

1. Medizinische Klinik und Poliklinik der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Die Rolle von Tissue Factor und
Tissue Factor Pathway Inhibitor-1 bei der
Regulation der prokoagulatorischen Aktivität
von Monozyten im akuten Myokardinfarkt**

Stefanie Maria Geith

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F.-J. M. Neumann
2. Privatdozent Dr. M. P. Gawaz

Die Dissertation wurde am 26.04.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.07.2001 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Allgemeine Einführung	4
1.2. Pathogenese der Koronarthrombose auf dem Boden atherosklerotischer Veränderungen	4
1.3. Behandlungsmöglichkeiten des akuten Koronarsyndroms	8
1.3.1. PTCA/Stentimplantation	8
1.3.2. Pharmakologische Thrombolyse	9
1.4. Lokale Aktivierung von Leukozyten nach Reperfusion eines Myokardinfarktareals	8
1.5. Theoretische Grundlagen	9
1.5.1. Tissue Factor	9
1.5.1.1. Molekulare Struktur.....	9
1.5.1.2. Expression in vivo.....	10
1.5.1.2.1. Physiologisch.....	10
1.5.1.2.2. Stimuliert.....	11
1.5.1.3. Funktion.....	11
1.5.1.3.1. Physiologisch.....	11
1.5.1.3.2. Stimuliert.....	14
1.5.1.3.3. Im Rahmen der Atherogenese.....	15
1.5.2. Tissue Factor Pathway Inhibitor-1	18
1.5.2.1. Molekulare Struktur.....	18
1.5.2.2. Expression in vivo.....	19
1.5.2.2.1. Physiologisch.....	19
1.5.2.2.2. Stimuliert.....	19
1.5.2.3. Funktion.....	20
1.5.2.3.1. Tissue Factor-Inhibition durch Tissue Factor Pathway Inhibitor-1 auf Endothelzellen.....	20
1.5.2.3.2. Tissue Factor-Inhibition durch Tissue Factor Pathway Inhibitor-1 auf zirkulierenden Monozyten.....	22
2. Zielsetzung der Studie	24

3. Studiendesign	26
3.1. Studienpopulation	26
3.1.1. Einschlusskriterien	26
3.1.1.1. Patientengruppe.....	26
3.1.1.2. Kontrollgruppe.....	26
3.1.2. Ausschlusskriterien	26
3.2. Abnahmeprotokoll	27
4. Methoden	29
4.1. Durchflusszytometrie	29
4.1.1. Aufbau eines Durchflusszytometers.....	29
4.1.2. Funktionsprinzip.....	29
4.1.3. Applikationsmöglichkeiten.....	30
4.2. Probenaufbereitung	30
4.2.1. FACS-Färbung.....	30
4.2.2. RNA-Isolierung.....	31
4.2.3. RT-PCR.....	32
4.2.4. Isolation mononukleärer Zellen.....	33
4.2.5. Messung der Faktor Xa-Bildung.....	34
4.2.6. Isolierung Triton X 114-unlöslicher Membranfraktionen.....	34
4.2.7. Proteinanalyse mittels Western Blotting.....	35
4.2.8. Messung der Prothrombinfragmente F_{1+2}	35
4.3. Statistische Auswertung	36

5. Ergebnisse	36
5.1. Demographische Daten der Studienpopulation	36
5.2. Transkriptionsrate und Oberflächen-Expression von Tissue Factor und Tissue Factor Pathway Inhibitor-1 auf zirkulierenden Monozyten	38
5.3. Funktionelle Konsequenzen der Tissue Factor- und Tissue Factor Pathway-1 Inhibitor-Expression	44
5.4. Tissue Factor Pathway Inhibitor-1-Verankerung auf Monozyten	47
6. Diskussion	48
6.1. Tissue Factor und prokoagulatorische Aktivität von Monozyten im akuten Myokardinfarkt	48
6.2. Partielle Hemmung der Tissue Factor-Aktivität durch Tissue Factor Pathway Inhibitor-1	48
6.3. Zusammenfassung der Studienergebnisse	51
6.4. Studienbeschränkungen	51
6.5. Therapeutische Bedeutung der Studienresultate	52
7. Zusammenfassung	53
8. Literaturverzeichnis	54
Danksagung	69
Lebenslauf	70

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung

Auch wenn der Herzinfarkt durch eine Schwerpunktverlagerung der Medienberichterstattung zugunsten sensationsträchtiger Krankheitsbilder, wie z.B. die Pandemie AIDS, oder auch exotische Infektionskrankheiten, wie das Lassa-Fieber, v.a. aber der ebenfalls im Vormarsch befindlichen Krebserkrankungen, welche mittels publikumswirksamer Schlagzeilen traurige Popularität erlangten, etwas in den Hintergrund des öffentlichen Interesses geraten ist, so kann diese Entwicklung dennoch nicht darüber hinweg täuschen, dass der Tod durch Herz-Kreislaufkrankungen in den Industrieländern immer noch die häufigste Todesursache und somit in Zeiten generalisierter Sparmaßnahmen auch ein nicht zu vernachlässigendes sozioökonomisches Problem darstellt.

Dem akuten Myokardinfarkt kommt hierbei angesichts einer Vielzahl probater Präventionsmaßnahmen nicht nur aus wirtschaftlicher Perspektive auf der einen, sondern auch aufgrund einer bei auch hinsichtlich des zeitlichen Rahmens optimaler Ausschöpfung sämtlicher etablierter Therapiemaßnahmen prognostisch günstigen Beeinflussung der Überlebensrate auch aus medizinischer und wissenschaftlicher Sicht auf der anderen Seite eine herausragende Stellung zu, so dass eine Optimierung der gegebenen Möglichkeiten bzw. eine Neuorientierung in Richtung zusätzlicher Therapieansätze durchaus zukunftssträchtig und erfolgversprechend anmutet.

1.2. Pathogenese der Koronarthrombose auf dem Boden atherosklerotischer Veränderungen

Von pathogenetischer Bedeutung bei der Entstehung der Atherosklerose kann im frühen Stadium die Adhärenz von zirkulierenden Monozyten an das Endothel, sowie deren Migration in die Intima der Gefäßwand, wo sie zu Makrophagen heranreifen, angesehen werden (Ross et al., 86). Eine Exposition dieser Makrophagen gegenüber oxidativ veränderten Low Density Lipoproteinen (LDL) im atherosklerotischen Plaques bewirkt eine Expression von Adhäsionsmolekülen, wie Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) und führt zur intrazellulären Cholesterindeposition, sowie zur Bildung lipidbeladener sogenannter „Schaumzellen“, deren TF-Expression und somit ihre Thrombogenität im Falle einer Fissur oder Ruptur des atherosklerotischen Plaques wiederum durch oxidativ verändertes LDL (oxLDL) hochreguliert werden kann (Petit et al., 99) und somit durch vermehrte TF-Freisetzung eine unmittelbare, durch

Abgabe von Phospholipiden zusätzlich getriggerte (Bacon et al., 96) Aktivierung der Gerinnungskaskade bewirkt.

Aber auch die unmittelbare Endothelschädigung aufgrund der direkten Zytotoxizität von oxLDL und Makrophagen mit nachfolgender Freisetzung von Zytokinen, wie Interleukin-1 (IL-1) oder Platelet Derived Growth Factor (PDGF), mit Thrombozytenadhäsion und Zellaktivierung, die wiederum zur vermehrten TF-Synthese führt, begünstigt somit durch die Induktion einer progredienten Arteriosklerose das Auftreten thrombotischer Ereignisse im atherosklerotischen Gefäß.

Zusätzlich zu diesem Beitrag des TF an der *lokalen* Gerinnungsaktivierung unterhält dieser durch seine vermehrte Oberflächenexpression auf durch Freisetzung inflammatorischer Mediatoren, wie IL-6 und IL-8, aus dem atherosklerotischen Plaque, dem Endothel, sowie dem Zelluntergang durch Ischämie vermittelten generalisierten Entzündung aktivierten zirkulierenden Monozyten weiterhin einen Zustand der Hyperkoagulabilität als Folge einer *systemischen* Entzündungsreaktion (Neumann et al., 95).

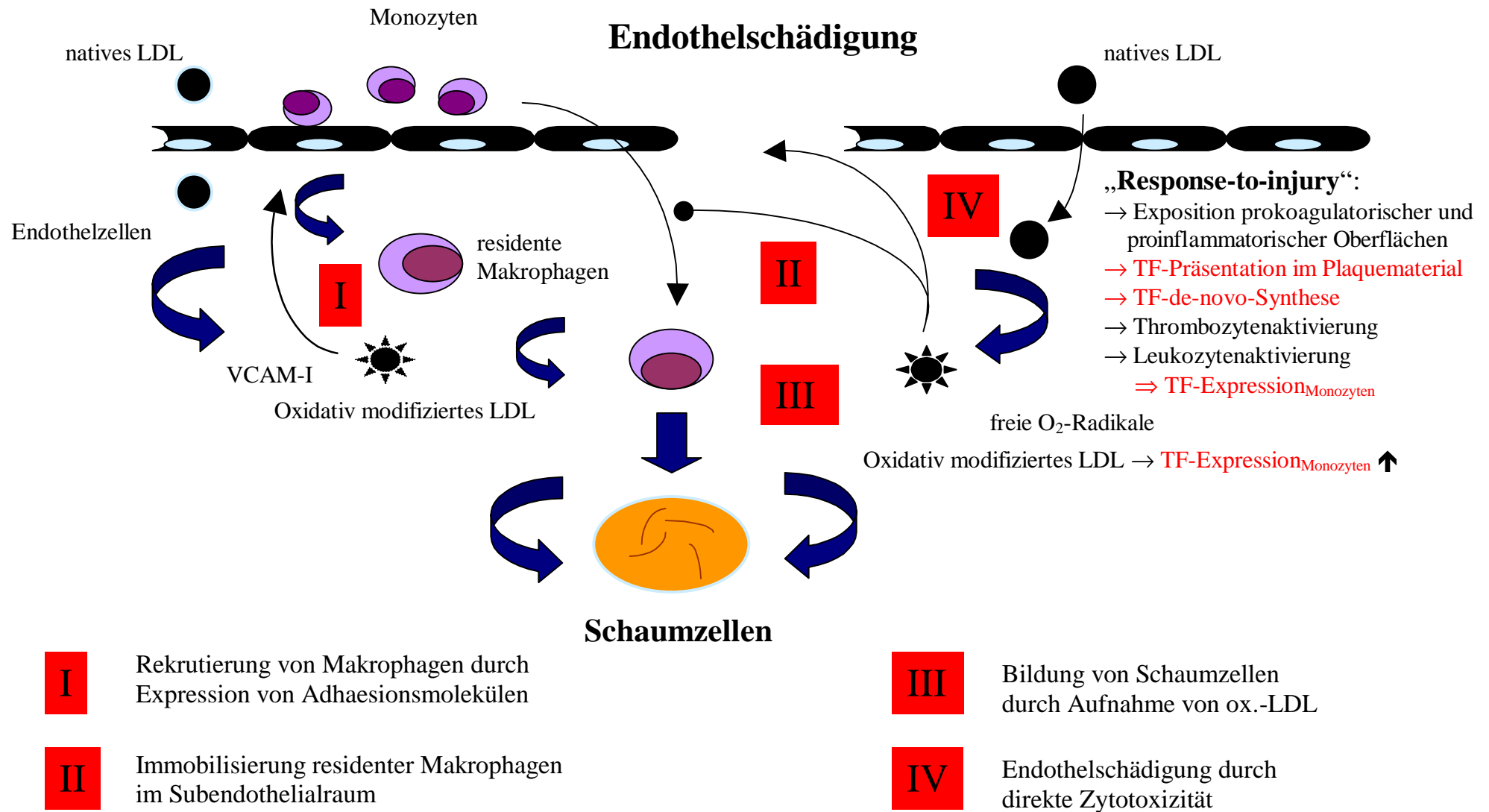


Abbildung 1: Pathogenese der Atherosklerose

Initial ursächlich für die Entstehung des akuten Koronarsyndroms, zu welchem neben dem transmuralen Myokardinfarkt auch der „non-Q-wave-Infarkt“, sowie die instabile Angina pectoris zählen, scheint die Exposition subendothelialer, thrombogener Substanzen, wie z. B. Kollagen oder Lipide, aber auch des TF gegenüber dem zirkulierenden Blut bei der akuten Ruptur einer bereits vorbestehenden stenosierenden, vormals schon erwähnten Plaqueläsion in einem arteriosklerotisch vorgeschädigten Herzkranzgefäß zu sein. Diese führt über die Aktivierung von vermehrt aus der Blutbahn rekrutierten Thrombozyten, die durch Interaktion mit endothelialen Zellen an die Gefäßwand adhären, zum einem zur Thrombusformation durch erhöhte Initiierung der thrombozytären und koagulatorischen Gerinnungskaskade. Zudem kommt es zur vermehrten Freisetzung einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und anderen niedermolekularen biologisch aktiven Substanzen, welche wiederum durch ihr Vermögen, die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen zu induzieren, zusammen mit der sich unter dem Einfluss von Thrombin und Faktor X/Xa entwickelnden Intimahyperplasie entscheidend an der lokalen Entzündungsreaktion der Gefäße mitwirken (Taubmann et al., 97; Petit et al., 99; Kaikita et al., 99).

Obgleich die exakten, für eine erhöhte prokoagulatorische Aktivität verantwortlichen, letztendlich mittels intravaskulären Thrombusformation zur akuten mechanischen Verlegung des Gefäßes bei akuten Koronarsyndromen führenden Mechanismen bislang nicht gänzlich geklärt werden konnten, so scheint doch dem TF bereits in dieser Anfangsphase eine bedeutende Rolle bei der lokalen Gerinnungsaktivierung nach Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques zuzukommen, (*Abbildung 1*).

Neben der lokalen Thrombinbildung trägt auch eine generalisierte ischämieinduzierte Inflamationsreaktion als systemische Antwort auf lokale Entzündungsvorgänge zum erhöhten Risiko von deletären thrombotischen Ereignissen beim akuten Koronarsyndrom bei (Liuzzo et al., 94; Yarnell et al., 91), *Abbildung 1*. So konnte in klinischen Studien ein systemischer Anstieg sowohl der Konzentrationen von Akut-Phase-Proteinen, wie z.B. CRP und IL-6, dem Hauptmediator der Akut-Phase-Reaktion, aber auch der Leukozyten, nachgewiesen werden. Derartige Veränderungen resultieren in einer Modifikation der Gerinnungseigenschaften des Blutes, welche eine gesteigerte Koagulabilität nach sich zieht (Ott et al., 98). Zusätzlich zu dieser systemischen Entzündungsreaktion konnte eine hypoxämie-induzierte lokale Freisetzung bzw. Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-1, TNF, IL-6, durch Endothelzellen und mononukleäre Zellen, welche die Expression von Adhäsionsmolekülen am Gefäßendothel bewirkt und durch Stimulation der Zellmigration Leukozyten in das betroffene Gewebe dirigiert, bzw. im Falle von IL-6, die prokoagulatorische Aktivität von Monozyten durch Oberflächenexpression von TF induziert.

1.3. Lokale Aktivierung von Leukozyten nach Reperfusion eines

Myokardinfarktareals

Neben dem Anteil entzündlicher Reaktionen mit der durch diese induzierten Aktivierung zirkulierender Zellen an der *Entstehung* atherosklerotischer Veränderungen vermögen aktivierte Leukozyten im Rahmen des sogenannten „Reperfusionsschadens“ („reperfusion injury“) auch einen entscheidenden Beitrag zum Auftreten thrombotischer Ereignisse *nach* erfolgreicher interventioneller Rekanalisation eines vormals verschlossenen Koronargefäßes, z.B. mittels Perkutaner Transluminale Koronarangioplastie (PTCA, siehe auch unter Punkt 1.4.1.) zu leisten:

Den in diesem Kontext wichtigsten Mechanismus stellt - neben einer erhöhten TF-de-novo-Synthese durch Exposition von Endothelzellen gegenüber freien Sauerstoffradikalen, sowie einer Kontaktaktivierung des Kininsystems nach Exposition von im Endothel lokalisierten prokoagulatorischen und proinflammatorischen Substanzen (z.B. ADP, Kollagen) gegenüber dem zirkulierenden Blut (Steele et al., 95) - die hypoxämie-induzierte lokale Freisetzung bzw. Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), oder Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) durch Endothelzellen und mononukleäre Zellen während der postischämischen Reperfusionphase (Neumann et al., 94 und 95, Ott et al., 98) dar. Hieraus resultiert die Aktivierung von Leukozyten mit einer nachfolgenden vermehrten TF-Expression auf Monozyten. Angesichts des jedoch erst im späteren zeitlichen Verlauf messbaren erhöhten Oberflächen-TF bei unmittelbar nach Intervention unveränderter TF-Expression_{Monozyten} scheint die Wiederherstellung des Koronarflusses nicht solitär für die beobachtete TF-Induktion auf zirkulierenden Zellen verantwortlich zu sein.

1.4. Behandlungsmöglichkeiten des akuten Myokardinfarktes

Ziel sämtlicher Repermutationsstrategien im akuten Myokardinfarkt ist neben einer Besserung der Angina-Pectoris-Symptomatik die prompte und möglichst komplette Wiederherstellung des Koronarflusses, um ischämisches Myokard vor der Nekrose zu bewahren und damit über die Erhaltung der Pumpfunktion des Herzens Morbidität und Mortalität bei akutem Infarkt, aber auch das Risiko eines (Re-)Infarktes zu senken.

Derzeit gelten zwei Therapieverfahren als klinisch etabliert:

1.4.1. Perkutane Transluminale Koronare Angioplastie (PTCA)

Mit der Methode der Ballonkatheterdilatation, deren Ziel die Verlagerung des lipidhaltigen, atheromatösen Plaqueinhaltes, sowie dessen thrombotischer Auflagerungen in die Gefäßwand mittels eines über dem Stenose- bzw. Verschlussgebiet aufgedehnten Ballons ist, läßt sich eine

komplette Wiederherstellung des Koronarflusses (TIMI °3) in mehr als 90 % der Patienten (Landau et al., 94) erreichen. Um den trotz zahlreicher Verbesserungen in Kathetertechnik, Bildgebung und Erfahrung der Untersucher immer noch relativ häufig auftretenden Komplikationen der PTCA, wie Dissektionen von Koronararterien durch starke Rissbildung im atheromatösen Plaque mit Plaqueruptur (> 20 %), Reocclusionen (> 10 %), oder auch inadäquatem intrakoronarem Fluß (> 5 %) entgegenzuwirken, bedient man sich heutzutage zunehmend der Möglichkeit der primären Stentimplantation, die z.B. das Risiko eines akuten Koronararterienverschlusses auf etwa 4-8 % zu senken vermag (de Feyter et al., 94).

1.4.2. Pharmakologische Thrombolyse

Als konservatives Verfahren zur Rekanalisation verschlossener bzw. stenosierter Koronargefäße hat sich bei einer Wiedereröffnungsrate von 70-80 % die systemische bzw. intrakoronare Lyse mit Streptokinase (SK), Urokinase (UK), anisoyliertem Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Complex (APSAC), oder tPA tissue-type Plasminogen Activator (tPA) etabliert, wobei die accelerierte t-PA-Lyse in Kombination mit Heparin i.v. mit den nachgewiesenermaßen höchsten Durchgängigkeitsraten als effektivstes pharmakologisches Verfahren anzusehen ist.

Hierbei limitiert eine frühe Reokkusionsrate von 20-25 % durch Rethrombosierung den Benefit einer primär erfolgreichen Lysetherapie.

1.5. Theoretische Grundlagen

1.5.1. Tissue Factor

1.5.1.1. Molekulare Struktur

Das menschliche aus 12,4 Kilobasenpaaren (kBP) bestehende TF-Gen setzt sich aus sechs Exons, von denen Exon 2-5 für die für Kofaktor- und Rezeptorfunktion verantwortliche extrazelluläre Domäne kodieren (Koyama et al., 94), im Wechsel mit fünf Introns zusammen.

TF ist ein einzelkettiges, integrales 47 Kilodalton (kDa) schweres Membran-Glykoprotein der Subklasse II der Zytokin-Rezeptor-Superfamilie (Osterud et al., 97), zu der auch Interferon α/β und Interferon γ -Rezeptoren gehören, und wird von 263 Aminosäuren (AS) gebildet, welche sich gemäß ihrer räumlichen Anordnung in eine lösliche extrazelluläre, aus 219 AS bestehende und als Rezeptor für Faktor VII/VIIa agierende Domäne, eine 23 Aminosäuren beinhaltende unlösliche transmembranäre, sowie eine zytoplasmatische, 21 Aminosäuren umfassende Komponente untergliedern lassen. Letztere fungiert durch Reorganisation des zytoplasmatischen Aktinnetzwerkes via spezifischer Interaktion mit der actinbindenden Proteinregion für die

Zellausbreitung im Rahmen der Tumormetastasierung und des Gefäßremodeling (Ott et al., 98; Ruf et al., 2000), was jedoch im Abschnitt 1.5.1.3.2. noch ausführlicher beleuchtet werden wird.

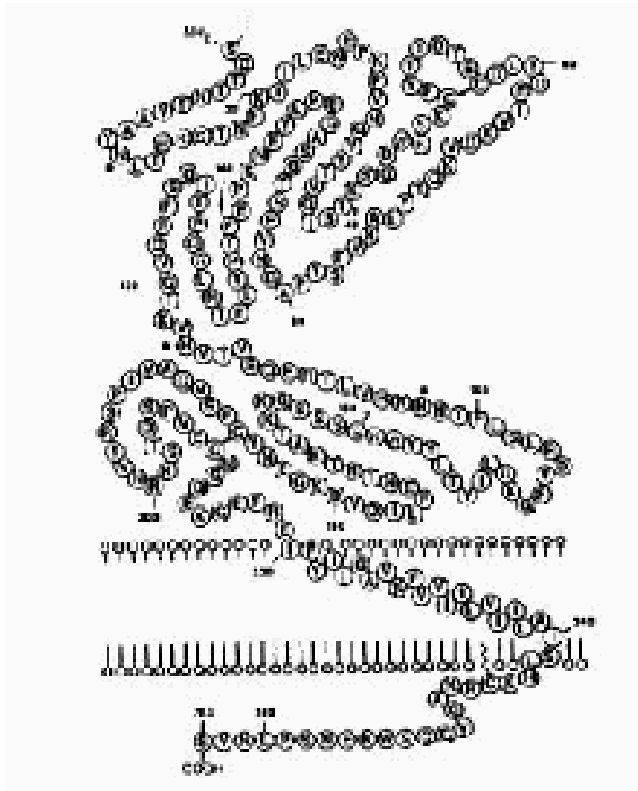


Abbildung 2: Molekulare Struktur des TF

1.5.1.2. Expression in vivo

1.5.1.2.1. Physiologisch

TF wird als Rezeptor an der Zelloberfläche hauptsächlich von mesenchymalen Zellen auf Geweben, welche als „Schutzmantel“ (vor Blutverlust in extravasale Räume) zwischen Körper und Umwelt fungieren, wie epitheliale Oberflächen, sowie an Grenzgebieten zwischen einzelnen Organen, wie z.B. der Adventitia von Blutgefäßen, oder auch den fibrösen Kapseln von Leber, Milz und Niere, präsentiert. Folglich ist er normalerweise nicht gegenüber dem zirkulierenden Blutstrom exponiert, findet sich also nicht auf ruhenden intimalen Endothelzellen, wodurch eine Initiierung der Blutgerinnung ausschließlich im Falle einer Gefäßverletzung garantiert wird. Diese räumliche Anordnung des TF, der gänzlich in aktiver Form synthetisiert wird und im Gegensatz zu den meisten anderen Gerinnungsfaktoren zu seiner Aktivierung keinerlei proteolytischer Modifikation (Nemerson et al., 95) bedarf, verhindert einerseits als eine Art protektiver „Wall“ unter physiologischen Umständen den Kontakt von TF mit dem plasmatischen Gerinnungsfaktor VII/VIIa, gewährleistet andererseits jedoch nach Konversion in die aktive TF-Faktor VIIa-Form

jederzeit eine rasche Aktivierung der Blutgerinnung bei Zerstörung von Gefäßbarrieren oder Membranschädigung (Randolph et al., 98; Bach et al., 98).

