

Aus dem
Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH)
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**„Modulation der Aktivierung von Thrombozyten und
Monozyten durch Thrombin und Thrombospondin-1“**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Mareike Döhrmann
geb. am 22.10.1984, in Bremen

Mainz, 2022

Dekan:

1. Berichterstatterin:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2022

Versicherung

Hiermit versichere ich, Mareike Döhrmann, geboren in Bremen am 22.10.1984, gemäß §11, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 22.12.2003, dass ich die heute als Dissertation vorgelegte Arbeit mit dem Titel „Modulation der Aktivierung von Thrombozyten und Monozyten durch Thrombin und Thrombospondin-1“:

(Zutreffendes ist angekreuzt)

- ☒ selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben habe
- ☒ nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe
- ☐ als Prüfungsarbeit für folgende Prüfung eingereicht habe
Bezeichnung der Prüfung:
Prüfungsstelle:
- ☒ und auch keine Teile einer Abhandlung bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht habe
- ☐ als die folgende Abhandlung mit nachstehendem Ergebnis eingereicht habe
Titel der Abhandlung:
Fakultät bzw. Fachbereich und Hochschule:
Ergebnis bzw. Beurteilung:

Mareike Döhrmann

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1. Die Hämostase	1
1.1.1. Der Thrombozyt	1
1.1.2. Rolle der Thrombozyten in der primären Hämostase	2
1.1.3. Rolle der Thrombozyten in der sekundären Hämostase	6
1.1.3.1. Initiation	6
1.1.3.2. Amplifikation und Propagation	8
1.2. Thrombin und seine pleiotrope Rolle im hämostatischen und zellulären System ..	10
1.3. „Cluster of differentiation“ 36.....	14
1.4. Thrombospondin-1	16
1.5. Die Inflammation	18
1.5.1. Der Monozyt.....	18
1.6. Wechselspiel zwischen zellulärer Hämostase und Inflammation bei der Arteriosklerose.....	20
1.7. Ziele der wissenschaftlichen Arbeit.....	26
2 MATERIALIEN.....	27
2.1. Zelllinie und Primärzellen.....	27
2.2. Medien	27
2.3. Gerinnungsfaktor-depletierte humane Plasmen	29
2.4. Laborgeräte	29
2.5. Verbrauchsmaterialien	31
2.6. Chemikalien und Reagenzien	33
2.7. Arzneistoffe, Medikamente und Anästhetika	35
2.8. Puffer und Lösungen	36

2.9.	Antikörper, Peptide und Proteine	38
2.10.	PCR-Reagenzien, Primer und Marker	40
2.11.	Software	41
2.12.	Tierversuche.....	41
2.12.1.	Genehmigung der Tierversuche	41
2.12.2.	Versuchstiere und Haltung	41
2.13.	Ethikantrag und Bezug der „Buffy Coats“	42
3	METHODEN.....	43
3.1.	Zellbiologische Methoden für humane Proben.....	43
3.1.1.	Blutentnahme	43
3.1.2.	Generierung von humanem PRP, PPP und PFP	43
3.1.3.	Generierung humaner gewaschener Thrombozyten	44
3.1.4.	Generierung von humanem defibriniertem Plasma	44
3.1.5.	Isolierung humaner Monozyten.....	45
3.1.6.	Kultivierung humaner Monozyten	46
3.2.	Zellbiologische Methoden für murine Proben	46
3.2.1.	Blutentnahme	46
3.2.2.	Generierung von murinem PRP.....	47
3.2.3.	Generierung muriner gewaschener Thrombozyten	47
3.2.4.	Isolierung muriner Makrophagen	47
3.2.5.	Kultivierung muriner Makrophagen	48
3.3.	Analytische Methoden	49
3.3.1.	Kalibrierte automatisierte Thrombographie („Calibrated Automated Thrombography“) ..	49
3.3.2.	Thrombin-, „Tissue Factor“- und Batroxobin-induzierte Thrombingenerierung in humanem PRP und von humanen gewaschenen Thrombozyten in Plasma	49
3.3.3.	Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in humanem Citrat-Vollblut.....	52
3.3.4.	Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in humanem PRP und PFP in An- bzw. Abwesenheit von Dabigatran	53
3.3.5.	Durchflusszytometrie.....	54
3.3.6.	Thrombozytenfunktionsanalysen, human	54
3.3.7.	Quantifizierung des Thrombozytenrezeptors CD36 in humanem PRP	56
3.3.8.	Präparation von CD36- bzw. Fibrin-beschichteten Polystyrol-Latexkügelchen	57
3.3.9.	Analyse der Bindungseigenschaften von aufgereinigten Adhäsionsproteinen an CD36-beschichtete Kügelchen.....	58
3.3.10.	Analyse der Bindungseigenschaften von Adhäsionsproteinen und Koagulationsfaktoren im Plasma an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen	58

3.3.11. Analyse der Bindungseigenschaften von aufgereinigten humanen Gerinnungsfaktoren an Fibrin-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen	59
3.3.12. Reinheitsbestimmung und Phänotypisierung humaner Monozyten	59
3.3.13. Reinheitsbestimmung muriner singulärer Makrophagen	60
3.4. Zellkultur	61
3.4.1. Kryokonservierung und Kultivierung humaner mikrovaskulärer Endothelzellen (HMEC-1)	61
3.4.2. Passagieren der Endothelzell-Erhaltungskultur	61
3.4.3. Lebendzellzahl-Bestimmung	62
3.5. Flusskammer-Experimente unter dynamischen Bedingungen	62
3.5.1. Beschichtung der Kanaloberfläche	63
3.5.2. Einsaat der HMEC-1	64
3.5.3. TNF α -Stimulation der HMEC-1	65
3.5.4. Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten an/auf/durch eine/r unstimulierte/n bzw. TNF- α -stimulierte/n Endothelzellschicht unter Flussbedingungen in An- bzw. Abwesenheit von Dabigatran	65
3.5.5. Adhäsion, Migration und Transmigration muriner Makrophagen an/auf/durch eine/r unstimulierte/n bzw. TNF- α -stimulierte/n Endothelzellschicht unter Flussbedingungen	68
3.6. Genotypisierung von TSP-1 Knockout-Mäusen	69
3.6.1. Die Thrombospondin-1 Knockout-Maus	69
3.6.2. Gewebeentnahme und DNS-Extraktion	70
3.6.3. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	70
3.6.4. Agarosegelelektrophorese	73
3.6.5. Proteinnachweis in murinen Thrombozyten	73
3.6.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	74
3.6.7. Western Blot Methode	75
3.7. Statistische Auswertung	76
4 ERGEBNISSE	77
4.1. Mechanismen der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung	77
4.1.1. Rolle des „Tissue Factor“-FVII-Komplexes in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung	77
4.1.2. Rolle des Tenase-Komplexes in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung	79
4.1.3. Rolle des Prothrombinase-Komplexes in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung	82
4.1.4. Rolle des Gerinnungsfaktors II in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung	84
4.1.5. Rolle des Gerinnungsfaktors XI in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung	85

4.1.6.	Rolle des Gerinnungsfaktors XII in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung	87
4.1.7.	Rolle der G-Protein-gekoppelten Thrombozytenaktivierung in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung.....	88
4.1.8.	Rolle des Fcγ-Rezeptors IIa (CD32a) in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung.....	89
4.1.9.	Rolle des Thrombozytenrezeptors CD36 in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung.....	90
4.1.10.	Rolle des Thrombozytenrezeptors CD36 in Citrat-Vollblut	94
4.1.11.	Quantifizierung des Thrombozytenrezeptors CD36 in humanem PRP	96
4.2.	Mechanismen der CD36-abhängigen Thrombingenerierung	97
4.2.1.	Rolle von GPIbα in der CD36-abhängigen Thrombingenerierung.....	97
4.2.2.	Rolle des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ in der CD36-abhängigen Thrombingenerierung	99
4.2.3.	Rolle von δ -granulären Verstärkungsagonisten in der CD36-abhängigen Thrombingenerierung.....	102
4.2.4.	Rolle von CD36 bei der Thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung (Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, P-Selektin-Oberflächenexpression und Bindung der Adhäsionsproteine Fibrinogen, TSP-1 und vWF an die Thrombozytenoberfläche)	104
4.2.5.	Rolle der Interaktion von TSP-1 mit CD36 in der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung.....	106
4.2.6.	Rolle der thrombozytären Phosphatidylserin-Präsentation in der CD36-abhängigen Thrombingenerierung.....	110
4.2.7.	Rolle von Thrombozytenrezeptor CD36 bei der Thrombin-induzierten Phosphatidylserin-Präsentation auf Thrombozyten.....	111
4.2.8.	Rolle von CD36 bei der Bindung von Gerinnungsfaktoren an Thrombin-stimulierte Thrombozyten	112
4.2.9.	Rolle von Fibrin in der CD36-abhängigen Thrombingenerierung	113
4.3.	Analyse potenzieller Liganden des Thrombozytenrezeptors CD36	116
4.3.1.	Bindung von isolierten Adhäsionsproteinen an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen	116
4.3.2.	Bindung von Adhäsionsproteinen im Plasma an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen	118
4.3.3.	Bindung von Gerinnungsfaktoren im Plasma an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen	120
4.3.4.	Bindung von isolierten Gerinnungsfaktoren an Fibrin-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen	121
4.4.	Untersuchungen zur Monozyten-abhängigen Thrombingenerierung	122
4.4.1.	Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in PFP	122
4.4.2.	Einfluss des direkten Thrombin-Inhibitors Dabigatran auf die Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in PFP.....	124

4.4.3.	Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in PRP	125
4.4.4.	Einfluss des direkten Thrombin-Inhibitors Dabigatran auf die Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in PRP	127
4.5.	Rolle von Thrombin bei der endothelialen Rekrutierung und Transmigration von humanen Monozyten unter Flussbedingungen <i>in vitro</i>	128
4.5.1.	Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten an/auf/durch unstimulierte/n bzw. TNF- α -stimulierte/n HMEC-1	128
4.5.2.	Einfluss von Dabigatran auf die endotheliale Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten	130
4.6.	Rolle von Thrombospondin-1 bei der endothelialen Rekrutierung und Transmigration von murinen Makrophagen unter Flussbedingungen <i>in vitro</i>	131
4.6.1.	Genotypisierung von TSP-1 Knockout-Mäusen und Proteinnachweis von TSP-1 in K. o.-Mäusen	131
4.6.2.	Adhäsion, Migration und Transmigration muriner Makrophagen von C57BL/6J-Mäusen an/auf/durch unstimulierte/n bzw. TNF- α -stimulierte/n HMEC-1	133
4.6.3.	Rolle von TSP-1 bei der endothelialen Adhäsion, Migration und Transmigration muriner Peritonealmakrophagen.....	135
5	DISKUSSION	137
5.1.	Validierung und Charakterisierung der FXI-abhängigen Thrombingenerierung auf humanen Thrombozyten	137
5.2.	CD36 amplifiziert die FXI-abhängige Thrombinbildung auf humanen Thrombozyten	144
5.3.	Der direkte Thrombin-Inhibitor Dabigatran hemmt die durch Monozyten initialisierte und durch Thrombozyten amplifizierte Thrombinaktivität	152
5.4.	Der direkte Thrombin-Inhibitor Dabigatran hemmt die endotheliale Rekrutierung und Transmigration humaner Monozyten unter Flussbedingungen <i>in vitro</i>	155
5.5.	Thrombospondin-1 vermittelt die endotheliale Rekrutierung und Transmigration von murinen Makrophagen unter Flussbedingungen <i>in vitro</i>	159
6	ZUSAMMENFASSUNG	165
7	LITERATURVERZEICHNIS	169
PUBLIKATIONEN.....		191
DANKSAGUNG		193
LEBENS LAUF		193

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Thrombozyten-Ultrastruktur.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der primären Hämostase.	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der zellbasierten Initiation der sekundären Hämostase. .	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Thrombozyten-vermittelten Amplifikation und Propagation von Thrombin in der sekundären Hämostase.	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fibrinogenspaltung durch Thrombin und Fibrinpolymerisierung und Kreuzvernetzung durch Gerinnungsfaktor XIIIa.	10
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der funktionellen Domänen des CD36-Rezeptors.....	14
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der funktionellen Domänen eines TSP-1-Einzelstrangs.	16
Abbildung 8: Schematische Darstellung der A: Adhäsion und B: Migration und Transmigration eines Monozyten an/auf/durch eine/r aktivierte/n Endothelzellschicht.	23
Abbildung 9: Beispiel-Thrombogramm mit „lag time“, „endogenem Thrombinpotenzial, etp“ und „thrombin peak“.....	52
Abbildung 10: „Inlet-“ und „Outlet-Well“ einer 48-„Well“ Flusskammerplatte mit Beobachtungsabschnitt.....	64
Abbildung 11: Einfluss des anti-TF Antikörpers VD8 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.	78
Abbildung 12: Einfluss des FVII auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.....	79
Abbildung 13: Einfluss des FVIII auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.....	80
Abbildung 14: Einfluss des FIX auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.....	81
Abbildung 15: Einfluss des FX auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.....	83
Abbildung 16: Einfluss des FV auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.....	84
Abbildung 17: Einfluss des FII auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.....	85
Abbildung 18: Einfluss des FXI auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung und Substitution von FXI-depletiertem Plasma mit humanem FXI.....	86
Abbildung 19: Einfluss des FXII auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.....	87
Abbildung 20: Einfluss des Prostazyklin-Analogons Iloprost auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.....	89
Abbildung 21: Einfluss des anti-CD32a Antikörpers IV.3 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.....	90

Abbildung 22: Einfluss des Thrombozytenrezeptors CD36 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombinbildung in PRP.	91
Abbildung 23: Einfluss des anti-CD36 Antikörpers FA6.152 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.	92
Abbildung 24: Einfluss des anti-CD36 Antikörpers CLB-IVC7 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.	93
Abbildung 25: Einfluss des anti-CD36 Antikörpers 185-1G2 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.	94
Abbildung 26: Einfluss des anti-CD36 Antikörpers FA6.152 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in Citrat-Vollblut.	95
Abbildung 27: Korrelation zwischen der CD36-Oberflächenrezeptorenanzahl und der Thrombingenerierung bzw. der Reduktion des „etps“ durch den anti-CD36 Antikörper FA6.152.	96
Abbildung 28: Einfluss des anti-GPIIb Antikörpers SZ2 auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.	97
Abbildung 29: Einfluss des anti-GPIIb Antikörpers SZ2 auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.	98
Abbildung 30: Einfluss des Bernard-Soulier-Syndroms auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.	99
Abbildung 31: Einfluss des Thrombozytenaggregationshemmers Tirofiban auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.	100
Abbildung 32: Einfluss des Syk Kinase-Inhibitors IV auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.	101
Abbildung 33: Einfluss von Tirofiban bzw. Syk Kinase-Inhibitor IV auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.	102
Abbildung 34: Einfluss der δ -Granula-Sekretion auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.	103
Abbildung 35: Einfluss des P2Y ₁₂ -Antagonisten AR-C69931 auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.	104
Abbildung 36: Repräsentative Histogramme der Thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung.	105
Abbildung 37: Einfluss des anti-CD36 Antikörpers FA6.152 bzw. der CD36-Defizienz Typ II auf die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, Granula-Sekretion und Adhäsionsproteinbindung in PRP.	106
Abbildung 38: Einfluss des anti-TSP-1 Antikörpers A4.1 auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.	107

Abbildung 39: Einfluss des Peptids CSVTCG auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.....	108
Abbildung 40: Einfluss des Peptids P(93-110) auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.....	109
Abbildung 41: Einfluss des rekombinanten Annexin V auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.....	110
Abbildung 42: Repräsentative Darstellung der Thrombin-induzierten PS-Oberflächenpräsentation und Einfluss des anti-CD36 Antikörpers FA6.152 bzw. der CD36-Defizienz Typ II auf die Thrombin-induzierte PS-Oberflächenpräsentation auf der Thrombozytenoberfläche.	112
Abbildung 43: Verbliebene Bindung von FIX, FX, FVIII und FV an CD36-blockierte oder CD36-defiziente Thrombozyten nach Stimulation mit Thrombin.....	113
Abbildung 44: Einfluss von Fibrinogen/Fibrin auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.	114
Abbildung 45: Einfluss von Batroxobin auf die Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.	115
Abbildung 46: Einfluss des Peptids GPRP auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.....	116
Abbildung 47: Bindung der Plasma-Adhäsionsproteine TSP-1 und vWF an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen.	117
Abbildung 48: Bindung von Fibrinogen bzw. Batroxobin-behandeltem Fibrinogen an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.	118
Abbildung 49: Einfluss von Fibrinogen/Fibrin auf die Bindung der Plasma-Adhäsionsproteine Fibrinogen, vWF und TSP-1 an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen in An- oder Abwesenheit von Thrombin.	119
Abbildung 50: Einfluss von Fibrinogen/Fibrin auf die Bindung von FIX, FVIII, FV und FX an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen in Kontroll- oder defibriniertem Plasma in An- oder Abwesenheit von Thrombin.	121
Abbildung 51: Oberflächenexpression und Oberflächenbindung von monozytären Adhäsions- und Aktivierungsmarkern.	123
Abbildung 52: Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in humanem PFP in Abhängigkeit von der Monozyten-Konzentration.....	124
Abbildung 53: Thrombinaktivität, induziert durch humane Monozyten, in humanem PFP in Abhängigkeit von der Dabigatran-Konzentration.....	125
Abbildung 54: Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in humanem PRP in Abhängigkeit von der Monozyten-Konzentration.....	126
Abbildung 55: Thrombinaktivität, induziert durch humane Monozyten, in humanem PRP in Abhängigkeit von der Dabigatran-Konzentration.....	127

Abbildung 56: Einfluss der TNF- α -Behandlung von HMEC-1 auf die endotheliale Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten.	129
Abbildung 57: Repräsentative Sequenzfotos der Adhäsion und Transmigration von humanen Monozyten an/durch eine TNF- α -stimulierte HMEC-1-Zellschicht unter Flussbedingungen.	130
Abbildung 58: Einfluss von Dabigatran auf die endotheliale Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten in An- und Abwesenheit von TNF- α	131
Abbildung 59: Visualisierung der Genotypisierung in einem Agarosegel.	132
Abbildung 60: Visualisierung der Proteinexpression in Wildtyp- und TSP-1 K. o.-Thrombozyten auf einer Trägermembran.	133
Abbildung 61: Einfluss von TNF- α auf die endotheliale Adhäsion, Migration und Transmigration muriner C57BL/6J-Peritonealmakrophagen.	134
Abbildung 62: Endotheliale Adhäsion, Migration und Transmigration muriner TSP-1-defizienter Peritonealmakrophagen.....	135

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	verwendete Zellen.....	27
Tabelle 2:	verwendete Medien und Supplemente	28
Tabelle 3:	verwendete Mangelplasmen und Restaktivität	29
Tabelle 4:	verwendete Geräte	29
Tabelle 5:	verwendete Verbrauchsmaterialien	31
Tabelle 6:	verwendete Chemikalien und Reagenzien	33
Tabelle 7:	verwendete Arzneistoffe, Medikamente und Anästhetika.....	35
Tabelle 8:	verwendete Puffer und Lösungen.....	36
Tabelle 9:	verwendete Antikörper	38
Tabelle 10:	verwendete Peptide	39
Tabelle 11:	verwendete Proteine	40
Tabelle 12:	verwendete Reagenzien, Primer, PCR-Marker und SDS-PAGE-Marker	40
Tabelle 13:	verwendete Software	41
Tabelle 14:	Konzentrationen und Inkubationszeiten der in der CAT eingesetzten Antikörper, Inhibitoren, Peptide und anderer Effektoren.	51
Tabelle 15:	Antikörper und CaCl_2 -Konzentrationen für die Funktionsanalyse humaner Thrombozyten.	55
Tabelle 16:	Antikörper für die Analyse der Bindungseigenschaften von Plasma-Adhäsionsproteinen und Koagulationsfaktoren an CD36-beschichtete Kügelchen.	59
Tabelle 17:	Einstellungen der Aufnahmebedingungen für die Wellenlängen.....	67
Tabelle 18:	Genetische Informationen der Thrombospondin-1 Knockout-Mutation.....	70
Tabelle 19:	Genotypisierungsprotokoll - allgemeine Daten laut „Jackson Laboratory“.	71
Tabelle 20:	Genotypisierungsprotokoll - Primersequenzen für die PCR von TSP-1 K. o.-Maus-DNS laut „Jackson Laboratory“.....	71
Tabelle 21:	Genotypisierungsprotokoll - Zusammensetzung der Reaktionskomponenten für die PCR von TSP-1 K. o.-Maus-DNS laut „Jackson Laboratory“.	72
Tabelle 22:	Genotypisierungsprotokoll - modifizierte Zusammensetzung der Reaktionskomponenten für die PCR von TSP-1 K. o.-Maus-DNS.	72
Tabelle 23:	Genotypisierungsprotokoll - Zyklen für die PCR von TSP-1 K. o.-Maus-DNS laut „Jackson Laboratory“.	73
Tabelle 24:	Zusammensetzung eines 8%igen SDS-Gels.....	74
Tabelle 25:	Signifikanzdefinition.	76
Tabelle 26:	Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von FIX-FITC, FVIII-FITC, FV-FITC und FX-FITC an Fibrin-beschichtete Kügelchen in An- oder Abwesenheit von DTNB.	122

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenkonzentration
ADP	Adenosindiphosphat
agLDL	„aggregated low density lipoprotein“, aggregiertes Lipoprotein niedriger Dichte
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin Fraktion V
BSS	Bernard-Soulier-Syndrom
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	„cyclic adenosinemonophosphate“, zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT	„calibrated automated thrombography“, kalibrierte automatisierte Thrombographie
CCL2	CC-chemokiner Ligand, auch MCP-1
CD	„cluster of differentiation“
CGS	„citrat-glucose-sodiumchloride“, Citrat-Glukose-Natriumchlorid
DAMPs	„damage associated molecular patterns“
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt-deionisiertes Wasser
DFP	defibriniertes Plasma
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DOAK	direkte orale Antikoagulanzen
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
etp	endogenes Thrombinpotenzial
EZ	Endothelzellen
FA	Formaldehyd
FBS	„fetal bovine serum“, fötales Rinderserum
FII	Gerinnungsfaktor II, Prothrombin
FIIa	Gerinnungsfaktor IIa, Thrombin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FIX	Gerinnungsfaktor IX
FIXa	aktivierter Gerinnungsfaktor IX
FluCa	Fluo-Substrat + Fluo-Puffer

FV	Gerinnungsfaktor V
FVa	aktivierter Gerinnungsfaktor V
FVII	Gerinnungsfaktor VII
FVIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor VII
FVIII	Gerinnungsfaktor VIII
FVIIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor VIII
FX	Gerinnungsfaktor X
FXa	aktivierter Gerinnungsfaktor X
FXI	Gerinnungsfaktor XI
FXIa	aktivierter Gerinnungsfaktor XI
FXII	Gerinnungsfaktor XII
FXIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor XII
FXIII	Gerinnungsfaktor XIII
FXIIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor XIII
GP	Glykoprotein
GPRP	H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH
HBSS	„Hank's balanced salt solution“, Hank's stabilisierte Salzlösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMEC-1	„human microvascular endothelial cells-1“, humane mikrovaskuläre Endothelzellen-1
HRP	„horseradish-peroxidase“, Meerrettich-Peroxidase
ICAM-1	„intercellular adhesion molecule 1“, interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
JAM	„junctional adhesion molecule“, junctionales Adhäsionsmolekül
K. o.	„Knockout“
LBRC	„lateral border compartment“
LDL	„low density lipoprotein“, Lipoprotein niederer Dichte
mA	Milliampere
MCP-1	„monocyte chemotactic protein-1“, Monozyten-chemotaktisches Protein-1, auch CCL2
min	Minute
mM	Millimolar
MRP-14	„myeloid related protein 14“, „myeloid“-verwandtes Protein 14
MZ	humane Monozyten
M Φ	murine Makrophagen
n. s.	nicht signifikant
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NOAK	Nicht Vitamin K-antagonistische orale Antikoagulanzen
oxLDL	„oxidized low density lipoprotein“, oxidiertes Lipoprotein niederer Dichte
P ₂ Rho	Rhodamin
PAR	Protease-aktivierter Thrombin-Rezeptor

PBS	„phosphate-buffered saline“, Phosphat-gepufferte Saline
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	„platelet endothelial cell adhesion molecule-1“, Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1
PFP	„platelet-free plasma“, Thrombozyten-freies Plasma
pM	Pikomolar
PPP	„platelet-poor plasma“, Thrombozyten-armes Plasma
PP-Röhrchen	Polypropylenröhrchen
PRP	„platelet-rich plasma“, Thrombozyten-reiches Plasma
PS	Phosphatidylserin
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
ROS	„reactive oxygen species“, reaktive Sauerstoffspezies
rpm	„revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	„sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis“, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNPs	„single nucleotide polymorphisms“, Einzelnukleotidpolymorphismen
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	„tris-buffered saline“, Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	„tris-buffered saline with Tween“, Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TF	„Tissue Factor“, Gewebefaktor
TFPI	„tissue factor pathway inhibitor“
TGF- β	„transforming growth factor β “, transformierender Wachstumsfaktor β
TGS	Tris-Glycin-SDS
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP-1	Thrombospondin-1
TZ	Thrombozyten
UV	ultraviolett
VCAM-1	„vascular adhesion molecule 1“, vaskuläres Adhäsionsmolekül 1
VE-Cadherin	vaskulär-endotheliales Cadherin
vWF	von Willebrand Faktor
x g	g-Kraft

1 Einleitung

1.1. Die Hämostase

Die Hämostase ist ein essenzieller Prozess, der bei Beschädigungen von Blutgefäßen in Kraft tritt, um den daraus resultierenden Blutverlust zu stoppen (Blutstillung) und die Beschädigung zu reparieren (Wundheilung). Dieser Prozess lässt sich in die Hauptphasen primäre und sekundäre Hämostase sowie Fibrinolyse unterteilen, die jedoch nicht klar voneinander abgegrenzt werden können und überlappend und parallel ablaufen. Durch Adhäsion, Sekretion und Aggregation sorgen aktivierte Thrombozyten für die Bildung eines ersten, noch instabilen Blutgerinnsels (Thrombus), welches im Zuge der sekundären Hämostase durch die Bildung von Thrombin stabilisiert wird. Anschließend setzt die Wundheilung ein, bei der Teile des gebildeten Thrombus wieder aufgelöst werden (Fibrinolyse). Störungen der Hämostase können durch verschiedene Faktoren wie z. B. einen Protein S- oder Protein C-Mangel oder Mutationen (Prothrombin-Mutation, Faktor-V-Leiden) hervorgerufen werden und zu einer unkontrollierten Blutungsstillung und Wundheilung führen. Der gebildete Thrombus wächst weiter und resultiert im schlimmsten Fall in der Verengung bzw. dem Verschluss des betroffenen Blutgefäßes, einer Thrombose.

1.1.1. Der Thrombozyt

Thrombozyten spielen bei der Hämostase eine zentrale Rolle, indem sie im Rahmen der primären Hämostase aggregieren und im Rahmen der sekundären Hämostase verstärkt Thrombin auf ihrer Oberfläche generieren. Sie sind mit einer Größe von etwa $3,6 \times 0,7 \mu\text{m}$ die kleinsten Blutzellen [1] und entstehen aus Abschnürungen ihrer Vorläuferzellen, den Megakaryozyten. Sie beinhalten keinen Zellkern und keine Desoxyribonukleinsäure (DNS) [2] und zirkulieren mit einer Zahl von etwa 150 bis $450 \times 10^9/\text{l}$ für sieben bis zehn Tage im Blutkreislauf, bevor sie in der Leber und Milz abgebaut werden [3], [4]. Thrombozyten sind von einer sogenannten Glykokalyx umgeben, die aus verschiedenen Glykoproteinen, Proteinen und Mukopolysacchariden aufgebaut ist [5]. Die darunterliegende Zytoplasmamembran besteht aus einer polarisierten Phospholipiddoppelschicht, in die Membranproteine eingebettet sind, und kann bei Aktivierung der Thrombozyten durch Ausstülpung

des sogenannten offenen kanalikulären Systems ihre Oberfläche vergrößern (Pseudopodien). So können sich die Thrombozyten über das verletzte Endothel des Blutgefäßes ausbreiten. Das dichte tubuläre System dient als Hauptspeicherort für Ca^{2+} -Ionen, die essenziell für die Regulation und Aktivierung der Thrombozyten sind [6]. Die submembranös angeordneten Mikrotubuli sowie die Strukturproteine Aktin und Myosin sorgen als Zytoskelett für die diskoide Form der ruhenden Thrombozyten und spielen eine wichtige Rolle bei der Formveränderung der aktivierten Thrombozyten. Die Neuordnung dieser Filamente bewirkt die Sekretion der im Zytoplasma enthaltenen α - und δ -Granula sowie Lysosomen, die als Speicherorte für z. B. Adhäsionsmoleküle, Membranproteine, Chemokine, Gerinnungsfaktoren, Adenosindiphosphat/Adenosintriphosphat (ADP/ATP) und hydrolysierende Enzyme dienen und die Präsentation von Adhäsionsmolekülen auf der Thrombozytenoberfläche bewirken. Außerdem ordnen sich die negativ geladenen Phospholipide auf der Oberfläche mittels eines „Flip-Flop“-Mechanismus an und stellen so eine prokoagulatorische Thrombozytenoberfläche zur Verfügung, an die die Gerinnungsfaktoren binden, so dass die Thrombingenerierung und sekundäre Hämostase wirkungsvoll stattfinden kann.

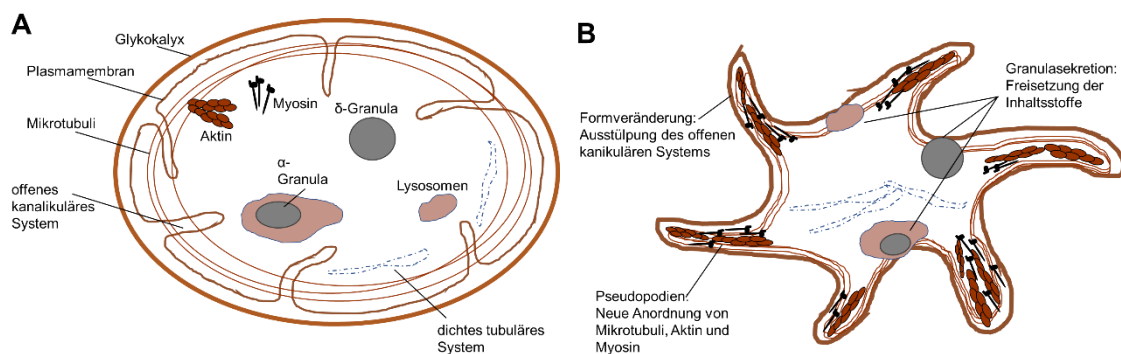


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Thrombozyten-Ultrastruktur.

A: ruhender Thrombozyt, B: aktivierter Thrombozyt. Modifiziert aus: [5].

1.1.2. Rolle der Thrombozyten in der primären Hämostase

Die innere Zellwand der Blutgefäße wird von Endothelzellen ausgekleidet. Ist das Endothel intakt und unverletzt, bietet es Thrombozyten keine Möglichkeit zur Adhäsion. Wird das Endothel jedoch mechanisch beschädigt oder durch inflammatorische Reize oder Pathogene aktiviert, kommt es zum Kontakt des Blutes mit vom

freigelegten Subendothel oder von aktivierten Endothelzellen präsentierten Adhäsionsproteinen. Je nach Flussbedingung und Präsentation der Oberflächenproteine, sind verschiedene Thrombozytenrezeptoren an der Adhäsion der Thrombozyten an Seiten der Endothelverletzung beteiligt.

Unter hohem Scherstress vermittelt der von Willebrand Faktor (vWF) die Adhäsion der Thrombozyten an das Subendothel [7]. Er wird als Multimer in unterschiedlich großen Fragmenten (500 bis 20 000 kDa) konstitutiv von Endothelzellen und Thrombozyten in das Plasma sezerniert und kann an das freiliegende Kollagen binden (immobilisierter vWF) [8]. Der hohe Scherstress führt dabei zu einer Konformationsänderung des vWFs und der daraus resultierenden Exposition von mehreren Bindungsstellen für das Glykoprotein Ib α (GPIb α) [9], das zusammen mit den Glykoproteinen IX und V sowie Ib β den sogenannten GPIb-IX-V-Komplex auf Thrombozyten bildet [10]. Wie essenziell die Rolle von GPIb α in der Hämostase ist, wird im Hinblick auf die Blutungsneigung von Bernard-Soulier-Syndrom (BSS) Betroffenen deutlich: Aufgrund einer stark reduzierten Expression (< 1 %) und/oder nicht funktionsfähigem GPIb α , verursacht durch verschiedene Mutationen im GPIb α -kodierenden Gen *GP1BA*, leiden diese unter Einblutungen in die Haut und/oder vermehrtem Auftreten von Hämatomen. Weiterhin wurden diverse Mutationen in den GPIb β - und GPIX-kodierenden Genen *GP1BB* und *GP9* entdeckt, die ebenso zu einer reduzierten Expression der jeweiligen Untereinheiten des GPIb-IX-V-Komplexes führen und/oder dessen Funktionsfähigkeit einschränken [11], [12]. GPIb α dient weiterhin als Rezeptor für die Gerinnungsfaktoren Thrombin (FIIa), XI (FIX) und XII (FXII), das Adhäsionsmolekül P-Selektin (präsent auf Endothelzellen und Thrombozyten) und das Integrin $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18 oder auch Mac-1, präsent auf Monozyten und Makrophagen) [11]. Die erste, noch instabile Bindung von GPIb α an vWF lässt die ruhenden Thrombozyten langsamer über die subendotheliale Oberfläche rollen und begünstigt nach wiederholtem Kontakt mit vWF die Stabilisierung der Bindung an Kollagen durch das von den Thrombozyten exprimierte Integrin $\alpha_2\beta_1$ und Glykoprotein VI (GPVI) [13], [14]. Alternativ zu vWF kann unter hohem Scherstress auch Thrombospondin-1 (TSP-1) an Kollagen und an den GPIb-IX-V-Komplex binden und so die Thrombozytenadhäsion und -aktivierung vermitteln [15].

Bei niedrigem Scherstress vermitteln GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ die Adhäsion von Thrombozyten direkt an das Kollagen, wobei GPVI hierbei die essenzielle und

Integrin $\alpha_2\beta_1$ eine unterstützende Funktion einnimmt [16], [17], [18], [19]. GPVI wurde außerdem als Fibrinrezeptor identifiziert: Die Bindung von polymerisiertem Fibrin an GPVI verstärkt die prokoagulatorische Aktivität und Thrombinbildung der Thrombozyten und kann weitere Thrombozyten zum Ort des Geschehens rekrutieren [20], [21].

Sind Thrombozyten am beschädigten Endothel adhärert, führt die Signalübertragung vom Äußeren ins Innere der Zelle („outside-in-signaling“) zu einer weiteren Aktivierung der Thrombozyten, die die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen mit sich führt. Der Anstieg der Ca^{2+} -Ionen-Konzentration ist essenziell für die Thrombozytenaktivierung: Sobald eine bestimmte Ca^{2+} -Ionen-Konzentration erreicht ist, kommt es zu einem „inside-out-signaling“ (aus dem Inneren zum Äußeren der Zelle) und das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ wird aktiviert [22], [23]. Dieses ermöglicht nun die Aggregation der Thrombozyten: Nur in aktiviertem Zustand kann $\alpha_{IIb}\beta_3$ lösliches Fibrinogen aus der Blutzirkulation binden. Die so entstehenden Fibrinogenbrücken aggregieren die Thrombozyten und ein sogenannter erster, noch instabiler Thrombus bildet sich. Unter hohen Flussbedingungen kann auch vWF die Aggregation vermitteln. Er bindet dabei über seine A1-Domäne zunächst an GPIIb α und aktiviert so den $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Komplex, der wiederum vWF an seiner C4-Domäne binden kann [8], [9], [24]. So entstehen auf den Verletzungsort lokalisierte vWF-vermittelte Thrombozytenaggregate. Bindet $\alpha_{IIb}\beta_3$ einen seiner Liganden, vWF, Fibrinogen oder Fibrin, wird ein erneutes „outside-in- signaling“ stimuliert, in das die Aktivierung der Tyrosinkinase Syk involviert ist [25], [26], [27] und für die Formveränderung und Degranulation der Thrombozyten sorgt. Die Aktivierung der Tyrosinkinase Syk spielt eine wichtige Rolle bei der GPVI- sowie GPIIb α -vermittelten Thrombozytenaktivierung [28], [29].

Im Zuge der Formveränderung werden die Strukturproteine Mikrotubuli, Aktin und Myosin, bzw. Aktomyosin neu angeordnet, um eine flexible und vergrößerte Oberfläche zu erreichen, indem die Plasmamembran Pseudopodien ausbildet. Dabei wird auch die Zahl der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptoren auf der Oberfläche erhöht [30], [31]. Weiterhin gelangen die Speicherorganellen durch die Formveränderung ins Zellinnere und verschmelzen mit dem offenen kanalikulären System oder durch Exozytose direkt mit der Plasmamembran und geben so ihre Inhaltsstoffe frei, die autokrin wirken oder die Aktivierung weiterer Thrombozyten verstärken [32]. Auch

dieser Prozess ist von der Ca^{2+} -Ionen-Konzentration abhängig. Aus den δ -Granula und Lysosomen werden unter anderem ADP, Serotonin sowie Ca^{2+} -Ionen sezerniert und der „cluster of differentiation“ 63 (CD63) durch Exozytose auf der Zelloberfläche präsentiert, welcher daher als Marker für die Thrombozytenaktivität herangezogen werden kann. ADP induziert z. B. die Freisetzung intrazellulärer Ca^{2+} -Ionen, die wiederum über den thrombozytären ADP-Rezeptor P2Y_{12} zur Aktivierung von $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ auf Thrombozyten sowie Formveränderungen und Aktivierung verschiedener Moleküle führt. Die α -Granula sezernieren unter anderem Gerinnungsfaktoren, wie z. B. Prothrombin, V, VII, XI und XIII, sowie z. B. die Adhäsionsmoleküle vWF und TSP-1 [33], [34], [35]. TSP-1 kann über die Rezeptoren „cluster of differentiation“ 36 (CD36), 47 (CD47) und Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ sowie indirekt über Kollagen, Fibrinogen oder vWF an die Thrombozyten rückbinden [36], [37] und dient damit als Marker der Thrombozytenaktivierung.

Wie wichtig die Granulasekretion für die funktionierende Blutgerinnung ist, macht die Sammel-speicher-Erkrankung, gebräuchlich ist die englische Bezeichnung „storage pool disease“, deutlich. Sie bezeichnet den Mangel oder die komplette Defizienz der α -Granula (engl.: „ α -storage pool disease“) bzw. der δ -Granula (engl.: „ δ -storage pool disease“). Die Thrombozyten betroffener Personen zeigen eine Adhäsions- („ α -storage pool disease“) bzw. Aggregationsstörung („ δ -storage pool disease“) [38], [39], [40], die zu milden bis moderaten Blutungen führt. Aufgrund der Verschmelzung der Granula mit der Plasmamembran werden vermehrt P-Selektin und „cluster of differentiation“ 40-Ligand (CD40L) auf der Thrombozytenoberfläche präsentiert, wobei P-Selektin neben CD63, $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, Fibrinogen und TSP-1 als Marker für die Analyse der Thrombozytenaktivierung herangezogen werden kann. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der primären Hämostase.

Weiterhin vermittelt P-Selektin die Bindung der Thrombozyten an aktivierte Leukozyten, die den P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) auf ihrer Oberfläche exprimieren, während thrombozytäres CD40L an den monozytären „cluster of differentiation“ 40 (CD40) bindet [41], [42], [43]. Zusätzlich werden auf der Thrombozytenoberfläche vermehrt negativ geladene Phospholipide (hauptsächlich Phosphatidylserine, PS) präsentiert und es entsteht die sogenannte prokoagulatorische Oberfläche, an die die Gerinnungsfaktoren binden können. Die

Thrombozytenaktivierung mit ihrer prokoagulatorischen Oberfläche ist eine wichtige Voraussetzung für den Ablauf der sekundären Hämostase [1], [44].

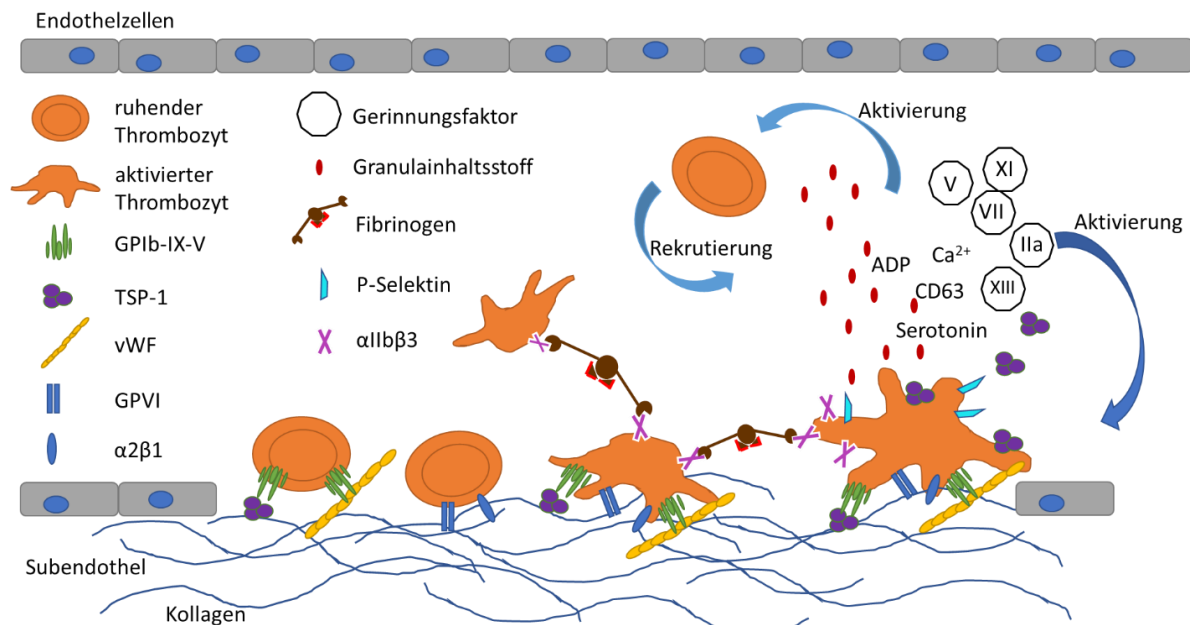


Abbildung 2: Schematische Darstellung der primären Hämostase.

Thrombozyten rollen über das Subendothel und adhären an das freigelegte Kollagen. Die Bindung aktiviert die Thrombozyten und es kommt zur Aggregation mit weiteren Thrombozyten und Sekretion der Granulainhaltsstoffe. Modifiziert aus: [1].

1.1.3. Rolle der Thrombozyten in der sekundären Hämostase

Die sekundäre Hämostase ist essenziell, um das in der primären Hämostase gebildete, noch instabile Thrombozyten-Aggregat zu stabilisieren: Das durch Anlagerung von Gerinnungsfaktoren auf der prokoagulatorischen Thrombozytenoberfläche vermehrt gebildete Thrombin spaltet Fibrinogen zu Fibrin, welches durch den aktivierten Gerinnungsfaktor XIII (Fibrin-stabilisierender Faktor, FXIIIa) kovalent verknüpft wird. Die sekundäre Hämostase lässt sich in drei Phasen aufteilen: Die Initiation, die Amplifikation und die Propagation.

1.1.3.1. Initiation

Die sekundäre Hämostase resultiert aus dem Kontakt von Blut mit Gewebefaktor-tragenden Zellen. Gewebefaktor (engl.: „Tissue Factor“, TF) wird, ähnlich wie Kollagen, nach einer Schädigung oder Aktivierung des Endothels präsentiert. Es ist jedoch bekannt, dass auch Monozyten TF sezernieren und auf ihrer Zelloberfläche

exprimieren können [45], [46]. Dies ist der Fall, wenn entzündliche Prozesse im Gewebe oder den Gefäßen stattfinden. Bindet der im Blut zirkulierende Gerinnungsfaktor VII (FVII) an den TF, wird FVII durch proteolytische Spaltung zu Gerinnungsfaktor VIIa (FVIIa) aktiviert und der TF-FVIIa-Komplex entsteht [47]. Dieser TF-FVIIa-Komplex bewirkt primär die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren X (FX) zu Gerinnungsfaktor Xa (FXa) und IX (FIX) zu Gerinnungsfaktor IXa (FIXa) zur Bildung des finalen Tenase-Komplexes. Während FIXa nun von der Oberfläche der TF-tragenden Zelle auf die Thrombozytenoberfläche diffundieren kann, wird FXa vom „tissue factor pathway inhibitor“ (TFPI) oder Antithrombin inhibiert, sobald er nicht mehr auf der Zelloberfläche lokalisiert und stabilisiert ist. Auf dieser ist FXa jedoch zusammen mit seinem Kofaktor V (FV) bzw. durch Thrombin aktivierten Kofaktor V (FVa) und Ca^{2+} -Ionen (Prothrombinase-Komplex) in der Lage, geringe Mengen Thrombin (Gerinnungsfaktor IIa, FIIa) aus Prothombin (Gerinnungsfaktor II, FII) zu bilden. Diese geringen Mengen Thrombin sind ausreichend, um weitere Thrombozyten, Gerinnungs(ko)faktoren und weitere in die Blutgerinnung involvierte Proteine in der Umgebung zu aktivieren [48]. Außerdem kann der TF-FVIIa-Komplex zusammen mit FXa die Kofaktoren V und VIII direkt aktivieren, bevor FXa durch TFPI inhibiert wird [49]. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der Initiationsphase der sekundären Hämostase.

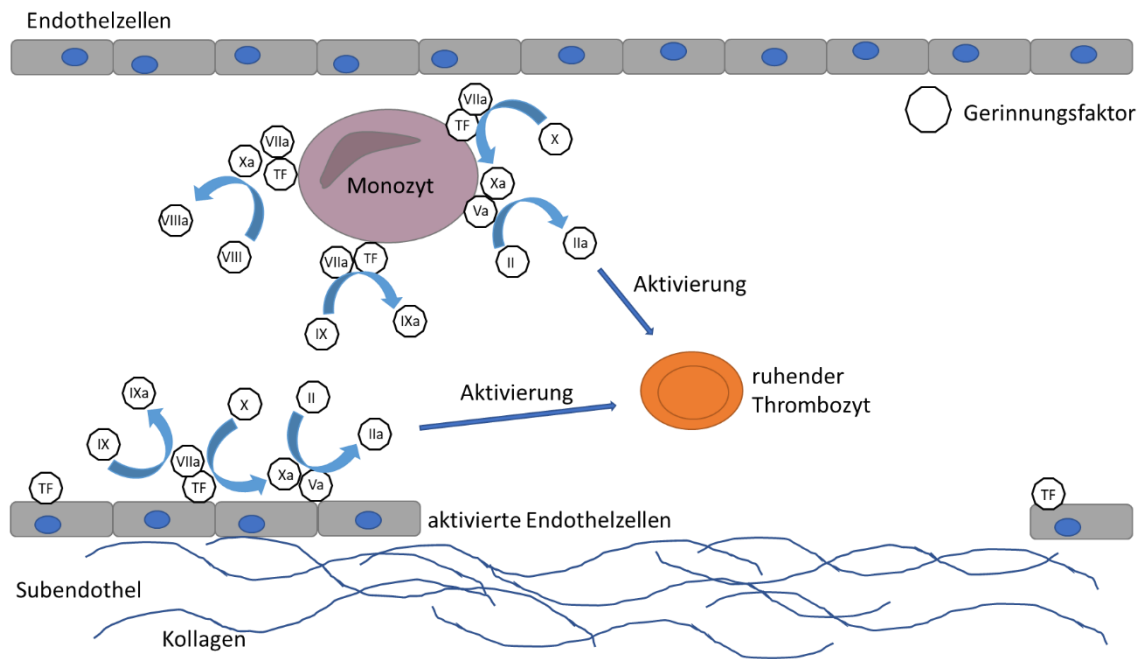


Abbildung 3: Schematische Darstellung der zellbasierten Initiation der sekundären Hämostase.

TF bildet mit FVIIa oder FVIIa und FXa einen Komplex und aktiviert weitere Gerinnungsfaktoren: FVIII zu FVIIIa, FX zu FXa und FIX zu FIXa. Der Prothrombinase-Komplex (FXa, FVa und Ca^{2+} -Ionen) generiert durch Aktivierung von Prothrombin (FII) geringe Mengen Thrombin (FIIa). Modifiziert aus: [44], [49].

1.1.3.2. Amplifikation und Propagation

In der Amplifikationsphase wird die Thrombinbildung verstärkt. Dies geschieht zum einen durch die Aktivierung weiterer Thrombozyten durch die in der Initiationsphase gebildeten geringen Mengen Thrombin. Zum anderen werden durch das Thrombin bzw. den TF-FVIIa-Xa-Komplex die Kofaktoren V und VIII (FVIII) zu Va und FVIIIa (FVIIIa) aktiviert. Ebenso wird FXI zu Gerinnungsfaktor XIa (FXIa) aktiviert [50], [51].

In der Propagationsphase wird dann eine Kettenreaktion in Gang gesetzt. Durch FXIa aktivierter FIX bindet an FVIIIa und bildet so den Tenase-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche. Der Tenase-Komplex aktiviert im Blut zirkulierenden, inaktiven FX zu FXa, der wiederum mit dem aktivierten Kofaktor V (Prothrombinase-Komplex) große Mengen an Prothrombin zu Thrombin umsetzt [52], [53], [54]. Wie wichtig der Tenase-Komplex für die Propagation von Thrombin auf der Thrombozytenoberfläche ist, zeigt sich in den Erkrankungen Hämophilie A und B, bei denen die Betroffenen aufgrund eines FVIII-Mangels (Hämophilie A) bzw. FIX-Mangels (Hämophilie B) unter starken und länger andauernden Blutungen leiden [55]. Auch

die sich selbst verstärkende FXI-Schleife (engl.: FXI-„Feedback-Loop“) ist für eine zeitnahe und effektive Thrombinbildung von essenzieller Bedeutung. Patienten mit einer Faktor XI-Defizienz (Hämophilie C) zeigen eine geringe Inzidenz für ischämischen Schlaganfall und tiefe Beinvenenthrombosen [56], [57], während bei Patienten mit ischämischem Schlaganfall hohe Thrombinkonzentrationen im peripheren Blut gemessen werden konnten, die mit hoher Thrombozytenaktivität einhergehen [58], [59]. Die Blutungsneigungen von Hämophilie C Betroffenen variieren und korrelieren nicht zwingend mit der FXI-Konzentration, was eine sorgfältige Planung von operativen Eingriffen erfordert. Häufig treten Blutungen in der Mundhöhle, im Rachen oder im Urogenitaltrakt nach eben diesen auf [60], [61], [62]. Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung der Amplifikations- und Propagationsphase der sekundären Hämostase.

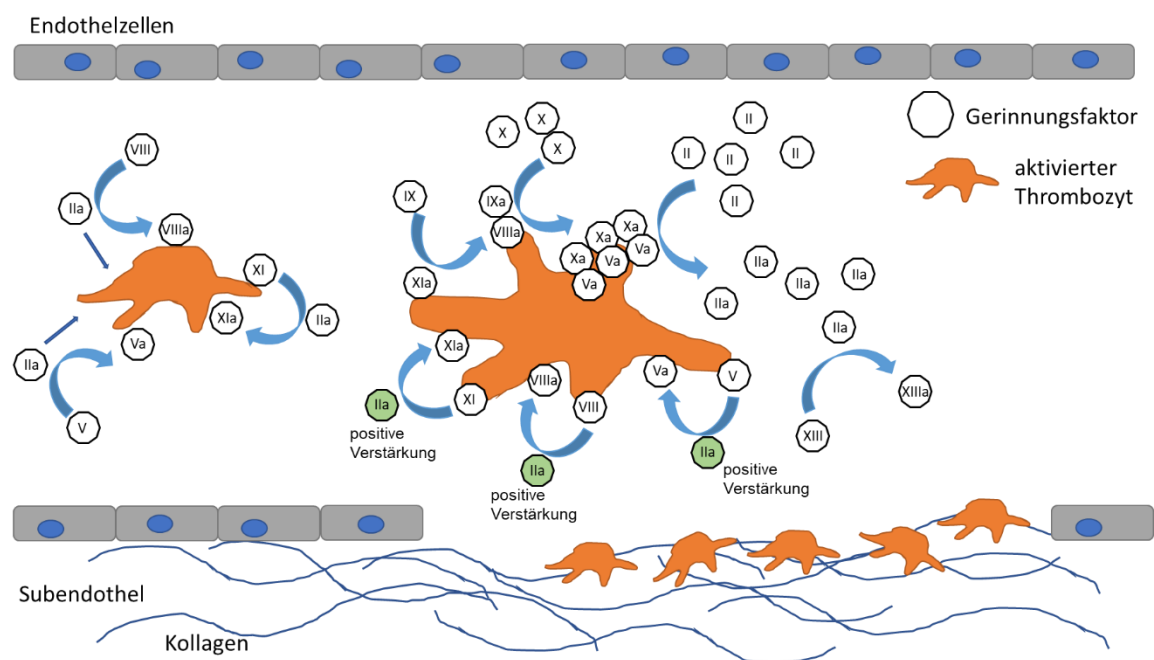


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Thrombozyten-vermittelten Amplifikation und Propagation von Thrombin in der sekundären Hämostase.

Das während der Initiation gebildete Thrombin (FIIa) aktiviert (weitere) Thrombozyten sowie die Gerinnungsfaktoren V, VIII und XI. Durch FXIa aktivierter FIX (FIXa) bildet mit FVIIIa den Tenase-Komplex, der wiederum FX aktiviert (FXa). Der Prothrombinase-Komplex (FXa und FVa) kann nun große Mengen Prothrombin (FII) zu Thrombin umsetzen. Modifiziert aus: [44].

Auf diese Weise werden mit Hilfe der sogenannten Feedback-Loops in kürzester Zeit große Mengen Thrombin gebildet, die neben der Aktivierung weiterer Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren auch die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin bewirken. Thrombin spaltet dabei die Fibrinopeptide A und B von Fibrinogen ab und

die entstehenden Fibrinmonomere polymerisieren zu Fibrinnetzen, in denen die Thrombozyten über ihre Rezeptoren adhärieren. Der Gerinnungsfaktor XIII (FXIII), eine Transglutaminase, die durch Thrombin zu Gerinnungsfaktor XIIIa aktiviert wird, katalysiert die Bildung einer Isopeptidbindung zwischen den Fibrinpolymeren durch den Transfer einer Alkylgruppe und stabilisiert so die Fibrinnetze [63]. Am Ende der sekundären Hämostase entsteht so ein stabiler Wundverschluss (Thrombus). Abschließend setzt die Wundheilung ein, auf die hier jedoch nicht im Detail eingegangen werden soll. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung der Fibrinogenspaltung durch Thrombin sowie die Fibrinpolymerisierung und Kreuzvernetzung durch FXIIIa.

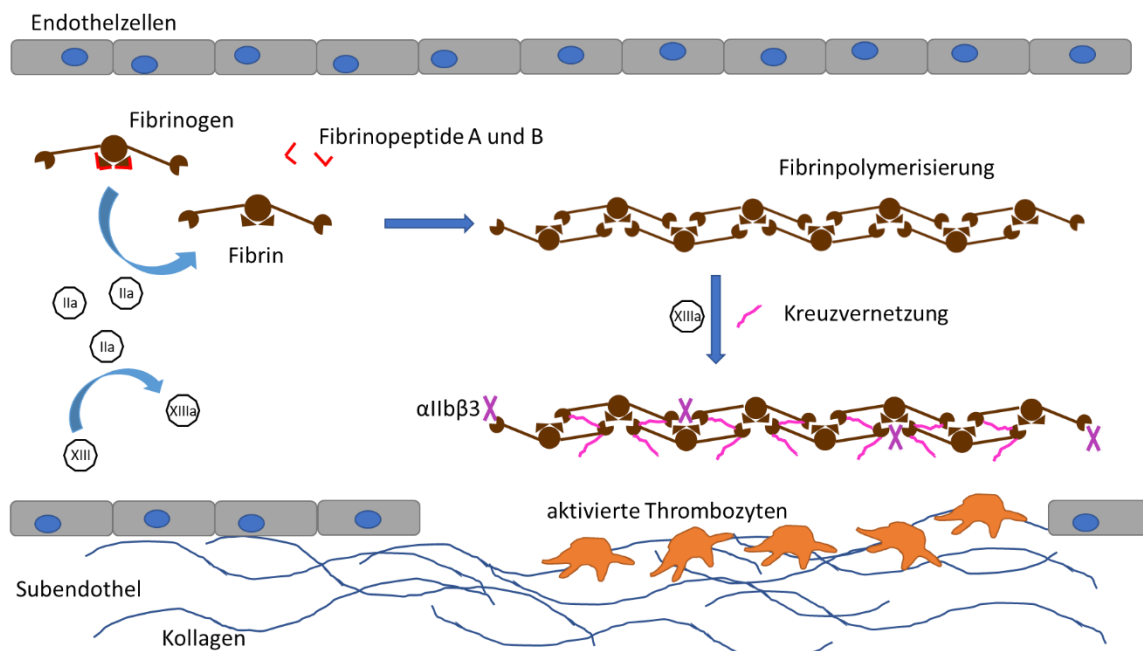


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Fibrinogenspaltung durch Thrombin und Fibrinpolymerisierung und Kreuzvernetzung durch Gerinnungsfaktor XIIIa.

Thrombin spaltet die Fibrinopeptide A und B von Fibrinogen ab, es entstehen Fibrinmonomere, die polymerisieren. Durch FXIIIa werden die Fibrinpolymere untereinander kovalent kreuzvernetzt und das Fibrinnetz so stabilisiert. Modifiziert aus: [64] und [65].

1.2. Thrombin und seine pleiotrope Rolle im hämostatischen und zellulären System

Die Serinprotease Thrombin stellt das Schlüsselenzym der Hämostase dar und entsteht durch proteolytische Spaltung von Prothrombin durch den Prothrombinase-Komplex [52], [53], [54]. In Abhängigkeit von Vitamin K wird Thrombin ebenso wie

Prothrombin und die Gerinnungsfaktoren VII, IX und X sowie Protein C, Protein S und Protein Z, in der Leber modifiziert und als inaktiver Faktor in die Blutzirkulation sezerniert [66]. Dabei wandelt die γ -Glutamylcarboxylase spezifische Glutamylreste der Vitamin K-abhängigen Proteine in γ -Carboxyglutaminsäurereste um [67].

In der Hämostase sorgt Thrombin für die Aktivierung der Thrombozyten. Primär geschieht dies über die Protease-aktivierten Thrombin-Rezeptoren 1 bis 4 (PAR-1 bis PAR-4), die auch von Endothelzellen, glatten Muskelzellen, T-Lymphozyten und Monozyten exprimiert werden [68]. PAR-1 und PAR-4 spielen hierbei eine wichtige Rolle, während PAR-2 nicht direkt durch Thrombin aktiviert wird und PAR-3 möglicherweise als Kofaktor für PAR-4 fungiert [68], [69], [70]. Die PAR gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren [71]. Diese G-Proteine bestehen aus den Untereinheiten α , β und γ [72], von denen die $G\alpha$ -Untereinheit weiter in vier funktionelle Familien eingeteilt wird: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12/13}$ [73].

Die Aktivierung der PAR durch Thrombinstimulation führt abhängig von der Thrombinkonzentration, Dauer der Aktivierung, Lokalisation der PAR, Anwesenheit von Korezeptoren und Bildung von PAR-Heterodimeren, zur Phosphorylierung der $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ und/oder $G\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten, die daraufhin vom $G\beta\gamma$ -Dimer dissoziieren [68], [74]. Die Aktivierung von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12/13}$ resultiert schließlich in der Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen, Granulasekretion, Formveränderung der Thrombozyten sowie einer reversiblen Aggregation der Thrombozyten nach Stimulation über PAR-1 (hohe Affinität für Thrombin) bzw. einer irreversiblen Aggregation nach Stimulation über PAR-4 (niedrige Affinität für Thrombin), während die Aktivierung von $G\alpha_i$ die Bildung des inhibitorisch wirkenden zyklischen Adenosinmonophosphats (engl.: „cyclic adenosinemonophosphate“, cAMP) unterdrückt [74], [70]. Durch die Granulasekretion wird u.a. ADP freigesetzt, das an den $P2Y_{12}$ -Rezeptor rückbinden und so die Thrombozytenaktivierung verstärken kann [74].

Es wird diskutiert, ob die Thrombozytenaktivierung bei niedrigen Thrombin-Konzentrationen PAR-unabhängig über den $GPIIb\alpha$ -Rezeptor ausgelöst werden kann [75], [76] oder ob $GPIIb\alpha$ lediglich als passiver Bindungspartner von Thrombin bei der Aktivierung der PAR unterstützt [77]. $GPIIb\alpha$ ist eine Untereinheit des thrombozytären $GPIIb-IX-V$ -Komplexes, der sich aus je zwei Untereinheiten $GPIIb$ und $GPIX$ sowie einer Untereinheit GPV zusammensetzt, wobei $GPIIb$ stark mit

GP1X verknüpft ist [78] und die Untereinheiten GPIb α und GPIb β über eine Disulfidbrücke verbunden sind [79]. Die N-terminale Domäne von GPIb α enthält Bindungsstellen für Liganden wie z. B. Thrombin, FXII, FXI, vWF, P-Selektin, β_2 -Integrine sowie TSP-1 [80], [81]. Estevez et al. beschrieben dagegen eine Kooperation zwischen der GPIb α - und PAR-initiierten Zellsignalübertragung, die zur optimalen Aktivierung der Thrombozyten führt, ausgelöst durch niedrige Konzentrationen Thrombin, wie sie bei der Entstehung von Thrombosen *in vivo* vorkommen [82].

Aktivierte Thrombozyten initiieren die Hämostase, im Zuge derer die Thrombozyten ihre Granulainhaltsstoffe sezernieren, Adhäsionsmoleküle wie z. B. P-Selektin, TSP-1, GPVI, Integrin $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf ihrer Oberfläche präsentieren und eine Formveränderung durchlaufen. Dabei werden die Thrombozyten stärker aktiviert und eine prokoagulatorische Oberfläche gebildet. Die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren V, VIII, XI und XIII durch Thrombin führt zu deren Bindung an die Thrombozytenoberfläche, z. B. FVIIIa an immobilisiertes, lösliches Fibrin [83], FXIIIa an aktiviertes Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ [84], FXIa an GPIb [85] oder FVa an Phosphatidylserine [86], und trägt maßgeblich zur Thrombinamplifikation- und propagation bei. Das gebildete Thrombin spaltet Fibrinogen zu Fibrin, welches durch Faktor XIIIa quervernetzt wird [63], [87], [88]. Außerdem kann Thrombin antikoagulatorisch wirken und aktiviert Protein C zu aktiviertem Protein, das mit seinem Kofaktor Protein S einen Komplex bildet, der im Blut zirkulierenden FVa und FVIIIa durch proteolytische Spaltung inaktiviert [89]. Protein Z fördert die Bindung von Thrombin an die prokoagulatorische Oberfläche und hemmt unter Beteiligung eines Protease-Inhibitors die Aktivität von Faktor Xa [90]. Weiterhin wird Thrombin von dem im Blut zirkulierenden Antithrombin inhibiert und dieser Prozess durch Heparin beschleunigt [91], [92]. So wird verhindert, dass es zu einer überhöhten Thrombinbildung und damit Thrombusbildung kommt.

Auch in der Atherogenese spielt Thrombin eine wichtige Rolle. Es stimuliert die Expression der endothelialen interzellulären und vaskulären Adhäsionsmoleküle 1 (engl.: „intercellular adhesion molecule-1“, ICAM-1, „vascular cell adhesion molecule-1“, VCAM-1) [93] sowie E-Selektin und die Sekretion von Interleukin-1 (IL-1) und -8 (IL-8) [94]. Weiterhin können Monozyten in Abhängigkeit eines Thrombin-Gradienten migrieren [95] und durch den auf der Monozytenoberfläche exprimierten

TF die Bildung von Thrombin auf Thrombozyten verstärken, was wiederum zur verstärkten Rekrutierung von Monozyten und Thrombozyten sowie der Aktivierung von Endothelzellen führt. Die Interaktionen zwischen Monozyten, Thrombozyten und Endothelzellen tragen zur Entstehung der Arteriosklerose bei und werden in Kapitel 1.6. ausführlicher beschrieben.

Die Thrombingenerierung kann durch sogenannte direkte FXa-Inhibitoren wie z. B. Rivaroxaban, Edoxaban oder Apixaban vermindert werden. Die COMPASS-Studie zeigte, dass die Kombination aus Rivaroxaban und Acetylsalicylsäure (ASS) das Risiko von kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit stabiler koronarer oder peripherer Gefäßerkrankung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit ASS signifikant reduziert [96]. Ergänzend zeigte die VOYAGER-PAD-Studie, dass diese Kombination auch nach Revaskularisierung vor atherothrombotischen Ereignissen schützt [97]. Die Thrombinaktivität hingegen wird durch direkte FIIa-Inhibitoren wie z. B. Hirudin, Argatroban und Dabigatran gehemmt. Dabigatran muss dabei, im Gegensatz zu Hirudin und Argatroban, nicht injiziert werden, sondern kann oral eingenommen werden [98]. Auch Rivaroxaban, Edoxaban und Apixaban können oral verabreicht werden. Diese Inhibitoren gehören somit zu den direkten oralen Antikoagulanzen (DOAK, neu: Nicht Vitamin K-antagonistische orale Antikoagulanzen, NOAK) und haben einen anderen Wirkmechanismus als die bisher bekannten klassischen indirekten Antikoagulanzen (Vitamin K-Antagonisten und Heparin). Vitamin K-Antagonisten (Cumarine) hemmen die Vitamin K-Oxidoreduktase, was zu einer Synthese von nicht voll funktionsfähigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X in der Leber führt [99], während Heparin an Antithrombin bindet und dessen inhibitorische Wirkung auf Thrombin beschleunigt [91], [92]. Dabigatran ist erst nach der Verstoffwechselung in der Leber aktiv und bindet dann kompetitiv und reversibel an freies oder Fibrin-gebundenes Thrombin. Seit 2011 ist es zur Prophylaxe von Schlaganfällen, systemischen Embolien und nicht-valvulärem Vorhofflimmern zugelassen [100], [101], [102] und ist bisher der einzige orale FIIa-Inhibitor, für den ein spezifisches Antidot existiert [103].

Die Thrombingenerierung und Thrombinaktivität repräsentieren also potente „(Wirkstoff-)Ziele“ (engl.: „Targets“) bei der medikamentösen Behandlung von Erkrankungen, die durch die Beteiligung von aktivierten Thrombozyten entstehen können.

1.3. „Cluster of differentiation“ 36

Der „cluster of differentiation“ 36 oder auch GPIV besitzt ein Molekulargewicht von etwa 88 kDa und gehört zur Familie der Klasse B „scavenger“ Rezeptoren [104]. Er wird von einer Vielzahl von Zellen wie z. B. Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten und mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert und fungiert als Zelladhäsionsmolekül und Signalüberträger [105]. CD36 ist ein transmembranes Einzelpeptid, das durch das auf dem Chromosom 7 befindliche Gen *Cd36* kodiert wird, und besteht aus 15 Exons.

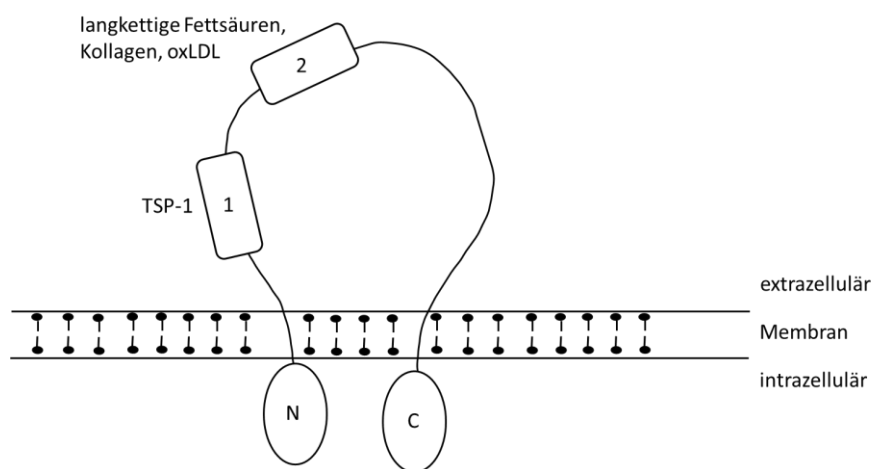


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der funktionellen Domänen des CD36-Rezeptors.

N: N-terminales Ende, 1: Interaktion mit TSP-1 an Aminosäuren 87-99, 2: Interaktion mit Kollagen und Aufnahme apoptotischer Zellen sowie oxLDL an Aminosäuren 155-183, Interaktion mit langkettigen Fettsäuren an Aminosäuren 127-279, C: C-terminales Ende. Modifiziert aus: [106].

CD36 fungiert als sogenannter „pattern recognition“-Rezeptor für Moleküle mit „damage associated molecular patterns“ (DAMPs), wie oxidiertes Lipoprotein niedriger Dichte („oxidized low density lipoprotein“, oxLDL) [107], [108], Phospholipide [109], Mikropartikel und das „myeloid“-verwandte Protein 14 (engl.: „myeloid related protein“, MRP-14) [110]. Außerdem ist das „response to injury“ Protein Thrombospondin-1 [111] ein prominenter Ligand von CD36.

Auf Thrombozyten wird CD36 mit einer Zahl von 10 000 bis 25 000 Kopien konstitutiv auf der Oberfläche exprimiert und ist zusätzlich in der α -Granula-Membran enthalten [112], [113]. Fehlt CD36, wird dies als CD36-Defizienz bezeichnet und in zwei Gruppen unterteilt: Während bei der seltener auftretenden Typ I-

Defizienz (2 von 354 Spender:innen japanischer Herkunft) weder Thrombozyten noch Monozyten CD36 exprimieren, kann bei der Typ II-Defizienz (14 von 354 Spender:innen japanischer Herkunft) die Expression von CD36 auf den Monozyten nachgewiesen werden [114]. Von einer CD36-Defizienz Betroffene zeigen keinen auffälligen Blutungsphänotyp wie spontane oder andauernde Blutungen. Es konnte jedoch für die Typ I-Defizienz gezeigt werden, dass humane Thrombozytentransfusionen fehlschlagen und CD36-Alloantikörper gebildet wurden, wenn eine CD36-positive Blutkonserve gegeben oder ein CD36-positives Kind geboren wurde [115]. Weiterhin wurden in CD36-Defizienz Typ I Betroffenen, im Vergleich zu gesunden Probanden, erhöhte Level von Cholesterin und Lipoprotein niedriger Dichte (engl.: „low density lipoprotein“, LDL) nachgewiesen [116], [117]. CD36-defiziente Makrophagen binden und nehmen oxLDL signifikant weniger auf [118]. Während CD36 bei der Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen eine große Rolle bei der Schaumzellentwicklung spielt, führt die Bindung von thrombozytärem CD36 an oxLDL zu einem hyperreaktiven Phänotyp der Thrombozyten [119], [120] der mit prothrombotischen und proatherogenischen Effekten in Mäusen assoziiert ist [121], [122].

Ursprünglich als Kollagen-Rezeptor beschrieben [123], wird CD36 in aktuelleren Forschungsarbeiten eine maßgebliche Beteiligung bei der Bindung von löslichem TSP-1 an Thrombozyten zugeschrieben, die die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation fördert [124]. Die Bindung von TSP-1 an Thrombozyten über CD36 verstärkt die Kollagen-abhängige Thrombusbildung und -stabilisierung *in vitro* und *in vivo* [37]. Eine entsprechende Ligandenbindung an CD36 kann also zu einem prothrombotischen Thrombozytenphänotyp unter inflammatorischen Bedingungen beitragen. CD36 ist somit ein interessanter Rezeptor, der ein potenzielles „Target“ zur Behandlung von thrombotisch-inflammatorischen Erkrankungen wie der Atherosklerose darstellt. Die genauen Mechanismen, wie CD36 die Thrombin-induzierte Thrombinamplifikation oder Atherogenese beeinflusst, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

1.4. Thrombospondin-1

Thrombospondin-1 wurde erstmals aus Thrombin-aktivierten Thrombozyten isoliert und daher zunächst als „Thrombin-sensitives Protein“ bezeichnet. Später wurde nachgewiesen, dass TSP-1 auch von aktivierten Endothelzellen und Monozyten sowie glatten Muskelzellen primär während des Wachstums, der Entwicklung und als Antwort auf Verletzung („response to injury“) sezerniert wird [125], [126], [127]. Es gehört zur Familie der Thrombospondine, die aufgrund ihrer Involviertheit in verschiedene Prozesse als multifunktionale Proteine bezeichnet werden. So inhibiert TSP-1 z. B. die Angiogenese und blockiert die mikrovaskuläre Endothelzellproliferation, kann jedoch ebenso das Wachstum von glatten Muskelzellen stimulieren [128].

