

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung des Proteins „Tissue Factor“ in der Blutgerinnung

1892 publizierte der Physiologe Alexander Schmidt (1831-1894) in seinem Werk „Zur Blutlehre“ erstmals ein Schema zur Blutgerinnung. Er vermutete, dass eine unbekannte Substanz die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin auslöse und dadurch die Gerinnung des Blutes hervorgerufen würde (Schmidt, 1892). Seine Vermutung wurde 1903 durch den Arzt Paul Oskar Morawitz (1879-1936) bestätigt. Herr Dr. Morawitz fand heraus, dass Gewebsthromboplastin für die Generierung von Thrombin erforderlich war (Morawitz, 1905). Die Isolierung und eine genauere Charakterisierung dieses Proteins fanden allerdings erst in den letzten 25 Jahren statt (Bach et al., 1981; Broze, Jr. et al., 1985). Heute wird Thromboplastin im Rahmen einer einheitlichen Nomenklatur als Tissue Factor (TF, Faktor III, CD 142) bezeichnet. Dieser Begriff wurde durch die Vorstellung geprägt, dass TF im Gewebe vorhanden ist und erst nach einer Verletzung der Gefäßwand mit dem zirkulierenden Blut und den darin enthaltenen Blutgerinnungsfaktoren interagieren kann.

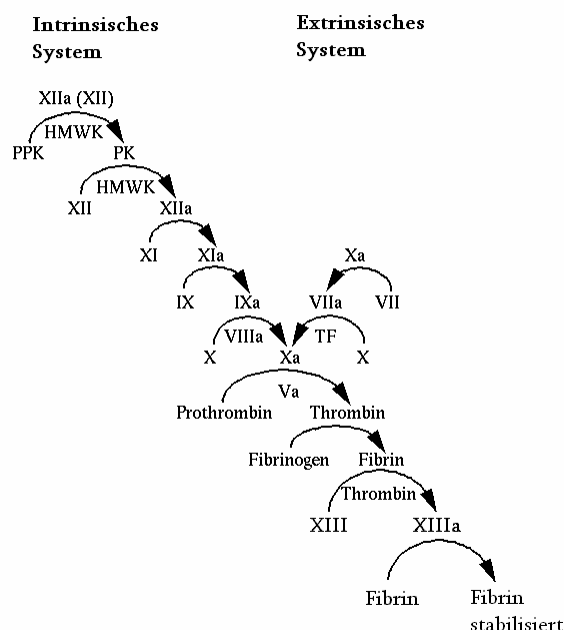


Abbildung 1 Blutgerinnungskaskade nach Davie/Mac Farlane, 1964, PPK: Plasma-Präkalkalilikrein
HMWK: hochmolekulares Kininogen, TF:Tissue Factor

Ausgehend von Morawitz' theoretischen Ansätzen bilden die 1964 veröffentlichten Publikationen über die so genannte Wasserfall- bzw. Kaskaden-Theorie (Davie und Ratnoff, 1964; Mac Farlane, 1964) die Grundlage unserer Auffassung vom Ablauf der Blutgerinnung. Demnach werden inaktive Vorläufer, so genannte Zymogene, in einer kaskadenartigen Reaktion durch Serinproteasen und Ko-Faktoren in aktive Enzyme überführt. Dabei wird zwischen zwei unterschiedlichen Systemen unterschieden: dem so genannten extrinsischen und dem intrinsischen Gerinnungssystem (Abbildung 1).

Das extrinsische Gerinnungssystem wird auf exogenem Wege durch TF gestartet. Dieser ist in diversen menschlichen Geweben wie Gehirn, Lunge, Niere, Leber und Milz vorhanden (Fleck et al., 1990). In diesen Geweben ist TF vor allem in der Gefäßwand und in Organkapseln lokalisiert (Drake et al., 1989), um im Falle einer Gefäßverletzung das Organ und den Körper vor Blutverlusten zu schützen. Das intrinsische oder auch Kontaktaktivierungssystem wird nach Kontakt mit anionischen Oberflächen (z. B. Glaswand eines Reagenzglases) durch eine Aktivierung des Gerinnungsfaktors XII (F XII) ausgelöst, der im Blut, also intrinsisch, vorhanden ist. Beide Wege führen zur Bildung von F Xa, der auf einer gemeinsamen Endstrecke Prothrombin aktiviert, was letztendlich zur Fibrinbildung führt.

Neuere Erkenntnisse legen allerdings eine Revision dieses Vorstellungsmodells nahe. Die Trennung zwischen intrinsischem und extrinsischem System wird nicht mehr so strikt vollzogen, da nicht nur F X, sondern auch F IX das intrinsische System durch den TF/F VIIa-Komplex aktivieren kann (Bauer et al., 1990; Bom et al., 1991; Nemerson und Bach, 1982; Osterud und Rapaport, 1977; Rapaport und Rao, 1992). Thrombin ist ferner in der Lage, F XI ohne Beteiligung von F XII zu aktivieren (Broze, Jr. und Gailani, 1993; Gailani und Broze, Jr., 1993; Naito und Fujikawa, 1991) (Abbildung 2).