Extravaskulär findet sich TF in unstimulierten Fibroblasten und Nervenzellen (Flössel et al., 94, Drake et al., 89), *perivaskulär* lässt er sich in Fibroblasten und glatten Muskelzellen nachweisen, während er konstitutiv von kardialen Myozyten, epithelialen Zellen der Plazenta und des Gehirns, sowie glomerulären Endothelzellen exprimiert wird (Edgington et al., 91). *Intravaskuläre* Zellen hingegen besitzen ohne Stimulation keinen TF (Osterud et al., 95).

1.5.1.2.2. Stimuliert

Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen vermögen in einer auf Transkriptionsebene regulierten Art und Weise auf Stimulation durch eine Vielzahl inflammatorischer und immunologischer Signale, wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS), Wachstumsfaktoren, Immunkomplexe, Zytokine, wie Interleukin-1 β (IL-1 β) oder Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), sowie Phorbol ester, oder Lektine, die zelluläre Immunantwort und Entzündungsreaktion zu modulieren. Dies geschieht u.a. durch Induktion prokoagulatorischer Aktivität auf Zelloberflächen mit nachfolgender Hyperkoagulabilität und Thrombusformation mittels vorübergehender de novo Transkription des TF-Gens und stellt somit einen wichtigen Mechanismus auf dem Weg der Entstehung einer Verbrauchskoagulopathie im Rahmen des septischen Geschehens, das in Multiorganversagen und Tod gipfeln kann, dar (Luther et al., 90; Takahashi et al., 94).

Somit zeichnet sich der TF durch seine vielseitigen regulatorischen Modifikationsmöglichkeiten als induzierbares „Aktivations-Effektor-Gen“ monozytärer und endothelialer Zelllinien aus, wobei nach Stimulation die Oberfläche eines einzelnen Monozyten mit bis zu 17 000 TF-Molekülen besetzt sein kann (Edgington et al., 91).

1.5.1.3. Funktion

1.5.1.3.1. Physiologisch

TF kommt aufgrund seiner Funktion als Rezeptor und essentieller Kofaktor für Gerinnungsfaktor VII (Faktor VII), der die Bildung von aktiviertem Faktor VIIa (Faktor VIIa) autokrin, d.h. in sich selbst verstärkender Weise, triggert (*Abbildung 3*), über die Aktivierung von Faktor VII zu Faktor VIIa eine entscheidende Schlüsselrolle bei der Regulation des extrinsischen Gerinnungssystems zu (Banner et al., 96; Nemerson et al., 94 und 95; Takamiya et al., 96; Edgington et al., 91; Nemerson et al., 88/94; Mann et al., 98; Monroe et al., 98). Daneben wirkt der TF durch seine Beteiligung an der Faktor X-Aktivierung ebenfalls – wenn auch in geringerem Maße - an der Initiierung der intrinsischen Gerinnungskaskade mit.

Der Bildung eines bimolekularen Komplexes aus Faktor VII und TF folgt die katalytische Aktivierung von Faktor VII zu Faktor VIIa und - durch Erhöhung dessen proteolytischer Aktivität gegenüber Faktor X - eine Konversion von Faktor X in Faktor Xa. Dieser wiederum wandelt Prothrombin zu Thrombin um, was schließlich in einer Bildung eines Thrombus' durch Fibrinvernetzung gipfelt (Hatakeyama et al., 97).

Eine weitere wichtige Funktion des Gerinnungssystems stellt dessen Fähigkeit zur Signaltransduktion bei der Interaktion von Zellen dar:

So bedienen sich Thrombin, und vermutlich auch die auf einer früheren Stufe der Gerinnungskaskade befindlichen Faktoren Xa und VIIa bei Zellaktivierungsvorgängen sogenannter Proteasen-aktivierter Rezeptoren (PARs), einer Subklasse G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Diese werden mittels proteolytischer Spaltung einer spezifischen Bande der extrazellulären Region des Rezeptors aktiviert, woraus die Bildung eines neuen N-terminalen Endes, das als Ligand für die Triggerung der Rezeptoraktivierung fungiert, resultiert. Angesichts ihrer ausgeprägten intra- und extravaskulären Verbreitung vermögen diese die verschiedensten zellulären Funktionen von einer Modulation der Genexpression über Motilitätseigenschaften bis hin zu Migrationsvorgängen von Zellen zu regulieren (Ruf et al., 2000).

Neben vormals genannter, wohl bedeutendster Aufgabe des TF scheint dieser ebenso an der Bereitstellung basaler Mengen der Gerinnungsfaktoren IXa und Faktor Xa beteiligt zu sein (Bauer et al., 89 und 90), sowie an der für ein regelrechtes Embryonalwachstum verantwortlichen Vaskulogenese mitzuwirken, deren Fehlen, wie Studien an TF-„knock-out“-Mäusen mit inaktiviertem TF eindrucksvoll aufzeigen konnten, unweigerlich zum Tod der Embryos führten (Carmeliet et al., 96).

Extrinsische Kaskade

Intrinsische Kaskade

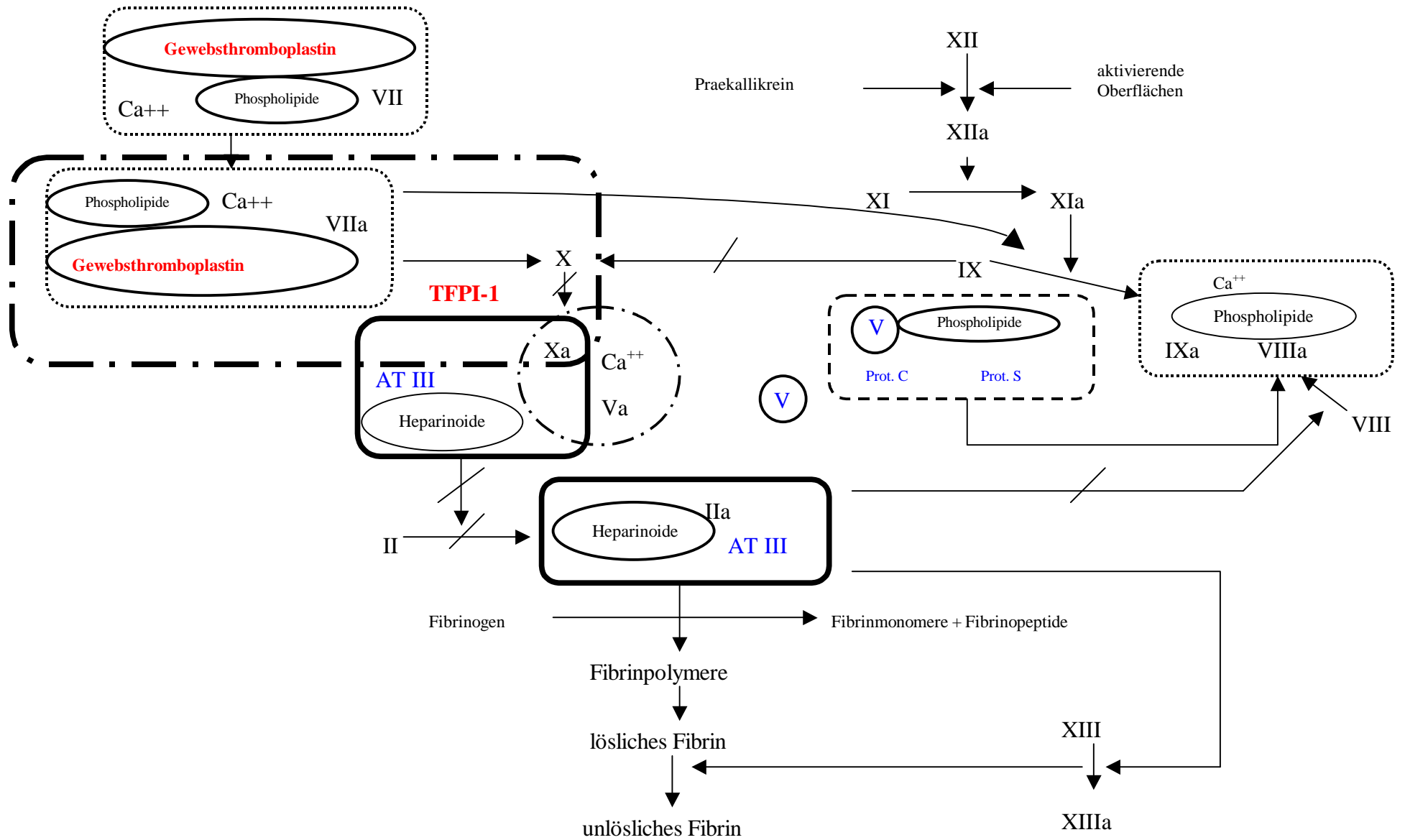


Abbildung 3: Übersicht über das extrinsische und intrinsische Gerinnungssystem

1.5.1.3.2. Stimuliert

Bei durch eine Vielzahl proinflammatorischer Stimuli induzierter vermehrter Expression auf Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen oder epithelialen Zellen im Rahmen allgemeiner Entzündungsreaktionen, der Sepsis, aber auch bei diversen Tumorleiden durch Verschiebung des hämostatischen Gleichgewichts zugunsten prokoagulatorischer Aktivität wirkt TF entscheidend an der Entstehung lokaler thrombotischer Komplikationen beim akuten Koronarsyndrom, sowie der disseminierten intravasalen Gerinnung mit (Ott et al., 98; Ruf et al., 94; Edgington et al., 94; Levi et al., 93; Semeraro et al., 92).

Betrachtet man z.B. die drei, auch als Virchow'sche Trias bekannten praedisponierenden Faktoren venöser Thrombosen, der Hyperviskosität, der Stase und nicht zuletzt der Gefäßwandverletzung, so begünstigen unter anderem die Abgabe von TF aus beschädigtem Gewebe an den Blutstrom, aber auch die Exposition des Blutstromes gegenüber TF bei Gefäßschäden oder Rekrutierung aktivierter Leukozyten, sowie eine lokale TF-Expression durch morphologisch einwandfreies Endothel mittels Zytokinfreisetzung bei Gewebeerletzung oder Entzündung, eine gesteigerte Thrombusformation und Hyperkoagulabilität in Gebieten erhöhter Stase.

Aber auch im Rahmen maligner Erkrankungen trägt eine vermehrte TF-Synthese zum einen des gesunden Gewebes durch Interaktion von mononukleären Phagozyten oder Endothelzellen mit Tumorzellen oder deren Produkten, zum anderen des Tumorstromas mittels Aktivierung sogenannter tumorassoziierter Makrophagen durch direkte Zell-Zell-Interaktion oder auf dem Wege der Freisetzung löslicher Faktoren, und schließlich die Aktivierung systemischer Gerinnungsvorgänge durch auf dem Wege der Metastasierung in die systemische Blutbahn gelangte Tumorzellen zum Auftreten thrombotischer Ereignisse bei (Fischer et al., 95).

Eine vor allem im Hinblick auf prognostische Aussagen entscheidende Stellung kommt dem TF angesichts seiner Beteiligung an der Tumorangiogenese, für die eine erhöhte mitogene Aktivität der Endothelzellen, eine gesteigerte Transkriptionsrate des vascular endothelial growth factor (VEGF), sowie nicht zuletzt eine verminderte Transkription des anti-angiogenen Thrombospondin (TSP 2) im Falle einer Überexpression von TF verantwortlich gemacht werden kann, zu, welche in vivo zu einem schnelleren, aber auch ausgedehnteren Tumorwachstum führt und ideale Bedingungen für eine breite hämatogene Metastasierung bietet (Zhang et al., 94).

Des Weiteren spielt der TF über seine Eigenschaft als Oberflächenrezeptor der Serinprotease Faktor VIIa durch Interaktion mit seinem physiologischen Liganden neben der Initiierung des extrinsischen Gerinnungssystems eine gewichtige Rolle bei anderen proteolytisch regulierten Enzymkaskaden, wie z.B. der Signaltransduktion zwischen Zellen, die unter anderem an der Regulation von Zelladhäsions- und Migrationsprozessen im Rahmen inflammatorischer Reaktionen, aber auch der Tumorinvasion und -metastasierung entscheidend beteiligt ist. Letzteres vollzieht sich zum einen via direkte *extrazelluläre* Thrombinbildung beim angesichts

der in Anlehnung an deren fenestrierte Architektur erhöhten Permeabilität der tumorassoziierten Gefäße erleichterten Kontakt der im Plasma zirkulierenden Gerinnungsfaktoren mit TF-exprimierenden Tumorzellen. Zum anderen nimmt der TF über *intrazelluläre* Signalvermittlung durch Rekrutierung des aktinbindenden Proteins 280 (ABP-280) an TF-Adhäsionsmoleküle und Bindung der zytoplasmatischen Domäne des TF an das Aktin-Zytoskelett auf Adhäsions- und Migrationseigenschaften von Zellen Einfluß. Die Adhäsion der TF-exprimierenden Tumorzellen kann durch Interaktion des Rezeptor-Protease-Komplexes mit spezifischen matrixassoziierten Inhibitoren vermittelt werden (Ott et al., 98; Mueller und Ruf, 98; Ruf et al., 2000).

1.5.1.3.3. Im Rahmen der Atherogenese

Von besonders für die Zielsetzung dieser Arbeit zentraler Bedeutung imponiert der Beitrag des TF zur Pathogenese der Atherosklerose über eine Gerinnungsaktivierung mit hieraus resultierender auf verschiedenen, teils unabhängig voneinander ablaufenden, teils einander bedingenden molekularen Mechanismen beruhender vermehrter Thrombinbildung (*Abbildung 4*):

Zum einen kann die erhöhte prokoagulatorische Aktivität im Rahmen spontaner oder induzierter Plaqueruptur mit einer vermehrten TF-Synthese und -Expression mittels Aktivierung von in arteriosklerotischen Läsionen enthaltenen Endothelzellen, mononukleären Phagozyten, Schaumzellen, glatten Muskelzellen, aber auch zirkulierender Leukozyten durch die Freisetzung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, modifiziertem LDL oder Zellinteraktionen, im Sinne von Thrombozyten-Leukozyten-Koagregaten, im Rahmen sowohl lokaler als auch systemischer Entzündungsreaktionen erklärt werden (Neumann et al., 94, 95 und 97; Jude et al., 94; Leatham et al., 94).

Eine andere Ursache der TF-Aktivierung stellt die myokardiale Ischämie, insbesondere in Verbindung mit einer nachfolgenden Reperfusion des ischämischen Myokardareals dar:

Untersuchungen an isolierten, initial Ischämie und sodann Reperfusion ausgesetzten Rattenherzen ergaben eine rasche, mit einer anhaltenden Erhöhung der prokoagulatorischen Aktivität einhergehende Induktion der TF-mRNA, die angesichts der Unversehrtheit der Gefäßultrastruktur vermutlich auf eine erhöhte de-novo-TF-Synthese durch Exposition von Endothelzellen gegenüber freien Sauerstoffradikalen während der postischämischen Reperusionsphase zurückzuführen ist und daher auch als „reperfusion-injury“ bezeichnet wird (Semeraro et al., 97).

Die Exposition von in der Gefäßwand befindlichen thrombogenen Substanzen, wie Kollagen oder ADP, gegenüber dem zirkulierenden Blutstrom im Rahmen der Reperfusion führt via Kontaktaktivierung des Kininsystems und Präsentation von TF im Plaquematerial über eine direkte Initiierung des intrinsischen Gerinnungssystems zu einer gesteigerten Thrombinbildung. Zum anderen kommt es über eine Aktivierung, Rekrutierung und Adhäsion von Thrombozyten,

über die Freisetzung prokoagulatorischer Mikropartikel, und durch Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Koaggregaten zur Leukozytenaktivierung, die wiederum mit einer erhöhten TF-Expression assoziiert sein könnte. Dies trägt vermutlich zur vermehrten lokalen Thrombusformation bei (Ott et al., 96; Neumann et al., 96; Gawaz et al., 96).

Thrombozyten-aktivierung

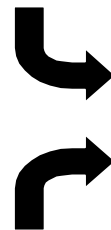
- P-Selektin ↑
- Rekrutierung/Adhäsion
- Aktivierung/Aggregation/Degranulation
- Freisetzung thrombogener Substanzen aus Mikro-partikeln (Zytokine...)
- Thrombozyten-Leukozyten-Koaggregate
- Leukozytenaktivierung
- ⇒ **TF-Expression_{Mono}**



Hyperkoagulabilität

Systemische Entzündung

- IL-6
- Leukozyten
- CRP
- MAC-1
- **TF-Expression_{Mono}**



Exposition prokoagulatorischer und proinflammatorischer Oberflächen

- **TF-Präsentation**
- Plättchenaktivierung
- Initiierung der Gerinnungskaskade
- Thrombinbildung

Lokale Entzündungsreaktion

- Zelluntergang durch Freisetzung inflammatorischer Mediatoren (Komplement, zelluläre Botenstoffe) aus Plaque/Endothel
- Aktivierung von zirkulierenden Leukozyten
- **TF-Expression_{Monozyten} → PCA_{Mono}?**
- Superoxid-Anionen-Bildung
- Zytokinfreisetzung

Abbildung 4: Induktion der TF-Expression_{Monozyten} als Bindeglied zwischen ischämie-assoziierten inflammatorischen Reaktionen und erhöhtem thrombotischen Risiko

1.5.2. Tissue Factor Pathway Inhibitor-1

1.5.2.1. Molekulare Struktur

Tissue Factor Pathway Inhibitor-1 (TFPI-1) stellt ein aus 276 Aminosäuren bestehendes, auf Gen 2q (Girard, 91 et al.; van der Logt et al., 91; Enjyoji et al., 93) lokalisiertes und 42 kDa schweres Plasmaglykoprotein mit einer sauren N-terminalen Region, gefolgt von drei hintereinander angeordneten inhibitorischen Domänen vom Kunitz-Typ, sowie einer basischen COOH-terminalen Region dar (Abbildung 5). Die Existenz multipler Domänen vom Kunitz-Typ folgt den Anforderungen an die zweifach inhibitorischen Angriffspunkte TFPIs an Faktor Xa auf der einen Seite und dem Komplex aus Faktor VIIa und TF auf der anderen. Die erste Kunitz-Domäne ist für die Bindung an die katalytische Region von Faktor VIIa, die zweite Kunitz-Domäne zusammen mit anderen Teilen des Moleküls für die inhibitorische Interaktion mit Faktor Xa verantwortlich. Das carboxyterminale Ende sorgt sowohl für eine rasche und suffiziente Inhibition TFPIs von Faktor Xa als auch für dessen Bindung an Heparin, während hingegen die Funktion der dritten Kunitz-Typ-Domäne bislang nicht gänzlich geklärt zu sein scheint. Neuere Studien vermuten jedoch eine Rolle bei der Interaktion mit heparansulfatierten Proteoglykanen, sowie TFPI's Assoziation mit Lipoproteinen (Hamamoto et al., 93; Wesselschmidt et al., 93; Huang et al., 93).

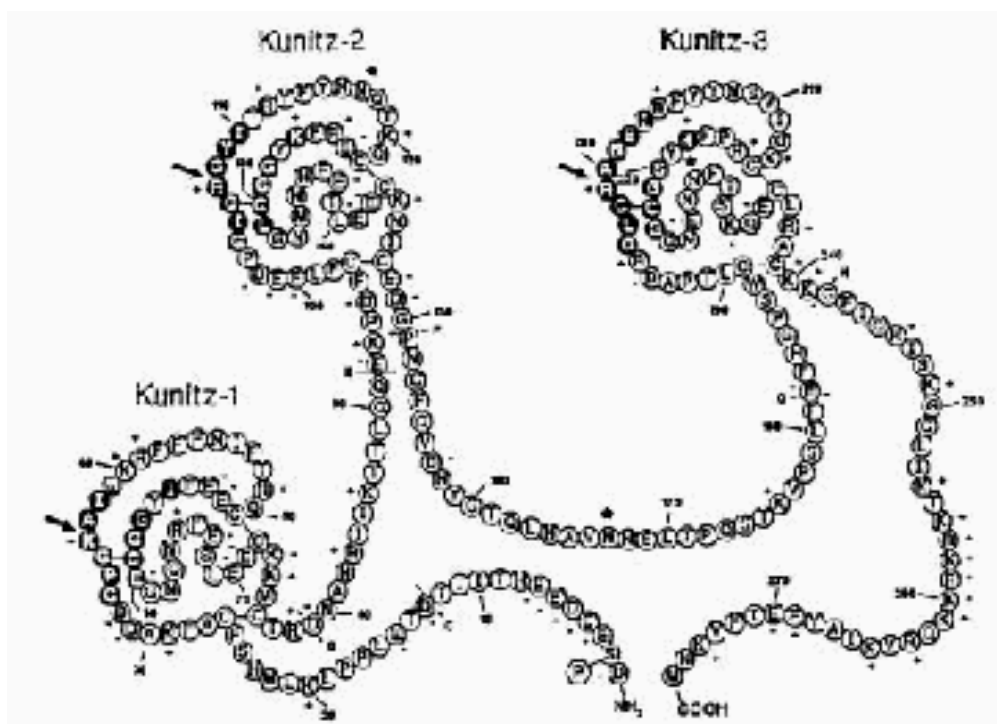


Abbildung 5: Molekulare Struktur des TFPI-1

1.5.2.2. Expression in vivo

1.5.2.2.1. Physiologisch

In vivo existieren drei verschiedene Formen des TFPI:

Plasma-TFPI, welcher zum größten Teil Lipoprotein-assoziiert ist, TFPI in Thrombozyten, dessen Freisetzung durch Thrombin stimuliert wird, und schließlich der zellassoziierte endotheliale TFPI (Ho et al., 96). Mittels RNA-Analyse konnte neben Monozyten, glatten Muskelzellen und Fibroblasten, welche eine eher untergeordnete Rolle bei der Expression von TFPI spielen, als entscheidende Quelle der TFPI-Synthese das mikrovaskuläre Endothel verschiedener Organe (Placenta > Lunge > Leber > Niere > Herz > Skelettmuskel > Gehirn) identifiziert werden (Bajaj et al., 99), wobei die quantitative gewebespezifische TFPI-Expression im Gefäßbett der einzelnen Organe eine Antwort auf die lokale „Mikroumgebung“ auf der einen, eine Anpassung an die Anforderungen, sowie jeweilige Funktion der Gewebe auf der anderen Seite darstellt (Bajaj et al., 99). Die interindividuell stark differierenden (Warshawsky et al., 94) Plasmakonzentrationen des zu einem großen Teil an Lipoproteine wie HDL (~ 50 %), LDL (40-45 %), und Lipoprotein (a), aber auch an Thrombozyten (10 %) gebundenen zirkulierenden TFPI liegen mit circa 2,5 nM, oder 100 ng/ml (Lindal et al., 95) relativ niedrig. Die Höhe der TFPI-Konzentrationen befindet sich zum Zeitpunkt der Geburt auf ihrem Tiefststand, steigt jedoch mit zunehmendem Alter, wobei keine geschlechtsspezifischen Unterschiede der Plasma-TFPI-Levels festzustellen sind. Als Trägerproteine für TFPI im Plasma fungieren Lipoproteine, für deren Komplexbildung mit TFPI die dritte Kunitz-Domäne verantwortlich ist (Lindahl et al., 95). Das Molekulargewicht der vorherrschenden Formen von TFPI liegt neben ebenfalls existierenden Formen höheren Molekulargewichts zwischen 34 und circa 50 kDa. Derartige Größenheterogenität, welche auch mit einer differierenden inhibitorischen Potenz assoziiert ist, spiegelt vermutlich die proteolytische Abspaltung des COOH-Endes wider (Petersen et al., 95; Lupu et al., 97).