Thrombospondin-1 ist ein homotrimeres, glykolysiertes Protein mit einer Masse von 450 kDa und bindet durch seinen modularen Aufbau eine Vielzahl von Liganden [129]. Es weist Bindungsstellen für z. B. vWF (Typ 1-Wiederholungen), Prokollagen (PK, Typ 1- und 2-Wiederholungen), Fibrinogen/Fibrin (N-terminale Domäne und Typ 1-Wiederholungen), $\alpha_{IIb}\beta_3$ (RGD in den Typ 3-Wiederholungen) und CD47 (in der C-terminalen G-Domäne) sowie CD36 (PK und Typ 1-Wiederholungen) auf [36], [129], [130].

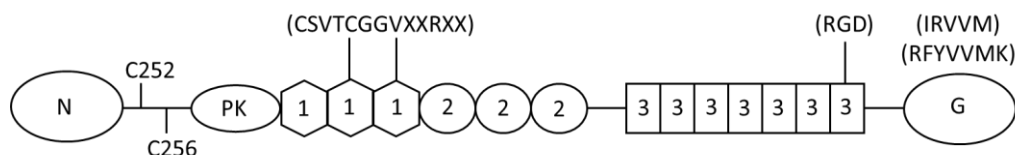


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der funktionellen Domänen eines TSP-1-Einzelstrangs.

N: N-terminale Domäne, C252 und C256: Disulfidbrücke zu je einem weiteren Einzelstrang, PK: Prokollagen-Homologie-Domäne, 1: Typ 1-Wiederholungen, 2: Typ 2-Wiederholungen, 3: Typ 3-Wiederholungen, G: C-terminale Domäne, CSVTCGGVXXRXX: involviert in Bindung von CD36, RGD: involviert in Bindung von Integrinen $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, IRVVM, RFYVVK: involviert in Bindung von CD47. Modifiziert aus: [129].

In den α -Granula von Thrombozyten ist TSP-1 mit etwa 101 000 Kopien pro Zelle eines der am meisten exprimierten Proteine [131]. Die seltene Blutgerinnungsstörung „Graue Thrombozyten-Syndrom“, gebräuchlich ist die englische Bezeichnung „gray-platelet-syndrome“, ist eine Sammel-speichererkrankung und

wird durch eine Mutation im *Neurobeachin-like 2-(NBEAL2-)*Gen ausgelöst [132], [133]. Sie bezeichnet das Fehlen der α -Granula bzw. die fehlerhafte Sekretion der Granulainhaltsstoffe [134]. Symptome sind Thrombozytopenie, Splenomegalie, Myelofibrose und eine milde bis moderate Blutungsneigung [135]. Welche der in den α -Granula enthaltenen Proteine für die Ausbildung der Symptome verantwortlich sind, ist bisher unklar. Die Gruppe um Kuijpers et al. stellte die Hypothese auf, dass TSP-1 zusammen mit CD36 die Thrombozyteninteraktionen innerhalb eines Thrombus fördert und konnte zeigen, dass TSP-1- ebenso wie CD36-defiziente Thrombozyten den *NBEAL2*-defizienten Thrombozyten ähneln: Alle Thrombozyten zeigten eine verminderte Adhäsion und PS-Präsentation sowie reduzierte Thrombusbildung bei gleichzeitiger reduzierter Thrombusstabilität [37], [38].

Thrombospondin-1 stimuliert die Thrombozytenaggregation [136] und stabilisiert diese $\alpha_{IIb}\beta_3$ -abhängigen Thrombozytenaggregate, indem es zusätzlich an Fibrinogen bindet [137], [138]. In Abhängigkeit von CD36 vermittelt TSP-1 die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen über den thrombozytären GPIIb-IX-V-Komplex unter hohem Scherstress und stimuliert außerdem eine CD36-abhängige Signalübertragung, die die Aggregation von Thrombozyten und deren Immobilisierung unter Flussbedingungen verstärkt [15], [124]. Weiterhin schützt TSP-1 am Endothel immobilisierten vWF vor dem Abbau durch die Metalloprotease „a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains“ (ADAMTS13) und erhöht so die Wahrscheinlichkeit der Thrombosebildung [139], gleichzeitig kann TSP-1 als Disulfidisomerase jedoch auch selbst die Größe der vWF-Multimere regulieren [140].

Von aktivierten Monozyten präsentiertes TSP-1 fördert die Adhäsion der Monozyten an das Endothel [141] und kann zur Thrombozytenaktivität und einem prothrombotischen Potenzial in inflammatorischen Erkrankungen wie Atherosklerose beitragen, indem es an ruhende Thrombozyten *in vitro* und in Patienten mit Carotis-Atherosklerose bindet [142].

Eine entsprechende Ligandenbindung an TSP-1 kann also zu einem prothrombotischen Thrombozytenphänotyp unter inflammatorischen Bedingungen beitragen und/oder die Rekrutierung von Monozyten an das Endothel fördern. TSP-1 stellt somit ein potenzielles „Target“ zur Behandlung von thrombotisch-inflammatorischen Erkrankungen wie der Atherosklerose dar. Die genauen

Mechanismen, wie TSP-1 die Atherogenese beeinflusst, bleiben jedoch zu erforschen.

1.5. Die Inflammation

Die Inflammation (Entzündung) ist eine Abwehrreaktion des Körpers auf interne oder externe Reize (z. B. Verletzungen, Fremdkörper, Wärme oder Kälte, Allergene oder Autoallergene und Krankheitserreger), die dem Zweck dient, den Reiz zu beenden und zu beseitigen und eine eventuell entstandene Schädigung zu beheben. Sie geht mit einer pathophysiologischen Veränderung des betroffenen Organs oder Lymphsystems und dem umliegenden Gewebe und den Blutgefäßen einher. Bereits vor mehr als 1900 Jahren beschrieb Celsus (Aulus Cornelius Celsus, * etwa 25 v. Chr., † etwa 50 n. Chr.) vier Symptome der Entzündung, die von Galenos (Galenos von Pergamon, * etwa 128-131, † etwa 199-216) um ein fünftes Symptom ergänzt wurden und bis heute gültig sind: Rötung, Schwellung, Schmerz, Überwärmung und eingeschränkte Funktion [143], [144]. Der auslösende Reiz verursacht eine kurze Durchblutungsminde- rung, gefolgt von einer Gefäßerweiterung und Erhöhung der Permeabilität, es kommt zur Rötung. Primäre leukozytäre Immunzellen wandern entlang eines chemotaktischen Gradienten in das Gewebe ein und verursachen so die Schwellung des betroffenen Gewebes. Weiterhin werden von den Leukozyten Schmerz-Botenstoffe sezerniert, die die Ruhigstellung aufgrund von Schmerzempfinden bewirken sollen. Die Wärme wird durch die erhöhte Stoffwechselaktivität verursacht. Als größte Blutzellen sind die den Leukozyten zugehörigen Monozyten zentral an diesen Reaktionen beteiligt. Weiterhin ist eine Entzündung durch verschiedene Interaktionen der Immunzellen mit Endothelzellen und Thrombozyten charakterisiert [145]. Ist das Gleichgewicht dieser Interaktionen gestört, kann es zu chronisch-inflammatorischen und thrombotisch-inflammatorischen Erkrankungen wie der Atherosklerose kommen.

1.5.1. Der Monozyt

Monozyten spielen bei der Entzündung eine zentrale Rolle. Sie sind mit einem Durchmesser von etwa 7 bis 20 μm die größten Blutzellen und differenzieren sich

aus Monoblasten, die aus den blutbildenden Stammzellen im Knochenmark hervorgehen. Mit einem Anteil von etwa 10 % gehören Monozyten zur Familie der Leukozyten. Sie besitzen einen Zellkern und zirkulieren für etwa ein bis drei Tage im Blut, danach wandern sie ins Gewebe ein und differenzieren sich zu Makrophagen, welche eine Lebensdauer von mehreren Wochen haben [146], [147], [148], [149]. Liegt eine Verletzung oder Entzündung des Endothels vor, gelangen Monozyten zum Ort des Geschehens und sezernieren Zytokine und Chemokine (chemotaktisch wirkende Zytokine), die die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Monozyten, aber auch die Aktivierung des Endothels oder Thrombozyten bewirken [150]. Sie exprimieren Adhäsionsrezeptoren und -moleküle wie z. B. das Integrin $\alpha_M\beta_2$, das an den thrombozytären Rezeptor GPIb [151] und endotheliales ICAM-1 [152] binden kann, Integrin $\alpha_4\beta_1$, das an endotheliales VCAM-1 bindet [153], PSGL-1, das an endotheliales oder thrombozytäres P-Selektin [154] binden kann oder TSP-1, das an CD36, Kollagen, immobilisierten vWF sowie den thrombozytären Rezeptor GPIb binden kann [15], [155]. Ebenso präsentieren aktivierte Monozyten, Makrophagen und auch Schaumzellen TF auf ihrer Oberfläche [156], der in Interaktion mit FVIIa primär den Tenase-Komplex aktiviert und somit geringe Mengen an Thrombin bilden und so Thrombozyten und die Hämostase aktivieren kann. Im Verlauf der Reaktion agieren Monozyten bzw. Makrophagen als Teil der unspezifischen Immunantwort, indem sie Fremdkörper phagozytieren und unschädlich machen. Außerdem können sie Zellbestandteile des Fremdkörpers (Antigene) auf ihrer Zelloberfläche präsentieren und so die spezifische Immunantwort initiieren [149], [157], [158], [159]. Ins Gewebe eingewandert, nehmen Makrophagen neben Fremdkörpern auch Zelltrümmer und andere Stoffe auf. Dazu gehört z. B. das Lipoprotein niederer Dichte („low density lipoprotein“, LDL), das lipophile Substanzen wie Cholesterin, Fettsäuren und Phospholipide transportiert. Makrophagen erkennen oxidiertes LDL (oxLDL) über den „scavenger“ Rezeptor CD36 und „scavenger“ Rezeptoren der Klasse A-I und -II und speichern es unbegrenzt in ihrem Zellinneren [160] [161]. Die Bindung von oxLDL an monozytäres CD36 führt zu proinflammatorischen Antworten der Makrophagen, die sich aufgrund des Fettüberschusses in Schaumzellen verwandeln und als atherosklerotische Plaques an der Gefäßwand ablagern [162], [163], [164]. Allgemein werden die Sekretion von spezifischen Zytokinen und Chemokinen, Produktion von Stickstoffmonoxid, Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche und Phagozytose

von Fremdkörpern als proinflammatorische Antworten der Monozyten bzw. Makrophagen bezeichnet. Daneben können Monozyten bzw. Makrophagen auch antiinflammatorische Zytokine und Chemokine sezernieren. Abhängig von den durch pathologische Prozesse ausgelösten aktivierenden Signalen, können sie ihre funktionalen Profile der Umgebung anpassen [165].

1.6. Wechselspiel zwischen zellulärer Hämostase und Inflammation bei der Arteriosklerose

Atherosklerotische Erkrankungen nehmen in den westlichen industriellen Ländern immer mehr zu. Umgangssprachlich als Verkalkung der Blutgefäße bezeichnet, handelt es sich um eine Erkrankung, bei der sich Blutfette, Thromben und Bindegewebe in den Blutgefäßen ablagern und diese im schlimmsten Fall vollständig verschließen. Nicht selten führen atherosklerotische Erkrankungen daher zu dramatischen Ereignissen wie Schlaganfall oder Herzinfarkt und/oder zum Tod der Betroffenen, so dass die Forschung auf diesem Feld einen hohen Stellenwert angenommen hat.

Im „Normalzustand“ interagieren das Endothel, Thrombozyten und z.B. Monozyten im Gleichgewicht und sorgen für die Bekämpfung von Entzündungen und Blutungen bzw. Blutgerinnseln. Gerät dieses Gleichgewicht durcheinander, tragen diese drei Zelltypen durch Sekretion und Expression prothrombotischer und proinflammatorischer Moleküle maßgeblich zur Entstehung von chronischen und akuten inflammatorischen Prozessen bei, die wiederum wesentlich an der Entstehung von thrombotisch-inflammatorischen Erkrankungen wie der Atherosklerose oder venösen Thromboembolien beteiligt sind.

Die Rekrutierung peripherer Blutmonozyten aus der Zirkulation an die Gefäßwand und in das vaskuläre Gewebe ist dabei ein wichtiger Schritt [166]. Aktivierte Monozyten sind fähig, geringe Mengen Thrombin zu generieren, die eine erste Aktivierung von Thrombozyten bewirken [1], [167]. Die Thrombozyten adhären an das beschädigte, entzündlich oder atherosklerotisch aktivierte Endothel und lösen durch Formveränderung und Sekretion ihrer Granulainhaltsstoffe ihre weitere Aktivierung und die Bildung der prokoagulatorischen Oberfläche durch die Exposition von anionischen Phospholipiden aus. Neben anionischen Phospholipiden vermittelt z. B. auch

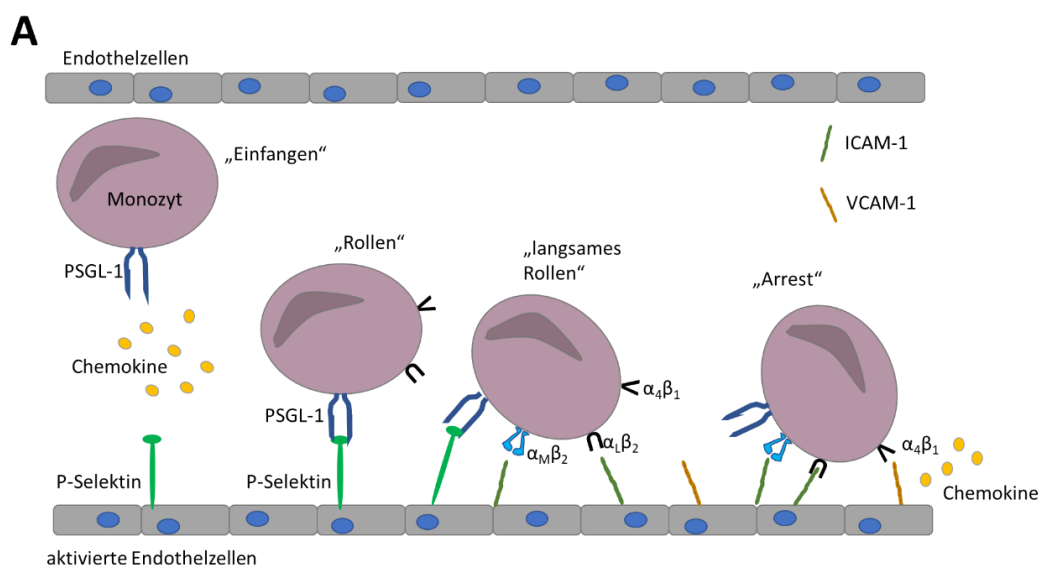
der Rezeptor GPIIb/IIIa die Bindung der Gerinnungsfaktoren an die prokoagulatorische Thrombozytenoberfläche [168] und es kommt zur Amplifikation und Propagation der Thrombinbildung. Diese großen Mengen Thrombin sind essenziell für die Bildung und Stabilisierung eines hämostatischen oder pathologischen Thrombus [48]. Das von den Monozyten und Thrombozyten gebildete Thrombin löst die Aktivierung der Endothelzellen aus, die daraufhin vermehrt Adhäsionsmoleküle wie z. B. vWF, P-Selektin und E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 [93] und Rezeptoren für Chemokine exprimieren. Ebenso werden Chemokine wie IL-8, IL-1 [94], [169] oder das Monozyten-chemotaktische Protein-1 (engl.: „monocyte chemotactic protein-1“, MCP-1, auch CC-chemokiner Ligand, CCL2) [170] sezerniert. Außerdem kann Thrombin selbst als Chemokin wirken und die Rekrutierung von Monozyten stimulieren [95].

Die Monozyten wandern entlang des chemotaktischen Gradienten [171] zum verletzten, entzündeten bzw. atherosklerotischen Endothel und werden durch eine erste lockere Bindung über den monozytären PSGL-1 an endotheliales P-Selektin verlangsamt und voraktiviert [172]. Die Bindung von monozytärem Integrin $\alpha_L\beta_2$ und/oder $\alpha_M\beta_2$ an endotheliales ICAM-1 [173], [174] bzw. monozytärem $\alpha_4\beta_1$ an endotheliales VCAM-1 [175] verlangsamt das Rollen weiter und wird gleichzeitig durch vom Endothel sezernierte sogenannte „Arrest“-Chemokine wie CXCL1, -2, und -3 [176], [177] verstärkt und stabilisiert. In Abhängigkeit von $\alpha_M\beta_2$ kriechen bzw. migrieren die Monozyten auf der Endothelzellschicht, um durch die Zellverbindungen (engl.: „cell junctions“) die Blutzirkulation verlassen zu können [178]. Nach welchem Mechanismus die Monozyten/Makrophagen an diesen „Ausstiegstellen“ stoppen, ist bisher nicht bekannt. Häufig findet die Transmigration durch die Endothelzellschicht parazellulär (durch die Zwischenräume der Endothelzellen), seltener transzellulär (direkt durch die Endothelzellen), statt. Eine wichtige Rolle spielen dabei die endothelialen junktionalen Adhäsionsmoleküle (engl.: „junctional adhesion molecules“, JAMs) JAM-A und JAM-C, die homophil mit JAMs der verbundenen Zelle sowie heterophil mit anderen Proteinen der gleichen Zelle („cis“) oder heterophil mit anderen Proteinen einer weiteren Zelle („trans“) interagieren können [179]. Die Bindung von $\alpha_L\beta_2$ an JAM-A destabilisiert die homophile Bindung zwischen zwei Endothelzellen und bewirkt eine erste Öffnung dieser Zellverbindung [180]. Gleichzeitig werden durch die Bindung der Monozyten an ICAM-1 und VCAM-1 Signalwege in den Endothelzellen aktiviert, die in der Reduktion der adhäsiven Endothelzellverbindungen durch vaskulär-endotheliale Cadherine (VE-Cadherine) und der

aktiven Kontraktion der Endothelzellen resultieren [181]. Diese Prozesse erleichtern die Transmigration der Monozyten.

Weiterhin sind monozytäres Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsmolekül-1 (engl.: „platelet endothelial cell adhesion molecule-1“, PECAM-1) und „cluster of differentiation“ 99 (CD99) wichtig für die Transmigration, indem sie an der Endothelzelloberfläche an ihre endothelialen Liganden PECAM-1 und CD99 binden und so die Rekrutierung des „lateral border recycling compartment“ (LBRC) an die Oberfläche der Zellverbindung an Seiten der Transmigration stimulieren [182]. Das LBRC besteht aus Einstülpungen in die laterale Zellwand und enthält Zellmembrankomponenten wie PECAM-1, JAM-A und CD99. So dient es als Orientierungshilfe für die transmigrierenden Monozyten [183]. JAM-C sorgt dafür, dass die Transmigration der Monozyten nicht wieder umgekehrt wird [184]. Nach erfolgter Transmigration der Monozyten schließt sich die geöffnete Zellverbindung wieder, so dass kein Plasma in das Gewebe austreten kann. In Abbildung 8 ist die Adhäsion, Migration und Transmigration eines Monozyten an/auf/durch eine/r aktivierte/n Endothelzellschicht schematisch dargestellt.

Die genauen Mechanismen der transzellulären Transmigration sind größtenteils unklar. Bekannt ist, dass nahezu die gleichen Komponenten wie bei der parazellulären Transmigration beteiligt sind [185], [186].



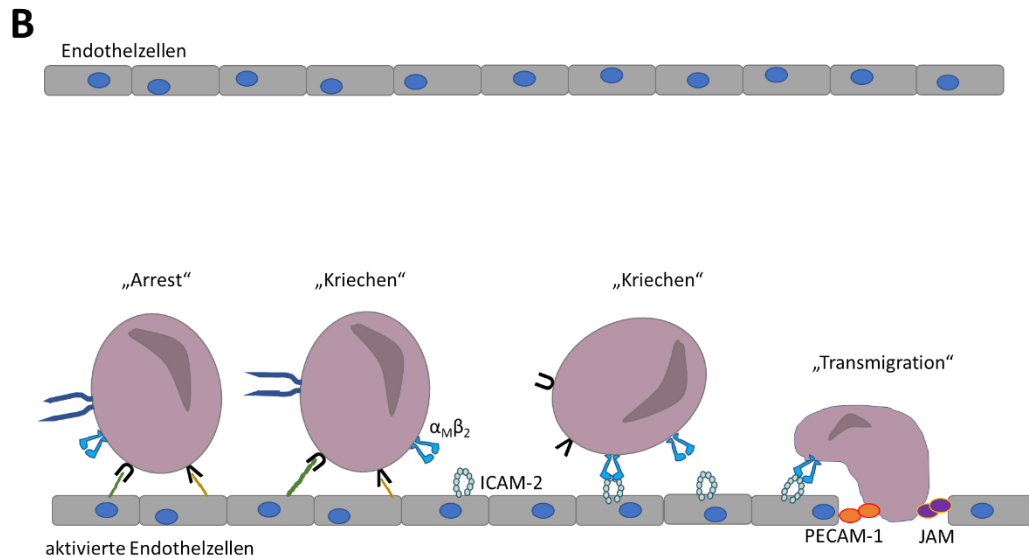


Abbildung 8: Schematische Darstellung der A: Adhäsion und B: Migration und Transmigration eines Monozyten an/auf/durch eine/r aktivierte/n Endothelzellschicht.

Der Monozyt wandert entlang eines Chemokingradienten zum aktivierten Endothel und bindet über PSGL-1 an endotheliales P-Selektin. Die erste lockere Bindung wird durch die Interaktion von VCAM-1 mit monozytärem $\alpha_4\beta_1$ und stabilisierende Chemokine verstärkt. In Abhängigkeit von $\alpha_M\beta_2$ migriert der Monozyt über die Endothelzellschicht zu einer passenden Zellverbindung. Mit Hilfe von PECAM-1 und JAMs transmigriert der Monozyt durch die Endothelzellschicht. Modifiziert aus: [186].

Unter hohem Scherstress fungieren bereits am Endothel adhärenzte Thrombozyten als klebriges Substrat für Monozyten, dabei bindet monozytärer PSGL-1 an das thrombozytäre P-Selektin bzw. monozytärer CD40 an thrombozytären CD40L [41], [187]. Weiterhin können Monozyten über das auf ihrer Zelloberfläche exprimierte TSP-1 an den GPIb-Rezeptor ruhender Thrombozyten binden und Assoziate bilden. In symptomatischen Patienten mit kardio- und zerebrovaskulären Erkrankungen wurden erhöhte Werte für diese Thrombozyten-Monozyten-Assoziate gemessen [142], [188], [189], [190]. Die Thrombozyten-Monozyten-Assoziate sind also nicht nur auf die Endothelzelloberfläche begrenzt, sondern zirkulieren auch im Blut und können das aktivierte Endothel infiltrieren [191].

Die Atherogenese (Entstehung der Atherosklerose) ist außerdem durch eine Fehlfunktion und Aktivierung des vaskulären Endothels gekennzeichnet [2]: Kleine Moleküle wie LDL können das Endothel passieren und versorgen die Gefäßwandzellen mit Cholesterin [192]. Überschüssiges LDL wird von Makrophagen phagozytiert und entfernt. Verbleibendes LDL wird leicht von reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: „reactive oxygen species“, ROS) oxidiert (oxLDL) und wirkt in dieser Form stark proinflammatorisch [193], [194], [195], [196]. Das Endothel exprimiert und sezerniert

vermehrt Adhäsionsmoleküle und Chemokine und verstärkt die Rekrutierung und Aktivierung von Thrombozyten und Monozyten bzw. Thrombozyten-Monozyten-Assoziaten, die wiederum neue Immunzellen rekrutieren und die Infiltration in das betroffene Gewebe modulieren [95], [165], [167], [197]. Auch T-Lymphozyten werden durch die sezernierten Chemokine angelockt und setzen ihrerseits Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) frei. TNF- α stellt dabei einen potenten Aktivator des Endothels dar und trägt somit maßgeblich zur Adhäsion, Migration und Transmigration von Monozyten/Makrophagen an/auf/durch das/dem Endothel bei [198]. Die aktivierten Monozyten wandern in das Gewebe ein, differenzieren sich zu Makrophagen und nehmen Rezeptor-mediert ungehemmt oxLDL auf. Verantwortlich dafür sind die „scavenger“ Rezeptoren der Klasse A-I und -II sowie CD36 [160]. Interferon- γ stimuliert die Proliferation glatter Muskelzellen, die aggregiertes LDL (agLDL) aufnehmen können [199]. Durch die Akkumulation von oxLDL bzw. agLDL verwandeln sich Makrophagen und glatte Muskelzellen in Schaumzellen [150], [200], [201] und es entsteht eine atherosklerotische Plaque (Ablagerung). Die glatten Muskelzellen migrieren an die Oberfläche der Plaque und synthetisieren dort kollagene Fasern, die eine fibröse Schicht, (fibröse Kappe) auf der Lipidansammlung bilden [202]. Die fibröse Kappe, die den Lipidkern von der Blutzirkulation trennt, ist jedoch anfällig für proteolytische Enzyme, die von den Makrophagen sezerniert werden, gleichzeitig hemmt IFN- γ die Synthese neuer Kollagenfibrillen und die fibröse Kappe wird instabil [203], [204]. Rupturiert die atherosklerotische Plaque, werden die kollagenen Fasern sowie der weiterhin auf Monozyten/Makrophagen bzw. Schaumzellen exprimierte TF [203], [205] zugänglich für zirkulierende Thrombozyten und Thrombozyten-Monozyten-Assoziate, die über ihren CD36-Rezeptor ebenso an oxLDL binden können, was zu einem hyperreaktiven Phänotyp der Thrombozyten führt [121], [122]. Für Thrombozyten bedeutet Hyperreaktivität eine stark erhöhte Aktivierung oder Aggregation und kann als Überreaktion auf niedrige Konzentrationen der Stimuli definiert werden [206]. Die aktivierten Thrombozyten lösen die Amplifikation und Propagation von Thrombin aus und es kommt zur Thrombusbildung. Wachsen die atherosklerotische Plaque und/oder der Thrombus ungehemmt weiter, kann es zur Stenose (Verengung) oder einem kompletten Verschluss des Blutgefäßes kommen. Ebenso kann der Thrombus abgeschwemmt werden und als Embolus in kleineren Blutgefäßen zum Verschluss führen. Dieses Ereignis wird als Infarkt (betrof-

fen sind Blutgefäße von Gewebe oder Organen), Schlaganfall (betroffen sind Blutgefäße des Hirns) oder Herzinfarkt (betroffen sind Blutgefäße des Herzens) bezeichnet und kann, je nachdem, wie schwer, wie lange und welche Blutgefäße vom Sauerstoffmangel betroffen sind, dramatische akute oder chronische Folgen wie Herzschwäche, Vorhofflimmern, Lähmungen, Seh- und Sprechstörungen oder den Tod haben.

1.7. Ziele der wissenschaftlichen Arbeit

Die vorliegende Dissertation sollte primär zu einem besseren Verständnis der Thrombin- und Thrombospondin-1-abhängigen Funktionen von Thrombozyten und Monozyten beitragen. Thrombin ist zwar als potenter Agonist für beide Zelltypen bekannt, die Mechanismen, die an der Thrombin-vermittelten zellulären Thrombingenerierung und ihrer Hemmung beteiligt sind, sind jedoch unvollständig verstanden.

Das matricelluläre und multifunktionelle „response to injury“ Glykoprotein Thrombospondin-1 ist als „Thrombin-sensitives“ Protein bekannt, doch seine Funktion bei der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung sowie bei der endothelialen Transmigration von Monozyten ist ebenso unzureichend erforscht.

Daher sollten im Rahmen dieser Dissertation folgende spezifische Ziele verfolgt werden:

1. Validierung der Rolle von Gerinnungsfaktoren in einem von der Arbeitsgruppe Jurk etablierten *in vitro*-Thrombingenerierungsassay, in dem Thrombozyten im Vergleich zu „Tissue Factor“ durch Thrombin aktiviert werden.
2. Untersuchung der Rolle des prominenten Thrombospondin-1-Rezeptors CD36 in der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung von humanen Thrombozyten *in vitro*.
3. Effekt des direkten oralen Thrombin-Inhibitors Dabigatran auf die Thrombingenerierung von isolierten humanen Monozyten in An- und Abwesenheit von Thrombozyten *in vitro*.
4. Effekt des direkten oralen Thrombin-Inhibitors Dabigatran auf die endotheliale Transmigration humaner Monozyten unter Flussbedingungen *in vitro*.
5. Untersuchung der Beteiligung von Thrombospondin-1 an der endothelialen Transmigration von murinen Makrophagen unter Flussbedingungen *in vitro*.

2 Materialien

2.1. Zelllinie und Primärzellen

Die Kanäle der Flusskammerplatten wurden mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen (engl.: „human microvascular endothelial cells“, HMEC-1) aus der Haut (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Beate Kehrel, Münster; Centers of Disease Control, Atlanta, USA) beschichtet. Die HMEC-1 wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen (T₇₅-Flaschen) mit Filterdeckel in Endopan MV-Medium mit fötalem Rinderserum (engl.: „fetal bovine serum“, FBS) und Supplementen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert.

Aus humanen „Buffy Coats“ (hier: Mit Leukozyten angereichertes Blut) isolierte Monozyten wurden in 50 ml Polypropylenröhrchen mit Filterdeckel und aus dem Peritonealraum der Maus isolierte Makrophagen wurden in 182,5 cm²-Zellkulturflaschen (T_{182,5}-Flaschen) mit Filterdeckel in RPMI 1640-Medium mit FBS, L-Glutamin (Gln) und Penicillin/Streptomycin (P/S) bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert.

Tabelle 1: verwendete Zellen

Zellen	Herkunft/Gewebetyp	Hersteller/Vertrieb
HMEC-1	Homo sapiens, human, dermal	ATCC®: CRL-3243™
Makrophagen	Mus musculus, murin	Hauseigene Zucht, Ursprungselterniere von „Charles River GmbH“ und „The Jackson Laboratory“
Monozyten	Homo sapiens, human, „Buffy Coats“	Transfusionszentrale, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

2.2. Medien

Für die Kultivierung der Endothelzellen wurde das Endothelzellmedium Endopan MV mit allen sieben gelieferten Zusätzen supplementiert (Tabelle 2) und 6 % (v/v) hitzeinaktiviertem (30 min bei 56 °C im Wasserbad) FBS versetzt.

Für die Kultivierung der humanen Monozyten bzw. murinen Makrophagen wurde RPMI 1640-Medium mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem (30 min bei 56 °C im Wasserbad) FBS, 1 % (v/v) Gln und 1 % (v/v) P/S versetzt.

Soweit nicht anders angegeben, definieren die Namen Endopan MV-Medium und RPMI 1640-Medium die supplementierten, serumhaltigen Medien.

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Materialien und Medien durchgeführt. Das benötigte Volumen der Medien wurde vor Verwendung im Wasserbad (37 °C) erwärmt und mit einem Spritzenvorsatzfilter (20 µm Porengröße) steril-filtriert. Die Aufbewahrung der Medien erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank.

Tabelle 2: verwendete Medien und Supplemente

Medium/Supplement	Aufbewahrung	Hersteller/Vertrieb
BBL™ Fluid Thioglycollate Medium Thioglykolat 2,98 % (w/v)	4 °C, Kühlschrank	Becton Dickinson, Heidelberg
Endopan MV-Medium	4 °C, Kühlschrank	PAN™ Biotech, Aidenbach
FBS	-20 °C, Gefrierschrank	Gibco®, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
L-Glutamin (Gln), 200 mM	-20 °C, Gefrierschrank	GE Healthcare, Cytiva Europe GmbH, Freiburg
Penicillin/Streptomycin (P/S) 5 000 U/ml Penicillin 5 000 µg/ml Streptomycin	-20 °C, Gefrierschrank	Gibco®, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
RPMI 1640-Medium ohne Glutamin + 2,0 g/l NaHCO ₃	4 °C, Kühlschrank	PAN™ Biotech, Aidenbach
Supplemente für das Basalmedium Endopan MV: Ascorbinsäure EGF („epidermal growth factor“) FBS FGF-2 („fibroblast growth factor“-2) Gentamicin Sulfat/Amphotericin B Hydrocortison R ³ -IGF-1 (rekombinantes Analogon des „insulin-like growth factor-1“) VEGF („vascular endothelial cell growth factor“)	-20 °C, Gefrierschrank	PAN™ Biotech, Aidenbach

2.3. Gerinnungsfaktor-depletierte humane Plasmen

Die Gerinnungsfaktor-depletierten humanen Plasmen (Mangelplasmen) wurden im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt und kurz vor Verwendung bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut.

Tabelle 3: verwendete Mangelplasmen und Restaktivität

Mangelplasma	Restaktivität	Hersteller/Vertrieb
FII-depletiert	< 1 %	Hematologic Technologies, Essex Junction, USA
FV-depletiert	< 1 %	Hematologic Technologies, Essex Junction, USA
FVII-depletiert	< 1 %	Hematologic Technologies, Essex Junction, USA
FVIII-depletiert	< 1 %	Hematologic Technologies, Essex Junction, USA
FIX-depletiert	< 1 %	Hematologic Technologies, Essex Junction, USA
FX-depletiert	< 1 %	Hematologic Technologies, Essex Junction, USA
FXI-depletiert	< 1 %	Hematologic Technologies, Essex Junction, USA
FXII-depletiert	< 1 %	Hematologic Technologies, Essex Junction, USA

2.4. Laborgeräte

Tabelle 4: verwendete Geräte

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Analysenwaage	CPA1003P	Sartorius, Göttingen
Autoklav	VX-150	Systec GmbH, Linden
Blot-Kammer	Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Brutschrank	INCO 2 153	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Durchflusszytometer	FACS Canto™ II	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoresekammer + Einsatz	Mini-Sub® Cell GT Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Eppifuge (Labor)	5418 R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Flusskammersystem	Power Supply 232 MCU 2008 Definite Focus BioFlux™ Controller (Druckverteiler) CCD-Kamera	Fluxion Biosciences, Alameda, USA
Gel-Dokumentationsgerät + UV-Einsatz	Gel Doc™ EZ Reader	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Hämozytometer	Sysmex KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt
Kolbenhub- Einkanalpipetten, manuell (Labor)	Research Plus®, variabel 0,1- 2,5 µl 0,5- 5,0 µl 2,0- 20,0 µl 10,0- 100,0 µl 20,0- 200,0 µl 100,0-1000,0 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Kolbenhub- Einkanalpipetten, manuell (PCR)	Classic PR-20 2,0- 20,0 µl 20,0-200,0 µl	Mettler-Toledo, Gießen
Kolbenhub- Einkanalpipetten, manuell (Zellkultur)	Finnpipette™ F2, variabel 2,0- 20,0 µl 20,0- 200,0 µl 100,0-1000,0 µl	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Kryo-Einfriergerät	Mr. Frosty	Nalgene®, Thermo Fisher Sci- entific GmbH, Dreieich
Laborwasser- Aufbereitungsanlage (ddH ₂ O)	Milli-Q® Advantage + Q-POD® Element	Merck KGaA, Darmstadt
Lichtmikroskop, invers (Flussskammersystem)	Observer Z.1	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Lichtmikroskop (Zellkultur)	Diaphot 300	Nikon, Düsseldorf
Lichtquelle für Fluoreszenzanregung (Flussskammersystem)	HXP 120 C Codix	Kübler Group, Villingen-Schwenningen
Locheisen	6 mm, 7/32"	Amazon.com, Seattle, USA
Magnetrührer	D-6010	neoLab® Migge GmbH, Heidel- berg
Mehrfachdispenser	vWR Stepper	vWR International GmbH, Darm- stadt
Mikrowelle	studio 4in1 MD12801	MEDION AG, Essen
Ohrlochstanze	Ear Punch Ø 2 mm, L: 11,5 cm	FST (fine science tools) GmbH, Heidelberg
PCR-Cycler	Mastercycler pro S	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
pH-Meter	HI 2211 pH/ORP Meter	HANNA Instruments Deutsch- land GmbH, Vöhringen
Pipettierhilfe (Labor)	Accu-jet® pro	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim
Pipettierhilfe (Zellkultur)	S1 Pipettierhilfe	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Präparierbesteck	Pinzetten und Scheren	Medicon BZ Medizintechnik, Tuttlingen

Schüttler	SHAKER DOS-10L	neoLab® Migge GmbH, Heidelberg
Schwenktisch	Nutating Mixer	vWR International GmbH, Darmstadt
Sicherheitswerkbank	HERA Safe KS 15	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Spannungsgeber	PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Thermomixer	compact	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Thrombinoskop	Fluoroskan Ascent™ FL	Thermo Fisher Scientific Biosciences GmbH, USA
Tischzentrifuge	REMI	REMI Elektrotechnik limited, Maharashtra, Indien
Ultraschall-Wasserbad	Sonorex RK 100	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Vortexmischer	D-6012	neoLab® Migge GmbH, Heidelberg
Wasserbad + Einsätze	ED-AP (042) (5A max. 60 °C)	Julabo GmbH, Seelbach
Wärmeofen	Heratherm oven	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Western Blot Detektionsgerät	Fusion FX7	Vilber Loumat GmbH, Eberhardzell, Germany
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim
Zentrifuge (Labor)	Allegra X-30R Rotoren: F2402H, SX 4400	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge (Zellkultur)	Hettich Rotanta / RP Rotor: 4394	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zellzählhilfe	infactory	Amazon.com, Seattle, USA

2.5. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller/Vertrieb
Filterpapier	Whatman® qualitative filter paper, Grade 1 B: 460 x L: 570; Dicke: 180 µm	GE Healthcare, Cytiva Europe GmbH, Freiburg
Flusskammerplatten	„low shear“ (0 bis 20 dynes/cm²) 48-„Well“ BioFlux 1000	Fluxion Biosciences, Alameda, USA

Handdispenser-Adapter	12,5 ml	vWR International GmbH, Darmstadt
Handschuhe	Latex, puderfrei Sempercare®	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied
Hautdesinfektionsmittel	octeniderm®	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Kanülen	Safety-Multifly®-Kanüle 21 G x ¾" TW; 0,8 x 19 mm Microlance™ 3 26 G x ½"; 0,45 x 13 mm Microlance™ 3 23 G x ¼"; 0,6 x 30 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Becton Dickinson, Heidelberg
Konnektoring	„Connector Ring“	pluriSelect GmbH, Leipzig
Kryoröhrchen	CryoTube™ Vials 1,8 ml	Nunc™, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Mikroplatten	cellstar® 96-„Well“ U-Boden 96-„Well“, F-Boden	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Parafilm	B: 10 cm, L: 38 m	BEMIS, Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
PCR Reaktionsgefäße	Soft Strips + Cap Strips 0,2 ml, farblos	Biozym® Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen (Labor)	TipOne® (10 µl, 200 µl) epT.I.P.S.® 50-1000 µl	Starlab, Hamburg Fisher Scientific GmbH, Nidderau
Pipettenspitzen (PCR)	Precision Pipette Filter Tips (10 µl, 200 µl)	Mettler Toledo, Gießen
Pipettenspitzen (Zellkultur)	TipOne® (200 µl, 1000 µl)	Starlab, Hamburg
Plastik-Kügelchen	CD14 M-pluriBeads® anti- human	pluriSelect GmbH, Leipzig
Polypropylenröhrchen (PP-Röhrchen)	cellstar® (15 ml, 50 ml, konischer Boden) 14 ml, PP, 18/95 mm, runder Boden, zwei- Positionen- Belüftungsstopfen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Polystyrol- Latexkügelchen	3,0 µm	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Polystyrolröhrchen	5 ml, 75 x 12 mm	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Polyvinylidenfluorid- Membran	Amersham™ Hybond™ PVDF Blotting Membrane 0,45 µm	GE Healthcare, Cytiva Europe GmbH, Freiburg
Reaktionsgefäße	Safe-Seal (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Rollenpflaster	Leukosilk® S	BSN Medical GmbH, Hamburg
Serologische Plastikpipetten	cellstar®	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

S-Monovette®	Tri-Natriumcitrat-Lösung 4,3 ml, 10 ml 9NC	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spritzen	Discardit™ II (5 ml, 10 ml, 20 ml) Injekt®-F Tuberkulin (0,01- 1 ml/Luer-Solo)	Becton Dickinson, Heidelberg B. Braun, Melsungen
Spritzenvorsatzfilter, Rotilabo®	20 µm Porengröße, Ø 25 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Transferpipette	3,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Trichter	„Funnel“	pluriSelect GmbH, Leipzig
Zellkulturflaschen	25 cm², 75 cm², mit Filterdeckel	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	182,5 cm², mit Filterdeckel	vWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturröhrchen	50 ml, mit Filterdeckel	TPP®, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	Zellschaber M, drehbar, L: 300 mm, B: 20 mm	TPP®, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb	70 µm Easy Strainer	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellsieb	pluriStrainer®, 40 µm	pluriSelect GmbH, Leipzig
Zellstofftupfer	Zelletten 4 x 5 cm	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Neuwied

2.6. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6: verwendete Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller/Vertrieb
β-Mercaptoethanol	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Accutase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Agarose Standard (Roti®garose)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Aqua ad iniectionabilia (Wasser für Injektionszwecke)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Borsäure (H ₃ BO ₃)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA), pH 7,0	Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Clarity™ Western ECL Substrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumdihydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
D(+)-Glukose (Glc)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Dulbecco's Pulver 10 x	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat ($\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (EtOH) 96 %, vergällt und 99,5 % (v/v), reinst	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Fluo-Substrat	Thrombinoscope B.V., Maastricht, Niederlande
Formaldehyd (FA) 37 % (v/v)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Glycin (Gly)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol (2-Propanol, IPA) 99,9 % (v/v)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Methanol (MeOH) 99,9 % (v/v)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mineralöl (DryStrip Cover Fluid)	GE Healthcare, Cytiva Europe GmbH, Freiburg
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid, isotonische Lösung 0,9 % (w/v), steril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumcitrat-Lösung, 3,13 % (w/v), steril	EIFELFANGO GmbH, Bad Neuenahr-Ahrweiler
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (engl.: „sodium dodecyl sulfate“, SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid-Lösung (NaOH) 2 N	vWR International GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxid-Lösung (NaOH) 32 % (v/v)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

PRP-Reagenz	Thrombinoscope B.V., Maastricht, Niederlande
Rhodamin 110 (P ₂ Rho)	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Salzsäure (HCl) 37 % (v/v)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure-Lösung (HCl) 2 N	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Terralin	Schülke, Norderstedt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Thrombin-Kalibrator	Thrombinoscope B.V., Maastricht, Niederlande
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau 0,5 % (w/v)	Biochrom AG, Merck KGaA, Darmstadt
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

2.7. Arzneistoffe, Medikamente und Anästhetika

Tabelle 7: verwendete Arzneistoffe, Medikamente und Anästhetika

Arzneistoff/Medikament/ Anästhetikum	Handelsname	Hersteller/Vertrieb
Dabigatran	Pradaxa®	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH, Ingelheim am Rhein
Gerinnungsfaktor XI, human aus Plasma		Univ.-Prof. Dr. XXX XXX, Universitätsmedizin XXX XXX, XXX
Iloprost	Ilomedin® 20 µg/ml	Schering, Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Berlin
Ketamin	Ketamin-hameln® 50 mg/ml	Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln
P2Y ₁₂ -Inhibitor AR- C69331	Kengrexal® (Cangrelor)	The Medicines Company, Parsippany, USA
Tirofiban	Aggrastat®	Iroko Cardio LLC, USA
von Willebrand Faktor, human	Willfact® 1 000 I.E./10 ml	LFB Biomedicaments Courtaboeuf Cedex, Frankreich
Xylazin	Rompun® 2 % (w/v)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen

2.8. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit doppelt-deionisiertem Wasser (ddH₂O) der hauseigenen Aufbereitungsanlage angesetzt. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure (2 N) bzw. Natriumhydroxid-Lösung (2 N) eingestellt.

Tabelle 8: verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung (V = 1 Liter)	pH
CGS-Puffer 1 x (engl.: „citrat-glucose-sodiumchloride, CGS“, Citrat-Glukose-Natriumchlorid-Puffer)	12,9 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 30 mM Glukose 120 mM NaCl -20 °C, Gefrierschrank	6,5
EDTA in PBS (engl.: „phosphate-buffered saline“, Phosphat-gepufferte Salzlösung) (steril-filtriert)	10 mM EDTA-Na ₂ • 2 H ₂ O PBS 1x	7,4
Fluo-Puffer	Fertigprodukt von Thrombinoscope B.V., Maastricht, Niederlande HEPES (pH 7,35) 17 mM CaCl ₂ 4 °C, Kühlschrank	-
Formaldehyd in PBS	1 % Formaldehyd (v/v) PBS 1 x Raumtemperatur	7,4
Formaldehyd in Tyrode's Puffer	4 % Formaldehyd (v/v) Tyrode's Puffer 1 x Raumtemperatur	7,4
HBSS 10 x (engl.: „Hank's balanced salt solution“, Hank's stabilisierte Salzlösung)	Fertigprodukt von Gibco®, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich 4 °C, Kühlschrank	-
HBSS 1 x (steril-filtriert)	100 ml HBSS 10x 900 ml ddH ₂ O 4 °C, Kühlschrank	7,4
HEPES-Puffer 1 x (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	145 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 10 mM D-Glukose 10 mM HEPES 4 °C, Kühlschrank	7,4
HEPES-CaCl ₂ -BSA-Puffer	HEPES-Puffer 0,5 % (w/v) BSA 67 mM CaCl ₂ -20 °C, Gefrierschrank	
Laemmli-Puffer 3 x	0,2 M Tris-HCl 15 % (v/v oder w/v) Glycin 6 % (w/v) SDS	-

	2 % (w/v) Bromphenolblau Natriumsalz Raumtemperatur	
Lysepuffer (Genotypisierung)	25 mM NaOH 0,2 mM EDTA Raumtemperatur	12
Natriumchlorid-Lösung 9 % (w/v)	90 g NaCl Raumtemperatur	-
Natriumchlorid-Lösung, isotonisch 0,9 % (v/v), unsteril	100 ml NaCl-Lösung 9 % (w/v) 900 ml ddH ₂ O Raumtemperatur	-
Neutralisationspuffer	40 mM Tris-HCl Raumtemperatur	5,0
PBS 1 x	9,55 g Dulbecco's-Pulver 10 x Raumtemperatur	7,4
PBS 1 x, Zellkultur (steril)	Fertigprodukt von Gibco®, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich 4 °C, Kühlschrank	7,2
„pluriBead detachment“ Puffer	Fertigprodukt von pluriSelect GmbH, Leipzig -20 °C, Gefrierschrank	-
„pluriBead Waschpuffer“ (steril-filtriert)	Fertigprodukt von pluriSelect GmbH, Leipzig oder 0,5 % BSA (w/v) 2 mM EDTA PBS 1 x 4 °C, Kühlschrank	7,4
„pluriBead stabilization“ Puffer 20 x	Fertigprodukt von pluriSelect GmbH, Leipzig oder 200 mM EDTA PBS 1 x 4 °C, Kühlschrank	7,4
TBE-Puffer 1 x (Tris-Borsäure-EDTA-Puffer)	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O Raumtemperatur	8- 8,9
TBS-Puffer 1 x (engl.: „tris-buffered saline“, Tris-gepufferte Salzlösung)	20 mM Tris 140 mM NaCl 4 °C, Kühlschrank	7,4
TBS-T-Puffer 1 x (engl.: „tris-buffered saline with Tween 20“, Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20)	20 mM Tris 140 mM NaCl 0,1 % Tween 20 Raumtemperatur	7,4
TGS-Puffer 10 x (Tris-Glycin-SDS Puffer)	Fertigprodukt von Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen 25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS Raumtemperatur	-

TGS-Puffer 1 x (SDS-PAGE-Laufpuffer)	100 ml TGS 10 x 900 ml ddH ₂ O Raumtemperatur	8,3
Transfer-Puffer 10 x	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 %(v/v) Methanol 4 °C, Kühlschrank	-
Transfer-Puffer 1 x	100 ml Transfer-Puffer 10 x 900 ml ddH ₂ O 4 °C, Kühlschrank	8,3
Tyrodé's Puffer 1 x	5,5 mM Glukose 5 mM HEPES 2,7 mM KCl 140 mM NaCl 12 mM NaHCO ₃ 0,42 mM NaH ₂ PO ₄ 4 °C, Kühlschrank	7,4

2.9. Antikörper, Peptide und Proteine

Tabelle 9: verwendete Antikörper

Antikörper	Wirt/Reaktions-spezifität	Hersteller/Vertrieb
anti-CD11b PE, Klon D12	Maus anti-human	BD Pharmingen™, BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD14 FITC, Klon M5E2	Maus anti-human	BD Pharmingen™, BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD32a, Klon IV.3	Maus anti-human	Stemcell Technologies, Köln
anti-CD36, Klon 185-1G2	Maus anti-human	Acris Antibodies, OriGene Technologies, Herford
anti-CD36, Klon CLB-IVC7	Maus anti-human	Cell Sciences, Canton, USA
anti-CD36, Klon FA6.152	Maus anti-human	Beckman Coulter Life Sciences, Krefeld
anti-CD36 FITC, Klon FA6.152	Maus anti-human	Beckman Coulter Life Sciences, Krefeld
anti-CD41 FITC, Klon MW Reg30	Ratte anti-Maus	BD Pharmingen™, BD Biosciences, Heidelberg
anti-CD62P FITC, Klon AK-4	Maus anti-human	Beckman Coulter Life Sciences, Krefeld
anti-CD63 FITC, Klon H5C6	Maus anti-human	Beckman Coulter Life Sciences, Krefeld
anti-F4/80, Klon Cl:A3-1	Ratte anti-Maus	Bio-Rad, AbD Serotec, Puchheim
anti-Fibrinogen FITC	Kaninchen anti-human	Agilent, Santa Clara, USA
anti-FV FITC	Schaf anti-human	Affinity Biologicals, Ancaster, Kanada

anti-FVIII FITC	Schaf anti-human	Affinity Biologicals, Ancaster, Kanada
anti-FIX FITC	Ziege anti-human	Affinity Biologicals, Ancaster, Kanada
anti-FX FITC	Schaf anti-human	Affinity Biologicals, Ancaster, Kanada
anti-GPIIb α , Klon SZ2	Maus anti-human	Beckman Coulter Life Sciences, Krefeld
anti-ICAM-1-PE, Klon HA58	Maus anti-human	BD Pharmingen™, BD Biosciences, Heidelberg
anti-Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (aktiviert), Klon PAC-1 FITC	Maus anti-human	BD Pharmingen™, BD Biosciences, Heidelberg
anti-Tissue Factor, Klon VD8	Maus anti-human	American Diagnostica GmbH, Pfungstadt
anti-TSP-1, Klon A4.1	Maus anti-human	Abcam® Ltd., Cambridge, UK
anti-TSP-1 PE, Klon P10	Maus anti-human	Beckman Coulter Life Sciences, Krefeld
anti-VCAM-1 PE, Klon 51-10C9	Maus anti-human	BD Pharmingen™, BD Biosciences, Heidelberg
anti-vWF FITC	Schaf anti-human	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
IgG Isotyp-Kontrolle FITC	Ziege anti-human	Novus Biologicals, Wiesbaden
IgG Isotyp-Kontrolle FITC	Schaf anti-human	Novus Biologicals, Wiesbaden
IgG $_1$ κ Isotyp-Kontrolle FITC, Klon MOPC-21	Maus anti-human	BD Pharmingen™, BD Biosciences, Heidelberg
IgG $_1$ κ Isotyp-Kontrolle PE, Klon MOPC-21	Maus anti-human	BD Pharmingen™, BD Biosciences, Heidelberg
IgG $_1$ κ Isotyp Kontrolle, Klon 679.1Mc7	Maus anti-human	Beckman Coulter Life Sciences, Krefeld
IgG (H+L) HRP-konjugiert (sekundärer Antikörper)	Ziege anti-Maus	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen

Tabelle 10: verwendete Peptide

Peptid	Hersteller/Vertrieb
rekombinantes CD36-Fragment, human	Abcam® Ltd., Cambridge, UK
CD36-Peptid P(93-110)	Bachem, Heidelberg
H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH (GPRP)	Bachem, Heidelberg
TSP-1-Peptid CSVTCG	AnaSpec, Fremont, USA

Tabelle 11: verwendete Proteine

Protein	Hersteller/Vertrieb
α -Thrombin, bovin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Albumin, human	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Annexin V FITC, human, rekombinant	eBiosciences, Affymetrix, Frankfurt
Batroxobin	Pentapharm, Schweiz/Loxo GmbH, Dossenheim,
CellTracker orange™ CMRA	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Fibrinogen 488 AlexaFluor, human	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Fibrinogen, human, hochrein Plasminogen-, vWF- und Fibronektin-depletiert	Enzyme Research Labs, South Bend, USA
Fibronektin	ThermoFisher Scientific GmbH, Dreieich
TSP-1, human, FITC-konjugiert	Prof. Dr. Beate Kehrel, Münster
SYK Kinase-Inhibitor IV BAY 61-3606	Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	Biochrom AG, Merck KGaA, Darmstadt

2.10. PCR-Reagenzien, Primer und Marker

Tabelle 12: verwendete Reagenzien, Primer, PCR-Marker und SDS-PAGE-Marker

Reagenz/Primer/Marker	Primersequenz	Hersteller/Vertrieb
DNS-Färbe-Reagenz Roti®Safe		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
GeneRuler DNS-Leiter, 100 bp		Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
H ₂ O, Nuklease-frei		Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Mastermix Hot Start Green PCR (2 x)		Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Primer „Common“	5'-GAG TTT GCT TGT GGT GAA CGC TCA G-3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer Mutante	5'-TGC TGT CCA TCT GCA CGA GAC TAG-3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer Wildtyp	5'-AGG GCT ATG TGG AAT TAA TAT CGG-3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards		Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen

2.11. Software

Tabelle 13: verwendete Software

Software	Hersteller/Vertrieb
FACS DIVA 6.1.3	BD Biosciences, San Jose, USA
FusionCapt advanced 16.11	Vilber Loumat GmbH, Eberhardzell
BioFlux Montage 7.7.40	Molecular Devices, San Jose, USA
Gel-Dokumentation ImageLab 3.0	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Graph Pad Prism 6.07 für Windows	GraphPad Software, La Jolla, USA,
Microsoft Office 2007 für Windows	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Sysmex-Software 1KXNH 00-10	Sysmex Europe, Norderstedt
Thrombinoscope 3.0.0.29	Thrombinoscope B.V., Maastricht, Niederlande
Tierdatenbanksystem PyRat (engl.: "Python based relational animal tracking"), 3.4-467	Scionics Computer Innovation GmbH, Dresden

2.12. Tierversuche

2.12.1. Genehmigung der Tierversuche

Die Blutentnahme bei der Maus wurde als anzeigepflichtiger Tierversuch A12-1-006 durchgeführt. Zuständig ist das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz.

Die Isolierung muriner Makrophagen wurde als genehmigungspflichtiger Tierversuch G12-1-100 durchgeführt. Zuständig ist das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz, Koblenz.

2.12.2. Versuchstiere und Haltung

Für die Isolierung muriner Makrophagen wurden acht bis zwölf Wochen alte männliche Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6J und des Inzuchtstammes B6.129S2-*Thbs1^{tm1Hyn}/J* (Thrombospondin-1 Knockout, TSP-1 K. o.) aus der hauseigenen Zucht eingesetzt. Die Ursprungselterntiere wurden von der „Charles River GmbH“

(C57BL/6J, #027) [207] und „The Jackson Laboratories“ (TSP-1 K. o., #006141) [208], [209] bezogen.

Die Haltung erfolgte spezifisch pathogenfrei in der zentralen Versuchstiereinrichtung (engl.: „translational animal research center“, TARC) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

2.13. Ethikantrag und Bezug der „Buffy Coats“

Studien mit humanem Blut bzw. Blutbestandteilen wurden von der lokalen Ethik-Kommission genehmigt: Mainz (837.302.12(8403-F), Würzburg (67/92 und 114/04) und Wien (237/2004).

Die „Buffy Coats“ für die Isolierung humaner Monozyten wurden kostenfrei über die Transfusionszentrale der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bezogen.

3 Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden für humane Proben

3.1.1. Blutentnahme

Das Blut wurde gesunden Proband:innen, bzw. einem Spender mit CD36 Typ II-Defizienz, einem Bernard-Soulier-Syndrom- oder einem „ δ -storage pool disease“ Patienten, die mindestens elf Tage vor dem Experiment keine Blutgerinnung-beeinflussenden Medikamente (z. B. Acetylsalicylsäure oder Ibuprofen) eingenommen hatten, in Tri-Natriumcitrat-S-Monovetten mit einer 21 G-Safety-Multifly-Kanüle aus der Armvene entnommen (hier: Citrat-Vollblut). Das Tri-Natriumcitrat (finale Konzentration 10,6 mmol/L) bindet die im Blut enthaltenen Ca^{2+} -Ionen und verhindert so die vorzeitige Blutgerinnung. Bei der Blutentnahme wurde darauf geachtet, dass der Stempel der Monovette nicht zu schnell gezogen wurde, um eine Scherstress-induzierte Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden.

3.1.2. Generierung von humanem PRP, PPP und PFP

Thrombozyten-reiches Plasma (engl.: „platelet-rich plasma“, PRP) wurde durch Zentrifugation der Monovetten für 10 min bei 200 x g, Bremse 2 generiert. Der trübe Überstand (PRP) wurde vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen und in ein 5 ml Polystyrolröhrchen überführt, ohne die Trennschicht zu verwirbeln. Um Thrombozyten-armes Plasma (engl.: „platelet-poor plasma“, PPP) zu gewinnen, wurde das verbliebene Blut für 10 min bei 2 000 x g, Bremse 9 zentrifugiert und der Überstand erneut vorsichtig abgenommen, ohne die Trennschicht zu verwirbeln. Das Thrombozyten-freie Plasma (engl.: „platelet-free plasma“, PFP) wurde durch einen dritten Zentrifugationsschritt generiert. Dazu wurde das PPP in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 30 000 x g, Bremse 9 zentrifugiert. Alle Schritte erfolgten bei einer Temperatur von über 21 °C (RT), um eine Kälte-induzierte Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Anschließend wurde die Thrombozytenkonzentration der jeweiligen Plasmen mit Hilfe des Hämozytometers gemessen.

3.1.3. Generierung humaner gewaschener Thrombozyten

Zu dem in Tri-Natriumcitrat-S-Monovetten abgenommenen Blut wurden 40 µl EGTA pipettiert (finale Konzentration 2 mM). Die Monovetten wurden für 10 min bei 200 x g, Bremse 2 zentrifugiert, der trübe Überstand vorsichtig abgenommen und in 14 ml Polypropylenröhrchen (PP-Röhrchen) mit Rundboden überführt. Die Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1 + 1 mit vorgewärmtem CGS-Puffer (37 °C, pH 6,5) verdünnt und für mindestens 5 min ruhen gelassen. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 70 x g, um die Leukozyten zu pelletieren. Der Überstand wurde erneut in ein frisches 14 ml PP-Röhrchen überführt und für 10 min bei 400 x g zentrifugiert. Vorsichtig wurde der Überstand abpipettiert, verworfen und das Pellet zunächst in 1 ml vorgewärmtem CGS-Puffer (37 °C, pH 6,5) gelöst und anschließend mit dem CGS-Puffer auf ein Volumen von 3 ml gebracht. Je 400 µl wurden in ein 5 ml Polystyrolröhrchen pipettiert und für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und das Thrombozytenpellet schließlich in dem gewünschten Plasma (Kontrollplasma, Gerinnungsfaktor-depletiertem Plasma, defibriniertem Plasma) resuspendiert. Alle Schritte wurden bei über 21 °C (RT) durchgeführt, um eine Kälte-induzierte Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Anschließend wurde die Konzentration der gewaschenen Thrombozyten mit Hilfe des Hämozytometers gemessen.

3.1.4. Generierung von humanem defibriniertem Plasma

Zuvor generiertes PPP wurde in ein 14 ml PP-Röhrchen mit Rundboden überführt und mit Batroxobin (finale Konzentration 1 U/ml), einem Schlangengift, welches Fibrinogen zu Fibrin spaltet, inkubiert. Nach 30 min bei 37 °C im Wasserbad folgte ein Gefrierungsschritt von 10 min bei -20 °C, um die Polymerisierung des Fibrins zu provozieren. Anschließend wurde das Fibrin durch Zentrifugation für 10 min bei 2 000 x g pelletiert und der Überstand, das defibrinierte Plasma (DFP), in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Restkonzentration des Fibrinogens im Plasma wurde nach der Methode von Clauss (System ACL TOP, Firma IL) durch das Zentrallabor der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz festgestellt und betrug durchschnittlich < 0,35 g/l.

3.1.5. Isolierung humaner Monozyten

Die Isolierung humaner Monozyten (MZ) wurde mit Hilfe des CD14 M-pluriBeads anti-human Kits nach dem Protokoll der Firma pluriSelect GmbH durchgeführt. Das Prinzip entspricht einer positiven Zellseparation, bei der die Zielzellen an nicht-magnetische Plastik-Kügelchen (engl.: „beads“) binden und durch verschiedene Sieb- und Waschschriffe von unerwünschten Zellen getrennt werden. Zunächst wurden je 8 ml Citrat-antikoaguliertes Blut aus „Buffy Coats“ (hier: Mit Leukozyten angereichertes Blut) in zwei 50 ml PP-Röhrchen gegeben, mit je 16 ml pluriBead-Waschpuffer (pH 7,4, steril) verdünnt und für 10 min bei 300 x g ohne Bremse bei RT zentrifugiert, um freies Serum-CD14 zu entfernen. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen, ohne die Trennschicht zu verwirbeln und der Waschschriff ein zweites Mal wiederholt (1 ml Blut + 2 ml Waschpuffer). Der Überstand wurde erneut abgenommen und der verbliebene „Buffy Coat“ in einem Röhrchen zusammengeführt. Pro 1 ml „Buffy Coat“ wurden 50 µl eines Stabilisierungspuffers hinzu pipettiert (dieser Puffer beinhaltet EDTA und PBS und bindet die für die Blutgerinnung benötigten Ca^{2+} -Ionen) und das Blut durch ein Zellsieb (70 µm Maschenweite) in ein frisches 50 ml PP-Röhrchen filtriert, um mögliche Zelltrümmer oder -konglomerate zu entfernen. Als nächstes folgte die Inkubation des filtrierten Blutes mit den CD14 M-pluriBeads anti-human. Dazu wurden 34,8 µl „beads“ pro 1 ml Blut hinzugefügt und für 20 min auf dem Schwenktisch bei RT inkubiert. Dabei war sicher zu stellen, dass das Blut gut, aber nicht zu stark durchmischt wurde. Ein pluriStrainer (40 µm Maschenweite) wurde auf einem frischen 50 ml PP-Röhrchen platziert und das mit den pluriBeads inkubierte Blut hindurchfiltriert. Ungebundene und nicht erwünschte Zellen flossen hierbei durch das Zellsieb, während die CD14 M-pluriBeads-gebundenen Zielzellen zu groß für die Maschen waren und dementsprechend auf dem Sieb sitzen blieben. Um restliche ungebundene Zellen und Erythrozyten zu entfernen, wurden die Ziellzellen auf dem Zellsieb 10 bis 15 x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde ein Konnektoring auf ein frisches 50 ml PP-Röhrchen gesetzt, das Zellsieb auf dem diesem befestigt und der Luer-Lock des Konnektorrings verschlossen. Zum Ablösen der Monozyten von den CD14 M-pluriBeads wurden 1 ml Waschpuffer und 1 ml Ablösungspuffer (engl.: „detachment buffer“, die Zusammensetzung des Puffers ist nicht bekannt) auf das Zellsieb pipettiert und die Zellen für 10 min bei RT inkubiert. Dabei wurde das Röhrchen samt Konnektoring und Sieb alle 2 min sanft im Kreis geschwenkt. Erneut wurde

1 ml Waschpuffer hinzugegeben und die Zellen durch sanftes auf und ab pipettieren (10 x) von den pluriBeads abgelöst. Hierbei sollte Luftblasen- bzw. Schaumbildung vermieden werden, da dies zu einem Verlust der Zielzellen führen kann. Anschließend wurde der Luer-Lock geöffnet, so dass die von den „beads“ abgelösten Zielzellen in das Röhrchen fließen konnten. Das Zellsieb wurde 10 x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und der Konnektoring und das Zellsieb danach entfernt. Die gewonnenen Zellen wurden für 10 min bei 250 x g ohne Bremse bei RT zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet in RPMI 1640-Medium resuspendiert.

3.1.6. Kultivierung humaner Monozyten

Zur Kultivierung humaner Monozyten wurden 50 ml Zellkulturröhrchen mit Filterdeckel verwendet. Es wurden ca. 15 bis 20 ml auf 37 °C erwärmtes RPMI 1640-Medium vorgelegt, die isolierten Monozyten hinzu pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ stehend für 24 h im Inkubator kultiviert. Um die Zellen zu pelletieren, wurde das 50 ml Zellkulturröhrchen für 10 min bei 200 x g bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl RPMI 1640-Medium resuspendiert und die Konzentration der Monozyten mit Hilfe des Hämozytometers in einer 1:10 Verdünnung bestimmt.

3.2. Zellbiologische Methoden für murine Proben

3.2.1. Blutentnahme

Für die Herzpunktion wurde das Versuchstier mit einem Gemisch aus Xylazin (0,8 mg/ml) und Ketamin (10 mg/ml) in sterilem PBS (pH 7,4) anästhesiert (10 µl/g Körpergewicht) und nach Eintritt der Narkose das Herz in Rückenlage lateral mit einer 1 ml-Spritze (+ 250 µl Natriumcitrat) mit einer 26 G-Microlance-3-Kanüle punktiert. Das Natriumcitrat bindet die Ca²⁺-Ionen im Blut und verhindert so eine vorzeitige Koagulation des Blutes. Dennoch sollte bei der Blutentnahme der Stempel der Spritze nicht zu schnell gezogen werden, da so eine Scherstress-induzierte Aktivierung der Thrombozyten verhindert werden kann und außerdem das Herz un-

ter dem sonst entstehenden Druck kollabieren könnte. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurde das Tier durch zervikale Dislokation getötet, dann die Kanüle von der Spritze entfernt und das Herzblut in ein 5 ml Polystyrolröhrchen überführt.

3.2.2. Generierung von murinem PRP

Um Thrombozyten-reiches Plasma zu generieren, wurde das Natriumcitrat-antikoagulierte Vollblut im Verhältnis 1 + 1 mit vorgewärmtem Tyrode's Puffer (37 °C, pH 7,4) in einem 5 ml Polystyrolröhrchen verdünnt und für 4 min bei 100 x g zentrifugiert. Der Überstand (PRP) wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches 5 ml Polystyrolröhrchen überführt. Alle Schritte erfolgten bei einer Temperatur von über 21 °C (RT), um eine Kälte-induzierte Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Anschließend wurde die Thrombozytenkonzentration der jeweiligen Plasmen mit Hilfe des Hämozytometers gemessen.

3.2.3. Generierung muriner gewaschener Thrombozyten

Murine gewaschene Thrombozyten wurden nach einem modifizierten Protokoll von Prof. Dr. Bernhard Nieswandt [210] generiert. Murines PRP wurde für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 600 µl Tyrode's Puffer resuspendiert. Die Thrombozytensuspension wurde für 5 min bei 37 °C im Wasserbad ruhen gelassen, anschließend erneut für 5 min bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 100 µl HEPES-Puffer resuspendiert. Alle Schritte erfolgten bei einer Temperatur von über 21 °C (RT), um eine Kälte-induzierte Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Anschließend wurde die Thrombozytenkonzentration mit Hilfe des Hämozytometers gemessen.

3.2.4. Isolierung muriner Makrophagen

Zur Isolierung muriner Makrophagen (MΦ) wurde das Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis von Patel et al. [211] modifiziert und angewandt. Dazu wurde dem Versuchstier 1 ml von dem Anreicherungsmedium Thioglykolat (2,98 %) intra-peritoneal injiziert (1 ml Spritze + 26 G-Microlance-3-Kanüle). Nach fünf Tagen war die Bauchhöhle mit Makrophagen besiedelt. Das Tier wurde mit CO₂ begast und nach Feststellung des Todes die kaudale Hälfte des Abdomens eröffnet. 10 ml eiskaltes

HBSS (pH 7,4, steril) wurden mit einer 10 ml Spritze (+ 23 G-Microlance-3-Kanüle) in die kaudal gelegene Hälfte des peritonealen Bauchraumes injiziert und die Maus leicht geschwenkt oder gerollt. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit der Spritze wieder abgesaugt und in ein 50 ml PP-Röhrchen auf Eis überführt (um Scherstress zu vermeiden, wurde dazu die Kanüle von der Spritze abgenommen). Die Makrophagen wurden für 10 min bei 400 x g, 4 °C zentrifugiert und das Pellet in RPMI 1640-Medium resuspendiert. Zellen von Mäusen des gleichen Stammes wurden hierbei zusammengeführt. Um die Makrophagen von weiteren Zellen wie z. B. Erythrozyten zu trennen, wurden die isolierten Zellen zu 10×10^6 M Φ /T_{182,5}-Flasche ausgesät und für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit auf 37 °C vorgewärmtem PBS (pH 7,2, steril) gewaschen und mit eiskaltem EDTA in PBS (pH 7,4, steril) und einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt, für 10 min bei 400 x g, 4 °C zentrifugiert und das Pellet in RPMI 1640-Medium resuspendiert. Die Makrophagenkonzentration wurde mit Hilfe des Hämozytometers gemessen.

3.2.5. Kultivierung muriner Makrophagen

Die murinen Makrophagen wurden in T_{182,5}-Flaschen mit Filterdeckel kultiviert. 20 ml RPMI 1640-Medium wurden in eine Flasche vorgelegt und die isolierten Makrophagen hinzu pipettiert (10×10^6 M Φ /T_{182,5}-Flasche). Die Kultivierung erfolgte für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Um die Zellen wieder in Suspension zu bringen, wurde das alte Medium abgesaugt, die Makrophagen mit auf 37 °C erwärmtem PBS (pH 7,2, steril) gewaschen und mit eiskaltem EDTA in PBS (pH 7,4, steril) und einem Zellschaber vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 10 min bei 200 x g, 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl RPMI 1640-Medium resuspendiert und die Makrophagenkonzentration mit Hilfe des Hämozytometers in einer 1:10 Verdünnung gemessen.

3.3. Analytische Methoden

3.3.1. Kalibrierte automatisierte Thrombographie („Calibrated Automated Thrombography“)

Die Phospholipid- bzw. Zell-abhängige Thrombingenerierung wurde mit der von Hemker et al. [212] und Jurk et al. [213] beschriebenen Methode der „kalibrierten automatisierten Thrombographie“ (engl.: „calibrated automated thrombography“, CAT) untersucht. Diese Methode ermöglicht es, die Generierung von Thrombin Plasma- und Zell-abhängig über eine bestimmte Zeit zu beobachten und kann zu der Diagnose einer thrombotischen Erkrankung oder auch Blutungsneigung beitragen. Thrombin gehört zu den Serinproteasen und spaltet in Proteinen und Peptiden innerhalb der Sequenz Leucin-Asparaginsäure-Prolin-Arginin-Serin nach dem Arginin [214]. Hier wird also das zu den Proben zugesetzte Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC zwischen dem „Arg“ und „AMC“ gespalten und die freigesetzte Fluoreszenz des 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) mit Hilfe des Fluoroskan Ascent Fluoreszenzlesegerät (Thrombinoskop) detektiert. Die Anregung erfolgt bei 390 nm im PFP/PRP bzw. 485 nm im Vollblut und die Emission bei 460 nm im PFP/PRP bzw. 538 nm im Vollblut. Je mehr Thrombin entsteht, desto höher wird das Fluoreszenzsignal. Die Fluorophorkonzentration und Fluoreszenzstärke sind jedoch nicht linear zueinander und die Umsatzgeschwindigkeit des Substrats nimmt mit sinkender Thrombinkonzentration ab. Weiterhin reduziert sich die Thrombinaktivität aufgrund von im Plasma natürlicherweise vorkommender Inhibitoren. Für diese Variablen und um eine konstante Thrombinaktivität messen zu können, wird eine Kompensation vorgenommen, die durch den Einsatz eines Thrombin-Kalibrators als Referenz stattfindet. Dieser Kalibrator enthält den α -2-Makroglobulin-Thrombin-Komplex (α -2M-T-Komplex), welcher das Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC Thrombin-ähnlich spaltet, jedoch nicht durch die Plasma-Inhibitoren gehemmt wird. Der Thrombin-Kalibrator wird zu Spender:innen-identischem PFP pipettiert und die Messung der Kalibrator-„Wells“ mit den Fluoreszenzmessungen der Proben-„Wells“ verglichen [212].

3.3.2. Thrombin-, „Tissue Factor“- und Batroxobin-induzierte Thrombingenerierung in humanem PRP und von humanen gewaschenen Thrombozyten in Plasma

Zunächst wurden das Fluoreszenzlesegerät und der Computer angeschaltet und die Software von Thrombinoscope B.V. gestartet. Für die Messung in PRP oder von

gewaschenen Thrombozyten in Plasma wurde die Temperatur des Messgeräts auf 37 °C, die Wellenlängen auf 390 nm (Anregung) und 460 nm (Emission) gestellt sowie das Dispensieren (20 µl) und Schütteln (10 sek) aktiviert. Der Wert für die Kalibrator-Aktivität wurde kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert (die Aktivität des Kalibrators ist abhängig von der jeweiligen Charge, die Angabe dafür befindet sich auf jedem Kalibrator-Flakon). Mit Hilfe der Benutzeroberfläche „Plate Setup“ wurde dann ein Pipettierschema nach dem Protokoll von Thrombinsoscope B.V. („The Thrombogram Guide, Part II“) je nach Probenanzahl erstellt. Als Kalibrator dienten dabei Triplikate, die dann mit den Proben (Duplikate bzw. Triplikate) in einer Gruppe zusammengefasst wurden. Die lyophilisierten Reagenzien (PRP-Reagenz und Kalibrator) wurden mit 1 ml Wasser für Injektionszwecke gelöst und das benötigte Volumen Fluo-Substrat in einem Verhältnis von 1:40 mit dem Fluo-Puffer vermischt (FluCa).