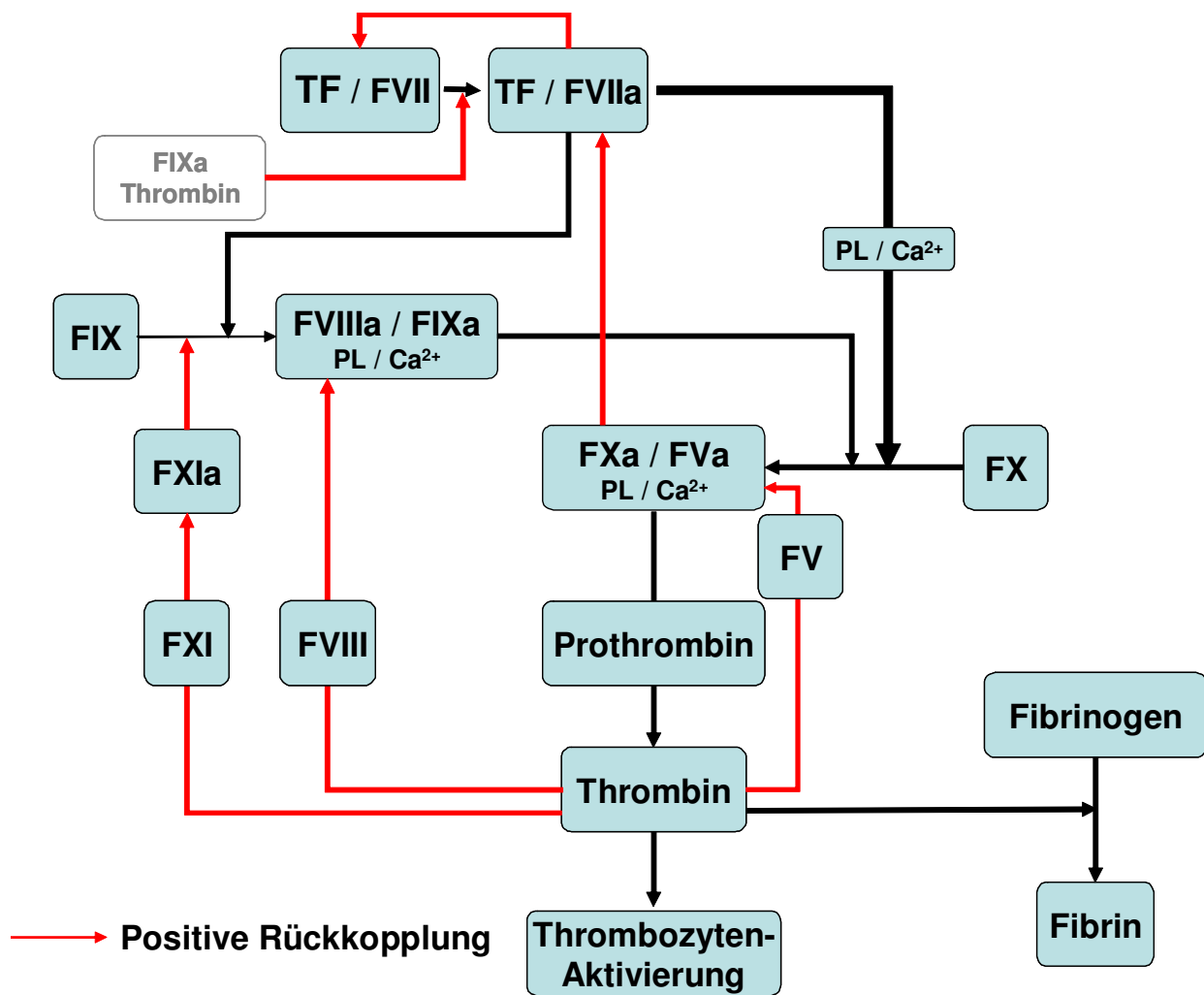


Abbildung 2 Schematische Darstellung des revidierten Blutgerinnungsmodells (in vereinfachter Form) F: Faktor, PL: Phospholipide, TF: Tissue Factor

Seitdem bekannt ist, dass Patienten mit nachgewiesenem Mangel an Kontaktaktivierungsfaktoren - F XII, Präkallikrein und hochmolekularem Kininogen – keine erhöhte Blutungsneigung aufweisen (Kienast und Ostermann, 1993; Zeerleder et al., 1999), wird die physiologische Bedeutung des intrinsischen Systems als Hauptaktivator der Fibrinbildung angezweifelt. Nach heutigem Kenntnisstand kommt dem intrinsischen System vorwiegend bei Kontakt von Blut mit künstlichen, negativ geladenen Oberflächen Bedeutung zu (Courtney und Forbes, 1994). Hingegen sind Zustände, die durch einen Mangel der extrinsischen Gerinnungsfaktoren VII, X, V und II (Prothrombin) gekennzeichnet sind, meist letal (Aasrum und Prydz, 2002; Yang et al., 2000). Patienten mit Mutationen des TF-Gens sind bislang nicht bekannt. Mäuse, deren TF-Gen durch gentechnische Methoden ausgeschaltet wurde, waren nicht lebensfähig (Mackman, 2004). Diese Hinweise führten zu einem neuen

Gerinnungsschema, in dem das Protein TF den initiierenden Schritt für die Aktivierung der Blutgerinnung darstellt. Vaskulärer TF ist Rezeptor und Ko-Faktor für F VII (Bach, 1988; Carson und Brozna, 1993; Nemerson, 1988; Rapaport, 1991a) oder den im Blut bereits in geringen Mengen vorhandenen F VIIa (Abbildung 2). F VII/VIIa besitzt eine hohe Affinität für seinen Rezeptor TF, wodurch sich die Enzymgeschwindigkeit und katalytische Fähigkeit des TF/F VIIa-Komplexes zur Aktivierung weiterer Gerinnungsfaktoren signifikant steigert. Durch die Aktivierung der Zymogene F IX und F X entstehen geringe Mengen Thrombin, die zu einer teilweisen Aktivierung von Thrombozyten und einer quantitativen Umsetzung der Ko-Faktoren V (Esmon, 1979) und VIII (Eaton et al., 1986) führen. Ferner wird die Gerinnung über einen positiven Rückkopplungsmechanismus verstärkt: der Ko-Faktor VIIIa bildet mit F IXa auf Membranoberflächen einen Komplex, der zur Generierung einer 50- bis 100-fach größeren Menge an F Xa im Vergleich zum TF/F VIIa-Komplex führt. Darüber hinaus bildet F Xa mit dem Ko-Faktor Va und Prothrombin den so genannten Prothrombinase-Komplex (Kalafatis et al., 1994; Nemerson und Bach, 1982), der zu einer 25-fachen Verstärkung der Thrombinbildung und letztendlich zur Bildung eines stabilen Fibringerinnsels führt. Daher reichen bereits geringe Mengen von TF aus, um ein Gefäß zu verschließen.