1.5.2.2.2. Stimuliert

TFPI-1 wird auf Stimulation durch Thrombin sezerniert und vermag somit durch seine erhöhte Konzentration am Ort der Gefäßverletzung an der Kontrolle der Thrombusformation mitzuwirken (Lupu et al., 97). Inflammatorische Mediatoren induzieren zwar TF in Gefäßwandzellen und Monozyten, besitzen aber keinen signifikanten Einfluss auf die Synthese von TFPI-1 (Petersen et al., 95). Eine weitere Quelle für TFPI brachten Versuche mit *in vivo* Infusion von Heparin, welche eine zwei- bis vierfache Erhöhung des Spiegels von zirkulierendem TFPI induzierte. Dies läßt in Anbetracht eines fehlenden Anstiegs der TFPI-Konzentration bei *ex vivo* Zugabe von Heparin zu Plasma (Broze et al., 95), auf eine Freisetzung von TFPI aus intra- oder extrazellulären Speichern, wie an Heparansulfate oder andere Glykosaminoglykane des Endothels, wie Dermatansulfat oder

Chondroitinsulfat C (Petersen et al., 95) schließen. Diese gebundene Form von TFPI von kompletter Länge besitzt offenbar grundsätzlich ein höheres, durch Heparin zusätzlich steigerbares inhibitorisches Vermögen gegenüber Faktor Xa als die im Plasma zirkulierenden „COOH-gespalteten“ TFPI-Formen. Zu Proteoglykanrezeptoren, die nachweislich TFPI-1 binden, gehören das transmembran-verankerte Ryudcan/Syndecan 4 und das Glykosylphosphatidylinositol- (GPI)-verankerte Glypikan 3 (Mast et al., 97; Ott et al., 2000), wobei die Art der Membranverankerung die jeweilige Lokalisation der Oberflächenrezeptoren auf spezifischen Regionen der Zellmembran entscheidend beeinflusst (Ott et al., 2000). Während zum Beispiel GPI-verankerte Proteine in glycosphingolipidreichen Membran-Kompartimenten, welche mit Hilfe der Dichte-Zentrifugation als detergenz-unlösliche Fraktionen niedriger Dichte isoliert werden können, lokalisiert sind, finden sich transmembrane Rezeptoren in phospholipidreichen, detergenz-löslichen Fraktionen hoher Dichte. Zusätzlich zu Proteoglykan-Rezeptoren bindet das für die hepatische Endozytose vieler Plasmaproteine, wie z.B. α_2 -Makroglobulin-Protease-Komplexe, in der β -Fraktion wandernde VLDL komplexiert mit Apolipoprotein E bzw. Lipoproteinlipase, oder Plasminogen-Aktivator-Komplexe verantwortliche, transmembranös verankerte LDL-receptor-related protein (LRP) TFPI-1. LRP ist für den Abbau exogen zugeführten, also rekombinanten TFPIs durch kultivierte Zellen, sowie die beschleunigte Beseitigung TFPIs von der monozytären Oberfläche mittels irreversibler Degradierung erforderlich. Der erste Schritt dieses Abbauvorganges umfasst die Bindung des COOH-Endes von TFPI an einen unspezifischen Rezeptor, möglicherweise Glykosaminoglykane, dem hierauf der zweite Schritt in Form eines Transfers zu LRP und anschließender Internalisation (Broze et al., 95) folgt.

1.5.2.3. Funktion

Die auch im Rahmen dieser Arbeit relevante Hauptaufgabe des TFPI erstreckt sich auf die Hemmung der TF-Aktivität, welche sich verschiedener Mechanismen bedient:

1.5.2.3.1. TF-Inhibition durch TFPI-1 auf Endothelzellen

Der durch endogenen TFPI-1 vermittelten *reversiblen* Hemmung der enzymatischen Aktivität des TF-Faktor VIIa-Komplexes durch Reduktion der TF-Halbwertszeit auf der einen Seite geht die Bildung eines Komplexes mit TF, Faktor VIIa, und Faktor Xa in zwei Einzelschritten voran:

Zunächst erfolgt eine reversible 1:1-Bindung von TFPI-1 an Faktor Xa, die einen Verlust der katalytischen Aktivität von Faktor Xa nach sich zieht, woraufhin in einem zweiten Schritt die katalytische Aktivität des TF-VIIa-Komplexes durch Bildung eines Vierfachkomplexes bestehend aus TF, Faktor VIIa, Faktor Xa und TFPI-1 herabgesetzt wird (Petersen et al., 95).

Demgegenüber steht die Möglichkeit einer Reduktion der TF-Aktivität durch *rekombinanten* TFPI über eine LRP-vermittelte *irreversible* Internalisation und Degradierung des TF-VIIa-TFPI-1-Komplexes (Hamik et al., 99). Die Translokation des TF-VIIa-Xa-TFPI-1-Komplexes dagegen in glykosphingolipidreiche, detergenten-unlösliche Mikrodomänen durch *endogenen*, GPI-verankerten TFPI-1 stellt eine mit Dissoziation des Vierfachkomplexes nach etwa 12 Stunden lediglich vorübergehende, reversible Möglichkeit der TF-Inhibition dar, *Abbildungen 6 und 7* (Ott et al., 2000).

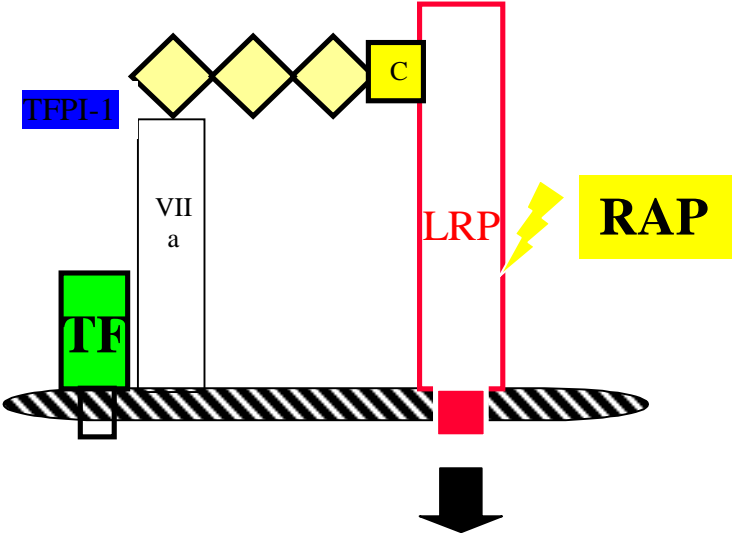


Abbildung 6: Irreversible Tissue Factor-Inhibition durch rekombinanten Tissue Factor Pathway Inhibitor-1 (irreversibel)

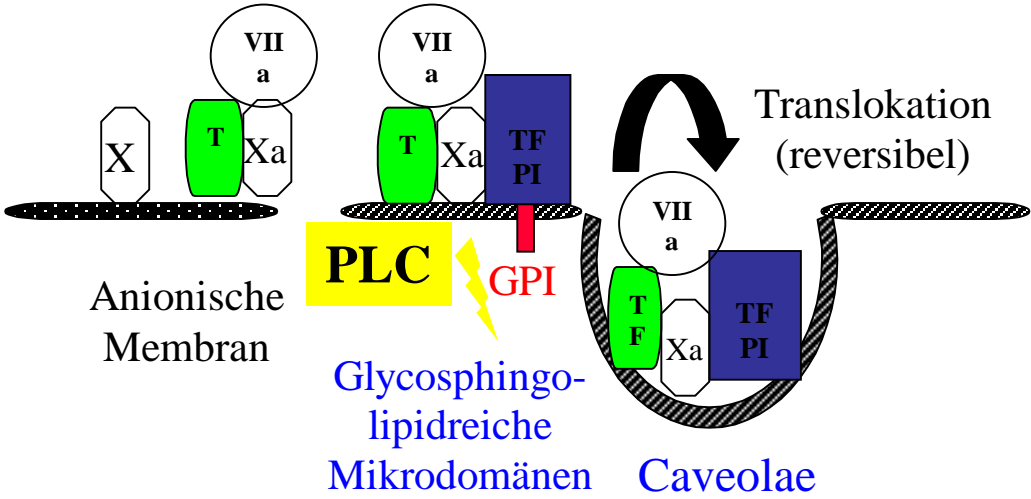


Abbildung 7: Reversible Tissue Factor-Inhibition durch endogenen Tissue Factor Pathway Inhibitor-1

Zusätzlich zu diesen Mechanismen hemmt TFPI-1 die Spaltung von Faktor IX durch den TF-Faktor VIIa-Komplex (Petersen et al., 95). Eine weitere, Faktor Xa-unabhängige, unphysiologisch hohe TFPI-1-Konzentrationen von > 100 nM erfordernde, und somit wohl hinsichtlich der zu untersuchenden in-vivo TF-Hemmung zu vernachlässigende direkte Inhibition des TF-Faktor VIIa-Komplexes konnte von verschiedenen Autoren (Petersen et al., 93; Hamamoto et al., 93; Callander et al., 92) gezeigt werden.

1.5.2.3.2. TF-Inhibition durch TFPI-1 auf zirkulierenden Monozyten

Auf monozytären Zellen vermag TFPI-1 - exogen zugeführt - zum einen die katalytische Aktivität des TF-VIIa-Komplexes durch bis zu dreifache Reduktion der TF-Halbwertszeit mittels Formierung eines Komplexes aus TF-VIIa und TFPI-1 unabhängig von der An-/Abwesenheit von Faktor Xa auf der Zelloberfläche reversibel zu hemmen (Hamik et al., 99). Dieser Mechanismus scheint jedoch angesichts einer ebenfalls in obiger Studie veröffentlichten verminderten TF-Expression durch kultivierte monozytäre, mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierte Zellen (Mono Mac 6) nach Zugabe von TFPI-1 und aktiviertem Faktor VIIa zum Kulturmedium bei im Gegensatz hierzu unveränderter TF-mRNA-Konzentration eine Stunde nach LPS-Stimulation offenbar nicht auf Transkriptionsebene, sondern vielmehr an einem später angesiedelten Schritt der TF-Biosynthese bzw. -degradierung anzugreifen (Hamik et al., 99): TFPI-1 vermittelt eine irreversible Entfernung des TF von der Zelloberfläche der Monozyten durch Interaktion dessen C-terminaler Domäne mit dem LDL-Rezeptor Related Protein (LRP) und nachfolgender Endozytose des TF-Faktor VIIa-Komplexes über mit Clathrin überzogene Membraneinstülpungen der Plasmamembran, wo er internalisiert und durch Transport in Lysosomen degradiert werden kann (Hamik et al., 99).

Diese Studie zur TFPI-induzierten TF-Inhibition auf Monozyten besitzt angesichts der bisherigen deutlichen Fokussierung auf endothelialen TF gewisse Pionierfunktion bei der Untersuchung des bislang vernachlässigten monozytären TFPI-1s, läßt jedoch viele Fragen zu genauen Verankerungs- und Regulationsmechanismen endogenen TFPIs auf Monozyten in vivo offen, die erstmals mit dieser Arbeit im Folgenden näher beleuchtet werden sollen.

Tabelle 1 soll zum besseren Verständnis anhand einer vergleichenden Gegenüberstellung eine zusammenfassende Übersicht über Aufbau, Ursprung und Funktion von TF versus TFPI-1 liefern:

	TF	TFPI
Genlokalisierung	Chromosom 1p 21-22	Chromosom 2q
Molekulargewicht	45 kDa	42 kDa
[Plasma]	3,0 pM	2,5 nM
Aufbau	263 AS, drei Komponenten: <ul style="list-style-type: none"> • <i>extrazellulär</i> (Bp 1-219): Rezeptor für VII/VIIa • <i>transmembranär</i> (Bp 220-242): hydrophob • <i>zytoplasmatisch</i> (Bp 243-263): → Zellausbreitung → Gefäßremodeling → Metastasierung 	276 AS, drei Regionen: <ul style="list-style-type: none"> • <i>saure N-Terminale</i>: Xa-Inhibition • <i>Protease Inhibitor-Domänen vom Kunitz Typ</i>: K1: TF-VIIa-Inhibition K2: Xa-Inhibition K3: Lipoprotein-Assoziation, Heparin-Interaktion • <i>basisches COOH-terminales Ende</i>: Heparin-Bindung, Prothrombinase-Komplex-Inhibition
Vorkommen: • konstitutiv	<ul style="list-style-type: none"> • <i>extravaskulär</i>: Nervenzellen, kardiale Myozyten, epitheliale Zellen, Adventitia • <i>perivaskulär</i>: Fibroblasten • <i>intravaskulär</i>: ∅ 	<ul style="list-style-type: none"> • Plasma: → Lipoproteinassoziiert (87,5%) → Thrombozyten (2,5%) → carrier-free (6-10%) • mikrovaskuläre Endothelzellen • sonstige: Plazenta, Lunge
• nach Stimulation	<ul style="list-style-type: none"> • Endothelzellen • Monozyten • Makrophagen • glatte Muskelzellen 	∅ Veränderung der TFPI-mRNA
Funktion: • unter physiologischen Bedingungen	<ul style="list-style-type: none"> • Hämostaseregulation durch Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Gerinnungssystems • embryonale Gefäßanlage • Signaltransduktion • basale Bereitstellung der Faktoren IXa und Xa 	<ul style="list-style-type: none"> • physiologische Inhibition der TF-induzierten Gerinnung • Inhibition von (Chymo-)Trypsin, Plasmin, Kathepsin G
• bei vermehrter Expression	<ul style="list-style-type: none"> • Begünstigung thrombotischer Ereignisse: → Atherosklerose/ "reperfusion injury" → Disseminierte Intravasale Gerinnung → arterielle/venöse Thrombose → Tumorangiogenese 	∅ Veränderung der TFPI-1-mRNA
Wirkprinzip	<ul style="list-style-type: none"> • Rezeptor und essentieller Kofaktor für Faktor VII • Aktivierung von Faktor VII → VIIa • Proteolytische Aktivität von VIIa gegenüber IX und X ↑ → Faktor IX/X-Aktivierung ↑ 	Thrombinbildung ↓ durch: <ul style="list-style-type: none"> • Bildung + Translokation eines Vierfachkomplexes aus TF-VIIa-Xa-TFPI in glykosphingolipidreiche Mikrodomänen (Endothelzellen: caveolae; Monozyten: rafts) • direkte Hemmung des TF-VIIa-Komplexes • direkte Hemmung von Faktor Xa • Faktor IX-Inhibition

Tabelle 1: Struktur, Vorkommen und Funktion von Tissue Factor und Tissue Factor Pathway Inhibitor-1

2. Zielsetzung der Studie

TF leistet durch die Initiierung der extrinsischen Gerinnungskaskade mittels (allosterischer) Erhöhung der Enzymaktivität der Plasmaserinprotease Faktor VIIa, an deren Ende nach Aktivierung der Faktoren IX und X durch „limitierte“ Proteolyse die Bildung von Thrombin steht, einen entscheidenden Beitrag zu zellulären prokoagulatorischen Antworten. Grundlage dieser Studie bildete eine Untersuchung im Jahre 1998, welche einen Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität (PCA), d.h. der Fähigkeit, die normale Gerinnungszeit von Plasma zu verkürzen, von zirkulierenden Leukozyten im akuten Myokardinfarkt aufzeigen konnte (Ott et al., 98). Diese Tatsache kann unter Umständen für „Resistenzen“ gegenüber einer thrombolytischen Therapie, aber auch für das Auftreten erneuter Gefäßokklusionen/-stenosen nach erfolgreicher Rekanalisation, oder peripherer thrombotischer Komplikationen verantwortlich gemacht werden. Zur Analyse der molekularen Grundlagen dieser Beobachtung bzw. eventueller gegenregulatorischer Maßnahmen bestimmten wir die mRNA- und Oberflächen-Expression von TF als vermutlichem Urheber dieser Feststellung, sowie von TFPI als dessen physiologischem Gegenspieler auf zirkulierenden Zellen mittels RT-PCR und durchflußzytometrischer Messungen. Um die funktionellen Konsequenzen einer eventuellen erhöhten TF-Expression auf Monozyten im Sinne einer vermehrten Thrombinbildung, aber auch die Rolle oberflächengebundenen TFPIs bei der Regulation der PCA zirkulierender Monozyten durch TF verifizieren zu können, analysierten wir die Konzentrationen der zirkulierenden Prothrombinfragmente F_{1+2} , welche aus dem amino-terminalen Ende von Prothrombin bei dessen Konversion zu Thrombin freigesetzt werden, und somit einen sowohl sensitiven als auch spezifischen Indikator der systemischen Thrombinbildung darstellen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Studie lag in der Untersuchung des exakten Mechanismus` der durch *endogenen* TFPI-1 induzierten Inhibition der proteolytischen Aktivität von TF auf Monozyten in Abgrenzung zur bereits etablierten irreversiblen Degradierung durch Bindung von *exogenem* TFPI an LRP auf *Monozyten* (Hamik et al., 99).

Somit lassen sich die Studienhypothesen wie folgt schlagwortartig zusammenfassen:

1. TF-/TFPI-Oberflächenexpression bzw. TF-/TFPI-1-Transkriptionsrate nach akutem Myokardinfarkt

Findet sich im zeitlichen Verlauf nach Intervention im akutem Myokardinfarkt eine erhöhte TF-/ TFPI-1-Transkriptionsrate mit eventuell nachfolgender, konsekutiv vermehrter TF-/TFPI-1-Oberflächenexpression, die als Ursache einer nachgewiesenermaßen erhöhten prokoagulatorischen Aktivität von Monozyten angesehen werden kann?

2. Mechanismus der TF-Inhibition durch TFPI-1

Hemmt TFPI-1 zum Zeitpunkt maximaler TF-Expression die funktionelle TF-Aktivität auf Monozyten, bzw. ist TFPI, der die TF-Aktivität herabsetzt, GPI verankert?

3. Funktionelle Konsequenzen dieser Ergebnisse am Bild der Thrombinbildung in vivo

Ist die erhöhte TF-Expression assoziiert mit einer Thrombinbildung in vivo?

3. Studiendesign

3.1. Studienpopulation

3.1.1. Einschlusskriterien

3.1.1.1 Patientengruppe

Die Studienpopulation umfasste 40 Patienten mit akutem Myokardinfarkt (AMI) der Killip-Klasse I bis II ohne vorangehende wiederholte Episoden einer instabilen Angina-Pectoris-Symptomatik, wobei sich die Diagnose des AMI auf die Anamnese eines prolongierten, 3-9 Stunden andauernden thorakalen Schmerzereignisses mit charakteristischen EKG-Veränderungen im Sinne von signifikanten ST-Elevationen bzw. einer mindestens zweifachen Erhöhung der Creatinkinase (CK) stützte.

3.1.1.2. Kontrollgruppe

In die Kontrollgruppe wurden 20 Patienten mit den klinischen Anzeichen einer stabilen Angina-Pectoris die sich einem elektiven Stenting unterzogen, eingeschlossen.

Patientengruppe n = 40	Kontrollgruppe n = 20
AMI	Stabile Angina Pectoris
<ul style="list-style-type: none">• pectanginöse Beschwerden > 20 Minuten• Schmerzbeginn 3-9 h• EKG-Veränderungen• CK ↑ mind. 2-fach bzw. CK-MB ↑• koronarangiographisch verifizierter Koronararterienverschluß	<ul style="list-style-type: none">• Ø Ruhe-AP• Ø CK-Erhöhung• positive Ergometrie• angiographisch gesicherte Koronarstenose > 50 %

Tabelle 2: Einschlusskriterien der Studienpopulation

3.1.2. Ausschlusskriterien

Patienten mit interferierenden nichtkardialen Erkrankungen, wie z.B. chronisch entzündlichen oder malignen Erkrankungen, Infektionen, sowie schweren systemischen Erkrankungen hämatologischer, renaler, pulmonaler, hepatischer, endokriner oder neurologischer Art, aber auch Patienten, die innerhalb der vorangegangenen 6 Monate invasive Eingriffe bzw. Traumen erlitten hatten, konnten ebenso wie Patienten mit einer antiinflammatorischen Medikation - mit Ausnahme von 100 mg Aspirin/d - aufgrund einer möglichen Beeinflussung des Studienergebnisses nicht an der Studie teilnehmen.

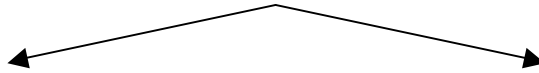
Alle Patienten waren eingehend aufgeklärt worden und hatten eine schriftliche Zustimmung zur Teilnahme an der Untersuchung abgegeben. Die Genehmigung des Studienprotokolls durch die Ethikkommission lag vor.

3.2. Abnahmeprotokoll

Während der Patientengruppe vor Beginn der Studie 1 Gramm (g) Aspirin intravenös (i.v.), 5-10 mg Metoprolol i.v., 5-10 Milligramm (mg) Morphin i.v., 0,25 mg/kg Abxciximab i.v., sowie 5000 internationale Einheiten (IU) Heparin intraarteriell (i.a.) verabreicht wurde, erhielt die Kontrollgruppe 1 g Aspirin i.a., 0,25 mg/kg Abxciximab i.a. und 5000 IU Heparin i.a.. Hinsichtlich der periprozeduralen Begleitmedikation, mit einem Bolus von 500 mg Aspirin i.v., 70 IU/kg Heparin i.v., und 0,25 mg/kg Abxciximab als Bolus, sowie des postinterventionellen Procedere, welches während der ersten vier Stunden nach Stenting bei Abfall der aktivierten partiellen Prothrombinzeit unter 80 Sekunden die Entfernung der arteriellen Schleuse mit nachfolgender Anlage eines Druckverbandes für weitere 24 Stunden, die i.v.-Infusion von Abxciximab in einer Dosis von 0,10 µg/min über 12 Stunden, die vierwöchige Gabe von 2 x 250 mg Ticlopidin/d bei einer Initialdosis von 2 x 500 mg, sowie die dauerhafte Einnahme von 100 mg Aspirin pro Tag (d) beinhaltete, unterschieden sich beide Studienpopulationen nicht.

Unmittelbar im Anschluß an das Stenting, sowie 24, 48 und 96 Stunden post interventionem wurden peripher-venöse Blutproben entnommen, auf Eis gekühlt und sofort nach unten beschriebenen Protokollen verarbeitet.

AMI
⇒ 5000 IE Heparin i.a. ⇒ 1 g Aspirin i.v. ⇒ 5-10 mg Metoprolol i.v. ⇒ 5-10 mg Morphin i.v ⇒ 0,25 mg/kg Abxciximab-Bolus



Ausschlußkriterien	Einschlußkriterien
<ul style="list-style-type: none"> • Unfähigkeit, nach Aufklärung eine schriftliche Zustimmung zu leisten • schwere systemische/chronisch entzündliche Erkrankung • koronare Angioplastie/Bypass < 6 Monate • V.a. Aortendissektion • schwere Traumen/chirurgische Eingriffe innerhalb < 6 Monate • Einnahme antiinflammatorischer Medikamente vor Studienbeginn (mit Ausnahme von Aspirin 100 mg/d) • Schwangere, Stillende 	<ul style="list-style-type: none"> • prolongierte pectanginöse Beschwerden Dauer: 3-9 Stunden (h) • Schmerzbeginn < 72 h • EKG-Veränderungen: → ST-Elevation > 0,1 mV in mind. 2 Extremitäten-Abl. → ST-Hebung > 0,2 mV in mind. 2 praekord.ialen Abl. → neu aufgetretener Linksschenkelblock • CK/CK-MB ↑↑ • koronarangiographisch verifizierter Koronararterienverschluss

PTCA
<i>Periprozedurale Begleitmedikation:</i> <ul style="list-style-type: none"> • Aspirin: 500 mg-Bolus i.v. • Heparin: 70 E/kg i.v. (max. 7000 E) • Abxciximab: 0,25 mg/kg i.v. + 0,10 µg/min über 12h • Ticlopidin: 2 x 500 mg, hierauf 2 x 250 mg (4 Wochen) • Aspirin 100 mg/d (dauerhaft)

<i>Post interventionem</i>	<i>Abnahme 1</i>
24 h	Abnahme 2
48 h	Abnahme 3
96 h	Abnahme 4

Tabelle 3: Abnahmeprotokoll

4. Methoden

4.1. Durchflußzytometrie

4.1.1. Aufbau eines Durchflußzytometers

Das Durchflußzytometer „FacScan“ der Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, welches die Grundlage der durchflußzytometrischen Untersuchungen der vorliegenden Studie bildete, setzt sich – vereinfacht dargestellt – aus einer *Messeinheit*, bestehend aus dem Probenführungssystem, einem luftgekühlten 448 nm Argonlaser mit einer Leistung von 500 Milliwatt (mW) zur Fluoreszenzanregung und fünf Detektoren zur Messung der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften, sowie einem konnektierten *Datenverarbeitungssystem* zusammen.