Für die Messung wurde/n PRP oder gewaschene Thrombozyten mit PFP bzw. Kontroll- bzw. Gerinnungsfaktor-depletiertem oder defibriniertem Plasma auf 150×10^3 Thrombozyten (TZ)/µl eingestellt und je 80 µl in ein „Well“ einer transparenten 96-„Well“ Platte mit Rundboden pipettiert. In Experimenten mit IgG-Antikörpern wurde das PRP zunächst für 10 min mit dem anti-CD32a Antikörper Klon IV.3 (finale Konzentration 10 µg/ml) inkubiert, um eine unspezifische Aktivierung durch den Fcy-Rezeptor IIa auf Thrombozyten zu vermeiden. Blockierende Antikörper, Inhibitoren, Peptide und andere Effektoren wurden anschließend pipettiert (Tabelle 14) und ggf. inkubiert, bevor 20 µl des Aktivators PRP-Reagenz („Tissue Factor“ + Phospholipide (TF), finale Konzentration 1 pM) oder Thrombin (Thr, finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) oder Batroxobin (finale Konzentration 1 U/ml) pipettiert wurden. Anschließend wurde die 96-„Well“ Platte in dem Gerät platziert und „Start“ geklickt. Nun wurde den Anweisungen durch die Software gefolgt und die Thrombingenerierung durch die automatisierte Zugabe von 20 µl auf 37 °C vorgewärmtem FluCa durch das Thrombinsoskop gestartet. Die Thrombozyten-abhängige Thrombingenerierung wurde mit den oben beschriebenen Einstellungen über 60 min in Intervallen von 20 sek gemessen.

Tabelle 14: Konzentrationen und Inkubationszeiten der in der CAT eingesetzten Antikörper, Inhibitoren, Peptide und anderer Effektoren.

anti-CD32a Antikörper, Klon IV.3 (10 µg/ml, 10 min Prä- Inkubation)	Antikörper/Inhibitor/Peptid/Effektor	Inkuba- tion bei RT	finale Konzentrati on
	Annexin V	-	0,5 µg/ml
✓	anti-CD36 Antikörper, Klon 185-1G2	10 min	5 µg/ml
✓	anti-CD36 Antikörper, Klon CLB-IVC7	10 min	5 µg/ml
✓	anti-CD36 Antikörper, Klon FA6.152	10 min	5 µg/ml
✓	anti-GPIIbα Antikörper, Klon SZ2	10 min	5 µg/ml und 10 µg/ml
✓	anti-TF Antikörper, Klon VD8	10 min	5 µg/ml
✓	anti-TSP-1 Antikörper, Klon A4.1	10 min	5 µg/ml
	CD36 P(93-110) DMSO als Kontrolle	10 min	12,5 µg/ml 0,125 % (v/v)
	Fibrinogen, human	-	4 mM
	FXI, human	-	1 U/ml
	GPRP	-	2,5 mM
✓	IgG Isotyp-Kontrolle	10 min	5 µg/ml
	Iloprost	10 min	10 nM
	P2Y ₁₂ -Inhibitor AR-C69931	5 min	5 µM
	Syk Kinase-Inhibitor IV	10 min	1,25 µg/ml
	Tirofiban	-	5 µM
	TSP-1 Peptid CSVTCG DMSO als Kontrolle	10 min	50 µM 0,5 % (v/v)

Die Software ermöglichte die Berechnung der Parameter „lag time“ (Verzögerung bis zum Beginn der Thrombingenerierung), „endogenes Thrombinpotenzial, etp“ (Fläche unter der Kurve, Thrombingenerierung über die Zeit) und „thrombin peak“ (Maximum der gemessenen Thrombingenerierung). Nach Korrektur der Rohdaten wurde von der Software eine Excel-Datei ausgegeben, in der alle zur Auswertung wichtigen Parameter („lag time“, „etp“, „thrombin peak“) enthalten waren und die in die Software Graph Pad Prism übertragen wurden, um Thrombogramme (Visualisierung der Thrombingenerierung, bei der die Menge des detektierten Thrombins in nM gegen die Zeit in min aufgetragen wird) und quantitative Diagramme zu erstellen. Abbildung 9 zeigt beispielhaft ein mit Hilfe von Graph Pad Prism erstelltes Thrombogramm.

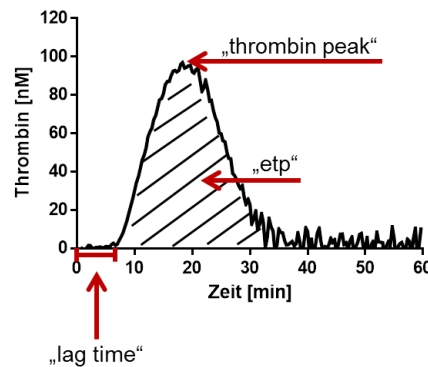


Abbildung 9: Beispiel-Thrombogramm mit „lag time“, „endogenem Thrombinpotenzial, etp“ und „thrombin peak“.

„Lag time“: Verzögerung bis zum Beginn der Thrombingenerierung, „endogenes Thrombinpotenzial, etp“: Fläche unter der Kurve, Thrombingenerierung, „thrombin peak“: Maximum der gemessenen Thrombingenerierung.

3.3.3. Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in humanem Citrat-Vollblut

Die Thrombingenerierung im Vollblut wurde nach der von Ninivaggi et al. [215] beschriebenen CAT-Methode untersucht. Zunächst wurden das Thrombinoskop und der Computer angeschaltet und die Software von Thrombinscope B.V. gestartet. Für die Messung in Vollblut wurde die Temperatur des Messgeräts auf 37 °C und die Wellenlängen auf 485 nm (Anregung) und 538 nm (Emission) gestellt sowie das Dispensieren und Schütteln deaktiviert. Der Wert für die Kalibrator-Aktivität wurde kontrolliert und ggf. korrigiert (die Aktivität des Kalibrators ist abhängig von der jeweiligen Charge, die Angabe dafür befindet sich auf jedem Kalibrator-Flakon). Mit Hilfe der Benutzeroberfläche „Plate Setup“ wurde dann ein Pipettierschema nach dem Protokoll von Thrombinsoscope („The Thrombogram Guide, Part II“) je nach Probenanzahl erstellt. Als Kalibrator dienten dabei Duplikate, die mit den Vollblutproben (Unikate bzw. Duplikate) in einer Gruppe zusammengefasst wurden. Das lyophilisierte PRP-Reagenz wurde in 1 ml und der lyophilisierte Kalibrator in 250 µl Wasser für Injektionszwecke gelöst und das fluoreszierende Substrat Rhodamin (P₂Rho, 10 mM) in einem Verhältnis von 1:5,5 mit Tyrode's Puffer (pH 7,4) verdünnt und gut gemischt. Mit einem Loch Eisen wurden 180 µm dicke Filterpapiere mit einem Durchmesser von 5 mm ausgestanzt und in eine 96-„Well“ Platte mit flachem Boden eingesetzt.

Für die Messung im Vollblut wurden zu 30 µl Citrat-Vollblut in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152 (10 min Inkubation bei RT, finale Konzentration 5 µg/ml), 10 µl P₂Rho (finale Konzentration 300 µM), 5 µl Aktivator (TF, finale Konzentration 0,5 pM oder Thrombin, finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) und um die Thrombingenerierung zu starten 15 µl HEPES-CaCl₂-BSA-Puffer (finale Konzentration CaCl₂ 16,7 mM) pipettiert und vorsichtig vermischt. Ein Filterpapier wurde mit je 5 µl des Citrat-Vollblut-Gemischs getränkt und mit 40 µl vorgewärmtem Mineralöl (37 °C) überschichtet. Die Thrombozyten-abhängige Thrombingenerierung im Citrat-Vollblut wurde mit den oben beschriebenen Einstellungen über 60 min in Intervallen von 20 sek gemessen. Die Auswertung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie für die Thrombingenerierung in Kapitel 3.3.2. beschrieben.

3.3.4. Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in humanem PRP und PFP in An- bzw. Abwesenheit von Dabigatran

Die Monozyten-induzierte Thrombingenerierung wurde mit Hilfe der CAT-Methode untersucht. Wie im ersten Absatz von Kapitel 3.3.2. beschrieben, wurden die Geräte angeschaltet, die Software gestartet, die gewünschten Parameter eingestellt (Temperatur, Anregung und Emission, Dispensieren, Schütteln, Kalibrator-Aktivität, „Plate Setup“) und die benötigten Reagenzien (Kalibrator, FluCa) vorbereitet.

Für die Messung wurde PRP mit PFP auf 50 x 10³ TZ/µl eingestellt oder PFP pur verwendet und je 80 µl in ein „Well“ einer transparenten 96-„Well“ Platte mit Rundboden pipettiert. Je Ansatz wurden 20 µl Tyrode's Puffer (pH 7,4) vorgelegt und anschließend isolierte und für 24 h über Nacht kultivierte Monozyten (Kapitel 3.1.5. und 3.1.6.) hinzu pipettiert (finale Konzentrationen 0 Monozyten/µl (MZ/µl), 250 MZ/µl, 500 MZ/µl, 1 000 MZ/µl und 2 000 MZ/µl). Sollte der Versuch in Gegenwart von Dabigatran stattfinden, wurden je Ansatz 20 µl Tyrode's Puffer vorgelegt und isolierte und für 24 h über Nacht kultivierte Monozyten (finale Konzentration 2 000 MZ/µl), die zuvor für 5 min mit Dabigatran (finale Konzentrationen 0 nM, 50 nM, 100 nM und 200 nM) inkubiert wurden, hinzu pipettiert. Entsprechende Kontrollen (DMSO + 5 % HCl) wurden mitgeführt. Die 96-„Well“ Platte wurde in dem Gerät platziert und „Start“ geklickt. Nun wurde den Anweisungen der Software gefolgt und die Thrombingenerierung durch die automatisierte Zugabe von 20 µl auf 37 °C vorgewärmtem FluCa durch das Thrombinoskop gestartet. Die Monozyten-

induzierte Thrombingenerierung in PRP und PFP wurde mit den oben beschriebenen Einstellungen über 60 min in Intervallen von 20 sek gemessen. Die Auswertung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie für die Thrombingenerierung in Kapitel 3.3.2. beschrieben.

3.3.5. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich Zellen je nach Form, Struktur, Größe und Fluoreszenzfärbung mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Markern analysieren. Die zu messenden Zellen fließen einzeln an einem Laserstrahl vorbei und das dabei entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal wird von einem Detektor ausgewertet. Das Vorwärtsstreulicht (engl.: „forward scatter“, FSC) hängt von der Größe der Zelle ab, während das Seitwärtsstreulicht (engl.: „side scatter“, SSC) von der Granularität der Zelle beeinflusst wird. Weiterhin können Zellen durch die Bindung von Fluorochrom-markierten Antikörpern oder anderen Markierungssubstanzen an die jeweiligen Oberflächenproteine „gefärbt“ werden. Der Fluoreszenzfarbstoff wird durch den Laser angeregt und emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dieses wird von dem Durchflusszytometer detektiert und visualisiert. Je mehr Fluorochrom-markierter Antikörper/Marker binden kann, desto stärker ist das detektierte Fluoreszenzsignal. In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluorochrome Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) verwendet.

3.3.6. Thrombozytenfunktionsanalysen, human

Um zu untersuchen, welche Rolle der Thrombozytenrezeptor CD36 bei der Thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung spielt, wurde PRP mit PFP auf 150×10^3 TZ/ μ l eingestellt und in einem Verhältnis von 1:10 mit Tyrode's Puffer (pH 7,4) verdünnt. Je 80 μ l des verdünnten PRP wurden in 5 ml Polystyrolröhrchen überführt und in Gegenwart des Peptids H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH (GPRP, finale Konzentration 3,75 mM) zunächst für 10 min bei RT mit anti-CD32a Antikörper IV.3 (finale Konzentration 10 μ g/ml) inkubiert, um eine unspezifische Aktivierung durch IgG über den Fc γ -Rezeptor IIa zu vermeiden. Das Peptid GPRP verhindert die Polymerisierung von Fibrin und somit eine Gerinnselformung der Thrombozyten, so dass singuläre Thrombozyten analysiert werden können. Anschließend wurde das PRP

mit anti-CD36 Antikörper FA6.152 (finale Konzentration 5 µg/ml) bzw. der entsprechenden IgG Isotyp-Kontrolle für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden 20 µl α-Thrombin (finale Konzentration 1 nM = 0,05 U/ml) und um die Thrombozytenaktivierung zu starten 20 µl Calciumchlorid (CaCl₂, finale Konzentration 1,7 mM bzw. 12 mM bei Annexin V-Detektion) hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurden je 30 µl des so stimulierten PRP mit den jeweiligen Fluorochrom-markierten Antikörpern (Tabelle 15) für weitere 15 min bei RT „gefärbt“ und nach Zugabe von 500 µl Tyrode's Puffer mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. Singuläre Thrombozyten wurden über die Größe (FSC) identifiziert und als Population selektiert. Für die Granula-Sekretion, α_{IIb}β₃-Aktivierung, Bindung von Fibrinogen, TSP-1, vWF und FV, FVIII, FIX und FX sowie die Phosphatidylserin-Präsentation wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der jeweiligen Antikörper-markierten Thrombozyten prozentual zur mittleren Fluoreszenzintensität der entsprechenden IgG Isotyp-Kontrolle-markierten Thrombozyten ($\pm$ 100 %) dargestellt.

Tabelle 15: Antikörper und CaCl₂-Konzentrationen für die Funktionsanalyse humaner Thrombozyten.

Parameter	Antikörper und Fluorochrommarkierung	finale Antikörper-Konzentration	finale CaCl ₂ -Konzentration
α-Granula-Sekretion	anti-CD62P FITC	5 µg/ml	1,7 mM
δ-Granula- und Lysosomen-Sekretion	anti-CD63 FITC	5 µg/ml	1,7 mM
aktivierter α _{IIb} β ₃ -Rezeptor	anti-Integrin α _{IIb} β ₃ (PAC-1) FITC	5 µg/ml	1,7 mM
Fibrinogen-Bindung	anti-Fibrinogen FITC	5 µg/ml	1,7 mM
FV-Bindung	anti-FV FITC	5 µg/ml	1,7 mM
FVIII-Bindung	anti-FVIII FITC	5 µg/ml	1,7 mM
FIX-Bindung	anti-FIX FITC	5 µg/ml	1,7 mM
FX-Bindung	anti-FX FITC	5 µg/ml	1,7 mM
IgG Isotyp-Kontrolle	IgG Isotyp-Kontrolle FITC, Ziege	5 µg/ml	1,7 mM
IgG Isotyp-Kontrolle	IgG Isotyp-Kontrolle FITC, Schaf	5 µg/ml	1,7 mM
IgG Isotyp-Kontrolle	IgG Isotyp-Kontrolle FITC, Maus	5 µg/ml	1,7 mM

IgG Isotyp-Kontrolle	IgG Isotyp-Kontrolle PE, Maus	5 µg/ml	1,7 mM
Phosphatidylserin-Präsentation	Annexin V FITC	5 µg/ml	12,0 mM
TSP-1-Bindung	anti-TSP-1 PE	2,5 µg/ml	1,7 mM
vWF-Bindung	anti-vWF FITC	5 µg/ml	1,7 mM

3.3.7. Quantifizierung des Thrombozytenrezeptors CD36 in humanem PRP

Für die Quantifizierung des CD36-Rezeptors auf Thrombozyten wurden 100 µl mit PBS (pH 7,4) verdünntes PRP (1:7) mit 100 µl Formaldehyd (FA) (1 % v/v) in PBS (finale FA-Konzentration 0,5 % (v/v)) für 30 min bei RT fixiert, anschließend mit 1 ml PBS versehen und für 10 min bei 800 x g, Bremse 9 zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und die fixierten Thrombozyten in 1 ml PBS resuspendiert. Je 100 µl der Thrombozytensuspension wurden mit FITC-markiertem anti-CD36 Antikörper bzw. mit entsprechender IgG Isotyp-Kontrolle FITC markiert (finale Konzentration 5 µg/ml) und auf dem Schüttler für 45 min bei 120 rpm, RT inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen mit PBS auf 2 ml aufgefüllt und für 10 min bei 800 x g, Bremse 9 zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und 500 µl PBS hinzu pipettiert. Die Analyse der markierten Thrombozyten erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers. Singuläre Thrombozyten wurden über die Größe (FSC) identifiziert und als Population selektiert. Um die Anzahl der Rezeptoren zu berechnen wurde die mediane Fluoreszenzintensität der CD36 FITC-markierten Thrombozyten mit 55,8 und die mediane Fluoreszenzintensität der IgG Isotyp Kontrolle-markierten Thrombozyten mit 295,84 multipliziert. Diese Faktoren wurden mit Hilfe von Standardgleichgeraden ermittelt. Für die Darstellung der Korrelation zwischen dem CAT-detektierten Thrombin-induzierten „etp“ bzw. dem verbliebenen „etp“ nach Inkubation mit anti-CD36 Antikörper FA6.152 und der CD36-Rezeptoranzahl wurde das „etp“ (absolute Werte, nM*min) bzw. das verbliebene „etp“ (%) gegen die CD36-Rezeptoranzahl aufgetragen. Mit Hilfe von Graph Pad Prism wurden die Abbildungen erstellt und die lineare Regression bzw. die Korrelation ermittelt.

3.3.8. Präparation von CD36- bzw. Fibrin-beschichteten Polystyrol-Latexkügelchen

Zunächst wurden 100 µl Polystyrol-Latexkügelchen (3 µm) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit PBS (pH 7,4) auf 1,5 ml aufgefüllt und für 10 min bei 10 000 x g, RT zentrifugiert, um die in der Suspension enthaltenen anorganischen Salze und Tenside herauszuwaschen. Der klare Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit 1 ml PBS versehen. Da die Kügelchen aufgrund der nun fehlenden anorganischen Salze und Tenside leicht zusammenklebten, wurde das 1,5 ml Reaktionsgefäß für 4 min in ein Ultraschallbad gestellt und der Inhalt anschließend auf einem Vortexmischer gemischt, um das Pellet vollständig zu lösen. Erneut wurden die Kügelchen für 10 min bei 10 000 x g, RT zentrifugiert und der Waschschrift ein zweites Mal wiederholt. Im Anschluss an den zweiten Waschschrift wurde für die Beschichtung mit humanem CD36-Fragment der klare Überstand abgenommen und das Pellet zunächst in einem kleinen Volumen PBS im Ultraschallbad resuspendiert. Anschließend wurde das rekombinante Fragment von humanem CD36 bzw. BSA (finale Konzentration 300 µg/ml) hinzu pipettiert und die Kügelchen für 1 h bei RT auf dem Schwenktisch inkubiert. Das CD36-Fragment ist etwa 48 kDa schwer und umfasst die Aminosäuren 30 bis 439 des humanen CD36-Rezeptors. Es fungiert somit als Rezeptor für Liganden wie z. B. TSP-1, oxLDL, anionische Phospholipide oder langkettige Fettsäuren. BSA wurde verwendet, um eine unspezifische Bindung von Plasmabestandteilen an die Kügelchenoberfläche zu vermeiden, die BSA-beschichteten Kügelchen dienten daher als Negativkontrolle.

Für die Beschichtung der Kügelchen mit löslichem Fibrin wurden diese mit hochreinem humanem Fibrinogen (finale Konzentration 50 µg/ml) in TBS-Puffer (pH 7,4) in Gegenwart von Batroxobin (finale Konzentration 1 U/ml), GPRP (finale Konzentration 5 mM) und CaCl₂ (finale Konzentration 2 mM) für 1 h bei RT schwenkend inkubiert. Analog wurden Polystyrol-Latexkügelchen mit humanem Albumin (finale Konzentration 50 µg/ml) beschichtet. Da humanes Albumin im Gegensatz zu Fibrin keine Aggregations-fördernden Eigenschaften besitzt, dienten die Albumin-beschichteten Kügelchen als Negativkontrolle. Nach einem weiteren Zentrifugations-schritt für 10 min bei 10 000 x g, RT wurden die jeweiligen Pellets in Tyrode's Puffer resuspendiert.

3.3.9. Analyse der Bindungseigenschaften von aufgereinigten Adhäsionsproteinen an CD36-beschichtete Kügelchen

Die CD36- oder BSA-beschichteten Kügelchen wurden für 15 min bei RT mit anti-CD36 Antikörper FA6.152 (finale Konzentration 5 µg/ml) vorinkubiert und mit Alexa 488-konjugiertem hochreinem humanem Fibrinogen (finale Konzentration 50 µg/ml) in An- oder Abwesenheit von Batroxobin (finale Konzentration 1 U/ml) markiert oder ohne anti-CD36 Antikörper FA6.152 mit FITC-konjugiertem hochreinem humanem TSP-1 oder humanem vWF (finale Konzentration 50 µg/ml) in Gegenwart von GPRP (finale Konzentration 1,25 mM) und CaCl₂ (finale Konzentration 3,4 mM) inkubiert. Anschließend wurden die Kügelchen mit 500 µl Tyrode's Puffer gewaschen und für 10 min bei 10 000 x g, RT zentrifugiert. Die mit vWF inkubierten Kügelchen wurden mit anti-vWF FITC (1:2 000) markiert und erneut mit 500 µl Tyrode's Puffer gewaschen und für 10 min bei 10 000 x g, RT zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die Überstände vorsichtig abpipettiert, die jeweiligen Pellets in 500 µl Tyrode's Puffer gelöst und 10 000 Kügelchen pro Probe im Durchflusssystem gemessen. Die jeweilige mittlere Fluoreszenzintensität der BSA- beschichteten bzw. der IgG Isotyp-Kontrolle-„gefärbten“ Kügelchen wurde als unspezifische Fluoreszenzintensität von der mittleren Fluoreszenzintensität der CD36-beschichteten Kügelchen subtrahiert und mit Hilfe von Graph Pad Prism Abbildungen und Statistiken erstellt.

3.3.10. Analyse der Bindungseigenschaften von Adhäsionsproteinen und Koagulationsfaktoren im Plasma an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen

Die CD36- bzw. BSA-beschichteten Kügelchen wurden entweder in humanem PFP oder DFP, welches zuvor in einem Verhältnis von 1:5 mit Tyrode's Puffer (pH 7,4) verdünnt wurde, in Gegenwart von GPRP (finale Konzentration 17,5 mM) und CaCl₂ (finale Konzentration 3,4 mM) in An- oder Abwesenheit von Thrombin (finale Konzentration 0,025 U/ml) für 30 min, RT schwenkend inkubiert. Anschließend wurden die Kügelchen zwei Mal mit Tyrode's Puffer gewaschen und für 10 min bei 10 000 x g, RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Tyrode's Puffer resuspendiert, je 100 µl in ein 5 ml PP-Röhrchen pipettiert und mit den in Tabelle 16 aufgeführten Antikörpern bzw. entsprechenden IgG Isotyp-Kontrollen für 15 min bei RT inkubiert.

Tabelle 16: Antikörper für die Analyse der Bindungseigenschaften von Plasma-Adhäsionsproteinen und Koagulationsfaktoren an CD36-beschichtete Kügelchen.

Parameter	Antikörper und Fluorochrommarkierung	finale Konzentration
Fibrinogen-Bindung	anti-Fibrinogen FITC	1:200
Gerinnungsfaktor V	anti-FV FITC	10 µg/ml
Gerinnungsfaktor VIII	anti-FVIII FITC	10 µg/ml
Gerinnungsfaktor IX	anti-FIX FITC	10 µg/ml
Gerinnungsfaktor X	anti-FX FITC	10 µg/ml
IgG Isotyp-Kontrolle	IgG Isotyp FITC, Ziege	10 µg/ml
IgG Isotyp-Kontrolle	IgG Isotyp FITC, Schaf	10 µg/ml
IgG Isotyp-Kontrolle	IgG Isotyp FITC, Maus	10 µg/ml
IgG Isotyp-Kontrolle	IgG Isotyp PE, Maus	10 µg/ml
TSP-1-Bindung	anti-TSP-1 PE	50 µg/ml
vWF-Bindung	anti-vWF FITC	1:20

Es wurden 10 000 Kügelchen pro Probe im Durchflusszytometer gemessen. Die jeweilige mittlere Fluoreszenzintensität der BSA- beschichteten bzw. der IgG Isotyp-Kontrolle-gefärbten Kügelchen wurde als unspezifische Fluoreszenzintensität von der mittleren Fluoreszenzintensität der CD36-beschichteten Kügelchen subtrahiert und mit Hilfe von Graph Pad Prism Abbildungen und Statistiken erstellt.

3.3.11. Analyse der Bindungseigenschaften von aufgereinigten humanen Gerinnungsfaktoren an Fibrin-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen

Die humanen Gerinnungsfaktoren V, VIII, IX und X wurden in Münster in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Beate Kehrel nach dem Protokoll von Xia et al. [216] mit dem Fluorochrom FITC in TBS-Puffer (pH 7,4) gekoppelt. Die Analyse der Bindungseigenschaften von FITC-gekoppelten Gerinnungsfaktoren an Fibrin-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen (3 µm) erfolgte ebenfalls in Münster nach dem Protokoll von Jurk et al. [213] in An- bzw. Abwesenheit des Thiol-Blockers 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB, finale Konzentration 2,5 mM) für 30 min bei RT mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

3.3.12. Reinheitsbestimmung und Phänotypisierung humaner Monozyten

Um die Reinheit der aus „Buffy Coats“ isolierten humanen Monozyten zu untersuchen, wurden diese mit einem Antikörper gegen das Monozyten-spezifische Antigen

CD14 markiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurden die isolierten Zellen zunächst in einem Verhältnis 1 + 3 mit Tyrode's Puffer (pH 7,4) verdünnt und anschließend in einem Verhältnis von 1 + 1 mit 4 % (v/v) FA in Tyrode's Puffer (finale FA-Konzentration 2 % (v/v)) für 15 min bei RT fixiert. Danach wurden 2 ml Tyrode's Puffer hinzu pipettiert und die fixierten Monozyten für 5 min bei 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und der anti-CD14 FITC Antikörper im Verhältnis 1:20 pipettiert. Nach der 15-minütigen Färbung (schüttelnd bei 120 rpm, RT, dunkel) wurden 300 µl Tyrode's Puffer hinzugefügt und die Proben mit dem Durchflusszytometer gemessen und analysiert. Die Monozytenpopulation ohne gebundene Thrombozyten entsprach CD14-positiven Zellen und wurde prozentual zur Gesamtzahl (± 100 %) an detektierten Leukozyten berechnet. Ebenso wurden die Monozyten auf ihre Aktivität analysiert, dafür wurden die isolierten Monozyten mit RPMI 1640-Medium auf 2×10^6 Monozyten/ml eingestellt und mit dem Monozyten-spezifischen Marker anti-CD14 FITC und jeweils mit einem für die Aktivität spezifischen Marker anti-CD11b PE, anti-ICAM-1 PE, anti-VCAM-1 PE oder anti-TSP-1 PE sowie der jeweiligen IgG Isotyp-Kontrolle PE für 15 min bei RT „gefärbt“. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden 10 000 Zellen/Probe analysiert und der Mittelwert der linearen Fluoreszenzintensität dargestellt.

3.3.13. Reinheitsbestimmung muriner singulärer Makrophagen

Um die Reinheit der isolierten Makrophagen zu untersuchen, wurden diese mit spezifischen Markern „gefärbt“ und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurden 100 µl Makrophagensuspension mit anti-CD41 Antikörper FITC (1:50) und anti-F4/80 Antikörper PE (1:50) für 15 min leicht schüttelnd (80 rpm) markiert und nach Zugabe von 500 µl Tyrode's Puffer mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Es wurden 10 000 Zellen/Probe detektiert. Der anti-CD41 Antikörper bindet an α_{IIb} , das auf Thrombozyten exprimiert wird, während der anti-F4/80 Antikörper das F4/80-Antigen auf murinen Makrophagen detektiert. Die Makrophagenpopulation entsprach also F4/80-positiven (CD41-negativen) Zellen und wurde prozentual zur Gesamtzahl (± 100 %) an detektierten Makrophagen berechnet.

3.4. Zellkultur

3.4.1. Kryokonservierung und Kultivierung humaner mikrovaskulärer Endothelzellen (HMEC-1)

Kryokonservierung ist die Aufbewahrung von Zellen in eingefrorenem Zustand. Um auf HMEC-1 zurückgreifen zu können, die möglichst wenig passagiert wurden, wurde beim Umsetzen der Erhaltungskultur übrig gebliebene Zellsuspension mit 10 % (v/v) DMSO versetzt und in Kryoröhrchen überführt. Das DMSO fungiert hierbei als eine Art Gefrierschutzmittel. Zunächst wurde 100 % DMSO mit 4 °C kaltem Endothelzell-Medium auf 20 % (v/v) verdünnt. Anschließend wurde das DMSO-Medium-Gemisch in einem Verhältnis von 1 + 1 zu der Zellsuspension getropft, um einen zu starken Temperaturanstieg zu vermeiden. Hier wurde zusätzlich auf Eis zu gearbeitet. Zügig wurde je 1 ml DMSO-Zellsuspension in zuvor beschriftete 1,8 ml-Kryoröhrchen überführt und diese für 24 h in einem Kryoeinfrierbehälter bei -80 °C eingefroren. Im Anschluss daran wurden die Kryoröhrchen für die dauerhafte Aufbewahrung bei etwa -195 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um die Endothelzellen (EZ) wieder in Kultur aufzunehmen, wurden die EZ im Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Da DMSO zelltoxisch wirkt, wurde die Zellsuspension danach zügig aus dem Kryoröhrchen in 5 ml Endothelzell-Medium gegeben und für 10 min bei 2 000 x g, Bremse 9, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 1 ml Endothelzell-Medium resuspendiert und in eine T₂₅-Flasche mit Filterdeckel zu 7 ml frischem Endothelzell-Medium pipettiert. Sobald der Flaschenboden zu ca. 80 % konfluent war, wurden die Zellen mit 10 ml frischem Medium in eine T₇₅-Flasche passagiert.

3.4.2. Passagieren der Endothelzell-Erhaltungskultur

Die HMEC-1 wurden in T₇₅-Flaschen mit Filterdeckel kultiviert. Sobald eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht war, wurden die HMEC-1 passagiert, um eine durch den Zellkontakt verlangsamte Zellteilung zu vermeiden. Dazu wurde das verbrauchte Medium vorsichtig abgesaugt, ohne den Zellrasen zu beschädigen und die EZ mit auf 37 °C erwärmtem PBS (pH 7,2, steril) gewaschen. Die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden erfolgte durch Zugabe von 2 ml Accutase und Inkubation im Brutschrank für ca. 2 min. Anschließend wurden die Zellen durch gutes Spülen

des Flaschenbodens mit 10 ml PBS abgelöst, in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und für 10 min bei 800 x g, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml frischem Endothelzell-Medium resuspendiert. In einer neuen T₇₅-Flasche wurden 10 ml Endothelzell-Medium vorgelegt und die Zellen je nach Bedarf aufgeteilt. Üblich war eine Auftrennung der Zellen im Verhältnis 1:50.

3.4.3. Lebendzellzahl-Bestimmung

Für das Flusskammer-Experiment musste die Lebendzellzahl der HMEC-1 bekannt sein. Diese wurde mit Hilfe von Trypanblau und der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Trypanblau färbt die Zellen, deren Zellmembran nicht intakt ist, blau an, so dass die toten von den lebenden Zellen unterschieden werden können. Zu 10 µl der Zellsuspension wurden 90 µl Trypanblau (0,5 % w/v) gegeben (Verhältnis 1:10) und 10 µl dieser Verdünnung in die Zählkammer pipettiert. Es wurden vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt. Anhand folgender Formel konnte die Konzentration der lebenden Zellen bestimmt werden:

$$\frac{\text{Summe der Zellen aus Großquadraten}}{4} \times 10^5 = \text{Zellen/ml}$$

Die Konzentration sollte für die Einsaat in den Flusskammerplattenkanal mindestens 1×10^7 EZ/ml betragen, um am Folgetag einen konfluenten Endothelzellrasen zu erhalten.

3.5. Flusskammer-Experimente unter dynamischen Bedingungen

Unter physiologischen Bedingungen zirkuliert das Blut in den Blutgefäßen mit einem bestimmten Scherstress, der in kleinen Arterien bzw. Arteriolen und in stenotisch verengten Blutgefäßen erhöht ist. In der vorliegenden Arbeit wurde das System BioFlux 1000z der Firma Fluxion Biosciences verwendet, um zu analysieren, welche Rolle Thrombin und Thrombospondin-1 bei der Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen an das Endothel spielen. Es wurde die Adhäsion, Migration und Transmigration von Monozyten/Makrophagen an/auf/durch eine/r Endothelzellschicht untersucht.

Das Flusskammersystem BioFlux 1000z besteht aus einem Druckverteiler (BioFlux Controller), einer automatisierten Epifluoreszenzmikroskopstation (invertiertes Mikroskop mit CCD Kamera), einem automatisierten Objektisch und der BioFlux Montage Software. Die Flusskammerplatte beinhaltet eine definierte Anzahl an „Wells“, von denen jeweils zwei, das Einlauf-„Well“ (engl.: „Inlet-Well“, kurz „Inlet“) und das Ablauf-„Well“ (engl.: „Outlet-Well“, kurz „Outlet“), durch einen Kanal miteinander verbunden sind. Diese Platte wird in eine Vorrichtung auf dem beweglichen Objektisch eingespannt und ein Deckel aufgesetzt, der mit dem Druckverteiler verbunden ist. Über diesen wird Druck aufgebaut, so dass Flüssigkeiten von einem „Well“ in das andere fließen können. Dieser Prozess wird mit Hilfe des Mikroskops in Echtzeit beobachtet und über das „Control Module“ der BioFlux Software gesteuert. Erstellte Fotos können sequenziert analysiert werden. Parameter, wie z. B. die Flussgeschwindigkeit, -richtung, -takt sowie Analyse-Positionen, Dauer des Experiments, Intervall, in dem Fotos gemacht werden und die Wahl des Fluoreszenzkanals für die Fotoerstellung können zudem entsprechend des Versuchsaufbaus automatisiert werden.

3.5.1. Beschichtung der Kanaloberfläche

Zunächst wurde gewährleistet, dass die Endothelzellen an der Oberfläche des Plattenkanals haften blieben. Hierfür wurde Fibronectin als Adhäsionsmolekül ausgewählt. Es wurden 20 µl Fibronectin (200 µg/ml) in das zum Beobachtungskanal gehörige „Outlet“ pipettiert. Mit ca. 0,2 dyn/cm² (die Einheit „dyn/cm²“ beschreibt den Scherstress-assoziierten Druck, 1 dyn/cm² $\triangleq$ 0,1 Pascal) wurde nun die Flüssigkeit vorsichtig bis kurz hinter den zu beobachtenden Teil des Kanals gepumpt (Abbildung 10, grüne Pfeilspitze) und der Druck gestoppt. So wurde vermieden, dass die EZ sich auch im restlichen Teil des Kanals festsetzten. Nach einer Adhäsionszeit von 30 min bei RT wurden ca. 150 µl EZ-Medium in das „Outlet“ (um Blasen im Kanal zu vermeiden, sollte nicht vom „Inlet“ in das „Outlet“ gepumpt werden) gegeben und der Kanal für ca. 5 min bei 0,6 dyn/cm² gespült.

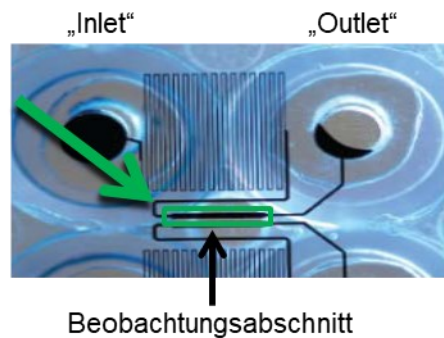


Abbildung 10: „Inlet-“ und „Outlet-Well“ einer 48-„Well“ Flusskammerplatte mit Beobachtungsabschnitt.

Modifiziert von der Fluxion Biosciences-Internetpräsenz [217].

In der Zwischenzeit wurden die Endothelzellen für die Einsaat in den Kanal vorbereitet. Dazu wurden die HMEC-1 wie in Kapitel 3.4.2. beschrieben pelletiert. Das Pellet wurde jedoch in 500 μ l statt in 1 ml Endothelzell-Medium resuspendiert.

3.5.2. Einsaat der HMEC-1

Das Spülen des Flusskammerplattenkanals (siehe Kapitel 3.5.1.) wurde unterbrochen und das überschüssige Medium abgesaugt. Unter sterilen Bedingungen wurden ca. 50 μ l der Zellsuspension in das „Outlet“ pipettiert und per Druck (0,2 dyn/cm²) in den Kanal geleitet. Um eine konfluente Endothelzellschicht am nächsten Tag zu gewährleisten, wurden die Endothelzellen in dem Kanal angereichert. Hierzu wurden die EZ bis kurz hinter den Beobachtungsabschnitt gepumpt (Abbildung 10, grüne Pfeilspitze) und der Druck pausiert, bis erste Zellen sich gesetzt hatten. Dann wurde der Druck erneut gestartet und die Zellen wieder bis kurz hinter den zu beobachtenden Abschnitt gepumpt. Dies wurde insgesamt drei bis vier Mal durchgeführt, bis ca. 80 % des Kanals mit HMEC-1 bedeckt waren. Anschließend wurde die Flusskammerplatte mit Deckel für 20 bis 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ in den Zellkulturinkubator gestellt. Nach der Inkubationszeit wurden 100 μ l Endothelzell-Medium unter sterilen Bedingungen in das „Inlet“ pipettiert und der Kanal für ca. 5 min bei 0,6 dyn/cm² gespült, um nicht-adhärente Endothelzellen zu entfernen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, in beide „Wells“ das gleiche Volumen Endothelzell-Medium gegeben und die EZ über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.5.3. TNF α -Stimulation der HMEC-1

Bei Experimenten, in denen Endothelzellen mit TNF- α stimuliert werden sollten, wurde humanes TNF- α zu Endothelzell-Medium pipettiert (finale Konzentration 100 ng/ml) und 200 μ l TNF- α -Medium in das „Inlet“ der Flusskammerplatte gegeben. Mit Hilfe des Druckverteilers wurde das Medium für 10 min bei 0,6 dyn/cm² durch den Kanal in das „Outlet“ gespült. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und in das „Inlet“ sowie das „Outlet“ das gleiche Volumen frisches Endothelzellmedium mit TNF- α gegeben und die Endothelzellen über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.5.4. Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten an/auf/durch eine/r unstimulierte/n bzw. TNF- α -stimulierte/n Endothelzellschicht unter Flussbedingungen in An- bzw. Abwesenheit von Dabigatran

Für den Flusskammerversuch wurden humane Monozyten verwendet, die 24 h über Nacht kultiviert wurden (siehe Kapitel 3.1.6.). Das gelöste Pellet wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Die Monozytenkonzentration wurde mit Hilfe des Hämozytometers in einer 1:10 Verdünnung bestimmt.

Für das Experiment wurden die HMEC-1 wie in Kapitel 3.5.3. beschrieben über Nacht mit TNF- α inkubiert oder unbehandelt gelassen. Die Monozyten wurden mit CellTracker orange CMRA (finale Konzentration 2 μ M) für 15 min auf Eis „gefärbt“. Anschließend wurden die Zellen 1 + 1 mit RPMI 1640-Medium verdünnt und für 5 min bei 200 x g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, das Pellet in 500 μ l RPMI 1640-Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 200 x g, 4 °C). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 100 μ l PFP gelöst. Im Hämozytometer wurde die MZ-Konzentration erneut in einer 1:10 Verdünnung bestimmt und die Monozyten auf 4 x 10⁶ MZ/ml mit PFP eingestellt. Zu den Monozyten in PFP wurde GPRP (finale Konzentration 5 mM) pipettiert. Sollte der Versuch in Gegenwart von Dabigatran stattfinden, wurden die pelletierten Monozyten in 100 μ l PFP statt RPMI 1640 resuspendiert, die MZ-Konzentration erneut in einer 1:10 Verdünnung bestimmt und die Monozyten mit PFP auf 4 x 10⁶ MZ/ml eingestellt. Zu den Monozyten in PFP wurden GPRP (finale Konzentration 5 mM), Dabigatran (finale Konzentration 100 nM) und CaCl₂ (finale Konzentration 6 mM) pipettiert. Als Kontrolle diente PFP, welchem analog GPRP und

CaCl₂, jedoch DMSO + 5 % HCl in entsprechender Konzentration statt Dabigatran zugesetzt wurde. Es wurden 100 µl der jeweiligen Monozytensuspension in das „Inlet“ der Flusskammerplatte pipettiert und mit 0,6 dyn/cm² (dieser Wert stellt den Scherstress dar) über die Endothelzellen in das „Outlet“ gepumpt. Nach 15 min wurde der Fluss unterbrochen, die restliche Monozytensuspension abgenommen und das „Inlet“ mit Endothelzell-Medium gespült, indem 200 µl Medium mit der Pipette hoch und runter pipettiert wurden. Anschließend wurde das Spülmedium abgenommen und 300 µl PFP (+ 5 mM GPRP) in das „Inlet“ pipettiert und der Kanal gespült, bis nicht-adhärenente Monozyten entfernt waren. Während des Spülvorgangs erfolgte die Kalibrierung der Software nach dem Protokoll „BioFlux Montage, BioFlux Plate Calibration“ der Firma Fluxion Biosciences. Anschließend wurden die Einstellungen festgelegt. Dazu wurde die Option „Multi Dimensional Acquisition“ (MDA) gewählt. Unter dem Reiter „Main“ wurden die Optionen „Timelapse“, „Multiple Stage Positions“ und „Multiple Wavelengths“ aktiviert und der Hardware Auto Fokus auf „never“ gesetzt. Der gewünschte Speicherpfad wurde ausgewählt und unter „Timelapse“ die Anzahl der aufzunehmenden Zeitpunkte (31 Zeitpunkte) angegeben. Die Dauer des Experiments betrug 30 min in Intervallen von 1 min. Die zu beobachtenden Positionen wurden unter „Stage“ bestimmt. Mit dem Steuerelement wurde der Kanal abgefahren und über die „live“-Option auf dem Display betrachtet. Die gewünschte Position wurde benannt (z. B. 1.4 = Kanal 1, Position 4) und mit dem nach rechts zeigenden Pfeilsymbol hinzugefügt. Auf diese Weise wurden zwischen 3 und 5 Positionen gespeichert. Die Option „move to memorized auto focus position“ wurde hierbei für alle Positionen aktiviert. Im Reiter „wavelength“ wurde als Anzahl der Wellenlängen „3“ angegeben und die Option „allow separate hardware memorized AF positions for each wavelength“ aktiviert. Es wurden zwei Wellenlängen ausgewählt, um Fotoaufnahmen im Hellfeld- sowie im Fluoreszenzkanal „DsRed“ vornehmen zu können. Um unspezifische Fluoreszenz von z. B. Medium oder Schmutzpartikeln auf der Flusskammerplatte auszuschließen, die nachstrahlt, wurde zusätzlich eine dritte „Wellenlänge“ („all closed“) ausgewählt. Unter dieser Aufnahmebedingung sollte nur „Rauschen“ detektiert werden, da weder Fluoreszenz- noch normale Lampe eingeschaltet sind. Für die Wellenlängen wurden die in Tabelle 17 angegebenen Einstellungen vorgenommen.

Tabelle 17: Einstellungen der Aufnahmebedingungen für die Wellenlängen.

Parameter	Hellfeld	„DsRed“	„Closed“
Gain	1	1	2
Digitizer	20 MHz	10 MHz	20 MHz
Exposure	0,1 ms	1 000 ms	1 000 ms
Auto expose	Every acquisition	Never	Never
Acquire	Every time point	Every time point	Every time point
Auto focus	Never	Never	Never

Im Reiter Display wurde „Default“ aktiviert. Um die Flussbedingungen zu automatisieren, wurde in der Konfiguration zunächst der Plattentyp ausgewählt und ein neues Protokoll erstellt. Die Dauer des Experiments wurde auf 30 min mit konstantem Vorwärts-Fluss von 0,6 dyn/cm² eingestellt und durch den Klick auf „add“ hinzugefügt. Damit dieses Protokoll nicht für jedes Experiment neu erstellt werden musste, wurde es entsprechend benannt und abgespeichert. Nun wurde zu dem Reiter „Sequence Setup“ gewechselt, dort erneut der Plattentyp ausgewählt und eine neue Sequenz erstellt. Das „Default Fluid“ wurde angegeben und auf „add Step“ geklickt. Als Wiederholung wurde „1“ angegeben, da nur ein Lauf gewünscht war. Das erstellte Protokoll wurde aus der Liste ausgewählt und der gewünschte Kanal aktiviert. Zum Anlegen der Sequenz wurde auf „apply“ geklickt und unter einer entsprechenden Bezeichnung abgespeichert. Da jeweils nur ein Kanal beobachtet und aufgenommen werden kann, wurden vier verschiedene Sequenzen angelegt, die jeweils die unterschiedlichen Kanäle abdeckten (Kanal 1-6, Kanal 7-12, Kanal 13-18 und Kanal 19-24). Nach dieser Kalibrierung und Speicherung der aufzunehmenden Positionen wurde im Kontrollmodul „Auto Run“ angewählt, der Plattentyp (0 bis 20 dyn/cm²) angegeben und die gewünschte Sequenz eingestellt. Der Lauf wurde durch den Klick auf „Acquire“ im MDA Kontrollfenster der BioFlux Montage Software gestartet, simultan wurde an dem Druckverteiler die Heizplatte der Vorrichtung auf dem Objektisch auf 37 °C gestellt und angeschaltet. Nach jedem Lauf wurden die Fotos abgespeichert und mit Hilfe der BioFlux Montage Software zu einem Video zusammengefügt. Dazu wurde „Make a video“ angewählt und den Anweisungen gefolgt. Es wurde die Anzahl der Monozyten pro Bild gezählt, zusammengefasst und pro mm² Bildfläche berechnet. Adhärenzte Monozyten wurden dabei als festsitzende, gleichbleibend fluoreszierende Monozyten, migrierte als sich (langsam) fortbewegende, gleichbleibend fluoreszierende Monozyten und transmigrierte

als festsitzende bzw. sich (langsam) fortbewegende Monozyten mit abnehmender Fluoreszenz definiert. Für die quantitative Auswertung von Adhäsion, Migration und Transmigration wurde die Anzahl der an/auf/durch eine/r unstimulierte/n bzw. TNF- α -stimulierte/n Endothelzellschicht adhären, migrieren und transmigrieren Monozyten/mm² verwendet und mit Hilfe von Graph Pad Prism Abbildungen und Statistiken erstellt. Für die quantitative Auswertung der Adhäsion, Migration und Transmigration in Gegenwart von Dabigatran wurde die Anzahl der an/auf/durch eine/r unstimulierte/n bzw. TNF- α -stimulierte/n Endothelzellschicht adhären, migrieren und transmigrieren Monozyten/mm² verwendet und die verbliebene Adhäsion, Migration und Transmigration prozentual zur 100 % Kontrolle (Adhäsion, Migration und Transmigration in Abwesenheit von Dabigatran-Behandlung) mit Hilfe von Graph Pad Prism dargestellt.

3.5.5. Adhäsion, Migration und Transmigration muriner Makrophagen an/auf/durch eine/r unstimulierte/n bzw. TNF- α -stimulierte/n Endothelzellschicht unter Flussbedingungen

Für den Flusskammerversuch wurden murine Makrophagen (M Φ) verwendet, die für 24 h über Nacht kultiviert wurden (siehe Kapitel 3.2.5.). Das resuspendierte Zellpellet wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Mit Hilfe des Sysmex wurde in einer 1:10 Verdünnung die Zellkonzentration bestimmt.

Für das Experiment wurden die HMEC-1 wie in Kapitel 3.5.3. beschrieben über Nacht mit TNF- α inkubiert oder unbehandelt gelassen. Die Makrophagen wurden mit CellTracker orange CMRA (finale Konzentration 2 μ M) für 15 min auf Eis „gefärbt“. Anschließend wurden die Zellen 1 + 1 mit RPMI 1640-Medium verdünnt und für 5 min bei 200 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, das Pellet in 500 μ l RPMI 1640-Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 200 x g, 4 °C). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 100 μ l RPMI 1640-Medium gelöst. Mit Hilfe des Hämozytometers wurde die M Φ -Konzentration erneut in einer 1:10 Verdünnung bestimmt und die Makrophagen auf 4 x 10⁶ M Φ /ml mit RPMI 1640-Medium eingestellt. Es wurden 100 μ l der jeweiligen Makrophagensuspension in das „Inlet“ der Flusskammerplatte pipettiert und mit 0,6 dyn/cm² über die Endothelzellen in das „Outlet“ gepumpt. Nach 15 min wurde der Fluss unterbrochen, die restliche Makrophagensuspension abgenommen und das „Inlet“ mit Endothelzell-Medium gespült, indem 200 μ l Medium mit der Pipette

hoch und runter pipettiert wurden. Anschließend wurde das Spülmedium abgenommen und 300 µl frisches Endothelzell-Medium in das „Inlet“ pipettiert und der Kanal gespült, bis nicht-adhärenente Makrophagen entfernt waren. Während des Spülvorgangs wurde die Kalibrierung und Speicherung der Positionen sowie der Start des Vorgangs, wie in Kapitel 3.5.4. beschrieben, durchgeführt. Für die quantitative Auswertung von Adhäsion, Migration und Transmigration wurde die Anzahl der an/auf/durch eine/r unstimulierte/n bzw. TNF- α -stimulierte/n Endothelzellschicht adhärenierten, migrierten und transmigrierten Makrophagen/mm² verwendet und mit Hilfe von Graph Pad Prism Abbildungen und Statistiken erstellt.

3.6. Genotypisierung von TSP-1 Knockout-Mäusen

3.6.1. Die Thrombospondin-1 Knockout-Maus

Mäuse, die einen homozygoten Knockout (K. o.) für Thrombospondin-1 besitzen, sind lebensfähig und fertil. Von Geburt an kann eine unterschiedlich stark ausgeprägte Lordose der Wirbelsäule beobachtet werden und die Anzahl der weißen Blutzellen ist erhöht. Mit zunehmendem Alter entwickeln homozygote TSP-1 K. o.-Mäuse Pneumonie und Hyperplasie. Das Transkript von TSP-1 ist abnormal und unvollständig in verschiedenen Geweben, das Protein TSP-1 fehlt auf Thrombozyten vollständig [208].

Für die Entwicklung der TSP-1 K. o.-Maus wurden das Exon 2, Intron 3 und Exon 3 des endogenen Gens durch eine Phosphoglycerat-Kinase-Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt und dieses Konstrukt durch Elektroporation in embryonale Stammzellen eingebracht. Die embryonalen Stammzellen wurden in C57BL/6J-Blastozysten injiziert, diese Chimären mit C57BL6/J-Mäusen gezüchtet und mutante Tiere für 8 Generationen zurückgekreuzt [208]. Die genetischen Informationen sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Genetische Informationen der Thrombospondin-1 Knockout-Mutation.

Allelname	gezielte Mutation, Richard Hynes
Alleltyp	gezielt (Null/Knockout)
Allelsynonyme	TSP-1, TSP-1 ⁻ , TSP1-, Thbs1 ⁻ , Tsp1KO, tbsp-1-
Gensymbol und Name	<i>Thbs1</i> , thrombospondin 1
Gensynonyme	THBS, THBS-1, TSP, TSP-1, TSP1, Thbs-1, Tsp1, tbsp1
Originalstamm	129S2/SvPas
Chromosom	2
molekulare Notiz	Eine Neomycin-Kassette ersetzt Exon 2, Intron 2 und Exon 3. Ein Ribonuklease-Assay zeigte, dass kein Transkript in verschiedenen Geweben von homozygoten Knockout-Tieren detektiert werden konnte. Die Western Blot Analyse bestätigte die Abwesenheit des kodierenden Proteins.
Mutation verursacht durch	Jack Lawler, Beth Israel Deaconess Medical Center

3.6.2. Gewebeentnahme und DNS-Extraktion

Um sicherzustellen, dass die TSP-1 Knockout-Tiere auch wirklich einen Knockout für das Thrombospondin-1-Gen hatten, wurden die jeweiligen Elterntiere mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion genotypisiert.

Dazu wurde das Tier im Nacken gegriffen, mit einer Ohrlochstanze Gewebe aus dem Ohr entnommen und in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Ohrgewebe wurde mit 40 µl Lysepuffer (pH 12) versetzt und für 20 min bei 97 °C im Thermomixer erhitzt, um die DNS aus dem Gewebe zu extrahieren. Die Reaktion wurde gestoppt, indem das Reaktionsgefäß für 5 min auf Eis gelagert und anschließend der pH-Wert mit 40 µl Neutralisationspuffer (pH 5,0) neutralisiert wurde. Die DNS wurde gut auf dem Vortexmischer vermischt und bei -20 °C aufbewahrt.

3.6.3. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: „polymerase chain reaction“, PCR) ist es möglich, einen definierten Teil einer DNS *in vitro* exponentiell zu vervielfältigen. Auf diese Weise erhält man ausreichend DNS, die anschließend durch die Elektrophorese in einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und zur Analyse mit Fluoreszenzfarbstoffen unter ultraviolettem Licht (UV-Licht) sichtbar gemacht werden kann. Die Reaktion der PCR beruht auf dem Prinzip von Denaturierung,

Primerhybridisierung und Elongation in mehrfach wiederholten Zyklen. Bei der Denaturierung wird die DNS erhitzt und dadurch in ihre Einzelstränge zerlegt. Die Phase der Primerhybridisierung erlaubt bei einer niedrigeren Temperatur die Anheftung der spezifischen Primer (Oligonukleotide, die den Startpunkt der DNS-Polymerase festlegen) an die DNS und bei der Elongation wird der DNS-Einzelstrang durch die DNS-Polymerase ab dem angelagerten Primer bei einer für das Enzym geeigneten Temperatur verlängert. Die exakten Temperaturen variieren dabei je nach Primer und des zugehörigen PCR-Protokolls. Die nötigen Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Desoxythymintriphosphat (dTTP) sowie die Polymerase und die Primer werden in einem sogenannten Mastermix für die Reaktion zur Verfügung gestellt.

Die Genotypisierungsprotokolle (Tabelle 19, Tabelle 20, Tabelle 21, Tabelle 23) stammen von der Internetpräsenz von „Jackson Laboratory - B6.192S2-Thbs1^{tm1Hyn}/J“ [209].

Tabelle 19: Genotypisierungsprotokoll - allgemeine Daten laut „Jackson Laboratory“.

Bestandsnummer	006141
Stamm	B6.192S2-Thbs1 ^{tm1Hyn} /J
Allel	Thbs1 ^{tm1Hyn}
Protokollname	Thbs1 ^{tm1Hyn}
Methode	Standard PCR
Version	1.1
Erstellt	24.06.2008, aktualisiert 12.03.2010

Tabelle 20: Genotypisierungsprotokoll - Primersequenzen für die PCR von TSP-1 K. o.-Maus-DNS laut „Jackson Laboratory“.

„Common“	5'-GAG TTT GCT TGT GGT GAA CGC TCA G-3'
Mutant	5'-TGC TGT CCA TCT GCA CGA GAC TAG-3'
Wildtyp	5'-AGG GCT ATG TGG AAT TAA TAT CGG-3'

Tabelle 21: Genotypisierungsprotokoll - Zusammensetzung der Reaktionskomponenten für die PCR von TSP-1 K. o.-Maus-DNS laut „Jackson Laboratory“.

Komponente	Volumen [µl]	finale Konzentration	Gesamtvolumen [µl]
ddH ₂ O	3,36	-	3,36
10 x AB Buffer II	1,2	1,00 x	1,2
25 mM MgCl ₂	0,96	2,00 mM	0,96
2,5 mM dNTP	0,96	0,20 mM	0,96
20 µM oIMR5186	0,6	1,00 mM	0,6
20 µM oIMR5187	0,6	1,00 mM	0,6
20 µM oIMR5188	0,6	1,00 mM	0,6
5 mM DNS Loading Dye	1,66	0,69 mM	1,66
5 U/µl Taq DNS Polymerase	0,06	0,03 U/ml	0,06
DNS	2,00	-	2,00

Zunächst wurden die TSP-1-Primer in dem im Primer-Datenblatt angegebenen Volumen ddH₂O gelöst, um eine Stammkonzentration von 100 µM zu erhalten. Aus dieser Stammkonzentration wurde für jeden Primer eine Verdünnung im Verhältnis 1:10 hergestellt (ddH₂O, 10 µM). Der „Mastermix Hot Start Green“ enthält die für die PCR nötigen Bestandteile DNS-Taq Polymerase, PCR-Puffer, dNTP, Mg²⁺-Ionen, Marker und Nuklease-freies Wasser. Die Zusammensetzung der Reaktionskomponenten des ursprünglichen Genotypisierungsprotokolls (Tabelle 21) wurde daher modifiziert und vereinfacht und für einen einfachen PCR-Ansatz der Mastermix aus Tabelle 22 pipettiert.

Tabelle 22: Genotypisierungsprotokoll - modifizierte Zusammensetzung der Reaktionskomponenten für die PCR von TSP-1 K. o.-Maus-DNS.

Komponenten des Mastermixes	Volumen [µl]
Mastermix Hot Start Green	12,5
Primer „Common“	1,0
Primer Mutante	0,5
Primer Wildtyp	0,5
ddH ₂ O	7,5

Je PCR-Reaktionsgefäß wurden 22 µl des Mastermixes vorgelegt und 3 µl Maus-DNS hinzu pipettiert. Der Inhalt wurde kurz auf dem Vortexmischer vermengt und danach zentrifugiert. Anschließend wurden die PCR-Reaktionsgefäße in dem PCR-

Gerät platziert, die Zyklen programmiert (Tabelle 23) und die Polymerase-Kettenreaktion gestartet.

Tabelle 23: Genotypisierungsprotokoll - Zyklen für die PCR von TSP-1 K. o.-Maus-DNS laut „Jackson Laboratory“.

Schritt	Temperatur	Dauer	
1	94 °C	3 min	
2	94 °C	30 sek	
3	56 °C	1 min	
4	72 °C	1 min	Schritt 2 bis 4 35 x wiederholen
5	72 °C	2 min	
6	10 °C	-	Halten (Ende der Reaktion)

3.6.4. Agarosegelelektrophorese

Die fertigen PCR-Proben (8 µl) und eine entsprechende DNS-Leiter (4 µl) wurden in die Geltaschen eines 1,5%igen (w/v) horizontalen Agarosegels (100 ml TBE-Puffer + 1,5 g Agarose + 4 µl RotiSafe) pipettiert und die Elektrophorese bei 80 V (konstant) gestartet. Das Gel fungiert als eine Art Sieb: Je kleiner die amplifizierte DNS, desto weiter und je größer die DNS, desto kürzer wandert sie in dem Gel. Die Substanz RotiSafe dient hierbei der Fluorochrom-Markierung der DNS, indem sie über die kleine Grube an die DNS-Helix bindet. Nach etwa 60 min wurde die Gelelektrophorese gestoppt, das Gel entnommen und auf einem UV-Einsatz platziert. In einem Gel-Dokumentationsgerät wurde das Gel mit UV-Licht beleuchtet, und mit Hilfe der Software ImageLab analysiert und ein Bild erstellt.

3.6.5. Proteinnachweis in murinen Thrombozyten

Zusätzlich sollte auf Proteinebene bestätigt werden, dass die Thrombozyten aus TSP-1 K. o.-Mäusen tatsächlich kein TSP-1 exprimieren. Wildtyp C57BL/6J- und TSP-1 K. o.-Mäusen wurde dazu Blut entnommen und zunächst PRP (Kapitel 3.2.2.) und dann gewaschene Thrombozyten (Kapitel 3.2.3.) generiert. Diese wurden im Anschluss mit HEPES-Puffer auf $5,7 \times 10^8$ /ml eingestellt.

Die Thrombozytensuspension wurde mit Laemmli-puffer (1:2) und β -Mercaptoethanol (1:10) versetzt und für 10 min bei 95 °C schüttelnd erhitzt. Das im Laemmli-puffer

enthaltene Natriumdodecylsulfat („sodium dodecyl sulfate“, SDS) überdeckt die Eigenladungen der Proteine, so dass diese eine negative Ladung aufweisen. Das Erhitzen der Proteine verursacht die Denaturierung der Proteine, während das β -Mercaptoethanol zusätzlich die Disulfidbrücken reduziert. Anschließend wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese („sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis“, SDS-PAGE) durchgeführt.

3.6.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Da die Eigenladungen der Proteine bei der Probenaufbereitung durch SDS überdeckt werden, lassen sich die Proteine mit Hilfe der SDS-PAGE ihrer Molekülgröße nach auftrennen. Ähnlich der Agarosegelelektrophorese fungiert das Gel als eine Art Sieb: Proteine mit kleinerer Molekülgröße wandern schneller als größere Proteine. Dieser Vorgang ist außerdem von der Porengröße des Gels, die durch den Gehalt an Acrylamid/Bisacrylamid definiert wird, abhängig. Je mehr Acrylamid/Bisacrylamid enthalten ist, desto feinporiger wird das Gel und desto langsamer wandern die Proteine. Feinporige Gele sind besser geeignet, kleinere Moleküle besser darzustellen, dementsprechend eignen sich grobporige Gele besser, um größere Moleküle darzustellen.

Hier wurde am Vortag des Versuchs ein Gel mit einem Acrylamid/Bisacrylamid-Gehalt von 8 % (Zusammensetzung siehe Tabelle 24) gegossen.

Tabelle 24: Zusammensetzung eines 8%igen SDS-Gels.

Inhaltsstoff	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid / Bisacrylamid	2 ml	660 μ l
1 M Tris pH 8,8	3 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	630 μ l
20 % (w/v) SDS	38 μ l	25 μ l
ddH ₂ O	2,43 ml	3,6 ml
10 % (w/v) APS	36 μ l	25 ml
TEMED	5 μ l	5 μ l

Für das Trenngel wurden bis auf das Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) alle Komponenten in einem 50 ml-Polypropylenröhrchen

vermischt. Nach Zugabe der Polymerisationsstarter APS und TEMED wurde die Mischung zügig in die vorbereitete Apparatur gegeben und um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten, Isopropanol über das Trenngel gegossen. Nach etwa 30 min wurde das Isopropanol entfernt und die Mischung für das Sammelgel auf das Trenngel gegeben. Ein entsprechender Kamm wurde eingesetzt, damit sich Taschen im Gel bildeten. Das fertige Gel wurde in feuchte Tücher eingeschlagen, bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und am Folgetag verwendet.

Die Gelelektrophoresekammer mit dem eingespannten Gel wurde mit SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt und in je eine Tasche des Gels 20 µl der aufbereiteten Proben (wildtypisch und TSP-1-defizient) pipettiert. In eine weitere Tasche wurden 5 µl eines Markers pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 80 Volt für 20 min gestartet und anschließend mit einer Spannung von 120 Volt für etwa 70 min fortgesetzt.

3.6.7. Western Blot Methode

Mit Hilfe der Western Blot Methode werden die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen, auf der die Proteine sichtbar gemacht werden können.

Auf einen Schwamm wurde ein durchfeuchtetes Filterpapier platziert und auf dieses die Polyvinylidenfluorid-Trägermembran, die kurz zuvor mit Methanol aktiviert wurde, gelegt. Auf die Trägermembran wurde vorsichtig das Gel der SDS-PAGE positioniert und dieses mit einem durchfeuchteten Filterpapier und einem weiteren Schwamm bedeckt. Die so zusammengesetzte Kassette wurde in die mit Transfer-Puffer gefüllte Western Blot-Apparatur eingesetzt und der Proteintransfer im Kühlraum bei 4 °C für 60 min mit einer Stromstärke von 800 mA gestartet.

Danach wurde die Trägermembran für 60 min bei RT mit 5%igem bovines Serumalbumin (BSA) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blockieren. Anschließend wurde die Membran mit dem anti-TSP-1 Antikörper A4.1 (1:700 in 5 % BSA) bei 4 °C über Nacht inkubiert und überschüssiger Antikörper am Folgetag durch dreimaliges Waschen für 10 min mit TBS-T-Puffer entfernt. Die Trägermembran wurde mit einem zweiten Meerrettich-Peroxidase-(horseradish-peroxidase, HRP-)konjugierten Antikörper (1:5000 in 5 % BSA in TBS-T-Puffer) für

120 min bei RT erneut inkubiert und überschüssiger Antikörper durch dreimaliges Waschen für 10 min mit TBS-T Puffer entfernt.

Die Trägermembran wurde mit Clarity Western ECL Substrat (1:1) beschichtet (engl.: „enhanced chemiluminescence“, ECL) und die entstandene Chemilumineszenz mit Hilfe der Fusion-FX7-Kamera und des zugehörigen FusionCapt advanced Programmes detektiert. Die Meerrettich-Peroxidase oxidiert dabei das im ECL enthaltenen Luminol und bewirkt so die Freisetzung von Licht. Die Entwicklungszeit betrug 2 min.

3.7. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der erhobenen Daten, sowie die Erstellung der Grafiken anhand der erhobenen Daten wurde das Programm Graph Pad Prism in der Version 6.07 angewandt. Dargestellt wurden die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD). Differenzen zwischen Gruppen wurden mit dem Student'schen t-Test, der ein-faktoriellen und zweifaktoriellen Varianzanalyse (engl.: „analysis of variance“, ANOVA, „One-Way“, „Two-Way“) analysiert und mit Hilfe des Dunnett'schen oder Tukey'schen Mehrfachvergleichs korrigiert. Ab wann ein Wert als statistisch signifikant gilt, wurde in Tabelle 25 definiert.

Tabelle 25: Signifikanzdefinition.

Angabe im Text	p-Wert
n. s. (nicht signifikant)	$\geq 0,05$
*	$< 0,05-0,01$
**	$< 0,01-0,001$
***	$< 0,001-0,0001$
****	$< 0,0001$

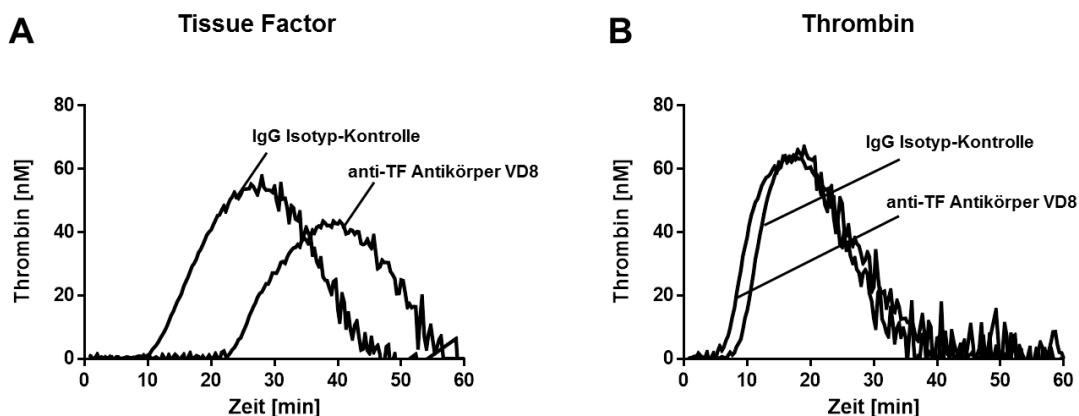
4 Ergebnisse

4.1. Mechanismen der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung

4.1.1. Rolle des „Tissue Factor“-FVII-Komplexes in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung

Um die Relevanz des TFs in der Thrombozyten-abhängigen Thrombinbildung aufzuzeigen, wurde PRP mit dem anti-TF Antikörper VD8 und mit Hilfe der CAT analysiert.

Wie in der Abbildung 11 A und C zu erkennen ist, wurde die TF-induzierte Thrombinbildung im PRP durch den anti-TF Antikörper VD8 mit 5 µg/ml beeinflusst. Dieser verlängerte die „lag time“ signifikant, während das „etp“ unverändert blieb und der „thrombin peak“ nur geringfügig verringert wurde. Dagegen hatte der TF-blockierende Antikörper VD8 keine Auswirkung auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung (Abbildung 11 B und C). Weder „lag time“, noch „etp“ oder „thrombin peak“ waren signifikant verändert. Diese Ergebnisse zeigen die zentrale Rolle von TF in der TF-induzierten Thrombingenerierung auf, während die Thrombin-induzierte Thrombinbildung unabhängig vom „Tissue Factor“ ist.



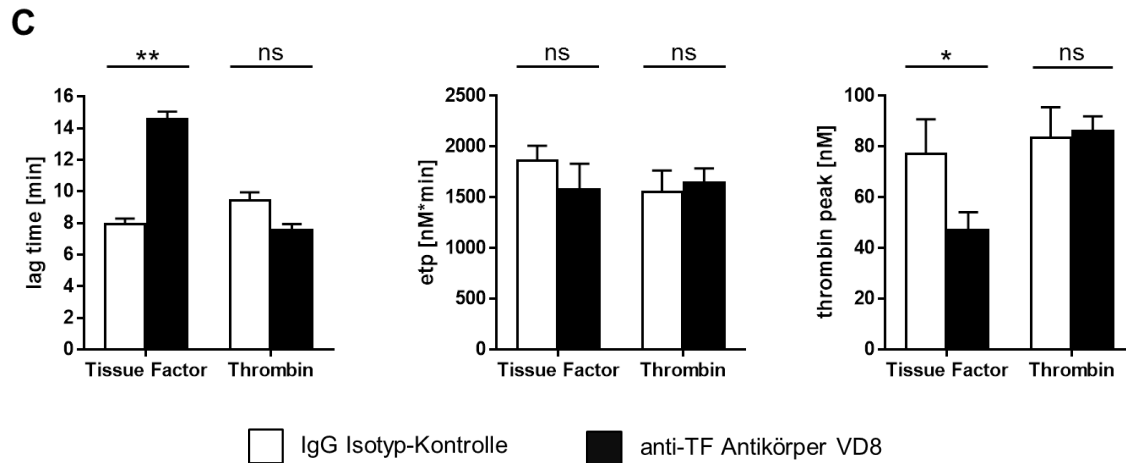


Abbildung 11: Einfluss des anti-TF Antikörpers VD8 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.

Je 80 µl PRP (150×10^3 TZ/µl) wurden in einer 96-„Well“ Platte mit IgG Isotyp-Kontrolle (5 µg/ml □) bzw. dem anti-TF Antikörper VD8 (5 µg/ml ■) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden (A) 20 µl TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 µl α-Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 µl FluCa durch das Thrombinskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD (n = 3). *P < 0,05; **P < 0,01; n. s. nicht signifikant.

Um die Rolle von FVII in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung zu untersuchen, wurden gewaschene Thrombozyten in Kontroll- und FVII-depletiertem Plasma resuspendiert.

Wurde die Thrombinbildung mit TF induziert, konnte keine Veränderung des „etps“ oder „thrombin peaks“, jedoch eine signifikant verlängerte „lag time“ in FVII-depletiertem Plasma beobachtet werden (Abbildung 12 A und C). Wurde Thrombin als Aktivator verwendet, konnten keine Unterschiede zwischen der Thrombingenerierung in Kontroll- oder FVII-depletiertem Plasma detektiert werden (Abbildung 12 B und C). Die Anwesenheit von Gerinnungsfaktor VII ist somit essenziell für die TF-induzierte Thrombinbildung, beeinflusst jedoch die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung nicht.

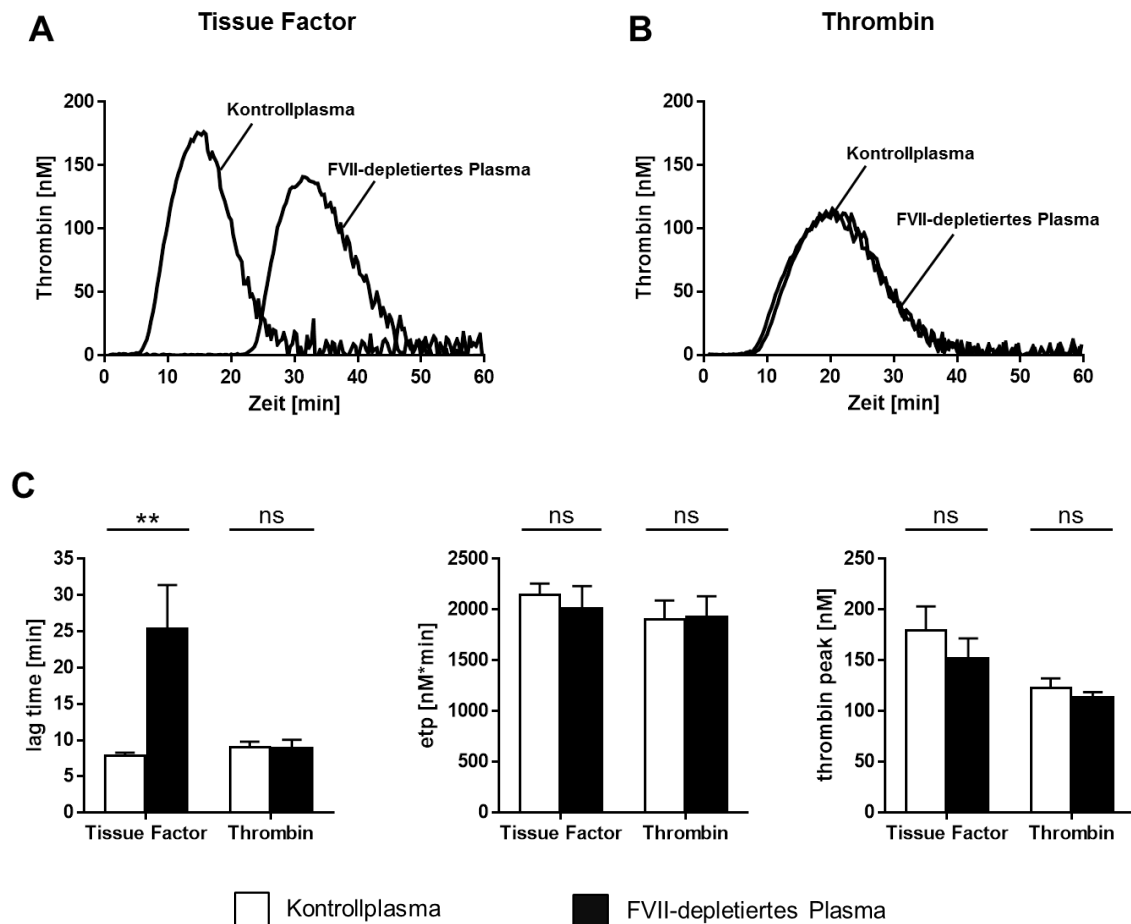


Abbildung 12: Einfluss des FVII auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.

