wurde mit dem anti-*Tissue Factor* Antikörper VIC7 (10 $\mu\text{g/ml}$) angefärbt und einem goldkonjugierten Zweitantikörper (\varnothing 10 nm) visualisiert. *Tissue Factor* ist an der Membran adhärrierender Mikrovesikel lokalisiert.

3.13 Mikrovesikel fördern die Fibrinbildung

Um die funktionelle Bedeutung der Mikrovesikel für die Fibrinbildung zu untersuchen, wurde mikrovesikelhaltiges Plasma mit der Ultrazentrifuge zentrifugiert und das so erhaltene mikrovesikelfreie Plasma wieder mit den restlichen Blutkomponenten vermischt. Das mikrovesikelfreie Blut wurde anschließend mit Kollagen und ADP stimuliert und die Fibrinbildung mit Hilfe der Thrombelastographie ermittelt. Als Kontrolle wurden dem mikrovesikelfreien Plasma vor der Stimulation die isolierten Mikrovesikel wieder zugegeben. Dabei wurde beobachtet, daß die Fibrinbildung nach der Herausnahme der Mikrovesikel um ca. 30 % reduziert war (Abb 35).

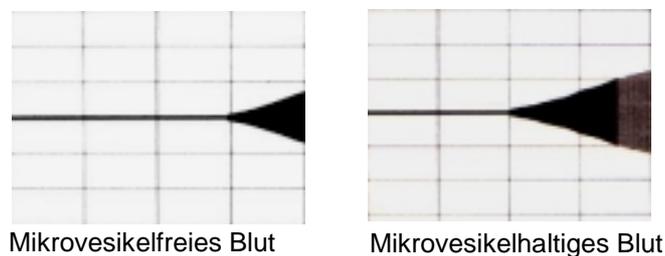


Abb. 35: Mikrovesikelfreies und mikrovesikelhaltiges Blut wurde mit Kollagen (12 µg/ml) und ADP (5 µM) stimuliert und nach Rekalzifizierung wurde die Fibrinbildung gemessen.

4. DISKUSSION

4.1 Intravaskulärer *Tissue Factor*

Verschiedene Zelltypen der Gefäßwand, wie Fibroblasten, glatte Gefäßmuskelzellen und Perizyten exprimieren konstitutiv *Tissue Factor*, das zentrale Starterprotein der Gerinnung. Die Lokalisierung des *Tissue Factors* in der Gefäßwand verhindert offensichtlich den Gerinnungsstart in einem intakten Gefäß. In Übereinstimmung mit dieser Vorstellung wurde bisher kein konstitutiv exprimierter *Tissue Factor* auf Blutzellen gefunden. Monozyten sind die einzigen Blutzellen, die im Rahmen einer Langzeitstimulation mit Entzündungsmediatoren in der Lage sind *Tissue Factor* zu synthetisieren (Osterud, 2001). Für die Initiation der physiologischen Blutgerinnung spielt der induzierbare monozytäre *Tissue Factor* vermutlich keine Rolle, da in der Haemostase eine schnelle Verfügbarkeit des Gerinnungsstarters essentiell ist.

Bei einer Gefäßverletzung wird nach Zerstörung von Endothelzellen subendotheliales Kollagen der Gefäßwand (Kollagentyp I, III, VI) freigelegt, das zu einer Adhäsion und Aktivierung von Plättchen führt (Fitzsimmons & Barnes, 1985). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher Blut mit fibrillärem Kollagen (Typ I) stimuliert und der Gerinnungsstart durch *Tissue Factor* untersucht. Unerwarteterweise führte die Stimulation von Vollblut mit Kollagen innerhalb von 3 bis 5 Min. zur Exposition von *Tissue Factor* Antigen auf der Oberfläche von Monozyten und Neutrophilen. Die rasche Präsentation des Leukozyten-assoziierten *Tissue Factors* deutete auf eine mögliche Rolle des Membranproteins für die physiologische Blutgerinnung hin. Dieser Befund widersprach der bisherigen Meinung, daß der Blutzell-assoziierte *Tissue Factor* nur nach Langzeitstimulation exprimiert wird und daher nur für pathologische Prozesse von Bedeutung ist (u.a. Sepsis, chronische Entzündungen; Osterud, 1998). Tatsächlich induzierte der durch Kollagenstimulation aktivierte intravaskuläre *Tissue Factor* innerhalb weniger Minuten die Fibrinbildung und das Thrombuswachstum im Vollblut. Das Ausmaß der Fibrinbildung unterschied sich dabei nicht signifikant von einer Stimulation des Vollblutes mit Lipopolysacchariden, dessen Bedeutung unter in vivo Bedingungen bei der disseminierten intravaskulären Gerinnung (DIC) während der Sepsis hinreichend dokumentiert ist (Osterud, 1998). Eine Beteiligung des Kontaktaktivierungssystems an der Fibrinbildung konnte durch Inhibierung des Faktors XIIa ausgeschlossen werden. In Übereinstimmung mit

unseren Ergebnissen wurde in einem Perfusionsmodell beobachtet, daß nach Passage von humanem Vollblut über Kollagen beschichtetes Glas innerhalb von wenigen Minuten ein Thrombus gebildet wurde, der große Mengen an *Tissue Factor* enthielt (Giesen, 1999). Auch hier wurde die Bildung des Thrombus auf einen intravaskulären *Tissue Factor (blood borne tissue factor)* zurückgeführt.

4.2 Plättchen-Leukozyten-Interaktion

Im Verlauf der Thrombogenese, aber auch bei Entzündungen, werden sowohl Plättchen als auch Leukozyten aktiviert, die durch Adhäsionsproteine untereinander interagieren. Durch freigesetzte Proteasen, Chemokine und Sauerstoffradikale können sich Plättchen und Neutrophile (bzw. Monozyten) gegenseitig aktivieren. So setzen aktivierte Plättchen nach ihrer Stimulation Degranulationsprodukte wie ADP, Plättchenfaktor 4 (PF4) frei und bilden Thromboxan A₂, Substanzen, die die leukozytäre Degranulation sowie die Adhäsion der Leukozyten an das Gefäßendothel induzieren können. In Neutrophilen wird durch eine Interaktion mit Plättchen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies gefördert (Nagata, 1993; Moon, 1990). Auf diese Weise beeinflussen Thrombozyten Funktionen der Leukozyten wie die Chemotaxis, Phagozytose und den sogenannten *oxidative burst*. Umgekehrt beeinflussen aber auch leukozytäre Produkte die Aktivierung der Plättchen (Bazzoni, 1991). Reaktive Sauerstoffspezies verstärken die Plättchenadhäsion und können zusammen mit leukozytären Proteasen wie Elastase, Cathepsin G und dem plättchen aktivierenden Faktor (PAF) die Aggregation und Sekretion der Plättchen induzieren (Li, 2000). Die Interaktion zwischen Plättchen und Leukozyten wird über eine Reihe von Adhäsionsproteinen vermittelt. Der erste Kontakt wird durch den Plättchenrezeptor P-Selektin vermittelt (Jungi, 1986; Lehr, 1994; Furie, 1995), der nach Aktivierung der Plättchen aus den α -Granula an die Zelloberfläche transloziert wird und seinem leukozytären Counterrezeptor PSGL-1 (McEver, 1997), der konstitutiv auf der Leukozytenoberfläche exprimiert ist. Die als *tethering* bezeichnete Bindung ist relativ instabil und dissoziiert daher sehr schnell wieder. Zur Stabilisierung der Interaktion wird deshalb eine weitere Interaktion benötigt (*firm adhesion*), die über eine Fibrinogenbrücke zwischen dem aktivierten Plättchenrezeptor GP IIb/IIIa und dem leukozytären Rezeptor Mac-1 (CD11b/CD18) vermittelt wird (Spangenberg, 1993). Neben dieser Interaktion sind aber noch andere

Adhäsionsrezeptoren bekannt. Dazu gehört vor allem der Plättchenrezeptor CD40L und sein leukozytärer Gegenpart CD40 (Abb. 36).

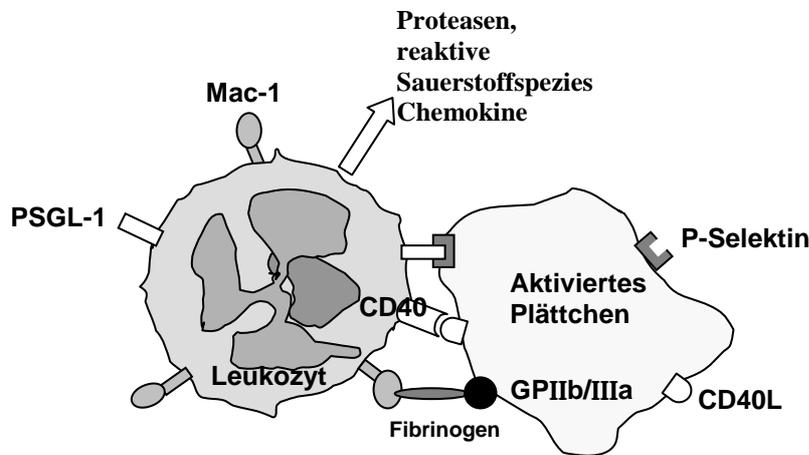


Abb. 36: Schematische Darstellung der an den Plättchen-Leukozyten-Interaktionen beteiligten Moleküle.

Im stimulierten Vollblut wurde der intravaskuläre *Tissue Factor* in den Leukozytenfraktionen präsentiert. Wir vermuteten daher, daß präformierter *Tissue Factor* aus den aktivierten Leukozyten freigesetzt wird. Während eine Stimulation der Leukozyten mit Kollagen nur zu einer geringfügigen Aktivierung führt (Li, 2000), werden Plättchen über verschiedene Kollagenrezeptoren (GP VI, GP Ia/IIa, CD36) stark aktiviert (Clemetson, 1999). Daher untersuchten wir, ob die Leukozyten-assoziierte *Tissue Factor* Präsentation über eine Interaktion mit aktivierten Plättchen vermittelt wird. Nach Reduktion der Thrombozytenzahl war die Präsentation des *Tissue Factors* auf der Oberfläche der Leukozyten deutlich vermindert. Auch die Fibrinbildung und das Thrombuswachstum verzögerten sich nach Wegnahme der Plättchen aus dem Vollblut. Daher vermuteten wir, daß Plättchen sowohl für die funktionelle Aktivität als auch die Präsentation des intravaskulären *Tissue Factors* eine wichtige Rolle spielen. Die genauere Analyse der *Tissue Factor* positiven Leukozyten des Vollblutes ergab außerdem, daß nur Leukozyten, die sich mit einem Plättchenoberflächenmarker (CD41b) anfärben ließen, auch *Tissue Factor* präsentierten (Zillmann et al., 2001). Die *Tissue Factor* Präsentation war daher auf Plättchen-Leukozyten-Komplexe beschränkt. Auch in Arbeiten zur Induktion der *Tissue Factor* Expression in Monozyten wurde gezeigt, daß die Interaktion mit Plättchen die prokoagulatorische Aktivität des monozytären *Tissue Factors* erhöht.

Für die erhöhte funktionelle Aktivität des monozytären *Tissue Factors* wurde die Adhäsion über P-Selektin und die Freisetzungsprodukte der Plättchen verantwortlich gemacht (Sissener-Engstadt, 1995; Lorenzet, 1998).

4.3 Lokalisierung des intravaskulären *Tissue Factors* in Thrombozyten

Da aufgrund der kurzen Stimulationsperiode (5-10 Min.) eine Neusynthese des *Tissue Factor* Proteins auszuschließen war, nahmen wir an, daß die Stimulation mit Kollagen die Exposition eines präformierten *Tissue Factors* fördert. Dies veranlaßte uns die einzelnen Komponenten der Plättchen-Leukozyten Aggregate auf ihren *Tissue Factor* Gehalt zu untersuchen. Während in Neutrophilen und Monozyten kein *Tissue Factor* Antigen vorhanden war, fanden sich erstaunlicherweise in Plättchen beträchtliche Mengen an *Tissue Factor* Protein. Die Analyse gefriergetrockneter, unstimulierter Plättchen mit Hilfe der Immunogold-Elektronenmikroskopie ergab einen klaren Hinweis auf die intrazelluläre Lokalisierung von *Tissue Factor* in Plättchen. *Tissue Factor* Antigen war vor allem in den α -Granula und dem *Open Cannalicular System* lokalisiert. Geringe Mengen waren auf der Plättchenoberfläche nachweisbar. Die Verteilung des *Tissue Factors* in den α -Granula zeigte neben einer membrangebundenen Form auch eine Lokalisierung des Proteins in der Matrix der Granula. Da es sich bei *Tissue Factor* um ein transmembranäres Protein handelt, könnten die Befunde auf die Existenz eines löslichen *Tissue Factors* hindeuten. Nach Stimulation wird der Inhalt der α -Granula (u.a. Faktor V, Faktor VIII) schnell in das extrazelluläre Medium abgegeben. Dabei verschmilzt die Membran der α -Granula mit der Zellmembran der Plättchen, wodurch integrale Membranproteine der α -Granula in die Plättchenmembran integriert werden. Dies würde eine schnelle, regulierte Freisetzung und Präsentation des *Tissue Factors* auf der Plättchenoberfläche ermöglichen. In der Tat fanden wir nach Stimulation mit verschiedenen Plättchenagonisten, daß *Tissue Factor* auf der Plättchenoberfläche präsentiert wird. Bislang war bereits bekannt, daß alle wichtigen Teilschritte der Gerinnung (Prothrombinase-Komplex, Tenase-Komplex) auf der Oberfläche der Plättchen ablaufen können. Unsere Ergebnisse zeigen, daß aktivierte Plättchen auch in der Lage waren, den Gerinnungsstarter *Tissue Factor* zu präsentieren. Die gesamte Blutgerinnungskaskade kann somit auf der Plättchenmembran stattfinden. Unsere

Befunde zur Lokalisierung von *Tissue Factors* in Plättchen wurde mittlerweile auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (u.a. Siddiqui, 2002). Uneinigkeit herrscht momentan noch über die initiale Lokalisierung des Plättchen-assoziierten *Tissue Factors* im Blut. In Northern Blot Analysen konnte keine m-RNA für *full length Tissue Factor* in Plättchen nachgewiesen werden. Da Megakaryozyten kein *Tissue Factor* Protein und keine m-RNA für *Tissue Factor* enthielten, konnte eine Übernahme des *Tissue Factor* Proteins aus den Vorläuferzellen der Thrombozyten ebenfalls ausgeschlossen werden. Blutplasma enthält unter physiologischen Bedingungen *Tissue Factor*, der eine Quelle für Plättchen-*Tissue Factor* darstellen könnte (Albrecht, 1996; Misumi, 1998). Der Plasma *Tissue Factor* stammt möglicherweise von stimulierten Leukozyten, die *Tissue Factor* in Form von sogenannten Mikrovesikeln auf Plättchen transferieren könnten. Dies wurde kürzlich unter Bedingungen einer Langzeitstimulation von Monozyten gezeigt (Rauch, 2000). Auch für andere prokoagulatorische Proteine der α -Granula, wie Fibrinogen und Faktor V, wurde bereits gezeigt, daß sie von den Thrombozyten (oder deren Vorläuferzellen) aus dem Plasma aufgenommen werden (Handagama, 1990; Camire, 1998). Plättchen stellen somit einen intravaskulären Speicher für *Tissue Factor* dar.

4.4 Lokalisierung von *Tissue Factor* auf Mikrovesikeln

Nach selektiver Entfernung der auch bei gesunden Probanden im Plasma vorhandenen Mikrovesikel (zirkulierende Mikrovesikel), war der *Tissue Factor* Gehalt des Plasmas deutlich reduziert. Mikrovesikel stellen Abschnürungen von Zellmembranen (Mikropartikel) und Zellorganellen (Exosomen) dar, die von Blutzellen in Folge von Reifung, erhöhten Scherraten oder anderen Stimuli freigesetzt werden (Miyazaki, 1996; Satta, 1994; Heijnen, 1999). Über die Abgabe von Membranproteinen durch Mikrovesikel könnten sich Zellen derjenigen Proteine entledigen, die von der Zelle nicht mehr benötigt werden (Pan, 1983). Mittels zellspezifischer Oberflächenproteine fanden wir, daß der Hauptanteil der Mikrovesikel im Blut aus Plättchen stammte. Geringere Anteile waren leukozytären, endothelialen oder erythrozytären Ursprungs. Die zirkulierenden Plasma-Mikrovesikel gesunder Spender besaßen einen Durchmesser von 300 - 800 nm. In früheren Arbeiten wurden erhöhte Mengen an Mikrovesikeln vor allem bei Patienten mit akuten koronaren Herzkrankheiten, Sepsis oder heparininduzierter