4.1.2. Funktionsprinzip

Die Durchflußzytometrie macht sich die unterschiedlichen **Fluoreszenz-** und **Streulichteigenschaften** einzelner Zellen zu Nutze und ermöglicht somit eine relativ exakte Differenzierung verschiedener Zelltypen anhand deren charakteristischer Signalmuster.

Somit gewährleistet die Durchflußzytometrie eine exakte Identifizierung der einzelnen Leukozytensubpopulationen nach ihren eigentümlichen Zelleigenschaften, wie Zellgröße, Zellmembran, Zellkern oder intrazelluläre Bestandteile bzw. Granularität auf der einen Seite, über die Ermittlung der Fluoreszenzintensität spezifischer markierter monoklonaler Antikörper aber auch eine quantitative Analyse der Antikörperbindung auf der anderen (Watson et al., 86; Van Dam et al., 92).

Essentielle Grundlage zur Erstellung der Messungen bildet das Vorliegen der Probe als monodisperse Einzelzellsuspension, welche - von einem Hüllstrom zur Zentrierung des Probenstromes umgeben - getragen von einer laminaren Strömung in der Jet-Flüssigkeit zum Analysepunkt geleitet wird und dort den Lichtstrahl eines 448 nm Argonlasers, der von seiner Richtung abgelenkt („gestreut“) bzw. von der fluoreszierenden Verbindung absorbiert wird, passiert.

Die Zellkonzentrationen können sich auf einen Bereich zwischen 1×10^5 und 2×10^7 /ml, die Partikelgröße zwischen 0,6 und 20 μm erstrecken.

Lichtintensität und Streuung jedes Partikels werden detektiert und hierauf in digitale elektronische Signale umgewandelt, was im Gegensatz zu fluoreszenzmikroskopischen Verfahren eine objektive, benutzerunabhängige und zeitlich effektive simultane Bestimmung folgender bis zu fünf Parameter erlaubt:

Meßparameter	Meßverfahren
Zellgröße ⇒ „Drei-Zellen- Zellgranularität ⇒ Differenzierung“	Vorwärtsstreulicht Seitwärtsstreulicht
Immunfluoreszenz	Fluoreszenzintensität von Fluorescein
Immunfluoreszenz Zellzyklusanalyse/Vitalitätsprüfung	Fluoreszenzintensität von: Phycoerythrin bzw. Propidiumjodid
Immunfluoreszenz Diskriminierung geschädigter Zellen Zellzyklusanalyse	Fluoreszenzintensität von: Phycoerythrin-Cyanin 5 Propidiumjodid 7-Aminoactinomycin

Tabelle 4: Meßparameter mit zugehörigen Meßverfahren der Durchflußzytometrie

4.1.3. Applikationsmöglichkeiten

Entscheidende Vorteile der Durchflußzytometrie, wie z.B. die verglichen mit der Fluoreszenzmikroskopie hohe Analysegeschwindigkeit von bis 400 bis zu 4000 Zellen/sec, sowie das aufgrund der höchst sensitiven und objektiven Quantifizierung der Fluoreszenzintensität benutzerunabhängige Meßverfahren, aber auch die im Vorangehenden bereits dargelegte Möglichkeit einer Korrelation eines Maximums unterschiedlicher Parameter bei gleichzeitigem Minimum an Meßaufwand, etablierten die Durchflußzytometrie mittlerweile als Routineuntersuchung sowohl im klinischen Alltag, z.B. im Rahmen des sogenannten „Immunmonitoring“ von HIV-Patienten, Organtransplantierten oder Tumorpatienten, als auch im Bereich der (Grundlagen-)forschung zur Differenzierung von Oberflächenantigenen/-rezeptoren in der Leukämiediagnostik, der HLA-Typisierung u.v.m..

4.2. Probenaufbereitung

4.2.1. FACS-Färbung

Für die Durchflußzytometrie wurden 40 µl der in 1 ml Cyfix (freundlicherweise von A. Ruf, Karlsruhe zur Verfügung gestellt) und 39 ml Phosphat-buffered Saline (PBS) fixierten Blutprobe nach 10-minütiger Zentrifugation bei 16000 Umdrehungen pro Minute (Upm) und 4 Grad Celsius (°C) mit jeweils 5 µl eines *fluorescein-isothiozyanit* (FITC)-konjugierten anti-TF-Antikörpers (AK) (American Diagnostica,

Pfungstadt, Deutschland), bzw. anti-TFPI-1-AK (Klon 4904, American Diagnostica, Pfungstadt, Deutschland), sowie eines *phycoerythrin* (PE)-konjugierten monoklonalen anti CD 14-AK (Klon Tük4, Coulter Electronics, Krefeld, Deutschland) zur Identifikation der Monozyten für 30 Minuten bei 4°C inkubiert (Gesamtvolumen des Probenansatzes: 50 µl). Nach einem Waschschrift mit PBS-Puffer (0,145 molare (M) NaCl, 0,01 M Kaliumphosphat, pH 7,2, Fa. GIBCO, Life Technologies, Leopoldshafen, Deutschland) und erneuter Zentrifugation für 10 Minuten mit 1600 Upm bei 4°C folgte eine weitere 30-minütige Inkubation des in 45 µl PBS gelösten Pellets bei 4°C mit 5 µl (Σ 50 µl) FITC-konjugiertem Ziege-anti-Maus-Immunglobulin (Dako, Hamburg, Deutschland) für die Patientenstudie, bzw. FITC-gelabelten anti-TFPI-1 für die in vitro Untersuchungen. Als Verhältnis von FITC zu TF-AK wurde 2,5 bis 3 gewählt (Neumann et al., 1997). Hieran schloß sich vor der durchflußzytometrischen Analyse unter Verwendung des Facs-Gerätes FACS Calibur (Becton-Dickinson, Mountain View, USA) die Lyse der Erythrozyten mittels 500 ml einer in einem Verhältnis von 1:25 mit PBS verdünnten auf 37°C erwärmten Lysereagenz (Coulter, Miami, USA) mit nachfolgender Zugabe von 125 ml einer Fixierlösung (Coulter, Miami, USA) nach Ablauf von exakt 70 Sekunden, um eine Beeinträchtigung der Leukozyten zu vermeiden. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS-Puffer und anschließender Zentrifugation bei 1600 Upm für 10 Minuten bei 4°C konnte schließlich die Fixierung der Zellen mit 200 µl einer 1%-igen Paraformaldehyd-(PFA-) Lösung erfolgen. Die Fluoreszenzintensität von 5000 Zellen der als „CD14+“ identifizierten Monocytenpopulation wurde aufgezeichnet, in Form von „List mode files“ gespeichert und mit Hilfe der Cell Quest Software ausgewertet. Die Reproduzierbarkeit konnte durch die Kalibration mit einer Mischung aus fluoreszierenden, einheitlich großen CaliBRITE sichergestellt werden.

4.2.2. Ribonukleinsäure- (RNA)-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde anhand eines Fertig-Kits zur Separation der RNA aus Vollblut (RNeasy Blood Mini Kit, Quiagen, Crawley, U.K.) nach den Anweisungen des Herstellers aus EDTA-antikoaguliertem Blut extrahiert:

Am Beginn der RNA-Isolierung stand die selektive Lyse der kernlosen und somit aufgrund ihrer fehlenden Fähigkeit RNA zu synthetisieren für die Isolierung von RNA irrelevanten Erythrozyten, deren im Vergleich zu Leukozyten erhöhte Anfälligkeit gegenüber hypotonen Lösungen man sich bei der Zugabe von initial 25 ml, sowie hierauf 10 ml eines vom Hersteller vorgefertigten Puffers, unterbrochen von zehnminütiger Zentrifugation bei 1600 Upm, 4°C zur Regeneration intakter Leukozyten zunutze machte. Hieran schloss sich die Lyse der im Pellet verbleibenden Leukozyten mittels 3 ml eines β-Mercaptoethanol enthaltenden Puffers („RLT“), sowie die anschließende Aufteilung des Gesamtvolumens von 3 ml auf fünf Säulen von jeweils 600 µl und Homogenisierung des Lysates bei

Zentrifugation mit einer maximalen Geschwindigkeit von 13000 Upm über zwei Minuten unter hochdenaturierenden Bedingungen, die durch rasche Inaktivierung von RNasen eine Isolation intakter RNA gewährleisten. Nach Praecipitation und Bindung der RNA durch Zugabe von je 600 µl 70 %-igem Ethanol pro Säule, drei Waschschritten mit je 700 µl Waschpuffer („RW 1“), bzw. 2 x je 500 µl Puffer („RPE“) mit zwischenzeitlicher Zentrifugation, sowie Hinzufügen von je 30 µl RNase-freiem Wasser zum erneuten Lösen der RNA und abschließendem Zentrifugationsschritt bei 10000 Upm, 1 Min., 4°C zur Eluierung konnte schließlich die Summe der fünf verbleibenden Diluents bis zur weiteren Verarbeitung mittels der im folgenden erläuterten Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bei -70°C weggefroren werden.

4.2.3. Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Zur Synthese der komplementär DNA (cDNA) wurde 1 µg RNA mit 10 U Superscript reverse transcriptase (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und 100 ng oligo (dT) primer zusammen mit dem Puffer des Herstellers, bestehend aus 10 nmol dNTP und 10 mM DTT, bei 42 Grad Celsius für 50 Minuten inkubiert. Die PCR der cDNA wurde mit 10 U Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) gestartet. Pro PCR-Reaktion wurde ein Gesamtansatz von 1 µg von jeder cDNA und 25 nm des Primers für TF, TFPI-1, E-Selektin und GAPDH verwendet. Als Positivkontrolle für TF und GAPDH diente synthetische RNA CY 101. Die Primer wurden entworfen um Intron-Exon-Grenzen zu ziehen, und so amplifizierte cDNA von amplifizierter Genom-DNA unterscheiden zu können. Für E-Selektin wurde für die Vervielfachung eine cDNA Sequenz, die sich über Exon 3 und 4 erstreckt, für TF eine Sequenz in Exon 4 und 6 und für TFPI-1 in Exon 8 und 9 ausgewählt. Um einer eventuellen Verschleierung etwaiger Auswirkungen auf die Induktion der mRNA durch den sogenannten „Plateau-Effekt“, bei welchem ein ungenügendes Verhältnis von DNA und Primer zu einem Transkriptionsstop führt, zu verhindern, wurden serielle Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen DNA-Mengen durchgeführt.

Molekül	Primer-Sequenz	PCR-Produkt
TF	5' CTTGTGTAGAGATATAGCCAGG 3' 5' GGGAACAAAAGTGAATGTGACC 3'	376 bp
TFPI-1	5' CAACTCTGATACAAACGTGTTGA 3' 5' CTACTACAATTCAGTCATTGGGA 3'	374 bp
GAPDH	5' GTTGTCATGGATGACCTTGGCC 3' 5' CCACCCATGGCAAATTCATGG 3'	350 bp
E-Selektin	5' CTTGACAGAAGAAGCCAAG 3' 5' ACTTGAGTCCACTGAAGGCA 3'	235 bp

Tabelle 5: AS-Sequenz der Primer

Die Bedingungen der PCR wurden für jedes der vier Moleküle optimiert: Dem initialen Denaturierungsschritt bei 95 Grad Celsius für 2 Minuten schlossen sich 30 Zyklen einer einminütigen Denaturierung bei 95 Grad Celsius, gefolgt von 1 Minute Erwärmung bei 60 Grad Celsius und 1 Minute Extension bei 72 Grad Celsius für 30 Zyklen in einem Gene Amp 9600 Thermocycler (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) an. Nach dem letzten Zyklus folgte eine letzte Extensionsphase von 7 Minuten bei 72 Grad Celsius. Die PCR-Produkte wurden auf 6 % Polyacrylamidgels (Novex, Frankfurt, Deutschland) analysiert, mit 0,001 %-igem Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Hierauf wurde die Dichte jeder Bande mittels NIH-Image quantifiziert. Durch anfängliche Experimente stellten wir einen linearen Zusammenhang zwischen cRNA-Konzentration und dem cDNA-Produkt, das wir durch die densitometrische Analyse abschätzten, sicher. Die TF- bzw. TFPI-1-Dichte des TF- bzw. TFPI-1-Produktes wurde mit der GAPDH-Intensität der selben Probe korreliert, wobei dieses Verhältnis als Maß des spezifischen RNA-Gehaltes diente.

4.2.4. Isolation mononukleärer Zellen

Die mononukleären Zellen wurden mittels Ficoll-Gradienten-Separation (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) nach Schichtung von 25 ml CPDA-antikoaguliertem Blut (Verhältnis 1:5) auf 25 ml Ficoll-Paque und anschließender Zentrifugation für 17 Minuten bei 2100 Upm, 20 °C durch Transfer der (milchigen) Intermediärschicht und mehrmaliges Waschen mit PBS-Puffer isoliert. Die Suspension mononukleärer Zellen enthielt 35 +/- 10 % Monozyten. Es konnten keine Unterschiede der TFPI-Oberflächenexpression nach dem Separationsvorgang verglichen mit Vollblutproben, die mit der Methode der Durchflußzytometrie gemessen wurden, festgestellt werden.

4.2.5. Messung der Faktor Xa-Bildung

Eine Anzahl von 5×10^6 Zellen wurde in 100 μ l Zellpuffer (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,75 mM Na_2HPO_4 , 5,5 mM Glucose, 2 mM CaCl_2 , pH 7,4) resuspendiert und mit 100 μ g/ml polyklonalem anti-TFPI-1 IgG (American Diagnostica), rekombinatem TFPI-1 (bis zu 500 nM, American Diagnostica, Pfungstadt, Deutschland) oder – zur Inhibition der TFPI-1-Bindungsstellen an LRP - 100 nM RAP (S.K. Moestrup, Universität von Aarhus, Dänemark) bei 37 Grad Celsius für 15 Minuten inkubiert und sodann zum Start der Faktor Xa-Bildung mit Faktor VIIa (5 nM) und Faktor X (500 nM, American Diagnostica) versehen. Nach 30 Minuten wurden 50 μ l-Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 150 μ l 0,1 M EDTA gestoppt. Nach Zugabe von 50 μ l Spektrozym Xa wurde die Faktor Xa-Bildung bei 405 nm photometrisch gemessen. Regulierter TF wurde als Verhältnis der (Faktor Xa-Erzeugung mit TFPI-1 AK – Faktor Xa-Bildung ohne TFPI-1 AK)/Faktor Xa-Bildung mit TFPI-1 AK definiert.

4.2.6. Isolierung Triton X 114-unlöslicher Membranfraktionen

Zur enzymatischen Spaltung GPI-verankerter Proteine wurde eine Suspension aus 6×10^6 Zellen/ml und Zellpuffer mit 1 U/ml Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) für 60 Minuten bei 37 Grad Celsius inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit HBS-Puffer (100 mM Tris, 10 mM EDTA, 2000 U/ml Aprotinin und 100 μ M PMSF) gewaschen und teilweise für die Durchflußzytometrie wie oben beschrieben gefärbt. Für die Triton X-114 Fraktionierung wurden die verbleibenden Zellpellets durch 15-minütige Inkubation auf Eis unter zwischenzeitlichem mehrmaligen Mischen mit 1 ml 1 % Triton X-114 in 0,1 M Tris, 10 mM EDTA, 2000 U/ml Aprotinin und 100 μ M PMSF lysiert. Zelldebris wurde mit Hilfe eines Zentrifugationsschrittes bei 14000 Upm bei 4 Grad Celsius beseitigt. Hierauf wurde durch fünfminütige Inkubation des geklärten Lysats bei 37 Grad Celsius, mit nachfolgender kurzer Zentrifugation bei 14000g zur Trennung der detergenten und wässrigen Phase, die Phasenseparation eingeleitet. Das detergente Pellet wurde mit dem 10-fachen Volumen von Azeton herausgelöst, was zu einer Präzipitation des gelösten Proteins, welches in nicht-reduzierendem SDS- (Natrium-Dodeacyl-Sulfat) Puffer resuspendiert und zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst wurde, führte. Extrahierte Proteine eines Äquivalents von 5×10^5 Zellen wurden pro Bahn für die Separation mit Natrium Dodeacyl Sulfat-Polyacryl Amid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot unter Verwendung von polyklonalem anti-TFPI-1 AK geladen.

4.2.7. Proteinanalyse mittels Western Blot

Der Separation einer konstanten Menge von 5 µg Protein auf einem Gel mit 8 – 16 %-iger Steigung folgte der Transfer auf Immobilon P (Millipore Corp., Bedford, USA) unter Verwendung eines halbtrockenen Transfersystems (Sevinsky et al., 96). Die Identifizierung von TFPI-1 gelang mittels eines polyklonalen Kaninchen-anti-TFPI-IgG, ein gebundener Erstantikörper, mit einem geeigneten Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Esel-anti-Kaninchen-Zweitantikörper (1:1000), der mittels chemilumineszierenden Reagentien auf einem Röntgenfilm dokumentiert wurde. Die Quantifizierung stützte sich auf die densitometrische Analyse mit NIH-Image.

4.2.8. Messung der Prothrombinfragmente F_{1+2}

Zur in-vitro-Bestimmung der bei der Umwandlung von Prothrombin zum aktiven Thrombin frei werdenden Prothrombinfragmente F_{1+2} wurde ein Enzymimmunoassay nach dem Sandwich-Prinzip verwendet (Enzygnost F_{1+2} micro, Fa. Behring, Marburg, Deutschland). Zu Beginn erfolgte die Bindung des in der Probe vorhandenen F_{1+2} -Antigens an die F_{1+2} -Antikörper durch 15-minütige Inkubation der mit Kaninchen-Antikörpern gegen humanes Prothrombinfragment F_{1+2} beschichteten Mikrotitrationsplatten, die in einem vorbereitenden Schritt mit je 50 µl einer Tween-haltigen Tris-Pufferlösung versehen worden waren, mit je 50 µl einer im Verhältnis von 1:9 mit Na-Citrat antikoagulierten Plasmaprobe, bzw. vier Standardproben mit 0,04, 0,2, 2, 10 nmol/l F_{1+2} und einer Positivkontrolle von definierter F_{1+2} -Konzentration bei 37 Grad Celsius. An einen zweimaligen Waschvorgang mit je ca. 0,3 ml einer Tween-haltigen Phosphat-Pufferlösung schloss sich die Bindung peroxidase-konjugierter Antikörper gegen Human-Prothrombin an die freien F_{1+2} -Determinanten durch Zugabe von je 100 µl einer Konjugatlösung aus Konjugatpuffer (Tween-haltiger Tris-Puffer, Rinderserumalbumin) und Anti-Prothrombin/POD-Konjugat (peroxidasekonjugiertes Kaninchen-Anti-Human-Prothrombin) eine zweite Inkubationsphase von 15 Minuten bei 37 Grad Celsius. Überschüssige Enzym-konjugierte Antikörper wurden mittels erneutem dreimaligen Waschen entfernt und hierauf 100 µl einer frisch angesetzten Chromogen (o-Phenylendiamin-dihydrochlorid) - Puffer/Substrat (Wasserstoffperoxid 0,3 g/l in Citrat-Pufferlösung) - Lösung, hinzugefügt und für 15 Minuten bei 20-25 Grad Celsius unter Lichtschutz inkubiert. Durch Zusatz von 100 µl 0,5 N Schwefelsäure wurde die enzymatische Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Chromogen unterbrochen, woraufhin die der F_{1+2} -Konzentration proportionale Farbintensität bei einer Wellenlänge von 492 nm photometrisch bestimmt wurde. Eine aus den Extinktionsmittelwerten der Standards, die einen Konzentrationsbereich von 0,04 bis 10 nmol/l abdeckten, berechnete doppel-logarithmische Bezugskurve ermöglichte die unmittelbare Ablesung der F_{1+2} -Konzentrationen.

Sonstige Methoden: Zellzählungen wurden mit einem Sysmex Counter (Digitana, Hamburg, Deutschland) vollzogen. Die Serumkonzentrationen der Creatinkinase wurden im Labor für Klinische Chemie des Deutschen Herzzentrums bestimmt. Es konnte keinerlei Endotoxin-Kontamination der Leukozyten-Suspension oder der Puffer festgestellt werden (E-toxate, Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

4.3. Statistische Auswertung

Unterschiede zwischen mehr als zwei verbundenen Stichproben wurden zunächst mit dem Friedmann-Test, hierauf mittels Wilcoxon's matched pairs signed-ranks Test überprüft. Unterschiede zwischen Studien- und Kontrollgruppe je nach Eignung mit dem Mann-Whitney-Wilcoxon-Rangsummen- oder dem Fishers Exakt Test ermittelt, die Normalverteilung wurde anhand des Kolmogorov Smirnov Tests aufgezeigt. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte +/- Standardabweichung dar. Eine mögliche Korrelation zwischen einzelnen Parametern wurde mit linearer Regressionsanalyse untersucht. Ein Wert von $p < 0,05$ im zweiseitigen Test wurde als signifikant gewertet.

5. Ergebnisse

5.1. Demographische/Angiographische Daten der Studienpatienten

Studien- und Kontrollgruppe waren sowohl bezüglich ihrer demographischen (Alter, Geschlecht, Risikofaktoren), als auch der angiographischen Daten (Art/Anzahl des(r) betroffenen Gefäße(s)) vergleichbar. Bei sämtlichen Patienten konnte nach erfolgreicher Gefäßrekanalisation und Stentimplantation eine Reduktion des prozentualen Stenosegrades auf unter 15 % erreicht und somit ein Koronarfluß vom Grad TIMI 3 wiederhergestellt werden, wobei sich die Dauer vom Beginn der Symptomatik bis zum Start der Intervention über einen Zeitraum von 0,5 bis 8 Stunden erstreckte. Der durchschnittliche Wert der maximalen CK-Erhöhung lag bei 1325 U/l bei einer Schwankungsbreite von 230 – 5962 U/l.

Keiner der Patienten erlitt einen Reinfarkt oder starb während des stationären Aufenthaltes.

	Patienten	Kontrollen
Geschlecht (M/W)	29/11	15/5
Alter	61,8 (36-87)	63,7 (31-79)
Risikofaktoren:		
• Nikotinabusus	23 (56 %)	10 (50 %)
• Hyperlipidämie	30 (75 %)	15 (75 %)
• Art. Hypertonie	33 (83 %)	14 (70 %)
• Diabetes mellitus	10 (25 %)	5 (25 %)
Betroffene Gefäße:		
• LAD	16 (40 %)	8 (40 %)
• LCX	17 (43 %)	7 (35 %)
• RCA	7 (18 %)	5 (30 %)
CK_{max} (U/l)	1325 (230-5962)	< 80
Anzahl der betr. Gefäße:		
• 1-GE	18 (45 %)	5 (25 %)
• 2-GE	14 (35 %)	8 (40 %)
• 3-GE	8 (20 %)	6 (30 %)
Kardiale Vorgeschichte:		
• MI	4 (10 %)	10 (50 %)
• PTCA	3 (8 %)	1 (5 %)

Tabelle 6: Demographische Basisdaten der beiden Studiengruppen

5.2. Transkriptionsrate und Oberflächenexpression von Tissue Factor und Tissue Factor Pathway Inhibitor-1 auf zirkulierenden Monozyten

96 Stunden nach direktem Stenting konnte bezogen auf die Werte vor Intervention ein signifikanter Anstieg der TF-Oberflächen-Expression (*Abbildung 8*) beobachtet werden (* $P = 0,02$ bezogen auf die Werte unmittelbar nach Intervention; + $P = 0,02$ verglichen mit den Patienten mit stabiler Angina Pectoris Symptomatik), dem eine signifikante Erhöhung ($P = 0,009$) der TF-RNA-Expression auf zirkulierenden Leukozyten 48 Stunden nach Intervention vorausgegangen war (* $p < 0,01$ bezogen auf die unmittelbar nach Intervention gemessenen Werte; + $P = 0,001$ verglichen mit den Patienten, die sich einem elektiven Stenting unterzogen), während hingegen unmittelbar nach Stentimplantation keine TF-mRNA nachgewiesen wurde (*Abbildung 10*). Im Gegensatz dazu folgte auf den elektiven Eingriff weder eine vermehrte TF-Oberflächenexpression auf Monozyten noch eine erhöhte zelluläre TF-mRNA-Expression auf zirkulierenden Leukozyten (*Abbildung 8/10*).