Gewaschene Thrombozyten wurden in Kontroll- (□) oder FVII-depletiertem (■) Plasma resuspendiert (150×10^3 TZ/ μ l) und je 80 μ l in eine 96-„Well“ Platte pipettiert. Als Aktivator wurden (A) 20 μ l TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in Kontroll- und FVII-depletiertem Plasma. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 5). **P < 0,01; n. s. nicht signifikant.

4.1.2. Rolle des Tenase-Komplexes in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung

Der Tenase-Komplex umfasst den Profaktor VIII und den Gerinnungsfaktor IX. Um die Bedeutung des Tenase-Komplexes in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung aufzuzeigen, wurden gewaschene Thrombozyten in Kontroll-, FVIII- (Abbildung 13) und FIX-depletiertem (Abbildung 14) Plasma resuspendiert.

Auf die TF-induzierte Thrombinbildung (Abbildung 13 A und C) hatte das Fehlen des Gerinnungsfaktors VIII einen nicht so starken Einfluss wie auf die Thrombin-induzierte Thrombinbildung (Abbildung 13 B und C). Die „lag time“ war in beiden

Fällen signifikant verlängert und der „thrombin peak“ signifikant erniedrigt. Das „etp“ in FVIII-depletiertem Plasma konnte jedoch nur in der TF-induzierten Thrombingenerierung ermittelt werden, während es in der Thrombin-induzierten Thrombinbildung nicht quantifiziert werden konnte. Diese Ergebnisse weisen auf eine essenzielle Rolle von FVIII in der Thrombin-induzierten und eine Rolle in der TF-induzierten Thrombingenerierung hin.

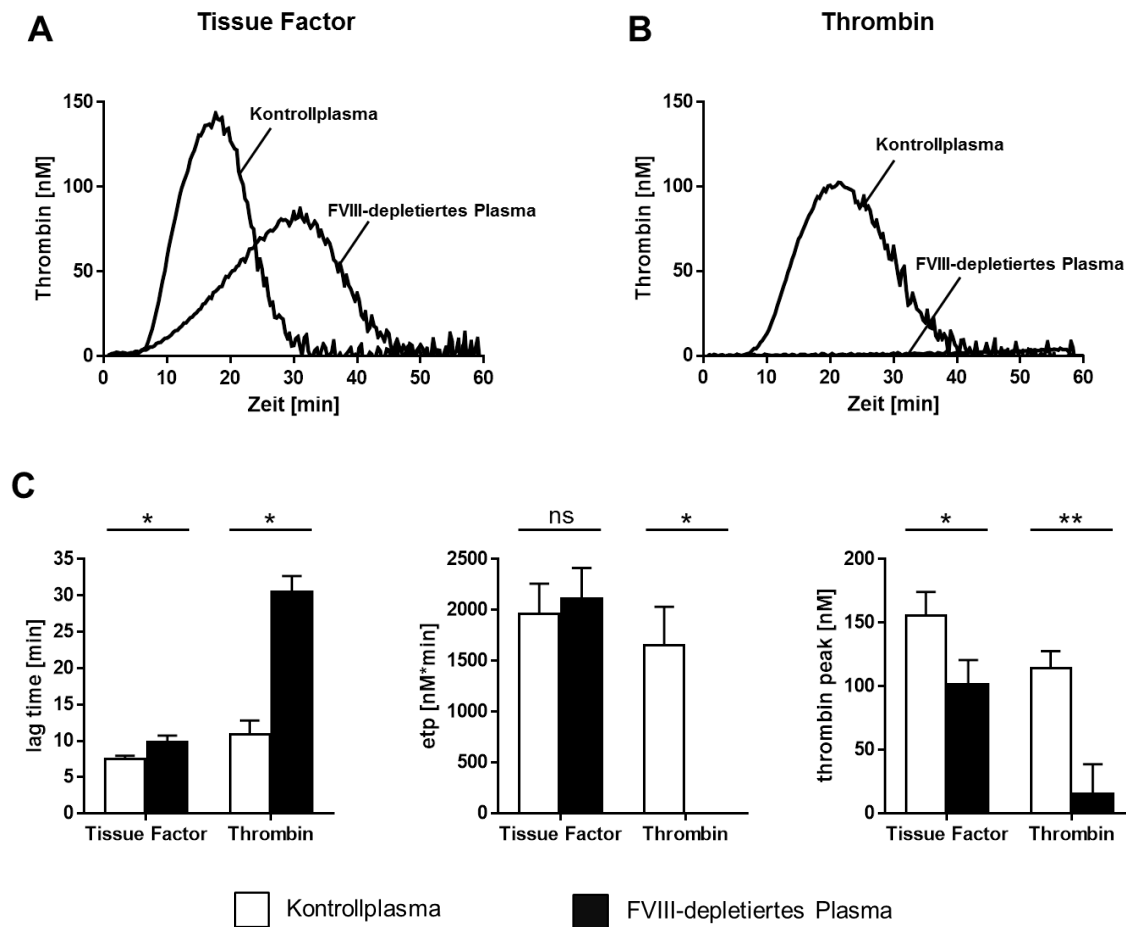


Abbildung 13: Einfluss des FVIII auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.

Gewaschene Thrombozyten wurden in Kontroll- (□) oder FVIII-depletiertem (■) Plasma resuspendiert (150×10^3 TZ/ μ l) und je 80 μ l in eine 96-„Well“ Platte pipettiert. Als Aktivator wurden (A) 20 μ l TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in Kontroll- und FVIII-depletiertem Plasma. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). *P < 0,05; **P < 0,01; n. s. nicht signifikant.

Wurden gewaschene Thrombozyten in FIX-depletiertem Plasma resuspendiert, konnte für die TF-induzierte Thrombingenerierung eine signifikant verlängerte „lag time“, ein signifikant vermindertes „etp“ und ein verminderter „thrombin peak“ beobachtet werden (Abbildung 14 A und C). Die Thrombinbildung konnte nach Stimulation mit Thrombin in FIX-depletiertem Plasma nicht detektiert werden (Abbildung 14 B und C). Der FIX spielt daher eine zentrale Rolle in der TF- sowie Thrombin-induzierten Thrombingenerierung.

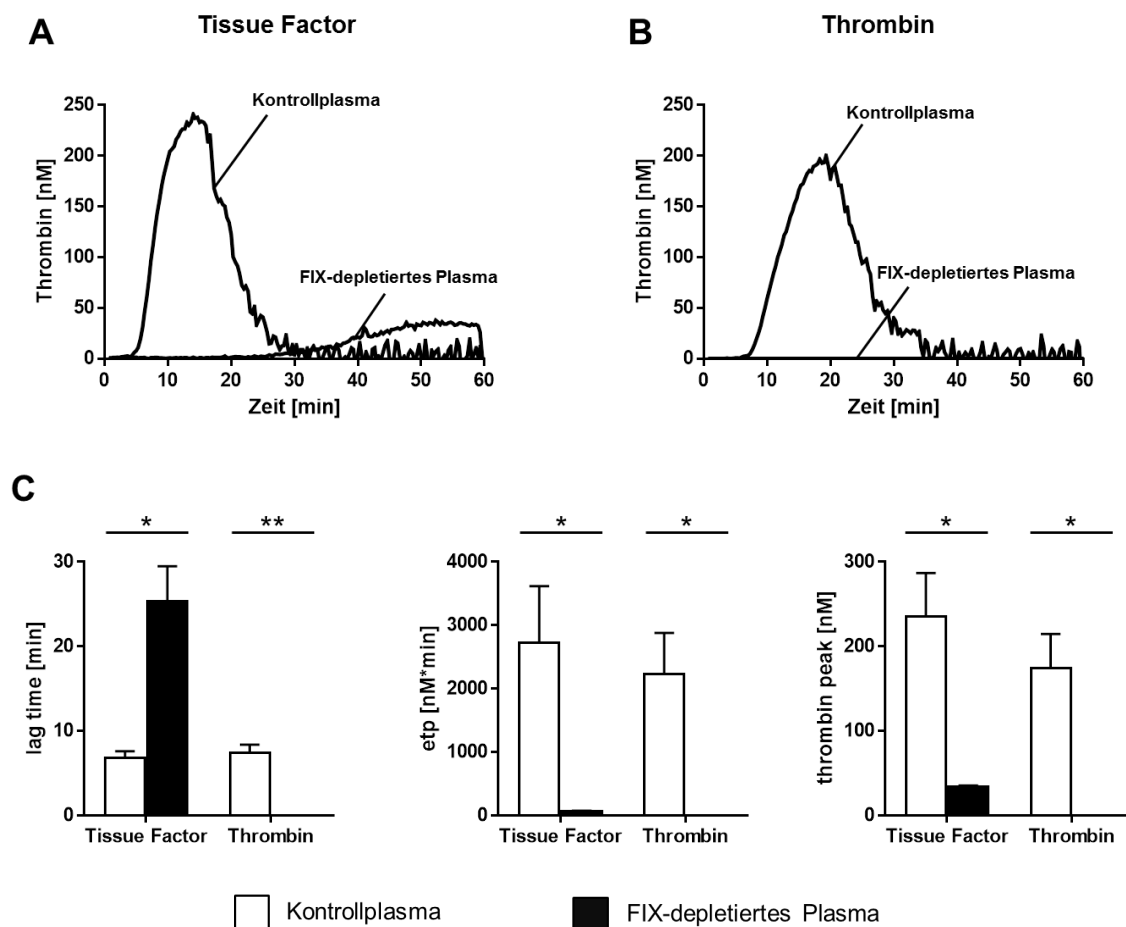


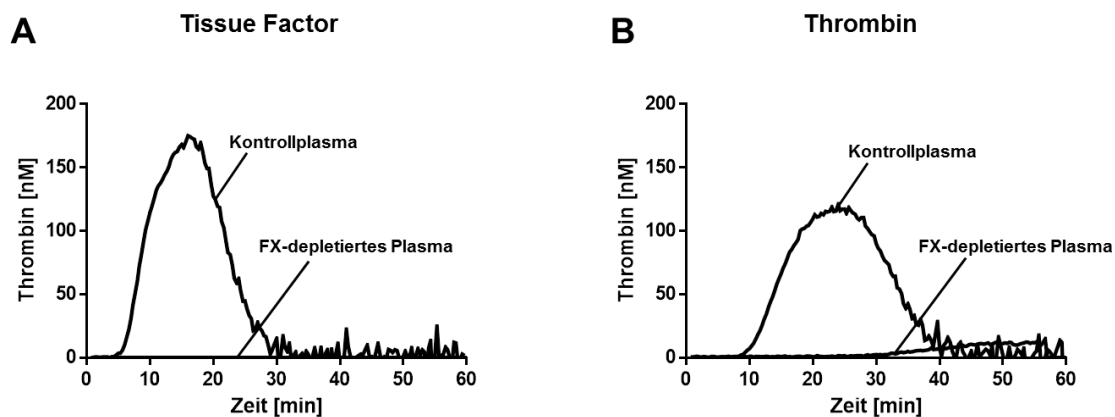
Abbildung 14: Einfluss des FIX auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.

Gewaschene Thrombozyten wurden in Kontroll- (□) oder FIX-depletiertem (■) Plasma resuspendiert (150×10^3 TZ/ μ l) und je 80 μ l in eine 96-„Well“ Platte pipettiert. Als Aktivator wurden (A) 20 μ l TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in Kontroll- und FIX-depletiertem Plasma. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). *P < 0,05; **P < 0,01.

4.1.3. Rolle des Prothrombinase-Komplexes in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung

Der Prothrombinase-Komplex besteht aus dem Gerinnungsfaktor X und seinem Kofaktor V. Um die wichtige Rolle von FX und FV in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung zu bestätigen, wurden gewaschene Thrombozyten in Kontroll- und FX- (Abbildung 15) bzw. FV-depletiertem Plasma (Abbildung 16) resuspendiert.

Wie die Abbildung 15 zeigt, führte das Fehlen von FX zu einer nahezu kompletten Reduktion der TF- (Abbildung 15 A und C) sowie Thrombin-induzierten (Abbildung 15 B und C) Thrombingenerierung. Es konnten weder „lag time“, noch „etp“ und „thrombin peak“ in der TF-induzierten Thrombinbildung gemessen werden, während für die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung eine signifikant verlängerte „lag time“, ein marginaler „thrombin peak“, jedoch kein „etp“ in FX-depletiertem Plasma ermittelt werden konnten. Diese Ergebnisse verdeutlichen die zentrale Rolle von FX in der TF- sowie Thrombin-induzierten Thrombingenerierung.



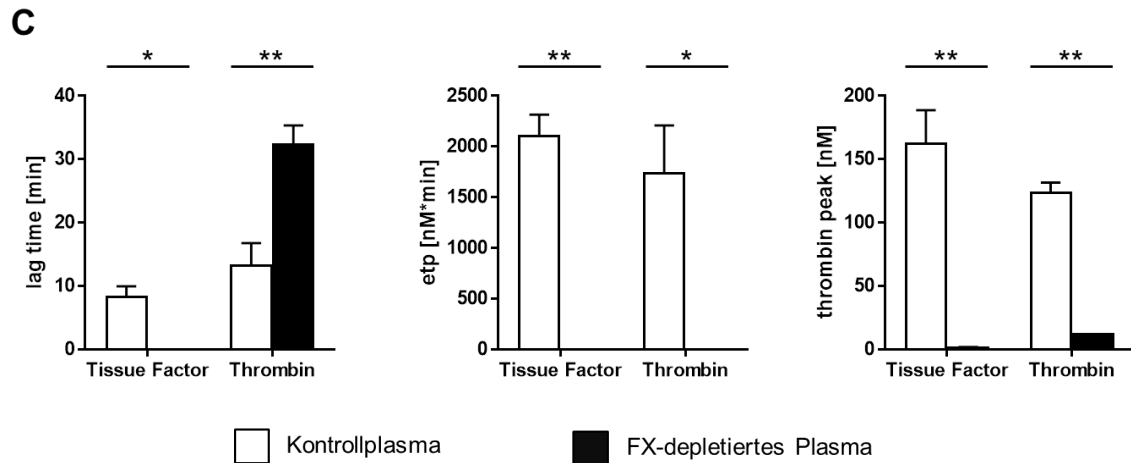
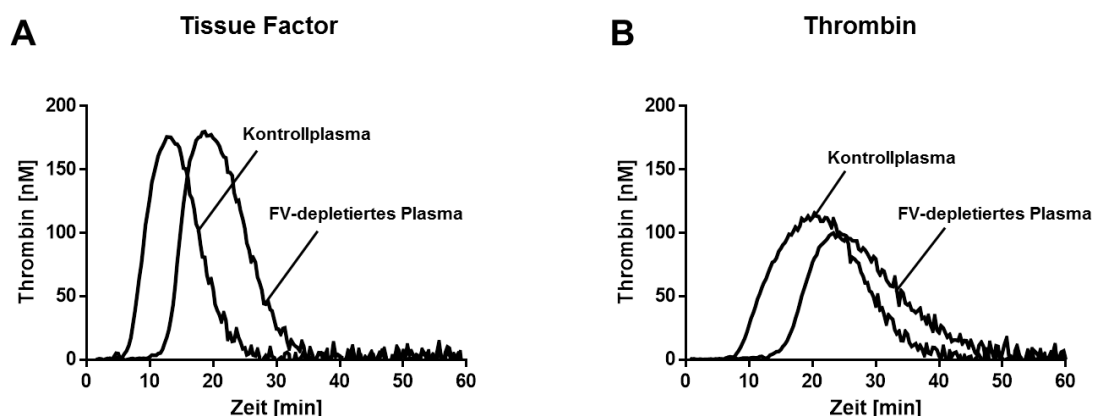


Abbildung 15: Einfluss des FX auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.

Gewaschene Thrombozyten wurden in Kontroll- (□) oder FX-depletiertem (■) Plasma resuspendiert (150×10^3 TZ/ μ l) und je 80 μ l in eine 96-„Well“ Platte pipettiert. Als Aktivator wurden (A) 20 μ l TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in Kontroll- und FX-depletiertem Plasma. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD ($n = 3$). *P < 0,05; **P < 0,01.

Gewaschene Thrombozyten, die in FV-depletiertem Plasma resuspendiert wurden, zeigten keine signifikante Veränderung des „etps“ und des „thrombin peaks“, jedoch eine signifikant verlängerte „lag time“ in TF- sowie Thrombin-induzierter Thrombingenerierung (Abbildung 16). Somit beschleunigt der plasmatische FV die TF- sowie Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.



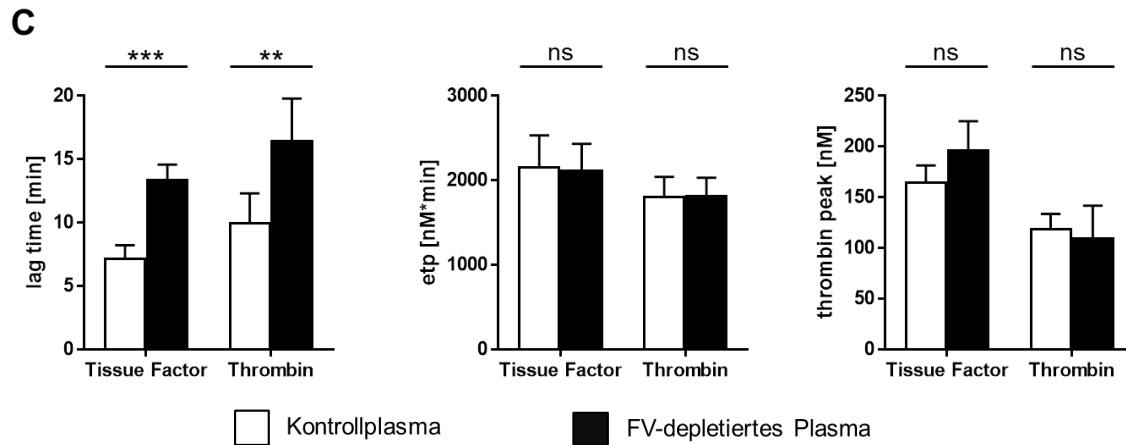


Abbildung 16: Einfluss des FV auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.

Gewaschene Thrombozyten wurden in Kontroll- (□) oder FV-depletiertem (■) Plasma resuspendiert (150×10^3 TZ/ μ l) und je 80 μ l in eine 96-„Well“ Platte pipettiert. Als Aktivator wurden (A) 20 μ l TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in Kontroll- und FV-depletiertem Plasma. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 4). **P < 0,01; ***P < 0,001; n. s. nicht signifikant.

4.1.4. Rolle des Gerinnungsfaktors II in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung

FII spielt eine zentrale Rolle in der Gerinnungskaskade. Zur Verdeutlichung der essenziellen Rolle des Prothrombins in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung wurden gewaschene Thrombozyten in Kontroll- und FII-depletiertem Plasma resuspendiert.

Wie die Abbildung 17 deutlich zeigt, konnte in FII-depletiertem Plasma nach Stimulation mit TF (Abbildung 17 A und C) sowie Thrombin (Abbildung 17 B und C) im Vergleich zu Kontrollplasma keine Thrombingenerierung beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann die zentrale Rolle von FII in der TF- als auch in der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung bestätigt werden.

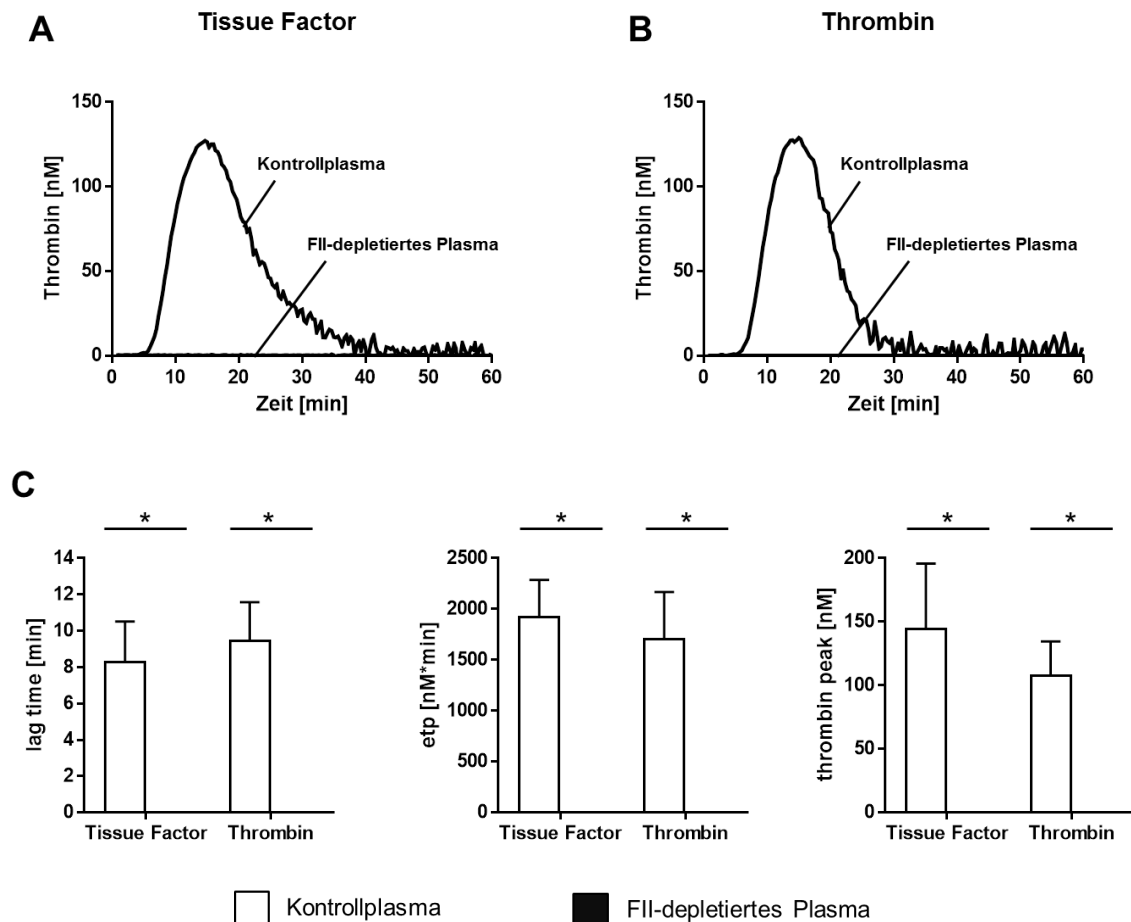


Abbildung 17: Einfluss des FII auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.

Gewaschene Thrombozyten wurden in Kontroll- (□) oder FII-depletiertem (■) Plasma resuspendiert (150×10^3 TZ/ μ l) und je 80 μ l in eine 96-„Well“ Platte pipettiert. Als Aktivator wurden (A) 20 μ l TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in Kontroll- und FII-depletiertem Plasma. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). *P < 0,05.

4.1.5. Rolle des Gerinnungsfaktors XI in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung

Der Gerinnungsfaktor XI ist maßgeblich an der Thrombingenerierung auf Thrombozyten beteiligt. Um die Rolle von FXI in der Thrombin-stimulierten Thrombingenerierung aufzuzeigen, wurden gewaschene Thrombozyten in Kontroll- und FXI-depletiertem Plasma sowie FXI-depletiertem Plasma in Gegenwart von humanem FXI resuspendiert.

Nach Stimulation mit TF (Abbildung 18 A und C) und ebenso nach Stimulation mit Thrombin (Abbildung 18 B und C) wurde eine Reduktion des „etps“ und „thrombin

peaks“ sowie eine verlängerte „lag time“ in FXI-depletiertem Plasma beobachtet. Wurde das Gerinnungsfaktor-depletierte Plasma mit humanem FXI supplementiert, konnte eine normale Thrombin-induzierte Thrombingenerierung beobachtet werden. Diese Ergebnisse weisen auf die Beteiligung von FXI in der TF-induzierten und die zentrale Beteiligung von FXI in der Thrombin-induzierten Thrombinbildung hin.

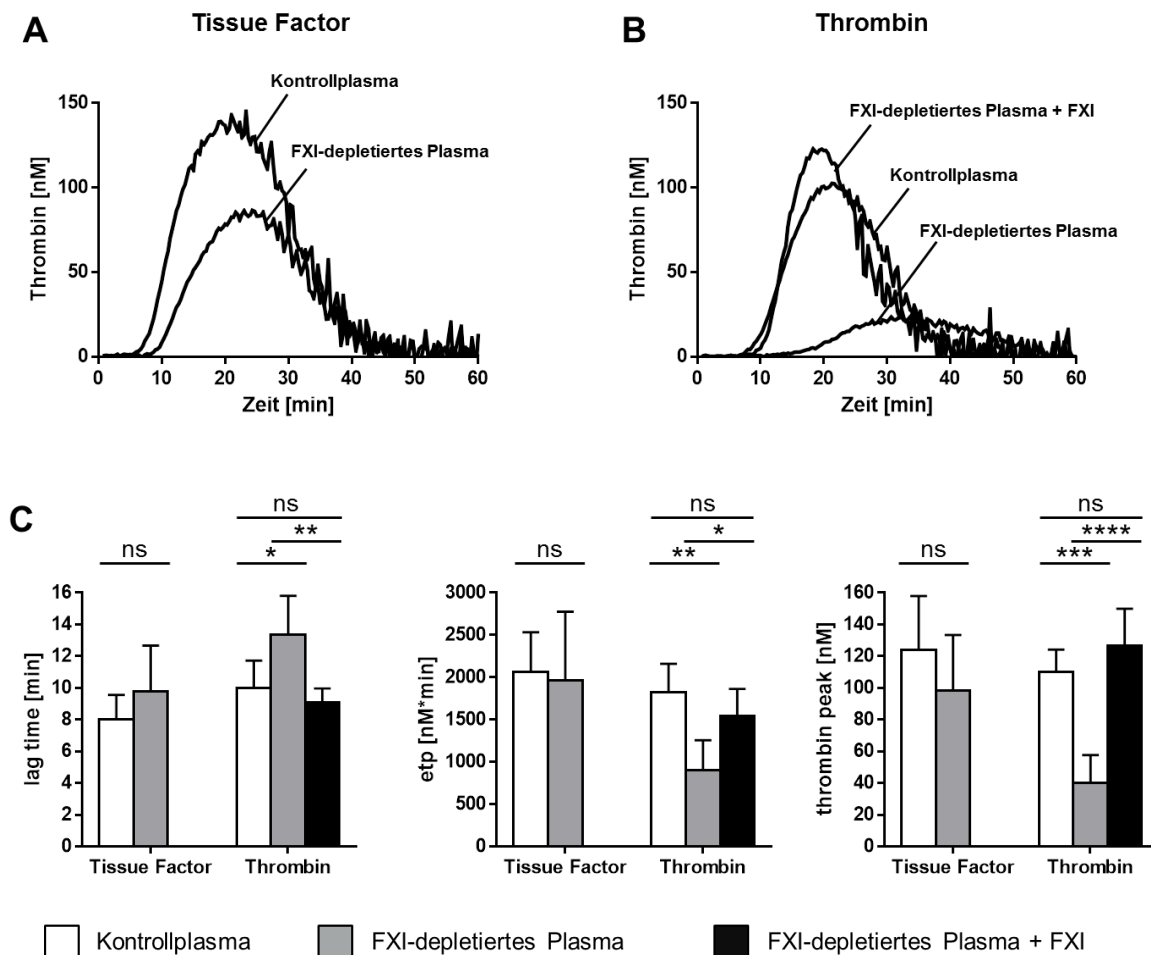


Abbildung 18: Einfluss des FXI auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung und Substitution von FXI-depletiertem Plasma mit humanem FXI.

Gewaschene Thrombozyten wurden in Kontroll- (□) oder FXI-depletiertem (■) oder FXI-depletiertem Plasma + humanem FXI (1 U/ml ■) resuspendiert (150×10^3 TZ/ μ l) und je 80 μ l in eine 96-„Well“ Platte pipettiert. Als Aktivator wurden (A) 20 μ l TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in Kontroll- und FXI-depletiertem bzw. FXI-depletiertem Plasma + humanem FXI. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 5-7). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001; n. s. nicht signifikant.

4.1.6. Rolle des Gerinnungsfaktors XII in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung

An der Kontaktaktivierung ist der Gerinnungsfaktor XII beteiligt. Um zu untersuchen, inwiefern sich das Fehlen von FXII auf die Thrombozyten-abhängige Thrombingenerierung auswirkt, wurden gewaschene Thrombozyten in Kontroll- und FXII-depletiertem Plasma resuspendiert.

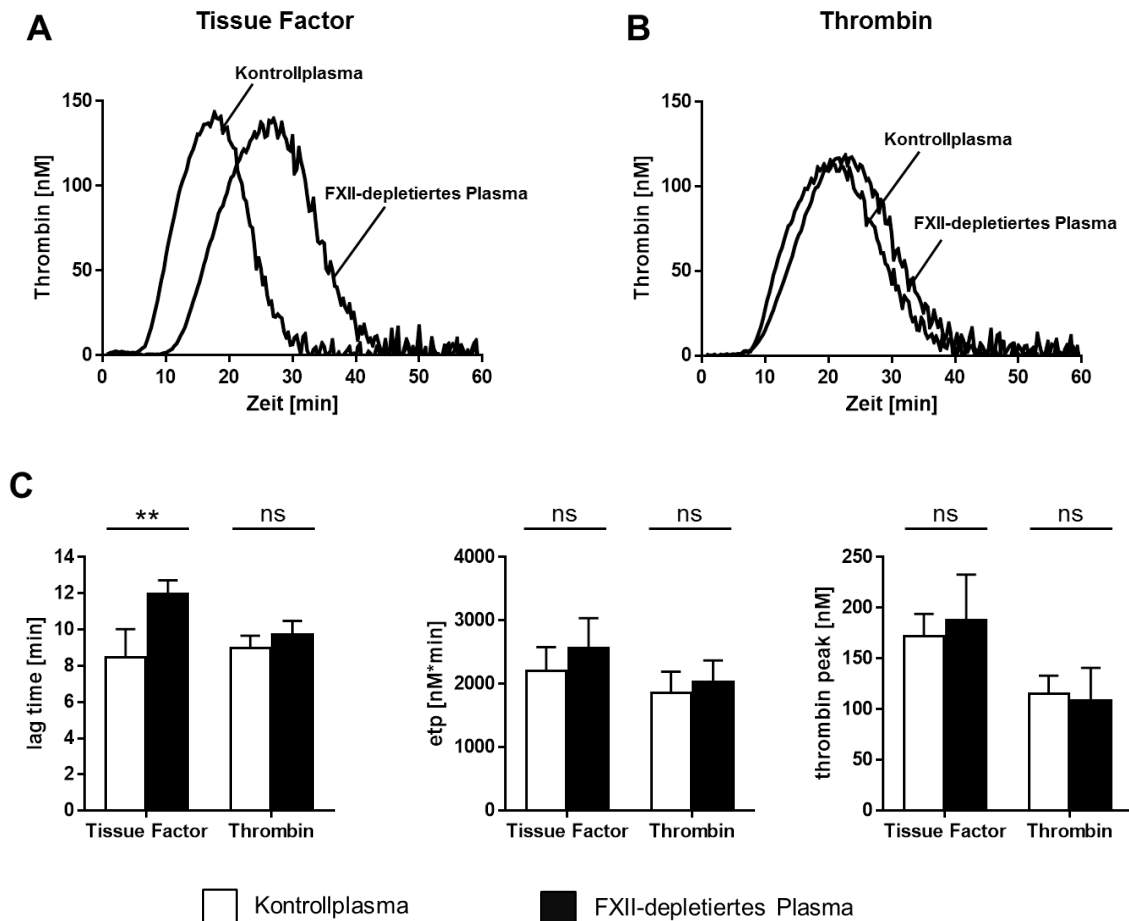


Abbildung 19: Einfluss des FXII auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.

Gewaschene Thrombozyten wurden in Kontroll- (□) oder FXII-depletiertem (■) Plasma resuspendiert (150×10^3 TZ/ μ l) und je 80 μ l in eine 96-„Well“ Platte pipettiert. Als Aktivator wurden (A) 20 μ l TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in Kontroll- und FXII-depletiertem Plasma. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD ($n = 4$). ** $P < 0,01$; n. s. nicht signifikant.

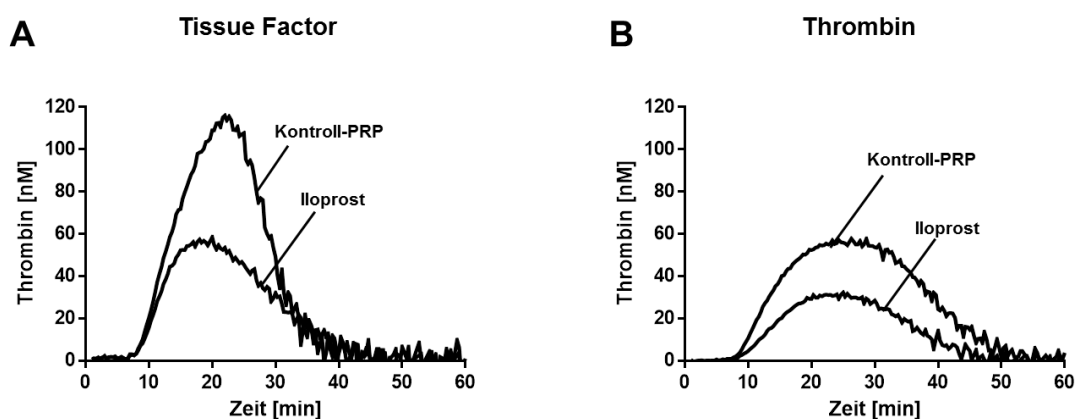
Abbildung 19 zeigt, dass die „lag time“ nach Stimulation mit TF in FXII-depletiertem Plasma signifikant verzögert war, während „etp“ und „thrombin peak“ unverändert

blieben. Auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung hatte das Fehlen von FXII keinen Einfluss. Der FXII spielt somit eine Rolle in der TF-induzierten Thrombingenerierung, während die Thrombin-induzierte Thrombinbildung nicht von FXII beeinflusst wird.

4.1.7. Rolle der G-Protein-gekoppelten Thrombozytenaktivierung in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung

Um zu untersuchen, inwiefern die G-Protein-Phosphorylierung und somit die Thrombozytenaktivierung die Thrombozyten-abhängige Thrombingenerierung beeinflusst, wurde PRP mit dem Prostazyklin-Analogon Iloprost inkubiert.

Aus Abbildung 20 wird ersichtlich, dass Iloprost sowohl auf die TF- als auch auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung einen Einfluss hatte. Während die „lag time“ bei beiden Aktivatoren unverändert blieb, verursachte die Inkubation mit Iloprost eine signifikante Reduktion des „etps“ und des „thrombin peaks“ in Thrombin-induzierter Thrombingenerierung (Abbildung 20 B und C). Bei der TF-induzierten Thrombinbildung konnte nur für den „thrombin peak“ eine signifikante Reduktion beobachtet werden (Abbildung 20 C), obwohl die repräsentative Abbildung 20 A eine Abnahme des „etp“ vermuten ließ. Diese Ergebnisse zeigen, dass der cAMP-Anstieg und die damit verbundene Phosphorylierung der G-Proteine und Thrombozytenaktivierung an der TF-induzierten sowie Thrombin-induzierten Thrombingenerierung beteiligt sind.



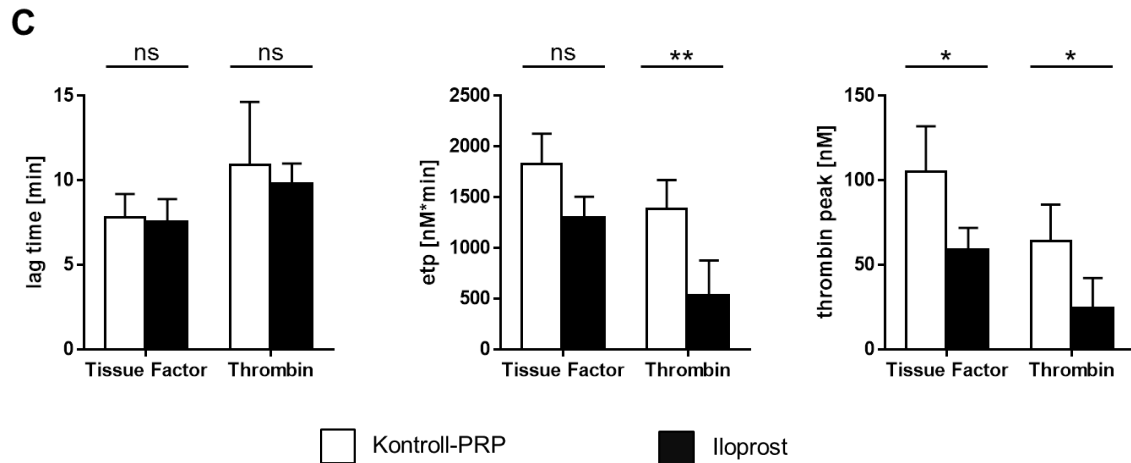


Abbildung 20: Einfluss des Prostazyklin-Analogons Iloprost auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.

Je 80 μ l PRP (150×10^3 TZ/ μ l) wurden in einer 96-„Well“ Platte in Ab- (□) oder Anwesenheit von Iloprost (10 nM ■) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden (A) 20 μ l TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipetiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). *P < 0,05; **P < 0,01; n. s. nicht signifikant.

4.1.8. Rolle des Fc γ -Rezeptors IIa (CD32a) in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung

Um zu gewährleisten, dass keine Kreuzvernetzung und damit unspezifische Aktivierung der Thrombozyten durch die jeweils eingesetzten Antikörper und nicht durch die Fc γ -Rezeptor IIa-Blockierung erfolgte, wurde PRP mit dem anti-CD32a Antikörper IV.3 allein inkubiert und mit Hilfe der CAT analysiert.

Weder nach Stimulation mit TF (Abbildung 21 A und C) noch mit Thrombin (Abbildung 21 B und C) wurden in anti-CD32a Antikörper IV.3-behandeltem PRP signifikante Veränderungen der „lag time“, des „etps“ und „thrombin peaks“ im Vergleich zu IgG Isotyp-Kontrolle-behandeltem PRP detektiert. Auch eine höhere Konzentration (15 μ g/ml, nicht gezeigt) resultierte in keiner Inhibition. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die TF- bzw. Thrombin-induzierte Thrombingenerierung nicht direkt durch den Fc γ -Rezeptor IIa, sondern durch die jeweiligen funktionell-blockierenden Antikörper beeinflusst wurde.

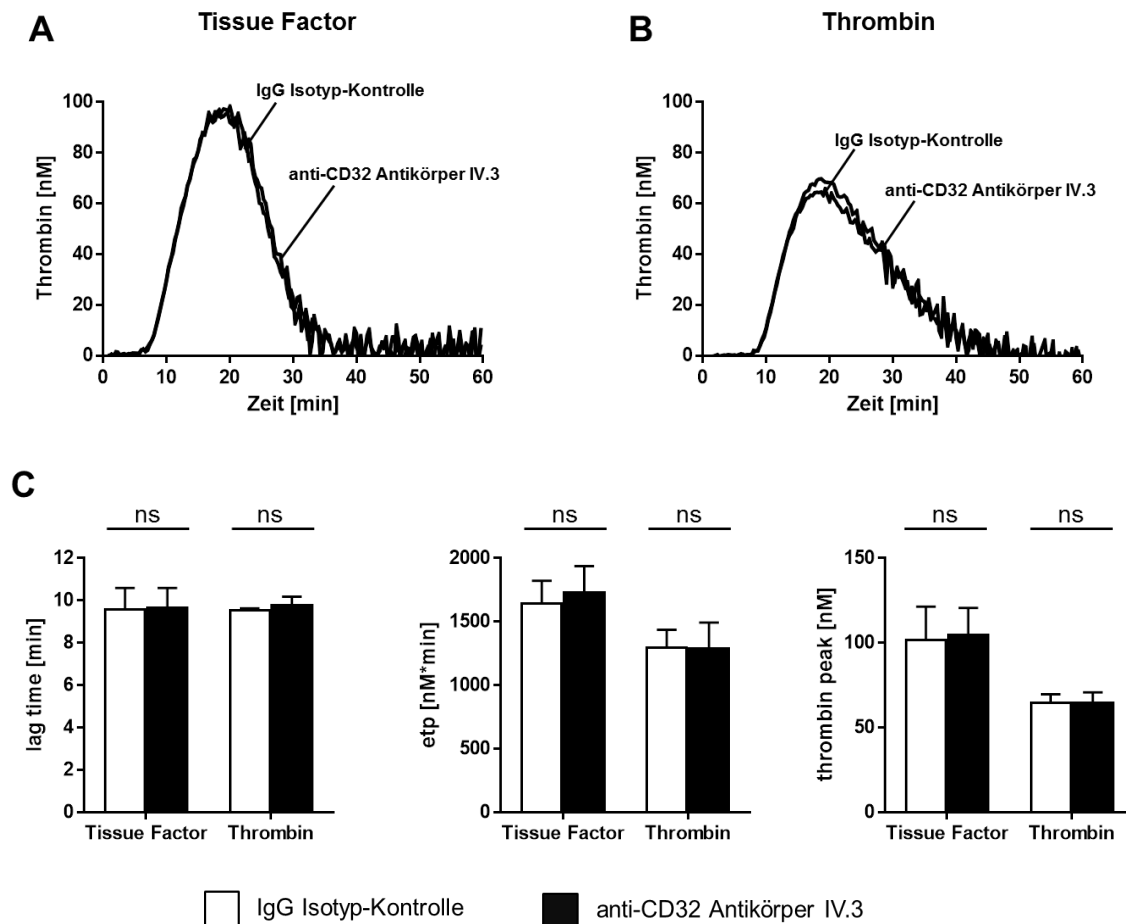


Abbildung 21: Einfluss des anti-CD32a Antikörpers IV.3 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.

Je 80 µl PRP (150×10^3 TZ/µl) wurden in einer 96-„Well“ Platte entweder mit IgG Isotyp-Kontrolle (10 µg/ml □) oder dem anti-CD32 Antikörper IV.3 (10 µg/ml ■) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden (A) 20 µl TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 µl α-Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 µl FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD (n = 4). n.s. nicht signifikant.

4.1.9. Rolle des Thrombozytenrezeptors CD36 in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung

Inwiefern der Thrombozytenrezeptor CD36 in die Thrombin-stimulierte Thrombingenerierung involviert ist, wurde mit Hilfe von CD36-defizienten Thrombozyten und der CAT untersucht.

Bei der TF-induzierten Thrombinbildung (Abbildung 22 A und C) wurde im PRP des CD36-defizienten Spenders eine verkürzte „lag time“ und ein verminderter „thrombin peak“, jedoch keine signifikante Veränderung des „etps“ im Vergleich zum PRP

gesunder Spender:innen beobachtet. Bei der Thrombin-induzierten Thrombinbildung (Abbildung 22 B und C) blieb die „lag time“ unbeeinflusst, jedoch waren das „etp“ und der „thrombin peak“ in CD36-defizientem PRP signifikant um max. 50 % reduziert. Der Rezeptor CD36 ist also deutlich an der Thrombin-induzierten Thrombinbildung beteiligt, während die TF-induzierte Thrombingenerierung weniger von CD36 abhängt.

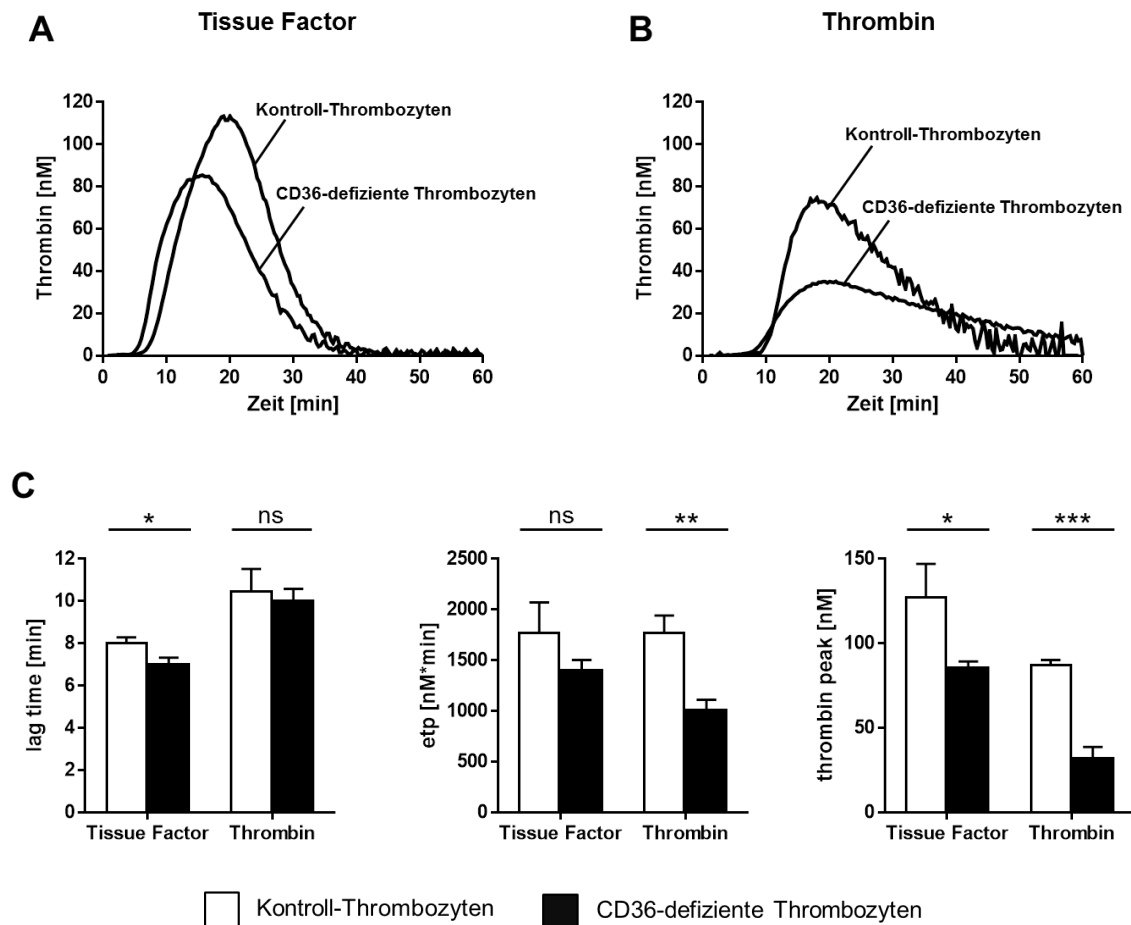


Abbildung 22: Einfluss des Thrombozytenrezeptors CD36 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombinbildung in PRP.

Je 80 µl Kontroll-PRP (□) oder PRP eines CD36-defizienten Spenders (■) (150×10^3 TZ/µl) wurden in eine 96-„Well“ Platte pipettiert. Als Aktivator wurden (A) 20 µl TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 µl α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 µl FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in Kontroll- und Spender-PRP. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; n. s. nicht signifikant.

Da der Rezeptor CD36 eine Rolle in der Thrombin-induzierten Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung spielte, wurden verschiedene CD36-blockierende Antikörper getestet.

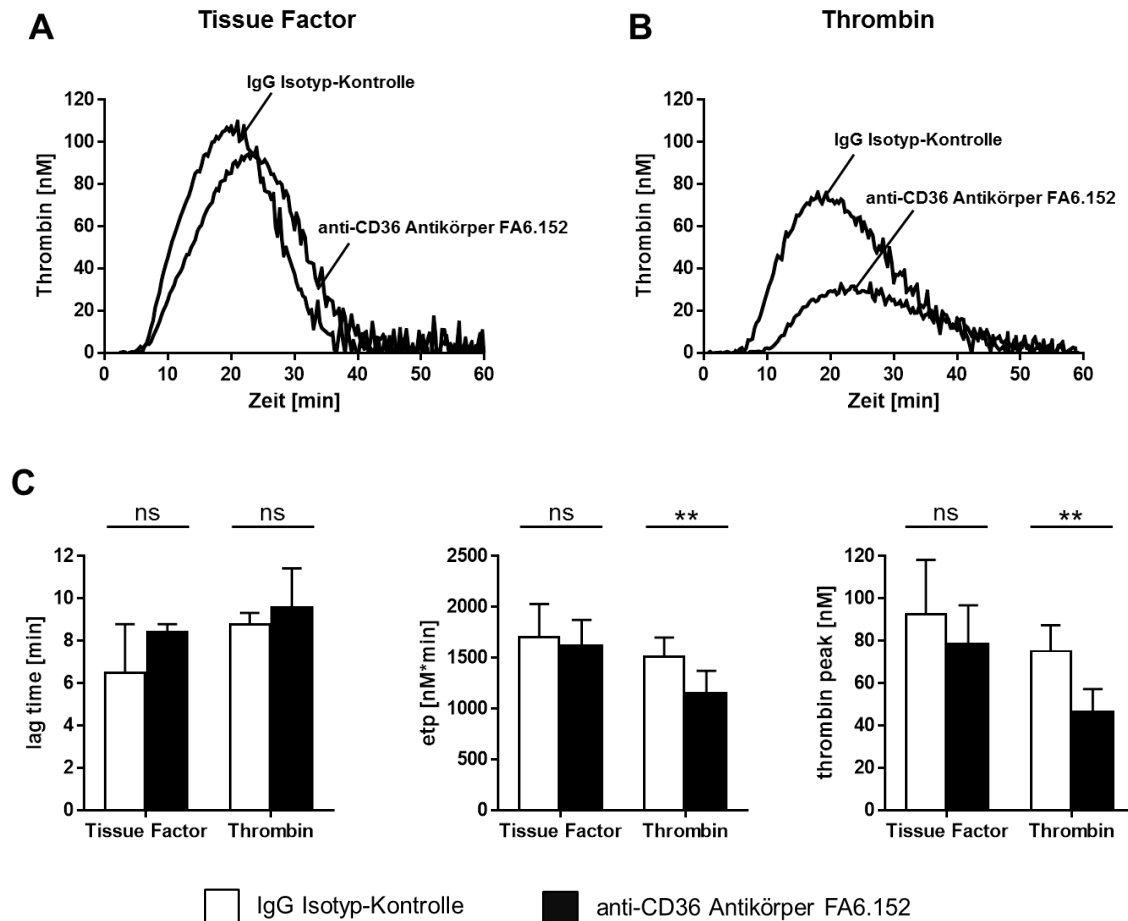


Abbildung 23: Einfluss des anti-CD36 Antikörpers FA6.152 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.

Je 80 µl PRP (150×10^3 TZ/µl) wurden in einer 96-„Well“ Platte entweder mit IgG Isotyp-Kontrolle (5 µg/ml □) oder dem anti-CD36 Antikörper FA6.152 (5 µg/ml ■) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden (A) 20 µl TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 µl α-Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 µl FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD (n = 3). **P < 0,01; n. s. nicht signifikant.

Die Inhibition des CD36-Rezeptors durch 5 µg/ml anti-CD36 Antikörper FA6.152 beeinflusste die TF-induzierte Thrombingenerierung nicht signifikant (Abbildung 23 A und C), jedoch konnte bei der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung (Abbildung 23 B und C) eine signifikante Verminderung des „etps“ und des „thrombin peaks“ um max. 50 % beobachtet werden. Die „lag time“ blieb in TF- und Thrombin-

induzierter Thrombingenerierung nach Inkubation mit dem CD36 Antikörper FA6.152 unverändert. Diese Ergebnisse bestätigen die zuvor beobachtete wichtige Beteiligung des Thrombozytenrezeptors CD36 an der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung, während die TF-induzierte Thrombinbildung unabhängig von CD36 ist.

Weiterhin wurden der anti-CD36 Antikörper CLB-IVC7 (Abbildung 24) sowie der anti-CD36 Antikörper 185-1G2 (Abbildung 25) getestet.

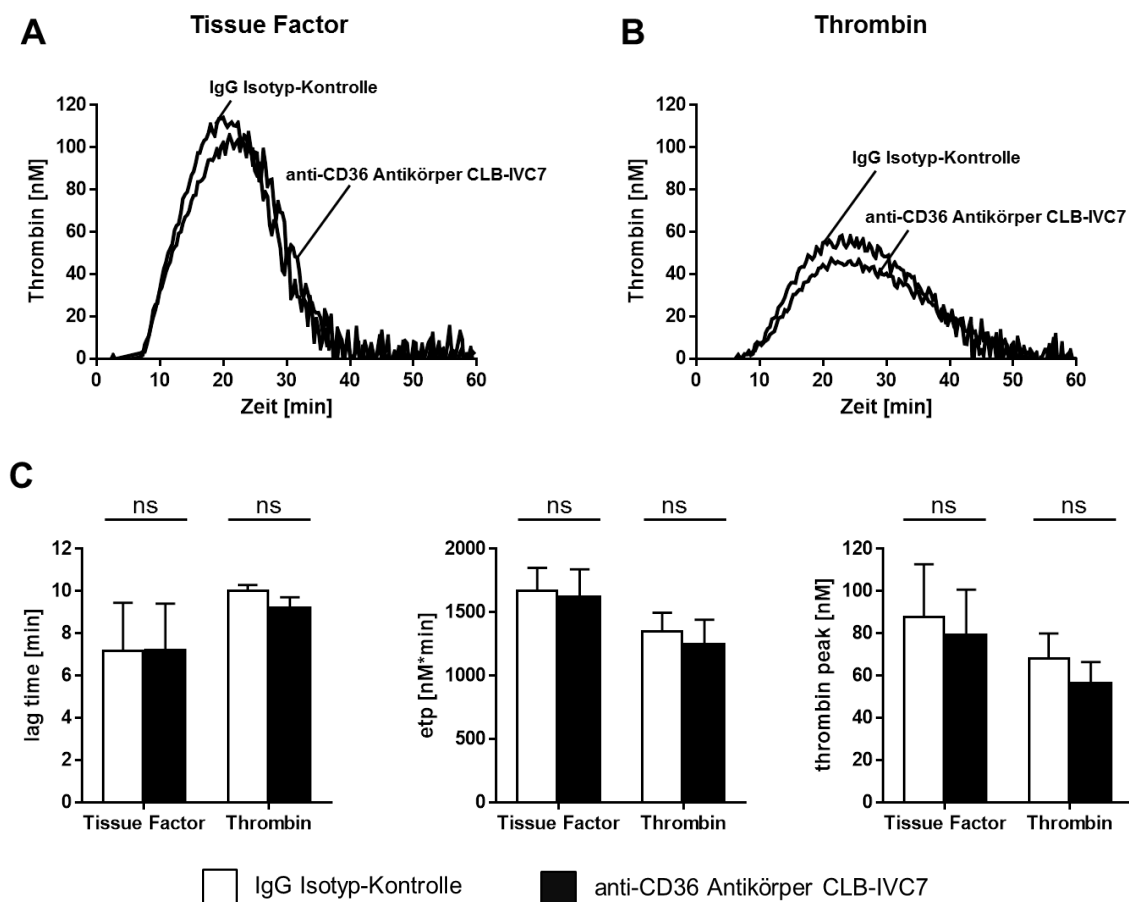


Abbildung 24: Einfluss des anti-CD36 Antikörpers CLB-IVC7 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.

Je 80 μ l PRP (150×10^3 TZ/ μ l) wurden in einer 96-„Well“ Platte entweder mit IgG Isotyp-Kontrolle (5 μ g/ml) oder dem anti-CD36 Antikörper CLB-IVC7 (5 μ g/ml) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden (A) 20 μ l TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thromboskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). n. s. nicht signifikant.

Im Gegensatz zu dem Klon FA6.152 konnten bei dem Klon CLB-IVC7 sowie dem Klon 185-1G2 keine signifikanten Veränderungen der „lag time“, des „etps“ und des „thrombin peaks“ bei der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung beobachtet werden. Auch eine höhere Konzentration (10 µg/ml, nicht gezeigt) führte zu keinen Effekten. Diese Ergebnisse lassen auf einen Epitop-spezifischen Effekt der jeweiligen Klone auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung schließen.

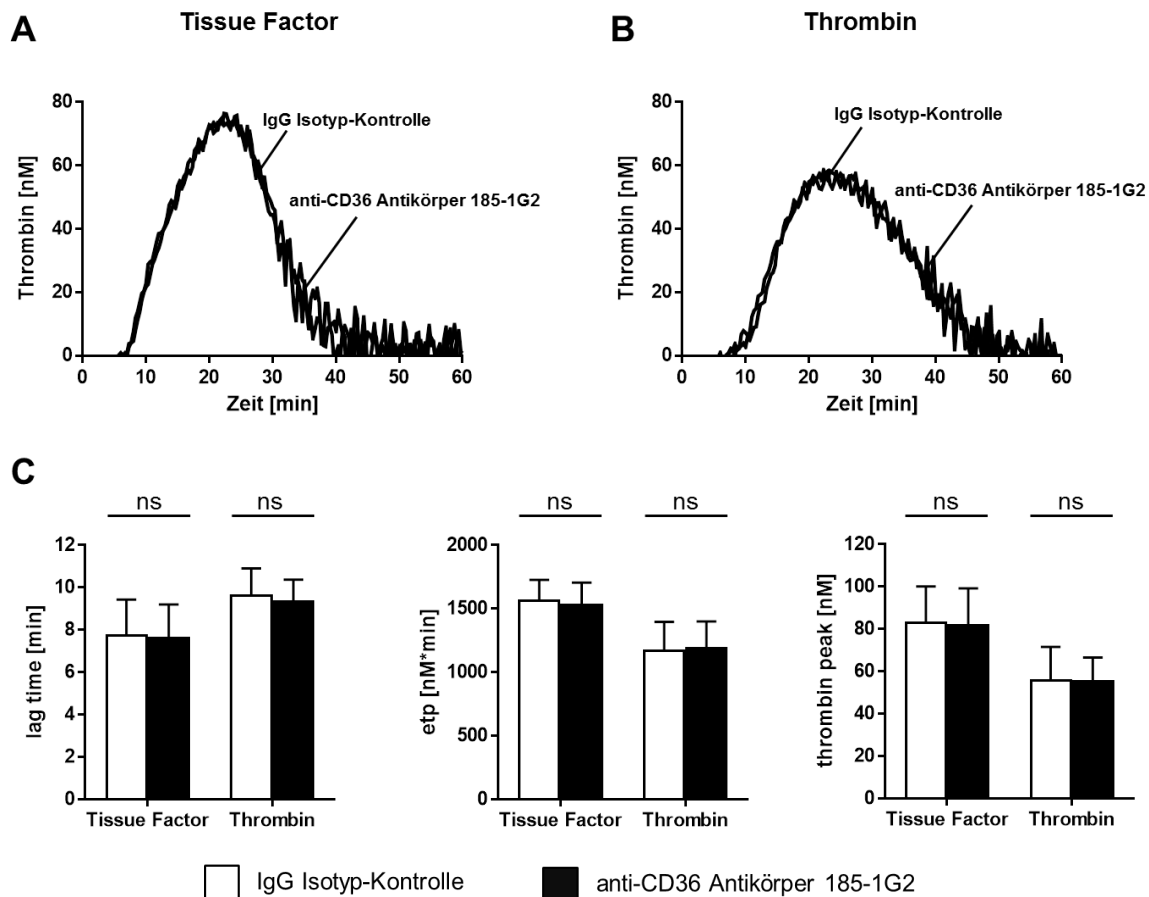


Abbildung 25: Einfluss des anti-CD36 Antikörpers 185-1G2 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.

Je 80 µl PRP (150×10^3 TZ/µl) wurden in einer 96-„Well“ Platte entweder mit IgG Isotyp-Kontrolle (5 µg/ml □) oder dem anti-CD36 Antikörper 185-1G2 (5 µg/ml ■) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden (A) 20 µl TF (PRP-Reagenz, finale Konzentration 1 pM) oder (B) 20 µl α-Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 µl FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD (n = 3). n. s. nicht signifikant.

4.1.10. Rolle des Thrombozytenrezeptors CD36 in Citrat-Vollblut

Zusätzlich wurde der Einfluss des anti-CD36 Antikörpers FA6.152 auf die Thrombingenerierung im Citrat-Vollblut untersucht.

Auch hier hatte die Inhibition des CD36-Rezeptors keinen Effekt auf die TF-induzierte Thrombingenerierung (Abbildung 26 A und C), während bei der Thrombin-induzierten Thrombinbildung eine signifikante Verminderung des „etps“ und „thrombin peaks“, jedoch keine Veränderung der „lag time“ beobachtet werden konnte (Abbildung 26 B und C). Diese Ergebnisse festigen die zuvor in PRP beobachteten Resultate, dass CD36 an der Thrombin-induzierten, jedoch nicht relevant an der TF-induzierten Thrombingenerierung beteiligt ist.

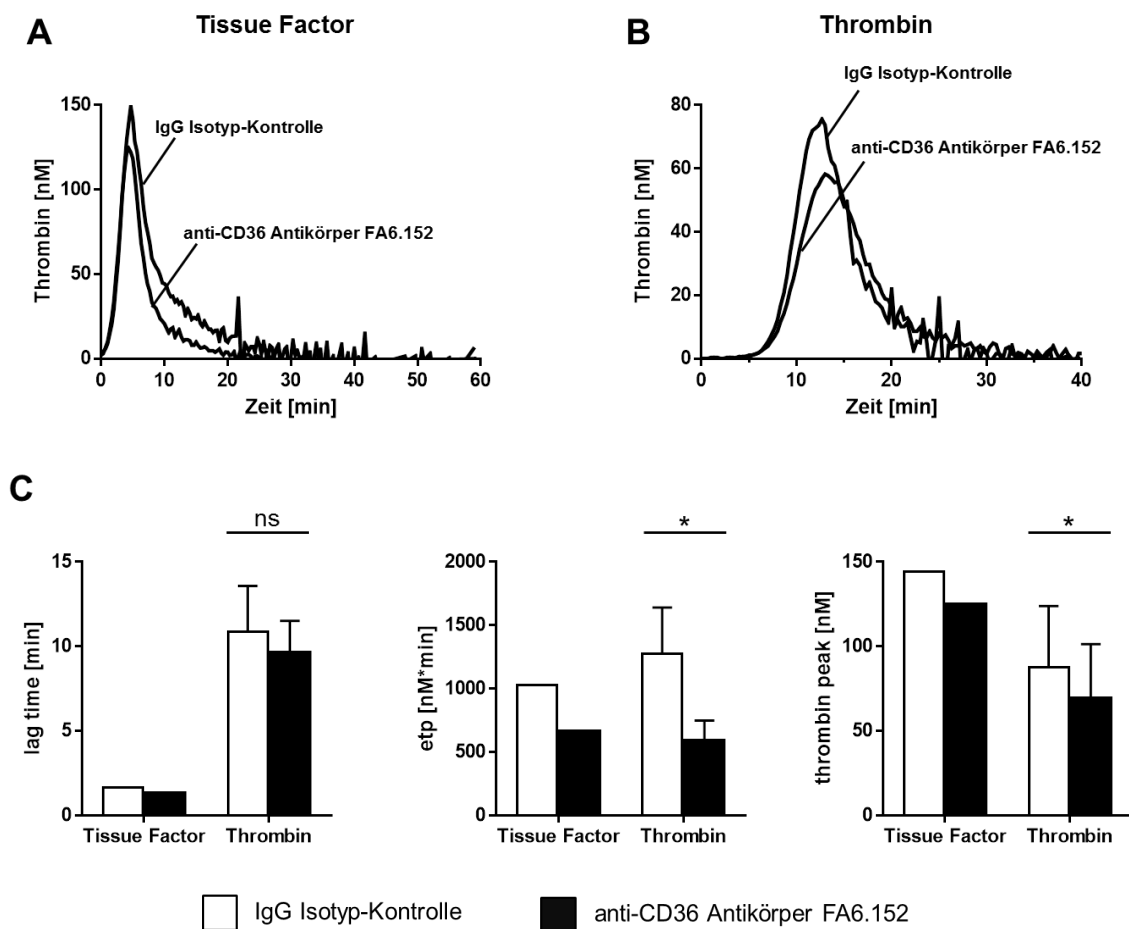


Abbildung 26: Einfluss des anti-CD36 Antikörpers FA6.152 auf die „Tissue Factor“- und Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in Citrat-Vollblut.

Je 30 μ l Citrat-Vollblut wurden entweder mit IgG Isotyp-Kontrolle (5 μ g/ml □) oder dem anti-CD36 Antikörper FA6.152 (5 μ g/ml ■) für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden als Thrombin-Substrat je 10 μ l P₂Rho (finale Konzentration 300 μ M) und als Aktivator (A) 5 μ l TF (finale Konzentration 0,5 pM) oder (B) 5 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert und die Thrombingenerierung durch die Zugabe von je 15 μ l HEPES-CaCl₂-BSA-Puffer (finale Konzentration CaCl₂ 16,7 mM) initiiert. Es wurden 5 μ l von dem Gemisch auf Filterpapiere in einer 96-„Well“ Platte pipettiert, mit 40 μ l vorgewärmtem Mineralöl überschichtet und die Messung gestartet. Die Thrombingenerierung wurde mit dem Thrombinoskop für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in Citrat-Vollblut. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 1-3). *P < 0,05; n. s. nicht signifikant.

4.1.11. Quantifizierung des Thrombozytenrezeptors CD36 in humanem PRP

Die mit Hilfe der CAT analysierte Thrombingenerierung zeigte, dass interindividuelle Unterschiede in Hinblick auf die Hemmung der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung durch den anti-CD36 Antikörper FA6.152 existieren. Um herauszufinden, ob eine Korrelation zwischen der Anzahl der CD36-Rezeptoren und der Thrombin-generierung besteht, wurde der CD36-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert und in Relation zu dem Thrombin-induzierten „etp“ in An- und Abwesenheit des anti-CD36 Antikörpers FA6.152 gesetzt.

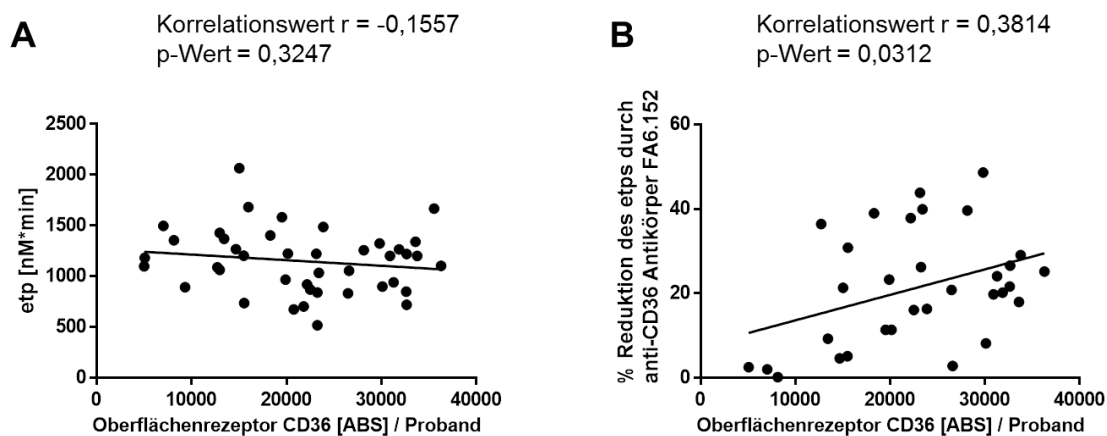


Abbildung 27: Korrelation zwischen der CD36-Oberflächenrezeptorenanzahl und der Thrombingenerierung bzw. der Reduktion des „etps“ durch den anti-CD36 Antikörper FA6.152.

Je 80 μ l PRP (150×10^3 TZ/ μ l) wurden in einer 96-„Well“ Platte mit IgG Isotyp-Kontrolle (5 μ g/ml) bzw. anti-CD36 Antikörper FA6.152 (5 μ g/ml) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. Die Werte wurden zur Auswertung in Graph Pad Prism übertragen. Verdünntes PRP wurde mit Formaldehyd in PBS fixiert, gewaschen und mit anti-CD36 FITC bzw. der entsprechenden IgG Isotyp-Kontrolle FITC markiert. Anschließend wurden 10 000 TZ/Probe mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die Korrelation wurde mit Hilfe des Pearson-Regressionskoeffizienten erstellt. A: Korrelation zwischen dem „etp“ und der Anzahl der CD36-Oberflächenrezeptoren auf den Thrombozyten. B: Korrelation zwischen dem inhibitorischen Effekt von anti-CD36 Antikörper FA6.152 auf das „etp“ und der Anzahl der CD36-Oberflächenrezeptoren auf den Thrombozyten. Dargestellt ist die CD36-Oberflächenrezeptoranzahl vs. „etp“ bzw. Reduktion des „etps“ durch anti-CD36 Antikörper FA6.152 (n = 25). ABS: Antigenbindungsstellen des anti-CD36 Antikörpers FA6.152, die mit Hilfe einer Eichgeraden ermittelt wurden.

Die Anzahl des Thrombozytenrezeptors CD36 korrelierte nicht signifikant mit dem Thrombin-induzierten „etp“ ($r = -0,1557$, p-Wert = 0,3247, Abbildung 27 A). Jedoch wurde eine signifikante positive Korrelation ($r = 0,3814$, p-Wert = 0,0312) ermittelt, wenn die Thrombinbildung durch den anti-CD36 Antikörper FA6.152 inhibiert wurde

(Abbildung 27 B). Je höher die Anzahl der CD36-Rezeptoren, desto stärker wurde das „etp“ durch den anti-CD36 Antikörper FA6.152 gehemmt.

4.2. Mechanismen der CD36-abhängigen Thrombingenerierung

4.2.1. Rolle von GPIIb in der CD36-abhängigen Thrombingenerierung

Zusammen mit den Glykoproteinen V und IX bilden GPIIb und GPIIb β auf Thrombozyten den GPIIb-Komplex des GPIIb-V-IX-Komplexes, der eine wichtige Rolle in der primären Phase der Hämostase spielt. Mit Hilfe der CAT wurde untersucht, inwiefern GPIIb eine Rolle in der CD36-abhängigen, Thrombin-induzierten Thrombingenerierung spielt. Dazu wurde PRP mit dem anti-GPIIb Antikörper SZ2 in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152 inkubiert.

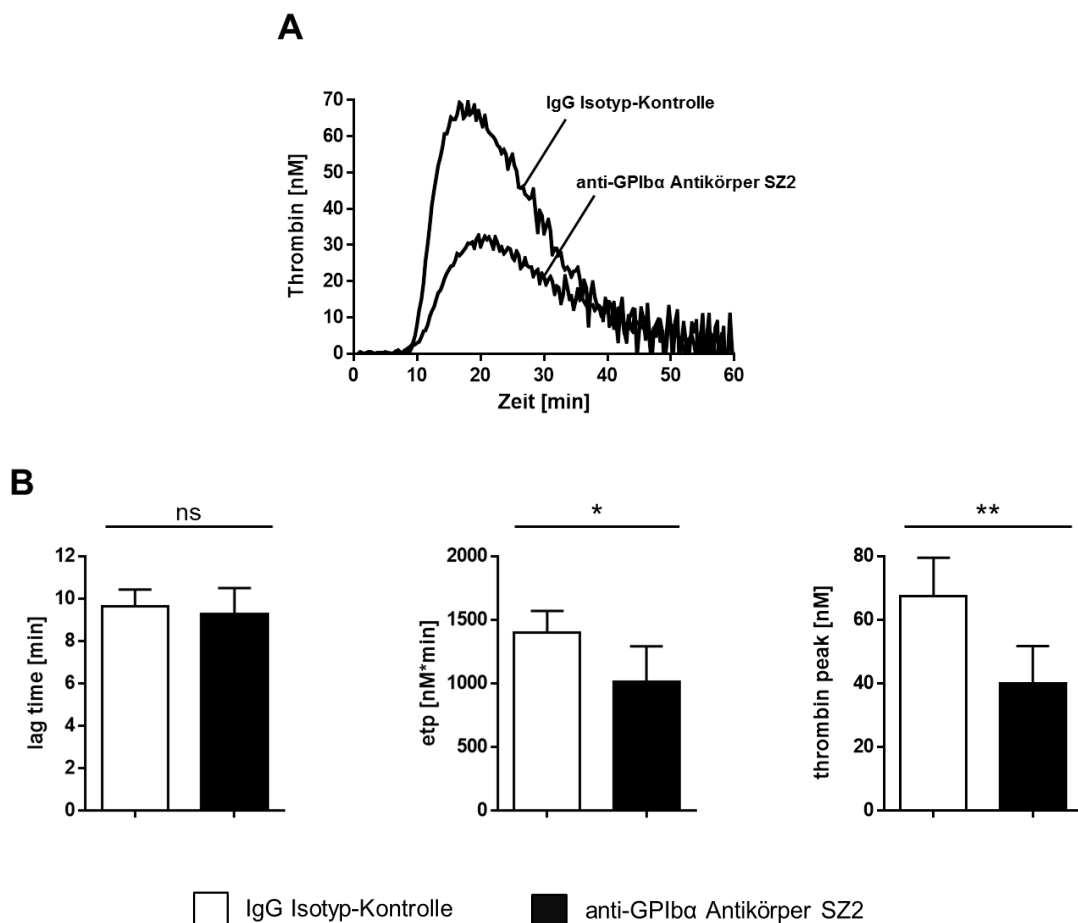


Abbildung 28: Einfluss des anti-GPIIb Antikörpers SZ2 auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.