Thrombozytopenien beobachtet (Warkentin, 1994; Holme, 1993; Monura, 1994). Diese Patienten zeichnet ein erhöhtes thrombotisches Risiko aus. In Übereinstimmung damit fanden wir in unserer Arbeit nach Zugabe einer physiologischen Menge an Mikrovesikeln zum mikrovesikelfreiem Vollblut eine vermehrte Fibrinbildung. Mikrovesikel könnten also auch in der physiologischen Blutgerinnung eine wichtige Funktion haben. Tatsächlich leiden Patienten mit Scott Syndrom, bei denen die Mikrovesikelbildung beeinträchtigt ist, an einem erhöhten Blutungsrisiko (Castaman, 1997; Sims, 1989). In den zirkulierenden Mikrovesikeln thrombozytären Ursprungs konnten wir *Tissue Factor* nachweisen. Auch in den in vitro produzierten Plättchen-Mikrovesikeln wurde *Tissue Factor* Antigen gefunden. Im Gegensatz dazu war weder in den zirkulierenden, noch in den in vitro produzierten Mikrovesikeln von Neutrophilen *Tissue Factor* enthalten. Für die verstärkte Fibrinbildung durch Mikrovesikel ist möglicherweise sowohl der *Tissue Factor* selbst als auch die vermehrte Exposition negativ geladener Phospholipide verantwortlich (Berckmans, 2001; Nieuwland, 1997). Außerdem ist bekannt, das thrombozytäre Mikrovesikel auch eine optimale Oberfläche für verschiedene Faktoren der Gerinnungskaskade aufweisen. So ist die Dichte an hochaffinen Rezeptoren für die Gerinnungsfaktoren des Tenase- und Prothrombinase-Komplexes im Vergleich zu den Thrombozyten deutlich erhöht (Sims, 1988; Holme, 1995). Für die prokoagulatorische Aktivität der Mikrovesikel scheint ihre Adhäsion an verschiedene Blutzellen notwendig zu sein. Mikrovesikel adhärieren an stimulierte Leukozyten und Plättchen mit Hilfe derjenigen Rezeptoren, die Plättchen-Leukozyten-Interaktionen vermitteln (u.a. P-Selektin, Mac-1 und PSGL-1). Erhöhte Plasma Konzentrationen an Mikrovesikeln begünstigen durch ihre verstärkte Interaktion mit Leukozyten und Plättchen thrombotische und entzündliche Vorgänge. Erstaunlicherweise stellte die Anwesenheit der Mikrovesikel im Vollblut gesunder Probanden keinen nennenswerten prokoagulatorischen Stimulus dar. Eine Erklärung dafür bietet vermutlich u.a. die Fähigkeit zirkulierender Mikrovesikel geringe Thrombinmengen zu bilden, die zu einer Aktivierung von Protein C, einem antikoagulatorischen System des Blutes, führen (Berckmans, 2001; Tans, 1991).

4.5 Aktivierung des intravaskulären *Tissue Factors*

Die Aktivierung von Plättchen mit starken Plättchenagonisten führt in der Regel zur Sekretion der α -Granula und zur Präsentation von Proteinen der Granulamembran auf der Zellmembran. Tatsächlich wurde *Tissue Factor* bereits nach kurzzeitiger Stimulation mit Thrombin oder Kollagen auf der Plättchenmembran präsentiert. In Gegenwart von ADP hingegen, einem schwachen Agonisten, wurde die *Tissue Factor* Exposition nicht gesteigert. In Einklang damit wurde nach Stimulation mit ADP auch nur eine geringe P-Selektin Exposition beobachtet, die auf eine unvollständige Degranulierung der Plättchen zurückzuführen war. Allerdings war der Plättchen-*Tissue Factor* auch nach Stimulation mit dem starken Plättchenagonisten Kollagen nicht in der Lage die Faktor Xa Bildung zu fördern und schien somit funktionell inaktiv zu sein. Erst eine massive Aktivierung von Plättchen durch ein Kalziumionophor steigerte die Faktor Xa Bildung. Die prokoagulatorische Aktivität wurde zu 50 % durch den anti-*Tissue Factor* Antikörper VIC7 gehemmt, was darauf hindeutet, daß der Plättchen-assoziierte *Tissue Factor* hauptsächlich für die prokoagulatorische Aktivität verantwortlich ist. Im Hinblick auf die bevorzugte Lokalisierung des Plättchen-*Tissue Factors* in Plättchen-Leukozyten Aggregaten (siehe 4.2) vermuteten wir, daß Neutrophile und Monozyten an der funktionellen Aktivierung des *Tissue Factors* beteiligt waren. Auch unter in vivo Bedingungen binden innerhalb eines Thrombus Plättchen an Leukozyten (McEver, 2001). Unter verschiedenen experimentellen Bedingungen konnte außerdem gezeigt werden, daß Plättchen-Leukozyten-Interaktionen die Fibrinbildung fördern (Palabrica, 1992; Goel, 2001). Tatsächlich bewirkte die Zugabe von Neutrophilen zu den Plättchensuspensionen einen starken Anstieg der prokoagulatorische Aktivität. Da Neutrophile kein *Tissue Factor* Antigen enthielten, konnten wir davon ausgehen, daß der Plättchen-*Tissue Factor* für den Anstieg der Faktor Xa Bildung verantwortlich war. Auch Monozyten erhöhten die funktionelle Aktivität des Plättchen-assoziierten *Tissue Factors*. Hier konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß während der Isolierung der Zellen monozytärer *Tissue Factor* gebildet worden war, der zu einem Anstieg der Faktor Xa Bildung führen würde. Die Inhibierung der Plättchen-Leukozyten-Interaktion durch Zugabe von Antikörper gegen Adhäsionsrezeptoren führte zu einer verminderten prokoagulatorischen Aktivität von *Tissue Factor*. Außerdem verzögerte die selektive Entfernung von Leukozyten aus dem Vollblut die Fibrinbildung und das Thrombuswachstum. Im Einklang mit diesem Befund konnte in Tiermodellen gezeigt

werden, daß Plättchen-Leukozyten-Interaktionen für die Bildung von Thrombosen notwendig sind (Sakariassan, 1990; Kirchhofer, 1997). Die Bildung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten schien daher ein Schlüsselereignis in der Bildung von Thromben darzustellen. Aus dem engen Zell-Zell-Kontakt der Plättchen-Leukozyten-Interaktion resultiert die Bildung eines sogenannten *Microenvironments* (Abb. 37), einem interzellulären Bereich, der durch die Zellmembranen der Bindungspartner begrenzt wird. Unter in vivo Bedingungen ist der Zugang von Plasmakomponenten zu diesem Bereich nur begrenzt möglich (Evangelista, 1991). Das *Microenvironment* bietet freigesetzten Proteasen daher Schutz vor einer Inaktivierung durch plasmatische Antiproteasen (α -Antichymotrypsin, α -Antitrypsin; Evangelista, 1991). Umgekehrt ist das *Microenvironment* gekennzeichnet durch hohe lokale Konzentrationen parakriner und autokriner Faktoren, die von den beteiligten Zellen sekretiert werden (De Gaetano, 1999). Im Falle der Neutrophilen sind dies vor allem Proteasen, reaktive Sauerstoffspezies und Chemokine. Diese Sekretionsprodukte der Neutrophilen könnten für die Aktivierung des plättchengebundenen *Tissue Factors* verantwortlich sein. In der Tat wurde latenter *Tissue Factor* glatter Muskelzellen nach Stimulation mit reaktiven Sauerstoffspezies, die von aktivierten Neutrophilen sekretiert werden, aktiviert (Penn, 1999). Wir fanden nach Stimulation der Thrombozyten mit Wasserstoffperoxid einen Anstieg an *Tissue Factor* Antigen auf der Plättchenoberfläche. Neben den reaktiven Sauerstoffspezies werden eine Reihe leukozytärer Serin- und Metallo-Proteasen freigesetzt, die zu einer Aktivierung der prokoagulatorischen Aktivität führten. Insbesondere die neutrophile Elastase war offensichtlich an der Aktivierung des Plättchen-*Tissue Factors* beteiligt (Abb. 37).

4.6 Leukozytäre Proteasen inaktivieren TFPI

Plättchen enthalten neben den prokoagulatorischen Faktoren auch TFPI, den physiologischen Antagonisten des durch *Tissue Factor* initiierten Gerinnungsprozesses. TFPI wird von stimulierten Thrombozyten innerhalb weniger Minuten freigesetzt und inhibiert initiale Reaktionen der *Tissue Factor* induzierten Blutgerinnung durch Bildung eines quaternären Komplexes mit *Tissue Factor*, Faktor VIIa und Faktor Xa auf Membranoberflächen (Novotny, 1988; Petersen, 1996). In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Arbeiten veröffentlicht, in denen gezeigt wurde, daß Proteasen in der Lage sind TFPI zu spalten. Die Spaltprodukte des TFPI

weisen gegenüber dem *Tissue Factor*/Faktor VIIa/Faktor Xa Komplex eine deutlich geringere inhibitorische Effizienz auf (Petersen, 1992). In den genannten Arbeiten wurde rekombinanter TFPI mit Proteasen unter in vitro Bedingungen inkubiert und mit Hilfe eines Western Blots die Spaltprodukte nachgewiesen. Die untersuchten Proteasen waren vor allem Proteasen des Gerinnungsprozesses, wie Thrombin, Plasmin, Faktor Xa, aber auch leukozytäre Proteasen wie Elastase und Matrix-Metalloproteinasen. An zellulären Modellen wurde bisher noch keine Spaltung von TFPI durch Proteasen nachgewiesen. Wir konnten nach einer kurzzeitigen Inkubation stimulierter Thrombozyten mit Neutrophilen eine Reihe von Spaltprodukten des TFPIs nachweisen. Stimulierte Plättchen allein zeigten diese Spaltprodukte nicht. Eine Hemmung der Plättchen-Leukozyten-Interaktion durch P-Selektin, PSGL-1 oder Mac-1 bewirkte eine vollständige Inhibierung der Spaltung. Dies ließ uns vermuten, daß die von Neutrophilen sezernierten bzw. membranständigen Proteasen TFPI spalteten und damit die Inaktivierung von Plättchen-assoziierten *Tissue Factor* verhinderten (Abb. 37). Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden den Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen Inhibitoren der Proteasen zugegeben. Tatsächlich wurde durch die Inhibitoren der neutrophilen Elastase (CMK, AT) und von Cathepsin G (ACT) die Spaltung des TFPI deutlich gehemmt. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurde zuvor gezeigt, daß Elastase bzw. stimulierte Neutrophile rekombinanten TFPI inaktivieren und damit die prokoagulatorische Aktivität von *Tissue Factor* fördern (Petersen, 1992; Higuchi, 1992). Da eine vollständige Inhibierung der Spaltung des TFPI durch diese Inhibitoren in unseren Experimenten nicht möglich war, vermuteten wir eine Beteiligung weiterer Sekretionsprodukte. Von besonderem Interesse waren für uns Matrix-Metalloproteinasen, die von Leukozyten unter Bedingungen sezerniert werden, die mit einer erhöhten prokoagulatorischen Aktivität und Fibrinablagerung einhergehen, wie z.B. Entzündungsreaktion. Bisher konnten mehr als 23 verschiedene Matrix-Metalloproteinasen identifiziert werden, die sich in ihrer Substratspezifität und ihrer zellulären Lokalisierung unterscheiden. Matrix-Metalloproteinasen existieren als Proform und müssen durch anderen Proteasen in ihre aktive Form überführt werden. Matrix-Metalloproteinasen sind in vielen Fällen in eine proteolytische Kaskade eingeschaltet, bei denen es u.a. auch zur Spaltung von Serinproteasen kommt. Wir beobachteten, daß die TFPI Spaltung in Plättchen-Neutrophilen-Suspensionen mit Hilfe von spezifischen (TIMP-2) als auch

unspezifischen Inhibitoren (Phenanthrolin) der Matrix-Metalloproteinasen gehemmt werden konnte. Die Identifizierung der hierfür verantwortlichen Metalloproteasen wird ein Ziel der zukünftigen Forschung auf diesem Gebiet sein. Da eine Vielzahl von Proteasen neben den Matrix-Metalloproteinasen in der Lage sind, TFPI zu spalten, war außerdem nicht auszuschließen, daß die Proteasen additiv wirkten. Allerdings hatte eine Koinkubation eines Elastase Inhibitors (CMK) mit TIMP-2, einem Matrix-Metalloproteinaseninhibitor, keinen zusätzlichen inhibitorischen Effekt auf die TFPI Spaltung. Eine Erklärung für dieses Ergebnis ergibt sich möglicherweise aus der Fähigkeit der Elastase, Proformen von Matrix-Metalloproteinasen in ihre aktive Form zu überführen (Shamamian, 2001).

4.7 Mechanismus der Aktivierung des intravaskulären *Tissue Factors*

Aus unseren bisherigen Beobachtungen können wir einen möglichen Mechanismus für die Aktivierung des intravaskulären *Tissue Factors* vorschlagen. *Tissue Factor* wird nach einer Stimulation mit Kollagen oder einem anderen Plättchenagonisten auf der Zellmembran von Thrombozyten präsentiert. Nach der Aktivierung von Faktor X durch den so gebildeten *Tissue Factor*/Faktor VIIa Komplex kann der ternäre Komplex durch den Antagonisten TFPI, der ebenfalls von den Plättchen sezerniert wird, funktionell inhibiert werden. Die von aktivierten Plättchen präsentierten Adhärenzrezeptoren interagieren mit Neutrophilen bzw. Monozyten. Dies führt zur Bildung eines *Microenvironments*, mit hohen lokalen Konzentrationen an Proteasen, die in der Lage sind TFPI zu spalten und somit *Tissue Factor* zu aktivieren. Aktivierte Plättchen sind außerdem in der Lage *Tissue Factor*-haltige Mikrovesikel abzuschnüren, die zusammen mit den zirkulierenden Mikrovesikeln an Blutzellen adhären und die prokoagulatorische Aktivität erhöhen (Abb. 37).

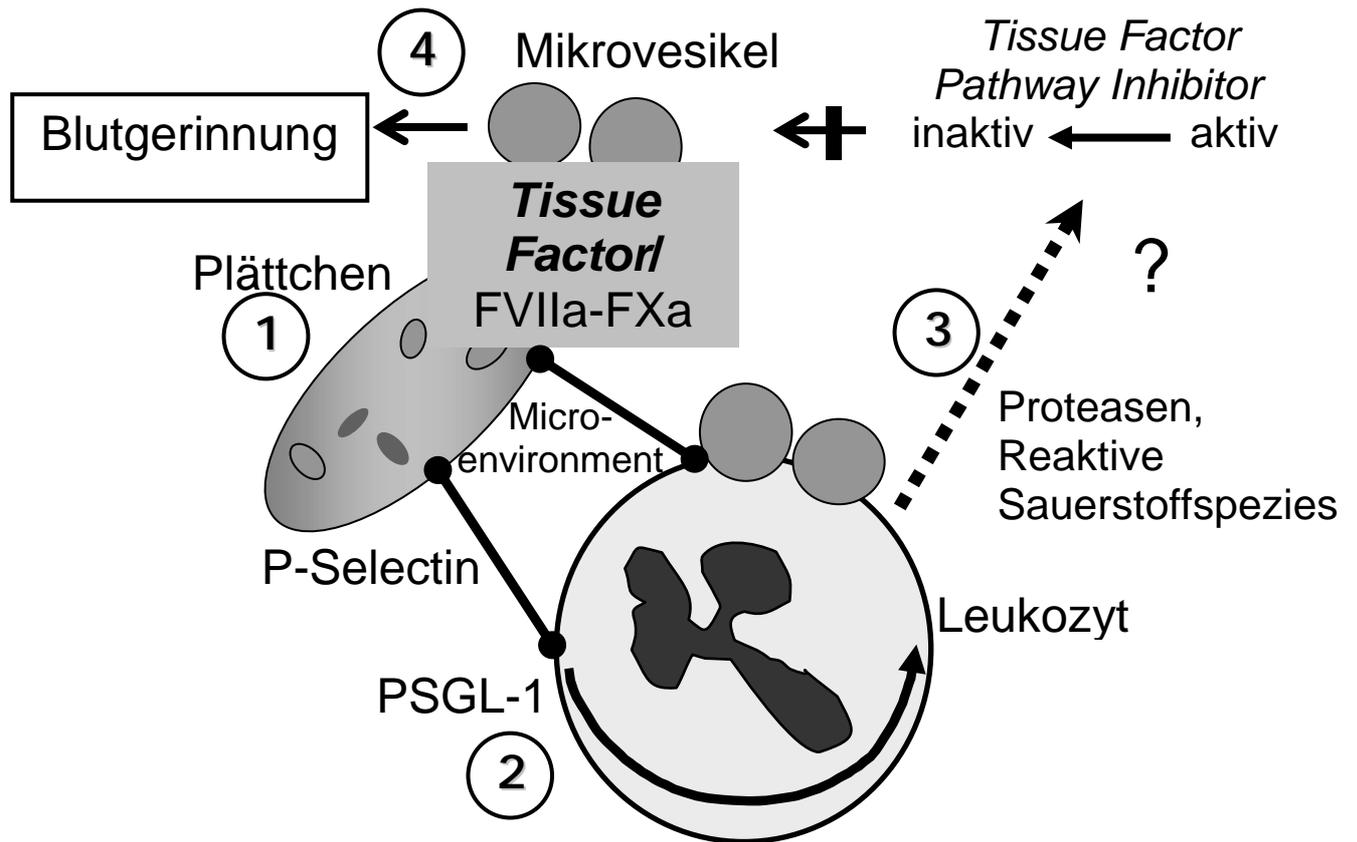


Abb. 37: Mechanismus der Aktivierung des intravaskulären *Tissue Factors*:

- 1) Präsentation des *Tissue Factors* auf der Oberfläche aktivierter Plättchen und thrombozytärer Mikrovesikel nach Stimulation mit Kollagen.
- 2) Bildung eines *Microenvironments* in Folge von Plättchen-Leukozyten-Interaktionen.
- 3) Freisetzung leukozytärer Proteasen in das Microenvironment. Inaktivierung des TFPI durch Proteasen.
- 4) Aktivierung des intravaskulären *Tissue Factors*.

4.8 In vivo Relevanz des intravaskulären *Tissue Factors*

Allgemein wird davon ausgegangen, daß die Startphase der Gerinnung sowohl während der physiologischen Hämostase als auch bei der arteriellen Thrombose durch den *Tissue Factor* der Gefäßwand induziert wird. Unsere in der vorliegenden Arbeit dargestellten Beobachtungen zeigten, daß dem intravaskulären *Tissue Factor* offensichtlich eine ähnlich wichtige Funktion bei dem Gerinnungsstart zukam. Nach der bisherigen Vorstellung bildete der *Tissue Factor* der Gefäßwand nach Gefäßverletzung einen katalytischen Komplex mit dem zirkulierenden Faktor VIIa und aktivierte dadurch den Faktor X. Dabei ist davon auszugehen, daß der gebildete

Faktor Xa anschließend von den *Tissue Factor* exprimierenden Zellen der Gefäßwand zur Oberfläche der aktivierten Plättchen diffundieren muß. In der Tat wird Faktor Xa für die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin benötigt, einem Prozess der vorwiegend auf der Oberfläche der aktivierten Plättchen stattfindet. Damit hätte der in der Gefäßwand gebildete Faktor Xa eine beträchtliche Diffusionsstrecke zurückzulegen. Erschwerend für die Diffusion ist außerdem eine Barriere der zum selben Zeitpunkt gebildeten, an das subendotheliale Kollagen adhärierenden Thrombozytenschicht. Es existieren Berechnungen, nachdem ein Protein in der Größe eines Blutgerinnungsfaktors (50 kDa) ca. 3 Std. für eine Diffusionsstrecke von 1 mm im Wasser benötigt. (Nemerson, 2002). Diese Beobachtungen werfen berechnete Zweifel an dem Modell eines alleinigen Gerinnungsstarters in der Gefäßwand auf. Unsere Ergebnisse implizierten daher eine völlig neue Sicht der physiologischen Blutgerinnung und pathologischer Vorgänge wie der Thrombogenese. Wir vermuteten, daß der *Tissue Factor* der Gefäßwand (vTF) nur ein erstes Startsignal der Blutgerinnung darstellt. Nach Aktivierung der Plättchen durch das subendotheliale Kollagen und geringe Mengen an bereits gebildeten Thrombin initiiert der intravaskuläre *Tissue Factor* (iTF) die Blutgerinnung innerhalb des lumenseits wachsenden Thrombus (Abb 38). Dadurch wird ein Fibrinnetzwerk gebildet, das den gesamten Thrombus umfaßt. Dies erfordert offensichtlich die Fibrinbildung am Ort des Geschehens, was durch die Lokalisierung von *Tissue Factor* auf den adhärierenden Plättchen ermöglicht wird. Für die Bedeutung des intravaskulären *Tissue Factors* in Thrombozyten und thrombozytären Mikrovesikeln spricht auch die Fähigkeit dieser Blutkomponenten schnell gerinnungsaktive negativ geladene Phospholipide auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Dies ermöglicht den Ablauf der gesamten Blutgerinnungskaskade, vom Gerinnungsstart durch den Plättchen-*Tissue Factor* bis zu den thrombinbildenden Schritten der Gerinnung, auf der Oberfläche aktivierter Plättchen. In diesem Modell ist es daher nicht erforderlich, Diffusionsvorgänge von Faktoren der Gerinnungskaskade zwischen Zellen der Gefäßwand zu den Thrombozyten zu postulieren. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte in einem in vivo Diffusionsmodell, in dem der Anteil der Blutkomponenten und der Gefäßwand an der Thrombusbildung untersucht wurde, gezeigt werden, daß in erster Linie die Blutkomponenten für das Thrombuswachstum verantwortlich sind (Karnicki, 2002).

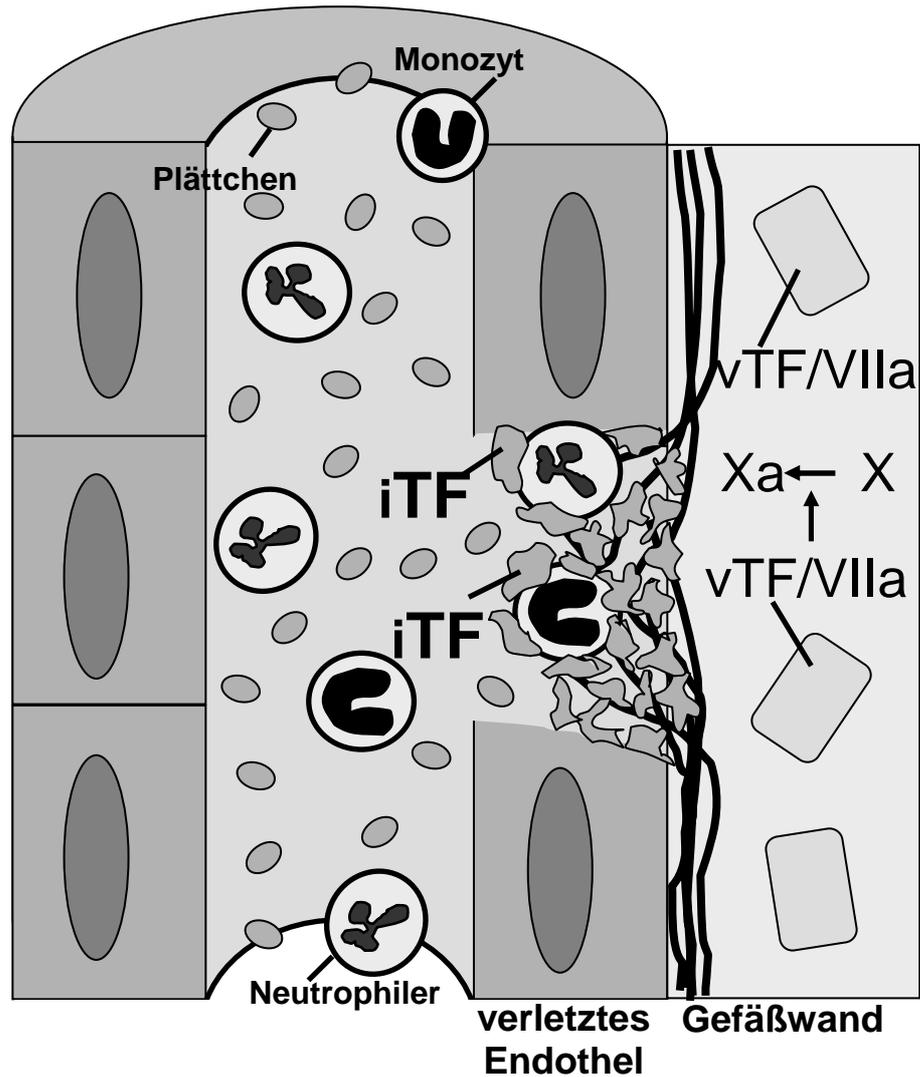


Abb. 38: Initiation der Blutgerinnung und des Thrombuswachstums in Richtung des Gefäßlumens; iTF=intravaskulärer *Tissue factor*, vTF= *Tissue Factor* der Gefäßwand

4.9 Ausblick

In dieser Arbeit haben wir einen neuen Weg des Blutgerinnungsstartes durch einen intravaskulären *Tissue Factor* vorgestellt. Im Verlauf der Arbeit ergaben sich allerdings immer wieder neue Fragen, die Ziel zukünftiger Untersuchungen sein werden. Insbesondere ist die in vivo Relevanz des intravaskulären *Tissue Factors* für die Thrombogenese zu klären. Da Patienten mit einem Defekt im *Tissue Factor* Gen nicht bekannt sind, ist die Etablierung eines Tiermodells unumgänglich. Ein weiteres Ziel ist die Klärung des Ursprungs des Plättchen-*Tissue Factors*, da weder Plättchen noch deren Vorläuferzellen m-RNA für *Tissue Factor* enthalten. Schließlich gilt es

den Mechanismus, der für die Aktivierung des Plättchen- und Mikrovesikel-assoziierten *Tissue Factors* verantwortlich ist, im Detail zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Im Verlauf einer Gefäßverletzung wird die Endothelschicht geschädigt, wodurch das subendothelial gelegene Membranprotein *Tissue Factor* in Kontakt mit den Gerinnungsfaktoren des Blutes kommen kann. Dies ermöglicht die Bildung eines Komplexes aus *Tissue Factor* und dem löslichen Faktor VIIa. Als Folge davon wird die proteolytische Aktivität von Faktor VIIa exzessiv gesteigert und die physiologische Blutgerinnung initiiert. Die Lokalisierung des *Tissue Factors* in der Gefäßwand verhindert den Gerinnungsstart in einem intakten Gefäß. In Übereinstimmung damit wurde bisher kein konstitutiv exprimierter *Tissue Factor* auf Blutzellen gefunden.

In der vorliegenden Arbeit beobachteten wir jedoch, daß nach einer 5-minütigen Stimulation von Vollblut mit fibrillärem Kollagen *Tissue Factor* auf der Oberfläche von Plättchen-Neutrophilen- und Plättchen-Monozyten-Komplexen präsentiert wurde (intravaskulärer *Tissue Factor*). Die kurzzeitige Stimulationsdauer deutet darauf hin, daß der intravaskuläre *Tissue Factor* an der physiologischen Blutgerinnung beteiligt ist. Tatsächlich war der Blut-assoziierte *Tissue Factor* in der Lage, die Fibrinbildung im Blut auszulösen. Aufgrund der schnellen Präsentation des *Tissue Factors* im Blut, konnte eine Neusynthese ausgeschlossen werden. Daher mußte der intravaskuläre *Tissue Factor* bereits präformiert in Blutzellen vorliegen. In einer Analyse der Komponenten der Plättchen-Leukozyten-Komplexe auf ihren *Tissue Factor* Gehalt fanden wir unerwarteterweise beträchtliche Mengen an *Tissue Factor* Antigen in Thrombozyten (60 pg/mg Protein), während in frisch isolierten Neutrophilen und Monozyten kein *Tissue Factor* Antigen nachweisbar war. Mit Hilfe der Immuno-Elektronenmikroskopie wurde die intrazelluläre Lokalisierung von *Tissue Factor* in den Plättchen untersucht. *Tissue Factor* wurde vor allem in den α -Granula, dem *Open Cannalicular System* und zu einem geringen Anteil auch an der Plättchenoberfläche gefunden. Eine kurzzeitige Stimulation der Thrombozyten führte zur Präsentation von *Tissue Factor* auf der Oberfläche von Plättchen. Eine Analyse des Plasmaanteils des Blutes zeigte außerdem eine Lokalisierung von *Tissue Factor* in Mikrovesikeln. Mikrovesikel sind Abschnürungen von Zellmembranen (Mikropartikel) und intrazellulären Organellen (Exosomen) stimulierter Zellen, die konstitutiv im Plasma gesunder Spender (zirkulierende Mikrovesikel) vorhanden sind. Die zirkulierenden Mikrovesikel wurden auf ihren zellulären Ursprung hin untersucht und anschließend mit Hilfe ihrer zellspezifischen Oberflächenmarker aufgetrennt. Dabei fanden wir, daß Mikrovesikel thrombozytären Ursprungs den Hauptanteil der

Mikrovesikel darstellten und den größten Anteil von *Tissue Factor* Antigen enthielten. Der *Tissue Factor* isolierter Plättchen und Mikrovesikel erwies sich allerdings als funktionell inaktiv. Die prokoagulatorische Aktivität des Plättchen-*Tissue Factors* wurde durch die Interaktion der Thrombozyten mit Neutrophilen bzw. Monozyten ausgelöst. Die Leukozyten inaktivierten dabei vermutlich TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*), den physiologischen Antagonisten des durch *Tissue Factor* ausgelösten Gerinnungsweges. TFPI wird zunächst von den aktivierten Thrombozyten freigesetzt und bildet einen stabilen quaternären Komplex mit *Tissue Factor*, Faktor VIIa und Factor Xa, wodurch die Thrombinbildung verhindert wird. Über adhesive Interaktionen zwischen Plättchen und Neutrophilen kommt es durch leukozytäre Serinproteasen (Elastase, Cathepsin G) und Matrix-Metalloproteinasen offensichtlich zu einer proteolytischen Inaktivierung von TFPI und letztendlich zu einer Verstärkung der Initiation der Blutgerinnung. Dieser Mechanismus ermöglicht vermutlich, daß die Initiation der Blutgerinnung auf den Bereich der Plättchen-Leukozyten-Komplexe beschränkt bleibt. Aus unseren Ergebnissen ergibt sich ein neues Modell für einen intravaskulären Startmechanismus der Blutgerinnung. Nach Aktivierung der Thrombozyten durch subendotheliales fibrilläres Kollagen adhärieren diese im Bereich der Gefäßverletzung und führen vorerst zu einem instabilen Verschuß des Gefäßes. Die Oberfläche aktivierter Thrombozyten bildet nun aufgrund ihres hohen Anteils an gerinnungsaktiven, negativ geladenen Phospholipiden eine optimale Oberfläche für die Initiation der Blutgerinnung durch den Plättchen-*Tissue Factor*, sowie auch für die folgenden Schritte der Thrombinbildung (Tenase-Komplex, Prothrombinase-Komplex). Die gesamte Blutgerinnungskaskade kann somit auf der Oberfläche aktivierter Plättchen stattfinden. Die Fibrinbildung findet letztendlich am Ort des Geschehens statt und führt zu einer Stabilisierung des lumenwärts wachsenden Thrombus. Dieser Mechanismus könnte unter pathologischen Bedingungen auch zur Bildung intravaskulärer thrombotischer Ereignisse führen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

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

Anderson RGW. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 93: 10909-10913.

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

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

Bach RR. Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit Rev Biochemistry* 1988; 23: 339-368.

Bajaj MS, Kuppaswamy MN, Manepalli AN, Bajaj SP. Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin and von Willebrand factor in normal human tissues. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1047-1052.

Bajaj SP, Rapaport SI, Brown SF. Isolation and characterization of human factor VII. Activation of factor VII by factor Xa. *J Biol Chem* 1981; 256: 253-259.

Banner DW, Dárcy A, Chene C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchofer D. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature*. 1996; 380: 41-6.

Bazan JH. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamilie. *Proc Natl Acad USA* 1990; 87: 6934-6938.

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

Berckmans R, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FPHTM, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin formation. *Thromb Haemost* 2001, 85: 639-646.

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

Bom VJJ, Van Hinsbergh VWM, 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.

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

- Brand K, Fowler BJ, Edgington TS, Mackmann N. Tissue factor m-RNA in THP-1 monocytic cells is regulated at both transcriptional and posttranscriptional levels in response to lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 4732-4738.
- Broze GJ, Gailani D. The role of factor XI in coagulation. *Thromb Haemost* 1993; 70: 72-74.
- Broze GJ, Girard TJ, Novotny WF. Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry* 1990; 2: 7539-7546.
- Broze GJ, Lange GW, Duffin KL, Macphail L. Heterogeneity of plasma tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coag Fibrin* 1994; 5: 551-559.
- Broze GJ, Leykam JE, Schwartz BD, Miletich JP. Purification of human brain tissue factor. *J Biol Chem* 1985; 260: 10917-10920.
- Broze GJ, Miletich JP. Characterization of the inhibition of tissue factor in serum. *Blood*. 1987; 69: 150-155.
- Broze GJ and Majerus PW. Purification and properties of human coagulation factor VII. *J Biol Chem* 1980; 255: 1242-1247.
- Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmback K, Danton MJS. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6258-6263.
- Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 1996; 81: 1-41.
- Carmelit P, Mackmann N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, Breier G, Evrard P, Müller M, Risau W, Edgington T, Collen D. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Letters to Nature* 1996; 383: 73-75.
- Carmire 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, Henry WM, Shows TB. Tissue factor gene localized to human chromosome 1. *Science* 1985; 229: 991-993.
- Carson SD, Brozna JP. The role of tissue factor in the production of thrombin. *Blood Coagul Fibrinol* 1993; 4: 281-292.
- Castaman G, Yu-Feng L, Battistin E, Rodeghiero F. Characterization of a novel bleeding disorder with isolated prolonged bleeding time and deficiency of platelet microvesicle generation. *Br J Haematol*. 1997; 96: 458-63.
- Clemetson KJ. Platelet collagen receptors: a new target for inhibition. *Haemostasis* 1999; 29: 16-26.

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

Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* 1964; 145: 1310-1333.

Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: Initiation maintenance and regulation. *Biochemistry* 1991; 30: 10363-10370.

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

Dickinson CD, Ruf W. Active site modification of factor VIIa affects interactions of the protease domain with tissue factor. *J Biol Chem.* 1997; 272:19875-19879

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

Eaton D, Rodriguez H and 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.

Eddlestone M, de la Torre JC, Oldstone MBA, Loskutoff DJ, Edgington TS, Mackmann N. Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central nervous system. *J Clin Invest* 1993; 92: 349-358.

Edgington TS, Dickinson CD, Ruf W. The structural basis of function of the TF/VIIa complex in the cellular initiation of coagulation. *Thromb Haemost* 1997; 78: 401-405.

Edgington TS, Mackmann N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Haemost* 1991; 66: 67-79.

Enyoji K, Miyata T, Kamikubo Y, Kato H. Effect of heparin on the inhibition of factor Xa by tissue factor pathway inhibitor: a segment, Gly212-Phe243, of the third Kunitz domain is a heparin-binding site. *Biochemistry* 1995; 34: 5725-5735.

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

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

Fitzsimmons CM, Barnes MJ. The platelet reactivity of the alpha 2(I)-chain of type I collagen: platelet aggregation induced by polymers of the molecule [alpha 2(I)] 3. *Thromb Res.* 1985; 39: 523-31.

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

Geczy CL, Hopper KE. A mechanism of migration inhibition in delayed-type hypersensitivity reactions. Lymphokines promote procoagulant activity of macrophages in vitro. *J Immunol* 1981; 126: 1059-1064.

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

Giesen PLA, 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 USA* 1999; 96: 2311-2315.

Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, Likert KM, Brown SG, Miletich JP, Broze GJ. 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.

Hamik A, Setiadi H, Bu G, McEver RP, Morrissey JH. Down regulation of monocyte tissue factor -mediated by TFPI and LRP. *J Biol Chem* 1999; 274: 4962-4969.

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 DMA, O'Brien DP, Jones EY, Stuart DI, Polikarpov I, Miller A, Tuddenham EGD, Boys CWG. Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. *Nature* 1994; 370: 662-666.

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

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

Holme PA, Solum NO, Brosstad F. Clinical significance of platelet-derived microvesicles: demonstration of their presence in patients suffering from disseminated intravascular coagulation (DIC). *Thromb Haemost* 1993; 69.

Holme PA, Brosstad F, Solum NO. Platelet-derived microvesicles and activated platelets express factor Xa activity. *Blood Coagul Fibrinol* 1995; 6: 302-310.

Iakhiaev A, Pendurthi UR, Voigt J, Ezban M, Rao LVM. Catabolism of factor VIIa bound tissue factor in fibroblasts in the presence and absence of tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem* 1999; 274: 36994-37003.

Jungi, TW, Spycher MO, Nydegger UE, Barandun S. Platelet-leukocyte interactions: Selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes and related cell-lines. *Blood* 1986; 67: 629-636.

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

Kao FT, Hartz J, Horon R, Nemerson Y, Carson SD. Regional assignment of human tissue factor gene to chromosome 1p21-p22. *Somatic Cell Mol Genet* 1988; 14: 407-410.

Karnicki K, Komorowicz E, Fass DN, Owen WG, McBane RD. Influence of anatomical location on arterial thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 342-347.

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

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

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

Landers SC, Gupta M, Lewis JC. Ultrastructural localization of tissue factor on monocyte-derived macrophages and macrophage foam cells associated with atherosclerotic lesions. *Virchows Arch* 1994; 425: 49-54.

Lehr HA, Oloffson AM, Carew TE, Vajkoczy P, von Au, Hubner C, Berndt MC, Steinberg D, Messmer K, Arfors KE. P-selectin mediates the interaction of circulating leukocytes with platelets and microvascular endothelium in response to oxidized lipoprotein in vivo. *Lab invest* 1994; 71: 380-386.

Li N, Hu H, Lindqvist M, Wikström- Jonsson E, Goodall AH, Hjemdahl P. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2702-2708

Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000. 247: 349-358

Lorenzet R, Napoleone A, Celi G, Pelligrini, Di Santo A. Cell-cell interaction and tissue factor expression. *Blood Coagul Fibrin* 1998; 9: 49-59.

Lupu C, Goodwin CA, Westmuckett AD, Emeis JJ, Scully MF, Kakkar VV, Lupu F. Tissue factor pathway inhibitor in endothelial cells colocalizes with glycolipid microdomains/caveolae: regulatory mechanism(s) of the anticoagulant properties of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2964-2974.

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

Mackmann N, Sawday MS, Keeton MR, Loskutoff DJ. Murine tissue factor gene expression in vivo. Tissue and cell specificity and regulation by lipopolysaccharide. *Am J Pathol* 1993; 143: 76-84.

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

Mackmann N, Fowler BJ, Edgington TS, Morrissey JH. Functional analysis of the human tissue factor promoter and induction by serum. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 2254-2258.

McEver RP, Cummings RD. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100: 485-491.

McEver RP. Adhesive interactions of leukocytes, platelets and the vessel wall during haemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* 2001; 86: 746-756.

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 platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microvesicles. *Blood* 1996; 88: 3456-3464.

Monura S, Komiyama Y, Miyake T, Miyazaki Y, Kido H, Suzuki M, Kagawa H, Yanabu M, Takahashi H, Fukuhara S. Amyloid-B protein precursor-rich platelet microvesicles in thrombotic diseases. *Thromb Haemost* 1994; 72: 519-522.

Moon DG, van der Zee H, Weston LK, Gudewicz PW, Fenton JW, Kaplan JE. Platelet modulation of neutrophil superoxid anion production. *Thromb Haemost* 1990; 63: 91-96.

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.

Muller YA, Ultsch MH, Kelley RF, de Vos AM. Structure of the extracellular domain of human tissue factor: location of the factor VIIa binding site. *Biochemistry* 1994; 33: 10864-10870.

Muller YA, Ultsch MH, De Vos A. The crystal structure of the extracellular domain of human tissue factor refined to 1,7 Å resolution. *J Biol Mol* 1996; 256: 144-159.

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

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

Naito K, Fjikawa 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; 23: 657-668

Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood* 1988, 71: 1-8

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

Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biol Chem* 1979; 254: 10952-10962.

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

Nordfang O, Bjorn SE, Valentin S, Nielsen LS, Wildgoose P, Beck TC, Hedner U. The C-terminus of tissue factor pathway inhibitor is essential to its anticoagulant activity. *Biochemistry* 1991; 30: 10371-10376.

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

Ohkura N, Ejyoji KI, Kamikubo YI, Kato H. A novel degradation pathway of tissue factor pathway inhibitor: incorporation into fibrin clot and degradation by thrombin. *Blood* 1997; 90: 1883-1892.

Osterud B. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathological roles. *Blood Coagul Fibrin* 1998; 9: 9-14.

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

Osterud B, Borind E. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27: 605-617.

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

Paborsky LR, Cras IW, Fisher KL, Goman 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.

Pan B-T, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 1983; 33: 967-977.

Penn MS, Patel CV, Cui MZ, DiCorieto 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 K. Inhibitory properties of separate recombinant Kunitz-type-protease-inhibitory domains from tissue factor pathway inhibitor. *Eur J Biochem* 1996; 235: 310-316.

Randolph GJ, Luther T, Albrecht S, Magdolen V, Muller WA. Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. *Blood* 1998; 92: 4167-4177.

Rao LV, Nordfang O, Hoang A, Pendurthi U. Mechanism of antithrombin III inhibition of factor VIIa/tissue factor activity on cell surfaces: comparison with tissue factor pathway inhibitor/factor Xa-induced inhibition of factor VIIa/tissue factor activity. *Blood*. 1995; 85:121-129

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

Rapaport SI. Regulation of the tissue factor pathway. *Ann N Y Acad Sci*. 1991; 614: 51-62

Rauch U, Bondermann D, Bohrmann B, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 2000; 96: 170-175.

Rivers RPA, Hataway WE, Weston WL. The endotoxin induced coagulant activity of human monocytes. *Br J Haematol* 1975; 30: 311-316.

Rivers RPA, Cattermole HEJ, Wright I. The expression of surface tissue factor apoprotein by blood monocytes in the course of infections in early infancy. *Pediatr Res* 1992; 31: 567-573.

Salemink I, Franssen J, Willems GM, Hemker HC, Li A, Wun TC, Lindhout T. Factor Xa cleavage of tissue factor pathway inhibitor is associated with loss of anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 1998; 80: 273-280.

Sanders NL, Bajaj SP, Zivelin A, Rapaport SI. Inhibition TF/factor VIIa activity in plasma requires factor X and an additional plasma factor. *Blood* 1985; 66: 204-212.

Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, Hedman H, Freyssinet JM. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for disseminated membrane-associated procoagulant activities and activities after stimulation with lipopolysaccharides. *J Immunol* 1994; 153: 3245-3255.

Scarpati EM, We D, Broze GJ, Miletich JP, Flandersmeyer RR, Siegel NR, Sadler JE. Human tissue factor cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry* 1987; 26: 5234-5238.

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

Schwartz BS, Edgington TS. Immune complex-induced human monocyte procoagulant activity. A rapid unidirectional lymphocyte-instructed pathway. *J Exp Med* 1981; 154: 892-906.

Sevinsky JR, Rao LVM, Ruf W. Ligand-induced protease receptor translocation into caveolae: A mechanism for regulation cell surface proteolysis of the tissue factor-dependent coagulation pathway. *J Cell Biol* 1996; 133: 293-304.

Shamamian P, Schwartz JD, Pocock PJ, Monea S, Whiting D, Marcus SD, Mignatti P. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol*. 2001; 189: 197-206.

Shoji M, Abe K, Nawroth PP, Rickles FR. Molecular mechanism linking thrombosis and angiogenesis in cancer. *Trends Cardiovasc med* 1997; 7: 52-59.

Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets*. 2002 Jun; 13: 247-53.

Simionescu M, Simionescu N. Endothelial transport of macromolecules : transcytosis and endocytosis. *Cell Biol Rev* 1991; 25: 1-80.

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.

Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the plasma membrane: studies in

- Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem* 1989; 264: 17049-17057.
- Sissener Engstadt C, Lia K, Rekdal O, Olsen JO, Osterud B. A novel biological effect of platelet factor 4 (PF4): enhancement of LPS-induced tissue factor activity in monocytes. *J Leuk Biol* 1995; 58: 575-581.
- Spangenberg P, Redlich H, Bergmann I, Lösche W, Götzrath M, Kehrel B. The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes. *Thromb Haemost* 1993; 70: 514-521.
- Stahl A, Mueller BM. The urokinase-type plasminogen activator receptor, a GPI-linked protein is localized in caveolae. *J Cell Biol* 1995; 19: 335-344.
- Stalboerger PG, Panetta CJ, Simari RD, Caplice NM. Plasmin poteolysis of endothelial cell and vessel wall associated tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 86: 923-928.
- Tans G, Rosing J, Christella M, Thomassen LGD, Reeb MJ, Zwaal RFA, Griffin JH,. Comparison of anticoagulant and procoagulant activities of stimulated platelets and platelet-derived microparticles. *Blood* 1991; 77: 2641-2648.
- Valentin S, Nordfang O, Bregengard C, Wildgoose P. Evidence that the C-terminus of tissue factor pathway inhibitor is essential for its in vitro and in vivo interactions with lipoproteins. *Blood Coagul Fibrinol* 1993; 4: 713-720.
- Van der Logt CPE, 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 Fibrinol* 1994; 5: 211-220.
- Versteeg Peppelenbosch MP, Speck CA. The pleiotropic effects of tissue factor: a possible role for factor VIIa-induced intracellular signalling? *Thromb Haemost*. 2001; 86: 1353-1359.
- Warkentin ET, Kelton JG. Sera from patients with heparin-induced thrombocytopenia generate platelet-derived microparticles with procoagulant activity: an explanation for the thrombotic complications of heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 1994; 84: 3691-3699.
- Wesselschmidt R, Likert K, Girard T, Wun TC, Broze GJ. 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 arteriosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2839-2843.
- Wun TC, Kretzmer KK, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ. Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains. *J Biol Chem* 1988; 263: 6001-6004.

Zhang Y, Deng Y, Luther T, Müller M, Ziegler R, Waldherr R, Stern MD, Nawroth PP. Tissue Factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest* 1994; 94: 1320-1327.

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

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bernd Engelmann für die freundliche Aufnahme im Arbeitskreis, die Bereitstellung des spannenden Themas und seine intensive Betreuung und Förderung während der gesamten Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Prof. Dr. Martin Biel für das Vertreten meiner Arbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU München im Bereich Pharmakologie für Naturwissenschaftler.

Prof. Dr. Ulrich Pohl und Prof. Dr. Seidel danke ich, daß ich die Möglichkeit erhielt, die Experimente der vorliegenden Arbeit in den Laboren des Physiologischen Institutes bzw. der Klinischen Chemie der LMU durchzuführen.

Dr. Thomas Luther, Dr. Matthias Kotzsch, Prof. Dr. Eberhard Morgenstern, Dr. Mechthild Stöcklhuber und Dr. Michael Spannagl danke ich für die hilfreichen Kooperationen.

Ein großes Dankeschön auch an Dr. Stefan Zahler und Dr. Thorsten Gloe , ohne die ich „praktisch“ aufgeschmissen gewesen wäre.

Bedanken möchte ich mich auch bei Susanne Zieseniss, die mich einlernte und die immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Mein Dank auch:

an die „Engelmänner und –frauen“ für ein nettes Arbeitsklima und die gegenseitige Unterstützung (vor allem Andreas Zillmann und Tini Moosbauer)

an die Doktoranden aus dem Physiologischen Institut, dem Graduiertenkolleg und meine ehemaligen Studienkollegen für's Zuhören und Aufbauen, wenn Frust angesagt war.

an meine Familie, vorallem aber meinem Spatz für ihre/seine Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	<u>Ingrid</u> Maria Müller
Geburtsdatum	24.06.1973
Geburtsort	München
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung:

1979-1984	Grundschule am Ravensburger Ring München
1984-1992	Bertolt-Brecht-Gymnasium München
08. Juli 1992	Abitur

Hochschulausbildung:

WS 1992	Studium der Chemie, LMU München
SS 1993 - WS 1997	Studium der Pharmazie, LMU München
5. September 1995	1. Staatsexamen
30. Oktober 1997	2. Staatsexamen
7. Dezember 1998	3. Staatsexamen
23. Dezember 1998	Approbation als Apothekerin

Praktikum:

Dezember 1997 - November 1998: Westkreuz-Apotheke München

Wissenschaftliche Tätigkeit:

Seit 1. Januar 1999 Doktorand bei PD Prof. Dr. med. Bernd Engelmann am Institut für Vegetative Physiologie, seit Mai 2002 im Institut für Klinische Chemie der LMU München mit dem Dissertationsthema: Funktion und Aktivierungsmechanismus eines schnell aktivierbaren intravaskulären Tissue Factor-Systems.

Von 01.01.1999 - 31.12.2001 Stipendiat des Graduiertenkollegs „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ unter der Leitung von Prof. Dr. W. Siess.