Abbildung 9 zeigt ein repräsentatives Histogramm eines Infarktpatienten unmittelbar, sowie 96 Stunden nach Intervention, *Abbildung 11* die TF-RT-PCR-Produkte eines Patienten mit akutem Myokardinfarkt.

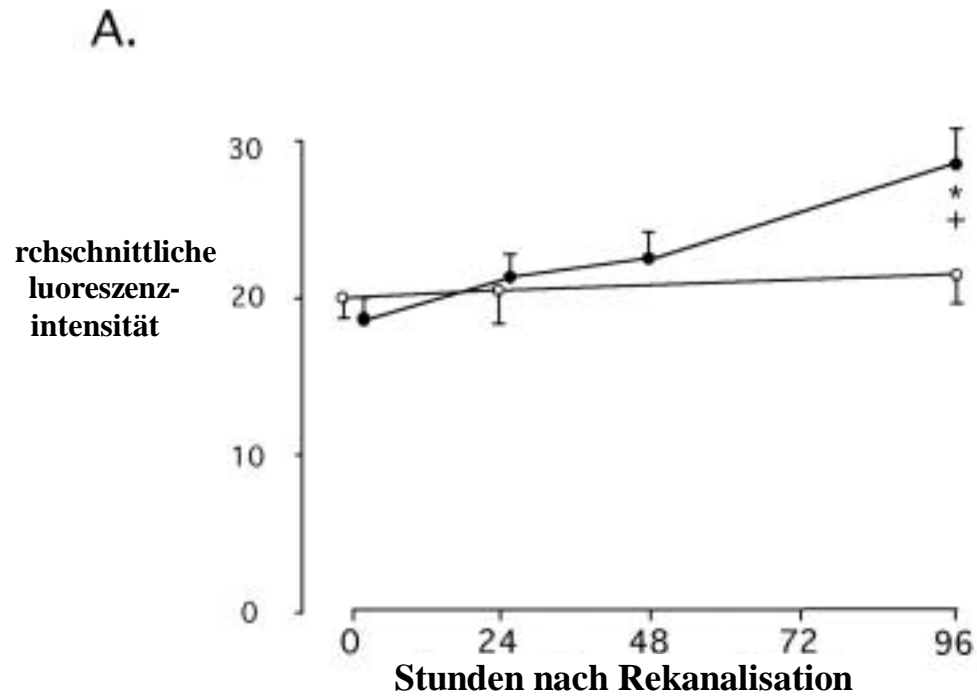


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der TF-Expression auf Monozyten bei Infarktpatienten nach Stentimplantation (●) bzw. nach elektivem Stenting bei Patienten mit stabiler Angina Pectoris (○)

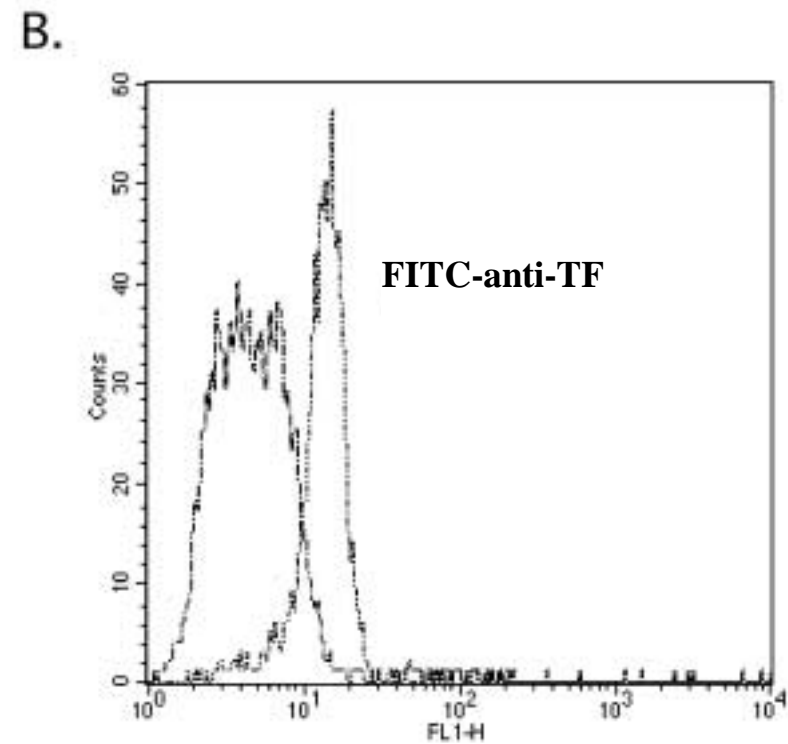


Abbildung 9: Repräsentatives Histogramm eines Infarktpatienten unmittelbar nach Stentimplantation (-----) und 96 Stunden nach Intervention (—)

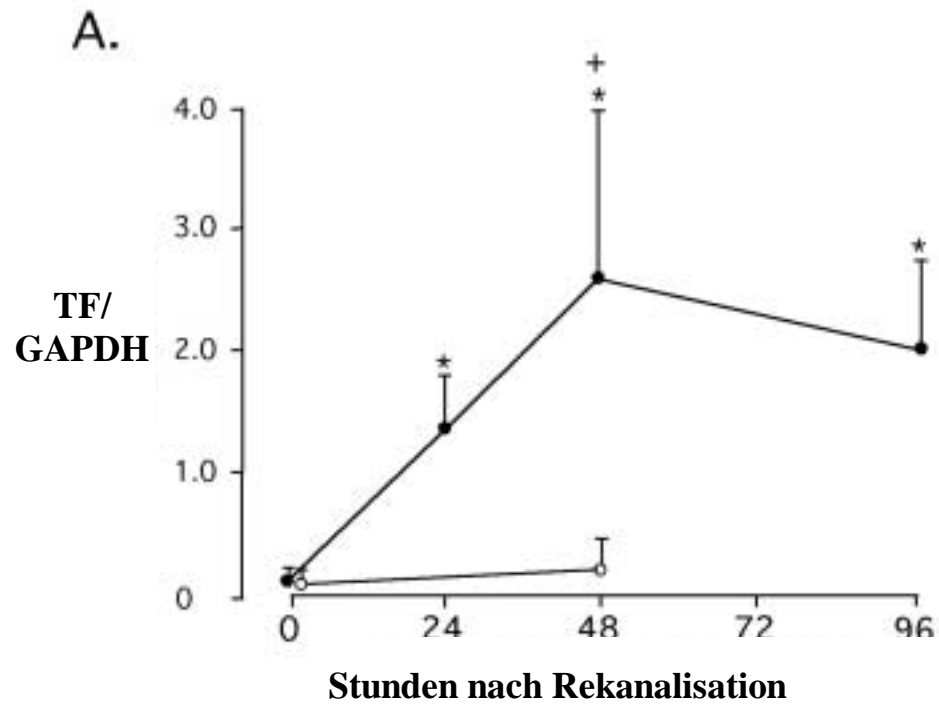


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der TF-RNA-Expression auf zirkulierenden Leukozyten von Infarktpatienten nach Stentimplantation (●) bzw. nach elektivem Stenting bei Patienten mit stabiler Angina Pectoris (○)

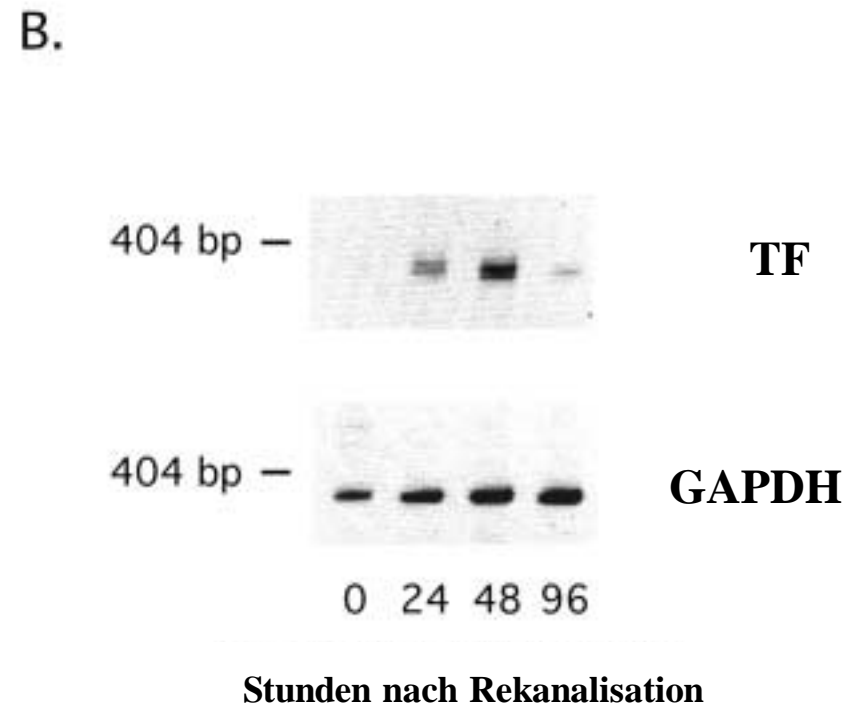


Abbildung 11: TF-RT-PCR-Produkte eines repräsentativen Infarkt-Patienten

Die TFPI-1-Expression auf zirkulierenden Monozyten der Infarktpatienten blieb während des gesamten Beobachtungszeitraums unverändert und bewegte sich etwa in der Größenordnung der TFPI-1-Oberflächenexpression nach elektivem Stenting (*Abbildung 12*). Ebenso konnten weder im zeitlichen Verlauf innerhalb einer Gruppe noch im Vergleich beider Patientenkollektive signifikante Veränderungen der TFPI-1 mRNA-Expression auf zirkulierenden Leukozyten mittels RT-PCR aufgezeigt werden (*Abbildung 14*). Die Gesamt-TFPI-1-Plasmakonzentrationen der Infarktpatienten lagen unmittelbar nach Intervention bei 192,8 +/- 22,7 ng/ml und fielen innerhalb des Zeitraums bis 96 Stunden nach Intervention auf 27,6 +/- 3,5 ng/ml ($p < 0,001$), was in etwa den Ergebnissen der Kontrollgruppe gleichkommt, ab.

Abbildungen 13 und *15* zeigen ein repräsentatives Histogramm 0 und 96 Stunden nach akutem Stenting, bzw. die TFPI-1-RT-PCR-Produkte eines Infarktpatienten.

E-Selektin-RNA konnte 96 Stunden nach Intervention auf zirkulierenden Zellen nicht nachgewiesen werden.

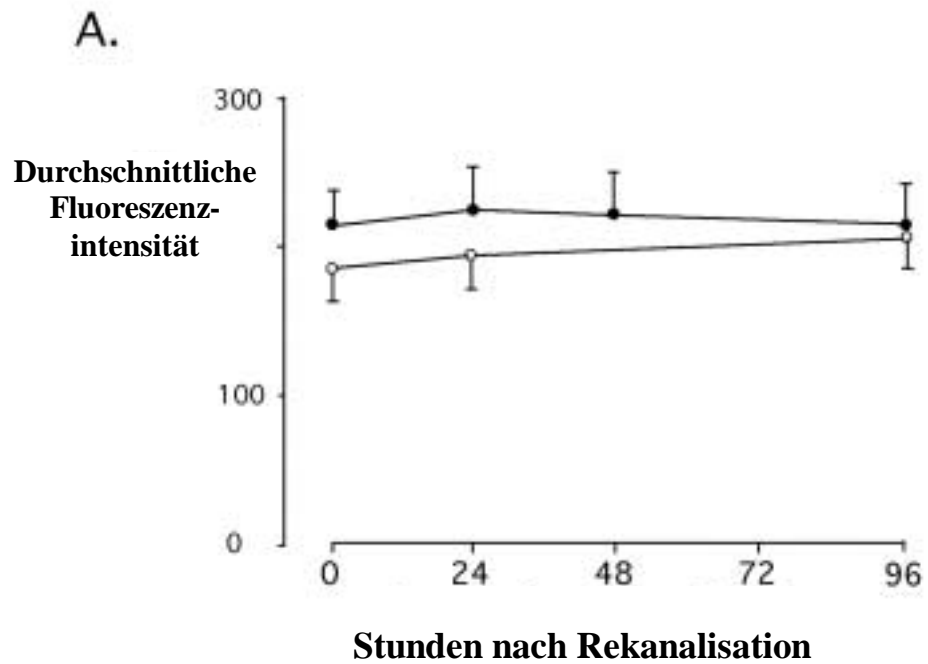


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der TFPI-Expression auf Monozyten bei Infarktpatienten nach Stentimplantation (●) bzw. nach elektivem Stenting bei Patienten mit stabiler Angina Pectoris (○)

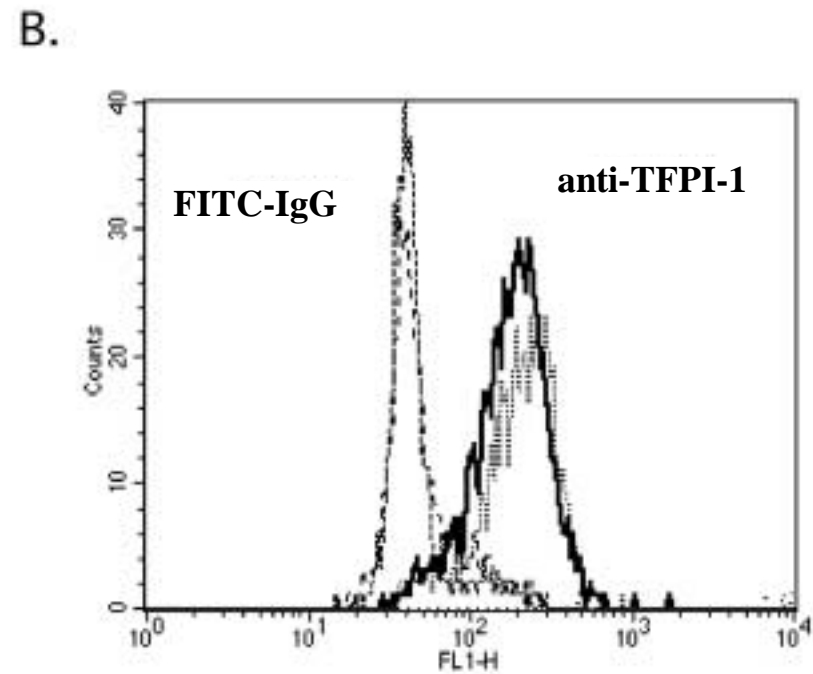


Abbildung 13: Repräsentatives Histogramm eines Infarktpatienten unmittelbar nach Stentimplantation (—) und 96 Stunden nach Intervention (·····)

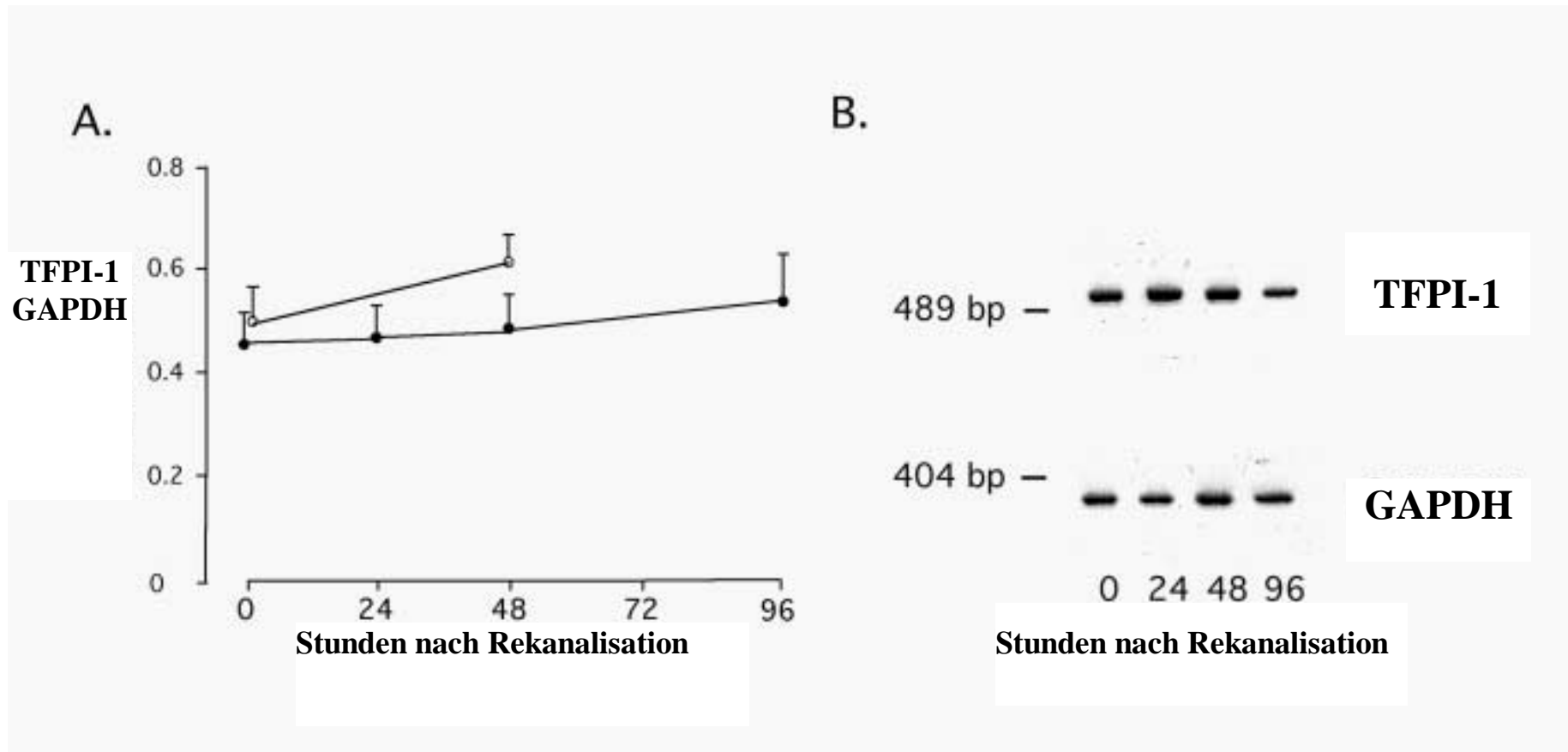


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der TFPI-RNA-Expression auf zirkulierenden Monozyten von Infarktpatienten nach Stentimplantation (●) bzw. nach elektivem Stenting bei Patienten mit stabiler Angina Pectoris (○)

Abbildung 15: TFPI-RT-PCR-Produkte eines repräsentativen Infarktpatienten unmittelbar nach Stentimplantation

5.3. Funktionelle Konsequenzen der TF- und TFPI-1-Expression

Gereinigte, isolierte mononukleäre Zellen von Infarktpatienten mit erhöhter TF-Oberflächenexpression produzierten – verglichen mit der Kontrollgruppe, in welcher lediglich geringe Konzentrationen von Faktor Xa gemessen wurden, - nach Zugabe von Faktor VIIa und Faktor X signifikante Mengen aktivierten Faktors Xa; + P = 0,04 gegenüber Patienten mit stabiler Angina Pectoris (*Abbildung 16*).

Die TF-Aktivität der Infarktpatienten, ausgedrückt durch die Faktor Xa-Bildung, stieg in Gegenwart inhibitorischen TFPI-1-Antikörpers sogar noch weiter an (*Abbildung 16*), während hingegen sich nach elektivem Stenting, verglichen mit den Werten ohne Zugabe von anti-TFPI-1-AK, keine signifikante Veränderung der Faktor Xa-Bildung fand; * P = 0,001 verglichen mit den Werten ohne Zugabe von anti-TFPI-1-AK. Im unmittelbaren Vergleich der mononukleären Faktor Xa-Bildung mit und ohne Zugabe von blockierendem anti-TFPI-AK konnten wir für den durch TFPI-1 regulierten TF einen Prozentsatz von 53,6 +/- 9 % ermitteln.

Daß dieser Anstieg der TF-Aktivität spezifisch auf die Anwesenheit des TFPI-1-AK zurückzuführen ist, zeigt die fehlende Zunahme der TF-Aktivität nach Zugabe von Kaninchen IgG.

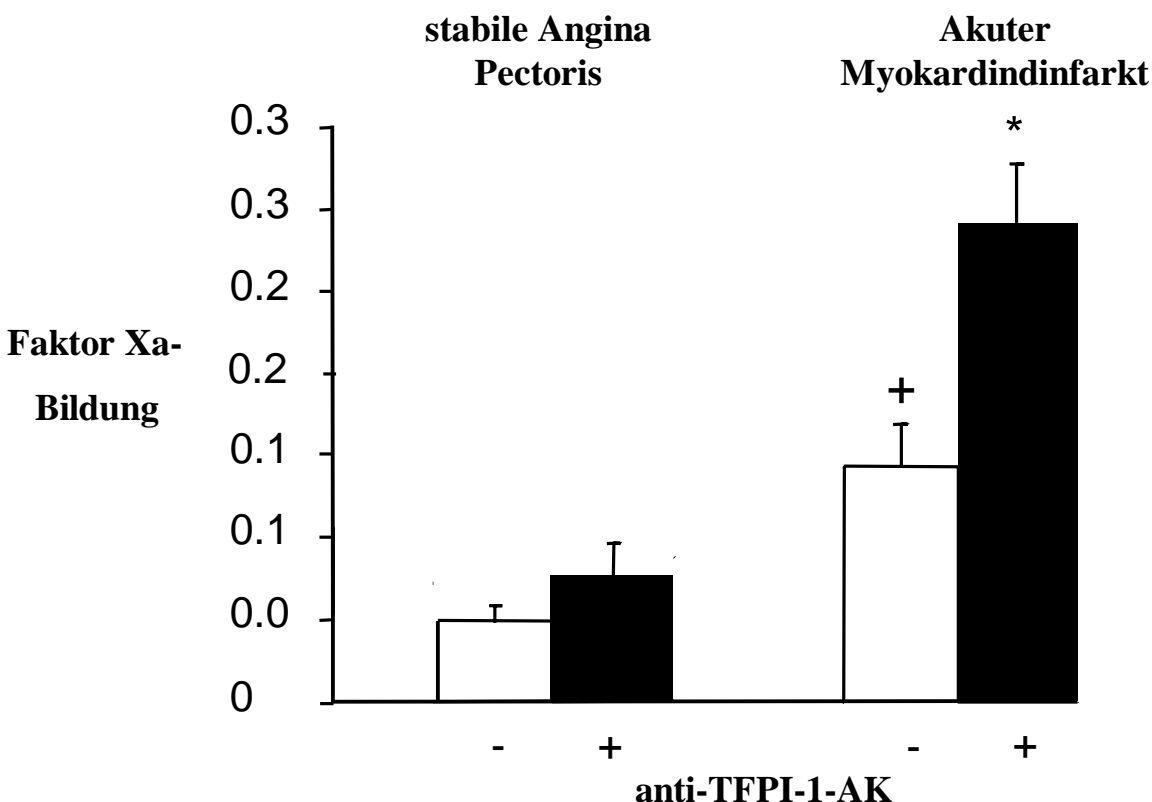


Abbildung 16: TFPI-1-induzierte Hemmung der Funktion von Tissue Factor 96 Stunden post interventionem bei Infarktpatienten versus Patienten mit stabiler AP aufgezeigt anhand der Faktor Xa-Bildung durch mononukleäre Zellen nach Initiierung der Kaskade durch Hinzufügen von Faktor VIIa und X mit und ohne Zugabe inhibitorischer anti-TFPI-1-AK.

Als funktionelles Korrelat in vivo wurde 24 Stunden nach Intervention bei den Infarktpatienten eine signifikant ($P = 0,0001$) erhöhte Bildung der bei der Konversion von Prothrombin zu Thrombin frei werdenden und somit als sensitive und spezifische Marker der systemischen Thrombinbildung einsetzbaren Prothrombinfragmente F_{1+2} um $61 \pm 13 \%$ beobachtet, die 96 Stunden nach Stentimplantation um maximal bis zu $103 \pm 17 \%$ anstieg; * $p \leq 0,03$ bezogen auf die unmittelbar nach Stenting ermittelten Werte, + $p \leq 0,04$ verglichen mit den Kontrollpatienten (Abbildung 17). Die Kontrollgruppe zeigte im Gegensatz hierzu keinerlei wesentliche Veränderungen ihrer F_{1+2} -Konzentrationen, sondern rangierte weiterhin im Normbereich (Abbildung 17).