Je 80 μ l PRP ($150 \times 10^3/\mu$ l) wurden in einer 96-„Well“ Platte entweder mit IgG Isotyp-Kontrolle (10 μ g/ml □) oder dem anti-GPIIb Antikörper SZ2 (10 μ g/ml ■) für 10 min bei RT inkubiert. Als

Aktivator wurden 20 µl α-Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 µl FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. B: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD (n = 4). *P < 0,05; **P < 0,01; n. s. nicht signifikant.

Abbildung 28 zeigt deutlich den inhibierenden Effekt des anti-GPIIb/IIIa Antikörpers SZ2 auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung. Während die „lag time“ unverändert blieb, konnte eine signifikante Reduktion des „etps“ und des „thrombin peaks“ um max. 50 % detektiert werden. Diese Ergebnisse lassen auf eine partielle Rolle von GPIIb/IIIa in der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung schließen.

Wie bereits beschrieben, führten die Antikörper anti-CD36 Antikörper FA6.152 und anti-GPIIb/IIIa jeweils zu einer signifikanten Reduktion des „thrombin peaks“. Die Kombination von anti-CD36 Antikörper FA6.152 und anti-GPIIb/IIIa Antikörper SZ2 resultierte jedoch in keiner additiven Inhibition, wenn beide Antikörper allein eine submaximale Inhibition zeigten (Abbildung 29). Folglich ist GPIIb/IIIa an der CD36-abhängigen Thrombingenerierung beteiligt.

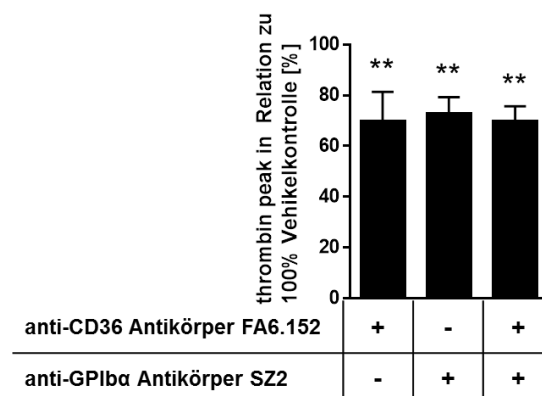


Abbildung 29: Einfluss des anti-GPIIb/IIIa Antikörpers SZ2 auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.

Je 80 µl PRP (150×10^3 TZ/µl) wurden in einer 96-„Well“ Platte entweder mit IgG Isotyp-Kontrolle (5 µg/ml) oder dem anti-GPIIb/IIIa Antikörper SZ2 (5 µg/ml) in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152 (5 µg/ml) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden 20 µl α-Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 µl FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. Quantitative Darstellung des „thrombin peaks“. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD (n = 3) im Vergleich zu 100 % Vehikelkontrolle (IgG Isotyp-Kontroll-behandeltes PRP). **P < 0,01.

Ähnliche Ergebnisse konnten im PRP eines Patienten mit Bernard-Soulier-Syndrom (BSS, Expression von < 1 % GPIIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche) beobachtet

werden (Abbildung 30). Die Thrombingenerierung im PRP des BSS Patienten war deutlich geringer als die Thrombinbildung im Kontroll-PRP und die Inkubation von BSS Patienten-PRP mit dem anti-CD36 Antikörper FA6.152 zeigte keine zusätzliche Abnahme der Thrombingenerierung. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass GPIIb/IIIa in die CD36-abhängigen Thrombingenerierung involviert ist.

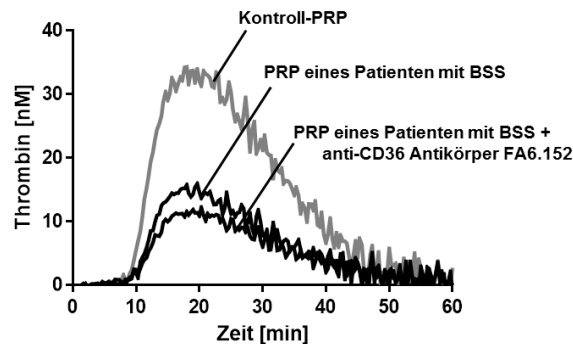


Abbildung 30: Einfluss des Bernard-Soulier-Syndroms auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.

Je 80 μ l PRP eines BSS Patienten (pur, 21×10^3 TZ/ μ l ■) und PRP der gesunden Patientinmutter (115×10^3 TZ/ μ l ■) wurden in eine 96-„Well“ Platte entweder in Gegenwart von IgG Isotyp-Kontrolle (5 μ g/ml) oder in Gegenwart von anti-CD36 Antikörper FA6.152 (5 μ g/ml) pipettiert. Als Aktivator wurden 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. Repräsentative Darstellung der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in Kontroll- und Patienten-PRP.

4.2.2. Rolle des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ in der CD36-abhängigen Thrombingenerierung

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist an der Thrombozytenaktivierung beteiligt, indem es die Kinase Syk mittels „outside-in-signaling“ nach Bindung von Liganden wie z.B. Fibrinogen/Fibrin aktiviert. Um zu analysieren, ob $\alpha_{IIb}\beta_3$ oder Syk in der CD36-abhängigen, Thrombin-induzierten Thrombingenerierung eine Rolle spielen, wurde PRP in An- oder Abwesenheit des anti-CD36 Antikörpers FA6.152 mit dem reversiblen $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Antagonisten Tirofiban oder dem Syk Kinase-Inhibitor IV inkubiert.

Die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung wurde durch Tirofiban signifikant inhibiert (Abbildung 31). Die „lag time“ tendierte zu einer Verzögerung, die jedoch nicht signifikant war, das „etp“ und der „thrombin peak“ hingegen waren signifikant reduziert. Diese Ergebnisse weisen auf die Beteiligung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und dessen Ligandenbindung an der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung hin.

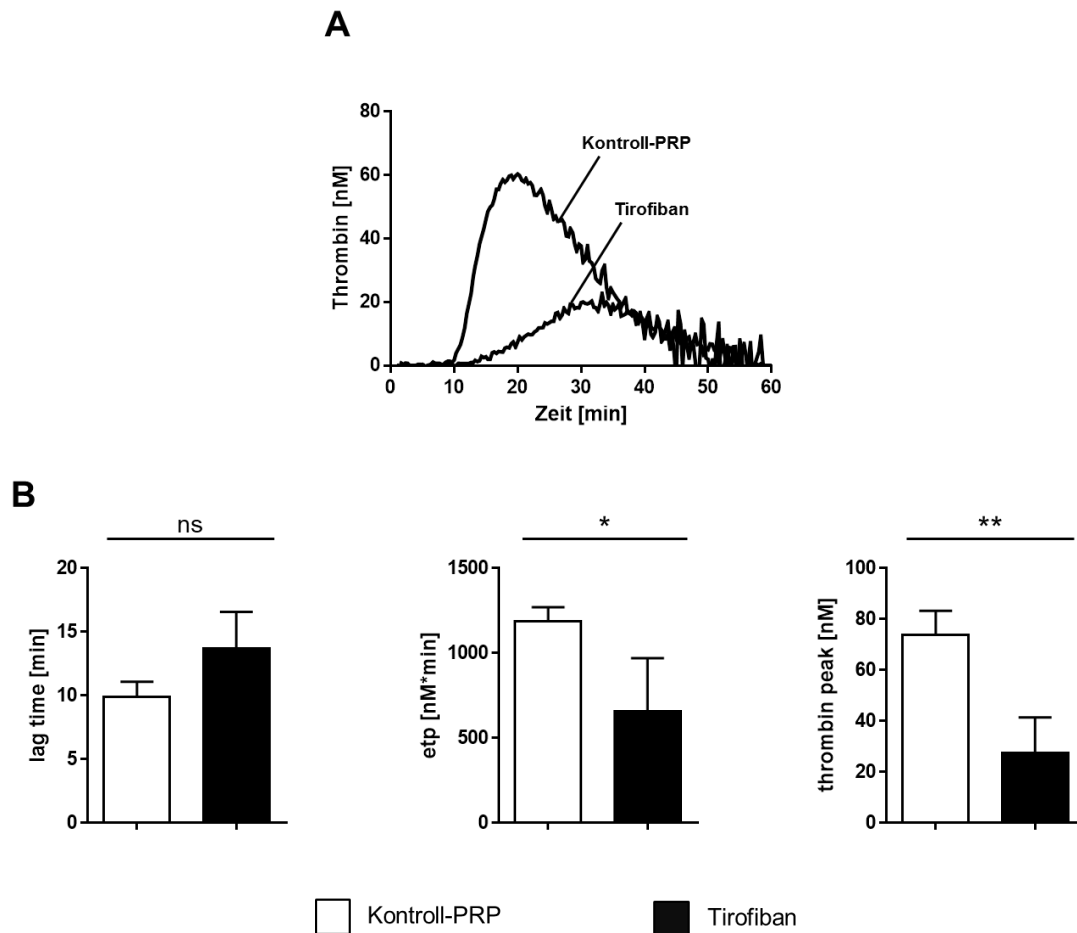


Abbildung 31: Einfluss des Thrombozytenaggregationshemmers Tirofiban auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.

Je 80 μ l PRP (150×10^3 TZ/ μ l) wurden in einer 96-„Well“ Platte in An- (5 μ M ■) oder Abwesenheit (□) von Tirofiban für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 4). *P < 0,05; **P < 0,01; n. s. nicht signifikant.

Der Syk Kinase-Inhibitor IV hatte einen inhibitorischen Effekt auf die Thrombin-induzierte Thrombinbildung (Abbildung 32). Die „lag time“ war marginal, jedoch signifikant verlängert, während für das „etp“ keine signifikante Reduktion detektiert werden konnte. Auch der „thrombin peak“ war signifikant reduziert. Die Syk Kinase ist folglich in die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung involviert.

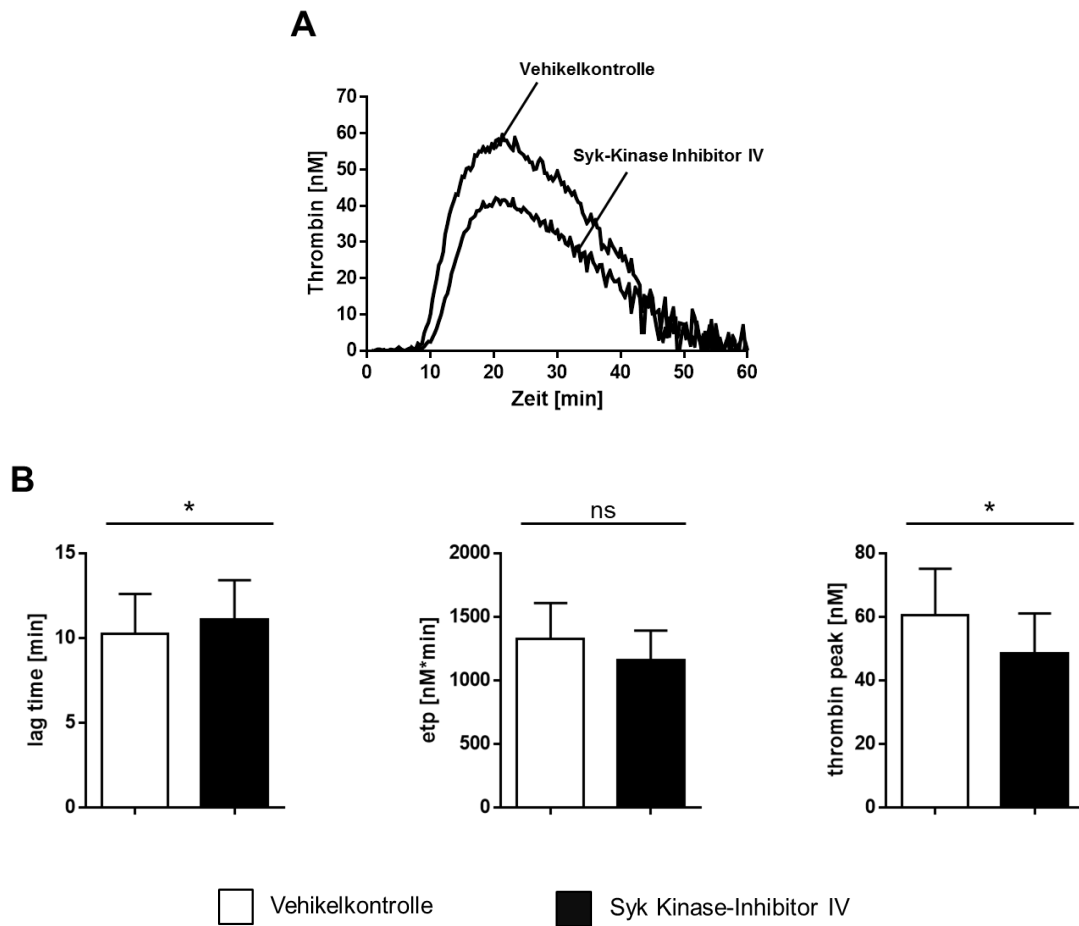


Abbildung 32: Einfluss des Syk Kinase-Inhibitors IV auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.

Je 80 μ l PRP (150×10^3 TZ/ μ l) wurden in einer 96-„Well“ Platte mit dem Syk Kinase-Inhibitor IV (1,25 μ g/ml ■) bzw. der Vehikelkontrolle DMSO (0,1 % □) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der TF-induzierten und B: der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. C: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 4). *P < 0,05; n. s. nicht signifikant.

Um den kombinatorischen Einfluss von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und Syk auf die CD36-abhängige Thrombingenerierung zu untersuchen, wurden die Antagonisten bei einer suboptimalen Hemmung differenziell kombiniert. Anti-CD36 Antikörper FA6.152, Tirofiban und Syk Kinase-Inhibitor IV hatten einen inhibitorischen Effekt auf die Thrombingenerierung, da hier jedoch eine suboptimale CD36-Inhibition gezeigt wird, sind die Statistiken für anti-CD36 Antikörper FA6.152 und Syk Kinase-Inhibitor IV in der Abbildung 33 nicht signifikant. In Gegenwart von anti-CD36 Antikörper FA6.152 war sowohl für Tirofiban als auch für den Syk Kinase-Inhibitor IV ein signifikanter, additiver inhibitorischer Effekt zu beobachten. Die Kombination aller Inhibitoren resul-

tierte in einer signifikanten, additiven Reduktion des „thrombin peaks“. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das aktivierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ sowie die Syk Kinase in die CD36-abhängige Thrombingenerierung involviert sind, aber auch unabhängig von CD36 die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung mediiieren.

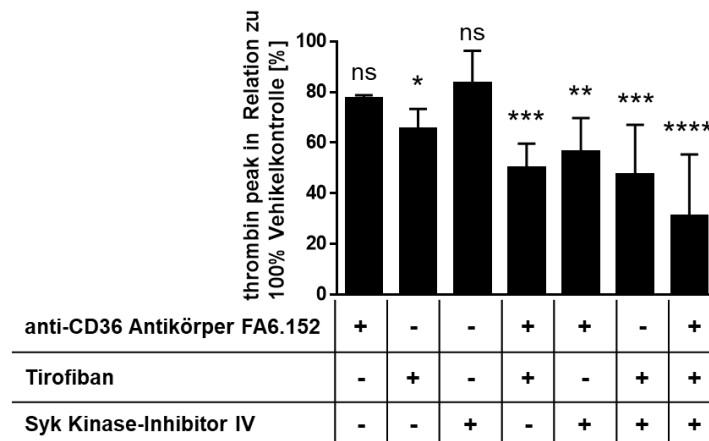


Abbildung 33: Einfluss von Tirofiban bzw. Syk Kinase-Inhibitor IV auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.

Je 80 μ l PRP (150×10^3 TZ/ μ l) wurden in einer 96-,Well“ Platte mit IgG Isotyp-Kontrolle (2,5 μ g/ml) bzw. dem $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Inhibitor Tirofiban (2,5 μ M) bzw. dem Syk Kinase-Inhibitor IV (1,25 μ g/ml) in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152 (2,5 μ g/ml) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinskop gestartete und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. Quantitative Darstellung des „thrombin peaks“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3) im Vergleich zu 100 % Vehikelkontrolle (IgG Isotyp-Kontroll-behandeltes PRP). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001; n. s. nicht signifikant.

4.2.3. Rolle von δ -granulären Verstärkungsagonisten in der CD36-abhängigen Thrombingenerierung

Die Sekretion der Thrombozytengranula ist ein wichtiger Prozess bei der Ausübung der verschiedenen Thrombozytenfunktionen. Um die Rolle der δ -Granula-Sekretion in Hinblick auf die Thrombin-induzierte und CD36-abhängige Thrombinbildung zu untersuchen, wurde PRP eines Patienten mit „ δ -storage-pool-disease“, bei dem die thrombozytären δ -Granula massiv reduziert sind, mit Hilfe der CAT analysiert.

Im Vergleich zur Thrombingenerierung im Kontroll-PRP war die Thrombingenerierung im PRP des „ δ -storage-pool-disease“ Patienten vermindert. Weiterhin führte die Inkubation von Patienten-PRP mit dem anti-CD36 Antikörper FA6.152 zu einer additiven Reduktion der Thrombin-induzierten Thrombinbildung (Abbildung 34). Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung der δ -Granulainhaltsstoffe bei der

Thrombin-induzierten Thrombingenerierung hin, die CD36-abhängig, jedoch auch CD36-unabhängig verläuft.

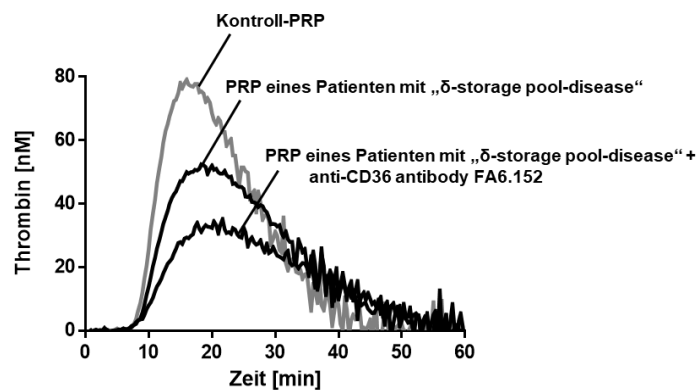


Abbildung 34: Einfluss der δ -Granula-Sekretion auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.

Je 80 μ l Kontroll-PRP (■) und PRP eines Patienten mit „ δ -storage-pool-disease“ (■) (150×10^3 TZ/ μ l) wurden in einer 96-„Well“ Platte in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152 (5 μ g/ml) inkubiert. Als Aktivator wurden 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. Repräsentative Darstellung der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in Kontroll- und Patienten-PRP.

Inwiefern speziell die Sekretion von ADP aus den Granula in die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung involviert ist, wurde mit Hilfe des P2Y₁₂-Blockers AR-C69931 analysiert. PRP wurde dazu in An- oder Abwesenheit des anti-CD36 Antikörpers FA6.152 mit AR-C69931 inkubiert.

Die Inkubation mit der P2Y₁₂-blockierenden Substanz AR-C69931 resultierte in einer signifikanten Abnahme der Thrombingenerierung (Abbildung 35). Die simultane Behandlung des PRPs mit anti-CD36 Antikörper FA6.152 führte zu einer signifikanten und additiven Inhibition der Thrombinbildung. Aufgrund dieser Ergebnisse spielt aus den δ -Granula sezerniertes ADP in der CD36-abhängigen und -unabhängigen, Thrombin-induzierten Thrombingenerierung eine Rolle.

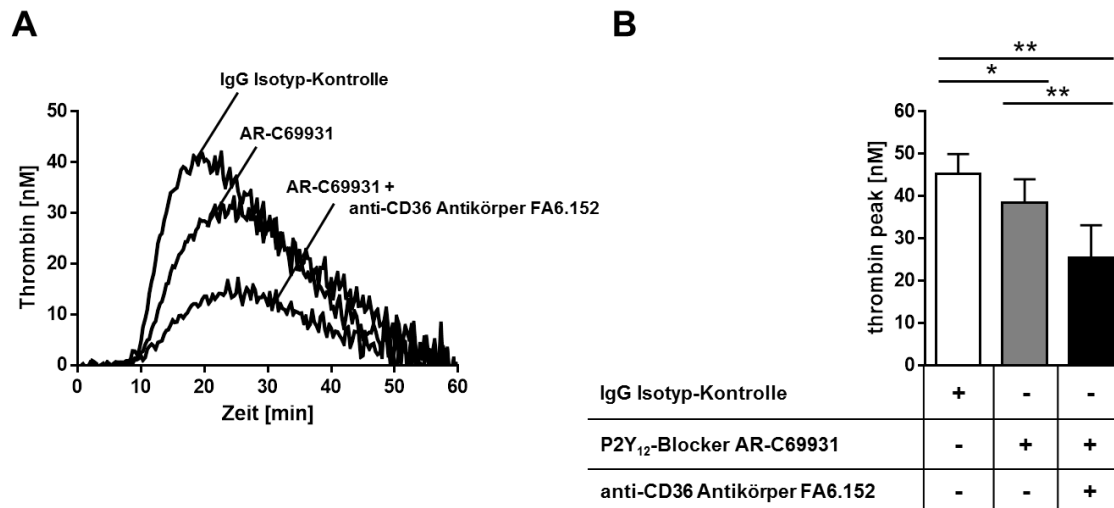


Abbildung 35: Einfluss des P2Y₁₂-Antagonisten AR-C69931 auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.

Je 80 μ l PRP (150×10^3 TZ/ μ l) wurden in einer 96-„Well“ Platte entweder mit IgG Isotyp-Kontrolle (5 μ g/ml □) oder dem P2Y₁₂-Blocker AR-C69931 (5 μ M ■) in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152 (5 μ g/ml ■) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. B: Quantitative Darstellung des „thrombin peaks“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 4). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001; n. s. nicht signifikant.

4.2.4. Rolle von CD36 bei der Thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung (Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, P-Selektin-Oberflächenexpression und Bindung der Adhäsionsproteine Fibrinogen, TSP-1 und vWF an die Thrombozytenoberfläche)

Aufgrund der oben beschriebenen Beteiligung von GPIIb α , $\alpha_{IIb}\beta_3$ und des Thrombozyten-Verstärkungsagonisten ADP an der Thrombin-induzierten und CD36-abhängigen Thrombingenerierung wurde untersucht, ob eine CD36-Blockierung bzw. CD36-Defizienz die Thrombin-induzierte Thrombozytenaktivierung beeinflusst. Dazu wurde verdünntes PRP mit dem anti-CD36 Antikörper FA6.152 inkubiert, mit Thrombin stimuliert, mit den jeweiligen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und anschließend mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Thrombin stellt einen sehr potenten Thrombozytenagonisten dar, der zu einer ausgeprägten Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Abbildung 36 A), der Exozytose der α -Granula (P-Selektin-Expression, Abbildung 36 B), δ -Granula und Lysosomen (CD63-Expression, Abbildung 36 C) sowie der Anbindung der Adhäsionsproteine Fibrinogen (Abbildung 36 D), TSP-1 (Abbildung 36 E) und vWF (Abbildung 36 F)

führt. Die Thrombozytenaktivierung ist durch die Verschiebung des Fluoreszenzsignals nach rechts charakterisiert.

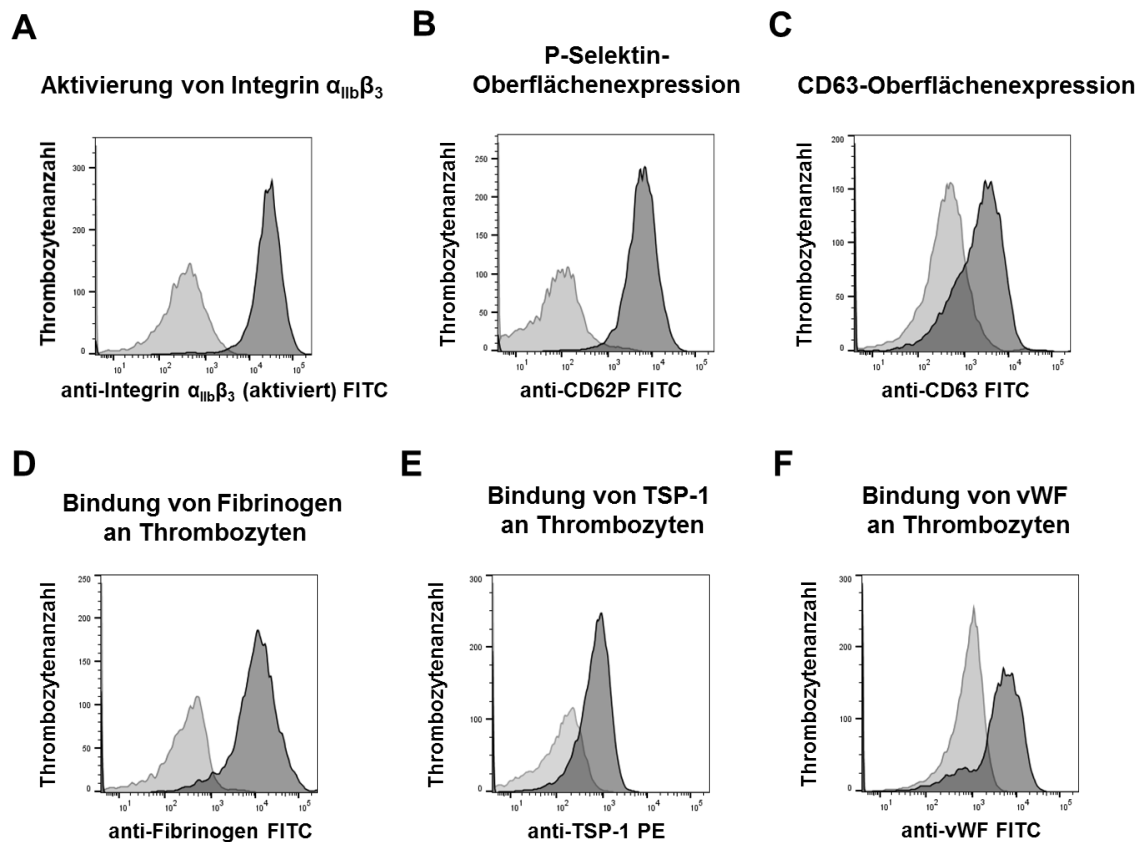


Abbildung 36: Repräsentative Histogramme der Thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung.

PRP (150×10^3 TZ/ μ l) wurde 1:10 mit Tyrode's Puffer verdünnt und in Gegenwart von GPRP (finale Konzentration 3,75 mM) mit 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 1 nM = 0,05 U/ml) stimuliert oder unstimuliert gelassen (20 μ l Tyrode's Puffer). Durch Zugabe von 20 μ l CaCl_2 (finale Konzentration 1,7 mM) wurde die Thrombozytenaktivierung gestartet. Anschließend wurden die so stimulierten Thrombozyten für 15 min mit entsprechenden Antikörpern (PAC-1 FITC, anti-CD62P FITC, anti-CD63 FITC, anti-Fibrinogen FITC, anti-vWF FITC (alle finale Konzentration 5 μ g/ml), anti-TSP-1 PE (finale Konzentration 2,5 μ g/ml) und entsprechenden IgG Isotyp-Kontrollen markiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Repräsentative Darstellung der A: Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$, B: P-Selektin-Oberflächenexpression, C: CD63-Oberflächenexpression, D: Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten, E: Bindung von TSP-1 an Thrombozyten und F: Bindung von vWF an Thrombozyten.

Die Blockierung des Thrombozytenrezeptors CD36 durch den Antikörper FA6.152 führte zu einer signifikanten Inhibition der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung, P-Selektin- und CD63-Oberflächen-Expression und der Bindung von Fibrinogen, TSP-1 und vWF (Abbildung 37 A). Ähnliche Ergebnisse wurden für CD36-defiziente Thrombozyten beobachtet. Die $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung, sowie P-Selektin-Oberflächen-Expression und Bin-

dung von TSP-1 und vWF war signifikant reduziert (Abbildung 37 B). Diese Ergebnisse zeigen, dass der CD36-Rezeptor an der Thrombin-induzierten Thrombozytenaktivierung beteiligt ist.

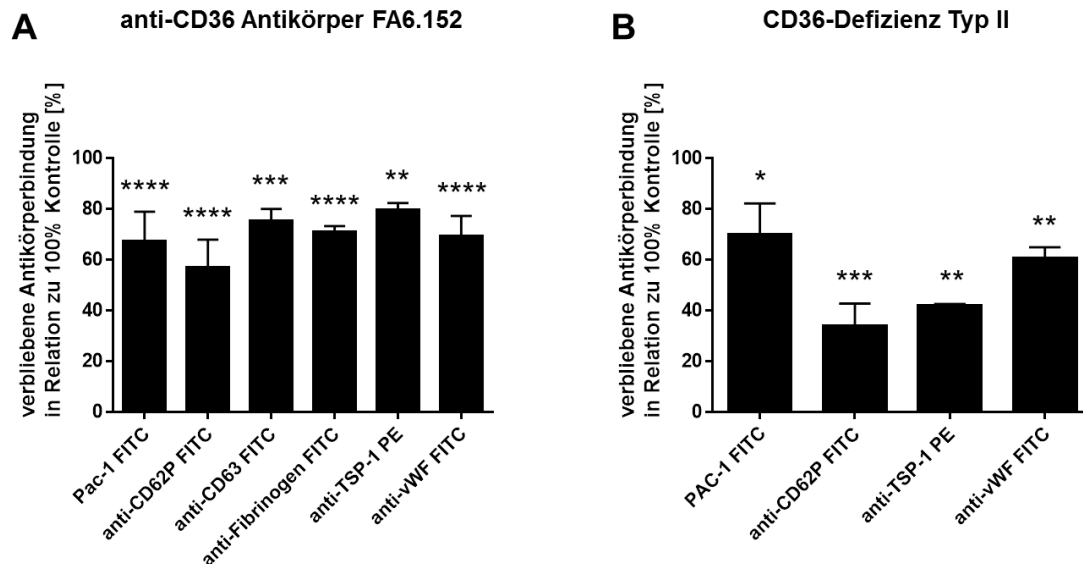


Abbildung 37: Einfluss des anti-CD36 Antikörpers FA6.152 bzw. der CD36-Defizienz Typ II auf die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, Granula-Sekretion und Adhäsionsproteinbindung in PRP.

Kontroll-PRP und PRP des Spenders mit CD36-Defizienz Typ II (150×10^3 TZ/ μ l) wurde 1:10 mit Tyrode's Puffer verdünnt. In Gegenwart von GPRP (finale Konzentration 3,75 mM) wurden 80 μ l des verdünnten Kontroll-PRP zunächst für 10 min mit anti-CD36 Antikörper FA6.152 inkubiert (5 μ g/ml). Anschließend wurde das PRP mit 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 1 nM = 0,05 U/ml) stimuliert. Die Thrombozytenaktivierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l CaCl_2 (finale Konzentration 1,7 mM) für 15 min bei RT gestartet. Die so stimulierten Thrombozyten wurden danach für 15 min bei RT mit PAC-1 FITC, anti-CD62P FITC, anti-CD63 FITC, anti-Fibrinogen FITC, anti-vWF FITC (alle finale Konzentration 5 μ g/ml), anti-TSP-1 PE (finale Konzentration 2,5 μ g/ml) und entsprechenden IgG Isotyp-Kontrollen inkubiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. A: Quantitative Darstellung der verbliebenen Antikörperbindung in Relation zu 100 % Kontrolle in Kontroll-PRP und B: in Spender-PRP. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 2-4). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001.

4.2.5. Rolle der Interaktion von TSP-1 mit CD36 in der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung

Da die Bindung von Thrombospondin-1 an CD36-defiziente sowie CD36-Antikörper-blockierte Thrombozyten in den vorigen Experimenten signifikant vermindert war, wurde analysiert, ob die Bindung von TSP-1 an den Thrombozytenrezeptor CD36 in der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung eine Rolle spielt. Dazu wurde PRP mit dem anti-TSP-1 Antikörper A4.1 inkubiert und mit Hilfe der CAT analysiert.

Weder „lag time“ noch „etp“ oder „thrombin peak“ wurden durch den anti-TSP-1 Antikörper A4.1 beeinflusst (Abbildung 38). Auch eine höhere Konzentration (10 μ g/ml,

nicht gezeigt) hatte keinen Effekt auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung. Folglich ist die Bindung von TSP-1 an seinen Rezeptor CD36 scheinbar nicht ausschlaggebend für die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung.

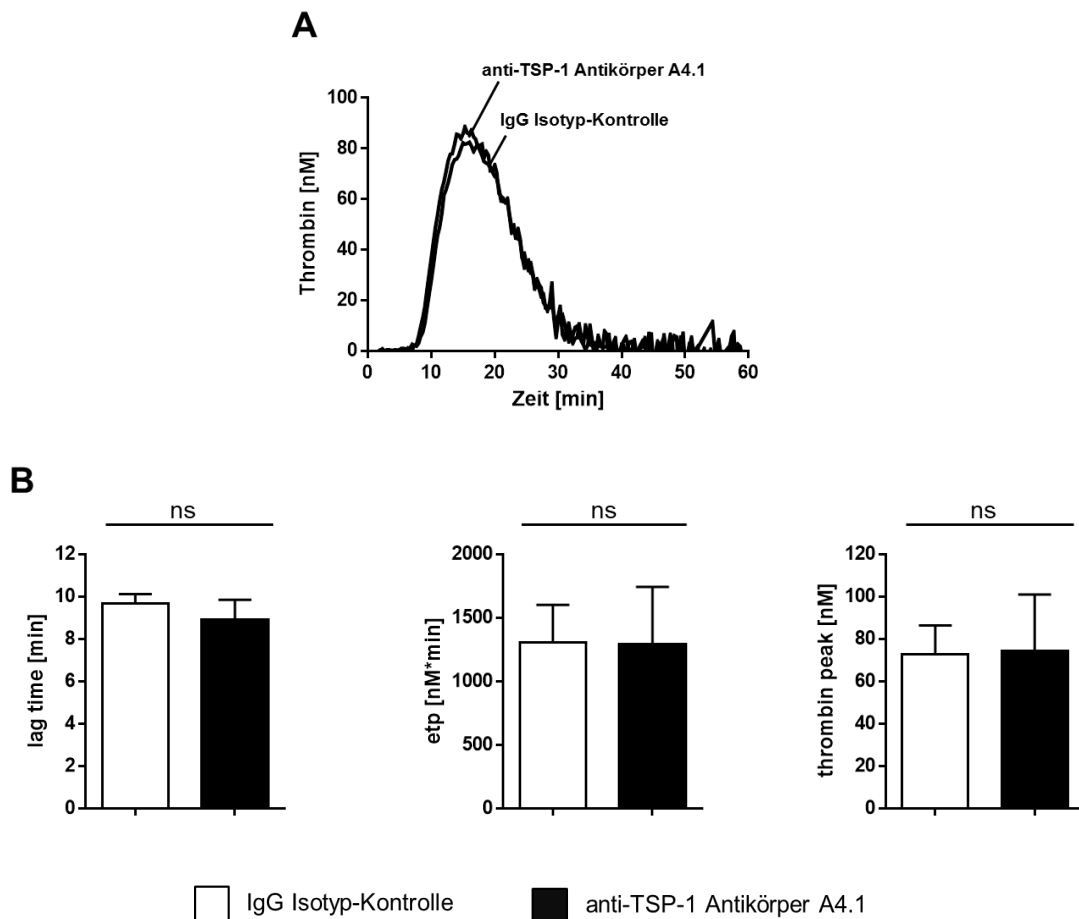


Abbildung 38: Einfluss des anti-TSP-1 Antikörpers A4.1 auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.

Je 80 μ l PRP ($150 \times 10^3/\mu$ l) wurden in einer 96-„Well“ Platte entweder mit IgG Isotyp-Kontrolle (5 μ g/ml □) oder dem anti-TSP-1 Antikörper A4.1 (5 μ g/ml ■) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. B: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). n. s. nicht signifikant.

Weiterhin wurde untersucht, welche Auswirkung die kompetitive Blockierung der CD36-bindenden TSP-1-Sequenz CSVTCG durch das Peptid CSVTCG auf die CD36-abhängige, Thrombin-induzierte Thrombingenerierung hat. PRP wurde dazu mit dem TSP-1-Peptid inkubiert und mit Hilfe der CAT analysiert.

Es konnte kein Effekt des TSP-1-Peptids CSVTCG auf die Thrombingenerierung festgestellt werden, weder „lag time“ noch „etp“ und „thrombin peak“ wurden signifikant beeinflusst (Abbildung 39). Auch eine höhere Konzentration (100 µg/ml, nicht gezeigt) erzielte keinen Einfluss auf die Thrombin-induzierte Thrombinbildung. Diese Ergebnisse unterstützen die zuvor beobachteten Resultate, dass die Bindung von TSP-1 an seinen Rezeptor CD36 nicht an der CD36-abhängigen Thrombingenerierung beteiligt zu sein scheint.

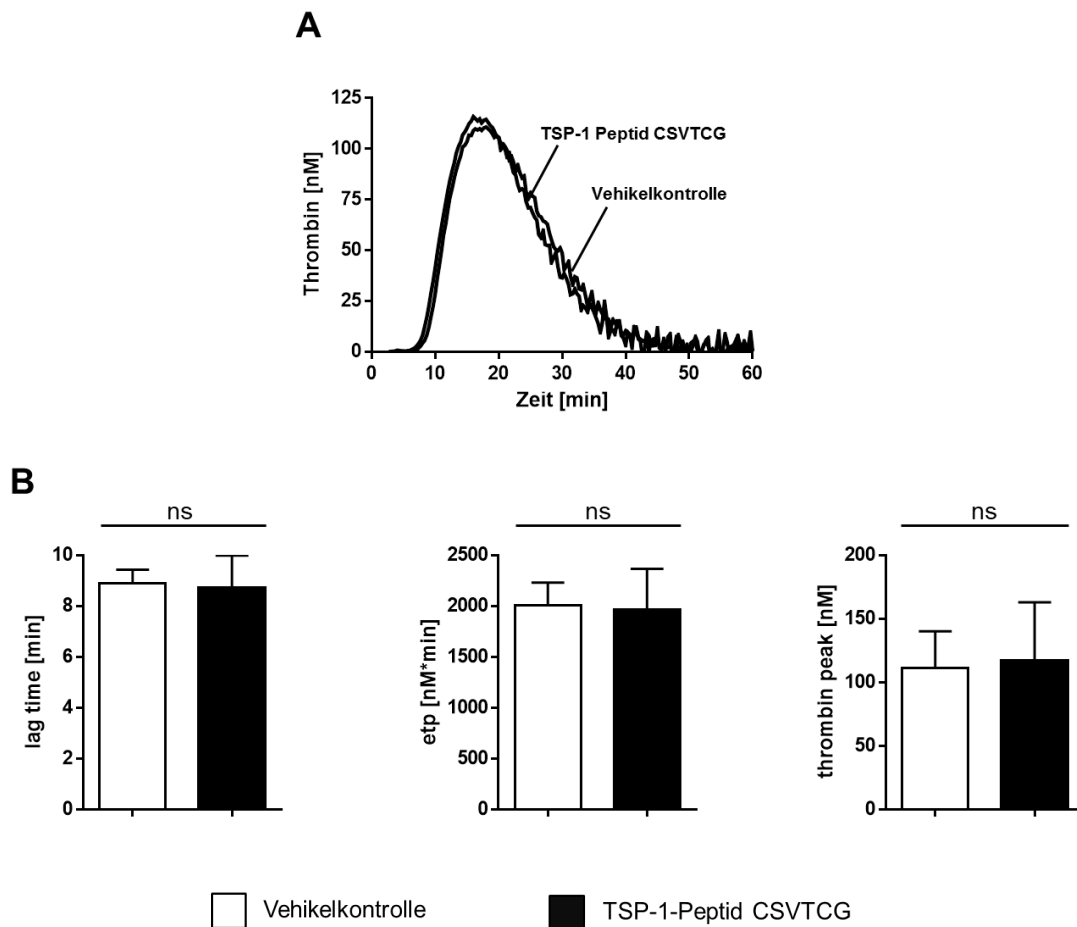


Abbildung 39: Einfluss des Peptids CSVTCG auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.

Je 80 µl PRP (150×10^3 TZ/µl) wurden in einer 96-„Well“ Platte mit der Vehikelkontrolle (0,25% DMSO □) bzw. dem TSP-1 Peptid CSVTCG (50 µM ■) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden 20 µl α-Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 µl FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. B: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). n. s. nicht signifikant.

Zusätzlich wurde der Einfluss des kompetitiv inhibitorisch wirkenden CD36-Peptids P(93-110) auf die CD36-abhängige, Thrombin-induzierte Thrombinbildung analysiert. Dazu wurde PRP mit dem Peptid P(93-110) inkubiert und mittels der CAT untersucht.

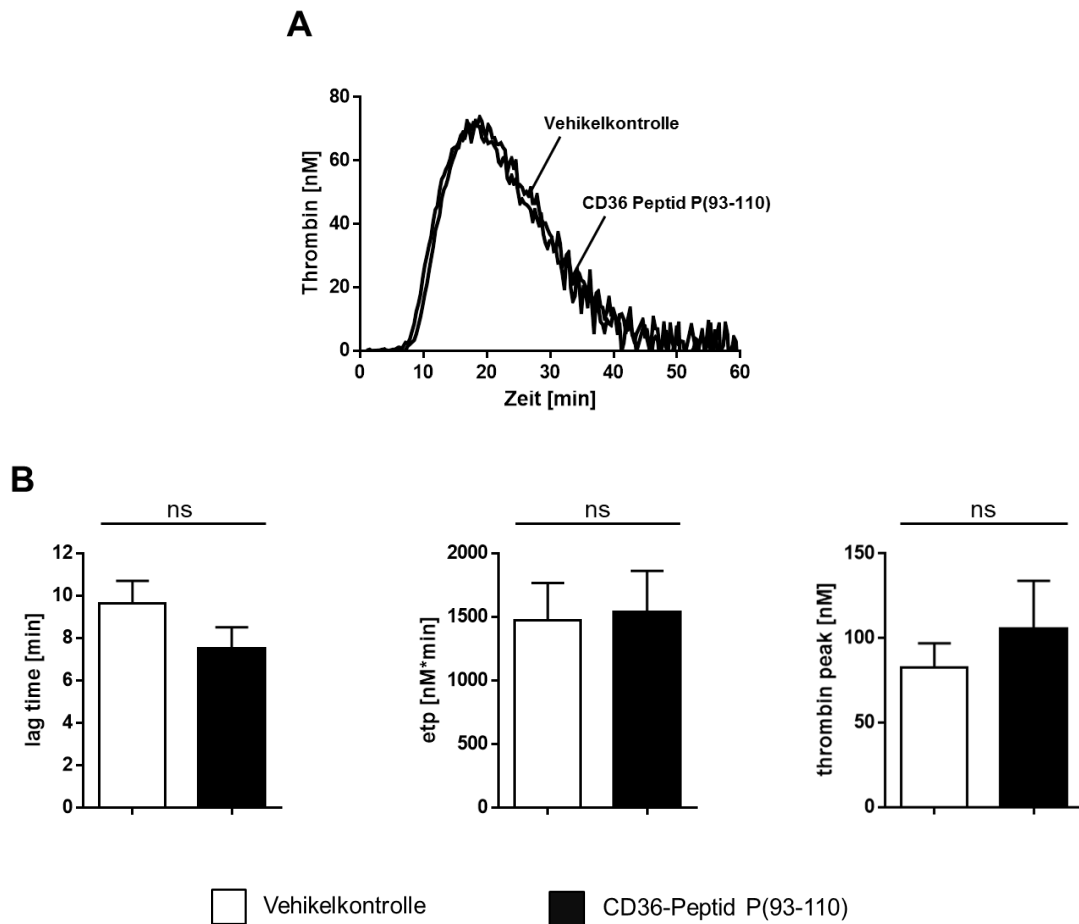


Abbildung 40: Einfluss des Peptids P(93-110) auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.

Je 80 μ l PRP (150×10^3 TZ/ μ l) wurden in einer 96-„Well“ Platte mit der Vehikelkontrolle (0,125 % DMSO □) bzw. dem CD36 Peptid P(93-110) (12,5 μ g/ml ■) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. B: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 4). n. s. nicht signifikant.

Auch hier wurde die Thrombingenerierung durch das CD36-Peptid nicht beeinflusst. „Lag time“, „etp“ und „thrombin peak“ blieben unverändert (Abbildung 40) und auch eine höhere Konzentration (25 μ g/ml, nicht gezeigt) zeigte keinen Einfluss auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung. Diese Ergebnisse festigen die vorigen

Beobachtungen, dass die Bindung von TSP-1 an CD36 in der CD36-abhängigen Thrombinbildung keine essenzielle Rolle spielt.

4.2.6. Rolle der thrombozytären Phosphatidylserin-Präsentation in der CD36-abhängigen Thrombingenerierung

Um zu untersuchen, inwiefern die PS-Präsentation sich auf die Thrombin-induzierte und CD36-abhängige Thrombingenerierung auswirkt, wurde PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152 mit humanem rekombinantem Annexin V inkubiert. Annexin V agiert hier als kompetitiver Inhibitor und verhindert die Bindung der Gerinnungsfaktoren an negativ geladene Phosphatidylserine.

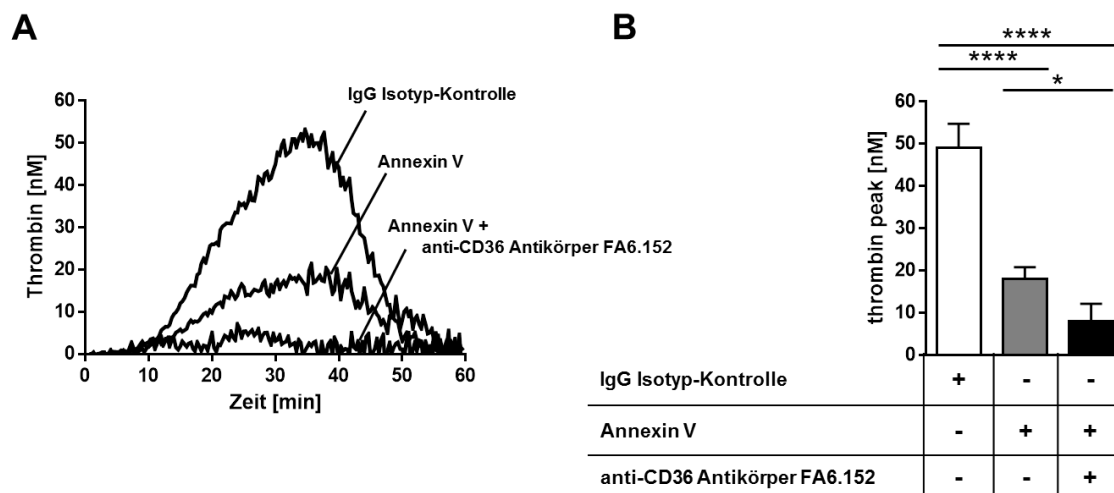


Abbildung 41: Einfluss des rekombinanten Annexin V auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.

Je 80 μ l PRP (150×10^3 TZ/ μ l) wurden in einer 96-„Well“ Platte mit IgG Isotyp-Kontrolle (5 μ g/ml □) bzw. humanem rekombinantem Annexin V (0,5 μ g/ml ■) in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152 (5 μ g/ml ■) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. B: Quantitative Darstellung des „thrombin peaks“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 4). *P < 0,05; ****P < 0,0001.

Aus Abbildung 41 wird ersichtlich, dass die Inkubation von PRP mit humanem rekombinantem Annexin V zu einer deutlichen signifikanten Reduktion des „thrombin peaks“ führte. Dies weist auf eine wichtige Rolle der PS-Präsentation in der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung hin. Die gleichzeitige Inhibition des CD36-Re-

zeptors resultierte in einer nahezu kompletten Reduktion des „thrombin peaks“ (Abbildung 41 B), woraus sich schlussfolgern lässt, dass die CD36-abhängige Thrombingenerierung nicht ausschließlich von der PS-Präsentation abhängig ist.

4.2.7. Rolle von Thrombozytenrezeptor CD36 bei der Thrombin-induzierten Phosphatidylserin-Präsentation auf Thrombozyten

Es wurde zusätzlich untersucht, inwiefern die Blockierung von CD36 mit dem anti-CD36 Antikörper FA6.152 bzw. das Fehlen von CD36 auf Thrombozyten (CD36-Defizienz Typ II) die Thrombin-induzierte PS-Präsentation beeinflusst. Dazu wurde Kontroll-PRP in Gegenwart von anti-CD36 Antikörper FA6.152 bzw. PRP des CD36-defizienten Spenders mit Thrombin stimuliert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Als Marker für den prokoagulatorischen Zustand der Thrombozytenoberfläche diente hier rekombinantes FITC-markiertes Annexin V, welches an die negativ geladenen Phosphatidylserine bindet.

Abbildung 42 A zeigt eine repräsentative Darstellung der PS-Oberflächenpräsentation. Während nur wenige unstimulierte Thrombozyten Annexin V FITC-positiv sind (Population P2), präsentieren die Thrombozyten nach Stimulation mit Thrombin verstärkt PS. Aus Abbildung 42 wird ersichtlich, dass die Blockierung bzw. das Fehlen von CD36 auf Thrombozyten keinen Einfluss auf die Phosphatidylserin-Präsentation hatte. Die Thrombin-induzierte Umstrukturierung der Thrombozytenoberfläche bzw. die prokoagulatorische Aktivität scheint somit unabhängig vom Thrombozytenrezeptor CD36 zu sein.

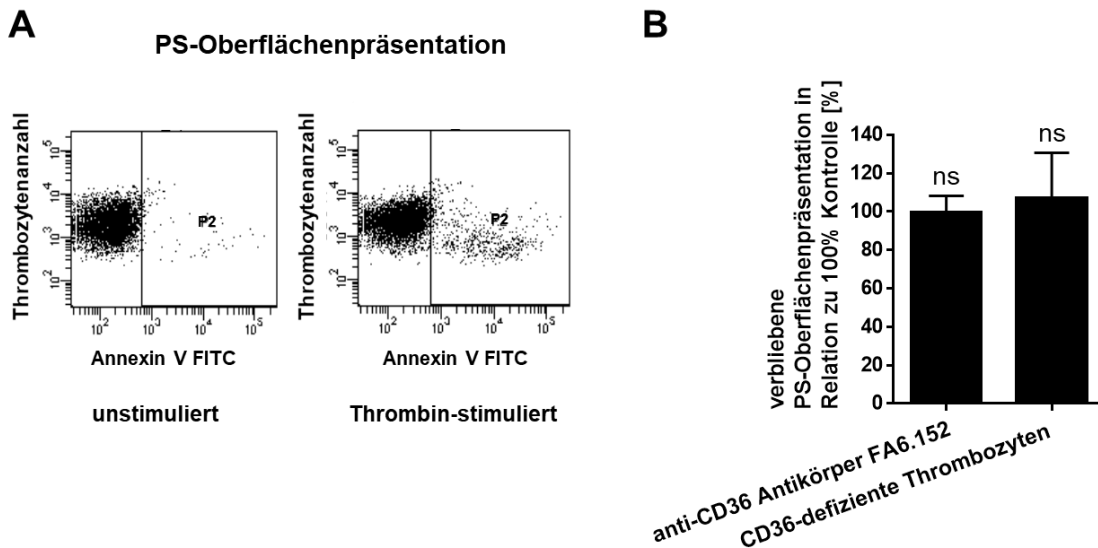


Abbildung 42: Repräsentative Darstellung der Thrombin-induzierten PS-Oberflächenpräsentation und Einfluss des anti-CD36 Antikörpers FA6.152 bzw. der CD36-Defizienz Typ II auf die Thrombin-induzierte PS-Oberflächenpräsentation auf der Thrombozytenoberfläche.

Kontroll-PRP und PRP eines Spenders mit CD36-Defizienz Typ II (150×10^3 TZ/ μ l) wurde 1:10 mit Tyrode's Puffer verdünnt. In Gegenwart von GPRP (finale Konzentration 3,75 mM) wurden 80 μ l des Kontroll-PRPs für 10 min mit anti-CD36 Antikörper FA6.152 (5 μ g/ml) inkubiert. Anschließend wurde das PRP mit 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 1 nM = 0,05 U/ml) stimuliert. Die Thrombozytenaktivierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l CaCl_2 (finale Konzentration 12 mM) für 10 min bei RT gestartet. Die stimulierten Thrombozyten wurden danach für 15 min bei RT mit Annexin V FITC (finale Konzentration 5 μ g/ml) und entsprechender IgG Isotyp-Kontrolle inkubiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. A: Repräsentative Darstellung der PS-Oberflächenexpression auf unstimulierten und Thrombin-stimulierten Thrombozyten. P2 stellt die Annexin V FITC-positiven Thrombozyten dar. B: Quantitative Darstellung der verbliebenen PS-Oberflächenpräsentation in Relation zu 100 % Kontrolle in Kontroll- bzw. Spender-PRP. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). n. s. nicht signifikant.

4.2.8. Rolle von CD36 bei der Bindung von Gerinnungsfaktoren an Thrombin-stimulierte Thrombozyten

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde außerdem untersucht, inwiefern die Bindung der Gerinnungsfaktoren IX, X und der Kofaktoren VIII und V an Thrombin-stimulierte Thrombozyten von CD36 abhängt.

Wie in Abbildung 43 zu sehen ist, war die Anbindung von FIX, FX, FVIII und FV an CD36-blockierte (Abbildung 43 A) sowie an CD36-defiziente (Abbildung 43 B) Thrombozyten signifikant vermindert. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der Rezeptor CD36 die Bindung der Gerinnungsfaktoren des intrinsischen Tenase- und Prothrombinasekomplexes an Thrombin-stimulierte Thrombozyten auf eine Phosphatidylserin-unabhängige Art moduliert.

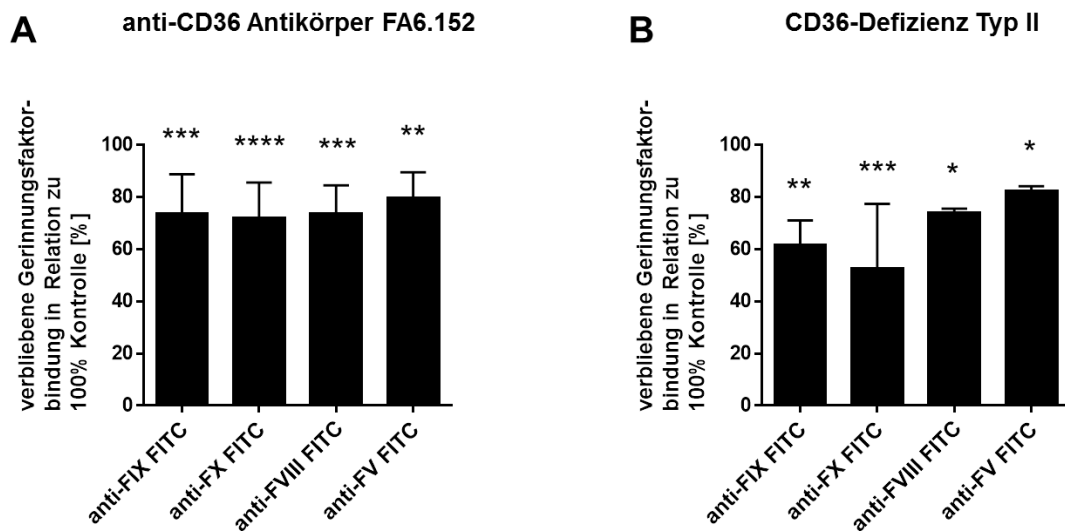


Abbildung 43: Verbliebene Bindung von FIX, FX, FVIII und FV an CD36-blockierte oder CD36-defiziente Thrombozyten nach Stimulation mit Thrombin.

Kontroll-PRP (A) und PRP eines Spenders mit CD36-Defizienz Typ II (B) (150×10^3 TZ/ μ l) wurde 1:10 mit Tyrode's Puffer verdünnt. In Gegenwart von GPRP (finale Konzentration 3,75 mM) wurden 80 μ l des verdünnten Kontroll-PRPs für 10 min mit dem anti-CD36 Antikörper FA6.152 inkubiert (5 μ g/ml). Anschließend wurden beide PRP mit 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 1 nM = 0,05 U/ml) stimuliert. Die Thrombozytenaktivierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l CaCl_2 (finale Konzentration 1,7 mM) für 10 min bei RT gestartet. Die so stimulierten Thrombozyten wurden danach für 15 min bei RT mit anti-FIX FITC, anti-FX FITC, anti-FVIII FITC und anti-FV FITC (finale Konzentration 5 μ g/ml) und entsprechender IgG Isotyp-Kontrolle FITC inkubiert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. A: Quantitative Darstellung der verbliebenen Gerinnungsfaktorbindung in Relation zu 100 % Kontrolle in Kontroll-PRP und B: in Spender-PRP. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 4-8). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001.

4.2.9. Rolle von Fibrin in der CD36-abhängigen Thrombingenerierung

Durch Thrombin wird Fibrinogen zu Fibrin gespalten, welches in der Lage ist, Thrombozyten über das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ miteinander zu vernetzen. Hier sollte die Rolle von Fibrinogen/Fibrin in der Thrombin-induzierten und CD36-abhängigen Thrombingenerierung untersucht werden. Dazu wurden gewaschene Thrombozyten in defibriniertem Plasma in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152 bzw. hochreinem humanem Fibrinogen resuspendiert und mit Hilfe der CAT analysiert.

Das Fehlen von Fibrinogen/Fibrin im Plasma führte zu einer signifikanten Verminderung der Thrombingenerierung durch Thrombin-stimulierte Thrombozyten (Abbildung 44). Wurde der anti-CD36 Antikörper FA6.152 in defibriniertem Plasma inkubiert, konnte kein additiver inhibitorischer Effekt beobachtet werden. Rekonstitution von defibriniertem Plasma mit hochreinem humanem Fibrinogen resultierte in einer

mit der im Kontrollplasma vergleichbaren Thrombingenerierung. Fibrinogen bzw. Fibrin spielen somit eine zentrale Rolle in der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung.

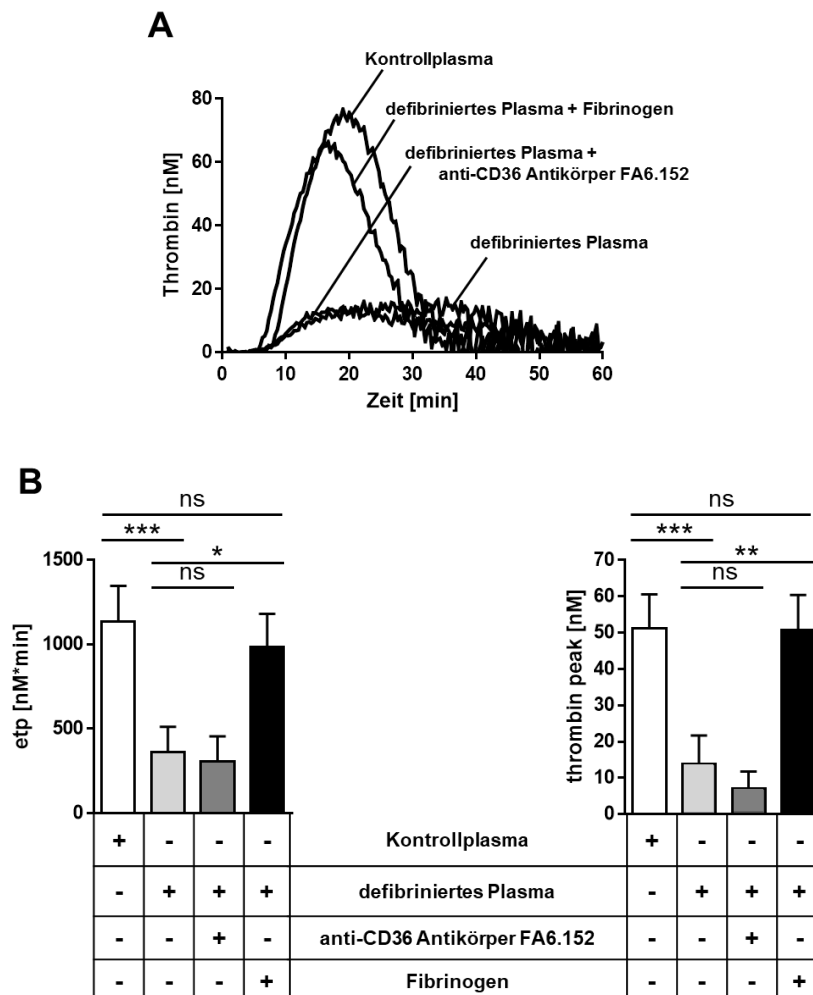


Abbildung 44: Einfluss von Fibrinogen/Fibrin auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.

Gewaschene Thrombozyten wurden in Kontroll-Plasma (□) oder defibriniertem Plasma (DFP □) resuspendiert (150×10^3 TZ/ μ l) und je 80 μ l in eine 96-„Well“ Platte pipettiert. Das defibrinierte Plasma wurde zusätzlich mit anti-CD36 Antikörper FA6.152 (5 μ g/ml, 10 min Inkubationszeit ■) oder Fibrinogen (4 mg/ml ■) bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in Kontroll-Plasma, DFP und DFP + anti-CD36 Antikörper FA6.152 bzw. Fibrinogen. B: Quantitative Darstellung von „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 5). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; n. s. nicht signifikant.

Batroxobin ist ein Schlangengift, welches Thrombin-unabhängig Fibrinogen zu Fibrin spaltet. Um zu untersuchen, ob in Abwesenheit von Thrombin Fibrinbildung statt-

findet und sich auf die Thrombingenerierung auswirkt, wurde PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152 entweder mit Batroxobin oder Thrombin stimuliert und mit Hilfe der CAT analysiert.

Die Batroxobin-induzierte Thrombingenerierung resultierte in einer der Thrombin-induzierten ähnlichen Thrombingenerierung und Behandlung mit dem anti-CD36 Antikörper FA6.152 führte zu einer vergleichbaren Inhibition der Thrombingenerierung (Abbildung 45). Diese Ergebnisse weisen auf eine wichtige Rolle von Fibrin in der Thrombin-induzierten und CD36-abhängigen Thrombinbildung hin.

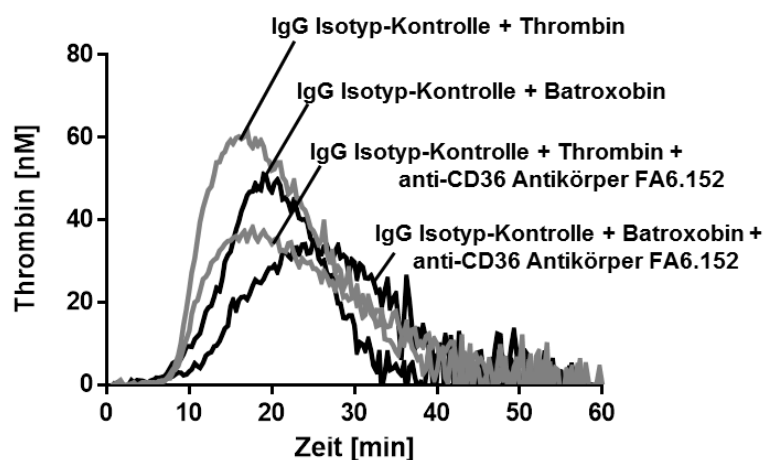


Abbildung 45: Einfluss von Batroxobin auf die Thrombingenerierung in PRP in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.

Je 80 μ l PRP (150×10^3 TZ/ μ l) wurden in einer 96-„Well“ Platte entweder mit IgG Isotyp-Kontrolle (5 μ g/ml) oder mit anti-CD36 Antikörper FA6.152 (5 μ g/ml) für 10 min bei RT inkubiert. Als Aktivator wurden 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml ■) oder 20 μ l Batroxobin (finale Konzentration 1 U/ml ■) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. Repräsentative Darstellung der Batroxobin- und Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in IgG Isotyp-Kontroll- und anti-CD36 Antikörper FA6.152-behandeltem PRP.

Die Polymerisierung von löslichem Fibrin ist ein wichtiger Schritt in dem Stabilisierungsprozess eines Blutgerinnsels. Um zu analysieren, inwiefern sich die Fibrin-Polymerisierung auf die CD36-abhängige, Thrombin-induzierte Thrombingenerierung auswirkt, wurde PRP mit dem Peptid GPRP, das die Fibrinpolymerisierung inhibiert, inkubiert und mit Hilfe der CAT analysiert.

In Abbildung 46 ist deutlich zu erkennen, dass die Inkubation von PRP mit GPRP keinen signifikanten Einfluss auf die Thrombingenerierung hatte. Weder für „lag time“ noch „etp“ oder „thrombin peak“ ließ sich eine Veränderung beobachten und

auch eine höhere Konzentration (5 mM, nicht gezeigt) führte zu keinem Effekt auf die Thrombinbildung. Die Polymerisierung von Fibrin ist somit nicht essenziell für die Thrombin-induzierte und CD36-abhängige Thrombingenerierung.

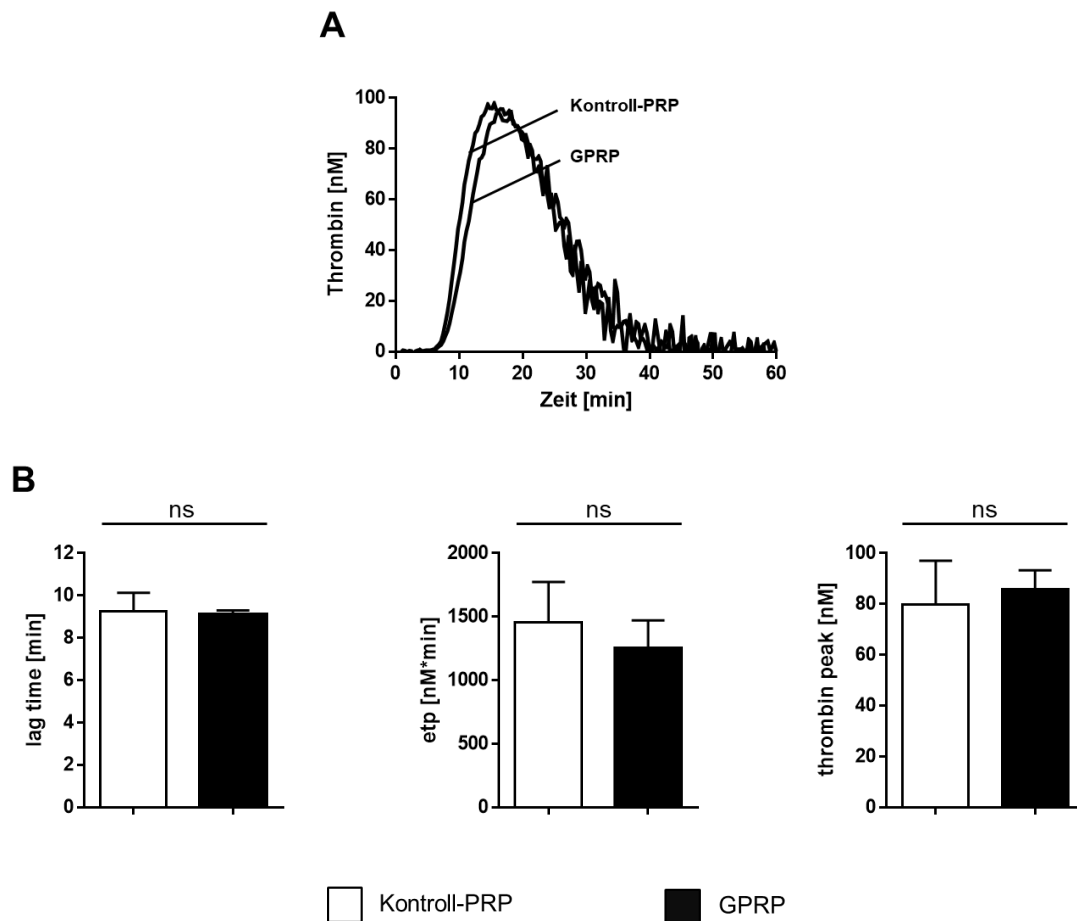


Abbildung 46: Einfluss des Peptids GPRP auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP.

Je 80 μ l PRP (150×10^3 TZ/ μ l) wurden in eine 96-„Well“ Platte pipettiert und unbehandelt gelassen (□) bzw. für 10 min bei RT mit GPRP (2,5 mM ■) inkubiert. Als Aktivator wurden 20 μ l α -Thrombin (finale Konzentration 2 nM = 0,1 U/ml) pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung in PRP. B: Quantitative Darstellung von „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). n. s. nicht signifikant.

4.3. Analyse potenzieller Liganden des Thrombozytenrezeptors CD36

4.3.1. Bindung von isolierten Adhäsionsproteinen an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkugeln

Mit Hilfe von mit humanem rekombinantem CD36-beschichteten Polystyrol-Latexkugeln wurden die Bindungseigenschaften von löslichem Fibrinogen, Fibrin,

vWF und TSP-1 an den Thrombozytenrezeptor CD36 durchflusszytometrisch analysiert.

Im Gegensatz zu TSP-1-FITC wurde eine nur marginale Bindung von vWF-FITC an die CD36-Kügelchen beobachtet (Abbildung 47). Dies zeigt, dass TSP-1 der bevorzugte Ligand des CD36-Rezeptors ist.

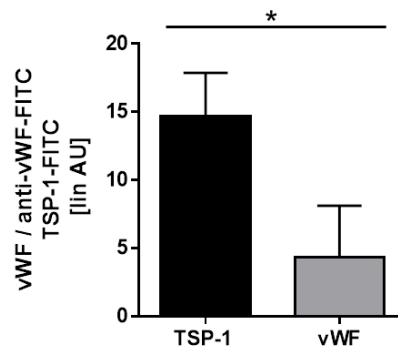


Abbildung 47: Bindung der Plasma-Adhäsionsproteine TSP-1 und vWF an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen.

Polystyrol-Latexkügelchen (3 µm) wurden mit humanem CD36 beschichtet und mit humanem FITC-konjugiertem TSP-1 (finale Konzentration 50 µg/ml) bzw. humanem vWF (Willfact 1 µg/ml) in Gegenwart von GPRP (finale Konzentration 1,25 mM) und CaCl₂ (finale Konzentration 3,4 mM) inkubiert. Die vWF-bindenden Kügelchen wurden für 15 min bei RT mit anti-vWF FITC Antikörper markiert (1:2 000) und gewaschen. Anschließend wurden 10 000 Kügelchen/Probe mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen und analysiert. Quantitative Darstellung der Bindung von TSP-1 und vWF an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität ± SD (n = 3) der CD36-beschichteten Polystyrol-Latexkügelchen, die durch Verrechnung mit der mittleren Fluoreszenzintensität ± SD (n = 3) von BSA-beschichteten Polystyrol-Latexkügelchen korrigiert wurde. *P < 0,05.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Beteiligung von Fibrin an der CD36-abhängigen und Thrombin-induzierten Thrombingenerierung gezeigt. Daher wurde auch die Bindung von isoliertem hochreinem Fibrinogen und Fibrin an CD36-beschichtete Kügelchen analysiert.

Während für das isolierte hochreine Fibrinogen allein keine Bindung nachgewiesen werden konnte, führte die Batroxobin-Behandlung von Fibrinogen zu einer signifikant verstärkten Bindung des entstandenen Fibrins an die CD36-beschichteten Kügelchen (Abbildung 48). In Kombination mit isoliertem hochreinem Fibrinogen hatte die Vorinkubation der CD36-beschichteten Kügelchen mit dem anti-CD36 Antikörper FA6.152 keinen Einfluss auf die Fibrinogenbindung. Wurde jedoch der Throm-

bozytenrezeptor CD36 mit dem anti-CD36 Antikörper FA6.152 blockiert und die Bindung von Batroxobin-induziertem Fibrin analysiert, wurde eine signifikante Abnahme der Fibrinbindung an die CD36-beschichteten Kügelchen beobachtet. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass lösliches Fibrin ein spezifischer Ligand von CD36 ist.

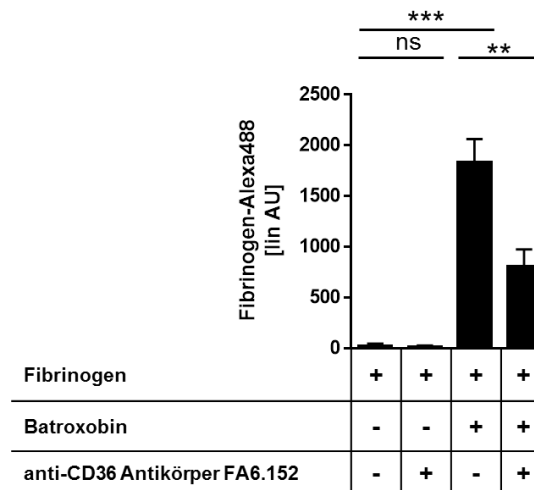


Abbildung 48: Bindung von Fibrinogen bzw. Batroxobin-behandeltem Fibrinogen an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152.