Neben seiner Bedeutung als Initiator der physiologischen Blutgerinnung ist TF auch bei der Entstehung von Thrombosen (Osterud, 1998) und der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt (Marutsuka et al., 2005). In den letzten Jahren wurden weitere Funktionen des TF-Proteins in der Angiogenese der Embryonalentwicklung (Bugge et al., 1996; Carmeliet et al., 1996) sowie in der Tumorangio-genese, -progression und -metastasierung (Belting et al., 2005; Shoji et al., 1998; Zhang et al., 1994) beschrieben. Die Beteiligung von TF an der Migration bzw. Transmigration von monozytären Zellen durch Endothelzellen konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Muller und Randolph, 1999). Eine erhöhte Expression von TF bei Patienten mit Sepsis führte ferner zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) (Levi und ten Cate, 1999) und verstärkt inflammatorische Reaktionen (Levi et al., 2006). Zu all diesen pathologischen Zuständen trägt TF entweder durch die Aktivierung des Gerinnungssystems und/oder durch von der Gerinnung unabhängige Interaktion in Signaltransduktionsprozessen bei (Versteeg und Ruf, 2006).

1.2 Tissue Factor Pathway Inhibitor und seine Bedeutung für die Blutgerinnung

Die Blutgerinnung stellt einen Schutz- und Abwehrmechanismus des Körpers dar, der den Körper vor Blutverlusten schützen soll. Um die Blutgerinnung nur auf den Bereich der Gefäßverletzung zu limitieren, ist eine Regulation der Blutgerinnung unverzichtbar. Verschiedene antikoagulatorische Mechanismen wurden beschrieben: Die Gerinnung wird zum einen durch eine Inhibition von aktivierten Gerinnungsfaktoren (Proteaseninhibitoren: Antithrombin III, α 2-Macroglobulin, Tissue Factor Pathway Inhibitor), zum anderen durch eine Inaktivierung der aktivierten Faktoren reguliert (Protein C System).

Innerhalb dieser Regulationsmechanismen ist das Protein Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), das auch als Lipoprotein-associated coagulation inhibitor (LACI) oder Extrinsic pathway inhibitor (EPI) bezeichnet wird, der wichtigste physiologische Gegenspieler des TF/F VIIa-Komplexes (Broze, Jr. et al., 1990; Rapaport, 1991b).

In vivo wird TFPI primär durch das vaskuläre Endothel synthetisiert (Werling et al., 1993); geringere Mengen werden auch durch Megakaryozyten, Monozyten, Makrophagen und in der Leber exprimiert (Lwaleed und Bass, 2006). Die im Endothel verschiedener Organe stattfindende TFPI-Expression scheint dabei von deren Bedarf abhängig zu sein. So exprimieren pulmonale und kardiale Endothelzellen die größten Mengen an TFPI (Bajaj et al., 1999). TFPI verteilt sich *in vivo* auf drei Pools: 50-80 % sind vermutlich über Glukosaminglykane und Proteoglykane an die Oberfläche von Endothelzellen gebunden, während 10-50 % zum großen Teil an Lipoproteine gebunden im Plasma zirkulieren. Ein geringer Anteil (ca. 2-5 %) des TFPI wird in Thrombozyten in speziellen Granula gespeichert (Novotny et al., 1989; Sandset, 1996).

TFPI ist ein Glykoprotein und enthält drei Kunitz-Typ-Domänen, die hoch konservierte Strukturen vieler Serinproteasen-Inhibitoren darstellen (Broze, Jr., 1995). Während Antithrombin III zur Dissoziation des TF/F VIIa-Komplexes führt (Rao et al., 1995), stabilisiert TFPI den Komplex, in dem es selbst einen reversiblen, quaternären Komplex mit TF, F VIIa und F Xa bildet (Dickinson und Ruf, 1997). In diesem Komplex hemmt TFPI kompetitiv F Xa; eine Aktivierung von Prothrombin ist somit nicht mehr möglich. Die Bildung des Komplexes erfolgt in zwei Schritten: TFPI

bindet zunächst über seine zweite Kunitz-Domäne an F Xa und hemmt anschließend über seine erste Kunitz-Domäne den TF/F VIIa-Komplex. Der erste Reaktionsschritt ist unabhängig von Ca^{2+} -Ionen, während der zweite diese erfordert. Auch in Abwesenheit von F Xa kann TFPI den TF/F VIIa-Komplex inhibieren. Dazu ist jedoch eine etwa 50-fach höhere TFPI-Konzentration als zur Ausbildung des quaternären Komplexes notwendig (Luchtman-Jones und Broze, Jr., 1995; Salemink et al., 1998).