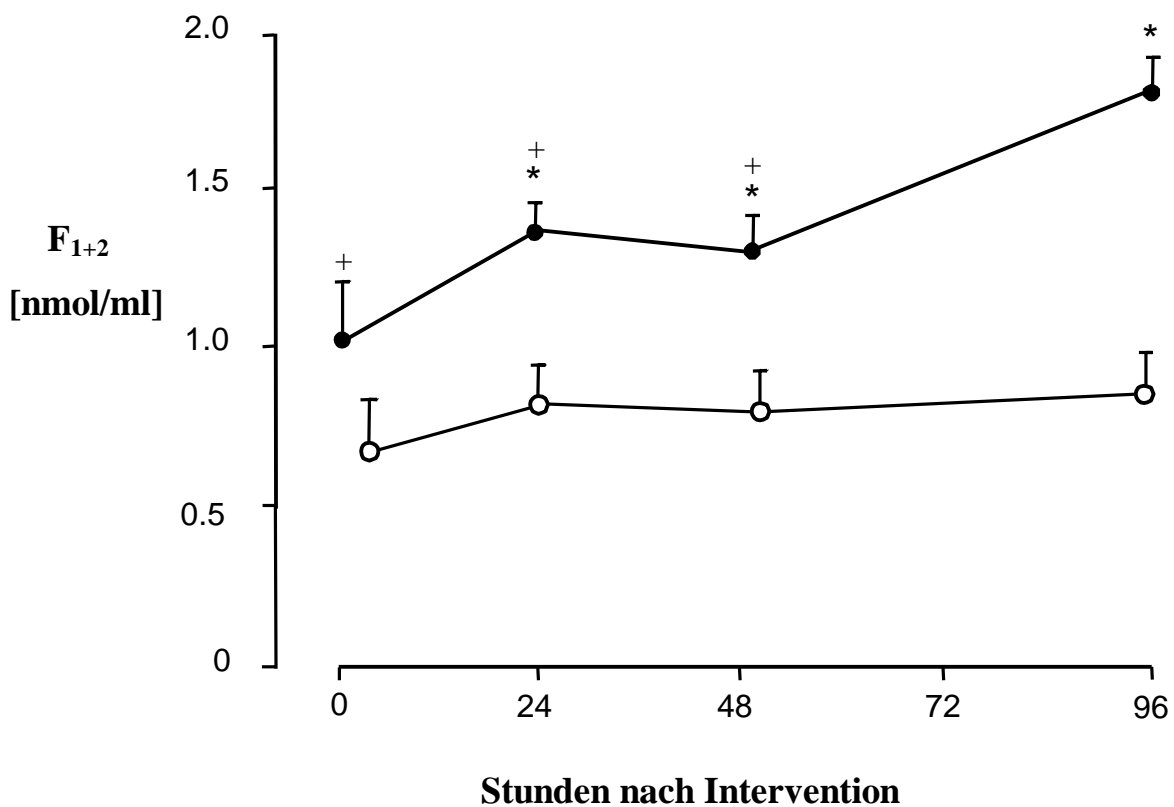


Abbildung 17: Verlauf der Prothrombinfragment F_{1+2} -Plasmakonzentrationen bei Infarktpatienten (●) bzw. Patienten mit stabiler Angina Pectoris (○).

Keine der beiden Patientengruppen reagierte nach Blockade von TFPI-1-Bindungsstellen mittels des LRP-Inhibitors RAP (0,38 +/- 0,05 OD ohne und 0,36 +/- 0,04 OD mit 100 nM RAP; n = 5) bzw. nach exogener Zugabe von bis zu 10 nmol/l rekombinanten TFPI-1s mit einer verminderten Faktor Xa-Produktion. Lediglich in einem Konzentrationsbereich von $\text{TFPI-1}_{\text{rekombinant}} \geq 25 \text{ nmol/l}$ konnte ein signifikanter Abfall der Faktor Xa-Bildung beobachtet werden; * $p < 0,008$ bezogen auf die Kontrollwerte ohne rekombinanten TFPI-1 (*Abbildung 18*).

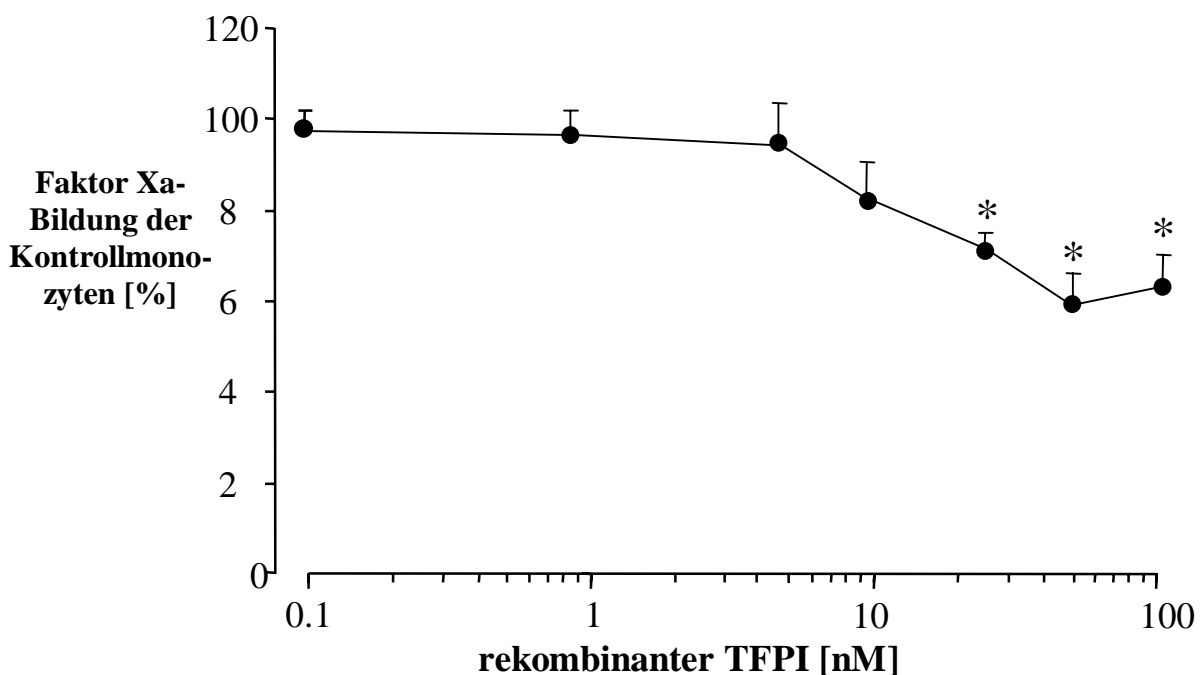
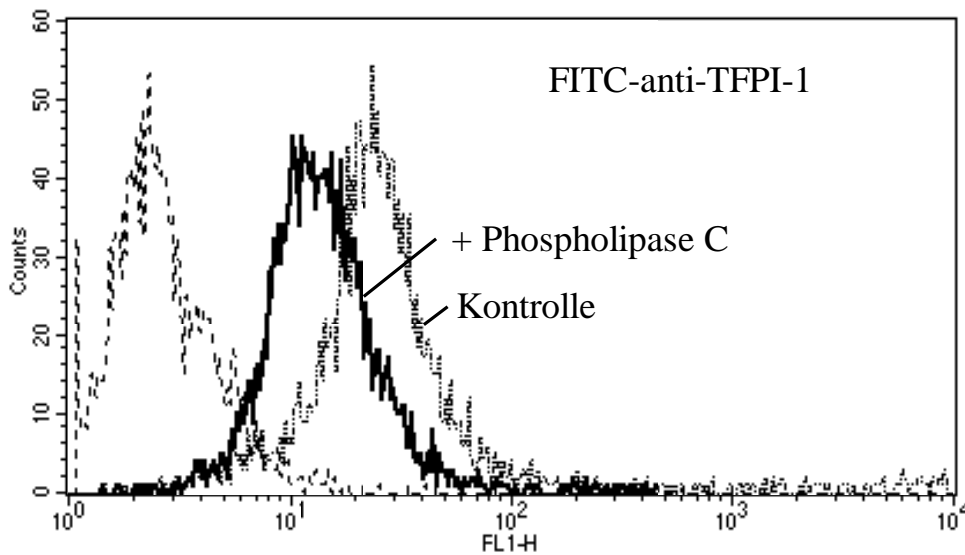


Abbildung 18: Auswirkungen ansteigender Konzentrationen rekombinanten TFPI-1s auf die monozytäre TF-Aktivität von Infarktpatienten (n = 12) 96 Stunden nach Gefäßrekanalisation. Die Faktor Xa-Bildung durch mononukleäre Zellen wurde nach Zugabe von Faktor VIIa und Faktor X mit und ohne rekombinantem TFPI-1 gemessen.

5.4. Tissue Factor Pathway-1-Verankerung auf Monozyten

Um zwischen GPI-verankerten und nicht-GPI-verankerten TFPI-1-Bindungsstellen unterscheiden zu können, wurden die mononukleären Zellen zur Freisetzung GPI-verankerter Proteine mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C versetzt. Diese vermochte – wie sowohl die durchflußzytometrische Messung (Abbildung 19 A), als auch die Proteinanalyse mittels Western Blotting (Abbildung 19 B) eindrucksvoll veranschaulicht - endogenen TFPI-1, dessen durchschnittliche Immunfluoreszenzintensität signifikant ($P = 0,03$, $n = 4$) von 186 ± 39 auf 111 ± 26 abfiel, effizient freizusetzen. Die mittlere Fluoreszenzintensität des Kontroll-Antikörpers lag bei 10 ± 2 .

A. Durchflußzytometrie



B. Western Blot

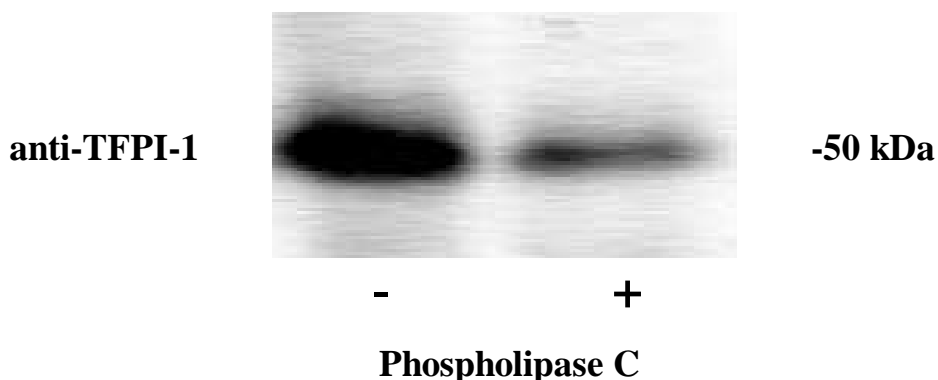


Abbildung 19: Effekt einer Inkubation von Monozyten mit Phospholipase C auf membrangebundenen TFPI-1 auf Monozyten, wobei einmal die Oberflächenexpression von TFPI mittels Durchflußzytometrie (A) zum anderen Triton X 100-löslicher, membranassoziierter TFPI-1 anhand eines Western Blots (B) mit anti-TFPI-1-AK ermittelt wurde.

6. Diskussion

6.1. Tissue Factor und prokoagulatorische Aktivität von Monozyten im akuten Myokardinfarkt

Vorliegende Studie konnte als Ursache der erhöhten prokoagulatorischen Aktivität (PCA) von zirkulierenden Monozyten nach Stentimplantation im akuten Myokardinfarkt den Anstieg der monozytären TF-Transkriptionsrate sowie der nachfolgenden TF-Oberflächenexpression auf Monozyten zeigen. Die funktionelle Relevanz dieser gesteigerten PCA *in vitro* wird durch eine erhöhte Faktor VIIa-abhängige Faktor Xa-Bildung verifiziert, und korreliert *in vivo* mit erhöhten Plasmakonzentrationen der Prothrombinfragmente F_{1+2} als Ausdruck einer vermehrten, zu postinterventionellen thrombotischen Ereignissen beitragenden Thrombinbildung.

Angesichts der während des gesamten Beobachtungszeitraumes nach Intervention konstanten TF-Expression durch Monozyten in der Kontrollgruppe, die sich bei einer chronisch stabilen Angina-pectoris-Symptomatik einem elektiven Eingriff unterzog, können wir den invasiven Eingriff der Gefäßrevaskularisation bzw. der Stentimplantation an sich als verursachendes Agens dieses Phänomens ausschließen. Bereits frühere Studien hatten eine Vielzahl von nach akutem Herzinfarkt freigesetzten Entzündungsmediatoren, wie IL-6, IL-8, Monozyten-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1), oder Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) als starke Stimuli für eine vermehrte TF-Expression auf Monozyten beschrieben (Neumann et al., 97; Mackman et al., 97; Camerer et al., 99), doch war bislang die TF-Expression auf Monozyten hauptsächlich mit deren Schlüsselrolle bei der Entstehung der Verbrauchskoagulopathie im Rahmen eines septischen Geschehens (Asada et al., 98) in Verbindung gebracht, deren Verlauf nach akutem Myokardinfarkt jedoch bisher nicht explizit untersucht worden.

6.2. Partielle Hemmung der Tissue Factor-Aktivität durch Tissue Factor Pathway Inhibitor-1

Verglichen mit vorhergehenden Studien, die TFPI-1 als potenten Inhibitor der TF-Aktivität auf kultivierten Endothelzellen identifizierten (Sevinsky et al., 96; Lupu et al., 97; Ott et al., 2000), konnte mit dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden, dass dieser Mechanismus auch auf Monozyten von Herzinfarktpatienten von pathophysiologischer Bedeutung und klinischer Relevanz ist. In einer erst kürzlich veröffentlichten Untersuchung wurde die Formierung eines Vierfach-Komplexes von GPI-verankertem TFPI-1 mit TF, Faktor VIIa und Faktor Xa, sowie dessen nachfolgende Translokation in Caveolae als Hauptmechanismus der TFPI-1-vermittelten TF-Inhibition auf Endothelzellen beschrieben (Ott et al., 2000). Die im Rahmen dieser Studie aufgezeigte Regulation des TF auf Monozyten durch

TFPI-1 offenbart, daß dieser Mechanismus auch für Monozyten zutrifft und eine entscheidende Bedeutung in vivo einnimmt:

Die in *Abbildung 19* demonstrierte Entfernung TFPI-1s von der Monozytenoberfläche nach Phospholipase C-Applikation spricht für eine GPI-Verankerung großer Mengen TFPI-1s, wobei die mangelnde Fähigkeit exogen zugeführten rekombinanten TFPI-1s, die Aktivität von TF noch weiter herabzusetzen jedoch eine spezifische, bei Verabreichung von rekombinatem TFPI-1 im Konzentrationsbereich von zirkulierendem TFPI-1 nicht gewährleistete Oberflächenbindung impliziert. Diese Erkenntnis untermauert somit zum einen zusätzlich die zentrale Bedeutung der GPI-Verankerung von TFPI-1, zum anderen die ausreichende Effizienz konstitutiven TFPI-1s auf Monozyten für eine suffiziente TF-Inhibition. Weiterhin gilt es zu bedenken, dass die überwiegende Mehrheit des im Plasma befindlichen TFPI-1 an Lipoproteine gebunden ist und keine antikoagulatorische Funktion besitzt.

Da lediglich ein geringer Teil des endogenen TFPI-1 Antigens bzw. der endogenen TFPI-1-Aktivität auf der Oberfläche von Monozyten gebunden ist, exogen zugeführter TFPI-1 dagegen multiple Bindungsstellen auf der Oberfläche von Zellen, wie z.B. Heparansulfatproteoglykanen (Narita et al., 95), Glypikanen (Mast et al., 97), Syndekan 4 (Kojima et al., 96) oder LRP (Warshawsky et al., 94 und 96) besitzt, hatten wir überdies andere mögliche Mechanismen der TFPI-1-vermittelten TF-Hemmung auszuschließen:

So ließ die Zugabe des 39 kDa schweren, die Bindung sämtlicher Liganden an LRP verhindernden Rezeptor assoziierten Proteins (RAP) die TF-Aktivität unserer Patienten mit AMI unberührt, und scheint somit - zumindest für eine Antagonisierung prokoagulatorischer Reaktionen im Rahmen des akuten Infarktgeschehens - nicht von pathophysiologischer Relevanz zu sein. Zudem galt es eine potentielle Bindung von TFPI-1 an Heparansulfat-Proteoglykane näher zu untersuchen: Wie bereits vormals beschrieben (Narita et al., 95) erhöhte die in vivo Infusion von Heparin auch bei unseren Patienten, die durchwegs periinterventionell Heparin erhalten hatten, die Plasmakonzentrationen zirkulierenden TFPI-1s durch dessen Freisetzung aus Heparansulfaten, oder anderen Glykosaminoglykanen des Endothels (Broze et al., 95), während hingegen oberflächenassoziiertes monozytäres TFPI-1 keinerlei Veränderung (*Abbildung 18*) erfuhr, so dass wir in Übereinstimmung mit unseren in vitro Daten zur Freisetzung von wesentlichen Teilen TFPI-1s durch Phospholipase C zu dem Schluß kamen, dass der Beitrag monozytären, an Glykosamine gebundenen TFPI-1s an der Erhöhung der TFPI-1-Plasmakonzentrationen nach Heparin-Infusion vernachlässigbar ist, sondern oberflächenassoziiertes TFPI-1 vielmehr größtenteils GPI-verankerten TFPI-1 repräsentiert.

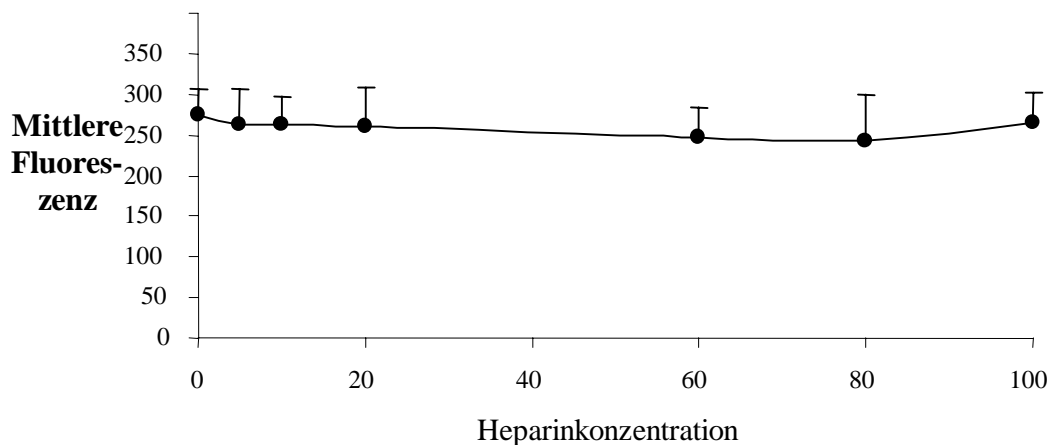


Abbildung 20: Durchflußzytometrische Analyse der Auswirkungen einer in vitro Inkubation mittels Ficoll-Gradienten-Separation isolierter mononukleärer Zellen gesunder Probanden mit steigenden Heparinkonzentrationen auf die TFPI-Expression_{Monozyten}

Diese Erkenntnisse lassen auf die Formierung eines Komplexes aus TF-Faktor VIIa-Faktor Xa-TFPI als zentralen Mechanismus der TFPI-1-abhängigen monozytären TF-Inhibition bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt schließen. Auf Endothelzellen basiert dieser Vorgang auf einer Translokation, in sogenannte „Caveolae“, detergenten-unlösliche Membranmikrodomänen (Sevinsky et al., 96; Lupu et al., 97; Ott et al., 2000). Sowohl für diese Translokation (Mulder et al., 96, Sevinsky et al., 96; Lupu et al., 97) als auch für die Wiederherstellung der TF-Hemmung ist die GPI-Verankerung hinreichend (Lupu et al., 97; Ott et al., 2000). Auf Monozyten ist der oberflächengebundene TFPI ebenfalls in unlöslichen Membrandomänen lokalisiert, die angesichts einer fehlenden Caveolin-Expression durch Monozyten vermutlich von sogenannten „rafts“ gebildet werden (Brown et al., 98), was mit unserer Annahme der GPI-Verankerung der überwiegenden Mehrheit von endogenem TFPI-1 konform geht, da GPI-verankerte Proteine in rafts aufgeteilt werden (Brown et al., 98). Hieraus folgt der Schluß, dass auf Monozyten die TFPI-abhängige TF-Inhibition mittels GPI-verankertem TFPI-1 in rafts vonstattent geht. Während glatte Muskelzellen und Endothelzellen nachweislich auf Stimulation durch Serum- und Wachstumsfaktoren hin mit einer vermehrten TFPI-Expression reagieren (Ameri et al., 92; Pendurthi et al., 99; Caplice et al., 98), wurden bezüglich dessen Regulation durch Entzündungsmediatoren auf Monozyten, die TFPI-1 konstitutiv exprimieren, unterschiedliche Antworten beschrieben (McGee, 94; van der Logt, 94): Unter den vorliegenden Studienbedingungen konnte inflammatorischen Mediatoren keine entscheidende Beteiligung an der Regulation von TFPI-1 auf Monozyten beigemessen werden. Im Gegensatz zum Verhalten des TF wies TFPI-1 während der Reperfusionphase nach akutem Myokardinfarkt keine signifikant erhöhte Expression auf der Oberfläche von Monozyten auf, was allerdings lediglich gegen eine TFPI-1-Induktion auf zirkulierenden Monozyten nach AMI, nicht jedoch gegen eine generelle TFPI-Induktion auf Monozyten spricht, zumal die konstitutive monozytäre TFPI-1-Expression für eine effektive Herabsetzung einer nach AMI induzierten vermehrten TF-Aktivität ausreichend ist.

6.3. Zusammenfassung der Studienergebnisse

1. Die TF-Expression auf Monozyten ist bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt erhöht und besitzt funktionelle Aktivität und ist assoziiert mit einer erhöhten Thrombinbildung.
2. Oberflächengebundener TFPI-1 stellt einen bedeutenden Inhibitor der TF-Aktivität auf Monozyten in vivo dar.
3. Die Hemmung der TF-Aktivität auf Monozyten wird durch GPI-verankerten, nicht jedoch durch exogen in Konzentrationen der Größenordnung von zirkulierendem TFPI zugeführten rekombinanten TFPI-1 vermittelt.
4. Die Hemmung der TF-Aktivität durch oberflächengebundenen TFPI-1 inhibiert den prokoagulatorischen Effekt einer erhöhten monozytären TF-Expression nach akutem Myokardinfarkt.

6.4. Studienbeschränkungen

Um den im Rahmen von Untersuchungen zur Funktion von Monozyten immer wieder geäußerten Bedenken zu interferierender Störfaktoren während und nach der Blutentnahme, sowie bei der Probenverarbeitung entgegenzuwirken, hielten wir sowohl die Zeit zwischen Gewinnung und Verarbeitung, als auch sämtliche methodischen Variablen bei allen Proben konstant. Zudem wurde zur Vermeidung eventueller Auswirkungen ex vivo auf die Monozytenfunktion routinemäßig eine Endotoxinkontamination ausgeschlossen. Um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass Lymphozyten keine prokoagulatorische Aktivität exprimieren, verarbeiteten wir zu deren Bestimmung eine Präparation aus mononukleären Zellen.

Da die Anzahl der zur Verfügung stehenden Zellen pro Patient begrenzt ist, verwendeten wir zur Isolierung der RNA-Expression durch Monozyten die semiquantitative RT-PCR und sorgten hierbei mittels densitometrischer Messung für eine lineare Korrelation zwischen RNA-Konzentration und dem erhaltenen Komplementär-DNA-Produkt. Obgleich trotz aller Bemühungen nicht auszuschließen ist, dass minimale Schwankungen der TFPI-1-RNA-Expression dem Nachweis der semiquantitativen Methode entging, hatte sich dieses Verfahren bei der sensitiven Aufdeckung von Veränderungen der TF-RNA-Expression vom gänzlich fehlenden Signal bei Aufnahme bzw. in der Kontrollgruppe bis zum deutlichen Anstieg nach 96 Stunden bewährt.