Polystyrol-Latexkügelchen (3 µm) wurden mit humanem CD36 beschichtet und nach Vorinkubation mit anti-CD36 Antikörper FA6.152 (5 µg/ml, 15 min, RT) mit 50 µg/ml Alexa488-konjugiertem Fibrinogen in Gegenwart von GPRP (finale Konzentration 17,5 mM) und CaCl₂ (finale Konzentration 3,4 mM) und in An- oder Abwesenheit von Batroxobin (finale Konzentration 1 U/ml) für 15 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die beschichteten Polystyrol-Latexkügelchen resuspendiert und 10 000 Kügelchen/Probe mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen und analysiert. Quantitative Darstellung der Bindung von unbehandeltem und Batroxobin-behandeltem Fibrinogen an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität ± SD der CD36-beschichteten Polystyrol-Latexkügelchen (n = 3-4), die durch Verrechnung mit der mittleren Fluoreszenzintensität ± SD (n = 3-4) von BSA-beschichteten Polystyrol-Latexkügelchen korrigiert wurde. **P < 0,01; ***P < 0,001; n. s. nicht signifikant.

4.3.2. Bindung von Adhäsionsproteinen im Plasma an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen

Weiterhin wurden CD36-beschichtete Kügelchen in An- oder Abwesenheit von Thrombin in Kontroll- oder defibriniertem Plasma inkubiert und anschließend die Bindung der Plasmaproteine Fibrinogen, vWF und TSP-1 an die CD36-Kügelchen durchflusszytometrisch analysiert.

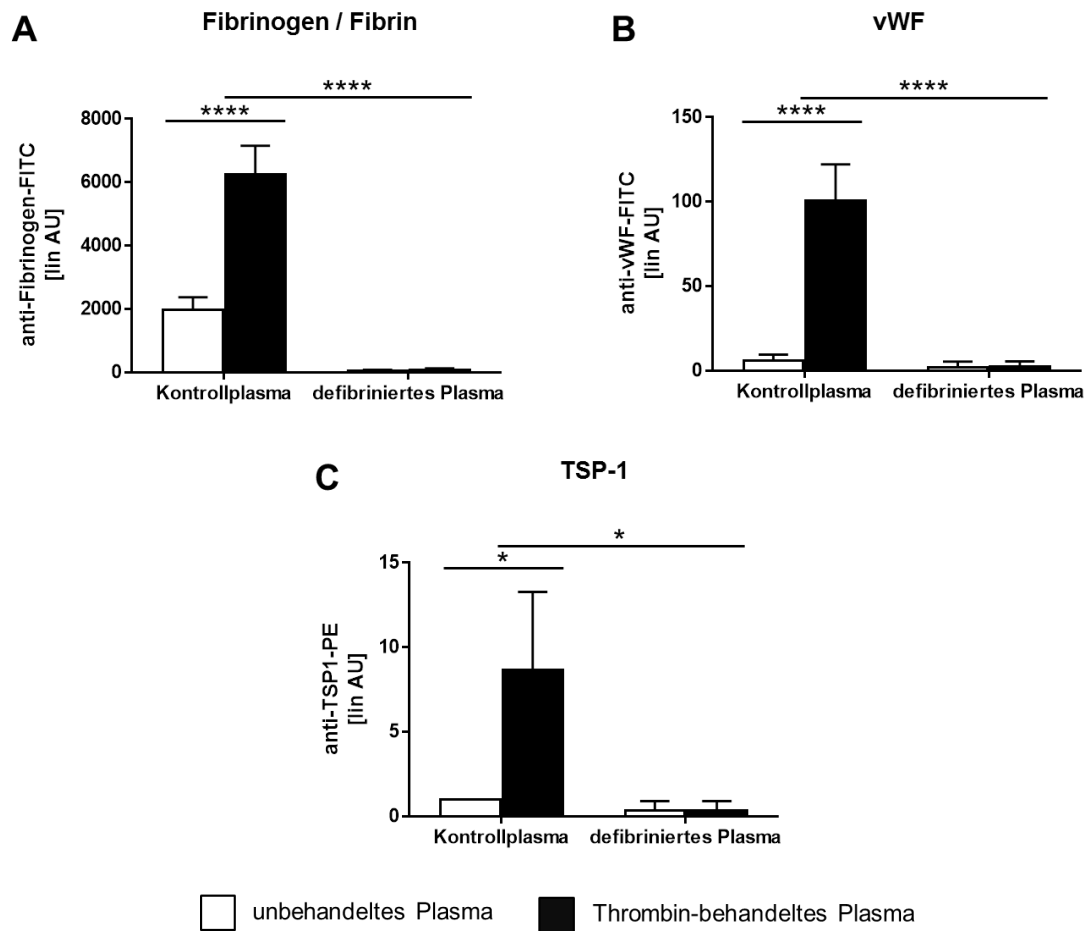


Abbildung 49: Einfluss von Fibrinogen/Fibrin auf die Bindung der Plasma-Adhäsionsproteine Fibrinogen, vWF und TSP-1 an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen in An- oder Abwesenheit von Thrombin.

Polystyrol-Latexkügelchen (3 µm) wurden mit humanem CD36 beschichtet und in verdünntem Kontroll- oder defibriertem Plasma in Abwesenheit (□) oder Anwesenheit (■) von Thrombin (finale Konzentration 0,025 U/ml), in Gegenwart von GPRP (finale Konzentration 17,5 mM) und CaCl₂ (finale Konzentration 3,4 mM) für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Kügelchen resuspendiert und mit anti-Fibrinogen FITC (1:200), anti-vWF FITC (1:20) und anti-TSP-1 PE (50 µg/ml) für 15 min bei RT markiert. Anschließend wurden 10 000 Kügelchen/Probe mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen und analysiert. A: Quantitative Darstellung der Bindung von Fibrinogen/Fibrin, B: von vWF und C: von TSP-1 an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen in Kontroll- und defibriertem Plasma in An- oder Abwesenheit von Thrombin. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität ± SD (n = 3) der CD36-beschichteten Polystyrol-Latexkügelchen, die durch Verrechnung mit der mittleren Fluoreszenzintensität ± SD (n = 4) von BSA-beschichteten Polystyrol-Latexkügelchen korrigiert wurde. *P < 0,05; ****P < 0,0001.

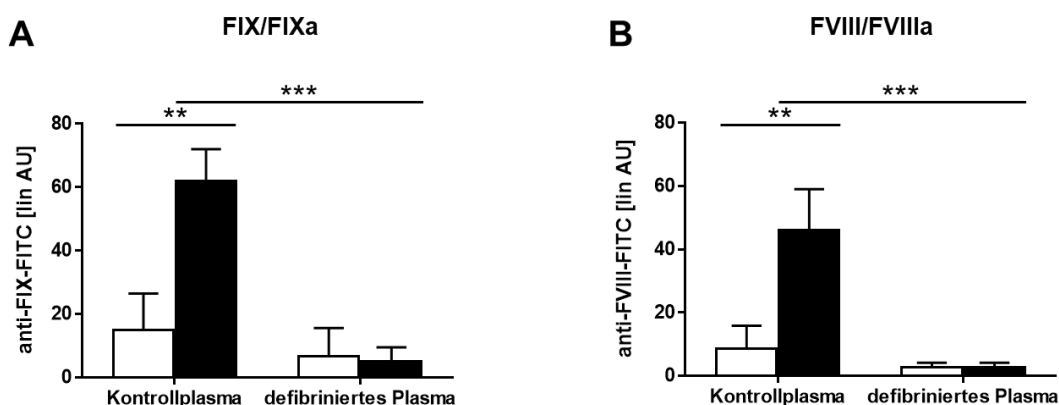
Abbildung 49 zeigt deutlich, dass die Stimulation mit Thrombin zu einer verstärkten Bindung der Plasmaproteine Fibrinogen/Fibrin (Abbildung 49 A), vWF (Abbildung 49 B) und TSP-1 (Abbildung 49 C) an die CD36-beschichteten Kügelchen führte. Wie erwartet konnte weder in defibriertem Plasma (DFP) noch in Thrombin-behandeltem DFP eine Bindung von Fibrinogen/Fibrin beobachtet werden. Außer-

dem führte das Fehlen von Fibrinogen/Fibrin zu einem Bindungsverlust der Adhäsionsproteine TSP-1 und vWF. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Fibrin die Ligation von vWF und TSP-1 an die CD36-beschichteten Kügelchen vermittelt.

4.3.3. Bindung von Gerinnungsfaktoren im Plasma an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen

Zusätzlich wurde die Bindung bestimmter Gerinnungsfaktoren an CD36-beschichtete Kügelchen in An- oder Abwesenheit von Thrombin analysiert. Dazu wurden die CD36-beschichteten Kügelchen in Kontroll- oder defibriniertem Plasma inkubiert und anschließend die Bindung der Gerinnungsfaktoren IX, VIII, V und X durchflusszytometrisch bestimmt.

Während die Stimulation von Kontrollplasma mit Thrombin zu einer signifikant erhöhten Bindung von FIX (Abbildung 50 A), FVIII (Abbildung 50 B) und FV (Abbildung 50 C) an die CD36-Kügelchen führte, konnte für FX (Abbildung 50 D) keine verstärkte Bindung und in defibriniertem Plasma kaum eine Bindung aller Faktoren detektiert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich sagen, dass Fibrin direkt oder indirekt die Bindung des Gerinnungsfaktors IX und der Kofaktoren VIII und V, jedoch nicht die Bindung des Gerinnungsfaktors X an CD36 vermittelt.



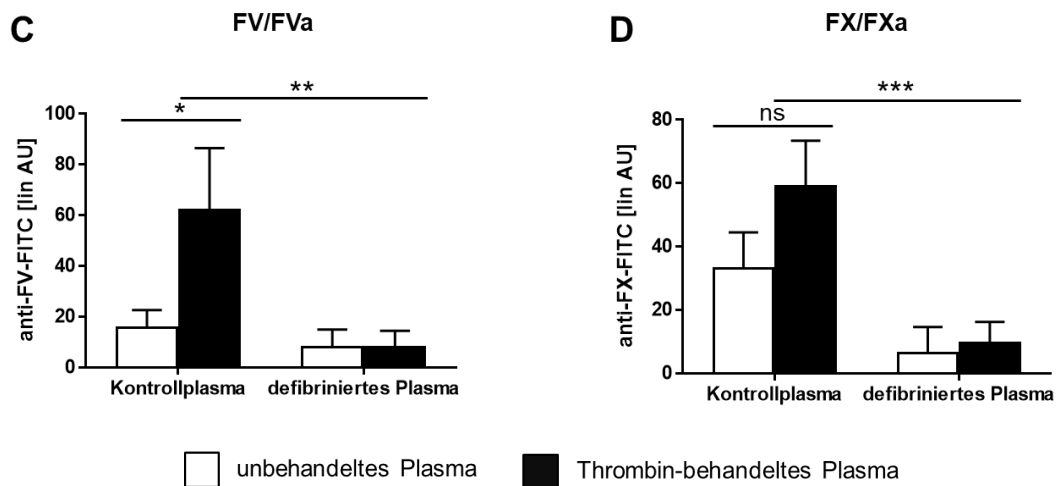


Abbildung 50: Einfluss von Fibrinogen/Fibrin auf die Bindung von FIX, FVIII, FV und FX an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen in Kontroll- oder defibriniertem Plasma in An- oder Abwesenheit von Thrombin.

Polystyrol-Latexkügelchen (3 μ m) wurden mit humanem CD36 beschichtet und in verdünntem Kontroll- oder defibriniertem Plasma in Abwesenheit (□) oder Anwesenheit (■) von Thrombin (finale Konzentration 0,025 U/ml) in Gegenwart von GPRP (finale Konzentration 17,5 mM) und CaCl_2 (finale Konzentration 3,4 mM) für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Kügelchen resuspendiert und mit anti-FIX FITC, anti-FVIII FITC, anti-FV FITC und anti-FX FITC (10 μ g/ml) und entsprechenden IgG Isotyp-Kontrollen für 15 min bei RT markiert. Anschließend wurden 10 000 Kügelchen/Probe mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen und analysiert. A: Quantitative Darstellung der Bindung von FIX und B: von FVIII und C: von FV und D: von FX an CD36-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen in Kontroll- und defibriniertem Plasma in An- oder Abwesenheit von Thrombin. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität $\pm$ SD ($n = 3$) der CD36-beschichteten Polystyrol-Latexkügelchen, die durch Verrechnung mit der mittleren Fluoreszenzintensität $\pm$ SD ($n = 3$) von BSA-beschichteten Polystyrol-Latexkügelchen korrigiert wurde. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; n. s. nicht signifikant.

4.3.4. Bindung von isolierten Gerinnungsfaktoren an Fibrin-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen

Um zu analysieren, ob diese Gerinnungsfaktoren direkt an Fibrin binden, wurde die Bindung von aufgereinigten FITC-konjugierten Gerinnungsfaktoren an Fibrin-beschichtete Kügelchen (3 μ m) mit Hilfe der Durchflusszytometrie detektiert.

Es wurde eine signifikant erhöhte Bindung von FVIII, FIX und FV, jedoch nicht von FX an Fibrinogen- und Fibrin-beschichtete Kügelchen im Vergleich zu den mit Albumin-beschichteten Kügelchen, die als Negativkontrolle dienten, detektiert. Zusätzlich reduzierte die Inhibition von freien Thiolen durch den Thiol-Blocker 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) die Bindung der Gerinnungs- und Kofaktoren an Fibrinogen- und Fibrin-beschichtete Kügelchen (Tabelle 26). Aus diesen Ergeb-

nissen geht hervor, dass nicht nur der Kofaktor FVIII, sondern auch FIX und Kofaktor FV spezifisch an Fibrin binden. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass die Interaktion zwischen Fibrin und FIX, FVIII und FV von freien Thiolen abhängt.

Tabelle 26: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von FIX-FITC, FVIII-FITC, FV-FITC und FX-FITC an Fibrin-beschichtete Kügelchen in An- oder Abwesenheit von DTNB.

Die Werte sind lineare Fluoreszenzintensitäten in arbiträren Einheiten. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). **P < 0,01 versus Albumin-beschichtete Kügelchen.

	Albumin-beschichtete Kügelchen	Fibrin-beschichtete Kügelchen	Fibrin-beschichtete Kügelchen + DTNB (2,5 mM)
FIX-FITC	11,9 $\pm$ 0,9	33,2 $\pm$ 3,1**	12,2 $\pm$ 1,3
FVIII-FITC	12,2 $\pm$ 1,2	34,3 $\pm$ 5,2**	12,6 $\pm$ 3,1
FV-FITC	12,4 $\pm$ 1,1	39,1 $\pm$ 3,3**	7,9 $\pm$ 0,9
FX-FITC	12,1 $\pm$ 0,9	15,3 $\pm$ 2,5	8,3 $\pm$ 0,5

4.4. Untersuchungen zur Monozyten-abhängigen Thrombingenerierung

4.4.1. Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in PFP

Inflammatorische Monozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche „Tissue Factor“ und sind so in der Lage, über die extrinsische Gerinnungskaskade initial Thrombin zu generieren. Die isolierten Monozyten wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie phänotypisiert und auf ihre Reinheit überprüft. Im Schnitt besaßen die humanen Monozyten eine Reinheit von 81,57 % $\pm$ 6,23 %. Ebenso wurde die Monozytenaktivität bestimmt. Aktivierte Monozyten exprimieren unter anderem die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, sowie $\alpha_m\beta_2$ (CD11b/CD18) und TSP-1 auf ihrer Oberfläche.

Im Vergleich zu frisch isolierten Monozyten exprimierten die einen Tag alten Monozyten signifikant mehr ICAM-1, $\alpha_m\beta_2$ und TSP-1 auf ihrer Oberfläche (Abbildung 51 A, B und D). Die Expression von VCAM-1 (Abbildung 51 C) erhöhte sich auf den über Nacht kultivierten Monozyten tendenziell, jedoch nicht signifikant. Die im Versuch eingesetzten Monozyten wurden also durch über-Nacht-Kultivierung aktiviert.

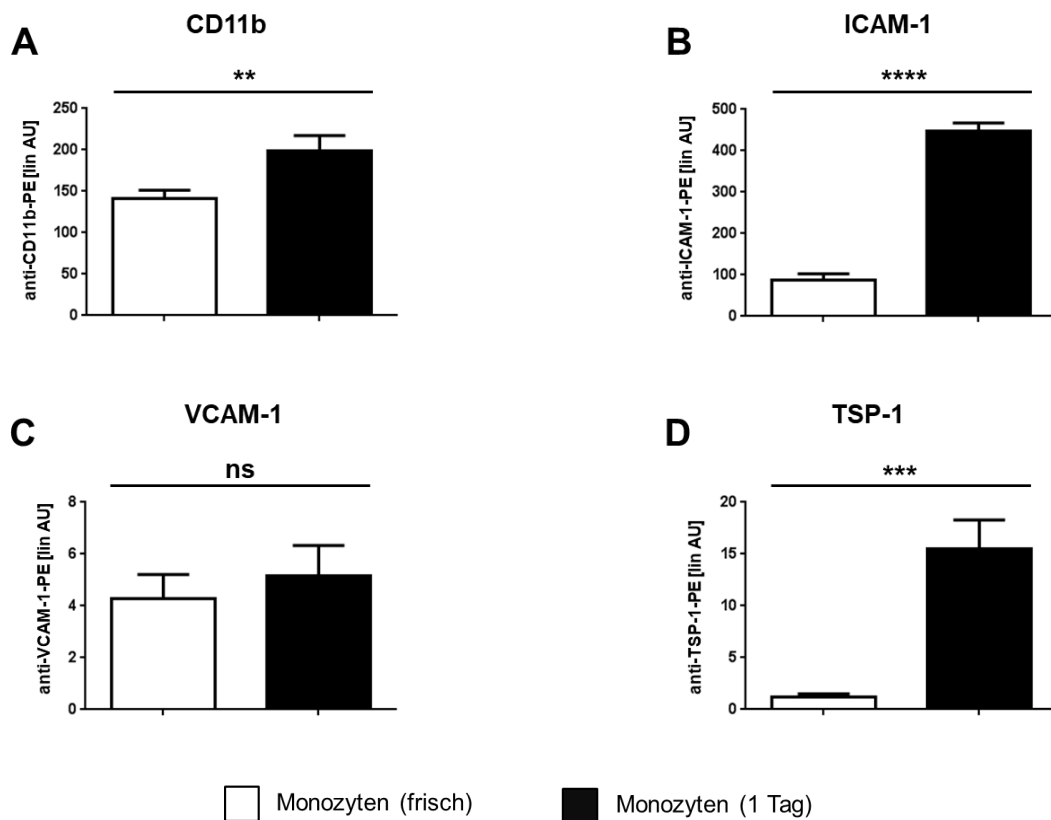


Abbildung 51: Oberflächenexpression und Oberflächenbindung von monozytären Adhäsions- und Aktivierungsmarkern.

Monozyten wurden aus humanen „Buffy Coats“ isoliert und entweder direkt () oder nach über-Nacht-Kultivierung (24 h) () mit RPMI 1640-Medium auf 2×10^6 MZ/ μ l eingestellt. Die Markierung erfolgte mit anti-CD14 FITC + anti-CD11b PE, anti-ICAM-1 PE, anti-VCAM-1 PE oder anti-TSP-1 PE für 15 min bei RT. Anschließend wurden 10 000 Monozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen und analysiert. **A:** Oberflächenexpression des Adhäsionsmoleküls CD11b ($\alpha_m\beta_2$), **B:** Oberflächenexpression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, **C:** Oberflächenexpression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1, **D:** Oberflächenbindung des multifunktionalen Moleküls TSP-1. Dargestellt ist die mittlere lineare Fluoreszenzintensität $\pm$ SD. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; n. s. nicht signifikant.

Mit Hilfe der CAT wurde die Thrombinbildung von humanen Monozyten, die aus „Buffy Coats“ isoliert und für 24 h über Nacht kultiviert wurden, im PFP untersucht.

In Abwesenheit von Monozyten konnte keine Thrombingenerierung in PFP beobachtet werden, während in Anwesenheit von Monozyten (250 MZ/ μ l bis 2 000 MZ/ μ l) eine dosisabhängige Zunahme von Thrombin mit steigender Monozyten-Konzentration detektiert wurde (Abbildung 52). Ab einer Konzentration von 500 MZ/ μ l, wie sie durchschnittlich auch etwa im Vollblut von gesunden Spender:innen vorliegt, und höher, wurde eine signifikante Zunahme des „etps“ und des

„thrombin peaks“ erreicht. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Thrombingenerierung in Thrombozyten-freiem Plasma dosisabhängig auf peripheren Blutmonozyten erfolgen kann.

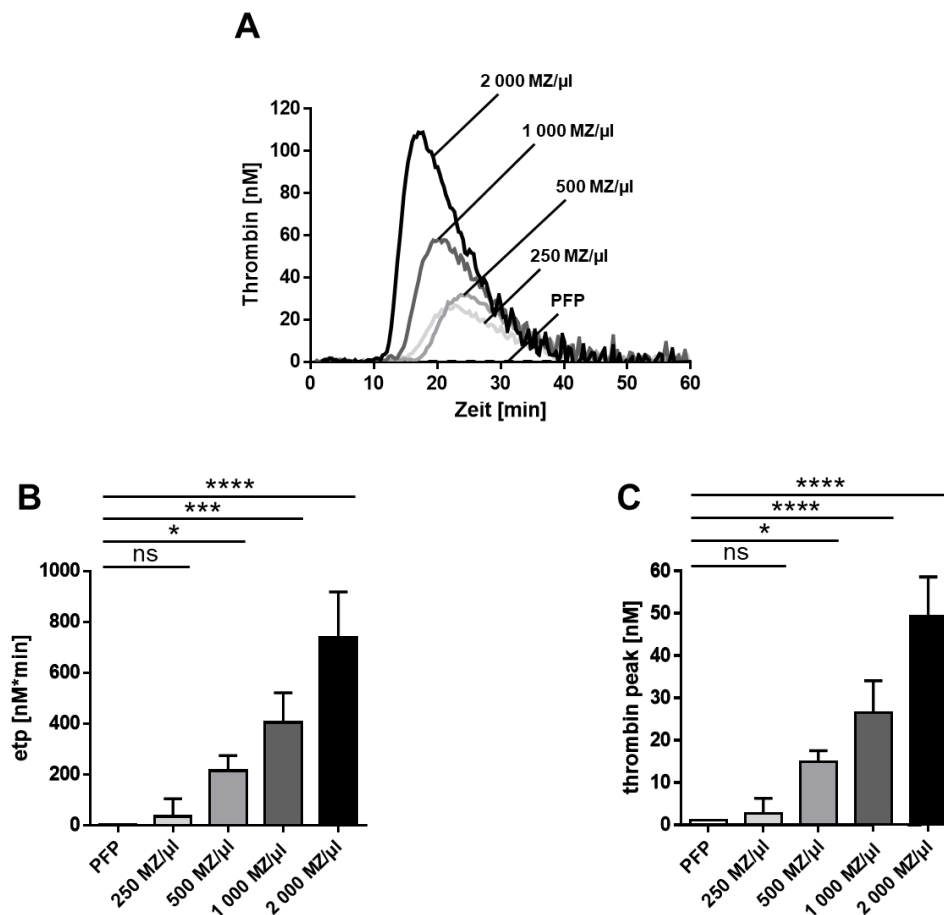


Abbildung 52: Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in humanem PFP in Abhängigkeit von der Monozyten-Konzentration.

Je 80 μl PFP (□) wurden zusammen mit 20 μl Tyrode's Puffer in eine 96-„Well“ Platte pipettiert und anschließend mit für 24 h über Nacht kultivierten Monozyten (Konzentrationen: 250 MZ/μl □, 500 MZ/μl ■, 1 000 MZ/μl ■ und 2 000 MZ/μl ■) inkubiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μl FluCa durch das Thrombinskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der Konzentrations-abhängigen, Monozyten-induzierten Thrombingenerierung in PFP. B: Quantitative Darstellung von „etp“ und „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD (n = 4). *P < 0,05; ***P < 0,001; ****P < 0,0001; n. s. nicht signifikant.

4.4.2. Einfluss des direkten Thrombin-Inhibitors Dabigatran auf die Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in PFP

Dabigatran stellt einen sehr potenten direkten Inhibitor für aktives Thrombin dar, der als Medikament für die Schlaganfallprophylaxe bei Vorhofflimmern zugelassen ist. Um den Einfluss von Dabigatran auf die Thrombinaktivität in Thrombozyten-freiem

Plasma in Gegenwart von Thrombin-generierenden humanen Monozyten zu untersuchen, wurde aktives Thrombin mit Hilfe der CAT in An- und Abwesenheit von Dabigatran quantifiziert.

Im Vergleich zur Vehikelkontrolle inhibierte Dabigatran dosisabhängig die von humanen Monozyten (2 000 MZ/μl) im PFP induzierte Thrombinaktivität (Abbildung 53 A). Ab einer Dabigatran-Konzentration von 100 nM, wie sie als Talspiegel therapeutisch in der Blutzirkulation vorkommt, und höher (200 nM), wurde der „thrombin peak“ signifikant um etwa 50 % gehemmt (Abbildung 53 B). Somit ist Dabigatran ein wirksamer Inhibitor der Monozyten-induzierten Thrombinaktivität in PFP.

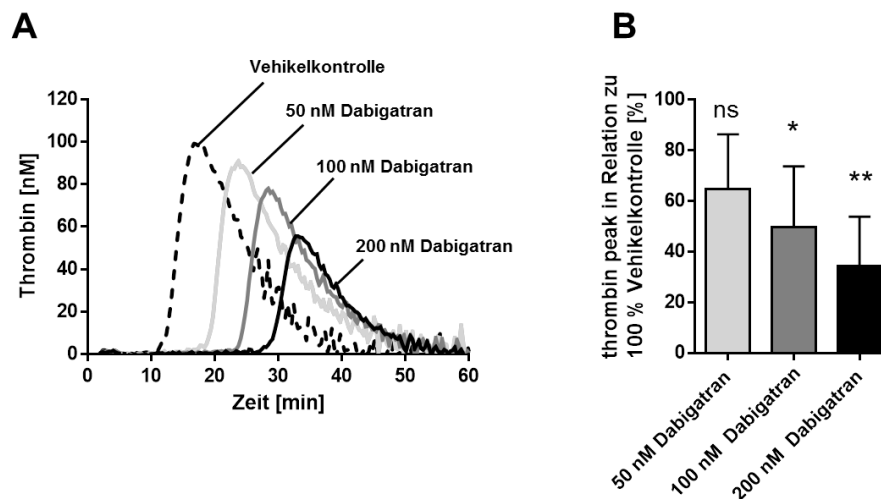


Abbildung 53: Thrombinaktivität, induziert durch humane Monozyten, in humanem PFP in Abhängigkeit von der Dabigatran-Konzentration.

Je 80 μl PFP wurden zusammen mit 20 μl Tyrode's Puffer in eine 96-„Well“ Platte pipettiert. Anschließend wurden für 24 h über Nacht kultivierte Monozyten (2 000 MZ/μl), die zuvor für 5 min mit Dabigatran (finale Konzentrationen: 50 nM □, 100 nM ■ und 200 nM ■) bzw. mit DMSO + 5 % HCl (0,0005 % HCl in 1 % DMSO) als Vehikelkontrolle inkubiert wurden, hinzu pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μl FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der Monozyten-induzierten Thrombingenerierung in PFP in Gegenwart von Dabigatran. B: Quantitative Darstellung des „thrombin peaks“ in Relation zu 100 % Vehikelkontrolle (mit DMSO + 5 % HCl-inkubierte Monozyten). Dargestellt ist der Mittelwert ± SD (n = 3). *P < 0,05; **P < 0,01; n. s. nicht signifikant.

4.4.3. Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in PRP

Thrombozyten sind maßgeblich an der Thrombingenerierung im Plasma beteiligt. Um die physiologischen Bedingungen widerzuspiegeln, wurde nachfolgend die Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in PRP untersucht. Dazu wurden humane

aus „Buffy Coats“ isolierte, für 24 h über Nacht kultivierte Monozyten mit PRP inkubiert und die Thrombingenerierung mit Hilfe der CAT detektiert.

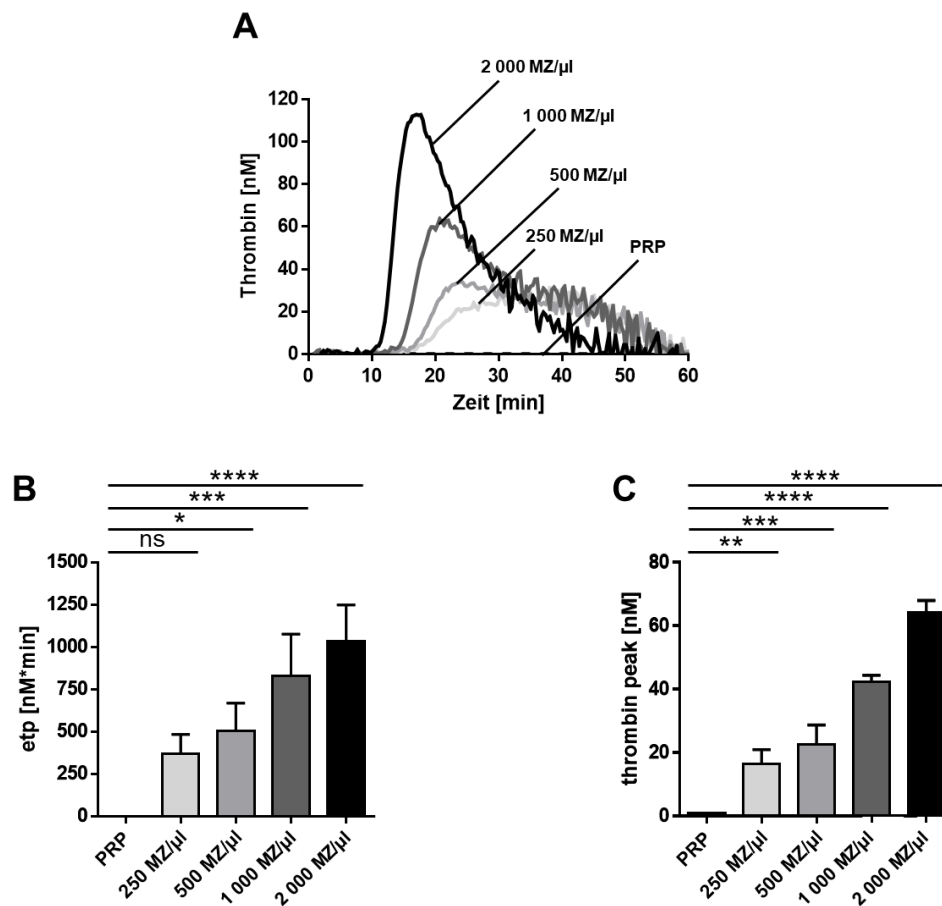


Abbildung 54: Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in humanem PRP in Abhängigkeit von der Monozyten-Konzentration.

Je 80 μl PRP (□, 50×10^3 TZ/μl) wurden zusammen mit 20 μl Tyrode's Puffer in eine 96-„Well“ Platte pipettiert und anschließend mit einem Tag alten Monozyten (Konzentrationen: 250 MZ/μl □, 500 MZ/μl ■, 1 000 MZ/μl ■ und 2 000 MZ/μl ■) inkubiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μl FluCa durch das Thrombinskop gestartet. Die Thrombingenerierung wurde für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der Konzentrations-abhängigen, Monozyten-induzierten Thrombingenerierung in PRP. B: Quantitative Darstellung von „etp“ und C: „thrombin peak“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; ****P < 0,0001; n. s. nicht signifikant.

Analog zu den Beobachtungen im PFP konnte in Abwesenheit von Monozyten keine Thrombinbildung im PRP beobachtet werden. In Anwesenheit von Monozyten (250 MZ/μl bis 2 000 MZ/μl) wurde eine dosisabhängige Zunahme der Thrombinbildung mit steigender Monozyten-Konzentration beobachtet (Abbildung 54). Ab einer Konzentration von 250 MZ/μl und höher wurde eine signifikante Zunahme des „thrombin peaks“ und ab 500 MZ/μl und höher eine signifikante Zunahme des „etps“ erreicht. Im Vergleich zum PFP ist das „etp“ im Schnitt ungefähr 335 nM*min höher.

als im PFP und auch der „thrombin peak“ ist im PRP im Schnitt ungefähr 12,9 nM höher. Diese Ergebnisse verdeutlichen die zentrale Rolle von Thrombozyten in der Thrombingenerierung und zeigen, dass Monozyten die Thrombingenerierung in Abwesenheit von Stimulanzien wie Thrombin initiieren können.

4.4.4. Einfluss des direkten Thrombin-Inhibitors Dabigatran auf die Monozyten-induzierte Thrombingenerierung in PRP

Um den Einfluss von Dabigatran auf die Thrombinaktivität in PRP in Gegenwart von Thrombin-generierenden humanen Monozyten zu untersuchen, wurde aktives Thrombin mit Hilfe der CAT in An- und Abwesenheit von Dabigatran quantifiziert.

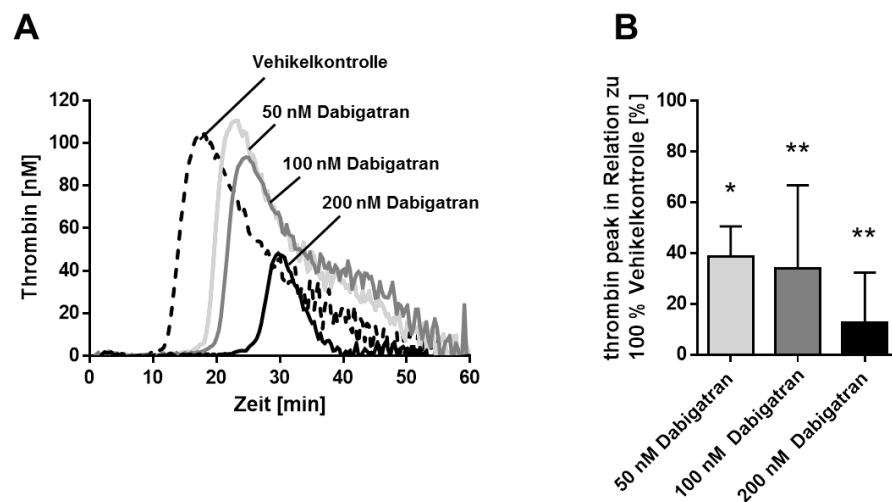


Abbildung 55: Thrombinaktivität, induziert durch humane Monozyten, in humanem PRP in Abhängigkeit von der Dabigatran-Konzentration.

Je 80 μ l PRP (50×10^3 TZ/ μ l) wurden zusammen mit 20 μ l Tyrode's Puffer in eine 96-„Well“ Platte pipettiert. Anschließend wurden für 24 h über Nacht kultivierte Monozyten (2 000 MZ/ μ l), die zuvor für 5 min mit Dabigatran (finale Konzentrationen: 50 nM , 100 nM und 200 nM) inkubiert wurden, hinzu pipettiert. Die Thrombingenerierung wurde durch die Zugabe von 20 μ l FluCa durch das Thrombinoskop gestartet und für 60 min in Intervallen von 20 sek bei 37 °C gemessen. A: Repräsentative Darstellung der Monozyten-induzierten Thrombingenerierung in PRP in Gegenwart von Dabigatran. B: Quantitative Darstellung des „thrombin peaks“. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). *P < 0,05; **P < 0,01.

Auch hier konnte eine dosisabhängige Inhibition der Thrombinaktivität durch Dabigatran beobachtet werden. Ab einer Dabigatran-Konzentration von 50 nM wurde der „thrombin peak“ signifikant um etwa 60 % gehemmt, obwohl die repräsentative Kurve eine Erhöhung vermuten ließ (Abbildung 55). Dabigatran inhibiert folglich die Monozyten- und Thrombozyten-induzierte Thrombingenerierung.

Stellt man die Inhibition der Thrombinaktivität im PRP der Inhibition der Thrombinaktivität im PFP gegenüber, wird deutlich, dass Dabigatran im PRP effizienter zu wirken scheint (im Schnitt um etwa 21 %). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Thrombozyten maßgeblich an der Thrombingenerierung beteiligt sind, jedoch auch eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Gerinnung spielen.

4.5. Rolle von Thrombin bei der endothelialen Rekrutierung und Transmigration von humanen Monozyten unter Flussbedingungen *in vitro*

4.5.1. Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten an/auf/durch unstimulierte/n bzw. TNF- α -stimulierte/n HMEC-1

Um zu analysieren, welchen Effekt TNF- α auf die endotheliale Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten hat, wurden die humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) vor dem Flusskammerversuch über Nacht mit 100 ng/ml TNF- α inkubiert.

Die Reinheit der Monozyten wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt und betrug im Mittel 81,57 % $\pm$ 6,23 %. Ebenso wurde die Monozytenaktivierung bestimmt (Abbildung 51, Kapitel 4.4.1.).

Abbildung 56 A zeigt die Adhäsion, Migration und Transmigration von Monozyten an/auf/durch unstimulierte/n Endothelzellen, während Abbildung 56 B die Adhäsion, Migration und Transmigration an/auf/durch TNF- α -stimulierte/n Endothelzellen zeigt. In beiden Experimenten war die Zahl der adhärenierten Monozyten am höchsten, während weniger Monozyten migrierten und am wenigsten Monozyten transmigrierten. Aus dem direkten Vergleich von unstimulierten mit TNF- α -stimulierten Endothelzellen wird ersichtlich, dass die TNF- α -Stimulation tendenziell die Adhäsion der Monozyten an die Zellschicht erhöht, jedoch hier nicht signifikant ist (Abbildung 56 C). Dahingegen wurde ein signifikanter Effekt bei der Migration auf und durch die Endothelzellschicht von Monozyten beobachtet. Es adhärenierten 84,2 ($\pm$ 36,02) MZ/0,658 mm² an die unstimulierte und 110,8 ($\pm$ 38,15) MZ/0,658 mm² an die TNF- α -stimulierte Endothelzellschicht. Während ca. 17,6 ($\pm$ 6,7) MZ/0,658 mm² auf der unstimulierten Endothelzellschicht migrierten, waren es 32,8 ($\pm$ 12,58) MZ/0,658 mm² auf der TNF- α -stimulierten Endothelzellschicht (Abbildung 56 D). Es

transmigrierten im Mittel $1,6 (\pm 2,03)$ MZ/ $0,658 \text{ mm}^2$ durch die unstimulierte Zellschicht, während die Stimulation mit TNF- α zu einer Steigerung der Transmigration auf $14,2 (\pm 10,35)$ MZ/ $0,658 \text{ mm}^2$ führte (Abbildung 56 E). Diese Ergebnisse bestätigen die wichtige Rolle von TNF- α -stimulierten Endothelzellen bei der endothelialen Migration und Transmigration von peripheren Blutmonozyten.

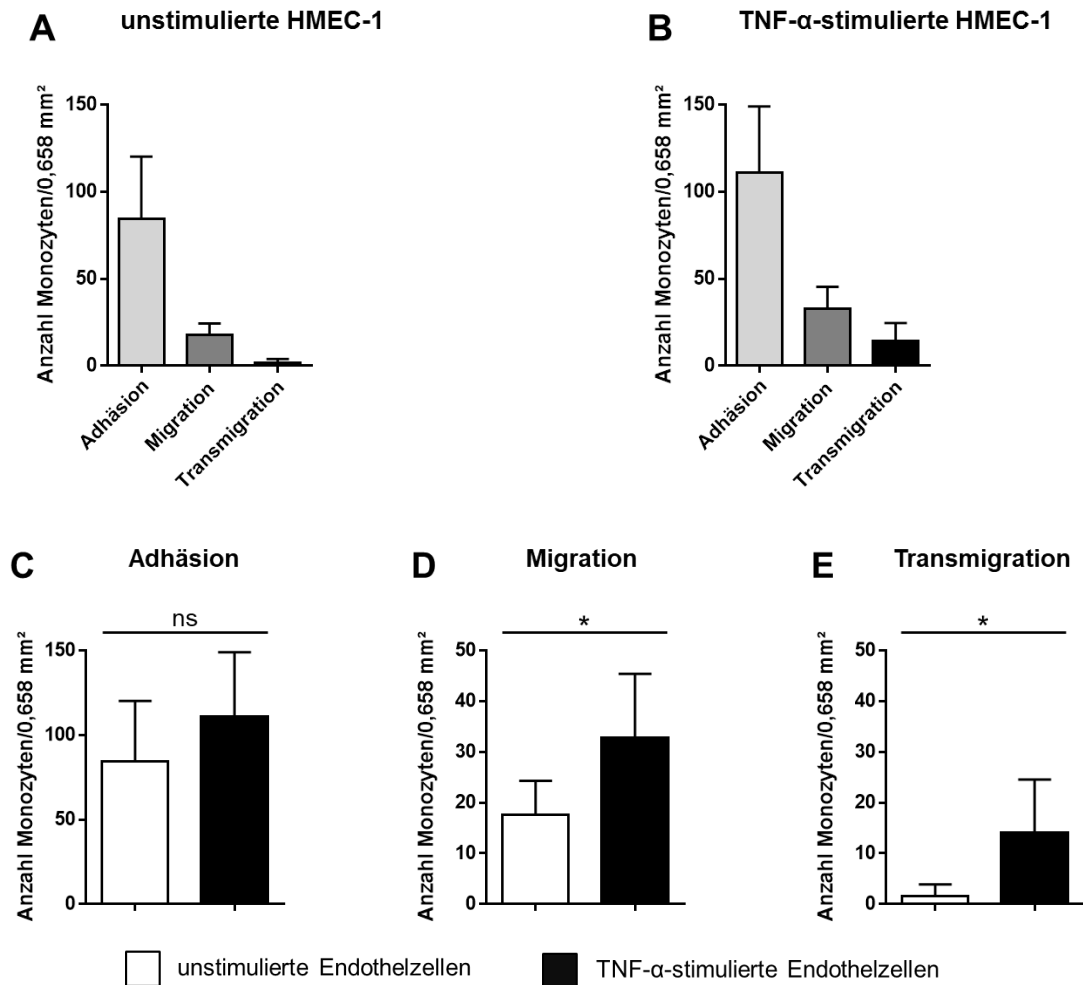


Abbildung 56: Einfluss der TNF- α -Behandlung von HMEC-1 auf die endotheliale Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten.

HMEC-1 wurden in einen Flusskammerplattenkanal eingesät und A: unbehandelt gelassen bzw. B: über Nacht mit TNF- α (finale Konzentration 100 ng/ml) stimuliert. Für 24 h über Nacht kultivierte Monozyten wurden mit CellTracker orange CMRA (finale Konzentration 2 μM) markiert und nach zweimaligem Waschen in PFP in Gegenwart von GPRP (finale Konzentration 5 mM) resuspendiert. Die Monozytensuspension (4×10^6 MZ/ml) floss für 15 min über die Endothelzellschicht, anschließend wurde das „Inlet“ gespült. Die Bildpositionen wurden gespeichert und der Fluss fortgesetzt. Ausgewertet wurden 4 Bildpositionen aus je 5 verschiedenen Experimenten. Quantitative Darstellung der Adhäsion (□), Migration (■) und Transmigration (■) humaner Monozyten an/auf/durch eine/r A: unstimulierte/n HMEC-1-Zellschicht und B: TNF- α -stimulierte/n HMEC-1-Zellschicht. Quantitative Darstellung der C: Adhäsion, D: Migration und E: Transmigration humaner Monozyten an/auf/durch eine/r unstimulierte/n (□) bzw. TNF- α -stimulierte/n (■) HMEC-1-Zellschicht. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD ($n = 5$). * $P < 0,05$; n. s. nicht signifikant.

Abbildung 57 zeigt eine beispielhafte Sequenz einer fotografierten Position des Flusskammerplattenkanals. Die Fluoreszenz-markierten Monozyten (in der Abbildung weiß dargestellt) waren zu Beginn des Experiments ($t = 0$ min) deutlich zu erkennen. Ab 20 min nahm die Fluoreszenzintensität sichtbar ab und nach 30 min waren die Monozyten kaum noch zu erkennen. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität der im grünen Kreis befindlichen Monozyten lässt darauf schließen, dass diese durch die TNF- α -stimulierte Endothelzellschicht transmigrierten.

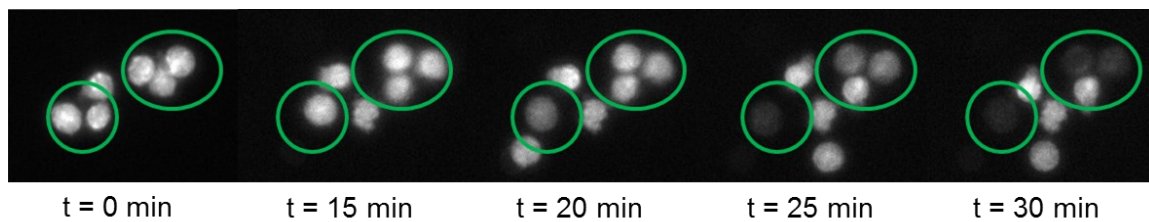


Abbildung 57: Repräsentative Sequenzfotos der Adhäsion und Transmigration von humanen Monozyten an/durch eine TNF- α -stimulierte HMEC-1-Zellschicht unter Flussbedingungen.

HMEC-1 wurden in einen Flusskammerplattenkanal eingesät und über Nacht mit TNF- α (finale Konzentration 100 ng/ml) stimuliert. Für 24 h über Nacht kultivierte Monozyten wurden mit CellTracker orange CMRA (finale Konzentration 2 μ M) markiert und die Monozytensuspension (4×10^6 MZ/ml) floss für 15 min über die Endothelzellschicht. Die Bildpositionen wurden gespeichert und der Fluss fortgesetzt. Die grünen Kreise markieren die durch die TNF- α -stimulierte Endothelzellschicht transmigrierten Monozyten.

4.5.2. Einfluss von Dabigatran auf die endotheliale Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten

Um die Rolle von zellulär-generiertem Thrombin bei der endothelialen Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten in PFP zu untersuchen, wurde der direkte Thrombin-Inhibitor Dabigatran (100 nM) in den Flusskammerexperimenten eingesetzt. Die Endothelzellen wurden dazu vor dem Flusskammerexperiment über Nacht mit TNF- α (100 ng/ml) stimuliert oder blieben unstimuliert. Die isolierten Monozyten wurden vor dem Experiment in PFP in Gegenwart von GPRP inkubiert, um die Fibrinpolymerisierung zu inhibieren.

Abbildung 58 A zeigt, dass Dabigatran die Migration und Transmigration von Monozyten auf/durch eine/r Endothelzellschicht unter Flussbedingungen in Abwesenheit von TNF- α um ca. 50 % und die Adhäsion um etwa 70 % verminderte. In Gegenwart von TNF- α wurde die Adhäsion, Migration und Transmigration der Monozyten an/auf/durch die/der Endothelzellschicht im Mittel um ca. 45 bis 70 % signifikant

inhibiert (Abbildung 58 B). Thrombin spielt somit eine wichtige Rolle bei der Adhäsion, Migration und Transmigration von humanen Monozyten an/auf/durch eine/r TNF- α -un/stimulierte/n humane/n Endothelzellschicht.

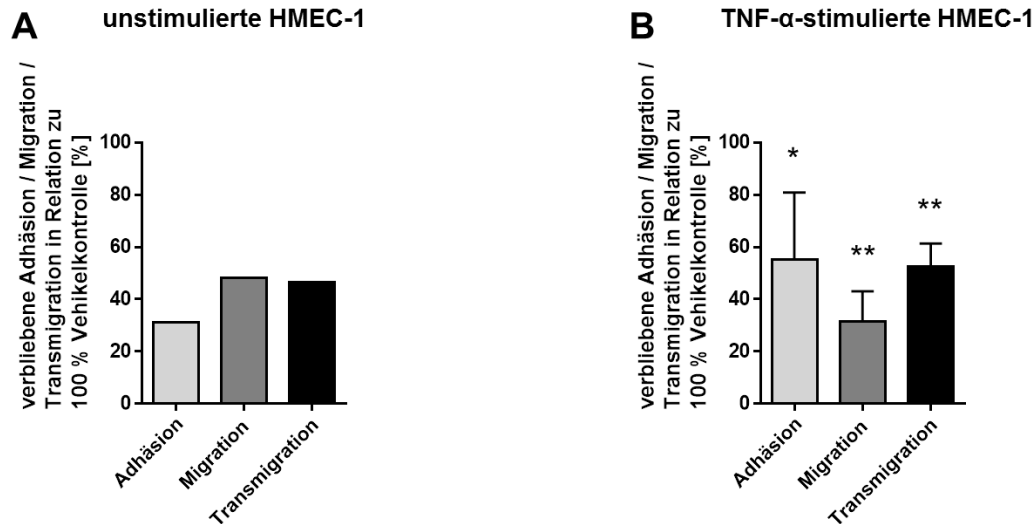


Abbildung 58: Einfluss von Dabigatran auf die endotheliale Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten in An- und Abwesenheit von TNF- α .

HMEC-1 wurden in einen Flusskammerplattenkanal eingesät und A: unbehandelt gelassen bzw. B: über Nacht mit TNF- α (finale Konzentration 100 ng/ml) stimuliert. Für 24 h über Nacht kultivierte Monozyten wurden mit CellTracker orange CMRA (finale Konzentration 2 μ M) markiert und nach zweimaligem Waschen in PFP in Gegenwart von GPRP (finale Konzentration 5 mM) resuspendiert. Anschließend wurden Dabigatran (finale Konzentration 100 nM) und CaCl₂ (finale Konzentration 6 mM) hinzu pipettiert. Die Monozytensuspension (4 x 10⁶ MZ/ml) floss für 15 min über die Endothelzellschicht, anschließend wurde das „Inlet“ gespült. Die Bildpositionen wurden gespeichert und der Fluss fortgesetzt. Ausgewertet wurden 3 Bildpositionen aus je einem bzw. 3 Experiment/en. Quantitative Darstellung der verbleibenden Adhäsion (□), Migration (▒) und Transmigration (■) von humanen Monozyten an/auf/durch A: eine/r unstimulierte/n Endothelzellschicht nach Inkubation mit Dabigatran (n = 1) bzw. B: eine/r TNF- α -stimulierte/n Endothelzellschicht nach Inkubation mit Dabigatran (n = 3). Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD. *P < 0,05; **P < 0,01; n. s. nicht signifikant.

4.6. Rolle von Thrombospondin-1 bei der endothelialen Rekrutierung und Transmigration von murinen Makrophagen unter Flussbedingungen *in vitro*

4.6.1. Genotypisierung von TSP-1 Knockout-Mäusen und Proteinnachweis von TSP-1 in K. o.-Mäusen

Ob die eingesetzten Thrombospondin-1 (TSP-1) Knockout-Tiere tatsächlich einen Knockout (K. o.) für das Zielgen hatten, wurde durch die Genotypisierung überprüft. Mit Hilfe der PCR wurde der durch den jeweiligen Primer definierte DNS-Teil amplifiziert und mittels Gelelektrophorese und UV-Beleuchtung für die Analyse sichtbar

gemacht. Besitzen die Tiere einen homozygoten Knockout für das TSP-1-Gen, haben die Amplifikate eine Größe von 400 bp, während die Amplifikate eines Wildtyp-Tieres 700 bp groß sind. Heterozygote Tiere besitzen ein Knockout-Gen sowie ein Wildtyp-Gen, was in Amplifikaten der Größe von 400 und 700 bp resultiert.

Wie in Abbildung 59 zu erkennen ist, handelte es sich bei den eingesetzten Mäusen um homozygote TSP-1 Knockout-Tiere, da die Banden der Taschen 2-10 auf der Höhe von 400 bp detektiert wurden. Die DNS der Positiv-Kontrolle (Wildtyp, C57BL/6J, Tasche 11) wurde bei 700 bp detektiert, während die Negativkontrolle (Tasche 12) erwartungsgemäß keine DNS enthielt und somit nicht zu detektieren war. Folglich wurden nur homozygote TSP-1 K. o.-Mäuse und keine heterozygoten TSP-1 K. o.-Mäuse für die Zucht bzw. Experimente eingesetzt.

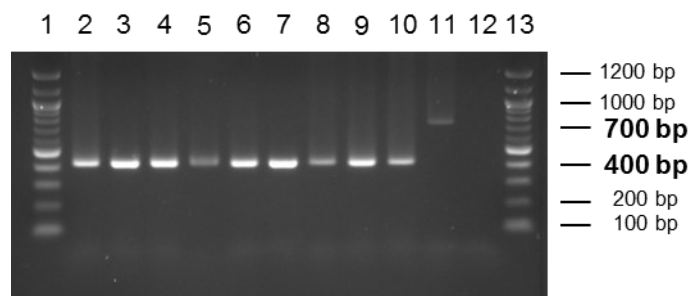


Abbildung 59: Visualisierung der Genotypisierung in einem Agarosegel.

Den jeweiligen Mäusen wurde eine Gewebeprobe aus dem Ohr entnommen und die DNS aus dieser Probe extrahiert. Die DNS wurden mit Hilfe der PCR-Methode amplifiziert und anschließend auf ein Agarosegel (1,5 %), das DNS-Färbe-Reagenz RotiSafe enthielt, aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde konstant bei 80 Volt für ca. 60 min laufen gelassen und das Gel mit Hilfe einer Gel-Dokumentationsanlage und der Software ImageLab visualisiert und analysiert. Tasche 1 und 13: DNS-Leiter, Tasche 2-10: TSP-1 Knockout-Elterntiere, Tasche 11: Positivkontrolle (Wildtyp-DNS), Tasche 12: Negativkontrolle (ddH₂O).

Zusätzlich wurde das Ergebnis der Genotypisierung auf Proteinebene bestätigt. Dazu wurden gewaschene Thrombozyten aus Wildtyp- und TSP-1 Knockout-Mäusen verwendet und für die Gelelektrophorese aufbereitet. In der SDS-PAGE wurden die Proteine der Größe nach getrennt und mit Hilfe der Western Blot Methode sichtbar gemacht. Wie in Abbildung 60 zu sehen ist, konnte der TSP-1-Antikörper im Vergleich zur wildtypischen Probe nicht an die TSP-1-defiziente Probe binden, da keine Banden zwischen 165-198 kDa detektiert wurden. Die Thrombozyten von TSP-1 K. o.-Mäusen exprimierten also kein TSP-1-Protein.

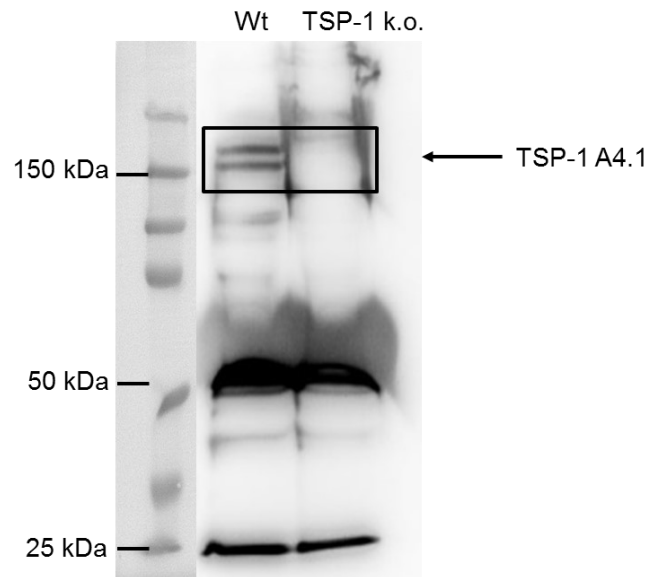


Abbildung 60: Visualisierung der Proteinexpression in Wildtyp- und TSP-1 K. o.-Thrombozyten auf einer Trägermembran.

Den jeweiligen Mäusen wurde Blut entnommen, PRP generiert und aus diesem gewaschene Thrombozyten hergestellt, die für die Gelelektrophorese aufbereitet wurden. Die im Gel nach Molekülgröße aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der Western Blot Methode auf eine Trägermembran übertragen, die zuvor mit anti-TSP-1 Antikörper Klon A4.1 über Nacht bei 4 °C und anschließend mit einem sekundären HRP-konjugierten Antikörper für 2 h bei RT inkubiert wurde. Die Membran wurde mit ECL bedeckt und die Chemilumineszenz mit Hilfe der Fusion-FX7-Kamera detektiert. Die Entwicklungszeit betrug 2 min.

4.6.2. Adhäsion, Migration und Transmigration muriner Makrophagen von C57BL/6J-Mäusen an/auf/durch unstimulierte/n bzw. TNF- α -stimulierte/n HMEC-1

Auch im Mausmodell wurde analysiert, welchen Effekt die Stimulation der HMEC-1 mit TNF- α auf die Adhäsion, Migration und Transmigration muriner Makrophagen (M Φ) hat. Dazu wurden isolierte und für 24 h über Nacht kultivierte Peritonealmakrophagen verwendet. Diese differenzieren sich nach Kontakt mit proinflammatorischen Signalen aus peripheren Blutmonozyten und wandern in die betroffenen Gewebe bzw. Körperhöhlen ein. Peritonealmakrophagen stellen also im Gegensatz zu peripheren Blutmonozyten differenzierte und aktivierte Immunzellen dar. Im Schnitt besaßen die murinen Makrophagen eine Reinheit von 92,97 % $\pm$ 4,9 %.

Die Adhäsion, Migration und Transmigration von Makrophagen an/auf/durch unstimulierte/n Endothelzellen ist in Abbildung 61 gezeigt. Die Zahl der adhärenierten Makrophagen war in beiden Experimenten am höchsten, während weniger Makrophagen migrierten und am wenigsten Makrophagen transmigrierten.

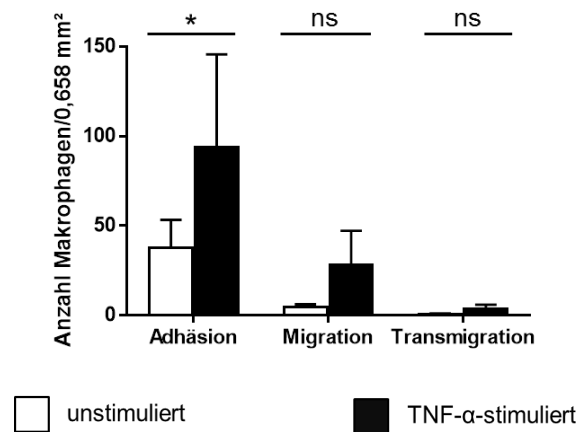


Abbildung 61: Einfluss von TNF- α auf die endotheliale Adhäsion, Migration und Transmigration muriner C57BL/6J-Peritonealmakrophagen.

HMEC-1 wurden in einen Flusskammerplattenkanal eingesät und unbehandelt (□) gelassen bzw. über Nacht mit TNF- α (■ finale Konzentration 100 ng/ml) stimuliert. Für 24 h über Nacht kultivierte murine C57BL/6J-Makrophagen wurden mit CellTracker orange CMRA (finale Konzentration 2 μ M) markiert und nach zweimaligem Waschen in 100 μ l RPMI 1640-Medium resuspendiert. Die Makrophagensuspension (4×10^6 M Φ /ml) floss für 15 min über die Endothelzellschicht und das „Inlet“ wurde anschließend gespült. Die Bildpositionen wurden gespeichert und der Fluss fortgesetzt. Ausgewertet wurden 5 Bildpositionen aus je 3 Experimenten. Quantitative Darstellung der Adhäsion, Migration und Transmigration muriner Makrophagen an/auf/durch eine/r unstimulierte/n (□) bzw. eine/r TNF- α -stimulierte/n (■) HMEC-1-Zellschicht. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD (n = 3). *P < 0,05; n. s. nicht signifikant.

Vergleicht man unstimulierte mit TNF- α -stimulierten Endothelzellen, wird deutlich, dass die TNF- α -Stimulation die Adhäsion der Makrophagen an die Zellschicht signifikant erhöhte. Tendenziell bewirkte eine TNF- α -Stimulation der HMEC-1 eine erhöhte Anzahl an migrierten und transmigrierten Makrophagen, jedoch waren diese Ergebnisse nicht signifikant. Es adhärten im Mittel $37,67 (\pm 15,63)$ M Φ /0,658 mm² an die unstimulierte und $93,67 (\pm 52,01)$ M Φ /0,658 mm² an die TNF- α -stimulierte Endothelzellschicht. Während ca. $4,67 (\pm 1,53)$ M Φ /0,658 mm² auf der unstimulierten Endothelzellschicht migrierten, waren es $28,33 (\pm 18,9)$ M Φ /0,658 mm² auf der TNF- α -stimulierten Endothelzellschicht. Es transmigrierten im Mittel $0,3 (\pm 0,58)$ M Φ /0,658 mm² durch die unstimulierte Zellschicht, während die Stimulation mit TNF- α zu einer Steigerung der Transmigration auf $3,67 (\pm 2,31)$ M Φ /0,658 mm² führte. Diese Ergebnisse bestätigen, dass TNF- α auch im Mausmodell eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Makrophagen an die Gefäßwand spielt.

4.6.3. Rolle von TSP-1 bei der endothelialen Adhäsion, Migration und Transmigration muriner Peritonealmakrophagen

TSP-1 wurde als Ligand von CD36 identifiziert und unterstützt die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen. Um zu analysieren, inwiefern sich eine globale TSP-1-Defizienz auf die Adhäsion, Migration und Transmigration an/auf/durch humane/n Endothelzellen auswirkt, wurden Makrophagen von TSP-1 K. o.-Mäusen in entsprechenden Flusskammer-Experimenten mit TNF- α -stimulierten Endothelzellen untersucht.

Aus Abbildung 62 wird ersichtlich, dass TSP-1-defiziente Peritonealmakrophagen keine signifikante Veränderung bei der Adhäsion und nur eine geringfügig verminderte Migration an/auf TNF- α -stimulierte/n Endothelzellen im Vergleich zu C57BL/6J-Makrophagen zeigten. Die Transmigration wurde jedoch deutlich und signifikant durch das Fehlen von TSP-1 beeinflusst. Es transmigrierten 52,5 % weniger TSP-1-defiziente Makrophagen im Vergleich zu der 100 % Wildtyp-Kontrolle durch die stimulierte Endothelzellschicht. TSP-1 ist folglich an der Transmigration von murinen Peritonealmakrophagen durch eine humane Endothelzellschicht beteiligt.

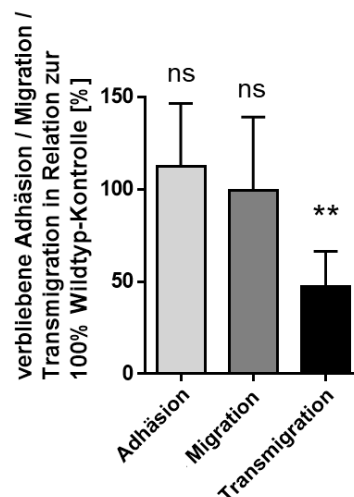


Abbildung 62: Endotheliale Adhäsion, Migration und Transmigration muriner TSP-1-defizienter Peritonealmakrophagen.

HMEC-1 wurden in einen Flusskammerplattenkanal eingesät und über Nacht mit TNF- α (finale Konzentration 100 ng/ml) stimuliert. Für 24 h über Nacht kultivierte C57BL/6J- bzw. TSP-1-defiziente Makrophagen wurden mit CellTracker orange CMRA (finale Konzentration 2 μ M) „gefärbt“ und nach zweimaligem Waschen in RPMI 1640-Medium resuspendiert. Die Makrophagensuspension (4×10^6 M Φ /ml) floss für 15 min über die Endothelzellschicht, anschließend wurde das „Inlet“ gespült. Die Bildpositionen wurden gespeichert und der Fluss fortgesetzt. Ausgewertet wurden 3 Bildpositionen aus je 4 Experimenten. Quantitative Darstellung der verbliebenen Adhäsion (□), Migration (■) und Transmigration (■) muriner TSP-1-defizienter Makrophagen an/auf/durch eine/r TNF- α -stimulierte/n Endothelzellschicht in Relation zu einer 100 % Wildtyp-(C57BL/6J-)Kontrolle. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ SD ($n = 4$). ** $P < 0,01$; n. s. nicht signifikant.

5 Diskussion

5.1. Validierung und Charakterisierung der FXI-abhängigen Thrombingenerierung auf humanen Thrombozyten

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die grundlegenden Mechanismen der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung *in vitro* untersucht. Unter Anwendung der kalibrierten automatisierten Thrombographie wurde bestätigt, dass α -Thrombin die Gerinnungsfaktor XI- und Tenase-abhängige Thrombingenerierung in Thrombozyten-reichem Plasma induziert und die positiven Rückkopplungs-Schleifen der Gerinnungsfaktoren IX und XI essenziell für die Amplifikation von Thrombin sind.

Thrombozyten sind maßgeblich in die primäre Hämostase involviert, ebenso sind sie essenziell für die Thrombinbildung während der Gerinnung und thrombotisch-inflammatorischer Erkrankungen. Unter inflammatorischen Bedingungen exprimieren aktivierte Monozyten den Gewebefaktor „Tissue Factor“ auf ihrer Zelloberfläche, der an FVII binden und mit dem so aktivierten FVII den TF-FVIIa-Komplex bilden kann. Auf diesem Wege werden geringe Mengen Thrombin gebildet, die eine erste Aktivierung von Thrombozyten bewirken. Außerdem können negativ geladene Oberflächen die sogenannte Kontaktaktivierung auslösen, die zur Aktivierung von FXI zu FXIa führt. Es ist bereits bekannt, dass FXI an der Thrombozytenaktivierung und Mikroaggregatbildung unter Scherstress *in vivo* und *ex vivo* beteiligt ist [218], weiterhin wurde FXI eine Rolle bei der arteriellen und venösen Thrombose zugeschrieben. Auch in vaskuläre Entzündungen sowie arterielle Hypertonie ist FXI involviert. Wie genau Thrombozyten die FXI-abhängige Thrombinbildung regulieren, ist jedoch bis heute nicht genau verstanden. Daher wurden die grundlegenden Mechanismen der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung genauer analysiert.

Im Vergleich zur Thrombozyten-abhängigen Thrombinbildung, die direkt durch Thrombin ausgelöst wurde und die die Amplifikationsphase der Thrombinbildung kennzeichnet, wurde die Initiation der Thrombinbildung, ausgelöst durch den TF, untersucht. Zusammen mit dem TF spielt FVII eine wichtige Rolle in der Gerinnungskaskade. Durch TF wird FVII aktiviert (FVIIa) und kann so den Prothrombinase-Komplex unter anderem direkt aktivieren. Studien mit TF-defizienten Mäusen

bzw. Mäusen mit niedrigem TF-Level („low TF“-Mäuse; Mäuse, die ~ 1 % „Tissue Factor“ exprimieren) zeigten die essenzielle Bedeutung des „Tissue Factors“ auch in nicht-hämostatischen Prozessen. Bereits 1996 publizierten Bugge et al. Daten, die eine TF-Defizienz in Mäusen als letal indizierten: TF-defiziente Embryos überlebten im Schnitt den Tag 9,5 im Uterus vermutlich aufgrund von Blutungen in die Dottersackhöhle und dem damit einhergehenden Verlust von roten Blutkörperchen sowie der Gefäßintegrität nicht [219]. Zudem bewies die Gruppe um Pawlinski, dass „low-TF“-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine verkürzte Lebensdauer besaßen, die unter anderem durch spontane Blutungen und starke Herzfibrose verursacht wurde [220]. Bisher wurde keine humane TF-Defizienz beschrieben, da diese auch im Menschen letal zu sein scheint [221].

Um die Rolle des TFs in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung zu untersuchen, wurde der monoklonale anti-TF Antikörper Klon VD8, der die essenzielle Interaktion zwischen TF und FVIIa blockiert [222], in der CAT eingesetzt. Wie erwartet verzögerte dieser Antikörper die Thrombinbildung im PRP im Mittel um ca. 7 Minuten, wenn TF als Trigger eingesetzt wurde, hingegen nicht, wenn Thrombin als Trigger diente. Vergleichbare Ergebnisse wurden erzielt, wenn gewaschene Thrombozyten in FVII-depletiertem Plasma untersucht wurden. TF und FVII scheinen somit bei der Thrombin-getriggerten CAT keine dominierende Rolle zu spielen. Möglich wäre aber, dass die Thrombin-initiierte Thrombingenerierung in TF-inhibiertem Plasma aufgrund der Freisetzung von TF durch die Thrombin-aktivierten Thrombozyten stattfand. Es werden z. B. TF-positive Mikropartikel von aktivierten Endothelzellen, Leukozyten und Thrombozyten freigesetzt [223], welche die Quelle von „vom Blut übertragenen“ (engl.: „blood-borne“) TF sein könnten. Dieser „blood-borne“ TF trägt möglicherweise zu intravaskulärer Gerinnung und Thrombose bei [224], [225]. Siddiqui et al. beschrieben in ihrer Arbeit, dass Thrombozyten diese Mikropartikel aufnehmen und so inaktiven TF auf ihrer Oberfläche präsentieren können. Dieser TF wird durch Freisetzung aktiviert [226] und kann dann im Plasma an FVII binden. Konträr dazu publizierte die Gruppe um Bouchard jedoch, dass Thrombozyten keinen detektierbaren TF exprimieren oder TF-Aktivität zeigen [227]. Bis heute wird dieser Prozess kontrovers diskutiert. Da in dem hier beschriebenen Versuch ein anti-TF Antikörper verwendet wurde, der auch den von Thrombozyten sezernierten TF inhibiert, ist ersichtlich, dass die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung unabhängig von TF erfolgte. Weiterhin könnte die verzögerte, TF-getriggerte

Thrombingenerierung in TF-inhibiertem Plasma auf im Blut zirkulierenden, bereits aktivierten FVII zurückzuführen sein, der FX direkt aktiviert. Studien zeigten bisher jedoch nur, dass Plasma-FVIIa bereits TF-gebundenen FVII aktiviert (FVII-TF Komplex zu FVIIa-TF) [228]. FVII muss scheinbar im Komplex mit TF vorliegen, um die Thrombinbildung initiieren zu können. Die verspätete Thrombinbildung in TF-getriggertem Plasma lässt sich daher eher mit einem TF- und FVIIa-unabhängigen Mechanismus erklären, der auf eine Gerinnungsfaktor XIIa-(FXIIa-)vermittelte Kontaktaktivierung zurückzuführen sein könnte. Die Arbeitsgruppe von PD Dr. Kerstin Jurk zeigte, dass ohne Zugabe eines Triggers die basale Thrombinbildung nach ca. 20 Minuten auf der Oberfläche humaner Thrombozyten initiiert wird [229], welche durch den FXIIa-Inhibitor „Corn Trypsin Inhibitor“ komplett gehemmt werden konnte (unveröffentlichte Daten).

Der enzymatische Tenase-Komplex setzt sich aus den Gerinnungsfaktoren VIII und IX zusammen und ist Teil der intrinsischen Gerinnungskaskade. Die prokoagulatorischen Faktoren binden in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen an die Oberfläche von aktivierten Thrombozyten und aktivieren Gerinnungsfaktor X zu Gerinnungsfaktor Xa [230], [231]. Ein Mangel an FVIII bzw. FIX resultiert daher in der Krankheit Hämophilie A bzw. B. Umgangssprachlich werden die Betroffenen auch Bluter genannt, da sie eine erhöhte Blutungsneigung haben und eventuell auftretende Blutungen wie z. B. Epistaxis oder Hämarthrosen länger andauern.

Um die wesentliche Rolle des Tenase-Komplexes als positives Rückkopplungssystem in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung zu bestätigen, wurden gewaschene Thrombozyten in FVIII- bzw. FIX-depletiertem Plasma resuspendiert und mit Hilfe der CAT untersucht. Während der Gerinnungsfaktor IX für die TF- ebenso wie für die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung essenziell ist, spielt der Kofaktor VIII eine größere Rolle in der Thrombin-induzierten als in der TF-induzierten Thrombingenerierung. Die Depletion von FVIII im Plasma resultierte in einer fehlenden oder extrem verlangsamten Aktivierung von FX, wenn Thrombin als Trigger verwendet wurde. Nach Stimulation mit TF wurde weiterhin eine Thrombingenerierung detektiert. Grover et al. zeigten im Mausmodell *in vivo*, dass der TF-FVIIa-Komplex den FIX auch direkt aktivieren kann [232]. Möglicherweise kann dieser aktivierte FIX auch ohne seinen Kofaktor VIII marginale Mengen Thrombin bilden. Dagegen spricht jedoch die fehlende Thrombingenerierung in Thrombin-getriggertem

FVIII-depletiertem Plasma. Hier müsste dieser Hypothese nach das zugesetzte Thrombin ausreichen, um FIX zu aktivieren, der wiederum FX aktivieren müsste. Wahrscheinlicher ist also die Fähigkeit des TF-FVIIa-Komplexes, den Gerinnungsfaktor X direkt aktivieren zu können [233]. Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen die maßgebliche Beteiligung von FVIII an der positiven Rückkopplung der Thrombingenerierung, da im Thrombin-getriggerten Plasma keine und im TF-getriggerten Plasma eine reduzierte Thrombinbildung detektiert wurde. Kiouptsi et al. konnten vergleichende Ergebnisse mit Hilfe von murinen FVIII-defizienten Thrombozyten zeigen [234]. Gressner et al. beschrieben FVIII als Katalysator, der die Aktivierung von FX durch FIXa mindestens um das 300 000-fache verstärkt [235]. Dass Hämophilie A Erkrankte trotz hier gezeigter, jedoch reduzierter, Thrombingenerierung bluten, ließe sich möglicherweise mit der fehlenden, normalerweise durch FVIII ausgelösten, positiven Rückkopplungsschleife begründen: Die gebildeten Mengen Thrombin reichen scheinbar nicht aus, um eine Blutung effizient zu stoppen. In TF-getriggertem FIX-depletiertem Plasma konnte nach einer signifikant verlängerten „lag time“ eine stark verminderte Thrombingenerierung gemessen werden. Kamikubo et al. zeigten 2017, dass der TF-FVIIa-Xa-Komplex den Kofaktor VIII auch direkt aktivieren kann [49]. Könnte FVIIIa ohne FIX effizient FX aktivieren, müsste die Thrombinbildung jedoch früher zu detektieren sein. Die geringen Mengen Thrombin sind daher wahrscheinlich aufgrund der Aktivierung von FX durch den TF-FVIIa-Komplex zu erklären [233]. Vergleichbar mit Hämophilie A, sind diese geringen Mengen Thrombin vermutlich nicht ausreichend, um die Blutungen eines Hämophilie-B Erkrankten effizient zu stoppen.