1.3 Die Struktur und Lokalisation des Proteins „Tissue Factor“

TF ist ein einzelkettiges integrales Glykoprotein der Zellmembran mit einem Molekulargewicht von 47 kDa. Aufgrund seiner großen Sequenzhomologie in der Sekundär- und Tertiärstruktur zum Interferon- γ -Rezeptor wird TF der Familie der Klasse II-Zytokinrezeptoren zugeordnet (Bazan, 1990). TF ist ein Polypeptid, das aus 295 Aminosäuren synthetisiert wird. Nach Abspaltung eines Signalpeptids besteht das reife Protein aus 263 Aminosäuren. Es lässt sich in drei Domänen einteilen: Die extrazelluläre Domäne umfasst 219 Aminosäuren und enthält zwei Disulfidverbindungen (Abbildung 3) und drei Glykosylierungsstellen. Ihr folgt eine 23 Aminosäuren lange transmembranäre Domäne, an die sich die zytoplasmatische Domäne mit 21 Aminosäuren anschließt (Edgington et al., 1991). Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei Fibronectin-Typ III-ähnlichen Domänen (Banner, 1997) mit β -Faltblattstruktur. Die beiden Domänen sind so zueinander ausgerichtet, dass sie einen Winkel von 120° bilden. Die F VII/VIIa-Bindung erstreckt sich über die gesamte extrazelluläre Domäne, wobei drei essentielle Bindungsstellen existieren (Banner et al., 1996; Harlos et al., 1994; Muller et al., 1994) (Abbildung 3).

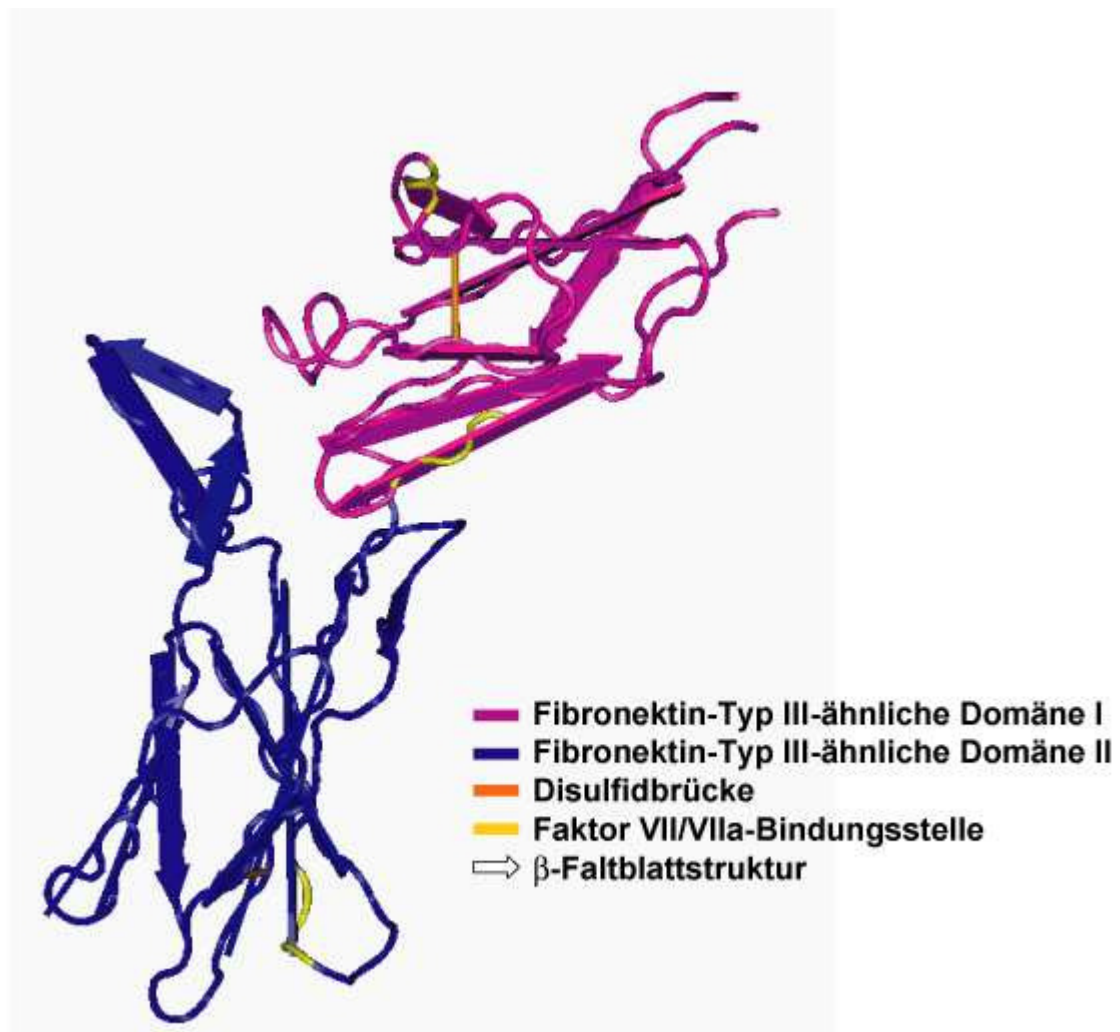


Abbildung 3 Dreidimensionale Darstellung der extrazellulären Domäne des Proteins TF erstellt mit dem Programm Cn3D 4.1 nach einer Publikation von Huang et al., 1998.

Die Bindung an TF bewirkt eine allosterische Aktivierung des F VIIa und verstärkt dadurch die Hydrolyse von F X um den Faktor 2×10^7 im Vergleich zu F VIIa allein (Edgington et al., 1997). Ferner steigert TF die Aktivierbarkeit von F VII durch die F Xa, IXa, Thrombin und den TF/F VIIa-Komplex (Bajaj et al., 1981; Broze, Jr. und Majerus, 1980; Davie et al., 1991).

Die transmembranäre Domäne erhöht die Bindungsaffinität der F X und IX an den TF/F VIIa-Komplex, ist jedoch nicht zwingend notwendig, damit komplexierter TF seine funktionelle Aktivität entfaltet. Hingegen ist eine Assoziierung mit Phospholipiden für seine Aktivität essentiell (Paborsky et al., 1991).

Durch die Interaktion zwischen TF und F VIIa kommt es über die intrazelluläre Domäne zu einer intrazellulären Calcium-Mobilisation, die durch eine

Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase vermittelt wird (Camerer et al., 1996; Rottingen et al., 1995). Unabhängig von der proteolytischen Aktivität führt die Ligandeninteraktion von TF zur Bindung der zytoplasmatischen Domäne an das Aktin bindende Protein 280 (ABP280) sowie zur Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) (Ott et al., 1998). Außerdem wurde gezeigt, dass der TF/F VIIa-Komplex die Phosphorylierung von mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK) vermittelt (Poulsen et al., 1998).

1.4 Die Genstruktur von Tissue Factor

Das menschliche TF-Gen ist auf dem Chromosom 1 p21-p22 lokalisiert und umfasst 12,4 kbp (Carson et al., 1985; Kato et al., 1988). Mit der Klonierung des humanen TF-Gens fand Ende der 80er Jahre seine strukturelle Aufklärung statt (Carson et al., 1985; Morrissey et al., 1987; Scarpati et al., 1987). Es besteht aus 6 Exons, die durch 5 Introns getrennt werden (Mackman et al., 1989). Die Exons 2 bis 5 kodieren die extrazelluläre Domäne des TF, während Exon 6 den zytoplasmatischen und den transmembranären Bereich von TF kodiert. Exon 1 beinhaltet die genetischen Informationen für die Initiation der Translation sowie eine Sequenz, die für die posttranslationale Prozessierung und das Einschleusen von TF in die Zellmembran verantwortlich ist.

Die Transkription des Gens führt zu einer 2,2 kbp großen mRNA, die in das reife TF-Protein translatiert wird (Abbildung 4).

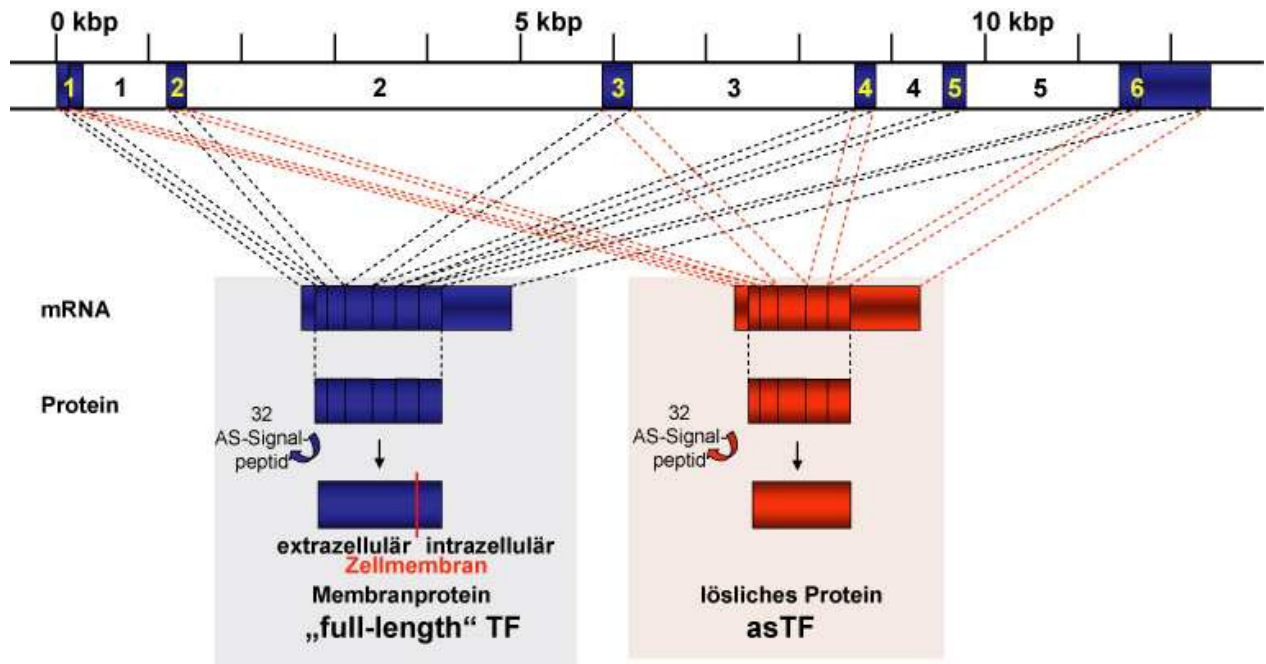


Abbildung 4 Schematische Darstellung des TF-Gens
 AS: Aminosäure, asTF: alternativ gespleißter TF, TF: Tissue Factor

TF wird konstitutiv von perivaskulären Zellen wie Fibroblasten und Perizyten sowie von extravaskulären Zellen wie Keratinozyten exprimiert (Drake et al., 1989; Wilcox et al., 1989). In Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen, die in direktem Kontakt mit dem zirkulierenden Blut stehen und unter physiologischen Bedingungen kein TF-Protein exprimieren, kann die Expression von TF durch Stimulation mit verschiedenen Substanzen induziert werden. So führt die Stimulation mit Entzündungsmediatoren, u. a. Interleukine, Komplementfaktor C5a, Phorbolmyristatacetat (PMA), Lipopolysaccharide (LPS), Wachstumsfaktoren oder durch andere Reize, z.B. ionisierende Strahlung, zur TF-Synthese (Bloem et al., 1989; Schwartz und Edgington, 1981; Verheij et al., 1995).

Die Regulation der TF-Expression findet auf der Transkriptionsebene statt (Edgington et al., 1991). In der Promoterregion des TF-Gens wurden Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, NF- κ B, SP-1 und EGR-1 identifiziert (Mackman et al., 1990).

1.5 Das alternative Spleißen des Tissue Factor-Gens

Neben dem 2,2 kbp großen Transkript sind des Weiteren auch Transkripte mit einer Größe von 3,1-3,4 kbp bekannt, die durch alternatives Spleißen erzeugt werden. Diese Transkripte verfügen zusätzlich über das erste Intron, welches ein Stopp-Kodon enthält, sodass kein reifes TF-Protein gebildet wird (Brand et al., 1991; van der Logt et al., 1992). In Tumorzellen wurde Ende 2005 ein weiteres inaktives mRNA-Transkript entdeckt, das nicht das gesamte Intron 1, sondern nur ein 495 bp großes Teilstück enthielt (Chand et al., 2006). Es zeigte sich, dass Tumorzellen dieses inaktive Transkript häufiger (bis zu 10 % aller TF-Transkripte) als gesunde Zellen (ca. 1 %) exprimieren. Ob dieses Transkript als diagnostischer Marker zur Detektion solider Tumoren geeignet ist, wird derzeit untersucht. Alternatives Spleißen führt nicht ausschließlich zu inaktiven Transkripten. Ein alternativ gespleißtes Transkript des TF-Gens, dem das komplette Exon 5 fehlte, wurde 2003 von Bogdanov beschrieben (Bogdanov et al., 2003)(Abbildung 4). Da Exon 4 mit einem kompletten Kodon endet, Exon 6 hingegen mit einem unvollständigen Kodon beginnt, kommt es beim direkten Spleißen von Exon 4 an Exon 6 zu einer Leserasterverschiebung (engl. frameshift) des offenen Leserahmens (engl. orf: open reading frame) der mRNA. Beim Screening von unterschiedlichen menschlichen Geweben wurde die mRNA des alternativ gespleißten TF (asTF) in der Niere, im Gehirn, im Herzen, in den Inselzellen des Pankreas, in der Plazenta und in der Lunge nachgewiesen. In der Lunge liegt ein wesentlich höheres Verhältnis von asTF-mRNA zu „full-length“ TF-mRNA gefunden als in anderen Geweben vor. Dies weist auf eine Regulierung der am Spleißen beteiligten Faktoren hin.

Abgesehen von ihrer Bedeutung bei konstitutiven Spleißprozessen stellen so genannte SR (Serin-reich)-Proteine wichtige Regulatoren des alternativen Spleißens dar (Graveley, 2000). Sie gehören zu einer Familie hoch konservierter essentieller Spleißfaktoren, die schon früh in der Bildung der Spleißosomen wirken (Fu, 1995). Das Serin-reiche Motiv bietet einen Angriffspunkt für eine Vielzahl von SR-Protein-Kinasen, zu denen unter anderem die Familie der CDC-ähnlichen Kinasen (CLK) zählt (Colwill et al., 1996). CLK interagieren mit verschiedenen SR-Proteinen und phosphorylieren sie (Nayler et al., 1997; Nikolakaki et al., 2002). Dadurch verändert sich die Proteinaktivität der SR-Proteine, wodurch unter anderem das alternative

Spleißen beeinflusst werden kann. Welche Faktoren im Detail beim alternativen Spleißen des TF-Gens beteiligt sind, ist bislang nicht bekannt.

Die Translation des asTF-mRNA-Transkripts führt zu einem TF-Protein, das nur aus 206 Aminosäuren besteht. Dem humanen alternativ gespleißten TF fehlt auf Grund der Leserasterverschiebung seine Membranverankerung. AsTF ist somit ein lösliches Protein. Die TF-Isoform asTF besteht aus einem Großteil der extrazellulären Domäne von „full-length“ TF (166 Aminosäuren), wohingegen das 40 Aminosäuren lange C-terminale Ende eine komplett neue, bislang unbekannt Sequenz aufweist. Zu bemerken ist, dass das L-Lysin-Doppel an den Stellen 165-166 in asTF noch vorhanden ist. Es ist an der Bindung von F VIIa an TF beteiligt (Kelley et al., 1995; Rao und Ruf, 1995).

Immunhistochemische Färbungen mit TF- und asTF-spezifischen Antikörpern an Lungenbiopsien von Patienten mit Plattenepithelkarzinom (Rauch et al., 2005) und an exzidierten Thromben (Bogdanov et al., 2003) zeigten eine Kollokalisierung von regulärem und alternativ gespleißtem TF in den entsprechenden Färbungen auf. Ebenso ließ sich in *ex vivo* generierten Thromben, die durch Perfusion von Blut über Kollagen beschichtete Oberflächen bzw. über arterielle Tunica media entstanden, nicht nur TF (Giesen et al., 1999) sondern auch asTF nachweisen. Dieses Ergebnis deutet auf ein Vorkommen von asTF im Plasma hin (Bogdanov et al., 2003). Ein wesentlicher Teil des im Plasma zirkulierenden TF (ca. 10-30 %) besteht aus der löslichen TF-Isoform (Hathcock, 2004). Versuche zeigten, dass asTF nicht in eine Phospholipidmembran inkorporiert sein muss, um prokoagulatorisch aktiv zu sein, sondern dass eine einfache Verbindung von Phospholipiden zur Aktivierung ausreicht (Bogdanov et al., 2003). Eine physiologische Rolle der löslichen TF-Isoform ist bislang noch nicht bekannt.

1.6 Die Bedeutung von im Blut zirkulierenden „Tissue Factor“

Lange Zeit wurde angenommen, dass bei einer Gefäßverletzung das Blutgerinnungssystem allein durch die Exposition des zirkulierenden Blutes gegenüber TF aus der Gefäßwand aktiviert wird. Giesen et al. zeigten 1999 erstmals, dass TF auch intravaskulär zu finden und in dieser Form funktionell aktiv ist (Giesen et al., 1999). In dieser Arbeit wurden Collagen-beschichtete Glasplättchen mit

humanem Blut perfundiert. In den dadurch entstandenen Thromben konnten nach entsprechender Färbung TF-positive Mikropartikel nachgewiesen werden. Bei der Perfusion eingesetzte TF-Antikörper führten zu einer Reduktion der Thrombusgröße um 70%. Weitere Arbeiten demonstrierten ebenfalls, dass TF-positive Mikropartikel in Thromben integriert und dadurch das Thrombuswachstum und die Fibrindeposition beeinflusst werden (Brisset et al., 2003; Rauch et al., 2000). In einem Thrombosemodell im Kaninchen führte die Infusion von Anti-TF-Antikörpern zu einer um ca. 90% verringerten Fibrindeposition im Thrombus (Himber et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeiten zeigten, dass TF von der luminalen Seite in Thromben inkorporiert wird und durch Thrombin- und Fibrinbildung ihr Wachstum propagiert.

In vielen Arbeiten wurde zirkulierender TF als ein wichtiger Faktor in der Ätiologie verschiedener Krankheiten genannt: Ein erhöhter TF-Spiegel wurde im Plasma von Patienten mit akuten Koronarsyndromen, Meningokokken-Sepsis, Disseminierter Intravaskulärer Koagulation (DIC), Anti-Phospholipid-Antikörper-Syndrom und Sichelzellanämie beschrieben (Osterud und Bjorklid, 2006). Einige Studien zeigten eine Korrelation zwischen einem erhöhten TF-Plasmaspiegel und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (Misumi et al., 1998; Seljeflot et al., 2003) bzw. einer erhöhten Thrombogenität des Blutes (Carey und Rodgers, 1998). Vor diesem Hintergrund scheint die Inhibition von zirkulierendem TF ein viel versprechender Angriffspunkt einer antithrombotischen Therapie zu sein.

Bislang wurden zwei unterschiedliche Formen zirkulierenden TF beschrieben: TF wird einerseits auf der Oberfläche von Monozyten exprimiert (Rivers et al., 1975). Monozyten sind die einzigen zirkulierenden Zellen, die nach Stimulation TF produzieren können (Ott, 2003). Andererseits kann TF auch mit Mikropartikeln unterschiedlicher zellulärer Herkunft assoziiert sein und so im Blut zirkulieren (Mallat et al., 2000; Rauch et al., 2000). Als potentielle Quellen gelten Leukozyten (Rauch et al., 2000), Thrombozyten (Siddiqui et al., 2002), glatte Muskelzellen (Schechter et al., 2000) und Endothelzellen (Mallat et al., 2000). Die wichtigsten Mechanismen der Mikropartikel-Freisetzung aus diesen Zellen sind Zellaktivierung und Apoptose (Freyssinet, 2003). Die Mehrheit der im Blutplasma befindlichen Mikropartikel stammt aus Thrombozyten, wohingegen Mikropartikel anderer Herkunft in einer weitaus geringeren Anzahl im Blut zirkulieren (Diamant et al., 2004). Im Gegensatz zu

Monozyten können Thrombozyten selbst keinen TF exprimieren (Fink et al., 2003). Rauch et al. zeigten jedoch, dass TF aus Leukozyten auf Thrombozyten übertragen werden kann (Rauch et al., 2000).

In den meisten Publikationen wird zirkulierender TF als Mikropartikel-assoziierte Form nachgewiesen. Mit der Entdeckung der TF-Isoform asTF wurde erstmals ein tatsächlich lösliches, im Plasma zirkulierendes TF-Protein beschrieben (Bogdanov et al., 2003).

1.7 Entzündung und Tissue Factor

Schwere Infektionen sind geprägt von einer akuten inflammatorischen Reaktion und werden fast ausnahmslos von Veränderungen des Gerinnungssystems begleitet (Levi und ten Cate, 1999). Bei Kontakt mit Mikroorganismen werden Zellen des Immunsystems rekrutiert und proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet. Auch bei der Gerinnungsaktivierung unter inflammatorischen Bedingungen ist TF das zentrale Starterprotein. Eine Antagonisierung des TF/F VIIa-Komplexes reduzierte im Tiermodell bei Vorliegen einer Sepsis und Endotoxinämie Koagulopathien und verringerte die Letalität der Tiere (Biemond et al., 1995; Dackiw et al., 1996).

In den letzten Jahren wurde das komplexe Zusammenspiel zwischen den zwei Systemen Entzündung und Gerinnung detailliert untersucht (Chu, 2006): Nach derzeitigem Stand führen Entzündungen nicht nur zu einer TF-abhängigen Aktivierung der Gerinnung, vielmehr trägt auch das Gerinnungssystem beträchtlich zur Stärke der inflammatorischen Reaktion bei. Neben seiner Funktion als Initiator des Gerinnungssystems besitzt TF eine wichtige Rolle als Modulator von Entzündungsreaktionen: So induzieren proinflammatorische Zytokine die Expression von TF in Monozyten und Endothelzellen, was letztendlich zur Bildung von Thrombin führt. Gleichzeitig können TF/F VIIa-Komplex sowie Thrombin an zelluläre Rezeptoren, so genannte Protease aktivierte Rezeptoren (PARs), binden, über die die Produktion und Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren wie z. B. IL-6 vermittelt wird (Levi et al., 2006).

Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und Interleukin-6 (IL-6) sind die wesentlichen Mediatoren bei der Aktivierung des Gerinnungssystems im Rahmen

einer Entzündung. Bei gesunden Probanden induzierte eine Infusion von TNF- α nicht nur Zeichen einer systemischen inflammatorischen Immunantwort, sondern führte auch zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems (van der Poll et al., 1990). Eine Inhibition von TNF- α mit monoklonalen Antikörpern hob jedoch nicht die Gerinnungsaktivierung bei einer Endotoxinämie bei Schimpansen auf (van der Poll et al., 1994b). Dagegen führte eine Blockierung von IL-6 im selben Tiermodell sowohl systemisch als auch lokal zur Abschwächung der Gerinnungsaktivierung (Levi et al., 1998; van der Poll et al., 1994a).

Proinflammatorische Zytokine verändern das hämostatische Gleichgewicht von Endothelzellen (Grignani und Maiolo, 2000). Unter physiologischen Bedingungen ist TF nicht auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert. Eine Aktivierung des Endothels durch proinflammatorische Zytokine führt zu einer Änderung des hämostatischen Gleichgewichts des Endothels zugunsten eines prothrombogenen Zustandes (Combes et al., 1999; Kushak et al., 2005). Ob proinflammatorische Zytokine das Expressionsmuster der TF-Isoformen in Endothelzellen beeinflussen, wurde bislang nicht untersucht.

1.8 Ionisierende Bestrahlung und Tissue Factor

Nicht nur inflammatorische Prozesse führen zu einer erhöhten zellulären Thrombogenität. Seit langem ist bekannt, dass antiproliferative Therapien wie ionisierende Bestrahlung bzw. der Einsatz von Chemotherapeutika mit dem klinisch bedeutsamen Auftreten von Gewebsthrombosen und -fibrosen assoziiert sind (Fajardo, 2005; Takano und Mizuno, 2006). In der Kardiologie ist das Auftreten von Spätthrombosen in bestrahlten Koronararterien eine bekannte Komplikation nach intrakoronarer Bestrahlung (genannt Brachytherapie), ein Verfahren das zur Behandlung von In-Stent-Rezidivstenosen entwickelt wurde (Waksman, 1999). Bereits in älteren wissenschaftlichen Arbeiten wurde beschrieben, dass es nach Anwendung ionisierender Bestrahlung zu einer Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems und zur erhöhten Gewebsthrombogenität mit Thrombosen in den jeweiligen Organen kommen kann (Andrushko, 1967; Wustrow et al., 1982). Ionisierende Bestrahlung verursacht in Endothelzellen eine *de novo*-Synthese von

dem Protein TF (Verheij et al., 1995). Ob die bestrahlten Zellen apoptotische, TF-positive Mikropartikel oder die lösliche TF-Isoform sezernieren oder ein Zusammenhang zwischen der strahlungsinduzierten TF-Expression und der Ausbildung von Spätthrombosen besteht, wurde bislang nicht analysiert. Ferner ist eine Strahlenexposition häufig mit einer inflammatorischen Reaktion assoziiert (Van der Meeren et al., 2003), wodurch die strahlungsinduzierte Aktivierung des Gerinnungssystems möglicherweise verstärkt werden könnte.

1.9 Antioxidantien und Tissue Factor

Sowohl die endogene Produktion als auch die exogene Zufuhr von reaktiven Sauerstoffderivaten hat weit reichenden Einfluss auf zahlreiche endotheliale Funktionen. So wird unter anderem das hämostatische Gleichgewicht von Endothelzellen entscheidend durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) beeinflusst: Zum einen werden beispielsweise bei der Genese der Arteriosklerose ROS gebildet, die LDL oxidieren. Oxidiertes LDL fördert die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel sowie die Leukozyten/Thrombozyten-Aggregation (Stoll und Bendszus, 2006). Zum anderen kann TF direkt durch Sauerstoffradikale in vaskulären Zellen induziert und aktiviert werden (Herkert et al., 2004). Darüber hinaus wird die TF-Expression durch Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B reguliert, die oxidationsempfindlich sind (Kim et al., 2003). Antioxidantien (wie z.B. Vitamin C und E) sind nach Aufnahme in die Endothelzelle in der Lage, dort direkt antioxidativ zu wirken sowie indirekt Redoxsysteme und Enzymaktivitäten zu beeinflussen (Frei, 1999; Sugiyama et al., 1998). Obwohl klinische Studien von positiven Effekten durch eine orale Vitaminsupplementierung z. B. bei endothelialer Dysfunktion berichten (Mietus-Snyder und Malloy, 1998; Nappo et al., 1999), wird die Vitaminsupplementierung in der Literatur kontrovers diskutiert (Clarke und Armitage, 2002; Darko et al., 2002).

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde gezeigt, dass die antioxidativen Carotinoide Beta-Carotin, Lutein und Lycopin sowohl die TF-Expression als auch die TF-Aktivität in vaskulären Zellen signifikant reduzierten (Lee et al., 2006). Die

Auswirkungen anderer Antioxidantien wie N-Acetylcystein auf die endotheliale TF-Expression wurden bislang nur wenig untersucht.