Um sicherzustellen, dass der beobachtete Anstieg der TF-mRNA auf zirkulierenden Leukozyten nicht auf einzelne aktivierte Endothelzellen zurückzuführen ist, führten wir eine Messung E-Selektin-Expression durch, die 96 Stunden nach Intervention keine E-Selektin-mRNA-Expression auf zirkulierenden Zellen ergab, so dass die erhöhte TF-mRNA-Expression wohl die Monozytenaktivierung widerspiegelt.

6.5. Therapeutische Bedeutung der Studienresultate

Nach akutem Herzinfarkt auftretende systemische prokoagulatorische Reaktionen limitieren den Erfolg thrombolytischer Therapien und begünstigen das erhöhte Risiko für einen Reinfarkt oder für die Entstehung thrombotischer Ereignisse. Vorliegender Studie gelang es, Daten zur pathophysiologischen Bedeutung einer vermehrten TF-Expression von Monozyten in reperfundiertem Infarktareal, die möglicherweise den Vorteil einer zeitigen Reperfusion schmälern, zu präsentieren die molekularen Mechanismen einer erhöhten Aktivität des TF auf Monozyten, sowie deren Regulation nach Stentimplantation im akuten Myokardinfarkt zu identifizieren. Wir konnten eine erhöhte Aktivität des monozytären TF aufzeigen, die lediglich zu einem Teil durch GPI-verankerten TFPI-1 auf Monozyten gehemmt wird, so dass folglich teilweise schon in experimenteller Erprobung befindliche Methoden einer Inhibition einer monozytären TF-mRNA-Expression durch IL-4, IL-10, Retinolsäure, oder Pentoxyphyllin (Bajaj et al., 97), oder aber auch eine spezifische Blockierung der TF-Aktivität im Myokardinfarkt z.B. mittels rekombinanten inaktiven Faktor VIIa oder durch Verabreichung spezifischer Antikörper, ein Konzept, das unter in vitro Bedingungen bereits im Rahmen des septischen Schockgeschehens mit einer Reduktion von Morbidität und Mortalität erfolgreich praktiziert wurde (Taylor et al., 91; Camerota et al., 98), Teilerfolge bringen könnte.

Zudem konnten wir mit dem Nachweis der GPI-Verankerung des endogenen TF-Inhibitors TFPI als obligate Voraussetzung für eine effektive Entfaltung seiner Fähigkeit, die TF-Aktivität durch Translokation mit nachfolgender Inaktivierung eines TF-Faktor VIIa-Faktor Xa-TFPI-1-Komplexes in „rafts“ reversibel herabzusetzen und somit die Ausdehnung einer lokalen Thrombinbildung auf der Oberfläche der Monozyten zu begrenzen, einen Beitrag auf dem Weg zur Entwicklung weiterer künftiger Therapieansätze zur Verringerung von mit Gefäßverletzung und akutem Koronarsyndrom assoziierten thrombotischen Komplikationen leisten.

Diese könnten auf einer Unterstützung der TFPI-1-vermittelten TF-Inhibition, unter Umständen mittels exogener Zugabe rekombinanten TFPI-1s, der allerdings – wie unsere Ergebnisse nahelegen – für eine effiziente Hemmung des TF einer GPI-Verankerung bedarf, basieren.

7. Zusammenfassung

Nach Myokardinfarkt besteht ein hohes Risiko thrombotischer Komplikationen, wie Re-Verschluss eines primär erfolgreich rekanalisierten Infarktgefäßes, Bildung von Ventrikelthromben und peripherenöse Thrombosen mit Gefahr der Lungenembolie.

Vorausgehende Arbeiten konnten nach akutem Myokardinfarkt eine erhöhte prokoagulatorische Aktivität von Leukozyten zeigen. Ziel der jetzigen Untersuchungen war es, die Mechanismen der erhöhten prokagulatorischen Aktivität von Leukozyten im Myokardinfarkt aufzuklären. Hierzu sollten die Expression von Tissue Factor (TF) auf Monozyten und dessen funktionelle Aktivität *in vivo*, sowie deren Hemmung durch den physiologischen Antagonisten Tissue Factor Pathway Inhibitor-1 (TFPI-1) untersucht werden.

Eingeschlossen in die Studie wurden 40 Patienten mit akutem Myokardinfarkt und Revaskularisation durch Ballonangioplastie mit Stentimplantation, sowie als Kontrollgruppe 20 Patienten mit elektiver Stentimplantation wegen stabiler Angina pectoris. Bei diesen Patienten wurden unmittelbar nach Intervention sowie im postinterventionellen Verlauf serielle Blutproben entnommen. Die Oberflächenexpression von TF und TFPI-1 auf Monozyten wurde anhand der Durchflußzytometrie, deren mRNA-Expression mittels PCR, die proteolytische Aktivität von TF mit Hilfe eines Spektrozym Xa-Assays analysiert. Als Indikator systemischer Thrombinbildung wurden die Konzentrationen der Prothrombinfragmente F_{1+2} mit einem Immunoassay ermittelt.

Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt zeigte sich nach Intervention eine erhöhte TF-Transkriptionsrate, der eine Zunahme der TF-Oberflächenexpression auf zirkulierenden Leukozyten folgte. Als Hinweis auf eine Bedeutung bei der Thrombinbildung *in vivo* fand sich konsekutiv eine gesteigerte Bildung der Thrombinspaltprodukte F_{1+2} . Die Expression von TFPI-1 auf mRNA- und auf Proteinebene blieb im Verlauf unverändert. *In vitro* ließ sich jedoch zeigen, dass die TF-abhängige monozytäre Faktor Xa-Bildung nach Zugabe von TFPI-1-Antikörper ansteigt. Dies belegt eine partielle Hemmung der TF-Aktivität von Monozyten durch zellassozierten TFPI-1 nach Myokardinfarkt.

Im Gegensatz zu den Patienten mit akutem Myokardinfarkt fanden sich in der Kontrollgruppe weder auf mRNA- noch auf Proteinebene Veränderungen in der TF-Expression und auch die TFPI-1-Expression blieb gleich. Die Induktion von TF im Myokardinfarkt kann somit nicht der Katheterintervention zugeschrieben werden, sondern muss vielmehr als spezifisch infarktbedingt angesehen werden.

Die Studie zeigt, dass die erhöhte prokoagulatorische Aktivität von Leukozyten nach Myokardinfarkt auf einer Induktion von TF in Monozyten beruht, die durch konstant exprimierten TFPI-1 nur partiell gehemmt wird.

8. Literaturverzeichnis

1. ABILDGAARD U., Relative roles of Tissue Factor Pathway Inhibitor and antithrombin in the control of thrombogenesis, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1995, Vol. 6 (1), S. 45-49
2. AMERI A., KUPPUSWAMY M.N., BASU S., BAJAJ S.P., Expression of Tissue Factor Pathway Inhibitor by cultured endothelial cells in response to inflammatory mediators, *Blood*, 1992, Vol. 79 (12), S. 3219-3226
3. AMIRKHOSRAVI A., ALEXANDER M., MAY K., FRANCIS D.A., WARNES G., BIGGERSTAFF I., FRANCIS I.L., The importance of platelets in the expression of monocyte Tissue Factor antigen measured by a new whole blood flow cytometric assay, *Thrombosis and Haemostasis*, 1996, Vol. 75 (1), S. 87-95
4. ANDOH K., PETERSEN K.S., FILION-MYKLEBUST CHR., PRYDZ H., Observation on the cell biology of Tissue Factor in endothelial cells, *Thrombosis and Haemostasis*, 1990, Vol. 63 (2), S. 298-302
5. ASADA Y., MARUTSUKA K., HATAKEYAMA K., SATO Y., HARA S., KISWANUKI A., SUMIYOSHI A., The role of Tissue Factor in the pathogenesis of thrombosis and atherosclerosis, *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 1998, Vol. 4 (3), S. 135-139
6. BACH R.R., Mechanism of Tissue Factor Activation on Cells, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1998, Vol. 9 (1), S. 37-43
7. BACON C., CARY N., DAVENPORT A., Endothelin peptide and receptors in human atherosclerotic coronary artery and aorta, *Circulation Research*, 1996, Vol. 79 (4), S. 794-801
8. BAJAJ M.S., BAJAJ S.P., Tissue Factor Pathway Inhibitor, potential therapeutic applications, *Thrombosis and Haemostasis*, 1997, Vol. 78 (1), S. 471-477
9. BAJAJ M.S., KUPPUSWAMY M.N., MANEPALLI A.N., BAJAJ S.P., Transcriptional expression of Tissue Factor Pathway Inhibitor, thrombomodulin and von Willebrand factor in normal human tissues, *Thrombosis and Haemostasis*, 1999, Vol. 82 (3), S. 1047-1052

10. **BANNER D., D'ARCY A., CHENE C., WINKLER F.K., GUHA A., KONIGSBERG W.H., NEMERSON Y., KIRCHHOFER D.**, The crystal structure of the complex of blood coagulation Factor VIIa with soluble Tissue Factor, *Nature*, 1996, Vol. 380 (6569), S. 41-46
11. **BASTIDA E., ORDINAS A., ESCOLAR G., JAMIESON G.A.**, Tissue Factor in microvesicles shed from U 87 MG human glioblastoma cells induces coagulation, platelet aggregation, and thrombogenesis, *Blood*, 1984, Vol. 64 (1), S. 177-184
12. **BAUER K.A., CONWAY E.M., BACH R., KONIGSBERG W.H., GRIFFIN J.D., DEMETRI G.**, Tissue Factor gene suppression in acute myeloblastic leukemia, *Thrombosis Research*, 1989, Vol. 56 (3), S. 425- 430
13. **BAUER K.A., KASS B.L., TEN CATE H., HAWIGER J.J., ROSENBERG R.D.**, Factor IX is activated in vivo by the Tissue Factor mechanism, *Blood*, 1990, Vol. 76 (4), S. 731-736
14. **BAUGH R.J., BROZE G.J. JR., KRISHNASWAMY S.**, Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by Tissue Factor Pathway Inhibitor, *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, Vol. 273 (8), S. 4378-4386
15. **BOGNACKI J., HAMMELBURGER J.**, Functional and immunologic methods for the measurement of human Tissue Factor Pathway Inhibitor, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1995, Vol. 6 (1), S. 65-72
16. **BRIDEY F., LACOMBE C., SUSTENDAL L., MOATTI D., COMBE F., MAMMES O., DE PROST D.**, Development of a method to separate lipoprotein-bound and lipoprotein-depleted tissue factor pathway inhibitor. Measurement of free tissue factor pathway inhibitor activity, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1998, Vol. (7), S. 637-643
17. **BROWN D., LONDON E.**, Functions of lipid rafts in biological membranes, *Annual Review in Cell Developmental Biology*, 1998, Vol. 14, S. 111-136
18. **BROZE G.J. JR.**, Tissue Factor Pathway Inhibitor and the current concept of blood coagulation, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1995, Vol. 6 (1), S. 7-13

19. **BROZE G.J. JR.**, Tissue Factor Pathway Inhibitor, *Thrombosis and Haemostasis*, 1995, Vol. 74 (1), S. 90-93
20. **BROZE G.J. JR.**, Tissue Factor Pathway Inhibitor and the revised theory of coagulation, *Annual Review of Medicine*, 1995, Vol. 46, S. 103-112
21. **CALLANDER N.S., RAO L.V., NORDFANG O., SANDSET P.M., WARN-CRAMER B., RAPAPORT S.I.**, Mechanisms of binding of recombinant Extrinsic Pathway Inhibitor (rEPI) can bind to and inhibit factor VIIa-Tissue Factor complexes in the absence of factor Xa, *Journal of Biological Chemistry*, 1992, Vol. 267 (2), S. 876-882
22. **CALLANDER N.S., VARKI N., RAO L.V.**, Immunohistochemical identification of Tissue Factor in solid tumors, *Cancer*, 1992, Vol. 70 (5), S. 1194-1201
23. **CAMERER E., KOLSTO A.B., PRYDZ H.**, Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation, *Thrombosis Research*, 1996, Vol. 81 (1), S. 1-41
24. **CAMERER E., ROTTINGEN J., GJERNES E., LARSEN K., SKANTLIEN A.H., IVERSEN I.G., PRYDZ H.**, Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to regulation of the egr-1 gene, *Journal of Biological Chemistry*, 1999, Vol. 274 (45), S. 32225-32233
25. **CAMEROTA A., CREASEY A., PATLA V., LARKIN V.A., FINK M.P.**, Delayed treatment with recombinant human Tissue Factor Pathway Inhibitor improves survival in rabbits with gram-negative peritonitis, *Journal of Infectious Diseases*, 1998, 177 (3), S. 668-676
26. **CAPLICE N.M., MUESKE C.S., KLEPPE L.S., PETERSON T.E., BROZE G.J. JR., SIMARI R.D.**, Expression of Tissue Factor Pathway Inhibitor in vascular smooth muscle cells and its regulation by growth factors, *Circulation Research*, 1998, Vol. 83 (12), S. 1264-1270
27. **CARMELIET P., MACKMAN N., MOONS L., LUTHER T., GRESSENS P., VAN VLAENDEREN I., DEMUNCK M., KASPER M., BREIER G., EVRARD P., MULLER M., RISAU W., EDGINGTON T., COLLEN D.**, Role of Tissue Factor in embryonic blood vessel development, *Nature*, 1996, Vol. 383 (6595), S. 73-75

28. **CATE TEN H., BAUER K.A., LEVI M., EDGINGTON T.S., SUBLETT R.D., BARZEGAR S., KASS B.L., ROSENBERG R.D.**, The activation of factor X and prothrombin by recombinant factor VIIa in vivo is mediated by Tissue Factor, *The Journal of Clinical Investigation*, 1993, Vol. 92 (3), S. 1207-1212
29. **CHEN D., RIESBECK K., KEMBALL-COOK, MEVEU J.H., TUDDENHAM E.G., LECHLER R.I., DORLING A.**, Inhibition of Tissue Factor-dependent and -independent coagulation by cell surface expression of novel anticoagulant fusion proteins, *Transplantation*, 1999, Vol. 67 (3), S. 467-474
30. **CONTRINO J., GORALNICK S., QI J., HAIR G., RICKLES F.R., KREUTZER J.**, Fibrin induction of Tissue Factor expression in human vascular endothelial cells, *Circulation*, 1997, Vol. 96 (2), S. 605-613
31. **DAM VAN P., LOWE D.**, Flow Cytometry, *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 1992, Vol. 99 (7), S. 545-546
32. **DRAKE TH. A., RUF W., MORRISEY J.H., EDGINGTON T.S.**, Functional Tissue Factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively Tissue Factor-producing neoplastic cell line, *The Journal of Cell Biology*, 1989, Vol. 109 (1), S. 389-395
33. **EDGINGTON TH. S., MACKMAN N., BRAND K., RUF W.**, The structural biology of expression and function of Tissue Factor, *Thrombosis and Haemostasis*, 1991, Vol. 66 (1), S. 67-79
34. **EDGINGTON T. S., DICKINSON S. D., RUF W.**, The structural basis of function of the TF-VIIa complex in the cellular initiation of coagulation, *Thrombosis and Haemostasis*, 1997, Vol. 78 (1), S. 401-405
35. **ENJYOJI K., EMI M., MUKAI T., KATO H.**, cDNA cloning and expression of rat Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), *Journal of Biochemistry*, 1992, Vol. 111 (5), S. 681-687
36. **ENJYOJI K., EMI M., MUKAI T., IMADA M., LEPPERT M.L., LAHONEL J.M., KATO H.**, Human Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) gene: complete genomic structure and localization on the genetic map of chromosome 2q, *Genomics*, 1993, Vol. 17 (2), S. 423-428

37. **FALCIANI M., GORI A. M., FEDI S., CHIARUGI L., SIMONETTI I., DABIZI R.P., PRISCO B., PEPE G., ABBATE G., GENSINI G.F., NERI SERNERI G.G.**, Elevated Tissue Factor and Tissue Factor Pathway Inhibitor circulating levels in ischaemic heart disease patients, *Thrombosis and Haemostasis*, 1998, Vol. 78 (3), S. 495-499
38. **FEYTER DE P.J., JAEGERE DE P.P., SERRUYS P.W.**, Incidence, predictors, and management of acute coronary occlusion after coronary angioplasty, *American Heart Journal*, 1994, Vol. 127 (3), S. 643-651
39. **FISCHER E.G., RUF W., MÜLLER B M.**, Tissue Factor-initiated thrombin generation activates the signaling thrombin receptor on malignant melanoma cells, *Cancer Research*, 1995, Vol. 55 (8), S. 1629-1632
40. **FLÖSSEL C., LUTHER T., MÜLLER M., ALBRECHT S., KASPER M.**, Immunohistochemical detection of Tissue Factor (TF) on paraffin sections of routinely fixed human tissue, *Histochemistry*, 1994, Vol. 101 (6), S. 449-453
41. **GAWAZ M., NEUMANN F.J., OTT I., SCHIESSLER A., SCHÖMIG A.**, Platelet function in acute myocardial infarction treated by direct angioplasty, *Circulation*, 1996, Vol. 93 (2), S. 229-237
42. **GEE MAC M.P., FOSTER S., WANG X.**, Simultaneous expression of Tissue Factor and Tissue Factor Pathway Inhibitor by human monocytes. A potential mechanism for localized control of blood coagulation, *Journal of Experimental Medicine*, 1994, Vol. 179 (6), S. 1847-1854
43. **GIRARD T.J., WARREN L.A., NOVOTNY W.F.**, Functional significance of the Kunitz-type inhibitor domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor, *Nature*, 1989, Vol. 338 (6215), S. 518-520
44. **GIRARD T.J., EDDY R., WESSELSCHMIDT R.L., MAC PHAIL L.A., LIKERT K.M., BYERS M.G.**, Structure of the human lipoprotein-associated coagulation inhibitor gene. Intron/exon gene organization and localization of the gene to chromosome 2, *Journal of Biological Chemistry*, 1991, Vol. 266 (8), S. 5036-5041

45. **GORI A.M., PEPE G., ATTANASIO M., FALCIANI M., ABBATE R., PRISCO D., FEDI S., GIUST B., BRUNELLI T., COMEGLIO P., GENSINI G.F., NERI SERNERI G.G.**, Tissue Factor reduction and Tissue Factor Pathway Inhibitor release after heparin administration, *Thrombosis and Haemostasis*, 1999, Vol. 81 (4), S. 589-593
46. **GOUIN-THIBAUT I., DEWAR L., CRAVEN S., KULCZYCKY M., WUN T.C., OFASU F.A.**, Probable regulation of Factor VIIa-Tissue Factor and prothrombinase by factor Xa-TFPI and TFPI in vivo, *British Journal of Haematology*, 1996, Vol. 95 (4), S. 738-746
47. **HAMAMOTO T., YAMAMOTO M., NORDFANG O., PETERSEN J.G., FOSTER D.C., KISIEL W.**, Inhibitory properties of full-length and truncated, recombinant Tissue Factor (TFPI). Evidence that the third Kunitz-type domain of TFPI is not essential for the inhibition of factor VIIa-Tissue Factor complexes on cell surfaces, *Journal of Biological Chemistry*, 1993, Vol. 268 (12), S. 8704-8710
48. **HAMIK A., SETIADI H., BU G., MC EVER R.P., MORRISSEY J.H.**, Down-regulation of monocyte Tissue Factor mediated by Tissue Factor Pathway Inhibitor and the low density lipoprotein receptor-related protein, *Journal of Biological Chemistry*, 1999, Vol. 274 (8), S. 4962-4969
49. **HANSEN J., HUSEBY K.R., HUSEBY N.E, EZBAN M., NORDOY A.**, Tissue Factor Pathway Inhibitor in complex with low density lipoprotein isolated from human plasma does not possess anticoagulant function in Tissue Factor-induced coagulation in vitro, *Thrombosis Research*, 1997, Vol. 85 (5), S. 413-425
50. **HATAKEYAMA K., ASADA Y., MARUTSKA K., SATO Y., KAMIKUBO Y., SUMIYOSHI A.**, Localization and activity of Tissue Factor in human aortic atherosclerotic lesions, *Atherosclerosis*, 1997, Vol. 133 (2), S. 213-219
51. **HO G., TOOMEY J.R., BROZE G.J., SCHWARTZ A.L.**, Receptor-mediated Endocytosis of Coagulation Factor Xa Requires Cell Surface-bound Tissue Factor Pathway Inhibitor, *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, Vol. 271 (16), S. 9497-9502
52. **HUANG Z.F., WUN T.C., BROZE G.J. JR.**, Kinetics of Xa inhibition by Tissue Factor Pathway Inhibitor, *Journal of Biological Chemistry*, 1993, Vol. 268 (36), S. 26950-26955

53. **JESTY J., LORENZ A., RODRIGUEZ J., WUN T.C.**, Initiation of the Tissue Factor Pathway of coagulation in the presence of heparin: control by antithrombin III and Tissue Factor Pathway Inhibitor, *Blood*, 1996, Vol. 87 (6), S. 2301-2307
54. **JUDE B., AGRAOU B., MC FADDEN E.P., SUSEN S., BANTERS C., LEPELLEY P., VAN HAESBROUCKE C., DEVOS P., CASSON A., ASSEMAN P.**, Evidence for time-dependent activation of monocytes in the systemic circulation in unstable angina but not in acute myocardial infarction or in stable angina, *Circulation*, 1994, Vol. 90, (4), S. 1662-1668
55. **KAIKITA K., OGAWA H., YASNE H.**, Tissue Factor expression on macrophages in coronary plaques in patients with unstable angina, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1993, Vol. 17 (10), S. 2232-2237
56. **KAIKITA K., TAKEYA M., OGAWA H., SUEFUJI H., YASUE H., TAKAHASHI K.**, Co-localization of Tissue Factor and Tissue Factor Pathway Inhibitor in coronary atherosclerosis, *Journal of Pathology*, 1999, Vol. 188 (2), S. 180-188
57. **KAPPELMAYER J., BERNABEI A., EDMUNDS L.H. JR. EDGINGTON T.S., COLMAN R.W.**, Tissue Factor is expressed on monocytes during stimulated extracorporeal circulation, *Circulation Research*, 1993, 72 (5), S. 1075-1081
58. **KOKAWA T., ABUMIYA T., KIMURA T., HARADA-SHIBA M., KOH H., TSUSHIMA M., YAMAMOTO A., KATO H.**, Tissue Factor Pathway Inhibitor Activity in Human Plasma. Measurement of lipoprotein-associated and free forms in hyperlipidemia, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1995, Vol. 15 (4), S. 504-510
59. **KOYAMA T., NISHIDA K., OHDAMA S., SAWADA M., MUROKAMI N., HIROSAWA S., KURIYAMA R., MATSUZAWA K., HASEGAWA R., ACKI N.**, Determination of plasma Tissue Factor antigen and its clinical significance, *British Journal of Haematology*, 1994, Vol. 87 (2), S. 343-347
60. **KOJIMA T., KATSUMI A., YAMAZAKI T., MURAMATSU T., NAGASAKA T., OHSUMI K., SAITO H.**, Human ryudocan from endothelium-like cells binds basic fibroblast growth factor, midkine, and Tissue Factor Pathway Inhibitor, *Journal of Biological Chemistry*, 1996, Vol. 271 (10), S. 5914-5920