Der Prothrombinase-Komplex besteht aus den aktiven Gerinnungsfaktoren X und V und bindet ebenso wie der Tenase-Komplex in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen an die Oberfläche von aktivierten Thrombozyten. Er ist essenziell für die Katalyse von Prothrombin zu Thrombin. Thrombin aktiviert weitere Gerinnungsfaktoren und spaltet zudem Fibrinogen zu Fibrin [231]. Thrombin ist aber nicht nur in der Hämostase von großer Bedeutung, sondern auch für die Entwicklung, Plastizität sowie die Signaltransduktion von Neuronen bedeutsam [236]. Die embryonale Entwicklung von Mäusen ist stark abhängig von den Gerinnungsfaktoren X [237], II [238] und V [239], weder Mäuse mit FX- noch mit FII- oder V-Defizienz überlebten in Studien. Die Prävalenz einer FX-Defizienz beträgt beim Menschen 1:1 000 000 und ist lebensbedrohlich. 2019 berichteten Grottke et al. in einem Fallbericht von einer erfolgreichen FX-

Plasma-Therapie nach einer lebensgefährlichen Blutung [240] und machten damit deutlich, wie wichtig die Forschung auf diesem Gebiet ist. Auch ein FII-Mangel tritt beim Menschen selten auf (1:2 000 000) und ist mit diversen schweren Blutungen (z. B. Epistaxis, Menorrhagie, Hämarthrose) verbunden. Bis 2013 wurde von keinem lebenden Menschen berichtet, der ein nicht-detektierbares Plasmalevel von FII aufwies [241]. Ebenso ist ein homozygoter FV-Mangel beim Menschen sehr selten (1:1 000 000) und ist wie ein FX- oder FII- Mangel mit schweren Blutungen verbunden [242]. Entgegengesetzt leiden Menschen mit Faktor-V-Leiden unter Thrombophilie, da der aktivierte FV aufgrund einer Genmutation nicht oder nicht vollständig durch das aktivierte Protein C gehemmt werden kann und so seine gerinnungsfördernde Wirkung beibehält [243].

Um die Beteiligung von FX, FII und FV in der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung zu untersuchen, wurden gewaschene Thrombozyten in dem jeweiligen Faktor-depletierten Plasma resuspendiert. Die hier erhaltenen Ergebnisse unterstützen die genannten Fakten zu FX, da in FX-depletiertem Plasma weder nach TF-Stimulation noch nach Thrombin-Stimulation eine Thrombingenerierung detektiert wurde und somit keine funktionierende Kontrolle der Blutgerinnung stattfinden kann. Vergleichende Beobachtungen wurden ebenfalls für FII-depletiertes Plasma gemacht: Es wurde weder in TF- noch in Thrombin-stimuliertem PRP eine „lag time“, ein „etp“ oder „thrombin peak“ detektiert. In FV-depletiertem Plasma wurde nach Stimulation mit TF sowie mit Thrombin jedoch eine Thrombingenerierung gemessen. Da es keine signifikanten Unterschiede zwischen TF- und Thrombin-Stimulation beim „etp“ und „thrombin peak“ gab und nur die „lag time“ verzögert war, scheint FV maßgeblich an der Geschwindigkeit, mit der die Thrombingenerierung aktiviert wird, beteiligt zu sein. Laut Tracy et al. sezernieren aktivierte Thrombozyten FV lokal aus ihren α -Granula [244] und 2017 publizierte die Gruppe um Yan Yang, dass dieser von Thrombozyten stammende Gerinnungsfaktor V an der Angiogenese und Thrombingenerierung beteiligt ist [245]. Somit ließe sich erklären, warum in FV-depletiertem Plasma nach Stimulation mit Thrombin bzw. TF eine verzögerte, aber immerhin stattfindende Thrombinbildung detektiert wurde.

Erhöhte Plasmakonzentrationen an FXI stellen einen Risikofaktor für venöse Thrombosen dar [246], während Patienten mit FXI-Defizienz nach z. B. Operationen unter starken Blutungen leiden, sofern sie nicht therapiert werden [247]. Weiterhin ist

bei den FXI-defizienten Patienten das Risiko einer tiefen Beinvenenthrombose [248] oder eines Schlaganfalls [249] signifikant reduziert. FXI ist also von großer Bedeutung bei der Entstehung von Thrombosen. Die Publikation von Keularts et al. zeigte bereits die wichtige Rolle des Gerinnungsfaktors XI in der TF-induzierten Thrombingenerierung, wenn niedrige Konzentrationen TF eingesetzt wurden: In FXI-defizientem Plasma wurde, verglichen mit Kontrollplasma, eine reduzierte Thrombingenerierung gemessen [250]. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Um die Rolle von FXI in der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung zu analysieren, wurden gewaschene Thrombozyten in FXI-depletiertem Plasma resuspendiert und mit Hilfe der CAT untersucht. Hier scheint FXI sogar noch eine größere Rolle zu spielen, da „lag time“, „etp“ und „thrombin peak“ signifikant verlängert bzw. reduziert waren. Die normale Thrombinbildung wurde durch die Zugabe von humanem FXI wiederhergestellt und bestätigte somit die Aussage von Wielders et al., dass FXI für die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung und deren positive Rückkopplung essenziell ist [251]. Weiterhin zeigten Zilberman-Rudenko et al., dass der FXI-Rückkopplungsmechanismus signifikant an der Thrombozytenaktivierung und Mikroaggregatbildung, die zwei wichtige Prozesse bei der Thrombusbildung darstellen, unter Flussbedingungen *in vivo* und *ex vivo* beteiligt ist [218].

Dass die FXI-abhängige Thrombingenerierung nicht durch FXII beeinflusst wird, wurde 2009 von Kravtsov et al. publiziert [252]. FXII ist der initierende Faktor der „Kontaktaktivierung“ und wird *in vitro* durch den Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen (z. B. Glas) und *in vivo* durch z. B. Polyphosphate [253], Glucosaminoglykane [254] oder bakterielle Oberflächenproteine [255] aktiviert. Gailani & Renné und Müller & Renné konnten zudem im Mausmodell zeigen, dass eine FXII-Defizienz vor arterieller Thrombusbildung schützen kann, jedoch die Hämostase nicht beeinflusst [256], [257].

Um die Rolle von FXII in der TF- sowie Thrombin-induzierten Thrombinbildung zu bestätigen, wurden gewaschene Thrombozyten mit FXII-depletiertem Plasma resuspendiert. Die TF-induzierte Thrombinbildung verzögerte sich signifikant, jedoch scheint FXII hier lediglich die Funktion eines Katalysators zu haben, da das „etp“ und der „thrombin peak“ nicht beeinflusst wurden. In Bezug auf die Thrombin-induzierte Thrombinbildung konnte die oben genannte Arbeit von Kravtsov et al. [252]

bestätigt werden, da weder „lag time“ noch „etp“ und „thrombin peak“ in FXII-depletiertem Plasma im Vergleich zu normalem Plasma verändert waren. Die Ergebnisse legen daher nahe, dass die FXI-getriebene Thrombingenerierung nach Thrombinexposition eher nicht auf die Kontaktaktivierung durch FXII zurückzuführen ist.

Prostazyklin ist ein bekannter Thrombozytenaggregationshemmer [258], [259]. Es bindet an einen $G\alpha_s$ -Protein-gekoppelten Rezeptor [260] und aktiviert so die Adenylatzyklase, welche die vermehrte Bildung des inhibitorisch wirkenden cAMPs aus ATP katalysiert. Der Anstieg von cAMP führt durch Phosphorylierung von regulierenden und „signalisierenden“ Substraten zur Hemmung der Thrombozytenaktivierung, die durch fehlende Aggregation sowie Granula- und Ca^{2+} -Sekretion gekennzeichnet ist [261].

Um aufzuzeigen, inwiefern die Thrombozytenaktivität die Thrombin-stimulierte Thrombingenerierung beeinflusst, wurde PRP mit dem Prostazyklin-Analagon Iloprost inkubiert. Die erhobenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Thrombin- als auch die TF-stimulierte Thrombingenerierung durch Iloprost maßgeblich gehemmt wurde. Das „etp“ und der „thrombin peak“ wurden im Vergleich zu unbehandeltem PRP durch die Inkubation mit Iloprost signifikant reduziert, womit bestätigt werden konnte, dass die Thrombin- als auch TF-stimulierte Thrombingenerierung von der Thrombozytenaktivität abhängig ist. Da die Thrombingenerierung jedoch nicht vollständig reduziert wurde, war die verwendete Iloprost-Konzentration eventuell zu niedrig. Möglich ist ebenso, dass die Thrombozyten über alternative Signalwege aktiviert werden können, die nicht durch Iloprost beeinflusst werden oder dass Thrombin zum Teil auch unabhängig von der Thrombozytenaktivierung generiert werden kann. In der Arbeitsgruppe von PD Dr. Kerstin Jurk konnte z. B. mit Hilfe der CAT gezeigt werden, dass auch Fibrin-beschichtete Polystyrol-Latexkügelchen die Thrombinbildung vermitteln können [262].

Zusammenfassend spiegelt die *in vitro* CAT-Methode die thrombozytären Gerinnungsprozesse *in vivo*, ausgelöst durch TF und amplifiziert durch Thrombin, sehr gut wider. Die Sensitivität ist bezüglich des FXI-abhängigen, positiven Rückkopplungssystems insbesondere durch den Trigger Thrombin im Vergleich zum Trigger TF mit 1 pM gegeben.

5.2. CD36 amplifiziert die FXI-abhängige Thrombinbildung auf humanen Thrombozyten

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von humanen CD36-defizienten Thrombozyten sowie CD36-blockierenden Antikörpern CD36 als wichtiger Rezeptor für die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung auf humanen Thrombozyten identifiziert. Dabei war die CD36-sensitive Thrombingenerierung abhängig von FXI, Fibrin und GPIIb α -vermittelten Signalwegen. Zudem konnte gezeigt werden, dass CD36 die Bindung der Gerinnungsprofaktoren V und VIII sowie die Bindung der Gerinnungsfaktoren IX und X unabhängig von der Oberflächenexposition negativ-geladener Phospholipide (wie z. B. Phosphatidylserine) an Thrombin-aktivierte Thrombozyten vermittelt. Als Bindeglied wurde erstmals Fibrin identifiziert, das sowohl von CD36 gebunden wird als auch Thiol-abhängig die Gerinnungsfaktoren V, VIII und IX bindet.

Der Thrombozytenrezeptor CD36 gehört zu der Familie der „Klasse B-scavenger“-Rezeptoren und fungiert unter anderem als Zelladhäsionsmolekül und Signalüberträger [105]. Bekannte Liganden sind das Glykoprotein TSP-1 [111], sogenannte DAMPs wie oxLDL [107], [108], Phospholipide [109], Mikropartikel und MRP-14 [110]. Kuijpers et al. konnten zeigen, dass die CD36-vermittelte Bindung von TSP-1 an Thrombozyten an der Kollagen-abhängigen Thrombusbildung und -stabilisierung *in vitro* und *in vivo* beteiligt ist [37]. Weiterhin wurde publiziert, dass CD36 eine Rolle bei der Entstehung eines hyperreaktiven Thrombozytenphänotyps spielt [263] und mit prothrombotischen und proatherogenen Effekten in Verbindung gebracht wird [121].

Daher wurde untersucht, inwiefern CD36 eine Rolle in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung spielt. In Kooperation mit Prof. Dr. XXX (Medizinische Universität XXX, XXX) wurde PRP von einem Spender mit CD36-Defizienz Typ II mit Hilfe der CAT analysiert. Während die Typ I Defizienz durch die fehlende Expression des CD36-Rezeptors auf Thrombozyten und Monozyten charakterisiert ist, zeichnet sich die Typ II Defizienz durch die fehlende Expression des CD36-Rezeptors ausschließlich auf Thrombozyten aus [114]. Der „thrombin peak“ sowie das „etp“ waren 50 bis 60 % signifikant reduziert, wenn der Trigger Thrombin eingesetzt wurde. Wurde TF als Trigger verwendet, wurde kein signifikanter Einfluss auf das

„etp“ beobachtet, was erklären könnte, warum von einer CD36-Defizienz Betroffene keinen auffälligen Blutungsphänotyp zeigen. CD36 ist also maßgeblich an der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung beteiligt, während die TF-induzierte Thrombinbildung nicht so stark von CD36 abhängt.

Dass die Thrombingenerierung tatsächlich durch das Fehlen von CD36 beeinflusst wurde, konnte durch die Inkubation von Kontroll-PRP und Citrat-Vollblut mit dem blockierenden anti-CD36 Antikörper FA6.152 (Epitop 155-183) [264] bestätigt werden. Dieser Antikörper blockiert unter anderem die Bindung von TSP-1 und oxLDL an den CD36-Rezeptor [265], [266], [267]. Da andere blockierende anti-CD36 Antikörper wie Klon CLB-IVC7, der die Bindung zwischen CD36 und oxLDL blockiert [268] und anti-CD36 Antikörper 185-1G2, der die Bindung zwischen CD36 und oxLDL [269] sowie die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation inhibiert [270], keinen Einfluss auf die Thrombingenerierung in Thrombin-induzierter Thrombingenerierung zeigten, sind diese Effekte eher durch Epitopspezifität der anti-CD36 Antikörper zu erklären. Eine Fcγ-Rezeptor IIa-(CD32a)-vermittelte Reaktion, ausgelöst durch kreuzvernetzte IgG-Komplexe [271], wurde bei der Untersuchung von funktionell-blockierenden IgG-Antikörpern vermieden, indem das PRP mit dem anti-CD32a Antikörper IV.3 vorinkubiert wurde, um die Fcγ-Rezeptoren IIa zu blockieren. Um zu gewährleisten, dass die oben beschriebenen Effekte durch die jeweils eingesetzten Antikörper und nicht durch die Fcγ-Rezeptor IIa-Blockierung selbst erfolgten, wurde PRP mit dem anti-CD32a Antikörper IV.3 allein inkubiert und mit Hilfe der CAT analysiert. Die alleinige Inkubation mit dem anti-CD32a Antikörper Klon IV.3 zeigte weder einen Effekt auf die TF- noch Thrombin-induzierte Thrombingenerierung, so dass hieraus geschlossen werden kann, dass die CD36-vermittelnden Effekte auf die *in vitro*-Thrombingenerierung unabhängig vom Fcγ-Rezeptor IIa sind.

Da eine Beteiligung von CD36 an der Thrombingenerierung gezeigt wurde, wäre es möglich, dass diese mit der Anzahl der CD36-Rezeptoren korreliert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden die CD36-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche verschiedener Probanden absolut quantifiziert und in Relation zu dem Thrombin-induzierten endogenen Thrombinpotenzial („etp“) gesetzt. Es zeigte sich mit Hilfe der Pearson-Korrelation, dass die Thrombin-induzierte, CD36-sensitive Thrombingenerierung auf humanen Thrombozyten eher nicht von der Anzahl der CD36-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche abhängt. Jedoch ergab sich

eine signifikante positive Korrelation zwischen der Anzahl an CD36-Rezeptoren und der durch den anti-CD36 Antikörper FA6.152 inhibierten Thrombingenerierung. Diese Ergebnisse weisen auf eine differenzierte Hemmbarkeit der Thrombinbildung auf der Thrombozytenoberfläche durch die Inhibition von CD36 hin, die von der Anzahl der CD36-Rezeptoren abhängig zu sein scheint. Somit können eher „high CD36-responder“ (Spender:innen, bei denen die Thrombingenerierung durch den anti-CD36 Antikörper FA6.152 stark gehemmt wurde) und eher „low CD36-responder“ (Spender:innen, bei denen die Thrombingenerierung durch den anti-CD36 Antikörper FA6.152 wenig gehemmt wurde) definiert werden. Die Menge an gebildetem Thrombin scheint jedoch unabhängig von den thrombozytären CD36-Kopien zu sein, was mit dem Einfluss von sogenannten Einzelnukleotidpolymorphismen (engl.: „single nucleotide polymorphisms“, SNPs) erklärbar sein könnte. 2011 konnte die Gruppe um Love-Gregory zeigen, dass bestimmte Lipid-assoziierte CD36-SNPs die Expression von CD36 auf Monozyten sowie Thrombozyten reduzieren und somit zu einem protektiven atherogenen Profil beitragen, da weniger Cholesterin von CD36 gebunden wurde [272]. Auch Ghosh et al. brachten die CD36-Expression mit einer veränderten Thrombozytenreaktivität auf oxLDL in Verbindung und stellten die Hypothese auf, dass mit der CD36-Expressionsrate-assoziierte SNPs das thrombotische Risiko vorhersagen könnten [273]. Madan et al. konnten 2019 erstmals eine genomische Region identifizieren, die die CD36-Expression reguliert und somit die Thrombozytenfunktion beeinflusst [274].

Thrombozyten exprimieren das Glykoprotein Iba (GPIba), das mit GPV und GPIX den GPIb-V-IX-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche bildet. GPIba enthält Bindungsstellen für Liganden wie z. B. Thrombin, FXII, FXI, vWF, P-Selektin, β_2 -Integrine sowie TSP-1 [80], [81]. Dörmann et al. zeigten 2000, dass GPIba essenziell für die Thrombin-induzierte Thrombozytenaktivität ist [275]. Die Arbeitsgruppe von PD Dr. Kerstin Jurk bestätigte diese Ergebnisse und zeigte zusätzlich, dass die Thrombin-induzierte GPIba-vermittelte Thrombozytenaktivierung in Abhängigkeit der Syk Kinase erfolgte [28]. Auch das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist an der Thrombozytenaktivierung beteiligt. Hemker et al. sowie van Meijden et al. beschrieben, dass $\alpha_{IIb}\beta_3$ Syk Kinase-abhängig in die TF-induzierte Thrombingenerierung involviert ist [27], [276].

Um zu untersuchen, ob die Thrombozytenaktivität auch in der CD36-sensitiven Thrombin-induzierten Thrombingenerierung eine Rolle spielt, wurden die Rezeptor-medierten Signalwege untersucht.

Im PRP eines Bernard-Soulier-Syndrom Betroffenen mit $< 1\%$ GPIIb/IIIa-Expression auf der Thrombozytenoberfläche und Kontroll-PRP, inkubiert mit dem GPIIb/IIIa-blockierenden Antikörper SZ2, wurde ein signifikant reduzierter „thrombin peak“ detektiert. Der anti-GPIIb/IIIa Antikörper SZ2 blockiert bekanntermaßen die Bindung von vWF, Thrombin, TSP-1 und FXI an GPIIb/IIIa. Die simultane Blockierung des CD36-Rezeptors durch den anti-CD36 Antikörper FA6.152 resultierte in keiner additiven Inhibition auf die Thrombingenerierung im PRP eines BSS Patienten bzw. Kontroll-PRP, inkubiert mit dem anti-GPIIb/IIIa Antikörper SZ2, wenn beide Antikörper allein eine submaximale Inhibition zeigten. Dies indiziert eine direkte Interaktion von GPIIb/IIIa mit CD36 in der Thrombin-induzierten FXI-abhängigen Thrombingenerierung.

Weiterhin wurde gezeigt, dass das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und die Syk Kinase ebenfalls an der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung beteiligt sind. Die Inhibition von $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch Tirofiban resultierte, wie die Inhibition der Syk Kinase durch den Syk Kinase-Inhibitor IV, in einer signifikant reduzierten Thrombinbildung. Tirofiban ist ein $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Rezeptorantagonist, der die Bindung von löslichem Fibrinogen an das aktivierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ kompetitiv reversibel hemmt [277], [278] und so das „outside-in-signaling“ verhindert. Wurde eine suboptimale CD36-Inhibition der Inhibitoren Tirofiban oder Syk Kinase-Inhibitor IV kombiniert, konnten additive inhibitorische Effekte auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung gemessen werden. Die Signalwege von $\alpha_{IIb}\beta_3$ und Syk Kinase sind also zumindest teilweise in die CD36-abhängige, Thrombin-induzierte Thrombinbildung involviert.

Vanschoonbeek et al. beschrieben in ihrer Publikation, dass die Sekretion von ADP aus thrombozytären δ -Granula die Thrombozyten-abhängige „Tissue Factor“-induzierte Thrombingenerierung im PRP unterstützt [279]. Sezernierte Inhaltsstoffe aus den δ -Granula der Thrombozyten stellen also wichtige Verstärkungsagonisten der Thrombozyten dar.

Um die Rolle der δ -Granula-Sekretion im Hinblick auf die Thrombin-induzierte CD36-abhängige Thrombinbildung zu untersuchen, wurde PRP eines Patienten mit

„ δ -storage pool disease“, bei dem die thrombozytären δ -Granula massiv reduziert sind [280], mit Hilfe der CAT analysiert. Es wurde eine verminderte Thrombin-induzierte Thrombingenerierung im PRP des „ δ -storage pool disease“ Betroffenen im Vergleich zu der Thrombingenerierung in Kontroll-PRP beobachtet. Da auch die Inkubation von Kontroll-PRP mit dem P2Y₁₂ ADP Rezeptor Antagonist AR-C69931 zu einer Abnahme der Thrombin-induzierten Thrombinbildung führte und die kombinierte Inhibition des CD36- und ADP-Rezeptors in Patienten- sowie in Kontroll-PRP zu einer weiteren Reduktion der Thrombingenerierung führte, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass speziell der Rückkopplungs-Agonist ADP teilweise an der CD36-abhängigen Thrombin-induzierten Thrombingenerierung beteiligt, aber nicht essenziell ist.

Aufgrund der oben beschriebenen Beteiligung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, Syk Kinase und dem Rückkopplungs-Agonist ADP an der CD36-abhängigen Thrombin-induzierten Thrombingenerierung, wurde untersucht, ob der Rezeptor CD36 in die Thrombozytenaktivierung involviert ist. Zudem publizierte die Gruppe um Nergiz-Unal 2011, dass $\alpha_{IIb}\beta_3$ und ADP zum Teil an der CD36-abhängigen Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes TSP-1 beteiligt sind. Zusätzlich konnte die Gruppe in Gegenwart des anti-CD36 Antikörpers FA6.152 eine verminderte $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung und P-Selektin-Oberflächenexpression auf Thrombozyten, die an TSP-1 adhärten, beobachten [281].

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Inhibition von CD36 durch den anti-CD36 Antikörper FA6.152 bzw. die CD36-Defizienz Typ II in einer signifikant verminderten $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung und Granulasekretion (P-Selektin-Oberflächenexpression und CD63 Expression) sowie einer signifikant verminderten Bindung der Adhäsionsproteine Fibrinogen, vWF und TSP-1 resultierte. Auch Silverstein et al. beschrieben TSP-1 als wichtigen Liganden von CD36 [282]. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Blockierung der Interaktion zwischen TSP-1 und CD36 durch den anti-TSP-1 Antikörper A4.1 [283] oder durch das TSP-1-Peptid CSVTCG [284] bzw. das CD36-Peptid CD36 P(93-110) [285] keinen Einfluss auf die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung in PRP hatte. Die Bindung von löslichem TSP-1 an CD36 scheint also, basierend auf den hier gezeigten Ergebnissen, nicht ausschlaggebend für die Thrombin-induzierte Thrombingenerierung zu sein. Frühere Studien zeigten jedoch, dass lösliches Fibrin

ein Ligand von vWF [286] sowie TSP-1 [287] ist und vWF direkt mit TSP-1 [140] interagieren kann. Es wurden daher GPIIb/IIIa-gebundener vWF und GPIIb/IIIa-gebundenes TSP-1 [15] als Bindeglied zwischen Fibrin und CD36 in der CD36-abhängigen Thrombingenerierung vermutet.

Die Aktivierung von Thrombozyten geht mit der Veränderung der Thrombozytenmembran einher. Unter anderem bewegen sich dabei anionische Phospholipide, wie z. B. Phosphatidylserine, vom Thrombozyteninneren zum -äußeren (sogenannter „Flip-Flop“) und bilden eine prokoagulatorische negativ geladene Oberfläche, an die die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X binden können [1], [288]. Rosing et al. [289], [290] sowie Thiagarajan & Tait [291] vermuteten eine essenzielle Rolle der PS-Präsentation bei der Bindung von Gerinnungsfaktoren (speziell des Tenase- und Prothrombinasekomplexes) an die Thrombozytenoberfläche.

Um die Beteiligung der PS-Präsentation bei der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung mit Hilfe der CAT zu untersuchen, wurden diese Bindungsstellen mit rekombinantem Annexin V blockiert, welches als kompetitiver Inhibitor agiert und somit die Bindung der genannten Gerinnungsfaktoren an negativ geladene PS verhindert. Erwartungsgemäß verminderte sich der „thrombin peak“ signifikant in Annexin V-behandeltem PRP im Vergleich zu Kontroll-PRP. Die gleichzeitige Inhibition des CD36-Rezeptors resultierte in einer additiven Abnahme und lässt schlussfolgern, dass die CD36-abhängige Thrombin-induzierte Thrombinbildung nicht ausschließlich von der PS-Präsentation abhängig ist. Interessanterweise hatte die CD36-Inhibition bzw. die CD36-Defizienz Typ II keinen Einfluss auf die PS-Präsentation auf Thrombozyten, jedoch konnte eine verminderte Bindung der Gerinnungsfaktoren V, VIII, IX und X an CD36-blockierte bzw. CD36-defiziente Thrombozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie detektiert werden. Diese Ergebnisse unterstützen die bereits publizierten Ergebnisse von Thiagarajan & Tait, dass die PS-Präsentation wichtig für die Bindung der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren ist [291], zeigt jedoch auch, dass CD36 die Bindung der Gerinnungsfaktoren des intrinsischen Tenase- sowie Prothrombinasekomplexes an Thrombin-stimulierte Thrombozyten auf eine PS-unabhängige Art moduliert. Experimente in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Kerstin Jurk bestätigten mit Hilfe von Lactadherin FITC-markierten Thrombozyten die bereits publizierte Studie von Heemskerk et al. [292], dass Thrombin allein nur einen Bruchteil der PS-Präsentation auf der Thrombozytenoberfläche induziert:

Etwa 15 % aller in der Durchflusszytometrie eingesetzten Thrombin-stimulierten Thrombozyten wurden als Lactadherin FITC-positiv detektiert [262]. Lactadherin bindet ebenso wie Annexin V an negativ geladene PS. Die Thrombingenerierung ist also besonders CD36-sensitiv, wenn die PS-Präsentation nur teilweise, wie z. B. durch Thrombin, stimuliert wird.

Hemker et al. publizierten 2006, dass Fibrinogen/Fibrin eine wichtige Rolle in der TF-induzierten Thrombingenerierung und Thrombozytenaktivierung spielt [276]. Passend zu den vorliegenden Beobachtungen konnten Mammadova-Bach et al. Fibrin als einen Liganden von GPVI, der die TF-induzierte Thrombingenerierung amplifiziert, identifizieren [20] und die Gruppe um Gilbert et al. zeigte, dass die Bindung des Gerinnungsfaktors VIII durch Fibrin vermittelt wird [83].

Aufgrund dieser Forschungsergebnisse wurde die Rolle von Fibrinogen/Fibrin in der CD36-abhängigen Thrombin-induzierten Thrombingenerierung analysiert. Dazu wurden gewaschene Thrombozyten in Kontroll- oder defibriniertem Plasma in An- oder Abwesenheit von anti-CD36 Antikörper FA6.152 bzw. Fibrinogen inkubiert. Die Daten dieser Arbeit bestätigen, dass Fibrinogen/Fibrin auch in der Thrombin-induzierten Thrombingenerierung eine zentrale Funktion übernimmt, da in defibriniertem Plasma nahezu keine (signifikant reduziertes „etp“ und reduzierter „thrombin peak“), in defibriniertem Plasma, supplementiert mit humanem hochreinem Fibrinogen, jedoch eine normale Thrombinbildung beobachtet werden konnte. In Gegenwart von anti-CD36 Antikörper FA6.152 konnte kein additiver inhibitorischer Effekt gemessen werden, so dass von einer CD36-medierten Fibrinogen/Fibrin-abhängigen Thrombingenerierung ausgegangen werden kann. Ob es sich dabei um Fibrinogen oder Fibrin handelt, wurde mit Hilfe von Batroxobin analysiert. Das Schlangengift Batroxobin spaltet wie Thrombin Fibrinogen zu Fibrin. Während Thrombin Fibrinogen zu Fibrin umwandelt, indem es das Fibrinopeptid A und B abspaltet, spaltet Batroxobin nur das Fibrinopeptid A ab [293]. Dieses Schlangengift induzierte ebenso wie Thrombin die Thrombingenerierung auf Thrombozyten, welche in ähnlichem Umfang von anti-CD36 Antikörper FA6.152 inhibiert wurde. Es wird aus diesen Ergebnissen also ersichtlich, dass Fibrin die Thrombingenerierung stimuliert. Weiterhin wurde bei der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung nach Stimulation mit Thrombin keine essenzielle Rolle von polymerisiertem Fibrin beobachtet, da die Behandlung mit dem Peptid GPRP ohne Auswirkungen blieb. GPRP beinhaltet eine analoge N-

terminale Sequenz zu der α -Kette von Fibrin und kann so die Polymerisierung der Fibrin-Monomere kompetitiv blockieren [294]. Lösliches Fibrin scheint aufgrund der hier erhobenen Ergebnisse von größerer Bedeutung für die CD36-abhängige Thrombin-induzierte Thrombingenerierung zu sein als polymerisiertes Fibrin.

Leung et al. und Frieda et al. beschrieben TSP-1 in ihren Arbeiten als prominenten Liganden von CD36 [285], [295]. Daher wurden potenzielle Liganden von CD36 mit Hilfe von CD36-beschichteten Polystyrol-Latexkügelchen ermittelt. Es stellte sich dabei heraus, dass TSP-1 sowie vWF nach Thrombin-Stimulation an CD36 binden konnten, wobei TSP-1 im Vergleich zu vWF verstärkt band. Diese Ergebnisse bestätigten die Daten von Leung et al. und Frieda et al. Weiterhin wurde eine verstärkte Bindung von Batroxobin-behandeltem Fibrinogen nach Thrombin-Stimulation an die CD36-beschichteten Kügelchen beobachtet, die in Gegenwart von anti-CD36 Antikörper FA6.152 signifikant reduziert wurde. Zusätzlich wurde nur eine marginale Bindung von unbehandeltem Fibrinogen an die Kügelchen detektiert. Folgeuntersuchungen zeigten eine signifikant erhöhte Bindung von Fibrin, TSP-1 und vWF an CD36-beschichtete Kügelchen in GPRP-behandeltem Plasma nach Stimulation mit Thrombin im Vergleich zu unstimuliertem, GPRP-behandeltem Plasma. Bei gleichem Versuchsaufbau konnte in defibriniertem Plasma weder ohne noch mit Thrombin-Stimulation eine Bindung von Fibrin, TSP-1 und vWF an die CD36-beschichteten Kügelchen beobachtet werden. Diese Ergebnisse bestätigen speziell die nicht-polymerisierte Form von Fibrin als Liganden von CD36 und dass diese Interaktion durch den anti-CD36 Antikörper FA6.152 blockiert werden kann.

Übereinstimmend mit Gilbert et al. [83] wurde eine signifikant erhöhte Bindung des Gerinnungsfaktors VIII validiert. Zusätzlich konnte zum ersten Mal eine erhöhte Bindung der Gerinnungsfaktoren IX und V, jedoch nicht Faktor X, an CD36-beschichtete Kügelchen nach Stimulation mit Thrombin in Kontrollplasma beobachtet werden, während in defibriniertem Plasma kaum eine Bindung detektiert wurde. Ebenso konnte eine signifikant verstärkte Bindung der Gerinnungsfaktoren XI, VIII und V, jedoch nicht Faktor X, an Fibrin-beschichtete Kügelchen identifiziert werden. Diese Bindung wurde durch den Thiol-Blocker DTNB inhibiert [213]. Fibrin ist schlussfolgernd nicht nur für die Thiol-abhängige Bindung von Faktor VIII [83], sondern auch von FIX und FV verantwortlich.

Ob TSP-1 und vWF ebenso die Bindung von bestimmten Gerinnungsfaktoren medieren können, bleibt zu erforschen. Jurk et al. publizierten 2011, dass die Thiol-Isomerase die Rückkopplungsmechanismen der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung durch die Bindung von Gerinnungsfaktoren moduliert. Hier konnte gezeigt werden, wie die extrazelluläre Thiol-Protein-Disulfid-Isomerase diese Bindung an Thrombin-aktivierte Thrombozyten, die weitaus weniger Phosphatidylserine präsentieren als Kollagen- bzw. Kollagen- und Thrombin-aktivierte Thrombozyten, fördert [213].

Zusammenfassend zeigen die auf dieser Arbeit und auf Studien basierenden Daten, dass CD36 die FXIa-initiierte Thrombingenerierung amplifiziert, in die GPIIb α , Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ sowie die Signaltransduktion über die Syk Kinase involviert sind. Weiterhin wurde CD36 als Rezeptor für Fibrin, welches FV, FVIII und FIX in einer Thiol-abhängigen Weise bindet, identifiziert. Dieser Phosphatidylserin-unabhängige Mechanismus trägt zur CD36-abhängigen Thrombinbildung auf Thrombin-stimulierten Thrombozyten bei. CD36 funktioniert also als wichtiger Schalter für die Amplifikation der FXIa-getriebenen Thrombingenerierung auf humanen Thrombozyten und repräsentiert daher ein attraktives, antithrombotisches „Target“, um die Thrombozyten-basierte Hyperkoaguabilität zu hemmen. Podrez et al. zeigten, dass der hyperkoaguable Zustand von Thrombozyten auch durch die Bindung von thrombozytärem CD36 an oxLDL ausgelöst werden kann [121], während Berliner & Watson 2005 veröffentlichten, dass oxidierte Phospholipide auf verschiedene Art und Weise die Pathogenese von Atherosklerose initiieren und modulieren können [296]. Die Inhibition von CD36 könnte also z. B. bei der Entstehung chronisch-inflammatorischer wie auch thrombotisch-inflammatorischer Erkrankungen wie der Atherosklerose von Bedeutung sein.

5.3. Der direkte Thrombin-Inhibitor Dabigatran hemmt die durch Monozyten initialisierte und durch Thrombozyten amplifizierte Thrombinaktivität

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der CAT bestätigt, dass TF-exprimierende Monozyten in der Lage sind, über die extrinsische Gerinnungskaskade geringe Mengen an Thrombin zu generieren und die Thrombingenerierung

in PFP somit abhängig von der Monozytenkonzentration, jedoch Thrombozyten-unabhängig, erfolgen kann. Es wurde zudem gezeigt, dass Thrombozyten in Gegenwart von Monozyten weiterhin essenziell für eine Amplifikation der Thrombingenerierung sind und Dabigatran nicht nur effektiv die Thrombin-induzierte, sondern auch die Monozyten-induzierte Generierung von Thrombin vermindert, indem es den Thrombozyten- und Monozyten-Agonisten Thrombin direkt inhibiert.

Es ist bekannt, dass nicht nur Thrombozyten die Thrombingenerierung effektiv beeinflussen, sondern auch inflammatorische Zellen wie Monozyten in der Lage sind, geringe Mengen an Thrombin zu generieren: Im aktivierten Zustand exprimieren die Immunzellen TF auf ihrer Zelloberfläche, der im Komplex mit FVIIa zu einer initialen Thrombinbildung beiträgt [48], [297].

Dabigatran ist ein für die Prophylaxe von Schlaganfällen, systemischen Embolien und nicht-valvulärem Vorhofflimmern bei erwachsenen Patienten zugelassenes Medikament, das die Thrombinaktivität durch die direkte Bindung an Thrombin wirksam kompetitiv und reversibel hemmt [100], [101], [102]. Diese Inhibition hat eine reduzierte Gerinnungsfaktoraktivierung, Thrombozytenaggregation und Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin zur Folge und wirkt somit der Thrombusbildung entgegen.

Um zu untersuchen, inwiefern das von Monozyten generierte Thrombin einen Einfluss auf die Thrombingenerierung hat und ob die Aktivität des Monozyten-generierten Thrombins durch Dabigatran vermindert werden kann, wurden Monozyten aus humanen „Buffy Coats“ (hier: Mit Leukozyten angereichertes Blut) isoliert und über Nacht kultiviert, was zu einem proinflammatorischen Phänotyp und damit einer Voraktivierung führte. Marker für die Aktivierung der Monozyten sind eine erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle $\alpha_m\beta_2$ (CD11b/CD18) [298], ICAM-1 [299], [300], VCAM-1 [300] sowie des Glykoproteins TSP-1, von dem Jaffe et al. und Mosher et al. zeigen konnten, dass es zwar primär von aktivierten Thrombozyten, aber auch von aktivierten Monozyten und Endothelzellen synthetisiert und sezerniert wird [125], [126]. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte der aktivierte Phänotyp der über Nacht kultivierten Monozyten bestätigt werden: Im Vergleich zu frisch isolierten Monozyten war die Expression der Adhäsionsmoleküle CD11b, ICAM-1, VCAM-1 und TSP-1 signifikant erhöht.

In Abwesenheit von Monozyten wurde in der CAT erwartungsgemäß keine Thrombingenerierung im PFP detektiert, da Oberflächen mit negativ-geladenen Phospholipiden fehlten. Mit steigender Monozyten-Konzentration wurde jedoch eine dosisabhängige Zunahme des „etps“ und „thrombin peaks“ gemessen und somit bestätigt, dass Monozyten die Thrombinbildung initiieren können. Je höher die Konzentration an Monozyten war, desto mehr Thrombin wurde initial gebildet und detektiert. Auch im PRP wurde mit steigender Monozyten-Konzentration eine dosisabhängige Zunahme des „etps“ und „thrombin peaks“ beobachtet. Da die Thrombinbildung in Gegenwart von Monozyten im PRP höher war als im PFP, steuerten die Thrombozyten signifikant zur Monozyten-induzierten Thrombingenerierung bei. Dies kann zum einen mit der Bereitstellung einer prokoagulatorischen Oberfläche durch die Thrombin-aktivierten Thrombozyten und zum anderen mit der Aktivierung der Faktoren V, VIII, IX und XI erklärt werden: Laut Monroe und Hoffman ist der Thrombozyt die einzige Zelle, auf dessen Oberfläche eine effiziente Thrombinamplifikation stattfinden kann [48].

Weiterhin wurde Dabigatran als wirksamer, direkter Thrombin-Inhibitor bestätigt, da sich die „lag time“ im PFP sowie PRP mit steigenden Konzentrationen von Dabigatran verlängerte. Im Vergleich zu den Vehikelkontrollen wurde die Thrombinbildung im Dabigatran-behandeltem PRP und PFP erst ca. fünf Minuten später detektiert. Dies lässt auf eine verlangsamte Initiationsphase der sekundären Hämostase schließen. Da Dabigatran die Thrombinaktivität kompetitiv und reversibel hemmt, nicht aber die Thrombinbildung selbst, konnten verspätet „etp“ und „thrombin peak“ detektiert werden, die jedoch signifikant vermindert waren. Im Vergleich zum PFP erzielten gleiche Konzentrationen von Dabigatran im PRP eine scheinbar höhere Wirksamkeit (im Schnitt um etwa 21 %), woraus ersichtlich wird, dass Thrombin-aktivierte Thrombozyten entscheidend an der Thrombingenerierung sowie der Kontrolle der Gerinnung beteiligt sind. Thrombin kann auch antikoagulatorisch wirken, indem es Protein C aktiviert, das zusammen mit seinem Kofaktor Protein S einen Komplex bildet und FVa und FVIIIa durch proteolytische Spaltung inaktiviert [89]. Weiterhin fördert Protein Z die Bindung von Thrombin an die prokoagulatorische Thrombozytenoberfläche und hemmt unter Beteiligung eines Protease-Inhibitors die FXa-Aktivität [301], [302]. Die antikoagulatorische Wirkung durch nicht-inhibiertes Thrombin könnte also zu einer zusätzlichen Verminderung der Thrombinbildung geführt haben.

Basierend auf diesen Ergebnissen ist Dabigatran ein effektiver Inhibitor der Thrombin-vermittelten Thrombozytenaktivierung und verringert so wirksam die Thrombin-amplifikation auf Thrombin-stimulierten Thrombozyten.

Thrombin spielt nicht nur in der Blutgerinnung eine wichtige Rolle. In der Atherogenese kann es Endothelzellen aktivieren und so zur Expression von Adhäsionsmolekülen wie z. B. ICAM-1, VCAM-1 [93] und E-Selektin sowie der Sekretion von P-Selektin, IL-1 und IL-8 beisteuern [94]. Weiterhin können Monozyten entlang eines Thrombin-Gradienten zur Entzündungsstelle wandern [95]. Diese endotheliale Rekrutierung von Monozyten an die Gefäßwand und in das zelluläre Gewebe stellt einen wichtigen Schritt bei der Entstehung von thrombotisch-entzündlichen Erkrankungen wie der Atherosklerose dar [166]. Deshalb wurde untersucht, inwiefern die Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten an/auf/durch eine/r humane/n Endothelzellschicht durch Dabigatran beeinflusst wird.

5.4. Der direkte Thrombin-Inhibitor Dabigatran hemmt die endotheliale Rekrutierung und Transmigration humaner Monozyten unter Flussbedingungen *in vitro*

Im vierten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Flusskammer-Methode bestätigt, dass Thrombin eine wichtige Rolle bei der Adhäsion, Migration und Transmigration humaner Monozyten an/auf/durch eine/r Endothelzellschicht unter Flussbedingungen spielt und gezeigt, dass diese endotheliale Rekrutierung durch Dabigatran reduziert werden kann.

Dabigatran kann präventiv eingesetzt werden, um eine übermäßige Thrombingenerierung oder Gerinnsel durch Thrombin-aktivierte Thrombozyten zu verhindern. Gerade bei Thrombin-induzierten entzündlichen Prozessen ist dies von hoher Bedeutung, da Monozyten aufgrund ihrer Fähigkeit, über den auf ihrer Zelloberfläche-exprimierten TF geringe Mengen Thrombin zu bilden, maßgeblich an der Entstehung von atherosklerotischen Läsionen beteiligt sind. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass der Einsatz von Dabigatran die Entstehung atherosklerotischer Läsionen vermindert [303], [304].

Daher wurde die Adhäsion, Migration und Transmigration von Monozyten an/auf/durch eine/r TNF- α -stimulierte/n bzw. unstimulierte/n Endothelzellschicht in An- und Abwesenheit von Dabigatran untersucht.

Aus humanen „Buffy Coats“ isolierte Monozyten wurden über Nacht in Gegenwart von Serum kultiviert, was zu einem proinflammatorischen Phänotyp und Voraktivierung führte. Um eine Thrombingenerierung durch die aktivierten Monozyten zu induzieren, wurden diese in PFP resuspendiert. Der monozytäre TF kann an den im PFP enthaltenen FVII binden und über den TF-VIIa-Xa Komplex die Bildung von geringen Mengen Thrombin initiieren. Außerdem wurden die Endothelzellen mit TNF- α stimuliert (die Kontrollzellen blieben unstimuliert), um einen proinflammatorischen Zustand herzustellen, der bei der Pathogenese der Atherosklerose wichtig ist. TNF- α fungiert hierbei als potenter Aktivator des Endothels, indem es z. B. die Expression von E-Selektin und die Sekretion von P-Selektin [305] sowie die Expression von ICAM-1 [306] und VCAM-1 [307] und Sekretion von Zytokinen sowie Chemokinen stimuliert [308], [309].

Unter Verwendung des sogenannten Flusskammersystems wurde beobachtet, dass humane Monozyten in Gegenwart von TNF- α -stimulierten im Vergleich zu nicht-stimulierten Endothelzellen tendenziell verstärkt adhärten und signifikant verstärkt migrierten und transmigrierten. Es ist bekannt, dass aktivierte Monozyten auf ihrer Oberfläche TSP-1 präsentieren, welches die Bindung an Endothelzellen unterstützt [141]. Die verstärkte Bindung von TSP-1 an über-Nacht-kultivierten Monozyten wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestätigt (Abbildung 51 D). Möglicherweise wurde daher eine erhöhte Adhäsion beobachtet, die unabhängig von der TNF- α -Stimulation, jedoch abhängig von TSP-1 stattfand. Die verstärkte Migration und Transmigration nach TNF- α -Stimulation bestätigt die Beobachtungen von Wen et al., die bereits 1989 zeigten, dass humane vaskuläre Endothelzellen nach TNF- α -Stimulation das Chemokin CXCL1 sezernieren [310]. Lo et al. bestätigten diese Beobachtungen 2014 und ergänzten, dass CXCL1 zu einer erhöhten Migration von Monozyten auf Endothelzellen führt [308]. Auch von MCP-1 ist bekannt, dass es nach TNF- α -Stimulation von Endothelzellen sezerniert wird [311] und an der monozytären Infiltration arterieller Gefäßwände beteiligt ist [312] sowie wesentlich zu dem sogenannten Rollen von Monozyten auf Endothelzellen und anschließender Transmigration beiträgt [178]. Die Stimulation der Endothelzellen mit TNF- α bewirkt

also bekanntermaßen eine signifikant verstärkte Migration und Transmigration sowie tendenziell erhöhte Adhäsion von Monozyten an/auf/durch eine/r Endothelzellschicht.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion, Migration und Transmigration von humanen Monozyten an/auf/durch eine/r TNF- α -un/stimulierte/n Endothelzellschicht durch den direkten Thrombin-Inhibitor Dabigatran vermindert wurde. Ohne vorherige TNF- α -Stimulation wurde die Adhäsion um ca. 70 % und die Migration und Transmigration um ca. 50 % durch die Dabigatran-Behandlung reduziert, während nach einer vorherigen TNF- α -Stimulation die Adhäsion und Transmigration um etwa 45 % und die Migration um etwa 70 % signifikant verringert wurde. Aufgrund der geringen Fallzahl konnte bei der fehlenden TNF- α -Stimulation keine Signifikanz errechnet werden.

Kaplanski et al. zeigten 1997, dass Thrombin die IL-8 Sekretion und E-Selektin-Expression auf Endothelzellen unabhängig von TNF- α induziert und diese durch den Thrombin-Inhibitor Hirudin (ein antikoagulatorisches Polypeptid aus dem Speichel von Blutegeln) vermindert wurde [94]. Das Chemokin IL-8 (CXCL8) rekrutiert mit Hilfe eines Chemokin-Gradienten Leukozyten zum Entzündungsherd und wirkt außerdem proangiogenetisch auf Endothelzellen [313], während E-Selektin zu der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen beiträgt [314], [315]. Außerdem beschrieben Kaplanski et al., dass die Stimulation von Endothelzellen mit Thrombin zur Expression von ICAM-1 und VCAM-1 führte [93], die eine wichtige Rolle bei der Adhäsion, Migration und Transmigration von Leukozyten an/auf/durch eine/r Endothelzellschicht spielen. Allerdings wurden diese Experimente über einen längeren Zeitraum (Inkubation über mehrere Stunden) durchgeführt, während die Flusskammerexperimente im Schnitt nur 45 bis 60 Minuten andauerten. Es ist daher wahrscheinlicher, dass Thrombin hier eher zu einer schnellen Sekretion und Aktivierung von endothelialen Adhäsionsmolekülen als zur Synthese neuer Proteine geführt hat. Prescott et al. zeigten z. B., dass polymorphonukleäre Leukozyten verstärkt an Thrombin-stimulierte Endothelzellen banden und die stimulierten Endothelzellen den Thrombozyten-aktivierenden Faktor („platelet activating factor“; PAF) herstellten [316]. Die gleiche Arbeitsgruppe definierte den PAF als mögliche Adhäsionsachse zwischen Leukozyten und Endothelzellen nach Thrombin-Stimulation [317].

Weiterhin stimuliert Thrombin auch die endotheliale Sekretion von vWF, an den die Monozyten über TSP-1 binden können.

Thrombin ist also an der Adhäsion, Migration und Transmigration von aktivierten Monozyten an/auf/durch eine/r TNF- α -un/stimulierte/n Endothelzellschicht beteiligt. Die durch Dabigatran inhibierte Thrombinaktivität trägt nicht nur zur reduzierten Rekrutierung von inflammatorischen Zellen an entzündetes endotheliales Gewebe, sondern auch zu verminderter Endothelzellaktivierung und damit einhergehender verminderter Sekretion und Expression von chemotaktischen Proteinen bzw. Adhäsionsmolekülen bei. Borissoff et al. sowie Preusch et al. konnten bereits im Mausmodell zeigen, dass Dabigatran die endotheliale Funktion antiinflammatorisch beeinflusst und die Entstehung atherosklerotischer Plaque reduziert [303], [304].

Dabigatran könnte daher ein guter Ansatzpunkt in der medikamentösen Behandlung von entzündlichen atherosklerotischen Erkrankungen sein. Es wird bereits bei nicht-valvulärem Vorhofflimmern zur Prophylaxe von Infarkten sowie nach Operationen eingesetzt und konnte auch bei intravitrealen Erkrankungen [318], Entzündungen des Fettgewebes [319] oder ischämischem Schlaganfall [320] eine positive Wirkung ausüben.

Die Adhäsion, Migration und Transmigration an/auf/durch eine/r TNF- α -un/stimulierte/n Endothelzellschicht wurde jedoch nicht vollständig durch den direkten Thrombin-Inhibitor Dabigatran inhibiert. Somit zeigen und bestätigen diese Ergebnisse, dass auch Thrombin-unabhängige Mechanismen zur endothelialen Rekrutierung und Transmigration von Monozyten beitragen. Für TSP-1 konnte bereits eine Beteiligung bei der Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen unter Verwendung des C-terminalen Peptids RFYVVMWK gezeigt werden [141]. Deshalb wurde im letzten Teil der Dissertation die Rolle von TSP-1 bei der Adhäsion, Migration und Transmigration an/auf/durch eine/r humane/n Endothelzellschicht mit Hilfe von TSP-1-defizienten Mausmakrophagen untersucht.

5.5. Thrombospondin-1 vermittelt die endotheliale Rekrutierung und Transmigration von murinen Makrophagen unter Flussbedingungen *in vitro*

Im fünften und letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde Thrombospondin-1 als ein wichtiges Protein bei der Transmigration von murinen Makrophagen durch eine humane Endothelzellschicht unter Flussbedingungen identifiziert.

Thrombospondin-1 ist ein multifunktionales, matrizelluläres Glykoprotein und wird von verschiedenen Zellen wie z. B. Thrombozyten [321], Monozyten [125], Endothelzellen [322] und glatten Muskelzellen [323] sezerniert. Die Funktion von Thrombospondin-1 ist aufgrund seiner Abhängigkeit von Konzentration und Lokalisation im Gewebe sowie Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren nicht einfach nachzuvollziehen [129]. Verschiedene Publikationen zeigten mit Hilfe von humanem aufgereinigtem TSP-1, dass TSP-1 *in vitro* an der Adhäsion, Proliferation und Migration glatter Muskelzellen beteiligt ist [324], [325], [326] sowie unter Verwendung von vaskulären glatten Muskelzellen aus TSP-1 Knockout-Mäusen, dass TSP-1 die Stickoxid-abhängige Signalübermittlung reguliert [327]. Weiterhin wurde publiziert, dass TSP-1 die Thrombusbildung *in vitro* und initiale Arteriosklerose in Mäusen stimuliert, indem es die antithrombotische Wirkung des Stickstoffmonoxid-Signalweges blockiert [136], [328]. Monozyten adhären in Abhängigkeit von TSP-1 an Endothelzellen [141] und Jurk et al. zeigten zudem, dass TSP-1-präsentierende Monozyten ruhende Thrombozyten *in vitro* und in Patienten mit karotischer Atherosklerose binden und somit zur Thrombozytenaktivität und einem prothrombotischen Potenzial in inflammatorischen Erkrankungen wie Atherosklerose beitragen können [142].

Daher wurde die Rolle von TSP-1 bei der Adhäsion, Migration und Transmigration von murinen Makrophagen an/auf/durch eine/r unstimulierte/n bzw. TNF- α -stimulierte/n Endothelzellschicht untersucht.

Mit Hilfe der Genotypisierung wurde festgestellt, dass die Zellen der TSP-1 Knockout-Mäuse tatsächlich kein TSP-1 exprimierten. Die Western Blot-Methode bestätigte die Abwesenheit von TSP-1-Protein in den Thrombozyten. Anschließend wurde in den C57BL/6J-Wildtyp- und TSP-1 Knockout-Mäusen eine Peritonitis (Bauchhöhlenentzündung) mit Thioglykolat provoziert und die eingewanderten Ma-

krophagen nach fünf Tagen isoliert. Um sicherzustellen, dass es sich um Makrophagen handelte, wurden diese mit Hilfe der Durchflusszytometrie phänotypisiert und auf ihre Reinheit geprüft. Im Schnitt besaßen die murinen Makrophagen eine Reinheit von $92,97 \% \pm 4,9 \%$. Die Makrophagen wurden nicht in PFP, sondern in RPMI 1640-Medium resuspendiert, um eventuelle Effekte durch Plasma-TSP-1 zu vermeiden. Weiterhin wurden die Endothelzellen mit TNF- α aktiviert und die Adhäsion, Migration und Transmigration der aus der Bauchhöhle isolierten, aktivierten Makrophagen an/auf/durch eine/r stimulierte/n Endothelzellschicht mit Hilfe des Flusskammersystems analysiert.

Es konnte eine signifikant verstärkte Adhäsion und eine tendenziell erhöhte Migration und Transmigration von murinen Wildtyp-Makrophagen an/auf/durch humane/n TNF- α -stimulierte/n Endothelzellen im Vergleich zu unstimulierten Endothelzellen beobachtet werden. TNF- α spielt also auch im Mausmodell eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Makrophagen an die Gefäßwand.

Während die Adhäsion und Migration TSP-1-defizienter Makrophagen an und auf eine/r TNF- α -stimulierte/n Endothelzellschicht nur marginal bzw. nicht beeinflusst wurden, wurde die Transmigration durch die Endothelzellschicht signifikant reduziert und ist somit stark abhängig von der Expression von TSP-1. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass TSP-1 für die Adhäsion und Migration von Makrophagen an/auf eine/r Endothelzellschicht keine essenzielle Rolle spielt. Aktivierte Monozyten exprimieren neben TSP-1 weitere Adhäsionsmoleküle wie z. B. $\alpha_m\beta_2$ und PSGL-1 auf ihrer Oberfläche, die vermutlich für die hier beobachtete Adhäsion der TSP-1-defizienten Makrophagen verantwortlich sind. Ebenso wurde beschrieben, dass z. B. $\alpha_m\beta_2$, PECAM und JAM [186] bei der Migration von Monozyten eine wichtige Rolle spielen. Die Adhäsion und Migration von murinen Makrophagen an/auf eine/r humane Endothelzellschicht kann bei fehlendem TSP-1 also vermutlich von anderen Rezeptoren und Molekülen der Makrophagen und des Endothels kompensiert werden.

Die stark reduzierte Transmigration der TSP-1-defizienten Makrophagen könnte aufgrund der fehlenden Aktivierung des transformierenden Wachstumsfaktor β („transforming growth factor β “, TGF- β) beobachtet worden sein. Dieser wird von verschiedenen Zellen wie Endothelzellen [329], aber auch Thrombozyten aus den α -Granula sezerniert [330]. Ribeiro et al. zeigten, dass TGF- β durch die Interaktion mit

TSP-1 aktiviert wird [331]. Abhängig vom Zelltyp und der extrazellulären Umgebung sind die Effekte von TGF- β positiv oder negativ [332]. So kann es die Proliferation von Endothelzellen *in vitro* inhibieren [333], jedoch die Angiogenese von Endothelzellen *in vivo* stimulieren [334]. Weiterhin fungiert TGF- β als Chemokin für Neutrophile und Monozyten und lockt diese so zum Ort der Entzündung [335]. Gegen die Hypothese, dass durch TSP-1 aktivierter TGF- β für die Transmigration verantwortlich ist, spricht, dass TGF- β , unabhängig von TSP-1, ebenso durch eine Vielzahl weiterer Proteine wie Integrine oder Proteasen wie Plasmin oder Matrix-Metalloproteinasen aktiviert werden kann [336]. Die Mechanismen der *in vivo*-Aktivierung sind jedoch nicht vollständig erforscht, es ist daher nicht auszuschließen, dass die Interaktion von TSP-1 mit TGF- β bei der Transmigration von Monozyten bzw. Makrophagen durch eine Endothelzellschicht von Bedeutung ist.

Möglicherweise ist der „cluster of differentiation“ 36 (CD36), ein prominenter TSP-1-Rezeptor, an der endothelialen Transmigration beteiligt. Frühere Studien vermuteten, dass die antiangiogenetische Funktion von niedrig konzentriertem TSP-1 durch endothelialen CD36 beeinflusst wird. CD36 fungiert dabei nicht als Adhäsionsmolekül oder „scavenger“-Rezeptor, sondern als Signalüberträger: Monozytäres TSP-1 bindet an endothelialen CD36 und setzt eine negative Signalübertragung in Gang, die die Proliferation, Migration und Angiogenese der Endothelzellen inhibiert. 1996 konnte dies von Dawson et al. bestätigt werden: Wurden CD36- oder TSP-1-blockierende Antikörper eingesetzt, konnte aufgrund des aufgehobenen inhibitorischen Effekts von TSP-1 eine erhöhte Migration der Endothelzellen festgestellt werden [337]. Im Gegensatz dazu wird die Migration der Endothelzellen durch höhere Konzentrationen von TSP-1 stimuliert. Gao et al. zeigten, dass dabei der „cluster of differentiation“ 47 (CD47) involviert ist, der ebenso von Gao et al. als ein weiterer Rezeptor von TSP-1 identifiziert wurde [338]. Da in diesen Studien jedoch die Migration von Endothelzellen untersucht wurde, können die Ergebnisse hier nur bedingt als Begründung herangezogen werden. Möglich wäre aber, dass TSP-1 neben den inhibitorischen Effekten auch stimulierende Effekte auf die Sekretion und Expression von für die Transmigration wichtigen endothelialen Molekülen, wie z. B. CD47, hat.

CD47 ist ein Membranrezeptor, der zur Immunoglobulin-Superfamilie gehört und unter anderem in Interaktionen zwischen Zellen sowie zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix involviert ist [339]. Narizhneva et al. zeigten in ihrer Studie, dass TSP-1 die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen CD47-abhängig förderte [141]. Schwartz et al. vermuteten, dass CD47 nach Kontakt mit extrazellulären Proteinen z. B. den Ca^{2+} -Einstrom in Endothelzellen reguliert, der für eine effiziente Transmigration nötig ist, indem CD47 möglicherweise selbst als Ca^{2+} -Tunnel fungiert [340]. Unter Verwendung eines CD47-blockierenden Antikörpers konnten Cooper et al. die transendotheliale Migration von Neutrophilen unterbinden, während die Adhäsion über den neutrophilen Rezeptor $\alpha_M\beta_2$ nicht beeinflusst wurde [341]. Diese Ergebnisse wurden von Parkos et al. mit einem weiteren CD47-Antikörper und dem Einsatz von Neutrophilen und Epithelzellen bestätigt [342]. Weiterhin zeigten Parkos et al., dass der anti-CD47 Antikörper dabei das von den Neutrophilen, aber auch von den Epithelzellen exprimierte CD47 wirksam inhibierte, da die Transmigration der Neutrophilen in beiden Szenarien stark reduziert wurde [342]. Es ist also möglich, dass die Transmigration der TSP-1-defizienten murinen Makrophagen aufgrund einer fehlenden TSP-1-CD47 Interaktion reduziert war.

Eine weitere Erklärung für die reduzierte Transmigration der murinen TSP-1-defizienten Makrophagen durch die humane Endothelzellschicht könnten die Studienergebnisse von Goldblum et al. bieten: Hier konnte mit Hilfe von aufgereinigtem humanem TSP-1 gezeigt werden, dass TSP-1 die Tyrosin-Phosphorylierung von Adhäsionsverbindungsproteinen (engl.: „adherens junction proteins“) induziert und so partiell die Zell-Zell-Interaktionen des Endothels beeinflusst. Als Phosphotyrosinhaltige Proteine wurden FAK, γ -Catenin und p120^{Cas} identifiziert [343]. Auch Wessel et al. berichteten, dass die Phosphorylierung verschiedener Tyrosinreste der vaskulär-endothelialen (VE-)Cadherine zur Destabilisierung der adhäsiven Endothelzellverbindungen führte [344]. Durch diese Lockerung wird es den Monozyten/Makrophagen möglich, parazellulär in das Gewebe einzuwandern. TSP-1-defiziente Makrophagen sind also möglicherweise nicht fähig, die adhäsiven Endothelzellverbindungen aufgrund der fehlenden Phosphorylierung der VE-Cadherin-Tyrosinreste zu lösen, was die Transmigration erschwert.

Verschiedene Studien zeigten, dass auch Thrombozyten an der Transmigration von Monozyten/Makrophagen beteiligt sind: Sie können z. B. unter hohem Scherstress

an vWF binden und die Inhibition dieser Thrombozyten-vWF Interaktion verminderte die Einwanderung von Leukozyten in den entzündeten Cremaster-Muskel und in das Bauchfell während einer Peritonitis [345], [346]. Braun et al. zeigten, dass Thrombozyten zur Transmigration von Monozyten beitragen, indem sie vWF-gebunden den Tie-2 Agonisten Angiopoietin-1 (Angpt-1) sezernieren: Tie-2 stabilisiert VE-Cadherin-unabhängig die Zellverbindungen und sorgt dafür, dass bei der Transmigration kein Plasma in das umliegende Gewebe austritt (engl.: „leakage“) [347]. Möglicherweise transmigrierten die TSP-1-defizienten Makrophagen weniger, da nicht nur TSP-1 als Stimulator der Destabilisierung der adhäsiven Endothelzellverbindungen, sondern auch die Bindung an Thrombozyten und somit die Prävention des Plasmaaustrittes fehlte.

Da die Transmigration der TSP-1-defizienten Makrophagen nicht vollständig reduziert wurde, verdeutlichen diese Ergebnisse, dass auch TSP-1-unabhängige Mechanismen an der Transmigration der murinen Makrophagen durch eine humane Endothelzellschicht beteiligt sind. Bekannt ist z. B. die Destabilisierung der homophilen Bindung zwischen zwei Endothelzellen durch die Bindung von monozytärem $\alpha_L\beta_2$ an endotheliales JAM-A [180].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TSP-1 eine wichtige Rolle bei der Transmigration von murinen Makrophagen durch eine humane Endothelzellschicht spielt. Welche genauen Mechanismen der TSP-1-abhängigen Transmigration zu Grunde liegen und welche Liganden dabei involviert sind, bleibt zu erforschen. Thrombozyten-Monozyten/Makrophagen-Assoziate können das Endothel infiltrieren [191] und tragen so zu atherothrombotischen zerebralen Ischämien [142] oder Myokardinfarkten [188], [189] bei. Da Monozyten/Makrophagen über das auf ihrer Zelloberfläche exprimierte TSP-1 nicht nur an das Endothel adhärieren, sondern auch an thrombozytäres GPIIb/IIIa binden, stellt TSP-1 ein potenzielles „Target“ bei der medikamentösen Behandlung von thrombotisch-inflammatorischen Erkrankungen dar.

6 Zusammenfassung

Die Serinprotease Thrombin ist ein essenzielles Enzym für die Blutgerinnung. Es spaltet Fibrinogen zu Fibrin und aktiviert die Thrombozyten und die Gerinnungsfaktoren V, VIII, XI und XIII (FV, FVIII, FXI, FXIII) und stimuliert so die Thrombozyten-abhängige Thrombingenerierung. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der kalibrierten automatisierten Thrombographie (CAT) bestätigt, dass die positiven Rückkopplungsschleifen der Gerinnungsfaktoren IX (FIX) und XI essenziell für die Thrombin-induzierte Amplifikationsphase der Thrombingenerierung auf Thrombozyten sind.

Der klassische Thrombospondin-1-(TSP-1-)Rezeptor CD36 ist unter anderem an der Entstehung eines hyperreaktiven Thrombozytenphänotyps beteiligt [263] und wird mit prothrombotischen und proatherogenen Effekten in Verbindung gebracht [121]. Daher wurde die Rolle von CD36 in der Thrombozyten-abhängigen Thrombingenerierung untersucht. CD36-defiziente oder mit anti-CD36 Antikörper FA6.152 geblockte Thrombozyten zeigten in der CAT eine verminderte Thrombin-induzierte Thrombingenerierung. Die Verwendung von Thrombozyten mit angeborenen Funktionsfehlern, blockierenden Antikörpern, pharmakologischen Inhibitoren und Mangelplasmen verdeutlichte die Abhängigkeit der CD36-sensitiven Thrombingenerierung von FXI, Fibrin und GPIIb/IIIa- sowie Syk Kinase-medierten Signalwegen. Die Vermittlung der Bindung von FV, FVIII und FIX an Thrombin-aktivierte Thrombozyten erfolgte unabhängig von der Phosphatidylserin-Oberflächenexposition. Hier wurde erstmals Fibrin als spezifischer Ligand von CD36 identifiziert, das zudem Thiol-abhängig FV, FVIII und FIX bindet und somit die CD36-abhängige Thrombinbildung auf Thrombozyten mediert. CD36 spielt also eine wichtige Rolle bei der Amplifikation der FXIa-getriebenen Thrombingenerierung auf humanen Thrombozyten und stellt somit ein interessantes, antithrombotisches „Target“ dar, um die Thrombozyten-basierte Hyperreaktivität zu hemmen.

Neben Thrombozyten sind auch „Tissue Factor“-präsentierende Monozyten in der Lage, Thrombin zu generieren [48], [297]. Isolierte humane Monozyten wurden in der CAT eingesetzt und bestätigten eine konzentrationsabhängige Thrombingenerierung in Thrombozyten-freiem Plasma (PFP). Für die Amplifikation der Thrombingenerierung sind jedoch Thrombozyten in Gegenwart von Monozyten essenziell, da in Thrombozyten-reichem Plasma (PRP) mit steigender Monozyten-Konzentration

eine höhere Thrombinbildung als im PFP detektiert wurde. Zudem wurde Dabigatran als wirksamer, direkter Thrombin-Inhibitor bestätigt, da die Thrombozyten- sowie Monozyten-induzierte Thrombingenerierung im PRP und PFP nach Dabigatran-Behandlung im Vergleich zu den Vehikelkontrollen verringert war. Hierbei war der Effekt im PRP signifikant stärker als im PFP. Dabigatran ist also ein effektiver Inhibitor der Thrombin-vermittelten Thrombozytenaktivierung und verringert so wirksam die Thrombinamplifikation auf Thrombin-stimulierten Thrombozyten.

Thrombin spielt ebenso eine wichtige Rolle bei der Atherogenese, in dem es Blut- und vaskuläre Zellen aktiviert und Monozyten entlang eines Thrombin-Gradienten zur Entzündungsstelle rekrutiert [95]. Mit Hilfe eines etablierten Flusskammersystems wurde daher die Adhäsion, Migration und Transmigration von aktivierten Monozyten an/auf/durch eine/r humane/n mikrovaskuläre/n Endothelzellschicht in An- und Abwesenheit von Dabigatran untersucht. Die endotheliale Adhäsion, Migration und Transmigration der Monozyten wurde durch die Behandlung mit Dabigatran reduziert. Die Thrombinaktivität spielt also eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Transmigration von Monozyten und kann durch Dabigatran wirksam inhibiert werden. Dabigatran trägt somit zu einer reduzierten Rekrutierung von inflammatorischen Zellen an entzündetes endotheliales Gewebe und reduzierter Endothelzellaktivierung bei. Es könnte daher ein guter Ansatzpunkt in der medikamentösen Behandlung von entzündlichen, atherosklerotischen Erkrankungen sein.

Es sind jedoch auch Thrombin-unabhängige Mechanismen an der endothelialen Rekrutierung und Transmigration von Monozyten beteiligt. Da TSP-1 bereits als wichtiges Protein bei der Adhäsion von Monozyten and Endothelzellen identifiziert wurde [141], wurde unter Verwendung des Flusskammersystems die Rolle von TSP-1 bei der endothelialen Adhäsion, Migration und Transmigration von murinen Makrophagen analysiert. Die Adhäsion und Migration muriner TSP-1-defizienter Makrophagen an/auf humane/n Endothelzellen wurde nur marginal bzw. nicht beeinflusst. Die endotheliale Transmigration war jedoch signifikant reduziert und ist somit stark von TSP-1 abhängig. Die genauen Mechanismen der TSP-1-abhängigen Transmigration bleiben zu erforschen. Da TSP-1-präsentierende Monozyten/Makrophagen inflammatorischen Erkrankungen prothrombotisch beeinflussen können, stellt TSP-1 ein potenzielles „Target“ bei der medikamentösen Behandlung von thrombotisch-inflammatorischen Erkrankungen wie der Atherosklerose dar.

Summary

The serine protease thrombin is an essential enzyme for blood coagulation. Besides cleaving fibrinogen to fibrin, it activates platelets and coagulation factors V, VIII, XI and XIII (FV, FVIII, FXI, FXIII) and triggers platelet-dependent thrombin generation.

Using the calibrated automated thrombography (CAT) the present work confirmed the essential role of the positive feedback loops of the coagulation factors IX and XI (FXI) in thrombin-induced thrombin generation on platelets.

Since the classical thrombospondin-1 (TSP-1) receptor CD36 is involved in the formation of a hyperreactive platelet-phenotype [263] and is considered to cause prothrombotic and proatherogenic effects [121], its role in thrombin-induced thrombin generation was analyzed. Platelets deficient in CD36 or blocked by anti-CD36 antibody FA6.152 showed impaired thrombin generation triggered by thrombin in the CAT. The usage of platelets with congenital function defects, blocking antibodies, pharmacological inhibitors and factor-depleted plasma elucidates the dependence of CD36-sensitive thrombin generation on FXI, fibrin and GPIIb/IIIa- as well as Syk kinase-mediated signaling. FV, FVIII and FIX binding to thrombin-activated platelets was shown to be independent of phosphatidylserine surface exposure. For the first time, fibrin was identified as an important adhesive mediator, specifically bound by CD36 and ligating FV, FVIII and FIX in a thiol-dependent manner. Hence, CD36 is an important amplifier of FXIa-driven thrombin generation on human platelets and represents a promising, antithrombotic target to inhibit platelet-hyperreactivity.

In addition to platelets, „tissue factor“-bearing cells such as monocytes are also able to generate thrombin [48], [297]. By using human monocytes in the CAT, it was confirmed that an initial thrombin generation in platelet-free plasma (PFP) occurs on monocytes in a concentration dependent manner. For the amplification of thrombin generation still platelets are necessary in the presence of monocytes since increased thrombin generation with rising monocyte concentration was measured in platelet-rich plasma (PRP) compared to PFP. In addition, dabigatran was confirmed as an effective, direct thrombin inhibitor as thrombin- as well as monocyte-induced thrombin generation in PRP and PFP was diminished after treatment with dabigatran compared to vehicle controls. Here, the effect of dabigatran was significantly stronger in PRP than in PFP. Dabigatran is therefore a potent inhibitor of

thrombin-mediated platelet activation and reduces the amplification of thrombin on thrombin-stimulated platelets.

Thrombin also plays an important role in the development of atherogenesis, activating blood and vascular cells and recruiting monocytes along a thrombin gradient to sites of inflammation [95]. Therefore, using a flow chamber system, the adhesion, migration, and transmigration of activated monocytes to/on/through a human microvascular endothelial cell layer in the presence and absence of dabigatran was analyzed. Adhesion, migration, and transmigration to/on/through the endothelial cell layer was reduced after treatment with dabigatran. Thus, dabigatran, inhibiting thrombin activity, contributes to a reduced recruitment of inflammatory cells to the inflamed endothelial tissue and to a diminished activation of endothelial cells. Hence, dabigatran could be a starting point in medication of inflammatory, atherosclerotic diseases.

However, thrombin-independent mechanisms also contribute to endothelial recruitment and transmigration of monocytes. Since TSP-1 was already identified as an important protein in adhesion of monocytes to endothelial cells [141], the role of TSP-1 in adhesion, migration, and transmigration of murine macrophages to/on/through a human endothelial cell layer was analyzed using the established flow chamber method. Adhesion and migration of TSP-1-deficient macrophages was only marginally affected, whereas the transmigration was significantly reduced and thereby heavily dependent on TSP-1. The exact mechanisms of how TSP-1 contributes to the transmigration of monocytes/macrophages through endothelial cell layers remains to be explored. Since TSP-1-bearing monocytes/macrophages influence inflammatory diseases in a prothrombotic manner, TSP-1 represents a potential target for medication of thrombotic-inflammatory diseases such as atherosclerosis.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Jurk K und Kehrel B, „Platelets: Physiology and Biochemistry,“ *Semin Thromb Hemost*, 2005;31(4):381-392.
- [2] Jurk K und Kehrel B, „Pathophysiologie und Biochemie der Thrombozyten,“ *Internist (Berl.)*, 2010;51(9):1086, 1088-1092, 1094.
- [3] Pluthero FG und Kahr WHA, „The Birth and Death of Platelets in Health and Disease,“ *Physiology (Bethesda)*, 2018;33(3):225-234.
- [4] Holinstat M, „Normal platelet function,“ *Cancer Metastasis Rev.*, 2017;36(2):195-198.
- [5] Gawaz M, Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung, M. Gawaz, Hrsg., Stuttgart; New York: Thieme, 1999;4-9.
- [6] Gerrard JM, White JG und Peterson DA, „The platelet dense tubular system: its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux,“ *Thromb Haemost.*, 1978;40(2):224-231.
- [7] Z. Ruggeri, „Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation,“ *Thromb Haemost.*, 1993;70(1):119-123.
- [8] Z. Ruggeri, „The role of von Willebrand factor in thrombus formation,“ *Thromb Res.*, 2007;120(Suppl 1):S5-S9.
- [9] Ruggeri ZM, Orje ZN, Habermann R, Federici AB und Reininger AJ, „Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress,“ *Blood*, 2006;108(6):1903-1910.
- [10] Moddermann PW, Admiraal LG, Sonnenberg A und v. d. Borne AE, „Glycoproteins V and Ib-IX Form a Noncovalent Complex in the Platelet Membrane,“ *J Biol Chem.*, 1992;267(1):364-369.
- [11] Andrews RK und Berndt MC, „Bernard-Soulier syndrome: an update,“ *Semin Thromb Hemost.*, 2013;39(6):656-662.
- [12] Savoia A, Pastore A, D. Rocco D, Civaschi E, D. Stazio M, Bottega R, Melazzini F, Bozzi V, Pecci A, Magrin S, Balduini CL und Noris P, „Clinical and genetic aspects of Bernard-Soulier syndrome: searching for genotype/phenotype correlations,“ *Haematologica*, 2011;96(3):417-423.
- [13] Staatz WD, Rajpara SM, Wayner EA, Carter WG und Santoro SA, „The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg++-dependent adhesion of platelets to collagen,“ *J Cell Biol.*, 1989;108(5):1917-1924.
- [14] Sarratt KL, Chen H, Z. MM, Santoro SA, Hammer DA und Kahn ML, „GPVI and alpha2beta1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow,“ *Blood.*, 2005;106(4):1268-1277.
- [15] Jurk K, Clemetson KJ, Groot PG, Brodde MF, Steiner M, Savion N, Varon D, Sixma JJ, Van Aken H und Kehrel BE, „Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor,“ *FASEB J.*, 2003;17(11):1490-1492.
- [16] Kehrel B, „Platelet-collagen interactions,“ *Semin Thromb Hemost.*, 1995;21(2):123-129.
- [17] Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, F. RW, O. M und B. MJ, „Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not,“ *Blood.*, 1998;91(2):491-499.

- [18] Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H und Fässler R, „Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen,“ *EMBO J*, 2001;20(9):2120-2130.
- [19] Jackson SP, Nesbitt WS und Kulkarni S, „Signaling events underlying thrombus formation,“ *J Thromb Haemost*, 2003;1(7):1602-1612.
- [20] Mammdova-Bach E, Ollivier V, Loyau S, Schaff M, Dumont B, Favier R, Freyburger G, Latger-Cannard V, Nieswandt B, Gachet C, Mangin PH und Jandrot-Perrus M, „Platelet glycoprotein VI binds to polymerized fibrin and promotes thrombin generation,“ *Blood*, 2015;126((5):683-691.
- [21] Alshehri OM, Hughes CE, Montague S, Watson SK, Frampton J, Bender M und Watson SP, „Fibrin activates GPVI in human and mouse platelets,“ *Blood*, 2015;126(13):1601-1608.
- [22] Varga-Szabo D, Braun A und Nieswandt B, „Calcium signaling in platelets,“ *J Thromb Haemost*, 2009;7(7):1057-1066.
- [23] Mazzucato M, Pradella P, D. M. Cozzi MR und Ruggeri ZM, „Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Iba α mechanoreceptor,“ *Blood*, 2002;100(8):2793-2800.
- [24] Peterson DM, Stathopoulos NA, Giorgio TD, Hellums JD und Moake JL, „Shear-induced platelet aggregation requires von Willebrand factor and platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa,“ *Blood*, 1987;69(2):625-628.
- [25] Senis YA, Antrobus R, Severin S, Parguifia AF, Rosa I, Zitzmann N, Watson SP und García A, „Proteomic analysis of integrin $\alpha IIb\beta 3$ outside-in signaling reveals Src-kinase-independent phosphorylation of Dok-1 and Dok-3 leading to SHIP-1 interactions,“ *J Thromb Haemost*, 2009;7(10):1718-1726.
- [26] Watson SP, Auger JM, McCarty OJT und Pearce AC, „GPVI and integrin $\alpha IIb\beta 3$ signaling in platelets,“ *J Thromb Haemost*, 2005;3(8):1751-1762.
- [27] van der Meijden PEJ, Feijge MAH, Swieringa F, Gilio K, Nergiz-Unal R, Hamulyák K und Heemskerk JWM, „Key role of integrin $\alpha (IIb)\beta (3)$ signaling to Syk kinase in tissue factor-induced thrombin generation,“ *Cell Mol Life Sci*, 2012;69(20):3481-3492.
- [28] Makhoul S, Trabold K, Gambaryan S, Tenzer S, Pillitteri D, Walter U und Jurk K, „cAMP- and cGMP-elevating agents inhibit GPIb α -mediated aggregation but not GPIb α -stimulated Syk activation in human platelets,“ *Cell Commun Signal*, 2019;17(1):122.
- [29] Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, Bori-Sanz T, Inoue O, Jung SM, Moroi M, Andrews RK, Berndt MC und Watson SP, „Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling,“ *J Biol Chem*, 2002;277(24):21561-21566.
- [30] Woods Jr VL, Wolff LE und Keller DM, „Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins,“ *J Biol Chem*, 1986;261(32):15242-15251.
- [31] Wencel-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM und Ginsberg MH, „Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses,“ *Am J Pathol*, 1986;124(2):324-334.
- [32] White JG und Krumwiede M, „Further studies of the secretory pathway in thrombin-stimulated human platelets,“ *Blood*, 1987;69(4):1196-1203.
- [33] Golebiewska EM und Poole AW, „Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond,“ *Blood Rev*, 2015;29(3):153-162.
- [34] Yadav S und Storrie B, „The cellular basis of platelet secretion: Emerging structure/function relationships,“ *Platelets*, 2017;28(2):108-118.

- [35] Nishibori M, Cham B, McNicol A, Shalev A, Jain N und Gerrard JM, „The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin,“ *J Clin Invest*, 1993;91(4):1775-1782.
- [36] Asch AS, Tepler J, Silbiger S und Nachman RL, „Cellular attachment to thrombospondin. Cooperative interactions between receptor systems,“ *J Biol Chem*, 1991;266(3):1740-1745.
- [37] Kuijpers MJE, d. Witt S, Nergiz-Unal R, v. Kruchten R, Korpelaar SJA, Verhamme P, Febbraio M, Tjwa M, Voshol PJ, Hoylaerts MF, Cosemans JMEM und Heemskerk JWM, „Supporting roles of platelet thrombospondin-1 and CD36 in thrombus formation on collagen,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014;34(6):1187-1192.
- [38] Deppermann C, Cherpokova D, Nurden P, Schulz JN, Thielmann I, Kraft P, Vögtle T, Kleinschnitz C, Dütting , Krohne G, Eming A, Nurden T, Eckes B, Stoll G, Stegner D und Nieswandt B, „Gray platelet syndrome and defective thrombo-inflammation in Nbeal2-deficient mice,“ *J Clin Invest*, 2013;123(8):3331-3342.
- [39] Blair P und Flaumenhaft R, „Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates,“ *Blood Rev*, 2009;23(4):177-189.
- [40] Dupuis A, Bordet JC, Eckly A und Gachet C, „Platelet δ -Storage Pool Disease: An Update,“ *J Clin Med*, 2020;9(8):2508.
- [41] Totani L und Evangelista V, „Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010;30(12):2357-2361.
- [42] Moore KL, Eaton SF, Lyons DE, Lichenstein HS, Cummings RD und McEver RP, „The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetyllactosamine,“ *J Biol Chem*, 1994;269(37):23318-23327.
- [43] Asa D, Raycroft L, Ma L, Aeed PA, Kaytes PS, Elhammer AP und Geng JG, „The P-selectin glycoprotein ligand functions as a common human leukocyte ligand for P- and E-selectins,“ *J Biol Chem*, 1995;270(19):11662-11670.
- [44] Monroe DM, Hoffman M und Roberts HR, „Platelets and thrombin generation,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002;22(9):1381-1389.
- [45] Lyberg T, Closs O und Prydz H, „Effect of purified protein derivative and sonicates of Mycobacterium leprae and Mycobacterium bovis BCG on thromboplastin response in human monocytes in vitro,“ *Infect Immun*, 1982;38(3):855-859.
- [46] Bjørklid E, Holm T und Osterud B, „The development of monospecific antibodies against human thromboplastin apoprotein (apoprotein III) and their application in the immunocytochemical detection of the antigen in blood cells,“ *Thromb Res*, 1987;45(5):609-624.
- [47] Nemerson Y und Repke D, „Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII: the role of a bifunctional coagulation cofactor,“ *Thromb Res*, 1985;40(3):351-358.
- [48] Monroe DM und Hoffman M, „What does it take to make the perfect clot?,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006;26(1):41-48.
- [49] Kamikubo Y, Mendolicchio GL, Zampolli A, Marchese P, Rothmeier AS, N. Orje J, Gale AJ, Krishnaswamy S, Gruber A, Østergaard H, Petersen LC, Ruf W und Ruggeri ZM, „Selective factor VIII activation by the tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex,“ *Blood*, 2017;130(14):1661-1670.
- [50] Gailani D und Broze Jr GJ, „Factor XI activation in a revised model of blood coagulation,“ *Science*, 1991;253(5022):909-912.
- [51] Naito K und Fujikawa K, „Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces,“ *J Biol Chem*, 1991;266(12):7353-7358.

- [52] Furie B und Furie BC, „The molecular basis of blood coagulation,“ *Cell*, 1988;53(4):505-518.
- [53] Suttie JW und Jackson CM, „Prothrombin structure, activation, and biosynthesis,“ *Physiol Rev*, 1977;57(1):1-70.
- [54] Davie EW und Fujikawa K, „Basic mechanisms in blood coagulation,“ *Annu Rev Biochem*, 1975;44:799-829.
- [55] Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, K. NS, Kitchen S, Llinas A, Ludlam CA, Mahlangu JN, Mulder K, Poon MC und Street A, „Guidelines for the management of hemophilia,“ *Haemophilia*, 2013;19(1):e1-47.
- [56] Löwenberg EC, Meijers JCM, M. BP und Levi M, „Coagulation factor XI as a novel target for antithrombotic treatment,“ *J Thromb Haemost*, 2010;8(11):2349-2357.
- [57] Salomon O, Steinberg DM, Zucker M, Varon D, Zivelin A und Seligsohn U, „Patients with severe factor XI deficiency have a reduced incidence of deep-vein thrombosis,“ *Thromb Haemost*, 2011;105(2):269-273.
- [58] Grau AJ, Ruf A, Vogt A, Lichy C, Buggle F, Patscheke H und Hacke W, „Increased fraction of circulating activated platelets in acute and previous cerebrovascular ischemia,“ *Thromb Haemost*, 1998;80(2):298-301.
- [59] Jurk K, Jahn UR, V. Aken H, Schriek C, Droste DW, Ritter MA, Ringelstein EB und Kehrel BE, „Platelets in patients with acute ischemic stroke are exhausted and refractory to thrombin, due to cleavage of the seven-transmembrane thrombin receptor (PAR-1),“ *Thromb Haemost*, 2004;91(2):334-344.
- [60] Jayakrishnan T, Shah D und Mewawalla P, „Hemophilia C: A Case Report With Updates on Diagnosis and Management of a Rare Bleeding Disorder,“ *J Hematol*, 2019;8(3):144-147.
- [61] Puetz J, Hugge C und Moser K, „Normal aPTT in children with mild factor XI deficiency,“ *Pediatr Blood Cancer*, 2018;65(4).
- [62] McCarthy ML, Ordway SM, Jones RM und Perkins JG, „Successful perioperative management in a patient with factor XI deficiency,“ *Successful perioperative management in a patient with factor XI deficiency*, 2018:bcr2017222434.
- [63] Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komáromi I und Katona É, „Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions,“ *Physiol Rev*, 2011;91(3):931-972.
- [64] Weisel JW und Litvinov RI, „Fibrin Formation, Structure and Properties,“ *Subcell Biochem*, 2017;82:405-456.
- [65] Riley RS, G. AR, Dalton JB, Pai S und McPherson RA, „Widely Used Types and Clinical Applications of D-Dimer Assay,“ *Lab Med*, 2016;47(2):90-102.
- [66] Preissner KT, „Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren,“ in *Hämostaseologie - Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, Pötzsch B und Madlener K, Hrsg., Springer Link, 2010;159-168.
- [67] Hao Z, Jin DY, Stafford DW und Tie JK, „Vitamin K-dependent carboxylation of coagulation factors: insights from a cell-based functional study,“ *Haematologica*, 2020;105(8):2164-2173.
- [68] Posma JJN, Posthuma JJ und Spronk HMH, „Coagulation and non-coagulation effects of thrombin,“ *J Thromb Haemost*, 2016;14(10):1908-1916.
- [69] Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H und Coughlin SR, „Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin,“ *J Clin Invest*, 1999;103(6):879-887.
- [70] Ossovskaya VS und Bunnett NW, „Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease,“ *Physiol Rev*, 2004;84(2):579-621.
- [71] Coughlin SR, „How the protease thrombin talks to cells,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999;96(20):11023-11027.

- [72] Mahoney JP und Sunahara RK, „Mechanistic insights into GPCR-G protein interactions,“ *Curr Opin Struct Biol*, 2016;41:247-254.
- [73] Syrovatkin V, Alegre KO, Dey R und Huang XY, „Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins,“ *J Mol Biol*, 2016;428(19):3850-3868.
- [74] Gurbel PA, Kuliopulos A und Tantry US, „G-protein-coupled receptors signaling pathways in new antiplatelet drug development,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015;35(3):500-512.
- [75] Adam F, Guillin MC und J.-P. M, „Glycoprotein Ib-mediated platelet activation. A signalling pathway triggered by thrombin,“ *Eur J Biochem*, 2003;270(14):2959-2970.
- [76] Ramakrishnan V, DeGuzman F, Bao M, Hall SW, Leung LL und Phillips DR, „A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmasked by cleavage of glycoprotein V,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011;98(4):1823-1828.
- [77] De Candia E, Hall SW, Rutella S, Landolfi R, Andrews RK und D. Christofaro R, „Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets,“ *J Biol Chem*, 2001;276(7):4692-4698.
- [78] Du X, Beutler L, Ruan C, Castaldi PA und B. MC, „Glycoprotein Ib and glycoprotein IX are fully complexed in the intact platelet membrane,“ *Blood*, 1987;69(5):1524-1527.
- [79] Li R und Emsley J, „The organizing principle of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex,“ *J Thromb Haemost*, 2013;11(4):605-614.
- [80] Bryckaert M, Rosa JP, Denis CV und Lenting PJ, „Of von Willebrand factor and platelets,“ *Cell Mol Life Sci*, 2015;72(2):307-326.
- [81] Du X, „Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex,“ *Curr Opin Hematol*, 2007;14(3):262-269.
- [82] Estevez B, Kim K, Delaney MK, Stojanovic-Terpo A, Shen B, Ruan C, Cho J, Ruggeri ZM und Du X, „Signaling-mediated cooperativity between glycoprotein Ib-IX and protease-activated receptors in thrombin-induced platelet activation,“ *Blood*, 2016;127(5):626-636.
- [83] Gilbert GE, Novakovic VA, Shi J, Rasmussen J und Pipe SW, „Platelet binding sites for factor VIII in relation to fibrin and phosphatidylserine,“ *Blood*, 2015;126(10):1237-1244.
- [84] Cox AD und Devine DV, „Factor XIIIa Binding to Activated Platelets Is Mediated Through Activation of Glycoprotein IIb-IIIa,“ *Blood*, 1994;83(4):1006-1016.
- [85] Mohammed BM, Matafonov A, Ivanov I, Sun MF, Cheng Q, Dickeson SK, Li C, Sun D, Verhamme IM, Emsley J und Gailani D, „An Update on Factor XI Structure and Function,“ *Thromb Res*, 2018;161:94-105.
- [86] Krishnaswamy S und Mann KG, „The Binding of Factor Va to Phospholipid Vesicles,“ *J Biol Chem*, 1988;263(12):5714-5723.
- [87] Blombäck B, Hessel B, Hogg D und Therkildsen L, „A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation,“ *Nature*, 1978;275(5680):501-505.
- [88] Souri M, Osaki T und Ichinose A, „The Non-catalytic B Subunit of Coagulation Factor XIII Accelerates Fibrin Cross-linking,“ *J Biol Chem*, 2015;290(19):12027-12039.
- [89] Essalmani R, Susan-Resiga D, Guillemot J, Kim W, Sachan V, Awan Z, Chamberland A, Asselin MC, Ly K, Desjardins R, Day R, Prat A und Seidah NG, „Thrombin activation of protein C requires prior processing by a liver proprotein convertase,“ *J Biol Chem*, 2017;292(25):10564-10573.
- [90] Barth J, Röhl K und Jäger D, „Protein-Z-Mangel als seltene Ursache unklarer perioperativer Blutungen,“ *A/NS*, 2003;38(9):605-608.
- [91] H. Damus PS und Rosenberg RD, „Anticoagulant action of heparin,“ *Nature*, 1973;246(5432):355-357.

- [92] Olson ST, Richard B, Izaguirre G, Schedin-Weiss S und Gettins PGW, „Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors,“ *Biochimie*, 2010;92(11):1587-1596.
- [93] G. Kaplanski, V. Marin, M. Fabrigoule, V. Boulay, B. AM, P. Bongrand, S. Kaplanski und C. Farnarier, „Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106),“ *Blood*, 1998;92(4):1259-1267.
- [94] Kaplanski G, Fabrigoule M, Boulay V, Dinarello CA, Bongrand P, Kaplanski S und Farnarier C, „Thrombin induces endothelial type II activation in vitro: IL-1 and TNF-alpha-independent IL-8 secretion and E-selectin expression,“ *J Immunol*, 1997;158(11):5435-5441.
- [95] Bar-Shavit R, Kahn A, F. 2nd JW und Wilner GD, „Chemotactic response of monocytes to thrombin,“ *J Cell Biol*, 1983;96(1):282-285.
- [96] Steffel J, Eikelboom JW, Anand SS, Shestakovska O, Yusuf S und Fox KAA, „The COMPASS Trial: Net Clinical Benefit of Low-Dose Rivaroxaban Plus Aspirin as Compared With Aspirin in Patients With Chronic Vascular Disease,“ *Circulation*, 2020;142(1):40-48.
- [97] Debus ES, Nehler MR und executive committee of the Voyager PAD trial, „The Voyager PAD Trial - New Path for Post-revascularisation PAD Patients,“ *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2020;59(5):699-700.
- [98] Lee CJ und Ansell JE, „Direct thrombin inhibitors,“ *Br J Clin Pharmacol*, 2011;72(4):581-592.
- [99] Eichinger S, „Reversing vitamin K antagonists: making the old new again,“ *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2016(1):605-611.
- [100] Ganetsky M, Babu KM, Salhanick SD, Brown RS und Boyer EW, „Dabigatran: review of pharmacology and management of bleeding complications of this novel oral anticoagulant,“ *J Med Toxicol*, 2011;7(4):281-287.
- [101] Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, „<https://www.akdae.de>,“ 18. 11. 2011. [Online]. Available: <https://www.akdae.de/Arzneimitteltherapie/NA/Archiv/2011030-Pradaxa.pdf>. [Zugriff am 16. 06. 2021].
- [102] Maucher, Dr. Isabelle Viktoria, „<https://www.gelbe-liste.de>,“ 01. 04. 2019. [Online]. Available: https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Dabigatran_50335#. [Zugriff am 16. 06. 2021].
- [103] Giannandrea D, Mengoni A, Carluccio E und Ambrosio G, „Practical considerations on anticoagulation reversal: spotlight on the reversal of dabigatran,“ *Vasc Health Risk Manag*, 2019;15:139-142.
- [104] Park YM, „CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis,“ *Exp Mol Med*, 2014;46(6):e99.
- [105] Febbraio M, Hajjar DP und Silverstein RL, „CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism,“ *J Clin Invest*, 2001;108(6):785-791.
- [106] Rać ME, Safranow K und Poncyliusz W, „Molecular basis of human CD36 gene mutations,“ *Mol Med*, 2007;13(5-6):288-296.
- [107] Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT und Protter AA, „CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein,“ *J Biol Chem*, 1993;268(16):11811-11816.
- [108] Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Gugiu B, Fox PL, Hoff HF, Salomon RG und Hazen SL, „Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36,“ *J Biol Chem*, 2002;277(41):38503-38516.

- [109] Rigotti A, Acton SL und Krieger M, „The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids,“ *J Biol Chem*, 1995;270(27):16221-16224.
- [110] Wang Y, Fang C, Gao H, Bilodeau ML, Zhang Z, Croce K, Liu S, Morooka T, Sakuma M, Nakajima K, Yoneda S, Shi C, Zidar D, Andre P, Stephens G, Silverstein RL, Hogg N, Schamier AH und Simon DI, „Platelet-derived S100 family member myeloid-related protein-14 regulates thrombosis,“ *J Clin Invest*, 2014;124(5):2160-71.
- [111] Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL und Nachman RL, „Isolation of the thrombospondin membrane receptor,“ *J Clin Invest*, 1987;79(4):1054-1061.
- [112] Shattil SJ und Brugge JS, „Protein tyrosine phosphorylation and the adhesive functions of platelets,“ *Curr Opin Cell Biol*, 1991;3(5):869-879.
- [113] Berger G, Caen JP, Berndt MC und Cramer EM, „Ultrastructural demonstration of CD36 in the alpha-granule membrane of human platelets and megakaryocytes,“ *Blood*, 1993;82(10):3034-3044.
- [114] Yamamoto N, Akamatsu N, Sakuraba H, Yamazaki H und Tanoue K, „Platelet glycoprotein IV (CD36) deficiency is associated with the absence (type I) or the presence (type II) of glycoprotein IV on monocytes,“ *Blood*, 1994;83(2):392-397.
- [115] Ikeda I, Mitani T, Ohnuma M, Haga H, Ohtzuka S, Kato T, Nakase T und Sekiguchi S, „A new platelet-specific antigen, Naka, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion“. 1989;57(3):213-217.
- [116] C. Yanai H, Morimoto M, Abe K, Fujiwara H, Fuda H, Hui SP, Takahashi Y, Akita H, Jamieson GA, Kobayashi K und M. K., „Human CD36 deficiency is associated with elevation in low-density lipoprotein-cholesterol,“ *Am J Med Genet*, 2000;93(4):299-304.
- [117] Hayek T, Aviram M, Heinrich R, Sakhnini E und Keidar S, „Losartan inhibits cellular uptake of oxidized LDL by monocyte-macrophages from hypercholesterolemic patients,“ *Biochem Biophys Res Commun*, 2000;273(2):417-420.
- [118] Nozaki S, Kashiwagi H, Yamashita S, Nakagawa T, Kostner B, Tomiyama Y, Nakata A, Ishigami M, Miyagawa J und Kameda-Takemura K, „Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects,“ *J Clin Invest*, 1995;96(4):1859-1865.
- [119] Korporaal SJA, V. Eck M, Adelmeijer J, Ijsseldijk M, Out R, Lisman T, Lenting PJ, V. Berkel TJC und Akkerman JWN, „Platelet activation by oxidized low density lipoprotein is mediated by CD36 and scavenger receptor-A,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007;27(11):2476-2483.
- [120] Assinger A, Koller F, Schmid W, Zellner M, Koller E und Wolf I, „Hypochlorite-oxidized LDL induces intraplatelet ROS formation and surface exposure of CD40L--a prominent role of CD36,“ *Atherosclerosis*, 2010;213(1):129-134.
- [121] Podrez EA, Byzova TV, Febbraio M, Salomon RG, Ma Y, Valiyaveetil M, Poliakov E, Sun M, Finton PJ, Curtis BR, Chen J, Zhang R, Silverstein RL und Hazen SL, „Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype,“ *Nat Med*, 2007;13(9):1086-1095.
- [122] Silverstein RL, „Type 2 scavenger receptor CD36 in platelet activation: the role of hyperlipemia and oxidative stress,“ *Clin Lipidol*, 2009;4(6):767.
- [123] Tandon NN, Kralisz U und Jamieson GA, „Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion,“ *J Biol Chem*, 1989;264(13):7576-7583.
- [124] Roberts W, Magwenzi S, Aburima A und Naseem KM, „Thrombospondin-1 induces platelet activation through CD36-dependent inhibition of the cAMP/protein kinase A signaling cascade,“ *Blood*, 2010;116(20):4297-4306.

- [125] Jaffe EA, Ruggiero JT und Falcone DJ, „Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin,“ *Blood*, 1985;65(1):79-84.
- [126] Mosher DF, Doyle MJ und Jaffe EA, „Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells,“ *J Cell Biol*, 1982;93(2):343-348.
- [127] Bornstein P, „Thrombospondins as extracellular modulators of cell function,“ *J Clin Invest*, 2001;107(8):929-934.
- [128] Jiménez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL und Bouck N, „Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1,“ *Nat Med*, 2000;6(1):41-48.
- [129] Bonnefoy A, Moura R und Hoylaerts MF, „The evolving role of thrombospondin-1 in hemostasis and vascular biology,“ *Cell Mol Life Sci*, 2008;65(5):713-727.
- [130] Gao AG, Lindberg FP, Finn MB, Blystone SD, Brown EJ und Frazier , „Integrin-associated protein is a receptor for the C-terminal domain of thrombospondin,“ *J Biol Chem*, 1996;271(1):21-24.
- [131] Burkhardt JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, Geiger J, Sickmann A und Zahedi RP, „The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways,“ *Blood*, 2012;120(15):e73-82.
- [132] Lo RW, Li L, Leung R, Pluthero R und Kahr WHA, „NBEAL2 (Neurobeachin-Like 2) Is Required for Retention of Cargo Proteins by α -Granules During Their Production by Megakaryocytes,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018;38(10):2435-2447.
- [133] Gunay-Aygun M, Falik-Zaccai TC, Vilboux T, Zivouny-Elboun Y, Gumruk F, Cetin M, Khayat M, Boerkoel CF, Kfir N, Huang Y, Maynard D, Dorward H, Berger K, Kleta R, Anikster Y, Arat M, Freiberg AS, Kehrel BE, Jurk K, Cruz P, Mullikin JC, White JG und Huizing M, „NBEAL2 is mutated in Gray Platelet Syndrome and is required for biogenesis of platelet alpha-granules,“ *Nat Genet*, 2011;43(8):732-734.
- [134] Rosa JP, George JN, Bainton DF, Nurden AT, Caen JP und M. RP, „Gray platelet syndrome. Demonstration of alpha granule membranes that can fuse with the cell surface,“ *J Clin Invest*, 1987;80(4):1138-1146.
- [135] Gunay-Aygun M, Zivouny-Elboun Y, Gumruk F, Geiger D, Cetin M, Khayat M, Kleta R, Kfir N, Anikster Y, Chezar J, Arcos-Burgos M, Shalata A, Stanescu H, Manaster J, Arat M, Edwards H, Freiberg AS, Hart S, Riney LC, Patzel K, Tanpaiboon P und Markello T, „Gray platelet syndrome: natural history of a large patient cohort and locus assignment to chromosome 3p,“ *Blood*, 2010;116(23):4990-5001.
- [136] Isenberg JS, Romeo MJ, Yu C, Yu CK, Nghiem K, Monsale J, Rick ME, Wink DA, Frazier WA und Roberts DD, „Thrombospondin-1 stimulates platelet aggregation by blocking the antithrombotic activity of nitric oxide/cGMP signaling,“ *Blood*, 2008;111(2):613-623.
- [137] Leung LL, „Role of Thrombospondin in Platelet Aggregation,“ *J Clin Invest*, 1984;74(5):1764-1772.
- [138] Bacon-Baguley T, Ogilvie ML, Gartner TK und Walz DA, „Thrombospondin Binding to Specific Sequences Within the A Alpha- And B Beta-Chains of Fibrinogen,“ *J Biol Chem*, 1990;265(4):2317-2323.
- [139] Bonnefoy A, Daenens K, Feys HB, D. Vos R, Vandervoort P, Vermeylen J, Lawler J und Hoylaerts MF, „Thrombospondin-1 controls vascular platelet recruitment and thrombus adherence in mice by protecting (sub)endothelial VWF from cleavage by ADAMTS13,“ *Blood*, 2006;107(3):955-964.
- [140] Xie L, Chesterman CN und Hogg PJ, „Control of von Willebrand factor multimer size by thrombospondin-1,“ *J Exp Med*, 2001;193(12):1341-1349.

- [141] Narizhneva NV, Razorenova OV, Podrez EA, Chen J, Chandrasekharan UM, DiCorleto PE, Plow EF, Topol EJ und Byzova TV, „Thrombospondin-1 up-regulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium,“ *FASEB J*, 2005;19(9):1158-1160.
- [142] Jurk K, Ritter MA, Schriek C, V. Aken H, Droste DW, Ringelstein EB und Kehrel BE, „Activated monocytes capture platelets for heterotypic association in patients with severe carotid artery stenosis,“ *Thromb Haemost*, 2010;103(6):1193-1202.
- [143] Scott A, Khan KM, Cook JL und Duronio V, „What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus?,“ *Br J Sports Med*, 2004;38(3):248-249.
- [144] Rivas F, „In this Issue: Inflammation,“ *Cell*, 2010;140(6):755,757.
- [145] Wagner DD und Burger PC, „Platelets in inflammation and thrombosis,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003;23(12):2131-2137.
- [146] Fanghangel J und Pschyrembel Redaktion, „<https://www.pschyrembel.de/Monozyten/K0EFK>,“ [Online]. [Zugriff am 15 Juni 2021].
- [147] Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK und Roy S, „Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration,“ *Am J Pathol*, 2015;185(10):2596-2606.
- [148] van Furth R, „Production and migration of monocytes and kinetics of macrophages,“ in *Mononuclear Phagocytes*, Springer Link, 1992, pp. 3-12.
- [149] Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M und Ley K, „Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells,“ *Science*, 2010;327(5966):656-661.
- [150] Christiakov DA, Bobryshev YV und Orekhov AN, „Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis,“ *J Cell Mol Med*, 2016;20(1):17-28.
- [151] Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong JF, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC und Lopez JA, „Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18),“ *J Exp Med*, 2000;192(2):193-204.
- [152] Smith CW, Marlin SD, Rothelin R, Toman C und Anderson DC, „Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro,“ *J Clin Invest*, 1989;83(6):2008-2017.
- [153] Zhang X, Craig SE, Kirby H, H. MJ und Moy VT, „Molecular basis for the dynamic strength of the integrin α 4 β 1/VCAM-1 interaction,“ *Biophys J*, 2004;87(5):3470-3478.
- [154] McEver RP und Cummings RD, „Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment,“ *J Clin Invest*, 1997;100(11 Suppl):S97-S103.
- [155] Adams JC und Lawler J, „The thrombospondins,“ *Int J Biochem Cell Biol*, 2004;36(6):961-968.
- [156] Lesnik P, Rouis M, Skarlatos S, Kruth HS und Chapman MJ, „Uptake of exogenous free cholesterol induces upregulation of tissue factor expression in human monocyte-derived macrophages,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992;89(21):10370-10374.
- [157] Germic N, Frangez Z, Yousefi S und Simon HU, „Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation,“ *Cell Death Differ*, 2019;26(4):715-727.
- [158] Hato T und Dagher PC, „How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble,“ *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015;10(8):1459-1469.
- [159] Yatim KM und Lakkis FG, „A brief journey through the immune system,“ *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015;10(7):1274-1281.

- [160] Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, Rhee JS, Silverstein R, Hoff HF und Freeman MW, „Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages,“ *J Biol Chem*, 2002;277(51):49982-49988.
- [161] Collot-Teixera S, Martin J, McDermott-Rhoe C, Poston R und McGregor JL, „CD36 and macrophages in atherosclerosis,“ *Cardiovasc Res*, 2007;75(3):468-477.
- [162] Moore KJ, E. Khoury J, Medeiros LA, Terada K, Geula C, Luster AD und Freeman MW, „A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid,“ *J Biol Chem*, 2002;277(49):47373-47379.
- [163] Janabi M, Yamashita S, Hirano K, Sakai N, Hiraoka H, Matsumoto K, Zhang Z, Nozaki S und Matsuzawa Y, „Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000;20(8):1953-1960.
- [164] Bobryshev Y, „Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis,“ *Micron*, 2006;37(3):208-22.
- [165] Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Szargiej P und Myśliwska J, „Different pathways of macrophage activation and polarization,“ *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2015;69:496-502.
- [166] Woollard KJ und Geissmann F, „Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions,“ *Nat Rev Cardiol*, 2010;7(2):77-86.
- [167] Libby P und Simon DI, „Inflammation and thrombosis: the clot thickens,“ *Circulation*, 2001;103(13):1718-20.
- [168] Gralnick HR, Williams S, McKeown LP, Hansmann K, F. 2nd JW und Krutzsch H, „High-affinity alpha-thrombin binding to platelet glycoprotein Ib alpha: identification of two binding domains,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994;91(14):6334-6338.
- [169] Stern DM, Bank I, Nawroth PP, Cassimeris J, Kiesel W, F. 2nd JW, Dinarello C, Chess L und Jaffe EA, „Self-regulation of procoagulant events on the endothelial cell surface,“ *J Exp Med*, 1985;162(4):1223-1235.
- [170] Colotta F, Sciacca FL, Sironi M, Luini W, Rabiet MJ und Mantovani A, „Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin,“ *Am J Pathol*, 1994;144(5):975-985.
- [171] Zigmond SH, „Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors,“ *J Cell Biol*, 1977;75(2 Pt 1):606-616.
- [172] Norman KE, Moore KL, M. RP und Ley K, „Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1,“ *Blood*, 1995;86(12):4417-4421.
- [173] Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM und Ley K, „Mac-1, but not LFA-1, uses intercellular adhesion molecule-1 to mediate slow leukocyte rolling in TNF-alpha-induced inflammation,“ *J Immunol*, 2003;171(11):6105-6111.
- [174] Zarbock A, Ley K, McEver RP und Hidalgo A, „Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow,“ *Blood*, 2011;118(26):6743-6751.
- [175] Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME und Lobb RR, „VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site,“ *Cell*, 1990;60(4):577-584.
- [176] Weber KS, v. Hundelshausen P, Clark-Lewis I, Weber PC und Weber C, „Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow,“ *Eur J Immunol*, 1999;29(2):700-712.

- [177] Smith DE, Galkina E, Ley K und Huo Y, „GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow,“ *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005;289(5):H1976-H1984.
- [178] Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM und Kubes P, „Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade,“ *J Exp Med*, 2006;203(12):2569-2575.
- [179] Kummer D und Ebnet K, „Junctional Adhesion Molecules (JAMs): The JAM-Integrin Connection,“ *Cells*, 2018;7(4):25.
- [180] Wojcikiewicz EP, Koenen RP, Fraemohs L, Minkiewicz J, Azad H, Weber C und Moy VT, „LFA-1 binding destabilizes the JAM-A homophilic interaction during leukocyte transmigration,“ *Biophys*, 2009;96(1):285-293.
- [181] Muller WA, „Mechanisms of leukocyte transendothelial migration,“ *Annu Rev Pathol*, 2011;6:323-344.
- [182] Mamdough Z, Chen X, Perini LM, Maxfield FR und Muller WA, „Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis,“ *Nature*, 2003;421(6924):748-753.
- [183] Wettschureck N, Strilic B und Offermanns S, „Passing the Vascular Barrier: Endothelial Signaling Processes Controlling Extravasation,“ *Physiol Rev*, 2019;99(3):1467-1525.
- [184] Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli FM, Nash GB, Chavakis T, Albelda SM, Rainger GE, Meda P, Imhof BA und Nourshargh S, „The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo,“ *Nat Immunol*, 2011;12(8):761-769.
- [185] Fillippi MD, „Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives,“ *Blood*, 2019;133(20):2149-2158.
- [186] Vestweber D, „How leukocytes cross the vascular endothelium,“ *Nat Rev Immunol*, 2015;15(11):692-704.
- [187] Moore KL, Patel KD, Bruehl RD, Li F, Johnson DA, Lichenstein HS, Cummings RD, Bainton DF und McEver RP, „P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin,“ *J Cell Biol*, 1995;128(4):661-671.
- [188] Furman MI, Barnard MR, Krueger LA, Fox ML, Shilale EA, Lessard DM, Marchese P, F. 3rd AL, Goldberg RJ und Michelson AD, „Circulating monocyte-platelet aggregates are an early marker of acute myocardial infarction,“ *J Am Coll Cardiol*, 2001;38(4):1002-1006.
- [189] Sarma J, Laan CA, Alam S, Jha A, Fox KAA und Dransfield I, „Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes,“ *Circulation*, 2002;105(18):2166-2171.
- [190] Zeller JA, Lenz A, Eschenfelder CC, Zunker P und Deuschl G, „Platelet-leukocyte interaction and platelet activation in acute stroke with and without preceding infection,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005;25(7):1519-1523.
- [191] Jurk K und Kehrel BE, „Die zentrale Rolle der Thrombozyten im neuen Verständnis der Hämostase,“ *Hämostaseologie*, 2005;25(1):39-49.
- [192] Huang L, Chambliss KL, G. X, Yuhanna IS, Behling-Kelly E, Bergaya S, Ahmed M, Michaely P, Luby-Phelps K, Darehshouri A, Xu L, Fisher EA, Ge WP, Mineo C und Shaul PW, „SR-B1 drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis,“ *Nature*, 2019;569(7757):565-569.
- [193] Moore KJ, Sheedy FJ und F. EA, „Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance,“ *Nat Rev Immunol*, 2013;13(10):709-721.
- [194] Rhoads JP und Major AS, „How Oxidized Low-Density Lipoprotein Activates Inflammatory Responses,“ *Crit Rev Immunol*, 2018;38(4):333-342.

- [195] Witztum JL und Steinberg D, „Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis,“ *J Clin Invest*, 1991;88(6):1785-1792.
- [196] Pirillo A, Norata GD und Catapano AL, „LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis,“ *Mediators Inflamm*, 2013;152786.
- [197] Gear ARL und Camerini D, „Microcirculation“, 2003;10(3-4):335-350.
- [198] Jaczewska J, Abdulreda MH, Y. CY, Schmitt MM, Schubert I, Berggren PO, Weber C, Koenen RR, Moy VT und Wojckiewicz EP, „TNF- α and IFN- γ promote lymphocyte adhesion to endothelial junctional regions facilitating transendothelial migration,“ *J Leukoc Biol*, 2014;95(2):265-274.
- [199] Llorente-Cortés V, Martínez-González J und Badimon L, „Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998;18(5):738-746.
- [200] Llorente-Cortés V, Martínez-González J und Badimon L, „LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000;20(6):1572-1579.
- [201] Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Y. K und Tang CK, „Foam cells in atherosclerosis,“ *Clin Chim Acta*, 2013;424:245-252.
- [202] Koga JI und Aikawa M, „Crosstalk between macrophages and smooth muscle cells in atherosclerotic vascular diseases,“ *Vascul Pharmacol*, 2012;57(1):24-28.
- [203] Badimon L und Vilahur G, „Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture,“ *J Intern Med*, 2014;276(6):618-632.
- [204] Libby P, „Inflammation in atherosclerosis,“ *Nature*, 2002;420(6917):868-874.
- [205] Llorente-Cortés V, Otero-Viñas M, Camino-López S, Llampayas O und Badimon L, „Aggregated low-density lipoprotein uptake induces membrane tissue factor procoagulant activity and microparticle release in human vascular smooth muscle cells,“ *Circulation*, 2004;110(4):452-459.
- [206] Cooke NM, Egan K, McFadden S, Grogan L, Breathnach OS, O'Leary J, Hennessy BT und Kenny D, „Increased platelet reactivity in patients with late-stage metastatic cancer,“ *Cancer Med*, 2013;2(4):564-570.
- [207] Charles River GmbH, „<https://www.criver.com/>,“ [Online]. Available: <https://www.criver.com/products-services/find-model/jax-c57bl6j-mice?region=23>. [Zugriff am 16. 06. 2021].
- [208] Lawler J, Sunday M, Thibert V, Duquette M, George EL, Rayburn H und Hynes RO, „Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia,“ *J Clin Invest*, 1998;101(5):982-992.
- [209] The Jackson Laboratory, „<https://www.jax.org/>,“ [Online]. Available: <https://www.jax.org/strain/006141>. [Zugriff am 16. 06. 2021].
- [210] Grüner S, Prostredna M, Aktas B, Moers A, Schulte V, Krieg T, O. S, Eckes B und Nieswandt B, „Anti-glycoprotein VI treatment severely compromises hemostasis in mice with reduced alpha2beta1 levels or concomitant aspirin therapy,“ *Circulation*, 2004;110(18):2946-2951.
- [211] Patel SS, Thiagarajan R, W. JT und Yeh ET, „Inhibition of alpha4 integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice,“ *Circulation*, 1998;97(1):75-81.
- [212] Hemker HC, Giesen P, A. Dieri R, Regnault V, d. Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T und Béguin S, „Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma,“ *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2003;33(1):4-15.

- [213] Jurk K, Lahav J, v. Aken H, Brodde MF, Nofer J-R und Kehrel BE, „Extracellular protein disulfide isomerase regulates feedback activation of platelet thrombin generation via modulation of coagulation factor binding,“ *J Thromb Haemost*, 2011;9(11):2278-2290.
- [214] Groot PG et al., „Glykoproteinrezeptoren der Thrombozytenmembran: Biochemie, Molekularbiologie und Physiologie,“ in *Hämostaseologie - Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*, Müller-Berghaus G und Pötzsch B, Hrsg., Berlin, Heidelberg, Springer, 1999;15-26.
- [215] Ninivaggi M, Apitz-Castro R, Dargaud Y, d. Laat B, Hemker HC und Lindhout T, „Whole-blood thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay,“ *Clin Chem*, 2012;58(8):1252-1259.
- [216] Xia Z, Wong T, Liu Q, Kasirer-Friede A, Brown E und Frojmovic MM, „Optimally functional fluorescein isothiocyanate-labelled fibrinogen for quantitative studies of binding to activated platelets and platelet aggregation,“ *Br J Haematol*, 1996;93(1):204-214.
- [217] Fluxion Biosciences Inc., „<https://bioflux.fluixionbio.com>,“ 2008. [Online]. Available: <https://bioflux.fluixionbio.com/application-notes> „Transmigration: Leukocyte transmigration through the endothelium under shear flow“. [Zugriff am 16. 06. 2021].
- [218] Zilberman-Rudenko J, Itakura A, Wiesenekker CP, Vetter R, Maas C, Gailani D, Tucker EI, Gruber A, Gerdes C und McCarty OJT, „Coagulation Factor XI Promotes Distal Platelet Activation and Single Platelet Consumption in the Bloodstream Under Shear Flow,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016;36(3):510-517.
- [219] Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmbäck K, Danton MJ, Colbert MC, Witte DP, Fujikawa K, Davie EW und Degen JL, „Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996;93(13):6258-6263.
- [220] Pawlinski R, Fernandes A, Kehrlé B, Pedersen B, Parry G, Erlich J, Pyo R, Gutstein D, Zhang J, Castellino F, Melis E, Carmeliet P, Baretton G, Luther T, Taubman M, Rosen E und Mackman N, „Tissue factor deficiency causes cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002;99(24):15333-15338.
- [221] Mackman N, „Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004;24(6):1015-1022.
- [222] Magdolen V, Albecht S, Kotzsch M, Haller C, Bürgle M, Jacob U, Grosser M, Kessler H, Graeff H, Müller M, Schmitt M und Luther T, „Immunological and functional analyses of the extracellular domain of human tissue factor,“ *Biol Chem*, 1998;379(2):157-165.
- [223] Owens 3rd AP und Mackman N, „Microparticles in hemostasis and thrombosis,“ *Circ Res*, 2011;108(11):1284-1297.
- [224] Cimmino G, Golino P und Badimon JJ, „Pathophysiological role of blood-borne tissue factor: should the old paradigm be revisited?,“ *Intern Emerg Med*, 2011;6(1):29-34.
- [225] Bogdanov VY und Versteeg HH, „Soluble Tissue Factor" in the 21st Century: Definitions, Biochemistry, and Pathophysiological Role in Thrombus Formation,“ *Semin Thromb Hemost*, 2015;41(7):700-707.
- [226] Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M und Francis JL, „The presence and release of tissue factor from human platelets,“ *Platelets*, 2002;13(4):247-253.
- [227] Bouchard BA, Mann KG und Butenas S, „No evidence for tissue factor on platelets,“ *Blood*, 2010;116(5):854-855.
- [228] Yamamoto M, Nagakaki T und Kisiel W, „Tissue factor-dependent autoactivation of human blood coagulation factor VII,“ *J Biol Chem*, 1992;267(27):19089-19094.

- [229] Trabold K, Makhoul S, Gambaryan S, van Ryn J, Walter U und Jurk K, „The Direct Thrombin Inhibitors Dabigatran and Lepirudin Inhibit GPIIb/IIIa-Mediated Platelet Aggregation,“ *Thromb Haemost*, 2019;119(6):916-929.
- [230] van Dieijen G, Tans G, Rosing J und Hemker HC, „The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X,“ *J Biol Chem*, 1981;256(7):3433-3442.
- [231] Hoffman M und Monroe 3rd DM, „A cell-based model of hemostasis,“ *Thromb Haemost*, 2011;85(6):958-965.
- [232] Grover SP, Schmedes CM, Auriemma AC, Butler E, Parrish ML, Misztal A, Cleuren AC, Visser M, Heitmeier S, Posma JJ, Spronk HM, A. S, Wolberg AS, Pawlinski R, Gailani D und Mackman N, „Differential roles of factors IX and XI in murine placenta and hemostasis under conditions of low tissue factor,“ *Blood Adv*, 2020;4(1):207-216.
- [233] Nemerson Y, „The reaction between bovine brain tissue factor and factors VII and X,“ *Biochemistry*, 1966;5(2):601-608.
- [234] Kiouptsi K, Grill A, Mann A, Döhrmann M, Lillich M, Jäckel S, M. F, Formes H, Manukyan D, Subramaniam S, Khandagale A, Karwot C, Thal SC, Bosmann M, Scharrer I, Jurk K und Reinhardt C, „Mice deficient in the anti-haemophilic coagulation factor VIII show increased von Willebrand factor plasma levels,“ *PLoS One*, 2017;12(8):e0183590.
- [235] Oldenburg J und Brackmann HH, „Diagnostik, Klinik und Therapie der Hämophilie A und B,“ in *Hämostaseologie*, Müller-Berghaus G und Pötzsch B, Hrsg., Berlin, Heidelberg, Springer, 1999;185-197.
- [236] Krenzlin H, Lorenz V, Danckwardt S, Kempinski O und Alessandri B, „The Importance of Thrombin in Cerebral Injury and Disease,“ *Int J Mol Sci*, 2016;17(1):84.
- [237] Dwerchin M, Liang Z, Moons L, Carmeliet P, Castellino FJ, Collen D und Rosen ED, „Blood coagulation factor X deficiency causes partial embryonic lethality and fatal neonatal bleeding in mice,“ *Thromb Haemost*, 2000;83(2):185-190.
- [238] Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkhardt MC, Holmbäck K, Xiao Q, Bugge TH und Degen SJ, „Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998;95(13):7597-7602.
- [239] Cui J, O'Shea KS, Purkayastha A, Saunders TL und Ginsburg D, „Fatal haemorrhage and incomplete block to embryogenesis in mice lacking coagulation factor V,“ *1996;384(6604):66-68*.
- [240] Grottke O, Moser O, Farrag A, Elbracht M, Orlikowsky T und Trepels-Kotte S, „Plasma-derived Factor X therapy for treatment of intracranial bleeding in a patient with Factor X deficiency: a case report,“ *Transfusion*, 2019;59(7):2228-2233.
- [241] Lancelotti S, Basso M und D. Cristofaro R, „Congenital prothrombin deficiency: an update,“ *Semin Thromb Hemost*, 2013;39(6):596-606.
- [242] Asselta R und Peyvandi F, „Factor V deficiency,“ *Semin Thromb Hemost*, 2009;35(4):382-389.
- [243] Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Welden PA und Reitsma PH, „Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C,“ *Nature*, 1994;369(6475):64-67.
- [244] Tracy PB, Eide LL, Bowie EJ und Mann KG, „Radioimmunoassay of factor V in human plasma and platelets,“ *Blood*, 1982;60(1):59-63.
- [245] Yang Y, Xiao L, Chen N, Li Y, Deng X, Wang L, Sun H und Wu J, „Platelet-derived factor V promotes angiogenesis in a mouse hind limb ischemia model,“ *J Vasc Surg*, 2017;65(4):1180-1188.e1.

- [246] Meijers JC, Tekelenburg WL, Nouma BN, B. RM und Rosendaal FR, „High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis,“ *N Engl J Med*, 2000;342(10):696-701.
- [247] Salomon O, Steinberg DM und Seligsohn U, „Variable bleeding manifestations characterize different types of surgery in patients with severe factor XI deficiency enabling parsimonious use of replacement therapy,“ *Haemophilia*, 2006;12(5):490-493.
- [248] Salomon O, Steinberg DM, Zucker M, Varon D, Zivelin A und Seligsohn U, „Patients with severe factor XI deficiency have a reduced incidence of deep-vein thrombosis,“ *Thromb Haemost*, 2011;105(2):269-273.
- [249] Salomon O, Steinberg DM, Koren-Morag N, Tanne D und Seligsohn U, „Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency,“ *Blood*, 2008;111(8):4113-4117.
- [250] Keularts IM, Zivelin A, Seligsohn U, Hemker HC und Béguin S, „The role of factor XI in thrombin generation induced by low concentrations of tissue factor,“ *Thromb Haemost*, 2001;85(6):1060-1065.
- [251] Wielders SJH, Béguin S, Hemker HC und Lindhout T, „Factor XI-dependent reciprocal thrombin generation consolidates blood coagulation when tissue factor is not available,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004;24(6):1138-1142.
- [252] Kravtsov DV, Matafonov A, Tucker EI, Sun MF, Walsh PN, Gruber A und Gailani D, „Factor XI contributes to thrombin generation in the absence of factor XII,“ *Blood*, 2009;114(2):452-458.
- [253] Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM, Schmidbauer S, Gahl WA, Morrissey JH und Renné T, „Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo,“ *Cell*, 2009;139(6):1143-1156.
- [254] Brunnée T, Reddigari SR, Shibayama Y, Kaplan AP und Silverberg M, „Mast cell derived heparin activates the contact system: a link to kinin generation in allergic reactions,“ *Clin Exp Allergy*, 1997;27(6):653-663.
- [255] Nickel KF und Rennée T, „Crosstalk of the plasma contact system with bacteria,“ *Thromb Res*, 2012;130 Suppl 1:S78-83.
- [256] Gailani D und Rennée T, „Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007;27(12):2507-2513.
- [257] Müller F und Rennée T, „Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system,“ *Curr Opin Hematol*, 2008;15(5):516-521.
- [258] Weiss HJ und Turitto VT, „Prostacyclin (prostaglandin I₂, PGI₂) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium,“ *Blood*, 1979;53(2):244-250.
- [259] Schrör K, Darius H, Matzky R und Ohlendorf R, „The antiplatelet and cardiovascular actions of a new carbacyclin derivative (ZK 36 374)--equipotent to PGI₂ in vitro,“ *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1981;316(3):252-255.
- [260] Chakraborty R, Pydi SP, Gleim S, Bhullar RP, Hwa J, Dakshinamurti S und Chelikani P, „New insights into structural determinants for prostanoid thromboxane A₂ receptor- and prostacyclin receptor-G protein coupling,“ *Mol Cell Biol*, 2013;33(2):184-193.
- [261] Smolenski A, „Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets,“ *J Thromb Haemost*, 2012;10(2):167-176.
- [262] Döhrmann M, Makhoul S, G. K, Krause M, Pillitteri D, von Auer C, Walter U, Lutz J, Volf I, Kehrel BE und Jurk K, „CD36-fibrin interaction propagates FXI-dependent thrombin generation of human platelets,“ *FASEB J*, 2020;34(7):9337-9357.

- [263] Assinger A, Koller F, Schmid W, Zellner M, Babeluk R, Koller E und Volf I, „Specific binding of hypochlorite-oxidized HDL to platelet CD36 triggers proinflammatory and procoagulant effects,“ *Atherosclerosis*, 2010;212(1):152-160.
- [264] Yamaguchi A, Yamamoto N, A. N, Saido TC, K. M, U. M und Tanoue K, „PS-liposome and ox-LDL bind to different sites of the immunodominant domain (#155-183) of CD36: a study with GS95, a new anti-CD36 monoclonal antibody,“ *Thromb Res*, 2000;97(5):317-326.
- [265] Kieffer N, Bettaieb A, L. C, Coulombel L, Vainchenker W, Edelman L und Breton-Gorius J, „Developmentally regulated expression of a 78 kDa erythroblast membrane glycoprotein immunologically related to the platelet thrombospondin receptor,“ *Biochem*, 1989;262(3):835-842.
- [266] Daviet L, Buckland R, Puente Navazo MD und McGregor JL, „Identification of an immunodominant functional domain on human CD36 antigen using human-mouse chimaeric proteins and homologue-replacement mutagenesis,“ *Biochem*, 1995;305(Pt 1)(Pt 1):221-224.
- [267] Puente-Navazo MD, Daviet L, Ninio E und McGregor JL, „Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL),“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996;16(8):1033-1039.
- [268] Hoogenboom HR, Lutgerink JT, Pelsers MM, Rousch MJ, Coote J, Van Neer N, De Bruïne A, Van Nieuwenhoven FA, Glatz JF und Arends JW, „Selection-dominant and nonaccessible epitopes on cell-surface receptors revealed by cell-panning with a large phage antibody library,“ *Eur J Biochem*, 1999;260(3):774-784.
- [269] Howard LM, Puente Navazo MD und McGregor JL, „Identification of CD36-reactive antibodies that bind an epitope encompassing amino acid residues 155-183,“ in *Leukocyte typing VI - Sixth international workshop and conference*, T. Kishimoto, H. Kikutani, A. von dem Borne, S. Goyert, D. Mason, M. Miyasaka, L. Moretta, K. Okumura, S. Shaw, T. Springer, K. Sugamura und H. Zola, Hrsg., Kobe, Japan, Garland, 1996; 637-638.
- [270] Englyst NA, Taube JM, Aitman TJ, Baglin TP und Byrne CD, „A novel role for CD36 in VLDL-enhanced platelet activation,“ *Diabetes*, 2003;52(5):1248-1255.
- [271] Arman M und Krauel K, „Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis,“ *J Thromb Haemost*, 2015;13(6):893-908.
- [272] Love-Gregory L, Sherva R, Schappe T, Qi JS, McCrea J, Klein S, Connelly MA und Bumrad NA, „Common CD36 SNPs reduce protein expression and may contribute to a protective atherogenic profile,“ *Hum Mol Genet*, 2011;20(1):193-201.
- [273] Ghosh A, Murugesan G, Chen K, Zhang L, Wang Q, Febbraio M, Anselmo RM, Marchant K, Barnard J und Silverstein RL, „Platelet CD36 surface expression levels affect functional responses to oxidized LDL and are associated with inheritance of specific genetic polymorphisms,“ *Blood*, 2011;117(23):6355-6366.
- [274] Madan N, Ghazi AR, Kong X, Chen ES, Shaw CA und Edelstein LC, „Functionalization of CD36 cardiovascular disease and expression associated variants by interdisciplinary high throughput analysis,“ *PLoS Genet*, 2019;15(7):e1008287.
- [275] Dörmann D, Clemetson KJ und Kehrel BE, „The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity,“ *Blood*, 2000;96(7):2469-2478.
- [276] Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E und Béguin S, „Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system,“ *Thromb Haemost*, 2006;96(5):553-561.
- [277] Barrett JS, Murphy G, Peerlinck K, De Lepeleire I, Gould RJ, Panebianco D, Hand E, Deckmyn H, Vermeylen J und Arnout J, „Pharmacokinetics and pharmacodynamics of MK-383, a selective non-peptide platelet glycoprotein-IIb/IIIa receptor antagonist, in healthy men,“ *Clin Pharmacol Ther*, 1994;56(4):377-388.

- [278] Lynch Jr JJ, Cook JJ, Sitko GR, Holahan MA, Ramjit DR, Mellott MJ, Stranieri MT, Stabilito II, Zhang G und Lynch RJ, „Nonpeptide glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. 5. Antithrombotic effects of MK-0383,“ *J Pharmacol Exp Ther*, 1995;272(1):20-32.
- [279] Vanschoonbeek K, Feijge MAH, Van Kampen RJW, Kenis H, Hemker HC, Giesen PLA und Heemskerk JWM, „Initiating and potentiating role of platelets in tissue factor-induced thrombin generation in the presence of plasma: subject-dependent variation in thrombogram characteristics,“ *J Thromb Haemost*, 2004;2(3):476-484.
- [280] Weiss HJ und Ames RP, „Ultrastructural findings in storage pool disease and aspirin-like defects of platelets,“ *Am J Pathol*, 1973;71(3):447-466.
- [281] Nergiz-Unal R, Lamers MME, Van Kruchten R, Luiken JJ, Cosemans JMEM, Glatz JFC, Kuijpers MJE und Heemskerk JWM, „Signaling role of CD36 in platelet activation and thrombus formation on immobilized thrombospondin or oxidized low-density lipoprotein,“ *J Thromb Haemost*, 2011;9(9):1835-1846.
- [282] Silverstein RL, Baird M, Lo SK und Yesner LM, „Sense and antisense cDNA transfection of CD36 (glycoprotein IV) in melanoma cells. Role of CD36 as a thrombospondin receptor,“ *J Biol Chem*, 1992;267(23):16607-16612.
- [283] Annis J, Murphy-Ullrich JE und Mosher DF, „Function-blocking antithrombospondin-1 monoclonal antibodies,“ *J Thromb Haemost*, 2006;4(2):459-468.
- [284] Asch AS, Silbiger S, Heimer E und Nachman RL, „Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding,“ *Biochem Biophys Res Commun*, 1992;182(3):1208-1217.
- [285] Leung LL, Li WX, McGregor JL, Albrecht G und Howard RJ, „CD36 peptides enhance or inhibit CD36-thrombospondin binding. A two-step process of ligand-receptor interaction,“ *J Biol Chem*, 1992;267(25):18244-18250.
- [286] Parker RI und Gralnick HR, „Fibrin monomer induces binding of endogenous platelet von Willebrand factor to the glyocalicin portion of platelet glycoprotein IB,“ *Blood*, 1987;70(5):1589-1594.
- [287] Tuszynski GP, Srivastava S, Switalska HI, Holt JC, Cierniewski CS und Niewiarowski S, „The interaction of human platelet thrombospondin with fibrinogen. Thrombospondin purification and specificity of interaction,“ *J Biol Chem*, 1985;260(22):12240-12245.
- [288] Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M und Reitsma PH, „New fundamentals in hemostasis,“ *Physiol Rev*, 2013;93(1):327-358.
- [289] Rosing J, van Rijn JL, Bevers EM, van Dieijen G, Comfurius P und Zwaal RF, „The role of activated human platelets in prothrombin and factor X activation,“ *Blood*, 1985;65(2):319-332.
- [290] Zwaal RF, Comfurius P und Bevers EM, „Mechanism and function of changes in membrane-phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes,“ *Biochem Soc Trans*, 1993;21(2):248-253.
- [291] Thiagarajan P und Tait JF, „Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets,“ *J Biol Chem*, 1990;265(29):17420-17423.
- [292] Heemskerk JWM, Mattheij NJA und Cosemans JMEM, „Platelet-based coagulation: different populations, different functions,“ *J Thromb Haemost*, 2013;11(1):2-16.
- [293] DSM Nutritional Products Ltd Branch Pentapharm, „www.pentapharm.com,“ Mai 2019. [Online]. Available: https://www.pentapharm.com/wp-content/uploads/2019/05/101-04_DSe_Batroxobin-maranhao.pdf. [Zugriff am 16. 06. 2021].
- [294] Laudano AP und Doolittle RF, „Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1978;75(7):3085-3089.

- [295] Frieda S, Pearce A, Wu J und Silverstein RL, „Recombinant GST/CD36 fusion proteins define a thrombospondin binding domain. Evidence for a single calcium-dependent binding site on CD36,“ *J Biol Chem*, 1995;270(7):2981-2986.
- [296] Berliner JA und Watson AD, „A role for oxidized phospholipids in atherosclerosis,“ *N Engl J Med*, 2005;353(1):9-11.
- [297] Mackman N, Tilley RE und Key NS, „Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis,“ *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007;27(8):1687-1693.
- [298] Arnaout MA, „Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18,“ *Blood*, 1990;75(5):1037-1050.
- [299] Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA und Springer TA, „Induction by IL 1 and interferon- γ : tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1),“ *J Immunol*, 2011;186(9):5024-5033.
- [300] Yonekawa K und Harlan JM, „Targeting leukocyte integrins in human diseases,“ *J Leukoc Biol*, 2005;77(2):129-140.
- [301] Han X, Fiehler R und Broze Jr GJ, „Isolation of a protein Z-dependent plasma protease inhibitor,“ *Proc natl Acad Sci U S A*, 1998;95(16):9250-9255.
- [302] Han X, Huang ZF, Fiehler R und Broze Jr GJ, „The protein Z-dependent protease inhibitor is a serpin,“ *Biochemistry*, 1999;38(34):11073-11078.
- [303] Preusch MR, Ieronimakis N, Wijelath ES, Cabbage S, Ricks J, Bea F, Reyes M, van Ryn J und Rosenfeld ME, „Dabigatran etexilate retards the initiation and progression of atherosclerotic lesions and inhibits the expression of oncostatin M in apolipoprotein E-deficient mice,“ *Drug Des Devel Ther*, 2015;9:5203-5211.
- [304] Borissoff JI, Otten JJT, Heeneman S, Leenders P, van Oerle R, Soehnlein O, Loubale STBG, Hamulyák K, Hackeng TM, Daemen MJAP, Degen JL, Weiler H, Esmon CT, van Ryn J, Biessen EAL, Spronk HMH und ten Cate H, „Genetic and pharmacological modifications of thrombin formation in apolipoprotein e-deficient mice determine atherosclerosis severity and atherothrombosis onset in a neutrophil-dependent manner,“ *PLoS One*, 2013;8(2):e55784.
- [305] Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone Jr MA und Seed B, „Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins,“ *Science*, 1989;243(4895):1160-1165.
- [306] Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD und Springer TA, „A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1,“ *J Immunol*, 1986;137(4):1270-1274.
- [307] Lin CC, Pan CS, Wang CY, Liu SW, Hsiao LD und Yang CM, „Tumor necrosis factor- α induces VCAM-1-mediated inflammation via c-Src-dependent transactivation of EGF receptors in human cardiac fibroblasts,“ *J Biomed Sci*, 2015;22(1):53.
- [308] Lo HM, Lai TH, Li CH und Wu WB, „TNF- α induces CXCL1 chemokine expression and release in human vascular endothelial cells in vitro via two distinct signaling pathways,“ *Acta Pharmacol Sin*, 2014;35(3):339-350.
- [309] McKellar GE, McCarey DW, Sattar N und McInnes IB, „Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease,“ *Nat Rev Cardiol*, 2009;6(6):410-417.
- [310] Wen DZ, Rowland A und Derynck R, „Expression and secretion of gro/MSGA by stimulated human endothelial cells,“ *EMBO J*, 1989;8(6):1761-1766.
- [311] Chen YM, Chiang WC, Lin SL, Wu KD, Tsai TJ und Hsieh BS, „Dual regulation of tumor necrosis factor- α -induced CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 expression in vascular smooth muscle cells by nuclear factor- κ B and activator protein-1: modulation by type III phosphodiesterase inhibition,“ *J Pharmacol Exp Ther*, 2004;309(3):978-986.
- [312] Kusano KF, Nakamura K, Kusano H, Nishii N, Banba K, Ikeda T, Hashimoto K, Yamamoto M, Fujio H, Miura A, Ohta K, Morita H, Saito H, Emori T, Nakamura Y, Kusano I und Ohe T,

- „Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis,” *Circ J*, 2004;68(7):671-676.
- [313] Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ und Singh RK, „IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis,” *J Immunol*, 2003;170(6):3369-3376.
- [314] Bevilacqua MP, „Endothelial-leukocyte adhesion molecules,” *Annu Rev Immunol*, 1993;11:767-804.
- [315] Schenkel AR, Mamdouh Z und Muller WA, „Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation,” *Nat Immunol*, 2004;5(4):393-400.
- [316] Prescott SM, Zimmerman GA und McIntyre TM, „Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984;81(11):3534-3538.
- [317] Zimmerman GA, McIntyre TM und Prescott SM, „Thrombin stimulates the adherence of neutrophils to human endothelial cells in vitro,” *J Clin Invest*, 1985;76(6):2235-2246.
- [318] Bastiaans J, Mulder VC, van Meurs JC, Smits-Te Nijenhuis M, van Holten-Neelen C, van Hagen PM und Dik WA, „Dabigatran inhibits intravitreal thrombin activity,” *Acta Ophthalmol*, 2018;96(5):452-458.
- [319] Feldmann K, Grandoch M, Kohlmorgen C, Valentin B, Gerfer S, Nagy N, Hartwig S, Lehr S, F. AC und Fischer JW, „Decreased M1 macrophage polarization in dabigatran-treated Ldlr-deficient mice: Implications for atherosclerosis and adipose tissue inflammation,” *Atherosclerosis*, 2019;287:81-88.
- [320] Dittmeier M, Wassmuth K, Schuhmann MK, Kraft P, Kleinschnitz C und Fluri F, „Dabigatran Etxilate Reduces Thrombin-Induced Inflammation and Thrombus Formation in Experimental Ischemic Stroke,” *Curr Neurovasc Res*, 2016;13(3):199-206.
- [321] Lawler JW, Slayter HS und Coligan JE, „Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets,” *J Biol Chem*, 1978;253(23):8609-8616.
- [322] McPherson J, Sage H und Bornstein P, „Isolation and characterization of a glycoprotein secreted by aortic endothelial cells in culture. Apparent identity with platelet thrombospondin,” *J Biol Chem*, 1981;256(21):11330-11336.
- [323] Raugi GJ, Mumby SM, Abbott-Brown D und Bornstein P, „Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture,” *J Cell Biol*, 1982;95(1):351-354.
- [324] Majack RA, Cook SC und Bornstein P, „Control of smooth muscle cell growth by components of the extracellular matrix: autocrine role for thrombospondin,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986; 83(23):9050-9054.
- [325] Yabkovitz R, Mansfield PJ, Ryan US und Suchard SJ, „Thrombospondin mediates migration and potentiates platelet-derived growth factor-dependent migration of calf pulmonary artery smooth muscle cells,” *J Cell Physiol*, 1993;157(1):24-32.
- [326] Patel MK, Lymn JS, Clunn GF und Hughes AD, „Thrombospondin-1 is a potent mitogen and chemoattractant for human vascular smooth muscle cells,” *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997;17(10):2107-2114.
- [327] Isenberg JS, Wink DA und Roberts DD, „Thrombospondin-1 antagonizes nitric oxide-stimulated vascular smooth muscle cell responses,” *Cardiovasc Res*, 2006;71(4):785-793.
- [328] Moura R, Tjwa M, Vandervoort P, Van Kerckhoven S, Holvoet P und Hoylaerts MF, „Thrombospondin-1 deficiency accelerates atherosclerotic plaque maturation in ApoE-/- mice,” *Circ Res*, 2008;103(10):1181-1189.

- [329] Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C und Heldin CH, „Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization,“ *J Biol Chem*, 1988;263(13):6407-6415.
- [330] Murphy-Ullrich JE, Schultz-Cherry S und Höök M, „Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin,“ *Mol Biol Cell*, 1992;3(2):181-188.
- [331] Ribeiro SM, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M und Murphy-Ullrich JE, „The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta,“ *J Biol Chem*, 1999;274(19):13586-13593.
- [332] Schultz-Cherry SS und Murphy-Ullrich JE, „Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism,“ *J Cell Biol*, 1993;122(4):923-932.
- [333] Müller G, Behrens J, Nussbaumer U, Böhlen P und Birchmeier W, „Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987;84(16):5600-5604.
- [334] Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V und Kehrl JH, „Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro,“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986;83(12):4167-4171.
- [335] Allen JB, Manthey CL, H. AR, Ohura K, Ellingsworth L und Wahl SM, „Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta,“ *J Exp Med*, 1990;171(1):231-247.
- [336] Travis MA und Sheppard D, „TGF- β activation and function in immunity,“ *Annu Rev Immunol*, 2014;32:51-82.
- [337] Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA und Bouck NP, „CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells,“ *J Cell Biol*, 1997;138(3):707-717.
- [338] Gao AG und Frazier WA, „Identification of a receptor candidate for the carboxyl-terminal cell binding domain of thrombospondins,“ *J Biol Chem*, 1994;269(47):29650-29657.
- [339] Sick E, Jeanne A, Schneider C, Dedieu S, Takeda K und Martiny L, „CD47 update: a multifaceted actor in the tumour microenvironment of potential therapeutic interest,“ *Br J Pharmacol*, 2012;167(7):1415-1430.
- [340] Schwartz MA, Brown EJ und Fazeli B, „A 50-kDa integrin-associated protein is required for integrin-regulated calcium entry in endothelial cells,“ *J Biol Chem*, 1993;268(27):19931-19934.
- [341] Cooper D, Lindberg FP, Gamble JR, Brown EJ und Vadas MA, „Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein (CD47),“ *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995;92(9):3978-3982.
- [342] Parkos CA, Colgan SA, Liang TW, Nusrat A, Bacarra AE, Carnes DK und Madara JL, „CD47 mediates post-adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia,“ *J Cell Biol*, 1996;132(3):437-450.
- [343] Goldblum SE, Young BA, Wang P und Murphy-Ullrich JE, „Thrombospondin-1 induces tyrosine phosphorylation of adherens junction proteins and regulates an endothelial paracellular pathway,“ *Mol Cell Biol*, 1999;10(5):1537-51.
- [344] Wessel F, Winderlich M, Holm M, Frye M, Rivera-Galdos R, Vockel M, Linnepe R, Ipe U, Stadtmann A, Zarbock A, Nottebaum AF und Vestweber D, „Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin,“ *Nat Immunol*, 2014;15(3):223-230.

- [345] Petri B, Broermann A, Li H, Khandoga AG, Zarbock A, Krombach F, George T, Schneider SW, Jones C, Nieswandt B, Wild MK und Vestweber D, „von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation,“ *Blood*, 2010;116(22):4712-4719.
- [346] Zuchtriegel G, Uhl B, Puhr-Westerheide D, Pörnbacher M, Lauber K, Krombach F und Reichel CA, „Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation,“ *PLoS Biol*, 2016;14(5):e1002459.
- [347] Braun LJ, Stegmeyer RI, Schäfer K, Volkery S, Currie SM, Kempe B, Nottebaum AF und Vestweber D, „Platelets docking to VWF prevent leaks during leukocyte extravasation by stimulating Tie-2,“ *Blood*, 2020;136(5):627-639.

Publikationen

Döhrmann M, Makhoul S, Gross K, Krause M, Pillitteri D, von Auer C, Walter U, Lutz J, Volf I, Kehrel BE, Jurk K. **CD36-fibrin interaction propagates FXI-dependent thrombin generation of human platelets.** *FASEB J.* 2020 Jul;34(7):9337-9357. doi: 10.1096/fj.201903189R. Epub 2020 May 28. PMID: 32463151

Ebert J, Wilgenbus P, Teiber JF, Jurk K, Schwierczek K, Döhrmann M, Xia N, Li H, Spiecker L, Ruf W, Horke S. **Paraoxonase-2 regulates coagulation activation through endothelial tissue factor.** *Blood.* 2018 May 10;131(19):2161-2172. doi: 10.1182/blood-2017-09-807040. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29439952.

Kiouptsi K, Grill A, Mann A, Döhrmann M, Lillich M, Jäckel S, Malinarich F, Formes H, Manukyan D, Subramaniam S, Khandagale A, Karwot C, Thal SC, Bosmann M, Scharrer I, Jurk K, Reinhardt C. **Mice deficient in the anti-haemophilic coagulation factor VIII show increased von Willebrand factor plasma levels.** *PLoS One.* 2017 Aug 24;12(8):e0183590. doi: 10.1371/journal.pone.0183590. PMID: 28837614; PMCID: PMC5570278.

Döhrmann M, Schorr A, Hülsenbeck J, Rasmussen TL, Issinger OG, Fritz G. **Comparative analysis of stress responses of H9c2 rat cardiomyoblasts following treatment with doxorubicin and tBOOH.** *Exp Cell Res.* 2012 Apr 1;318(6):779-88. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.01.010. Epub 2012 Jan 13. PMID: 22265794.

Danksagung

Lebenslauf