61. **LANDAU C., LANGE R.A., HILLIS L.D.**, Percutaneous transluminal coronary angioplasty, *New England Journal of Medicine*, 1994, Vol. 330 (14), S. 981-939
62. **LEATHAM E.W., BATH P.M., TOOZE J.A., CAMM A.J.**, Increased monocyte Tissue Factor expression in coronary disease, *British Heart Journal*, 1995, Vol. 73 (7), S. 10-13
63. **LESNIK PH., VONICA A., GUERIN M., MOREAU M., CHAPMAN M.J.**, Anticoagulant activity of Tissue Factor Pathway Inhibitor in human plasma is preferentially associated with dense subspecies of LDL and HDL and with Lp(a), *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 1993, Vol. 13 (7), S. 1066-1075
64. **LEVI M., TEN CATE H., VAN DER POLL T., VAN DEVEUTER S.J.**, Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis, *Journal of the American Medical Association*, 1993, Vol. 270 (8), S. 975-979
65. **LI A., WUN T.C.**, Proteolysis of Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) by plasmin: Effect on TFPI activity, *Thrombosis and Haemostasis*, 1998, Vol. 80 (3), S. 423-227
66. **LINDHAL A.K.**, Tissue Factor Pathway Inhibitor in health and disease, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 1995, Vol. 5 (4), S. 167-171
67. **LINDHOUT T., BLEZER R., SCHOEN P.**, Activation of factor X and its regulation by Tissue Factor Pathway Inhibitor in small diameter capillaries lined with human endothelial cells, *Blood*, 1992, Vol. 79 (11), S. 2909-2916
68. **LINDHOUT T., FRANSSSEN J., WILLEMS G.**, Kinetics of the inhibition of Tissue Factor-VIIa by Tissue Factor Pathway Inhibitor, *Thrombosis and Haemostasis*, 1995, Vol. 74 (3), S. 910-915
69. **LIUZZO G., BIASUCCI L.M., GALLIMORE J.R., GRILLO R.L., REBUZZI A.G., PEPYS M.B., MASERI A.**, The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina, *New England Journal of Medicine*, 1994, Vol. 331 (7), S. 417-424
70. **LOGT VAN DER C. P., REITSMA P. H., BERTINA R. M.**, Intron-exon organization for the human gene coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor: the factor Xa dependent inhibitor of the pathway of coagulation, *Biochemistry*, 1991, Vol. 30 (6), S. 1571-1577

71. LOGT VAN DER C., DIRVEN R., REITSMA P.H., BERTINA R.H., Expression of Tissue Factor and Tissue Factor Pathway Inhibitor in monocytes in response to bacterial lipopolysaccharide and phorbol ester, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1994, Vol. 5 (2), S. 211-220
72. LUPU CHR., LUPU F., DENNEHY U., KAKKAR V.V., SCULLY M.F., Thrombin induces the redistribution and acute release of Tissue Factor Pathway Inhibitor from specific granules within human endothelial cells in culture, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1995, Vol. 15 (11), S. 2055-2062
73. LUPU CHR., GOODWIN C., WESTMUCKETT A.D., EMEIS J.J., SCULLY M.F., KAKKAR W., LUPU F., Tissue Factor Pathway Inhibitor in endothelial cells colocalizes with glycolipid microdomains/caveolae. Regulatory mechanism(s) of the anticoagulant properties of the endothelium, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1997, Vol. 17 (11), S. 2964-2974
74. LUPU CHR., POULSEN E., ROQUEFEUIL S., WESTMUCKETT A.D., KAKKAR V.V., LUPU F., Cellular effects of heparin on the production and release of Tissue Factor Inhibitor in human endothelial cells in culture, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 1999, Vol. 19 (9), S. 2251-2262
75. LUPU CHR., KRUIHOT E.K., KAKKAR, V.V., LUPU F., Acute release of Tissue Factor Pathway Inhibitor after in vivo thrombin generation in baboons, *Thrombosis and Haemostasis*, 1999, Vol. 82 (6), S. 1652-1658
76. LUTHER TH., FLÖSSEL C., HIETSCHHOLD V., KOSLOWSKI R., MULLER M., Flow cytometric analysis of Tissue Factor (TF) expression on stimulated monocytes – comparison to procoagulant activity of mononuclear blood cells, *Blut*, 1990, Vol. 61 (6), S. 375-378
77. LUTHER TH., FLÖSSEL C., MACKMAN N., BIERHAUS A., KASPER M., ALBRECHT S., SAGE E.H., IRUELA-ARISPE L., GROßMANN H., STROHLEIN A., CARMELIET P., LASKUTOFF D.J., MULLER M., Tissue Factor expression during human and mouse development, *American Journal of Pathology*, 1996, Vol. 149 (1), S. 101-113
78. LWALEED B.A., CHISHOLM M., FRANCIS J.L., The significance of measuring monocyte Tissue Factor activity in patients with breast and colorectal cancer, *British Journal of Cancer*, 1999, Vol. 80 (1-2), S. 279-285

79. MACKMAN N., MORRISSEY J.H., FOWLER B., EDINGTON T.S., Complete sequence of the human Tissue Factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade, *Biochemistry*, 1989, Vol. 28 (4), S. 1756-1761
80. MACKMAN N., Regulation of the Tissue Factor gene, *Thrombosis and Haemostasis*, 1997, Vol. 78 (1), S. 747-754
81. MANN K.G., VAN'T VEER C., CAWThERN K., BUTENAS S., The role of the Tissue Factor Pathway Inhibitor in initiation of coagulation, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1998, Vol. 9 (1), S. 3-7
82. MARMUR J.D., ROSSIKHINA M., GUHA A., FYTE B., FRIEDRICH V., MEDLOWITZ M., NEMERSON Y., TAUBMAN M.B., Tissue Factor is rapidly induced in smooth muscle after balloon injury, *Journal of Clinical Investigation*, 1993, Vol. 91 (5), S. 2253-2259
83. MAST A.E., HIGUCHI D.A., HUANG Z.F., WARSHAWSKY I., SCHWARTZ A.L., BROZE G.J. JR., Glypican-3 is a binding protein on the HepG2 cell surface for Tissue Factor Pathway Inhibitor, *Biochemistry Journal*, 1997, Vol. 327 (Pt 2), S. 577-583
84. MONROE D.M., HOFFMAN M., OLIVER J.A., ROBERTS H.R., A possible mechanism of action of activated factor VII independent of Tissue Factor, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1998, Vol. 9 (1), S. 15-20
85. MORRISSEY J., FAIR D.S. EDINGTON T.S., Monoclonal antibody analysis of purified and cell-associated Tissue Factor, *Thrombosis Research*, 1988, Vol. 52 (3), S. 247-261
86. MORRISSEY J.H., Tissue Factor modulation of factor VIIa activity: Use in measuring trace levels of factor VIIa in plasma, *Thrombosis and Haemostasis*, 1995, Vol. 74 (1), S. 185-188
87. MUELLER B.M., RUF W., Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in Tissue Factor dependent experimental metastasis, *Journal of Clinical Investigation*, 1998, Vol. 99 (11), S. 832-836
88. MULDER A.B., SMIT J.W., BOM V.J.J., Association of smooth muscle cell Tissue Factor with caveolae, *Blood*, 1996, Vol. 88 (4), S. 1306-1313

89. NARITA M., BU G., OLINS G. M., HIGUCHI D.A., HERZ J., BROZE G.J. JR., SCHWARTZ A.L., Two receptor systems are involved in the plasma clearance of Tissue Factor Pathway Inhibitor in vivo, *Journal of Biological Chemistry*, 1995, Vol. 270 (42), S. 24800-24804
90. NEMERSON Y., Tissue Factor and the initiation of blood coagulation, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1987, Vol. 214, S. 83-84
91. NEMERSON Y., Tissue Factor and hemostasis, *Blood*, 1988, Vol. 71 (1), S. 1-8
92. NEMERSON Y., The Tissue Factor pathway of blood coagulation, *Hemostasis and Thrombosis*, 1994, S. 84-93
93. NEMERSON Y., Tissue Factor: Then and now, *Thrombosis and Haemostasis*, 1995, Vol. 74 (1), S. 180-184
94. NEUMANN F.J., OTT I., WILHELM A., KATUS W., TILLMANN H., SCHÖMIG A., Release of chemoattractants and neutrophil activation in acute myocardial infarction immediately after successful recanalization of the infarct-related vessel by angioplasty, *European Heart Journal*, 1994, Vol. 15 (2), S. 171-178
95. NEUMANN F.J., OTT I., GAWAZ M., RICHARDT G., HOLZAPFEL H., JOCHUM M., SCHÖMIG A., Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction, *Circulation*, 1995, Vol. 92 (4), S. 748-755
96. NEUMANN F.J., OTT I., GAWAZ M., PUCHNER G., SCHÖMIG A., Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty, *Journal of American College of Cardiology*, 1996, Vol. 27 (4), S. 819-824
97. NEUMANN F.J., OTT I., MARX N., LUTHER T., KENNGOTT S., GAWAZ M., KOTZSCH M., SCHÖMIG A., Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 1997, Vol. 17 (12), S. 3399-3405
98. NEUMANN F. J., GAWAZ M., DICKFELD T., WEHINGER A., WALTER H., BLASINI R., SCHÖMIG A., Antiplatelet effect of ticlopidine after coronary stenting, *Journal of American College of Cardiology*, 1997, Vol. 29 (7), S. 1515-1519

99. **OSTERUD B., BAJAJ M.S., BAJAJ S.P.**, Sites of Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) and Tissue Factor (TF) expression under physiologic and pathologic conditions, *Thrombosis and Haemostasis*, 1995, Vol. 73 (5), S. 873-875
100. **OSTERUD B.**, Tissue Factor: A complex biological role, *Thrombosis and Haemostasis*, 1997, 78 (1), S. 755-758
101. **OTT I., NEUMANN F.J., GAWAZ M., SCHMITT M., SCHÖMIG A.**, Increased neutrophil platelet adhesion in patients with unstable angina, *Circulation*, 1996, Vol. 94 (6), S. 1239-1246
102. **OTT I., FISCHER E.G., MIYAI Y., MUELLER B.M., RUF W.**, A role for Tissue Factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280, *Journal of Cell Biology*, 1998, Vol. 140 (5), S. 1241-1253
103. **OTT I., NEUMANN F.J., KENNGOTT S., GAWAZ M., SCHÖMIG A.**, Procoagulant inflammatory responses of monocytes after direct balloon angioplasty in acute myocardial infarction, *American Journal of Cardiology*, 1998, Vol. 82 (8), 938-942
104. **OTT I., MIYAGI Y., MIYAZAKI K., HEEB M.J., MUELLER B.M., RAO L.V., RUF W.**, Reversible regulation of Tissue Factor induced coagulation by glycosyl-phosphatidylinositol-anchored Tissue Factor Pathway Inhibitor, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2000, Vol. 20 (3), S. 874-882
105. **PENDURTHI, U.R., RAO L.V., WILLIAMS J.T., IDELL S.**, Regulation of Tissue Factor Pathway Inhibitor expression in smooth muscle cells, *Blood*, 1999, Vol. 94 (2), S. 579-586
106. **PETERSEN L.C., MEYN G., RASMUSSEN J.S., PETERSEN J., BJORN S.E., JONASSEN I., CHRISTIANSEN L., NORDFANG O.**, Characterization of human Tissue Factor Pathway variants expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, 1993, Vol. 268 (18), S. 13344-13351
107. **PETERSEN L.C., VALENTIN S., HEDNER U.**, Regulation of the extrinsic pathway system in health and disease: The role of factor VIIa and Tissue Factor Pathway Inhibitor, *Thrombosis Research*, 1995, Vol. 79 (1), S. 1-47

108. **PETIT L., LESNIK PH., DACHET CHR., MOREAU M., CHAPMAN M.J.**, Tissue Factor Pathway Inhibitor is expressed by human monocyte-derived macrophages, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 1999, Vol. 19 (2), S. 309-315
109. **PIERRE J.ST., YANG L.-Y., TAMIRISA K., SCHERRER D., DE CIECHI P., EISENBERG P., TOLUNAY E., ABENDSCHEIN S.D.**, Tissue Factor Pathway Inhibitor attenuates procoagulant activity and upregulation of Tissue Factor at the site of balloon-induced arterial injury in pigs, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 1999, Vol. 19 (9), S. 2263-2268
110. **RANDOLPH G.J., LUTHER TH., ALBRECHT S., MAGDOLEN V., MULLER W.A.**, Role of Tissue Factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro, *Blood*, 1998, Vol. 92 (11), S. 4167-4177
111. **RAPAPORT S. I., RAO L.V.M.**, The Tissue Factor Pathway: How it has become a “Prima Ballerina”, *Thrombosis and Haemostasis*, 1995, Vol. 74 (1), S. 7-17
112. **ROSS R.**, The pathogenesis of atherosclerosis: an update, *New England Journal of Medicine*, 1986, Vol. 314, S. 488-500
113. **RUF W., SCHULLEK J.R., STONE M.J., EDGINGTON T.S.**, Mutational mapping of functional residues in Tissue Factor identification of factor VII recognition determinants in both structural modules of the predicted cytokine receptor homology domain, *Biochemistry*, 1994, Vol. 33 (6), S. 1565-1572
114. **RUF W.**, Factor VIIa residue Arg 290 is required for efficient activation of the macromolecular substrate factor X, *Biochemistry*, 1994, Vol. 33 (38), S. 11631-11636
115. **RUF W.**, The interaction of activated Factor VII with Tissue Factor: insight into the mechanism of cofactor-mediated activation of activated factor VII, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1998, Vol. 9 (1), S. 73-78
116. **RUF W., FISCHER E., HUANG H.Y., MIYAGI Y., OTT I., RIEWALD M., MUELLER B.M.**, Diverse functions of protease receptor Tissue Factor in inflammation and metastasis, *Immunologic Research*, 2000, Vol. 21 (2-3), S. 289-292

117. SCARPATI A.M., SADLER J.E., Regulation of endothelial cell coagulant properties, *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, Vol. 264 (34), S. 20705-20713
118. SCARPATI E M., WEN D., BROZE G.J. JR., MILETICH J.P., FLANDERMEYER R.R., SIEGEL N.R., SADLER J.E., Human Tissue Factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene, *Biochemistry*, 1987, Vol. 26 (17), S. 5234-5238
119. SCHWARTZ A.L. BROZE G.J. JR., Tissue Factor Pathway Inhibitor endocytosis, *Trends in Cardiovascular Medicine*, 1997, Vol. 7 (7), S. 234-239
120. SEMERARO N., COLUCCI M., Changes in the coagulation-fibrinolysis balance of endothelial cells and mononuclear phagocytes: Role in disseminated intravascular coagulation associated with infections diseases, *International Journal of Clinical Laboratory Research*, 1992, Vol. 21 (3), S. 214-220
121. SEMERARO N., COLUCCI M., Tissue Factor in health and disease, *Thrombosis and Haemostasis*, 1997, Vol. 78 (1), S. 759-764
122. SEVINSKY J.R., RAO L.V., RUF W., Ligand-induced protease receptor translocation into caveolae: a mechanism for regulating cell surface proteolysis of the Tissue-Factor-dependent coagulation pathway, *The Journal of Cell Biology*, 1996, Vol. 133 (2), S. 293-304
123. SOEJIMA H., OGAWA H., YASUE H., KAIKITA K., NISHIYAMA K., MISUMI K., TAKAZOE K., MIYAO Y., YOSHIMURA M., KUGIYAMA K., NAKAMURA S., TSUJI I., KUMEDA K., Heightened Tissue Factor associated with Tissue Factor Pathway Inhibitor and prognosis in patients with unstable angina, *Circulation*, 1999, Vol. 99 (22), S. 2908-2913
124. SOEJIMA H., OGAWA H., YASUE H., NISHIYAMA K., KAIKITA K., MISUMI K., TAKAZOE K., KUGIYAMA K., TSUJU I., KUMEDA K., NAKAMURA S., Plasma Tissue Factor Pathway Inhibitor and Tissue Factor antigen levels after administration of heparin in patients with angina pectoris, *Thrombosis Research*, 1999, Vol. 93 (1), S. 17-25
125. STEELE P.M., CHESEBRO J.H., STANSON A.W., HOLMES D.R. JR., DEWANJEE M.K., BADIMON L., FUSTER V., Balloon angioplasty: natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model, *Circulation Research*, 1985, Vol. 57, S. 105-112

126. SUEFUHI H., OGAWA H., YSUE H., KAIKITA K., SOEJIMA H., MOTOYAMA T., MIZUNO Y., OSHIMA S., SAITO T., TSUJI I., KUMEDA K., KAMIKUBO Y., NAKAMURA S., Increased plasma Tissue Factor levels in acute myocardial infarction, *American Heart Journal*, 1997, Vol. 134 (2/1), S. 253-259
127. TAKAHASHI H., SATOH H., WADA K., TAKAKUWA E., SEKI Y., SHIBATA A., Tissue Factor in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation, *American Journal of Hematology*, 1994, Vol. 46 (4), S. 333-337
128. TAKAMIYA O., YOSHIOKA A., Factor VII binding to Tissue Factor in plasma from Warfarin-treated individuals, *Thrombosis Research*, 1996, Vol. 81 (6), S. 657-663
129. TAUBMAN M., FALLON J., SCHECTER A.D., GIESEN P., MEDLOWITZ M., FYTE B.S., MARMUR J.D., NEMERSON Y., Tissue Factor in the pathogenesis of atherosclerosis, *Thrombosis and Haemostasis*, 1997, Vol. 78 (1), S. 200-204
130. TAYLOR FB. JR., CHANG A., RUF W., MORRISEY J.H., HINSHA L., CATLETT R., BLICK K., EDGINGTON T.S., Lethal E. Coli septic shock is prevented by blocking Tissue Factor with monoclonal antibody, *Circulatory Shock*, 1991, Vol. 33 (3), S. 127-134
131. TENNO T., BOTLING. J., ÖBERG F., NILSSON K., SIEGBAHN A., Tissue Factor expression in human monocytic cell lines, *Thrombosis Research*, 1997, Vol. 88 (2), S. 215-228
132. TERRY CHR., CALLAHAN K., Protein kinase C regulates cytokine-induced Tissue Factor transcription and procoagulant activity in human endothelial cells, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1996, Vol. 127 (1), S. 81-93
133. VALENTIN S., NORDFANG O., BREGENGARD C., WILDGOOSE P., Evidence that the C-terminus of Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) is essential for its in vitro and in vivo interaction with lipoproteins, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1993, Vol. 4 (5), S. 713-720
134. VEER VAN 'T C., HACKENG T.M., DELAHAYE C., SIXMA J.J., BONMA B.N., Activated factor X and thrombin formation triggered by Tissue Factor on endothelial cell matrix in a flow model: Effect of the Tissue Factor Pathway Inhibitor, *Blood*, 1994, Vol. 84 (4), S. 1132-1142

135. WADA H., WAKITA Y., SHIKU H., Tissue Factor expression in endothelial cells in health and disease, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1995, Vol. 6 (1), S. 26-31
136. WARSHAWSKY I., BROZE, G.J. JR., SCHWARTZ A. L., The low density lipoprotein receptor-related protein mediates the cellular degradation of Tissue Factor Pathway Inhibitor, *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*, 1994, Vol. 91 (14), S. 6664-6668
137. WARSHAWSKY I., BU G., MAST A., SAFFITZ J.E., BROZE G.J. JR., SCHWARTZ A.L., The carboxy terminus of Tissue Factor Pathway Inhibitor is required for interacting with hepatoma cells in vitro and in vivo, *Journal of Clinical Investigation*, 1995, Vol. 95 (4), S. 1773-1781
138. WARSHAWSKY I., HERZ J., BROZE, G.J. JR., SCHWARTZ A.L., The Low Density Lipoprotein receptor-related protein can function independently from heparan sulfate proteoglycans in Tissue Factor Pathway Inhibitor endocytosis, *Journal of Biological Chemistry*, 1996, Vol. 271 (42), S. 25873-25879
139. WATSON J.V., WALPORT M., Molecular calibration in flow cytometry with subattogram detection limit, *Journal of Immunological Methods*, 1986, Vol. 93 (2), S. 171-175
140. WESSELSCHMIDT R., LIKERT K.M., GIRARD T.J., WUN T.C., BROZE G.J. JR., Tissue Factor Pathway Inhibitor: the carboxy-terminus is required for optimal inhibition of factor Xa, *Blood*, 1992, Vol. 79, S. 2004-2010
141. WESSELSCHMIDT R., LIKERT K.M., HUANG Z.F., MAC PHAIL L., BROZE G.J. JR., Structural requirements for Tissue Factor Pathway Inhibitor interactions with factor Xa and heparin, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1993, Vol. 4 (5), S. 661-669
142. YAMABE H., OSAWA H., INUMA H., KAIZUKA M., TAMURA N., TSUNODA S., FUJITA Y., SHIRATO K., ONODERA K., Tissue Factor Pathway Inhibitor Production by human mesangial cells in culture, *Thrombosis and Haemostasis*, 1996, Vol. 76 (2), S. 215-219
143. YAN S.-F. MACKMAN N., KISIEL W., STERN D.M., PINSKY D.J., Hypoxia/Hypoxemia-induced activation of the procoagulant pathways and the pathogenesis of ischemia-associated thrombosis, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 1999, Vol. 19 (9), S. 2029-2035

144. **YARNELL J., BAKER I., SWEETNAM P.M., BAINTON D., O'BRIEN J.R., WHITEHEAD P.J., ELWOOD P.C.**, Fibrinogen, viscosity and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart diseases, The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies, *Circulation*, 1991, Vol. 83 (3), S. 836-844

145. **ZHANG Y., DENG Y., LUTHER TH., MULLER M., ZIEGLER R., WALDHERR R., STERN D.M., NAWROTH P.P.**, Tissue Factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice, *Journal of Clinical Investigation*, 1994, Vol. 94 (3), S. 1320-1327

Danksagung

Danken möchte ich vor allem Herrn Prof. Dr. F.-J. Neumann und Frau Dr. Ilka Ott, dass sie mir die Mitarbeit in Ihrer Forschungsgruppe ermöglichten, vor allem aber für die kompetente Unterstützung bei Erhebung, Auswertung und Analyse der Datensätze, sowie beim Anfertigen der Dissertationsschrift.

Auch für deren stete Bereitschaft zur Erörterung sowohl fachlich-wissenschaftlicher Fragestellungen als auch klinischer Aspekte, sowie ihre stets offene und gesprächsbereite Haltung möchte ich ganz herzlich Dank sagen.

Mein weiterer Dank gilt allen mitwirkenden medizinisch-technischen und labor-technischen Assistentinnen, insbesondere Frau Corinna Huber und Frau Tanja Nordte, die mich engagiert und geduldig eingearbeitet, tatkräftig unterstützt und mir darüber hinaus praktische Hilfestellung bei der Durchführung der verschiedenen Laborverfahren geleistet haben.

Insbesondere möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Valerie Malouvier und Dominik Zieglgänsberger für die produktive Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung und die aufbauenden Worte beim Auftreten von Problemen bedanken.

Lebenslauf

Name: Geith, Stefanie Maria

Geburtsdatum: 21. Januar 1974

Geburtsort: Ingolstadt

Anschrift: Nordendstr.22
80799 München
Tel.: 089/271 29 57; 0171/45 46 178

Familienstand: ledig

Vater: Geith, Ludwig, geb. 22.01.1926, gest. 21.07.1999, Dipl. Ing. Architekt

Mutter: Geith, Carola, geb. Ernst, geb. 07.04.1933, Hausfrau

Schulausbildung: 09/80-07/84: Grundschule auf der Schanz
09/84-07/93: Gnadenthal-Gymnasium der Franziskanerinnen, Ingolstadt mit Abschluß der Allgemeinen Hochschulreife

FSJ: 09/93 –04/94: Freiwilliges Soziales Jahr, Pflegeheim Ingolstadt

Studium: seit 05/94: *Studium der Humanmedizin* an der Ludwig-Maximilians-Universität, München

- 03/96: Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
- 03/97: 1. Medizinisches Staatsexamen
- 09/99: 2. Medizinisches Staatsexamen
- 10/99-09/00: Praktisches Jahr:

Chirurgie: Traumatologie, Universitätsspital Zürich
Visceralchirurgie/SICU, Mount Sinai Hospital, New York

Gynäkologie: I. Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Innere Medizin: I. Medizinische Klinik, Klinikum Ingolstadt

- 11/00: 3. Medizinisches Staatsexamen, Gesamtnote: 1,8

Beruflicher Werdegang: seit 12/00: Ärztin im Praktikum (Innere Medizin),
II. Medizinische Klinik, Städt. KH München-Schwabing

Zweitstudium: 05/96-07/98: *Studium der Philosophie* an der Hochschule für Philosophie S.J., München

- Juli 1997: Vorprüfung zum Baccalaureat der Philosophie
- Juli 1998: Prüfung zum Baccalaureus Philosophiae

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet