

**Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin**  
Campus Benjamin Franklin  
aus der Klinik für Kardiologie und Pulmologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Heinz Peter Schultheiss

**Einfluss der ionisierenden Bestrahlung auf den  
Gerinnungsfaktor Tissue Faktor in peripheren mononukleären  
Blutzellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
medizinischen Doktorwürde  
der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Florian Niebergall  
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Ursula Rauch-Kröhnert  
Korreferent: Prof. Dr. med. Martin Tepel

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 03.02.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1. Tissue Faktor: Ein kurzer historischer Überblick .....	6
1.2. Die Tissue Faktor Genstruktur.....	6
1.3. Die Tissue Faktor Proteinstruktur .....	8
1.4. Die Lokalisation von Tissue Faktor im Organismus.....	10
1.5. Die Regulation der plasmatischen Gerinnung .....	11
1.6. Tissue Faktor und Thrombogenese .....	15
1.7. Die ionisierende Bestrahlung als thrombogener Stimulus.....	15
<b>2. Die Zielsetzung der Doktorarbeit</b> .....	<b>17</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
3.1. Der Aufbau der experimentellen Studie .....	18
3.2. Die Zusammensetzung der Probandengruppe.....	19
3.3. Die Zellkulturexperimente.....	20
3.3.1. Die Präparation von peripheren mononukleären Blutzellen .....	20
3.3.2. Die Zellzählung .....	22
3.3.3. Die Kultivierung der PBMNC.....	22
3.3.4. Die Bestrahlung der PBMNC .....	23
3.3.5. Die weitere Präparation der kultivierten Zellen .....	23
3.3.6. Die Trypanblaufärbung zur Überprüfung der Zellvitalität.....	24
3.3.7. Die Präparation von Mikropartikeln und des MP-freien Überstandes .....	24
3.4. Die Bestimmung der funktionellen enzymatischen Aktivität von Tissue Faktor .....	25
3.4.1. Das Grundprinzip .....	25
3.4.2. Verwendung von PBMNC.....	26
3.4.3. Verwendung von Mikropartikeln und Zellkulturüberstand.....	27
3.5. Die „full length“ TF-Protein Konzentrationsbestimmung .....	27

3.6. Der einstufiger Gerinnungstest .....	28
3.6.1. Das Grundprinzip .....	28
3.6.2. Verwendung von PBMNC, Mikropartikeln und Kulturüberstand .....	30
3.7. Die Statistik .....	31
<b>4. Ergebnisse der experimentellen Studie.....</b>	<b>32</b>
4.1. Die Auswirkungen der ionisierenden Bestrahlung auf die TF-Aktivität .....	32
4.2. Der Einfluss der ionisierenden Bestrahlung auf die zelluläre TF-Proteinkonzentration .....	33
4.3. Der Einfluss der ionisierenden Bestrahlung auf die Zellvitalität.....	34
4.4. Die Wirkung der ionisierenden Bestrahlung auf die prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel...	36
4.5. Einfluss der ionisierenden Bestrahlung auf die prokoagulatorische Aktivität des Überstandes .....	36
4.6. Rolle der Phospholipide für die prokoagulatorische Aktivität des Überstands .....	37
4.7. Die Wirkung der ionisierenden Bestrahlung auf die koagulatorische Aktivität von PBMNC .....	37
4.8. Die Auswirkung der ionisierenden Bestrahlung auf die koagulatorische Aktivität der Mikropartikel...	39
4.9. Die Auswirkung auf die koagulatorische Aktivität des Überstandes. ....	41
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>43</b>
5.1. TF-Induktion nach ionisierender Bestrahlung, gegenwärtiger Forschungsstand .....	43
5.2. Beeinflussung der Tissue Faktor-Proteinexpression in PBMNC nach ionisierender Bestrahlung .....	44
5.3. Regulation der enzymatischen Aktivität des TF-Proteins in PBMNC.....	45
5.4. Die Rolle der Mikropartikel in der Pathogenese der Thrombose .....	47
5.5. Die Bedeutung der lösliche TF-Form für die Thrombogenese .....	49
5.6. Mögliche klinische Bedeutung der TF-Induktion in PBMNC nach ionisierender Bestrahlung.....	49
5.7. Ausblick: Pharmakologische Beeinflussung des TF-Proteins als neues Therapiekonzept.....	51
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>53</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>55</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>58</b>

<b>10. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
<b>11. Lebenslauf .....</b>	<b>72</b>
<b>12. Erklärung über Selbständigkeit.....</b>	<b>73</b>
<b>13. Danksagung.....</b>	<b>74</b>

# 1. Einleitung

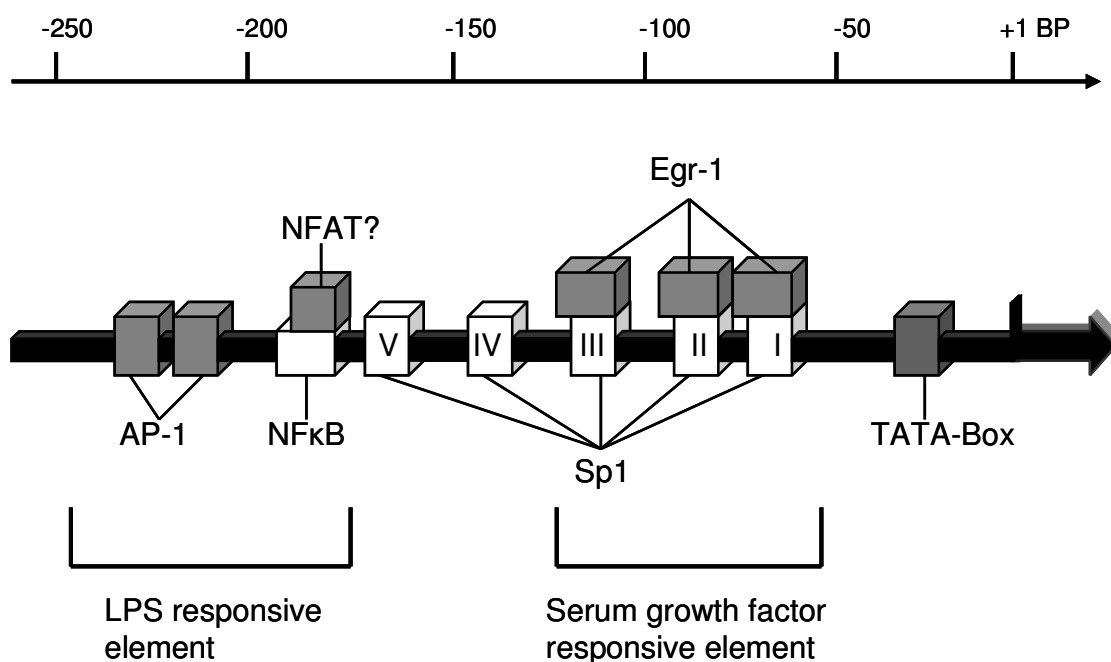
## 1.1. Tissue Faktor: Ein kurzer historischer Überblick

Der Gerinnungsfaktor Tissue Faktor (TF) gilt gegenwärtig als zentraler Initiator des Gerinnungssystems. Das Interesse der Wissenschaft an der Erforschung von Funktion und Regulation dieses Proteins ist ungebrochen, nicht nur wegen seiner bekannten physiologischen Funktion bei der Blutgerinnung, sondern auch aufgrund seiner bedeuteten Rolle bei der Thrombogenese und Entstehung der Arteriosklerose. Die Anfänge seiner Erforschung reichen weit über 150 Jahre zurück. Bereits im frühen 19. Jahrhundert hatte de Blainville gezeigt, dass es nach Infusion von Gewebeextrakt aus Rinderhin bei Versuchstieren zu einer massiven intravaskulären Thrombenbildungen kommt (1). Im Jahre 1905 veröffentlichte Morawitz seine Arbeit "Die Chemie der Blutgerinnung". In Anlehnung an Schmidt und Rauschenbach beschrieb er einen speziellen Gewebefaktor, den er Thrombokinase nannte. Laut seiner Theorie war dieser Faktor in der Lage, in Gegenwart von Kalziumionen die Bildung von Thrombin aus Prothrombin einzuleiten und somit die Blutgerinnung zu initiieren (1). Fundamentale Erkenntnisse für das heutige Verständnis des Gerinnungssystems waren damit gewonnen. Der Begriff „Tissue Faktor“ als Initiator des Gerinnungssystems manifestierte sich aber erst in den 50er und 60er Jahren im Zuge einer Vereinheitlichung der Nomenklatur der Gerinnungsfaktoren (2). Anfang der 80er Jahre wurde schließlich mit der Isolierung und Reinigung von Tissue Faktor in vorher nicht möglichen Mengen eine neue Ära der Erforschung dieses Proteins eingeleitet (3).

## 1.2. Die Tissue Faktor Genstruktur

Ende der 80er Jahre gelang die strukturelle Aufklärung des TF-Gens. Die cDNA-Struktur von humanen TF konnte erstmals 1987 von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben werden (4-7). Tissue Faktor wird von einem 12,4 kbp umfassenden Gen kodiert, welches auf dem langen Arm des Chromosoms 1 (1p21-22) lokalisiert ist (8;9). Das Gen weist sechs Exons auf, die durch fünf Introns getrennt werden (10) (Abbildung 2). Der

Transkriptionseinheit ist eine ca. 250 Basenpaare lange Promotorregion vorgeschaltet. Diese umfasst nach bisherigem Kenntnisstand zwei Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 (Aktivator Protein 1), eine Bindungsstelle für NFκB (nuclear factor κB) sowie drei Egr-1 (Early gene response-1) und fünf Sp1 (Specificity protein 1) Bindungsstellen (11;12). Eine Bindungsstelle für den nukleären Faktor aktiver T-Zellen (NFAT) konnte kürzlich identifiziert werden (13). Die Transkription der TF-mRNA kann durch verschiedene Stimuli induziert werden. So wurde in der Promoterregion ein so genanntes Lipopolysaccharid (LPS) abhängiges (LPS response element, LRE) sowie ein Serum abhängiges (Serum growth factor response element, SRR) Element beschrieben, über welche nach Zellstimulation mit LPS, Tumor Nekrose Faktor- α (TNF-α), Phorbolestern oder anderen Mediatoren eine erhöhte TF-Genexpression induziert wird (12) (Abbildung 1).



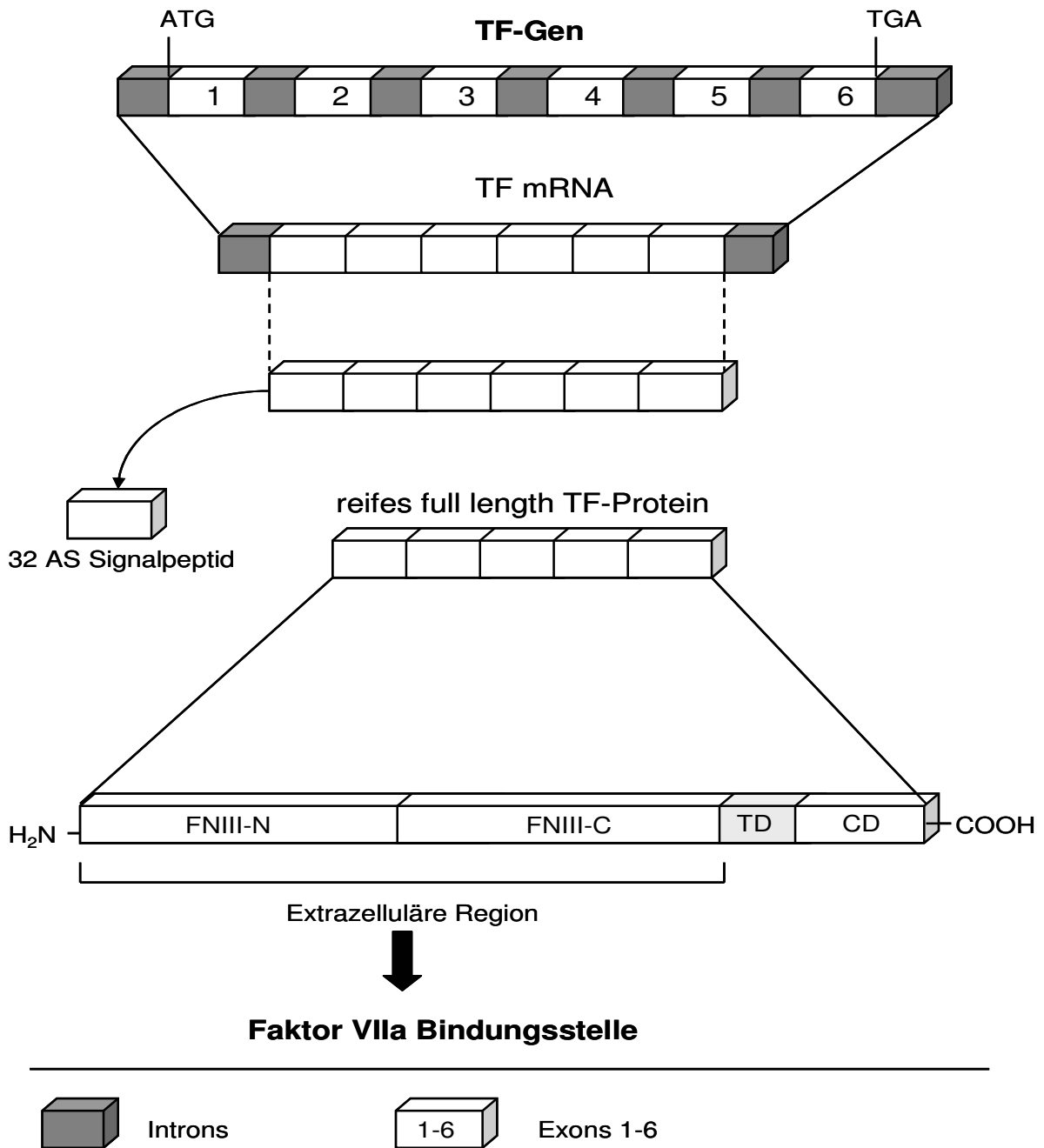
**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der TF-Gen Promotorregion mit ihren verschiedenen Transkriptionsfaktorbindungsstellen. In der Literatur wurde ein „LPS responsive element“ und ein „Serum growth factor responsive element“ beschrieben, über die der Einfluss verschiedener Stimulatoren auf die TF-Genexpression vermittelt wird. Nach Eilertsen und Østerud (12).

Bei der Transkription des TF-Gens entsteht normalerweise eine 2,3 kb große mRNA, die in die „full length“ TF-Form translatiert wird (4;6). Durch alternatives Splicing des primären TF-Transkripts können daneben allerdings verschiedene TF-Isoformen entstehen. So beschrieben Bogdanov et al. kürzlich eine lösliche TF-Isoform, asHTF (alternative spliced human Tissue Faktor), in deren mRNA das Exon 5 fehlt (14). Des Weiteren konnten in Tumorzellen verschiedene alternative Splicevarianten des TF-Primärtranskripts nachgewiesen werden (15).

### **1.3. Die Tissue Faktor Proteinstruktur**

Das reife „full length“ TF-Protein besteht nach Abspaltung eines 32 Aminosäuren (AS) großen Signalpeptides aus 263 Aminosäuren und weist eine Größe von 47 kDa auf. Aufgrund seines Vorkommens als Transmembranprotein kann man einen hydrophilen extrazellulären Anteil aus 219 AS, einen lipophilen transmembranären Teil aus 23 AS sowie einen kurzen intrazellulären Anteil aus 21 AS unterscheiden (16) (Abbildung 2). TF wird aufgrund seiner strukturellen Übereinstimmung mit dem Interferon- $\gamma$  Rezeptor in die Familie der humanen Zytokinrezeptoren der Klasse 2 eingeordnet. (17;18). Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei Fibronectin Typ III Modulen, die in einem Winkel von 120° zueinander stehen und die Bindungsstelle für Faktor VII und VIIa enthalten (19). Der extrazelluläre Teil des TF-Proteins ist daher essentiell für die Bildung des TF-Faktor/VIIa-Komplexes. Der transmembranäre Anteil bewirkt durch seine Verankerung in der Zellmembran die Interaktion von TF mit Phospholipiden, die für die volle Aktivität des TF/VIIa-Komplex benötigt werden (20). Die genau Rolle der zytoplasmatischen Domäne des TF-Proteins konnte bisher noch nicht geklärt werden. Es zeigte sich, dass sie unter anderem bei der Kalzium vermittelten Aktivierung von Monozyten nach Bildung des TF/VIIa Komplexes von Bedeutung ist (21). Andererseits entwickelten sich „knock out“ Mäuse, die keine zytoplasmatische Domäne im TF-Protein besitzen, phänotypisch normal (22;23). Fest steht, dass TF nicht nur als Initiator der Hämostase im Organismus dient, sondern weitreichendere Aufgaben als Rezeptorprotein besitzt und nach Ligandenbindung verschiedene Signaltransduktionswege beeinflussen kann (24;25).





**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der TF-Gen-, m-RNA- und Proteinstruktur. Die weißen Boxen repräsentieren die Exons, die in verschiedene Proteinabschnitte translatiert werden. FN III (Fibronectin Typ III Modul), TD (transmembranäre Domäne), CD (zytoplasmatische Domäne). Modifiziert nach Eilertsen und Østerud (12).

Neben der humanen „full length“ TF-Form ist derzeit eine weitere Isoform von TF bekannt, die durch alternatives Splicing des Primärtransskriptes entsteht (14;26). AsHTF besteht aus lediglich 206 Aminosäuren, wobei die AS 1-166 der extrazellulären Domäne der „full length“ TF-Form entsprechen. Die AS 167-206 bilden das C-terminale Ende des Proteins. Die TF-Isoform besitzt keinen transmembranären Anteil und liegt deshalb im Organismus im Gegensatz zum „full length“ TF Protein nicht als zelluläres Transmembranprotein, sondern als freie lösliche Form im Plasma vor. Welche Eigenschaften bzw. physiologischen Funktionen diese lösliche TF-Variante aufweist, ist derzeit noch unklar.

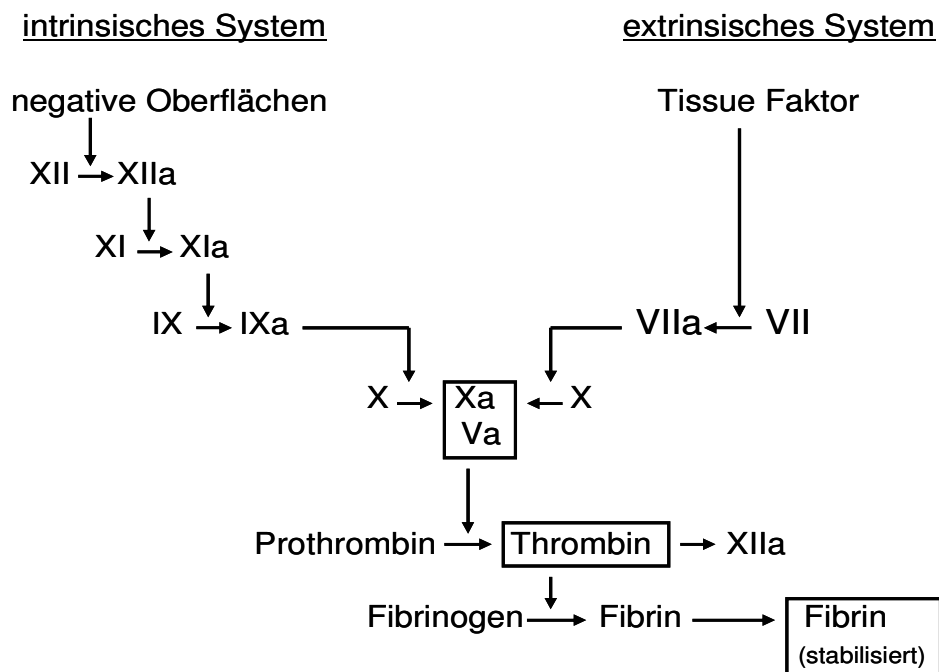
#### **1.4. Die Lokalisation von Tissue Faktor im Organismus**

Mit der Entwicklung monoklonaler gegen Tissue Faktor gerichteter Antikörper Ende der 80er Jahre wurde es erstmals möglich, das Protein immunhistochemisch in den verschiedenen Organen nachzuweisen. Man fand eine hohe Expression von Tissue Faktor in den Endothelzellen der Darmmukosa, aber auch in Fibroblasten sowie glatten Muskelzellen in den Organkapseln und der Adventitia der Gefäße. Drake et al. entwickelten auf der Grundlage dieser Entdeckungen die Theorie, dass Tissue Faktor im Gewebe eine Art „Schutzumschlag“ bildet (27). Nach Verletzung der Gefäßwand kommt es zur Freisetzung von extravaskulärem Tissue Faktor aus dem umliegenden Gewebe, der wiederum die Blutgerinnung initiiert und den Organismus somit effektiv vor Blutverlust schützt. Es zeigte sich jedoch, dass neben extravaskulär auch intravaskulär lokalisierter Tissue Faktor im Organismus existiert. Somit scheint zur Einleitung der Gerinnung nicht zwangsläufig eine Schädigung der Gefäßwand notwendig zu sein. So wiesen Giesen et al. in ihren Experimenten nach, dass auch das Blut gesunder Probanden funktionell aktiven TF enthält und somit in der Lage ist, ohne Kontakt zum Subendothel und dort lokalisiertem Tissue Faktor die Bildung von Fibringerinseln zu initiieren (28). Als Herkunftsort dieses intravaskulären Tissue Faktors postulierte man im Blut zirkulierende Monozyten, die TF unter bestimmten Umständen exprimieren und in das Plasma sezernieren. In verschiedenen Experimenten, bei denen Monozyten in vitro mit Aktivatoren wie LPS oder TNF- $\alpha$  stimuliert wurden, konnte eine erhöhte zelluläre TF-Expression nachgewiesen werden (29;30). Aber auch nicht aktivierte Monozyten weisen TF auf ihrer Zelloberfläche

auf. Es wird jedoch vermutet, dass dieser monozytär gebundene Tissue Faktor funktionell nicht aktiv ist, d.h. nur eine sehr schwache prokoagulatorische Aktivität besitzt. Er ist somit quasi verschlüsselt (TF-encryption) (31;32). Dies scheint ein Regulationsmechanismus zu sein, um in ungeschädigten Gefäßen unter physiologischen Bedingungen eine intravaskuläre Gerinnungseinleitung zu verhindern. Andererseits zeigte sich, dass Monozyten in der Lage sind, Tissue Faktor nach Stimulation mit Zytokinen wie z.B. TNF- $\alpha$  oder Endotoxinen wie LPS in Form von prokoagulanten Mikropartikeln (MP) zu sezernieren (33-35). Dies spielt bei verschiedenen Erkrankungen eine Rolle, die mit einem erhöhten Risiko thrombembolischer Ereignisse assoziiert sind. (36;37) Neben TF-exprimierenden Monozyten und TF-haltigen Mikropartikeln wurde mit der kürzlich entdeckten löslichen TF-Isoform nun eine neue Quelle von zirkulierendem TF im Blut gefunden. Die genaue Rolle der löslichen Isoform in der Physiologie und Pathophysiologie der Hämostase ist aber bisher nicht geklärt.

### **1.5. Die Regulation der plasmatischen Gerinnung**

Wichtige Grundlagen, auf denen die heutigen Modelle der Regulation der Blutgerinnung basieren, wurden in den 60er Jahren mit der so genannten Wasserfall-Theorie geschaffen (38). Hiernach ist der Vorgang der Gerinnung eine kaskadenartige Reaktion, in der verschiedene Plasmaproteine als Zymogene fungieren, die durch proteolytische Spaltung in Gegenwart von Kalziumionen in aktive Enzyme umgewandelt werden. Sie können dann wiederum selber als Proteasen wirken und somit weitere Faktoren aktivieren. Am Ende steht die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin, das schließlich die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin und damit die Koagelbildung initiiert. Klassischerweise unterscheidet man zwei verschiedene Wege, die Blutgerinnung zu aktivieren, den so genannten intrinsischen Weg als Folge einer Aktivierung des Gerinnungssystems durch Kontakt mit negativ geladene Oberflächen und den so genannten extrinsischen Weg, der durch Tissue Faktor eingeleitet wird. Beide Wege haben in der Aktivierung des Gerinnungsfaktors Faktor X ihre gemeinsame Endstrecke (Abbildung 3).



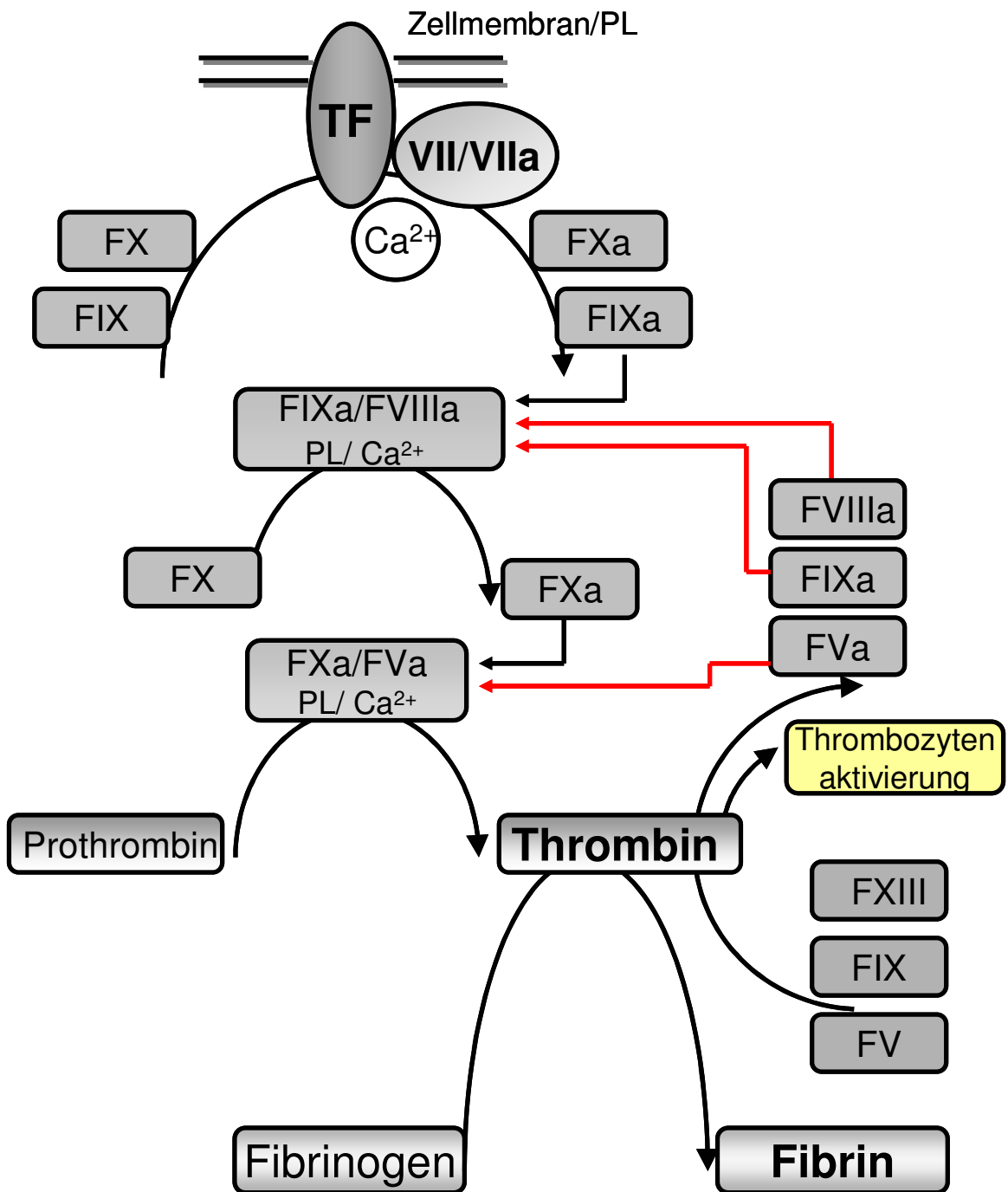
**Abbildung 3:** Klassische Einteilung der Gerinnungskaskade in ein intrinsisches und ein extrinsisches System.

Nach heutigem Kenntnisstand spielt der intrinsische Weg im Sinne einer Oberflächenkontaktaktivierung bei der Initiierung der Gerinnung in vivo jedoch eher eine untergeordnete Rolle. So weisen Patienten mit Faktor XII Mangel, dem Initiatorprotein des intrinsischen Weges, keine gesteigerte Blutungsneigungen auf (39). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Initiator-Komplex des extrinsischen Systems in der Lage ist, die intrinsische Kaskade zu aktivieren.

Tissue Faktor gilt im neueren Konzept der Regulation der Blutgerinnung als deren primärer Initiator (40). Seine maßgebliche Bedeutung ist auch daran erkennbar, dass beim Menschen keine Defekte bekannt sind, die mit einem Mangel an funktionsfähigen TF einhergehen. In Studien, in denen das TF-Gen bei Mäusen ausgeschaltet wurde, zeigte sich bereits im frühen Embryonalstadium eine hohe Letalität der Tiere (41-43). Als Ursache wurde neben der bedeutsamen Rolle von Tissue Faktor in der Hämostase seine Funktion als Schlüsselprotein in der Embryogenese diskutiert.

Kommt es nach Gefäßverletzung zur Freisetzung von zellulärem Tissue Faktor aus der Gefäßwand, so bindet dieser an Faktor VII (44) oder den bereits aktivierten (a) Faktor VII,

der in geringen Mengen im Blut zirkuliert (45). Faktor VII und VII(a) besitzen nur eine sehr schwache Proteaseaktivität (46). Erst nach Bindung an TF und in der Gegenwart von negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin (PS) steigt die katalytische Aktivität stark an (47-49). Der TF/FVIIa Komplex (extrinsic factor Xase) ist nun in der Lage, die Zymogene Faktor X und Faktor IX zu aktivieren (50). Faktor Xa wiederum kann nun bereits, wenn gleich auch in sehr geringen Mengen Prothrombin zu Thrombin spalten (51). Thrombin spielt als starker Aktivator von Thrombozyten sowie den Gerinnungsfaktoren FV, FVIII und FIX eine maßgebliche Rolle bei der Stabilisierung und Beschleunigung des Gerinnungsprozesses (52). Faktor VIIIa bildet zusammen mit Faktor IXa einen Komplex (intrinsic factor Xase). Dieser vermag FX mit einer weit höheren (ca. 50fachen) Aktivität umzusetzen als der FVIIa/TF-Komplex (53). TF und der FVIIa/TF-Komplex sind als Initiator der Gerinnung anzusehen. Die Hauptmenge an aktiviertem FX entsteht aber durch die hohe katalytischen Aktivität des VIIIa/IXa-Komplexes (54). Dieser fungiert somit als Verstärker in der Gerinnungsreaktion. Geringste Mengen des TF-Proteins sind deshalb bereits im Stande, den Gerinnungsprozess zu initiieren. FXa wiederum bildet mit FVa einen Komplex (Prothrombinase), der nun Prothrombin in mehreren Schritten zu Thrombin konvertiert. Der Prothrombinasekomplex ist dabei weit effektiver als FXa alleine (55). Wie schon beschrieben, ist Thrombin in der Lage, unter anderem die Gerinnungsfaktoren FV, FVIII und FIX zu aktivieren. Es bewirkt somit im System der Hämostase eine rückgekoppelte Verstärkung. Der finale Prozess in der Gerinnungskaskade ist schließlich die Thrombin abhängige Spaltung von löslichem Fibrinogen und die Generierung eines stabilen Fibrinpolymers, wie es für den Defektverschluss und die nachfolgende Wundheilung notwendig ist. (Abbildung 4)



**Abbildung 4:** Vereinfachte Darstellung des modernen Konzepts der plasmatischen Gerinnung. Der TF/VIIIa Komplex aktiviert nicht nur Faktor X sondern greift mit der Aktivierung von Faktor IX auch in das intrinsische System ein. Thrombin bewirkt mit der Aktivierung von Faktor V, VII und IX eine rückgekoppelte Verstärkung der Gerinnung (rote Pfeile), F: Faktor, PL: Phospholipide, TF: Tissue Faktor.

## **1.6. Tissue Faktor und Thrombogenese**

Kommt es durch Verletzung der Gefäßintegrität zum direkten Kontakt mit aktivem Tissue Faktor aus der Gefäßwand und zirkulierendem Blut, führt dies zur Aktivierung der Koagulationskaskade und somit zur Fibrinbildung, Thrombozytenaktivierung und letztlich zur Thrombenbildung. In nekrotischen Arealen atheromatöser Plaques fand man hohe Konzentrationen des Tissue Faktor Proteins mit hoher enzymatischer Aktivität. (56-58). Als Quelle postulierte man unter anderem Tissue Faktor-haltige Mikropartikel monozytären Ursprungs (59). Die Vorstellung, dass Thrombosen durch vaskuläre Verletzungen und damit verbundene Freilegung von Tissue Faktor ausgelöst werden können, ist in den letzten Jahren durch die Erkenntnis ergänzt worden, dass auch im Blut zirkulierender Tissue Faktor thrombogen wirken kann (28;60). Darüber hinaus ließ sich bei Patienten, die unter verschiedenen mit thrombozytären Komplikationen assoziierten Syndromen wie Sepsis, akutem Myokardinfarkt, Antiphospholipidantikörper-Syndrom oder Sichelzellanämie litten, erhöhte Mengen an intravaskulären TF nachweisen (61-64). Mit der Entdeckung der löslichen nicht zellgebundenen TF-Isoform (asHTF) ist kürzlich ein neues Element in das Konzept der Tissue Faktor abhängigen Thrombogenese eingeführt worden. AsHTF besitzt aber kaum prokoagulatorische Aktivität. In Zellkulturversuchen zeigte sich, dass die lösliche TF-Isoform in den Kulturüberstand sezerniert wird (65). Über seine Rolle in der Thrombogenese sei es als Aktivator oder gar Inhibitor wird derzeit noch intensiv diskutiert (66).

## **1.7. Die ionisierende Bestrahlung als thrombogener Stimulus**

Ionisierende Strahlung wird seit über 100 Jahren zu therapeutischen Zwecken in der Medizin genutzt. Gegenwärtig gehört die Strahlentherapie bei der Behandlung von Tumorerkrankungen nach wie vor zu den Grundpfeilern eines modernen Therapiekonzeptes. Auch in der Kardiologie wird ionisierende Bestrahlung in Form der Brachytherapie zur Behandlung von In-Stent Restenosen nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) angewandt. Der therapeutische Einsatz von ionisierender Bestrahlung ist jedoch mit einem erhöhten Risiko thromboembolischer Ereignisse assoziiert. In verschiedenen Studien, in denen Patienten nach erfolgter Radiotherapie bei Morbus

Hodgkin untersucht wurden, konnte ionisierende Bestrahlung als zusätzlicher Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert werden (67-69). Komplikationen wie Apoplex, Carotisstenosen oder koronare Herzkrankheit traten Jahre bis Jahrzehnte nach Beendigung der Behandlung vermehrt auf. Auch nach intrakoronarer Brachytherapie zeigten sich thrombembolische Komplikationen. Ca. 10-20 % der behandelten Patienten entwickeln so genannte späte Thrombosen (> 30 Tage nach Behandlung) im bestrahlten Koronargefäß (70). Als mögliche Ursache wurde eine erhöhte Tissue Faktor Expression nach intrakoronarer Brachytherapie vermutet (71). Eine Erhöhung der Tissue Faktor Expression auf zellulärer Ebene in vitro nach ionisierender Bestrahlung konnte bereits in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden. So zeigte sich ein Anstieg der enzymatischen Aktivität des TF-Proteins an der Oberfläche kultivierter Endothelzellen nach ionisierender Bestrahlung (72). Sreekumar et al. lieferten in ihrer Arbeit Hinweise auf eine erhöhten Expression von Tissue Faktor in humanen Kolonkarzinomzellen unter Radiotherapie (73).



## 2. Die Zielsetzung der Doktorarbeit

Ionisierende Bestrahlung ist mit einem erhöhten Risiko thrombembolischer Komplikationen assoziiert. Tissue Faktor spielt als primärer Initiator der Gerinnung eine maßgebliche Rolle in der Thrombogenese. Im Blut wurden humane Monozyten als Quelle von zirkulierendem thrombogenen Tissue Faktor identifiziert. Nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen steigt deren Tissue Faktor Expression stark an.

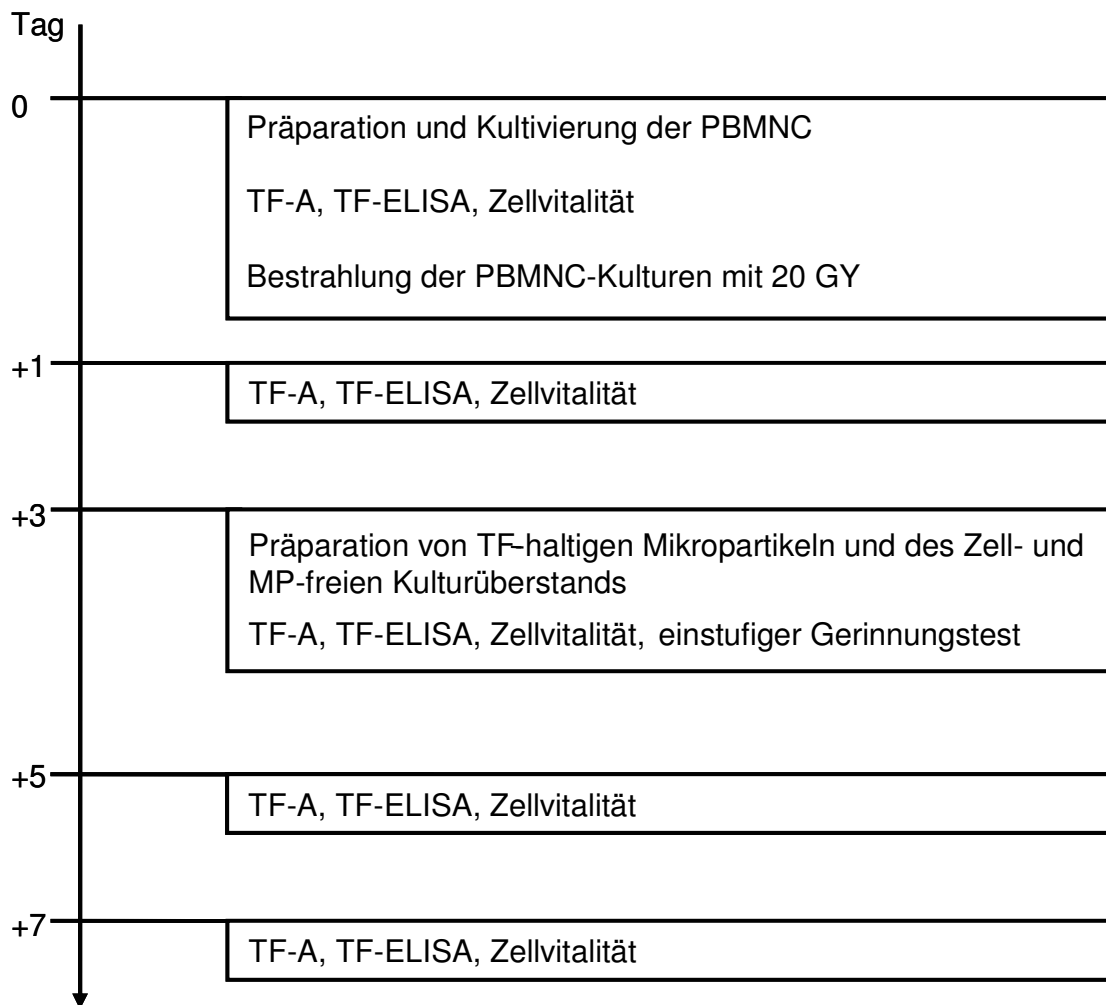
In dieser Arbeit soll untersucht werden, welchen Einfluss eine ionisierende Bestrahlung auf die Tissue Faktor Expression der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMNC) hat. Unter Berücksichtigung des derzeitigen Forschungsstands bezüglich der Rolle von TF in der Thrombogenese ergeben sich dabei folgende Fragen:

1. Verändert ionisierende Bestrahlung die TF-Proteinexpression und die enzymatische Aktivität des TF-Proteins kultivierter peripherer mononukleärer Blutzellen?
2. Beeinflusst ionisierende Strahlung die Aktivität von Mikropartikel-assoziiertem TF und die Thrombogenität des Überstandes kultivierter peripherer mononukleärer Blutzellen?
3. In wie weit sind kultivierte und bestrahlte PBMNC, sezernierte Mikropartikel sowie Zell- und MP-freier Kulturüberstand in der Lage, die plasmatische Gerinnung zu initiieren?

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Der Aufbau der experimentellen Studie**

Ziel der Studie war die Untersuchung der Auswirkung von ionisierender Bestrahlung auf die TF-Expression in kultivierten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMNC). Hierzu wurde Blut von gesunden Probanden entnommen, PBMNC isoliert und kultiviert (Tag 0). Danach erfolgte die Bestrahlung der kultivierten Zellen. Die zellulär exprimierte Tissue Faktor-Proteinmenge sowie die funktionelle enzymatische Aktivität von zellulär-assoziiertem TF wurde jeweils vor Bestrahlung sowie an Tag 1, 3, 5 und 7 nach Bestrahlung untersucht. An Tag 3 erfolgte zusätzlich die Bestimmung der funktionellen enzymatischen Aktivität von Mikropartikel-assoziiertem TF sowie Zell- und Mikropartikel-freien Kulturüberstand, der die lösliche TF-Form enthält. Außerdem wurde ein einstufiger Gerinnungstest durchgeführt, in dem die Gerinnung von Plasma unter dem Einfluss von kultivierten PBMNC, Mikropartikeln oder der löslichen TF-Form im Überstand untersucht wurde (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Aufbau der experimentellen Studie. TF-A: Bestimmung der funktionellen enzymatischen Aktivität von TF, TF-ELISA: Bestimmung der TF-Proteinmenge, Zellvitalität: Bestimmung der Zellvitalität durch Tryptan Blau Färbung.

### 3.2. Die Zusammensetzung der Probandengruppe

Als Blutspender wurden klinisch gesunde weibliche und männliche Nichtraucher im Alter von 21 bis 40 Jahren ausgesucht. Es wurde darauf geachtet, dass die Probanden mindestens 10 Tage zuvor keine die Blutgerinnung beeinflussenden Medikamente eingenommen hatten. Die Blutentnahme erfolgte am sitzenden Probanden aus der vena mediana cubiti. Vor der Punktion wurde die Haut über der Armvene 30 Sekunden mit 98 %

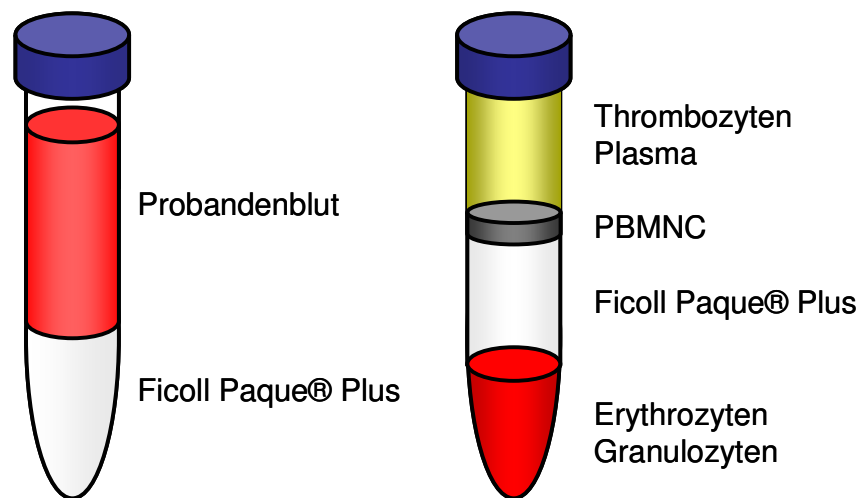
Ethanol desinfiziert. Danach erfolgte die Blutentnahme für die Präparation der peripheren mononukleären Blutzellen bei gestauter Vene mit einer Butterflykanüle in ein 3 ml fassendes mit Kalium Ethylendiamintetracetat (K2 EDTA) beschichtetes Vacutainer® Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland). Zur Isolation von Plasma wurde Blut in ein Natriumcitrat enthaltendes 4,5 ml Vacutainer® Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) abgenommen.

### **3.3. Die Zellkulturexperimente**

#### **3.3.1. Die Präparation von peripheren mononukleären Blutzellen**

Sofort nach der Blutentnahme wurden das mit EDTA versetzte Blut in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen abpipettiert und mit 1x Phosphat gepufferten Salz-Puffer (PBS) ph 7,4 ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (PAA, Pasching, Österreich) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Die Trennung der einzelnen Blutzellen erfolgte mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation unter der Verwendung von Ficoll Paque® Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Dazu überschichtete man vorsichtig je 7 ml Ficoll mit 7 ml Zellsuspension und zentrifugierte anschließend für 25 Min mit  $610 \times g$  bei Raumtemperatur.

Durch die Zentrifugation werden die Blutzellen nach Dichte aufgetrennt. Man erhält eine Separation der verschiedenen Blutzellen in einzelne Phasen. In der untersten Phase befinden sich Erythrozyten und Granulozyten, in der mittleren Phase das Ficoll-Medium, dann die peripheren mononukleären Blutzellen wie z.B. B- und T-Lymphozyten, Monozyten und wenige mononukleäre Vorläuferzellen als schmaler weißer Film, darüber als oberste Phase Plasma und Thrombozyten (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** PBMNC-Isolierung mit Hilfe von Ficoll Paque® Plus. Nach Dichtegradientenzentrifugation bilden sich mehrere Phasen. PBMNC stellen sich als schmaler weißer Film dar und lassen sich nun einfach abpipettieren.

Die oberste Phase wurde nun abpipettiert und verworfen, der Leukozytenfilm vorsichtig mit Hilfe einer sterilen Pasteur Transferpipette aufgenommen, in ein 15 ml Röhrchen transferiert und mit 12 ml 1x PBS-Puffer resuspendiert, anschließend für 10 Min bei 610 x g zentrifugiert. Den Überstand verwarf man und resuspendierte das bodenständige Zellsediment mit 4 ml 1x PBS-Puffer. Zur Entfernung sämtlicher verbliebener Thrombozyten erfolgte eine weitere Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe eines Sucrosegradienten und Ficoll. Hierzu wurden eine 5%, 10%, 20% und 30 % Sucrose-Lösung hergestellt, indem je nach angestrebter Konzentration Sucrose (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland) mit 1x PBS-Puffer vermischt, auf 50 °C erwärmt, somit in Lösung gebracht und danach steril gefiltert wurde. In einem 15 ml Röhrchen überschichtete man anschließend vorsichtig 4 ml Ficoll, je 2 ml 30%, 20%, 10 % und 1 ml 5% Sucrose-Lösung und 4 ml der Zellsuspension. Anschließend erfolgt die Zentrifugation für 15 Min bei 190 x g ohne Bremse. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das am Boden haftende PBMNC Sediment mit 10 ml PBS-Puffer resuspendiert und erneut 10 Min bei 610 x g mit Bremse zentrifugiert. Den Überstand verwarf man und löste die gewonnen PBMNC in 10 ml RPMI 1640 Medium (PAA, Pasching, Österreich), angereichert mit 1 mM L-Glutamin (PAA, Pasching, Österreich), 10 % fetalem Kälberserum Gold (FCS) (PAA, Pasching,

Österreich) und Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml)- Lösung (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland).

### **3.3.2. Die Zellzählung**

Die Konzentration der einzelnen Zellbestandteile wurde mit Hilfe eines automatischen Zellzählgerätes, Micros® 60-OT System (ABX® Diagnostics, Montpellier, Frankreich) bestimmt.

Das Messverfahren des automatischen Zellzählers beruht auf die Änderung des elektrischen Widerstandes beim Durchtritt einer Zelle durch eine Messkapillare. Die zu messende Zellsuspension wird dabei mit elektrolytischer Lösung verdünnt, die Leitfähigkeit der Lösung ist größer als die der Zelle. Bei Durchtritt der Zelle durch die Messkapillare führt die Widerstandsänderung zu einer Veränderung des gemessenen Spannungspotentials. Die Veränderung des Potentials ist proportional zum Zellvolumen. Je nach Größe des Zellvolumen/Spannungspotentials ordnet das Gerät die gemessene Zelle nun entweder als, Erythrozyt, Thrombozyt oder Leukozyt ein. Die Bestimmung der Verteilung der Leukozyten-Untergruppen, Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten wird durch die integrierte Behandlung mit einem Lyse-reagenz möglich. Es bewirkt eine Schrumpfung der Monozyten und eine Lyse der Lymphozyten bis auf die Kernmembran, die Zellgröße der Granulozyten bleibt unverändert. Die verschiedenen Leukozyten-Unterpopulationen lassen sich so volumetrisch voneinander unterscheiden.

### **3.3.3. Die Kultivierung der PBMNC**

Nach Bestimmung der Konzentrationen der einzelnen Zellbestandteile mit Hilfe des automatischen Zellzählgeräts wurden die isolierten peripheren mononukleären Blutzellen mit dem hergestellten RPMI 1640 Medium entsprechend verdünnt, so dass die abschließende Konzentration der Zellsuspension  $10^6$  PBMNC/ml Medium betrug. Die Kultivierung der isolierten Zellen erfolgte nun in 10 ml PET-Zellkulturflaschen (Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden, Deutschland), die vorab zur Unterstützung der Zelladhäsion mit Attachment Faktor (Tebu-Bio GmbH, Offenbach, Deutschland) beschichtet worden waren. Dazu wurde jeweils 5 ml verdünnte Zellsuspension in eine Zellkulturflasche gegeben und

mit 3 ml RPMI 1640 Medium vermischt, so dass das Gesamtvolumen der Kultur 8 ml mit einer Zellkonzentration von 0,625 PBMNC/ml betrug. Die Zellkulturen wurden im Brutschrank einem CO<sub>2</sub>- Inkubator C200 (Labotect GmbH, Göttingen, Deutschland) über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **3.3.4. Die Bestrahlung der PBMNC**

Die Bestrahlung der PBMNC-Kulturen erfolgte unter Verwendung eines Linearbeschleunigers mit einer maximalen Photonenergie von 6 MeV. Die Zellen wurden in einem Wasser-äquivalenten Umfeld mit einer Energiedosis von 20 Gy und einer Photonenfeldgröße von 25 cm x 25 cm bestrahlt. Die Homogenität der Strahlendosis im Bestrahlungsfeld betrug zwischen 100 % und 105 %.

#### **3.3.5. Die weitere Präparation der kultivierten Zellen**

Zur weiteren Untersuchung der kultivierten Zellen war die Ablösung der teiladhärenten PBMNC vom Kulturflaschenboden mit Hilfe des Enzyms Trypsin notwendig. Dazu wurde das Zellmedium abpipetiert und in einem 15 ml Röhrchen gekühlt auf Eis aufbewahrt. Die Kulturflaschen spülte man mit 2 ml 1x PBS-Puffer der anschließend ebenfalls eisgekühlt in dem jeweiligen 15 ml Röhrchen zurückgestellt wurde. Anschließend erfolgte die enzymatische Ablösung der adhären Zellen vom Kulturflaschenboden mit Hilfe von Trypsin-EDTA (PAA, Pasching, Österreich). Dazu wurde jeweils 2 ml 1x konzentriertes Trypsin-EDTA (1:250) (PAA Laboratories, Pasching, A) in die Kulturflasche gegeben und bei 37°C für 3 Minuten inkubiert. Die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden kontrollierte man lichtmikroskopisch. Wenn sich ein Großteil der Zellen abgelöst hatten, wurde die Reaktion mit 2 ml 10 % FCS-haltigen Kulturmedium gestoppt, die Zellen in das jeweilige 15 ml Röhrchen überführt und 10 Min mit 610 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen mit 2 ml 1x PBS-Puffer oder für die TF-Enzymaktivitätsbestimmung mit 1 ml Aktivitätspuffer resuspendiert und die entstandene Zellsuspension zu weiteren Experimenten verwendet.

### **3.3.6. Die Trypanblaufärbung zur Überprüfung der Zellvitalität**

Zur Bestimmung der Zellvitalität erfolgte eine Anfärbung von Zellen mit Hilfe von Trypanblau. Dazu wurden je 80  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 20  $\mu\text{l}$  0,4 Prozentiger Trypanblaulösung (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Auszählung mit Hilfe der „Neubauer improved“ Zählkammer (Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland). Tote Zellen stellen sich nach Typanblau-Färbung blau dar, lebende Zellen nehmen aufgrund ihrer intakten Membran kein Trypanblau auf und sind deshalb nicht blau gefärbt. Die gezählte Zellzahl multipliziert mit dem Faktor 12,5 ergibt aufgrund des Zählkammervolumens von 0,08  $\mu\text{l}$  die Zellkonzentration in [Zellzahl/ $\mu\text{l}$ ]. Nach Bestimmung der Zellkonzentration sowie der Zellvitalität konnte die untersuchte Zellsuspension bei Bedarf mit PBS-Puffer verdünnt und sofort für weitere Experimente verwendet oder bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren für spätere Zwecke gelagert werden.

### **3.3.7. Die Präparation von Mikropartikeln und des MP-freien Überstandes**

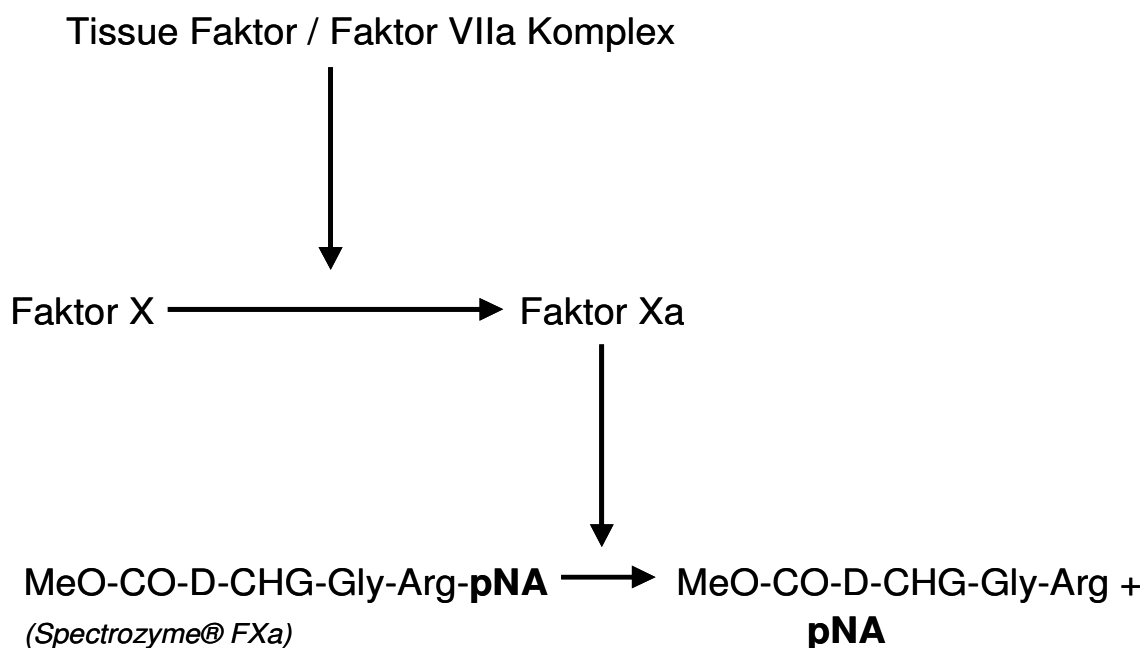
Zur Isolierung von TF-haltigen Mikropartikeln und des MP- und zellfreien Überstands, der die lösliche TF-Form enthält, wurde am Tag 3 nach Bestrahlung je mindestens 2 ml Zellkulturüberstand entnommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei  $610 \times g$  zentrifugiert, um tote Zellen und Zellrückstände zu entfernen. Die verbleibenden Überstände wurden vorsichtig jeweils in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und bei  $17000 \times g$  für mindestens 90 Minuten zentrifugiert. Anschließend pipettierte man den gewonnenen Überstand, welcher die lösliche TF-Form enthält, in ein neues Reaktionsgefäß zur Verwendung für weitere Experimente. Die präparierten Mikropartikel, die sich als feiner weißer Film am Gefäßboden darstellten, wurden der Tissue Faktor-Aktivitätsmessung oder dem einstufigen Gerinnungstest zugeführt.



### 3.4. Die Bestimmung der funktionellen enzymatischen Aktivität von Tissue Faktor

#### 3.4.1. Das Grundprinzip

Zur Bestimmung der enzymatischen bzw. prokoagulatorischen Aktivität von humanem Tissue Faktor wurde ein chromogener Aktivitätstest durchgeführt. Die funktionelle Aktivität von Tissue Faktor in einer Probe kann dabei anhand der TF-induzierten Bildung von Faktor Xa in Gegenwart von Kalziumionen bestimmt werden. TF bildet nach Zugabe von Faktor VIIa einen katalytischen Komplex mit hoher Aktivität, der Faktor X zu Faktor Xa aktiviert. Dieser ist in der Lage, das im Überschuss angebotene Substrat, Spectrozyme® FXa (American Diagnostica GmbH, Pfungstadt, Deutschland) umzusetzen. Bei dieser Reaktion entsteht der gelbe Farbstoff para-Nitroanilin (pNA). Je nach Faktor Xa Konzentration wird in einem bestimmten Zeitraum mehr pNA gebildet bzw. Spectrozyme® FXa mit einer höheren Geschwindigkeit umgesetzt. Die Intensität der Gelbfärbung der Lösung ist also von der FXa Konzentration abhängig (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Spectrozyme® FXa enthält den Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) in gebundener Form. Aktivierter Faktor Xa kann pNA abspalten. Es kommt zu einer Gelbfärbung und Anstieg der Lichtabsorption bei  $\lambda = 405$  nm. Die Größe des Anstieges der Lichtabsorption ist abhängig von der enzymatischen Aktivität von TF bzw. der Faktor Xa Menge.

Die enzymatische Aktivität von Tissue Faktor kann durch die Messung des Anstieges der Lichtabsorption (OD, optische Dichte) von pNA bei 405 nm über einen bestimmten Zeitraum mit Hilfe eines Photometers/ELISA Plattenlesegerätes bestimmt werden. Liegt das Substrat Spectozyme® FX im Überschuss vor, ist dieser Absorptionsanstieg proportional zur FXa Bildung und somit auch zur TF-Enzymaktivität. Die genaue TF-Aktivität der untersuchten Proben kann dann an einer zuvor erstellten Standardkurve abgelesen werden.

### **3.4.2. Verwendung von PBMNC**

Zur Messung der prokoagulatorischen Aktivität der Zellen wurden sie zunächst von den Zellkulturflasche mit Hilfe von Trypsin-EDTA abgelöst, zentrifugiert, mit Trypanblau angefärbt und lichtmikroskopisch gezählt. Anschließend wurden 100.000 vitale Zellen in 170 µl Aktivitätspuffer bestehend aus 10mM Hepes (Sigma-Aldrich, München, D), 1mg/ml 0,1 % Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich, München, D), 5mM CaCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, D) und 100 ml destilliertes Wasser mit einem pH von 7,5 aufgenommen. Dazu gab man 30 µl einer 0,1 molaren n-Octyl-β-D-Glycopyranosid Lösung (β-OG) (Merck, Darmstadt, D) zum Lysieren der Zellen hinzu und inkubierte die Zelllysate für 20 Minuten bei 37 °C. In einer 96 Loch-Mikrotiterplatte wurden nun 100 µl der Zellsuspension zu 50 µl 80 nM Faktor VIIa-Lösung (Novo Nordisk, Mainz, Deutschland) pipettiert und wiederum für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 50 µl 600 nM Faktor X (American Diagnostica GmbH, Pfungstadt, Deutschland). Die Endkonzentration in der Lösung betrug somit für Faktor VIIa 20 nM, für Faktor Xa 150 nM. Es wurde dann über einen Zeitraum von vier Minuten jede Minute 40 µl der Lösung abgenommen und in 100 µl 25 mM EDTA-Lösung bestehend aus, 50 mM N-Bicin (2-hydroxyethyl-glycin Bicine) (Sigma-Aldrich, München, D), 100 mM NaCl (Serva, Heidelberg, D), 25 mM EDTA (Sigma-Aldrich, München, D), 0,1 % BSA (Sigma-Aldrich, München, D) und 500 ml zweifach destilliertem Wasser mit einem pH von 8,5, pipettiert. Hierdurch kam die Bildung von Faktor Xa durch den Kalzium Entzug zum Stillstand. Der Anstieg der optischen Dichte wurde nun nach Zugabe von Spectrozyme® FXa mit einer Endkonzentration von 0,5 mM 30 min lang in einem ELISA-Lesegerät photometrisch bei 37 °C bestimmt. Zur

Umrechnung des Anstieges der optischen Dichte (slope OD) in TF-A Units, was ein Maß für die Umsetzung von Faktor X zu Xa durch den TF/Faktor VIIa Komplex darstellt, wurde eine vorher erstellte Standardkurve benutzt. Hierzu erstellte man unter Verwendung von lipidierten, rekombinanten Tissue Faktor (American Diagnostic GmbH, Pfungstadt, Deutschland) eine Standardprobenreihe mit 0, 6,25, 12,5, 25, 50, und 100 pg/µl TF-Protein. Durch Messung des Anstieges der optischen Dichte der jeweiligen Standardproben konnte nun eine Standardkurve erstellt werden, wobei die Aktivität von einem Pikogramm lipidiertem, rekombinanten Tissue Faktor als eine TF-A Unit definiert wurde.

### **3.4.3. Verwendung von Mikropartikeln und Zellkulturüberstand**

Mikropartikel und TF-Isoform-haltiger Überstand wurden wie in Abschnitt 3.3.7. beschrieben isoliert, die isolierten Mikropartikel mit je 30 µl β-OG sowie 170 µl TF-Aktivitätspuffer in eine 96-Lochplatte aufgenommen.

Je 170 µl des isolierten Mikropartikel- und zellfreien Überstands vermischte man nun mit jeweils:

1. 30 µl Phospholipidvesikeln (10 µM Phosphatidylcholin:Phosphatidylserin, 80:20) und 30 µl Aktivitätspuffer oder
2. 60 µl Aktivitätspuffer in der 96-Lochplatte.

Nach 20 minütiger Inkubation der Platte bei 37°C im Brutschrank erfolgten die nachfolgenden Schritte der Aktivitätsmessung wie in Abschnitt 3.4.2. beschrieben. Es wurde jedoch über einen Zeitraum von 10 Minuten alle 2½ Minuten 40 µl der Lösung abgenommen und in 100 µl EDTA pipettiert, wodurch eine weitere Faktor X Aktivierung verhindert wurde. Des Weiteren erfolgte die Bestimmung des Anstieges der optischen Dichte mit Hilfe des Elisaplatenlesegeräts über einen Zeitraum von 45 Minuten.

### **3.5. Die „full length“ TF-Protein Konzentrationsbestimmung**

Um die genaue Konzentration von „full length“ TF-Protein in Zelllysaten zu bestimmen, wurde ein IMUBIND® Tissue Faktor ELISA Kit (American Diagnostic GmbH, Pfungstadt,

Deutschland) verwendet. Dieses enthält eine 96-Lochplatte, die am Boden mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanen Tissue Faktor beschichtet ist. Die zur Messung verwendeten Monozyten werden durch mehrfache Gefrier- und Tauzyklen lysiert und das Lysat in die Platte gegeben. Nach Inkubation kommt es zur Bindung von humanem TF am Boden der Platte. Anschließend erfolgt die Zugabe eines zweiten spezifisch gegen TF gerichteten Detektionsantikörpers, welcher nach Hinzufügen eines Enzym-Konjugats einen Antikörper-Enzymkomplex bildet.

Überschüssige ungebundene Antikörper werden durch mehrfaches Waschen der Platte entfernt. Nach Zugabe des Substrates Tetra-Methylbenzidin kommt es nun zu dessen Peroxidase abhängiger Spaltung. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,5 molarer Schwefelsäure gestoppt. Dies führt zu einer Gelbfärbung der Lösung, die nun mit dem Photometer bei 450 nm gemessen werden kann. Die Intensität der Farbe ist dabei der Konzentration des entstandenen Produkts und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden TF-Antigens in der Probe proportional. Anhand einer Standardkurve, die für jeden Versuch für den Bereich von 0 pg/ml bis 1000 pg/ml erstellt wird, kann dann der genaue Proteingehalt in den Zellysaten bestimmt werden. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 10 pg/ml TF-Protein.

### **3.6. Der einstufiger Gerinnungstest**

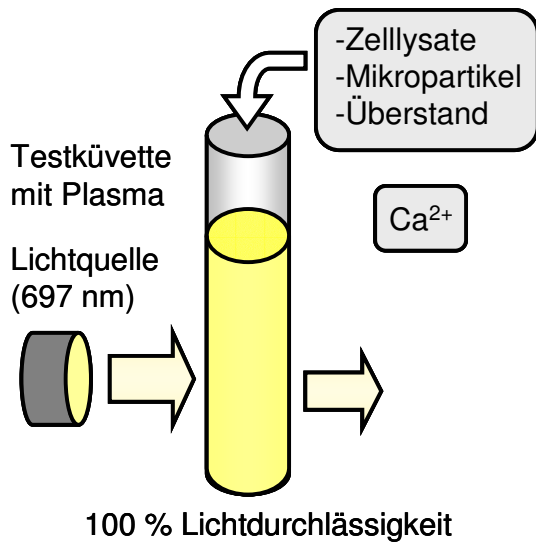
#### **3.6.1. Das Grundprinzip**

Zur Messung der Geschwindigkeit und Intensität der Gerinnung von humanem Plasma nach Durchmischung mit TF-haltigen Zellen, Mikropartikeln oder TF-Isoform im Überstand und nach Hinzugeben von Kalziumionen wurde ein einstufiger Gerinnungstest mit Hilfe eines vier Kanal Aggregometer PAP4 (möLAB, Langenfeld, D) durchgeführt.

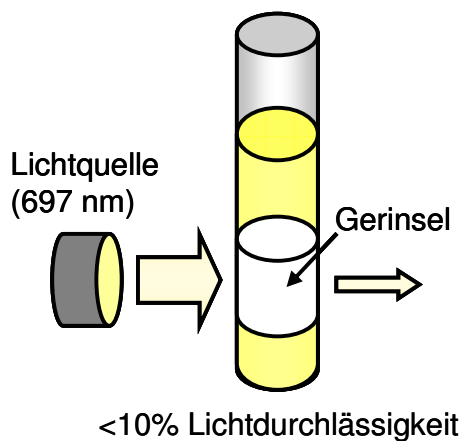
Die Messtechnik des PAP 4 Aggregometers beruht auf dem Prinzip der Turbidimetrie nach Born. Nach Einleitung des TF-vermittelten Gerinnungsprozesses durch Zugabe von Kalziumionen zu den Plasmaproben wird die Abnahme der Lichttransmission über einen Zeitraum von 20 Minuten bestimmt (Abbildung 8c).

Als 100 Prozent lichtdurchlässig wurden dabei die Plasmaproben vor der Kalziumionen Zugabe gewertet (Abbildung 8a). Als Null Prozent lichtdurchlässig wurde eine mit TF-

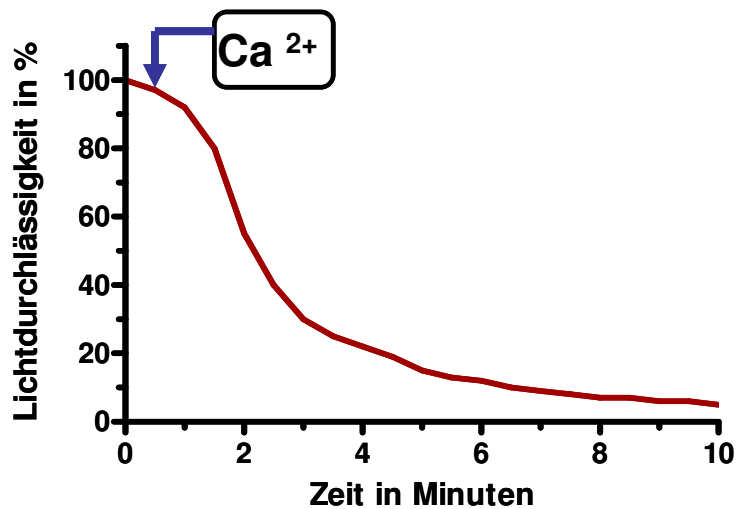
haltigen Zelllysate und Kalzium behandelte Plasmaprobe definiert, in der sich nach abgeschlossenem Gerinnungsprozess ein Gerinnsel aus Fibrin gebildet hatte, das die Lichtdurchlässigkeit der Probe stark reduzierte (Abbildung 8b).



**Abbildung 8a:** Schematische Darstellung des Messprinzips des PAP 4 Aggregometers. Das Gerät sendet einen Lichtstrahl aus. Nach Durchstrahlung der Testküvette wird die Intensität des ausfallenden Lichtstrahls und damit die Lichtdurchlässigkeit bzw. die Transmission der Probe gemessen. Durch Zugabe von TF- haltigen Probenmaterial und Kalziumionen kommt es zum Start der Gerinnungsreaktion.



**Abbildung 8b:** Durch Einleitung des Gerinnungsprozess bildet sich in einem Zeitraum von ca. 10 Minuten ein Thrombus. Es kommt zur Abnahme der Lichtdurchlässigkeit, die vom Aggregometer registriert und aufgezeichnet wird.



**Abbildung 8c:** Nach Zugabe von 1 molarer Kalziumchlorid Lösung zur Plasmaprobe kommt es zum Start der Gerinnungsreaktion. Dabei bildet sich allmählich ein Thrombus, der zur Abnahme der Lichtdurchlässigkeit der Probe führt.

### 3.6.2. Verwendung von PBMNC, Mikropartikeln und Kulturüberstand

Plasma wurde durch Zentrifugation von mindestens 4,5 ml mit Natriumcitrat antikoaguliertem Blut bei 3100 x g für 15 Minuten gewonnen. Das Plasma wurde von mehreren Probanden isoliert, in einen 15 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und auf Eis gestellt. Die bei -80°C tiefgefrorenen Zellproben mit jeweils  $2 \times 10^5$  PBMNC gelöst in 100 µl 1x PBS-Puffer taute man bei Raumtemperatur für fünf Minuten auf und fror sie dann wiederum für drei Minuten ein. Insgesamt wurden drei Gefrier- und Tauzyklen vollzogen, um ein Lysieren der Zellen zu gewährleisten. Aus je 4 ml Zellkulturüberstand isolierte Mikropartikel wurden in 100 µl PBS-Puffer resuspendiert und wie der gewonnene Zell- und Mikropartikelfreie Überstand, der die lösliche TF-Form enthält, auf Eis gestellt. Zur Vorbereitung der Messproben pipettierte man nun je 150 µl Plasma in 4 Glasküvetten und inkubierte diese für 5 Minuten bei 37 °C. Hinzu wurden anschließend jeweils 100 µl Zelllysat, 100 µl der gelösten Mikropartikel oder 100 µl Zellüberstand, der zuvor 20 Minuten 30 µl Phospholipidvesikeln bei 37°C ausgesetzt worden war, hinzugegeben. Die Proben wurden in die auf 37° C vorgewärmten Messplätze des Aggregometers gegeben und die Gerinnungsreaktion nach Zugabe von 10 µl einer 1 molaren Kalziumchlorid Lösung

gestartet. Die Bestimmung der Abnahme der Lichttransmission der Probe erfolgte nun mit dem Aggregometer über einen Zeitraum von 20 Minuten. Um sicher zu gehen, dass die Gerinnungsreaktion ausschließlich durch die Gegenwart von PBMNC, Mikropartikeln oder der löslichen TF-Form beeinflusst wurde, erfolgte zusätzlich als Negativkontrolle die Bestimmung der Transmissionsabnahme von Plasma nach Calcium Zugabe, das lediglich mit PBS-Puffer behandelt worden war. Mit Hilfe eines angeschlossenen Computers konnten die Versuchsergebnisse grafisch dargestellt und gespeichert werden.

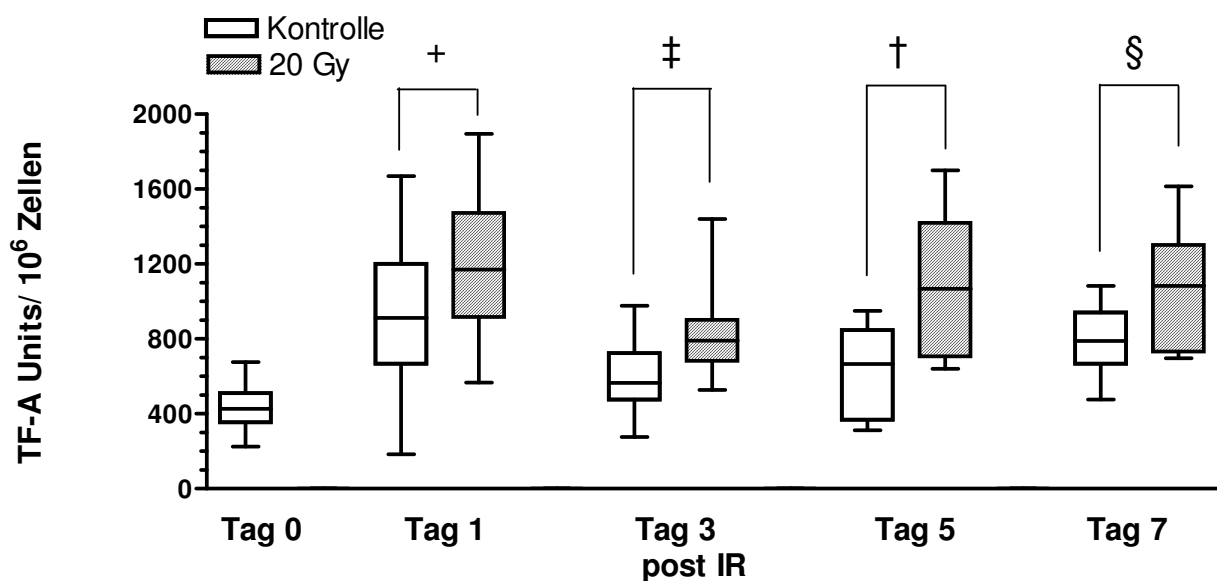
### **3.7. Die Statistik**

Die Statistische Auswertung der Ergebnisdaten wurde mit dem Programm „GraphPad Prism 4 für Windows“ durchgeführt. Da die Fallzahl  $n$  in der experimentellen Studie kleiner 20 war, wurde von einer Nicht-Normalverteilung der Daten ausgegangen. Die Meßwerte sind als Median und als 25-, 75-Perzentile dargestellt. Zum Vergleich der Messwerte zweier Gruppen wurde der zweiseitige Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest verwendet. P-Werte  $< 0,05$  galten als signifikant.

## 4. Ergebnisse der experimentellen Studie.

### 4.1. Die Auswirkungen der ionisierenden Bestrahlung auf die TF-Aktivität

Die Auswirkung der ionisierenden Bestrahlung auf die enzymatische bzw. prokoagulatorische Aktivität von zellulär exprimiertem TF wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen nach Bestrahlung von PBMNC-Kulturen mit 20 Gy untersucht. Zur Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität von TF wurde ein chromogener Aktivitätstest durchgeführt. Ionisierende Bestrahlung bewirkt einen Anstieg der funktionellen enzymatischen Aktivität von Tissue Faktor und steigert somit den prokoagulatorischen Effekt von kultivierten PBMNC.



**Abbildung 9:** Die funktionelle enzymatische Aktivität von PBMNC-exprimierten Tissue Faktor an Tag 0 vor und Tag 1, 3, 5 und 7 nach ionisierender Bestrahlung. Es ließ sich eine signifikante Erhöhung der TF-Aktivität bei bestrahlten PBMNC im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle nachweisen. +  $p=0,0068$  ‡  $p=0,0010$ , †  $p=0,0020$ , §  $p=0,0117$ , ( $n=9-12$ )

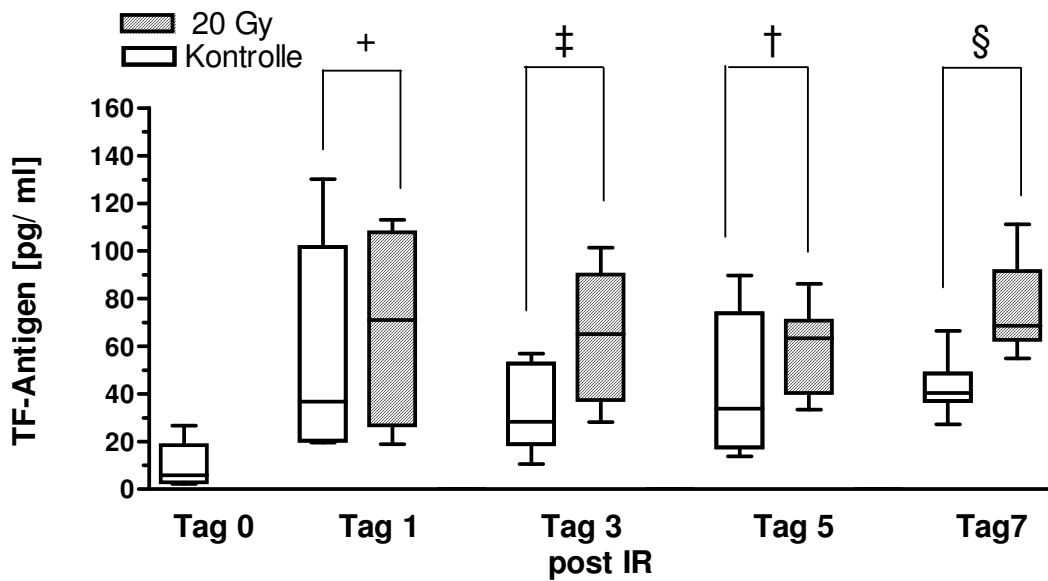
Bereits einen Tag nach ionisierender Bestrahlung zeigte sich eine Zunahme der TF-Aktivität im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ( $K_1=913,0$  (666,0-1201,0) U,  $20_1=$



1171,0, (915,0-1472) U, K vs. 20 Gy,  $p= 0,0068$ ). Im Vergleich zum Ausgangswert am Tag 0 (siehe Studienaufbau), der nach Zellpräparation bestimmt worden war ( $K_0 = 427,0$  (354,0-510,0) U), konnte eine Zunahme der TF-Aktivität nachgewiesen werden. Die signifikant gesteigerte enzymatische Aktivität des TF-Proteins der bestrahlten PBMNC gegenüber den unbestrahlten Kontrollen konnte auch an Tag 3 ( $K_3= 566,5$  (475,0-724,5) U,  $20_3= 791,5$  (683,0-902,5) U, K vs. 20 Gy,  $p=0,0010$ ), Tag 5 ( $K_5= 666,0$  (368,0- 847,5) U,  $20_5= 1068$  (706,5-1422) U, K vs. 20 Gy,  $p=0,0020$ ) und Tag 7 ( $K_7= 789,0$  (665,5-941,5) U,  $20_7= 1084$  (731,5-1302) U, K vs. 20 Gy,  $p=0,0117$ ) nach ionisierender Bestrahlung nachgewiesen werden. (Abbildung 9).

#### **4.2. Der Einfluss der ionisierenden Bestrahlung auf die zelluläre TF-Proteinkonzentration**

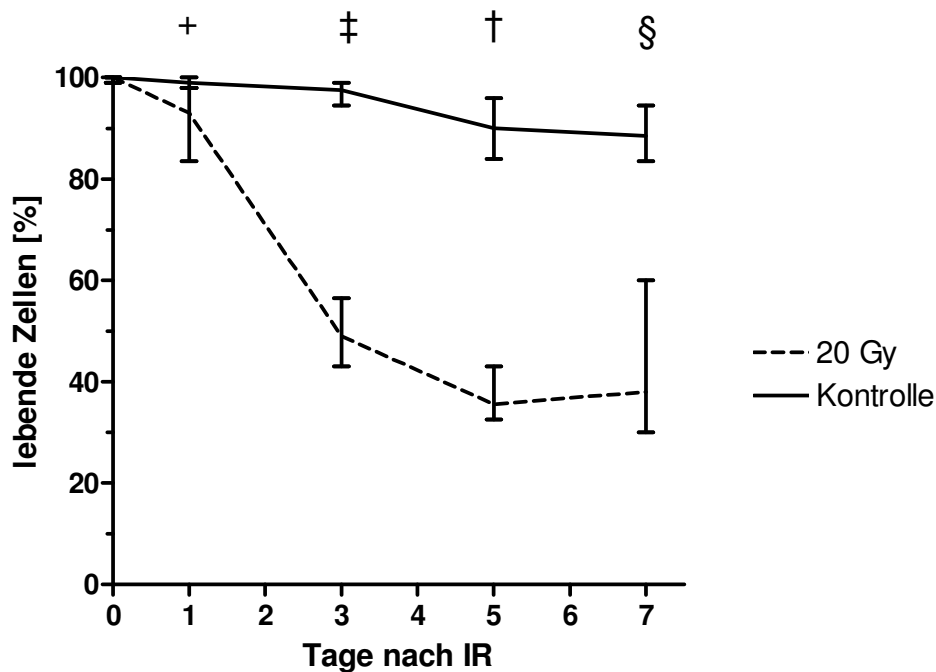
Die Bestimmung der zellulären TF-Proteinkonzentration von unbestrahlten und bestrahlten kultivierten PBMNC erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen nach ionisierender Bestrahlung unter Verwendung eines TF-ELISA Tests. Es zeigte sich, dass ionisierende Bestrahlung die TF-Protein Konzentration in kultivierten PBMNC steigert. Am Tag 0 direkt nach Zellpräparation wurden nur sehr geringe zelluläre TF-Proteinkonzentrationen gefunden ( $K_0 = 5,847$  (2,75-18,5) pg/ml). Bereits am Tag 1 nach Bestrahlung stieg die gemessene zellulär assoziierte TF-Proteinmenge in den kultivierten PBMNC an. Es ergaben sich aber noch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Proteinmenge der bestrahlten und nicht bestrahlten PBMNC ( $K_1= 36,8$  (20,3-102,0) pg/ml,  $20_1= 71,0$  (26,7-108,0) pg/ml, K vs. 20 Gy,  $p= 0,2188$ ). Eine signifikant gesteigerte TF-Proteinexpression der PBMNC zeigte sich ab Tag 3 ( $K_3= 28,2$  (18,8-52,8) pg/ml,  $20_3= 65,0$  (37,3- 90,1) pg/ml, K vs. 20 Gy,  $p= 0,0039$ ) und ließ sich auch an Tag 5 ( $K_5= 27,9$  (17,4- 57,4) pg/ml,  $20_5= 57,9$  (40,4- 67,1) pg/ml, K vs. 20 Gy,  $p= 0,0391$ ) sowie an Tag 7 ( $K_7= 40,4$  (36,9- 48,6) pg/ml,  $20_7= 68,6$  (62,6- 91,6) pg/ml, K vs. 20 Gy,  $p= 0,0078$ ) nach ionisierender Bestrahlung nachweisen (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Die TF-Proteinexpression der PBMNC vor sowie 1, 3, 5, und 7 Tage nach ionisierender Bestrahlung. Ionisierende Bestrahlung führt zu einer signifikanten Erhöhung der TF-Proteinexpression bestrahlter PBMNC im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen. +  $p=0,2188$ , ‡  $p=0,0039$ , †  $p=0,0391$ , §  $p=0,0078$ , (n=6-9)

#### 4.3. Der Einfluss der ionisierenden Bestrahlung auf die Zellvitalität

Die Bestimmung der Zellvitalität der kultivierten PBMNC nach ionisierender Bestrahlung erfolgte durch Tryptanblaufärbung. Ionisierende Bestrahlung bewirkte eine Verminderung der zellulären Vitalität (Abbildung 11).

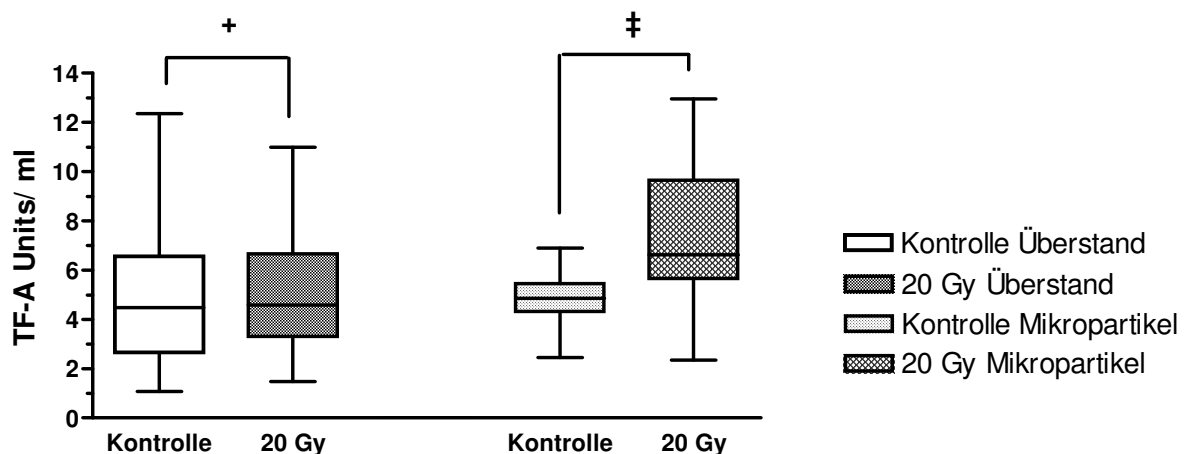


**Abbildung 11:** Zellvitalität bestrahlter und nicht bestrahlter PBMNC-Kulturen nach Präparation vor Bestrahlung und 1, 3, 5 sowie 7 Tage nach Bestrahlung. Ionisierende Bestrahlung bewirkt einen beschleunigten Zelltod. +  $p=0,0156$ , ‡  $p=0,0020$ , †  $p=0,0005$ , §  $p=0,0001$ , ( $n=6-9$ )

Bereits einen Tag nach der Bestrahlung zeigte sich ein Abfall des Anteiles der lebenden Zellen in der bestrahlten PBMNC-Kultur im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollkultur ( $K_1=99,0$  (98,0-100) %,  $20_1=93,0$  (83,5-98,0) %, K vs. 20 Gy,  $p=0,0156$ ) bei einem Ausgangswert an Tag 0 von 100 (99-100) % vitaler Zellen. Im Versuchsverlauf sank der Anteil der lebenden Zellen in der bestrahlten Zellkultur bis auf ca. 40 % am Tag 7 ab. Dem gegenüber fiel der Anteil der vitalen PBMNC in den unbestrahlten Kulturen nur auf etwa 90 %. 1 Tag nach ionisierender Bestrahlung bis zum Ende des Versuchs an Tag 7 stellte sich ein signifikant vermindertes Zellüberleben der bestrahlten PBMNC-Kulturen im Vergleich zu unbestrahlten PBMNC-Kontrollkulturen dar ( $K_3=98,0$  (94,5- 99,0) %,  $20_3=49,0$  (43,0-56,5) %, K vs. 20 Gy,  $p=0,0020$ ), ( $K_5=90,0$  (84,0- 96,0) %,  $20_5=35,5$  (32,5- 43,0) %, K vs. 20 Gy,  $p=0,0005$ ), ( $K_7=88,5$  (83,5- 94,5) %,  $20_7=38,0$  (30,0- 60,0) %, K vs. 20 Gy,  $p=0,0001$ ). Folglich induzierte eine Behandlung mit ionisierender Bestrahlung den Zelltod von kultivierten PBMNC.

#### 4.4. Die Wirkung der ionisierenden Bestrahlung auf die prokoagulatorische Aktivität der Mikropartikel

Zur Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität von Mikropartikel-assoziiertem TF wurde ein chromogener Aktivitätstest durchgeführt. 3 Tage nach ionisierender Bestrahlung ergab sich ein signifikanter Anstieg der enzymatischen Aktivität von Mikropartikel-assoziiertem TF aus bestrahlten PBMNC-Kulturüberstand im Vergleich zu Mikropartikeln aus Kontrollüberstand (K= 4,860 (4,3- 5,5) U, 20 Gy= 6,6 (5,7- 9,7) U, K vs. 20 Gy, ‡ p= 0,0006) (Abbildung 12). Ionisierende Bestrahlung besitzt also einen stimulierenden Einfluss auf die Aktivität von Mikropartikel-assoziiertem TF.



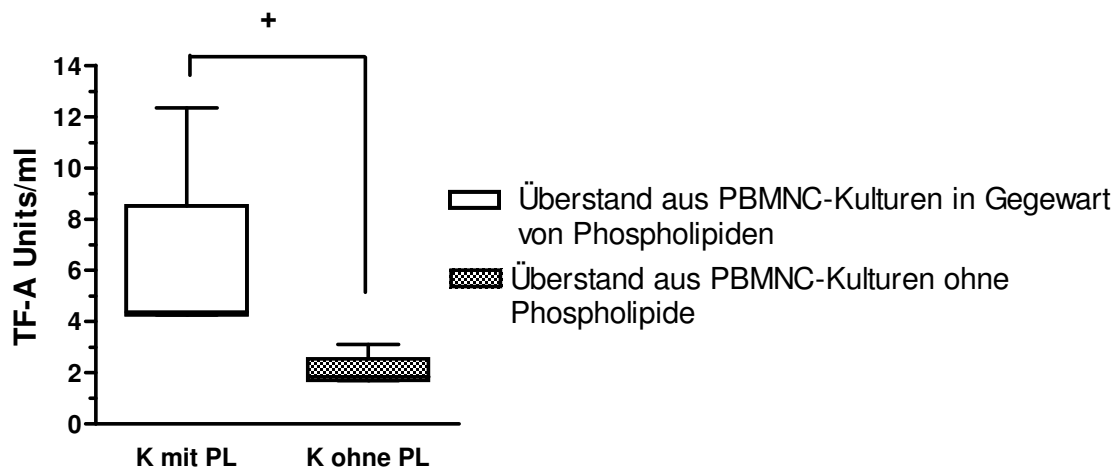
**Abbildung 12:** Ionisierende Bestrahlung bewirkt eine Steigerung der prokoagulatorischen Aktivität von Mikropartikeln aus PBMNC-Kulturüberstand an Tag 3. Eine Beeinflussung der Aktivität des MP- und Zellfreien Überstandes konnte nicht nachgewiesen werden. + p=0,4611, ‡ p= 0,0006, (n=16-20)

#### 4.5. Einfluss der ionisierenden Bestrahlung auf die prokoagulatorische Aktivität des Überstandes

Eine Steigerung der prokoagulatorischen Aktivität des präparierten MP- und Zellfreien Überstands bestrahlter PBMNC-Kulturen konnte an Tag 3 nicht nachgewiesen werden (K= 4,5 (2,6-6,6) U, 20 Gy= 4,6 (3,3-6,7) U, K vs. 20 Gy, p=0,4611) (Abbildung 12). Die ionisierende Bestrahlung scheint demnach keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der löslichen TF-Form im Überstand zu haben.

#### 4.6. Rolle der Phospholipide für die prokoagulatorische Aktivität des Überstands

Es ist bekannt, dass der TF/FVIIa Komplex nur in Gegenwart von negativ geladenen Phospholipiden seine volle enzymatische Aktivität entfalten kann.



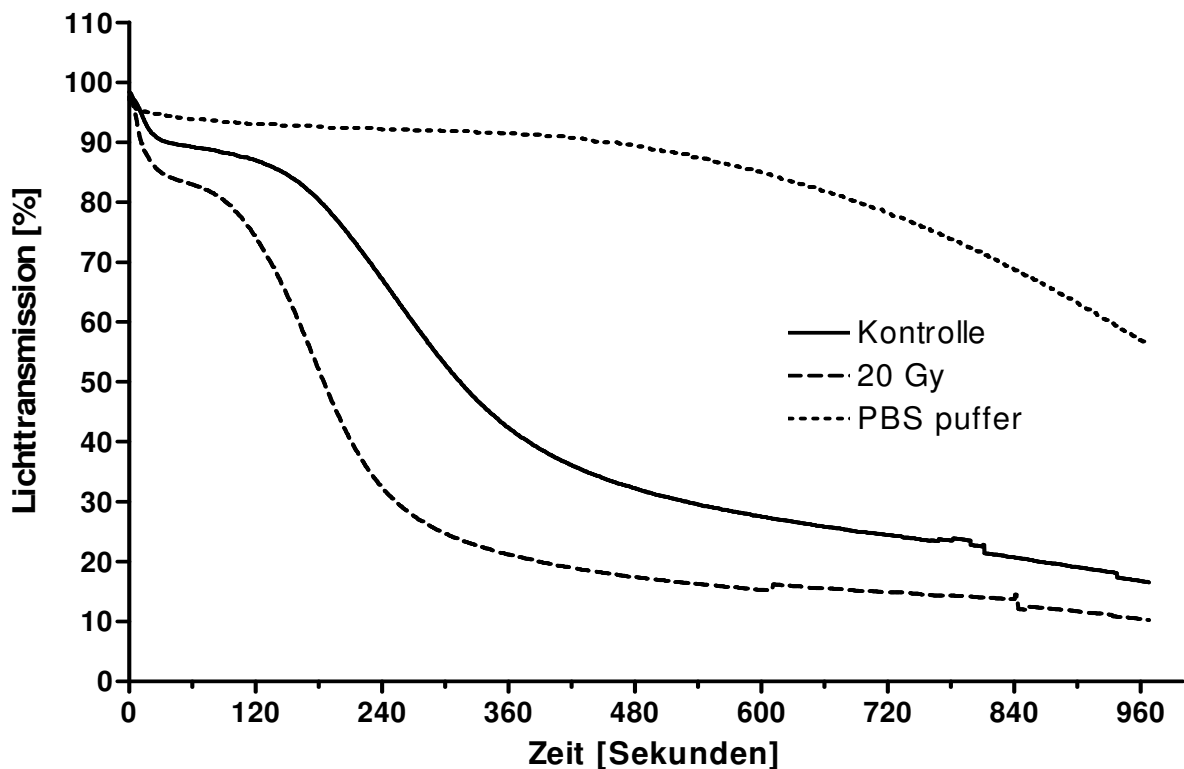
**Abbildung 13:** Für die volle prokoagulatorische Aktivität des Überstandes, der die lösliche TF-Form enthält, ist die Gegenwart von Phospholipiden (PL) unabdingbar. In Abwesenheit von Phospholipiden sinkt die Aktivität des Überstandes signifikant ab. +  $p=0,0313$ , ( $n=6$ )

Der MP- und zellfreie PBMNC-Kulturüberstand, der die lösliche TF-Form enthält, wurde deshalb vor Bestimmung seiner prokoagulatorischen Aktivität mit Phospholipidvesikeln behandelt. Ohne den Zusatz von Phospholipiden, war die prokoagulatorische Aktivität signifikant erniedrigt ( $K_{\emptyset\text{Phospholipide}}=1,8$  (1,7-2,5) U). Unter dem Einfluss der Phospholipide stieg die gemessene Aktivität deutlich an ( $K_{+\text{Phospholipide}}= 4,4$  (4,3-8,5) U,  $K_{\emptyset\text{Phospholipide}}$  vs.  $K_{+\text{Phospholipide}}$ ,  $p=0,0313$ ), (Abbildung 13). Für die volle prokoagulatorischen Aktivität des untersuchten Überstandes sind somit Phospholipiden notwendig.

#### 4.7. Die Wirkung der ionisierenden Bestrahlung auf die koagulatorische Aktivität von PBMNC

3 Tage nach ionisierender Bestrahlung wurde ein einstufiger Gerinnungstest mit bestrahlten und unbestrahlten PBMNC durchgeführt. Kultivierte PBMNC initiierten dabei

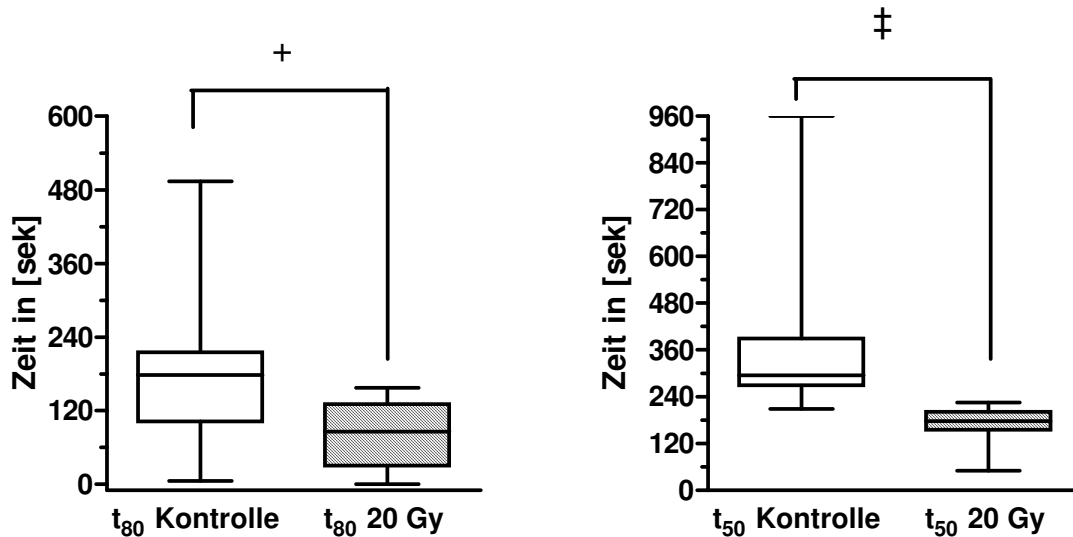
nach Zugabe von Kalziumionen innerhalb von Sekunden die Gerinnung in Plasma. Im einstufigen Gerinnungstest zeigte sich unter dem Einfluss bestrahlter PBMNC eine deutlich schnellere Abnahme der Lichttransmission als bei unbestrahlten Zellen. In Gegenwart von PBS-Puffer ergab sich lediglich eine sehr flache Kurve. Der Abfall der Transmission in Plasma setzt erst nach ca. 500 Sekunden ein (Abbildung 14a).



**Abbildung 14 a:** PBMNC initiieren die Gerinnung in einem einstufigen Gerinnungstest. Unter Einwirkung von bestrahlten PBMNC zeigte sich ein deutlich schnellerer Abfall der Lichttransmission im Plasma als in Gegenwart von unbestrahlten PBMNC. (n=11)

Um die Abnahme der Transmission nach Beginn der Reaktion und damit die Geschwindigkeit der Gerinnungsreaktion statistisch analysieren zu können, wurden jeweils diejenigen Zeiten bestimmt, nach denen die Transmission auf 80 % ( $t_{80}$ ) bzw. auf 50 % ( $t_{50}$ ) des Ausgangswertes von 100 % gefallen war. Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den  $t_{80}$ - und  $t_{50}$ -Werten der Gerinnungskurven der bestrahlten

und unbestrahlten PBMNC ( $t_{80}$ Kontrolle= 178,0 (102,0-215,0) s,  $t_{80}$ 20Gy= 86,00 (30,00-130,5) s,  $t_{80}$ Kontrolle vs.  $t_{80}$ 20Gy,  $p=0,0018$ ), ( $t_{50}$ Kontrolle= 295,0 (268,0-389,0) s,  $t_{50}$ 20 Gy= 177,0 (155,0-201,0) s,  $t_{50}$ Kontrolle vs.  $t_{50}$ 20 Gy,  $p<0,0001$ ) (Abbildung 14b).

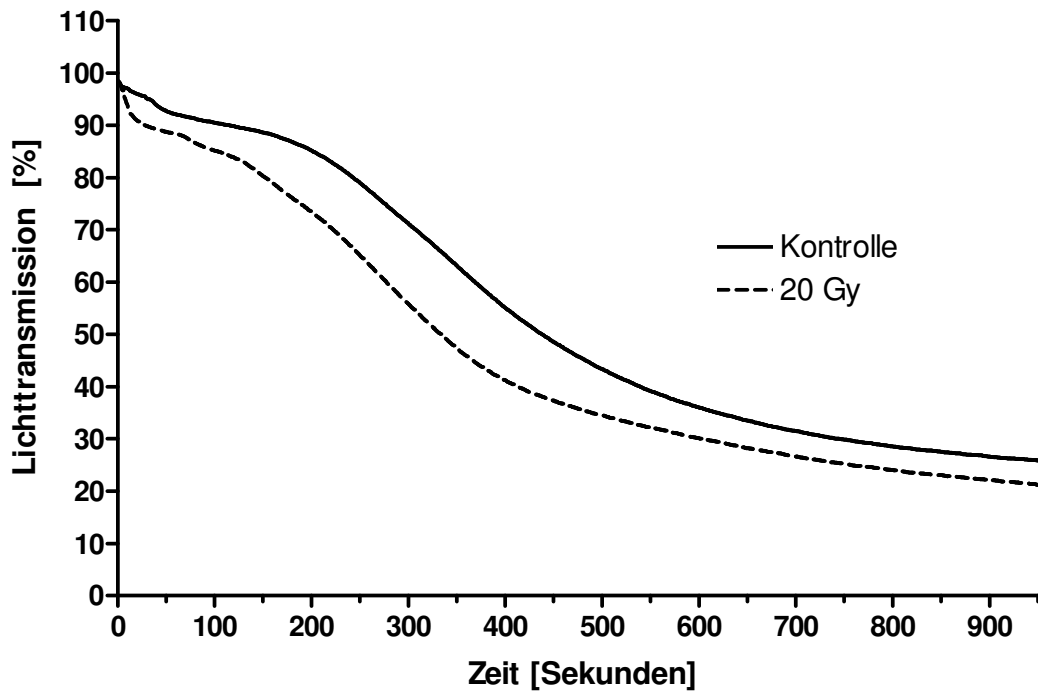


**Abbildung 14 b:** PBMNC initiieren die Gerinnung in Plasma 3 Tage nach ionisierender Bestrahlung. Unter dem Einfluss von bestrahlten PBMNC kommt es zu einer schnelleren Abfolge der Gerinnungsreaktion in Plasma als mit unbestrahlten PBMNC-Kulturen. Darstellung der  $t_{80}$ - sowie der  $t_{50}$ -Werte der erstellten Gerinnungskurven. +  $p=0,0018$ , ‡  $p<0,0001$  ( $n=11$ )

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bestrahlte und kultivierte PBMNC eine höhere koagulatorische Aktivität besitzen als unbestrahlte PBMNC.

#### 4.8. Die Auswirkung der ionisierenden Bestrahlung auf die koagulatorische Aktivität der Mikropartikel

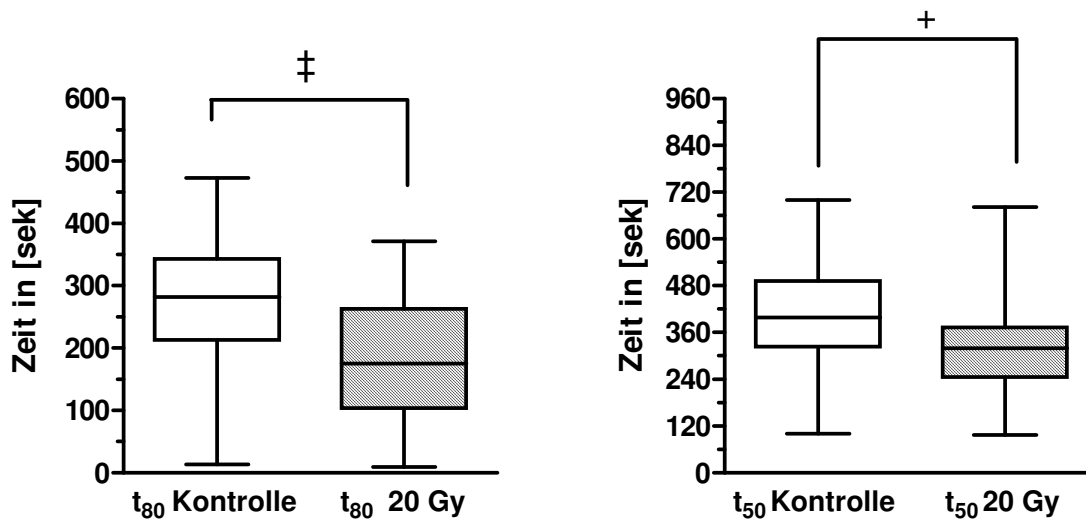
Kultivierte PBMNC sezernieren Mikropartikel. Im durchgeführten einstufigen Gerinnungstest 3 Tage nach ionisierender Bestrahlung waren sie in der Lage, die Gerinnung in Plasma zu initiieren. Hierbei zeigte sich ein schnellerer Abfall der Transmission unter dem Einfluss von Mikropartikeln aus bestrahlten PBMNC-Kulturen. (Abbildung 15a).



**Abbildung 15 a:** Mikropartikel initiieren die Gerinnung in einem einstufigen Gerinnungstest. Es ergab sich unter Einwirkung von Mikropartikeln, die aus bestrahlten PBMNC-Kulturen präpariert wurden ein deutlich schnellerer Abfall der Lichttransmission im Plasma als in Gegenwart von Mikropartikeln aus unbestrahlten PBMNC-Kulturen. (n=12)

Des Weiteren ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen den  $t_{80}$ - bzw. den  $t_{50}$ -Werten der Gerinnungskurven von Mikropartikeln aus bestrahlten oder unbestrahlten PBMNC-Kulturen nachweisen ( $t_{80}$ Kontrolle= 281,5 (212,5- 343,0) s,  $t_{80}20\text{Gy}$ = 175,0 (103,0- 262,5) s,  $t_{80}$ Kontrolle vs.  $t_{80}20\text{Gy}$ ,  $p= 0,0005$ ), ( $t_{50}$ Kontrolle= 398,5 (323,0-492,5) s,  $t_{50}20\text{Gy}$ = 319,5 (245,0-373,0) s,  $t_{50}$ Kontrolle vs.  $t_{50}20\text{Gy}$ ,  $p= 0,0040$ ), (Abbildung 15b). Mikropartikel, die aus bestrahlten PBMNC-Kulturen stammen, scheinen also die Gerinnung schneller zu initiieren als Mikropartikel von unbehandelten Kontrollen.

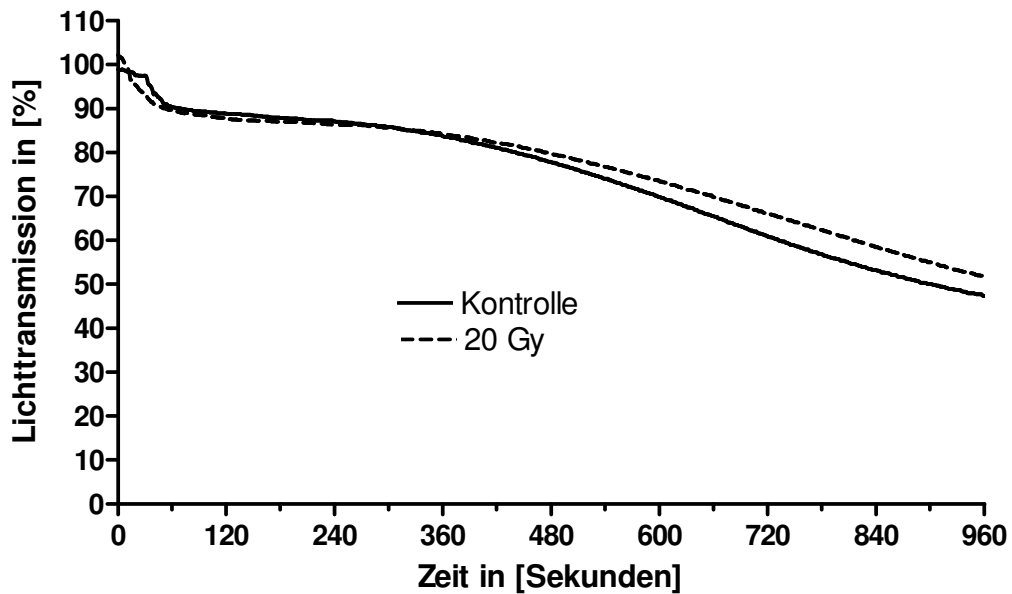




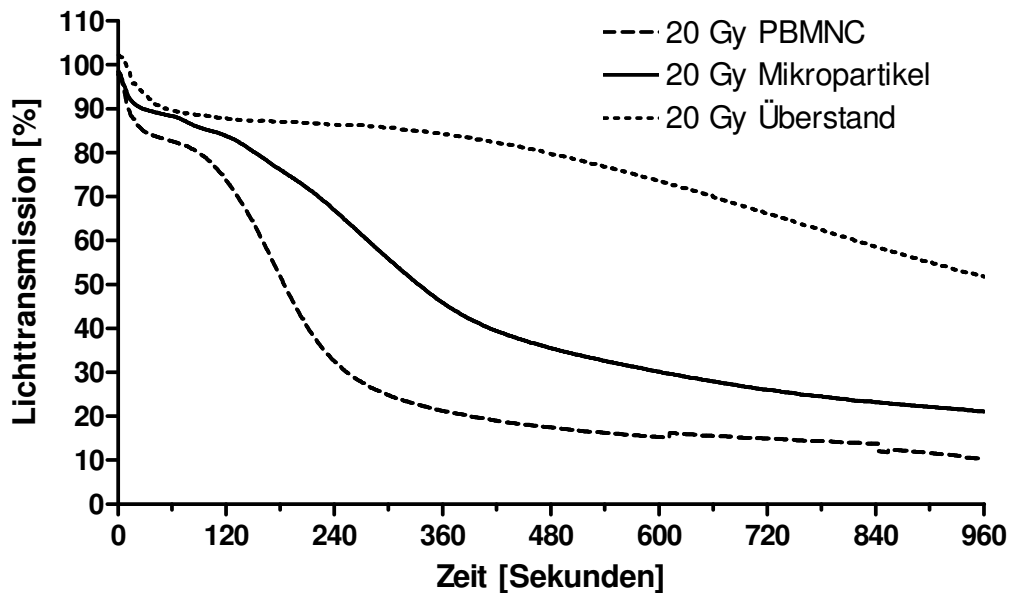
**Abbildung 15b:** Mikropartikel, die 3 Tage nach ionisierender Bestrahlung aus PBMNC Kulturen präpariert wurden, initiieren die Gerinnung in Plasma. Diese Mikropartikel führen zu einer schnelleren Abfolge der Gerinnungsreaktion als Mikropartikel aus unbestrahlten PBMNC-Kulturen. Dies spiegelt sich in der Darstellung der t<sub>50</sub>- sowie der t<sub>80</sub>-Werte der Gerinnungskurven wieder. ‡ p= 0,0005, + p= 0,0040 (n=12)

#### 4.9. Die Auswirkung auf die koagulatorische Aktivität des Überstandes.

MP-freier PBMNC-Kulturüberstand, in den die lösliche TF-Form sezerniert wird, scheint eine geringe koagulatorische Aktivität zu besitzen. In Gegenwart von Phospholipiden kommt es nur zu einem langsamen Abfall der Transmission auf ca. 50 % des Ausgangswertes (Abbildung 16). Des Weiteren zeigten sich im Gerinnungstest keine signifikanten Unterschiede zwischen den t<sub>80</sub>-Werten der Kontroll- und der aus bestrahlten Kulturen gewonnen Überstände. (t<sub>80</sub>Kontrolle= 494,5 (76,50-553,5) s, t<sub>80</sub>20Gy= 522,0 (361,0-550,0)s, t<sub>80</sub>Kontrolle vs. t<sub>80</sub>20Gy, p=0,4375). Die Ergebnisse zeigen, dass MP-freier PBMNC- Zellkulturüberstand eine deutlich geringe koagulatorische Aktivität als kultivierte PBMNCs oder präparierte Mikropartikel besitzt (Abbildung 17).



**Abbildung 16:** Abfall der Lichttransmission nach Zugabe von MP-freiem Kulturüberstand. Kulturüberstand bewirkt einen langsameren Abfall der Transmission in Plasma als PBMNC oder Mikropartikel.



**Abbildung 17:** Abfall der Lichttransmission nach Zugabe von bestrahlten PBMNC, Mikropartikeln oder Zellkulturüberstand in die Plasmaprobe.

## 5. Diskussion

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigen, dass ionisierende Bestrahlung die TF-Proteinexpression in kultivierten PBMNCs induziert und die prokoagulatorische Aktivität von PBMNC-assoziiertem TF sowie von sezernierten Mikropartikeln im Zellkulturüberstand steigert. Ein Einfluss auf die prokoagulatorische Aktivität des MP- freien Zellkulturüberstandes und damit auf die lösliche TF-Form ließ sich jedoch nicht nachweisen.

Die Auswirkung der Anwendung von ionisierender Bestrahlung auf den „TF-Pathway“ in PBMNC ist bisher nicht untersucht worden. Dem gegenüber konnte die bedeutende Rolle von Monozyten und sezernierten MP bei der TF-Protein vermittelten Entstehung von thrombembolischen Ereignissen in zahlreichen Arbeiten dargelegt werden.

### 5.1. TF-Induktion nach ionisierender Bestrahlung, gegenwärtiger Forschungsstand

In der Studie wurde der Einfluss der ionisierenden Bestrahlung auf periphere mononukleäre Blutzellen untersucht. Diese setzten sich hauptsächlich aus zwei Zellfraktion zusammen, Monozyten und Lymphozyten. Die Rolle der Monozyten als TF exprimierender Blutzelltyp nach Stimulation mit Endotoxinen und die damit verbundene bedeutende Stellung in der Pathophysiologie der Thrombogenese ist schon seit über 30 Jahren bekannt (29;74). Die Wirkung der ionisierenden Bestrahlung auf die TF-Expression in PBMNC ist bisher nur unzureichend erforscht worden. Allerdings konnte in einigen Arbeiten ein stimulierender Einfluss auf den „TF-Pathway“ in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden. So zeigten Van der Meeren et al., dass alveolare Epithelzellen nach Ganzkörperbestrahlung von Mäusen vermehrt TF-mRNA exprimieren (75). Finkelstein et al. überprüften in ihrer Arbeit den Einfluss der intrakoronaren Brachytherapie auf die Koronargefäßwand von Schweinen. In den bestrahlten Koronarien ließ sich dabei nicht nur eine gesteigerte TF-Proteinexpression sondern auch eine erhöhte enzymatische Aktivität des TF-Proteins nachweisen (71). In unserer Arbeitsgruppe wurde der Effekt der ionisierenden Bestrahlung auf verschiedene kultivierte Zelllinien untersucht. Neben den beschriebenen Auswirkungen auf PBMNC konnte auch in endothelialen HUVEC Zellen, in

monozytären THP-1 Zellen sowie SMC Gefäßmuskelzellen ein stimulierender Effekt auf die TF- Expression sowie die TF-Aktivität belegt werden (65) .

## **5.2. Beeinflussung der Tissue Faktor-Proteinexpression in PBMNC nach ionisierender Bestrahlung**

Nach Anwendung der ionisierenden Bestrahlung zeigte sich eine signifikant erhöhte Proteinkonzentration der PBMNC im Vergleich zu den Kontrollkulturen.

Zirkulierende Monozyten im Blut gesunder Probanden weisen im Gegensatz zu stimulierten Zellen kaum aktives TF-Protein auf (76). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnten nach Präparation der PBMNC an Tag 0 (siehe Studienaufbau, Seite 18) nur sehr geringe TF-Proteinkonzentrationen quantifiziert werden. Ein signifikanter Anstieg der TF-Proteinkonzentration zeigte sich in den kultivierten PBMNC erst ab Tag 3 nach ionisierender Bestrahlung. Dies spricht für eine zeitlich verzögerte TF-Protein de novo Synthese nach ionisierender Bestrahlung.

Bisher ist es nicht gelungen, die genauen intrazellulären Mechanismen, über die eine verstärkte TF- Gen und Proteinexpression nach Anwendung von ionisierender Strahlung in PBMNC vermittelt werden, zu identifizieren. Es ist jedoch bekannt, dass es nach ionisierender Bestrahlung von Monozyten zu einer gesteigerten Expression verschiedenerer Gene kommt sowie unterschiedliche Signaltransduktionswege initiiert werden, die bei Bestrahlungs-abhängigen entzündlichen Folgeprozesse eine Rolle spielen. So wiesen mehrere Arbeiten eine gesteigerte Strahlungs-induzierte endogene Synthese des inflammatorischen Zytokins TNF  $\alpha$  in kultivierten Monozyten nach (77;78). TNF  $\alpha$  wiederum kann nach Anwendung von ionisierender Bestrahlung wahrscheinlich über einen autokrinen Stimulationsmechanismus die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B einleiten (79). NF $\kappa$ B ist ein heterodimeres DNA-Bindeprotein, welches aus verschiedenen Untereinheiten wie z.B. p65 und p50 besteht. Im Cytosol unstimulierter Zellen liegt es als inaktiver Komplex mit dem Inhibitorprotein I $\kappa$ B vor (80). Verschiedene extrazelluläre Stimuli wie ionisierende Bestrahlung führen zu einer Dissoziation des Komplexes, was die Translokation von NF $\kappa$ B in den Zellkern ermöglicht. Die NF $\kappa$ B vermittelte Induktion des TF-Gens und eine nachfolgende gesteigerte TF-Proteinexpression wurde in verschiedenen Arbeiten belegt (11;81;82). In der dem TF-Gen vorgeschalteten Promotorregion wurden

neben der Bindungsstelle für NFκB weitere Regionen identifiziert, über die Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 eine verstärkte Genexpression nach Zellstimulation initiieren können (83). Letztendlich müssen nachfolgende Untersuchungen beweisen, in wie fern inflammatorische Zytokine für die gesteigerten TF-Expression in PBMNC nach Anwendung von ionisierender Bestrahlung verantwortlich sind und welche Rolle dabei der NFκB vermittelte Transduktionsweg oder andere Signalpfade spielen.

### **5.3. Regulation der enzymatischen Aktivität des TF-Proteins in PBMNC**

Welche genauen Prozesse für die gesteigerte enzymatische Aktivität des TF-Proteins nach ionisierender Bestrahlung verantwortlich sind, ist bisher nicht ausreichend erforscht. In vivo liegt unter physiologischen Bedingungen nur ein geringer Teil des zellulär exprimierten TF in funktionell voll aktiver Form vor (TF encryption) (84). Verschiedenen Mechanismen wurde eine Regulatorfunktion zugeschrieben, über welche die enzymatische Aktivität des TF-Proteins beeinflusst werden könnte. Eine bedeutende Rolle scheint dabei die Assoziation von TF mit negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin (PS) zu spielen. In Gegenwart von PS kommt es zu einem starken Anstieg der enzymatischen prokoagulatorischen Aktivität des TF-Proteins (85;86).

Vitale Zellen besitzen eine asymmetrische Verteilung von Phospholipiden in der Zellmembran. PS ist nur im Zytosol zugewandten Teil der Lipiddoppelschicht vorhanden (87). Diese Asymmetrie ist jedoch in apoptotischen Zellen aufgehoben, d.h. PS tritt auch im äußeren Membranteil auf und ist so in der Lage die prokoagulatorische Aktivität von TF zu steigern (88-90). Unsere Arbeitsgruppe zeigte in weiteren Experimenten, dass es nach Ionisierender Bestrahlung von PBMNC zu einer signifikant erhöhten Oberflächenpräsentation von Annexin V kommt, was für eine gesteigerte Freilegung von prokoagulatorisch wirksamen Phospholipiden spricht (91). Dies könnte ein möglicher Mechanismus sein, über den die enzymatische Aktivität des TF-Proteins nach ionisierender Bestrahlung beeinflusst wird.

Daneben scheint es weitere Phospholipid unabhängige Prozesse zu geben, die bei der Regulation der TF-Aktivität eine Rolle spielen. So berichteten Wolberg et al., dass nach Stimulation von Monozyten mit Calcium Ionophor trotz Blockade von PS durch Annexin V

weiterhin eine erhöhte enzymatische Aktivität des TF-Proteins messbar war (92). Bach et al. postulierten in ihrer Arbeit, dass TF in der Membran unstimulierter Zellen als inaktives Dimer vorliegt. Nach Zellaktivierung kommt es zur Dissoziation der TF-Dimere, damit zur Freilegung prokoagulatorisch wirksamer Monomere und zur Steigerung der TF-Aktivität (93).

Ein weiteres wichtiges Element bei der Regulation der enzymatischen Aktivität von TF stellt das Protein Tissue Faktor Pathway Inhibitor (TFPI) dar. In vivo bindet TFPI an Faktor Xa und den TF/VIIa Komplex, wodurch es zu einer Verminderung der prokoagulatorischen Aktivität kommt (94). Hamik et al. beschreiben zusätzlich die Möglichkeit einer TFPI vermittelte Endozytose und damit verbundenen Inaktivierung des TF-Proteins (95). Es ist zu erwarten, dass im Organismus neben den genannten Mechanismen weitere Regulationswege existieren, über welche die enzymatische Aktivität des Tissue Faktor Proteins, sei es unter physiologischen oder pathophysiologischen Umständen, beeinflusst werden kann.

Betrachtet man die Ergebnisse der in der Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen, sollte berücksichtigt werden, dass sich diese nicht ohne Einschränkungen auf die Situation in vivo übertragen lassen. Im verwendeten TF- Aktivitätstest wurden deutliche höhere Mengen an Faktor VIIa und Faktor X eingesetzt, als sie im Blut gesunder Menschen zu finden sind. Andererseits zeigte der Gerinnungstest, dass die bestrahlte PBMNC im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen die Gerinnung in humanem Plasma schneller auslösen. Die PBMNC wurden vor Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität und Durchführung des Gerinnungstestes mit einem Detergenz behandelt oder wiederholten Gefrier-Tauzyklen unterzogen. Dies führte zu einer Lyse der Zellen, zur Freisetzung von intrazellulärem TF, zur Auflösung der zellulären Membranintegrität und zu einer Exposition von prokoagulatorisch wirksamen PS. Trotzdem ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der zellulär-assoziierten TF-Aktivität von bestrahlten und unbestrahlten PBMNC. Weitere Experimente müssen zeigen, welche genauen Mechanismen für die erhöhte prokoagulatorische Aktivität von PBMNC nach ionisierender Bestrahlung verantwortlich sind.

#### **5.4. Die Rolle der Mikropartikel in der Pathogenese der Thrombose**

Die bedeutende Rolle von zirkulierenden Mikropartikeln in der Pathogenese verschiedener mit thrombembolischen Komplikation assoziierter Erkrankungen ist seit Jahren bekannt. Ihre genaue Stellung und Funktion im Prozess der Thrombogenese in vivo, besonders im Zusammenspiel mit anderen Elementen wie dem Endothel, den verschiedenen Blutzellen sowie den löslichen Gerinnungsfaktoren im Plasma, wird derzeit noch intensiv erforscht.

Als Mikropartikel bezeichnet man im Blut zirkulierende Membranvesikel zellulären Ursprungs mit einem Durchmesser von weniger als 1 µm. Typischer Weise enthalten diese neben verschiedenen Proteinen, wie z.B. spezifischen zellulären Oberflächenantigenen, große Mengen an negativ geladenen prokoagulatorisch wirksamen Phospholipiden in ihrer Membran (31). Primäre Quelle der Mikropartikel scheinen über inflammatorische Reize aktivierte, apoptotische Zellen zu sein. Während des Apoptoseprozesses kommt es bekanntermaßen zu einer Aufhebung der Membranasymmetrie und zu einer gesteigerten Translokation von PS in den äußeren Membranteil (96). Diese Überladung mit anionischen Phospholipiden wurde von Freyssinet als letztlich entscheidende Voraussetzung für die Mikropartikelbildung beschrieben (97). Sie bedingt die Ablösung der Zellmembran vom Zytoskelett und führt somit zur Abschnürung der Membranvesikel (membrane blebbing). Neben dem vaskulären Endothel stellen vor allem Thrombozyten und Monozyten die bedeutendste Sekretionsquelle von zirkulierenden Mikropartikeln im Blut dar (98-100). Erhöhte Mengen an prokoagulatorisch wirksamen TF-haltigen Mikropartikeln fanden sich im Blut von Patienten, die unter verschiedenen Erkrankungen wie Sepsis, akutem Koronarsyndrom oder Anti-Phospholipid-Antikörper Syndrom litten, welche mit einer pathologisch gesteigerten Blutthrombogenität einhergehen (37;101;102). Allerdings enthält auch das Blut gesunder Menschen zirkulierende Mikropartikel. Diese können zwar die Bildung von Thrombin über einen wahrscheinlich TF-unabhängigen Mechanismus induzieren, scheinen aber im Gegensatz zu den stark prokoagulanten MP, die man unter pathologischen Umständen finden kann, nur ein geringes thrombogenes Potential zu besitzen (103;104). In vivo scheint die Interaktion von zirkulierenden Mikropartikeln, Monozyten und Thrombozyten bei Thrombogenese von großer Bedeutung zu sein. Rauch et al beschrieben eine CD 15 vermittelte Adhäsion von Mikropartikel-assoziiertem TF

monozytären Ursprungs mit Thrombozyten (33). Dem gegenüber berichteten andere Autoren wie Losche, von einer umgekehrten Übertragung von TF-Protein haltigen MP aus Thrombozyten auf monozytäre Zellen (105). Osterud bekräftigte in seiner Arbeit die Bedeutung des Zusammenspiels von Monozyten, sezernierten MP und aktivierten Thrombozyten in der Pathogenese thrombogener Ereignisse. Monozytärer TF scheint demnach in vivo über Mikropartikel bzw. durch direkte Zellinteraktionen auf Thrombozyten übertragen zu werden, wodurch es zu einer Steigerung der enzymatischen Aktivität von TF kommt (TF-decryptation) (106).

In der vorgestellten Arbeit zeigte sich nach ionisierender Bestrahlung ein Anstieg der TF-abhängigen prokoagulatorischen Aktivität von Mikropartikeln im Zellkulturüberstand.

Zudem initiieren die präparierten Mikropartikel aus bestrahlten PBMNC-Kulturen die Gerinnung von Plasma schneller als MP unbestrahlter Kontrollen. In wie weit es zu einer Neubildung von Mikropartikeln kommt und welche Zellunterfraktionen der PBMNC in erster Linie für die Sekretion von TF-haltigen Mikropartikeln verantwortlich sind, wurde jedoch nicht untersucht.

Apoptotische Zellen sind, wie bereits beschrieben, in der Lage, Mikropartikel abzusondern. Diese können nicht nur aktives TF-Protein enthalten, sondern verfügen in ihrer Membran auch über einen hohen Anteil an prokoagulatorisch wirksamen anionischen Phospholipiden. Malat et al. demonstrierten in ihrer Arbeit, dass atherosklerotische Plaques große Mengen an TF-haltigen prothrombogenen Mikropartikeln beherbergen, die überwiegend aus apoptotischen Zellen monozytären Ursprungs stammten (59). Apoptotische Prozesse scheinen also für die Entstehung von prokoagulatorischen Mikropartikeln und somit auch für die Genese thrombogener und atherosklerotischer Veränderungen im Organismus von entscheidender Bedeutung zu sein. Die Induktion des Apoptoseprozesses durch ionisierende Bestrahlung ist seit langem bekannt (107;108). Eine gesteigerte Sekretion von prothrombogenen Mikropartikeln durch apoptotische PBMNC bzw. die gesteigerte enzymatische Aktivität von MP-assoziiertem TF-Protein nach Anwendung von ionisierender Bestrahlung könnte demnach ein möglicher Mechanismus sein, der für die erhöhte Thrombogenität des Blutes nach ionisierender Bestrahlung verantwortlich ist.



### **5.5. Die Bedeutung der lösliche TF-Form für die Thrombogenese**

Giesen et al. demonstrierten in ihrer Arbeit, dass im Blut zirkulierender TF existiert, der in der Lage ist, die Thrombusbildung zu initiieren. Neben Zell- und Mikropartikel-assoziiertem TF konnte im Plasma eine lösliche TF-Form nachgewiesen werden (109). Diese Entdeckung wurde durch die kürzliche Identifizierung der TF-Isoform im Blut aber auch als Bestandteil von Thromben durch Bogdanov gefestigt (14).

In der Doktorarbeit erfolgte die Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität des MP- und Zell-freien PBMNC-Kulturüberstandes nach ionisierender Bestrahlung. Szotowski et al. zeigten erst kürzlich, dass löslicher TF-Faktor nach Stimulation von HUVEC mit TNF  $\alpha$  in den Zellkulturüberstand abgesondert wird (65). Nach ionisierender Bestrahlung ließ sich in Gegenwart von zugesetzten Phospholipiden jedoch weder eine erhöhte TF-abhängige prokoagulatorische Aktivität im Zellkulturüberstand nachweisen, noch war der präparierte Überstand in der Lage, die Gerinnung in Plasma zu initiieren. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es fraglich, in wie weit die lösliche TF-Form im Plasma für die gesteigerte Thrombogenität nach ionisierender Bestrahlung überhaupt eine Rolle spielt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es erst in vivo in Gegenwart von anderen Komponenten wie dem Endothel und den Thrombozyten zu einer pathophysiologisch bedeutsamen Aktivierung der löslichen TF-Form nach ionisierender Bestrahlung kommt. Allerdings ist die genaue Funktion der löslichen TF-Form im Organismus weiterhin völlig ungeklärt. Neuere Untersuchungen stellen ihre Bedeutung bei der TF-abhängigen Generierung von Fibrin auf jeden Fall in Frage (110).

### **5.6. Mögliche klinische Bedeutung der TF-Induktion in PBMNC nach ionisierender Bestrahlung.**

Das thrombogene Potential der ionisierenden Bestrahlung ist seit über 50 Jahren bekannt und wurde bisher in zahlreichen Arbeiten dargelegt. Zu einem scheinen Patienten nach Radiotherapie des Mediastinal-, Kopf-, und Halsbereichs ein erhöhtes Risiko aufzuweisen, späte thrombembolische Gefäßverschlüsse zu entwickeln, auf der anderen Seite ist das Phänomen der späten Thrombosen nach intrakoronarer Brachytherapie bekannt (67-69;111-114). Solche späten thrombogenen Ereignisse treten in der Mehrzahl Monate bis

Jahren nach Therapieende auf und manifestieren sich oft als schwerwiegende klinische Komplikationen, wie Apoplex oder akutem Koronarsyndrom. Durch neue schonendere Radiotherapieverfahren sowie eine verlängerte intensive antikoagulatorische Therapie nach Bestrahlung ist es zwar gelungen, die genannten Nebenwirkungen zu vermindern, die ursächliche Pathogenese der thrombotischen Komplikationen ist dennoch bisher nur unvollständig verstanden und deren kausale pharmakologische Behandlung aus diesem Grund bisher auch nicht verfügbar (115;116).

Verschiedene Mechanismen wurden als Ursache der späten Thrombosen nach Anwendung von ionisierender Bestrahlung in Betracht gezogen, unter anderem eine Strahlungs-induzierte Plättchenaktivierung oder eine Gefäßwandschädigung verbunden mit einer verzögerten Endothelisierung und Wundheilungsstörung nach ionisierender Bestrahlung (117). Die Induktion des TF-Proteins in PBMNC nach ionisierender Bestrahlung ist bislang jedoch nicht beschrieben worden. Somit liefert diese Arbeit neue Ansatzmöglichkeiten bei der Klärung der Pathogenese von Bestrahlungs-induzierten Thrombosen, wobei die demonstrierte TF-Induktion in PBMNC sicherlich nur als ein Teilmechanismus in einem multifaktoriellen Geschehen zu sehen ist. Da die beobachteten Thrombosen nach ionisierender Bestrahlung normalerweise erst nach Monaten bis Jahren auftreten und in den gezeigten Versuchen lediglich der Zeitraum bis Tag 7 nach ionisierender Bestrahlung untersucht wurde, kann man bisher nur darüber spekulieren, welche genaue Bedeutung die relativ akute TF-Induktion in PBMNC hierbei spielt. Andererseits zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass nicht nur PBMNC sondern auch glatte Muskelzellen und Endothelzellen in vitro nach Bestrahlung vermehrt TF exprimieren. Die Applikation von ionisierender Bestrahlung bewirkt also sowohl eine intra- als auch eine extravaskuläre Steigerung der TF-Expression.

Aufgrund der beschrieben gut belegten Bedeutung des TF-Proteins in der Genese der Thrombose,- aber auch Arterioskleroseentstehung, scheint die dargestellte Bestrahlungs-induzierte TF-Induktion ein Mechanismus zu sein, der nun in weiteren Experimenten genauer untersucht werden sollte.

## **5.7. Ausblick: Pharmakologische Beeinflussung des TF-Proteins als neues Therapiekonzept**

Aufgrund der zentralen Stellung des TF-Proteins in der Hämostase und Thrombogenese könnte dessen pharmakologische Beeinflussung neue Möglichkeiten bei der Behandlung und Prävention thrombembolischer Erkrankungen aufzeigen. Durch die Inhibierung von intravaskulären TF wäre man einerseits in der Lage, dessen thrombogenes Potential zu reduzieren, andererseits befinden sich in der Gefäßwand große Mengen an extravaskulären TF, so dass nach Gefäßverletzung die Gerinnung weiterhin initiiert werden könnte (28;118).

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene neue Angriffspunkte innerhalb des „TF-Pathways“ für eine solche antikoagulatorische Therapie untersucht. Bierhaus et al. sowie Pendurthi et al. demonstrierten in ihren Arbeiten die Bedeutung von Antioxidantien, die die TF-Genexpression unter anderem über eine Inhibition des NFκB vermittelten Signaltransduktionsweges verminderten (119;120). Andere Autoren schlugen eine Beeinflussung der TF-Expression durch Inhibition der TF mRNA vor (121;122). Ein vielversprechender neuer Angriffspunkt einer antithrombogenen Therapie scheint die direkte Hemmung des TF-Proteins bzw. des TF/FVIIa-Komplexes sei es durch monoklonale Antikörper oder synthetische Antagonisten zu sein (123;124). In Tierversuchen zeigte sich eine Verminderung von thrombogenen Ereignissen, die nicht mit einem gesteigerten Blutungsrisiko verknüpft waren (125).

Der wichtigste physiologische Inhibitor von TF in vivo ist das Protein TFPI. In Phase 1 Studien, in denen gesunde Versuchspersonen nach Endotoxininjektionen mit rekombinantem TFPI behandelt wurden, ließ sich eine TFPI abhängige Hemmung der Thrombingeneration im Plasma ohne eine gleichzeitig erhöhte Blutungsneigung nachweisen (126). Diese Ergebnisse zu Grunde legend untersuchten Abraham et al in einer klinischen Phase 3 Studie die Auswirkungen einer Behandlung von Sepsispatienten mit rekombinantem TFPI (127). Es zeigte sich jedoch keine Reduktion der Mortalität, zudem trat unter der Therapie ein gesteigertes Blutungsrisiko auf. Für eine endgültige Bewertung der möglichen therapeutischen Rolle von TFPI ist es jedoch noch zu früh. Weitere klinische Studien müssen dessen Bedeutung bei der Behandlung und Prävention von thrombembolischen Störungen klären.

Neben einer direkten Inhibition über die oben genannten Wege ist die Beeinflussung des TF-abhängigen Gerinnungsprozesses aber auch über primär völlig unabhängig vom TF-Pathway erscheinende Mechanismen möglich. So demonstrierten Koh et al. erst kürzlich, dass die Kombinationstherapie mit Ramipril und Simvastatin bei Typ 2 Diabetikern zu einer signifikanten Verminderung der TF-Aktivität in vivo führt (128). Diese Beobachtung unterstreicht erneut die Bedeutung der bisher etablierten Basistherapie kardiovaskulärer Erkrankungen.

Auf der Suche nach neueren nebenwirkungsarmen, spezifischeren Therapieformen thrombembolischer Krankheitsprozesse wird die weitere Erforschung des TF-Protein-abhängigen Gerinnungsweges auch in Zukunft von entscheidender Bedeutung sein. Bis entsprechende Präparate mit hoher Bioverfügbarkeit, geringen Nebenwirkungen und ohne kritische Wechselwirkungen für den therapeutischen Einsatz zu Verfügung stehen, kann es allerdings noch Jahre dauern.

## 6. Zusammenfassung

Die therapeutische Anwendung von ionisierender Bestrahlung ist mit einem vermehrten Auftreten von späten thrombogenen Ereignissen verknüpft. Die genauen Mechanismen, die für diese prothrombogene Wirkung der ionisierenden Bestrahlung verantwortlich sind, wurden bisher aber nicht identifiziert.

Der Gerinnungsfaktor Tissue Faktor (TF) ist der primäre Initiator der Blutgerinnung und besitzt deshalb eine zentrale Stellung in der Pathogenese thrombembolischer Störungen. Nach Bindung von Faktor VIIa aktiviert er die Faktoren IX und X, die für die Fibrinogenierung essentiell sind. Im Blut zirkulierende Monozyten können unter inflammatorischen Bedingungen TF exprimieren und auf diesem Weg prothrombogen wirken. Neben zellgebundenem TF-Protein scheinen TF-haltige Mikropartikel (MP) eine bedeutende Rolle in der Thrombogenese zu spielen. Zudem existiert im Plasma eine lösliche TF-Form, deren genaue Funktion allerdings unklar ist.

Die vorgestellte Arbeit untersucht, welchen Einfluss die ionisierende Bestrahlung auf die TF-Expression von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMNC) hat. Hierzu wurden PBMNC präpariert, kultiviert und über einen Zeitraum von 7 Tagen nach Behandlung mit ionisierender Bestrahlung analysiert. Es ließ sich ein signifikanter Anstieg der prokoagulatorischen Aktivität der PBMNC sowie eine gesteigerte TF-Proteinexpression nachweisen. Zudem initiierten bestrahlte PBMNC die Gerinnung von Plasma schneller als unbestrahlte PBMNC. An Tag 3 nach Bestrahlung zeigte sich eine gesteigerte prokoagulatorische Aktivität von präparierten Mikropartikeln. Des Weiteren bewirkten MP von bestrahlten PBMNC eine schnellere Gerinnung von Plasma als MP aus Kontrollen. Eine erhöhte Strahlungs-induzierte prokoagulatorische Aktivität des Zellkulturüberstandes, der die lösliche TF-Form enthält, ließ sich an Tag 3 jedoch nicht nachweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ionisierende Bestrahlung die prokoagulatorische Aktivität von PBMNC und sezernierten Mikropartikeln steigert. Neben einer möglichen Aktivierung des NFκB-Signaltransduktionsweges scheint insbesondere der Apoptoseprozess, die damit verbundene Exposition von anionischen Phospholipiden an der äußeren Zellmembran sowie die Sekretion von MP für die gezeigte Strahlungs-induzierten Erhöhung der Prokoagulität von Bedeutung zu sein. Die Erhöhung der TF-

Expression von PBMNC nach ionisierender Bestrahlung könnte bei der Pathogenese Strahlungs-induzierter Thrombosen eine wichtige Rolle spielen. Weitere Untersuchungen müssen nun die genauen Mechanismen klären, die den demonstrierten Ergebnissen zu Grunde liegen und analysieren, in wie weit sich diese auf die Situation in vivo übertragen lassen.

## 7. Summary

The therapeutic application of ionizing radiation (IR) is associated with late thrombotic events, but the exact underlying molecular mechanisms are still unclear. Tissue factor (TF), the primary initiator of the coagulation system, induces thrombus formation by activation of Factor VII, resulting in activation of Factors IX and X. TF is widely considered to play a leading role in thrombus formation. During thrombotic disorders circulating monocytes have been identified to upregulate TF under inflammatory conditions and thereby enhance blood thrombogenicity. Besides cell-bound TF protein, two different forms of circulating TF have been described, TF-bearing microparticles (MP) and soluble TF protein. The aim of our study was to elucidate whether IR alters the procoagulability of human peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs). Therefore, we examined the expression of full-length TF in human PBMNCs and assessed the changes of cellular and extracellular procoagulability over a time period of 7 days post IR.

We found a significant increase of PBMNC-associated procoagulant activity over a time period of 7 days post irradiation. Moreover, 3 days post irradiation PBMNCs initiated the plasma clotting faster than non-irradiated cells. An enhanced cellular TF protein concentration was persistently observed throughout the investigated time up to 7 days post irradiation. Microparticle-associated TF activity significantly increased 3 days post irradiation compared with the non-irradiated controls. PBMNC-derived microparticles post irradiation also initiated the plasma clotting faster than microparticles derived from controls. In contrast to the PBMNC-derived MPs, no difference in TF activity was detected in the MP-free supernatant of irradiated and non irradiated PBMNCs 3 days post IR. The results show irradiation to induce TF expression and to increase procoagulability of PBMNCs and cell-derived microparticles. Besides the activation of the NF $\kappa$ B pathway and a therefore increased TF gene expression, IR induced apoptosis, which results in an exposition of anionic phospholipids on the outer leaflet of the plasma membrane and MP vesiculation, should be important for the demonstrated enhanced procoagulability. Further investigations are necessary to determine the exact mechanisms underlying these observations and to analyze the importance of IR-induced PBMNC TF expression in vivo.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

a	aktiviert
AP-1	Aktivator Protein-1
AS	Aminosäuren
asHTF	alternativ gespleißter Tissue Faktor (alternatively spliced human Tissue Faktor)
BSA	bovines Serum-Albumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (copy desoxyribonucleic acid)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F	Faktor
FCS	fetales Kälberserum
h	Stunde
IR	ionisierende Bestrahlung
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	milli-molar
MP	Mikropartikel
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor kappa B
nM	nano-molar
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalz-Lösung
pg	Pikogramm
PS	Phosphatidylserin
PBMNC	periphere mononukleäre Blutzellen



pM	pico-molar
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
s	Sekunden
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TF	Tissue Faktor
TF-A	Tissue Faktor Aktivität
TFPI	Tissue Faktor pathway inhibitor
U	Units
vs.	versus

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung der TF-Gen Promotorregion
Abbildung 2	Schematische Darstellung der TF-Gen-, m-RNA- und Proteinstruktur
Abbildung 3	Darstellung der Klassischen Einteilung der Gerinnungskaskade
Abbildung 4	Vereinfachte Darstellung des modernen Konzepts der plasmatischen Gerinnung
Abbildung 5	Aufbau der experimentellen Studie
Abbildung 6	Darstellung der PBMNC-Isolierung mit Hilfe von Ficoll Paque® Plus
Abbildung 7	Grundprinzip des chromogenen TF-Aktivitätstest
Abbildung 8a/8b	Schematische Darstellung des Messprinzips des PAP 4 Aggregometers
Abbildung 8c	beispielhafte grafische Darstellung der Abnahme der Transmission nach Start der Gerinnungsreaktion während des Gerinnungstest
Abbildung 9	Ergebnisse der Messung der funktionellen enzymatischen Aktivität von PBMNC-exprimiertem Tissue Faktor vor und an Tag 1, 3, 5 und 7 nach ionisierender Bestrahlung
Abbildung 10	Ergebnisse der Bestimmung der zellulären TF-Proteinkonzentration in PBMNC vor und Tag 1, 3, 5 und 7 nach ionisierender Bestrahlung
Abbildung 11	Zellvitalität bestrahlter und nicht bestrahlter PBMNC-Kulturen nach Präparation vor Bestrahlung und 1, 3, 5 sowie 7 Tage nach Bestrahlung
Abbildung 12	Ergebnisse der Messung der prokoagulatorischen Aktivität von Mikropartikeln aus PBMNC-Kulturüberstand an Tag 3
Abbildung 13	Darstellung der Rolle der Phospholipide für die prokoagulatorische Aktivität des Überstands
Abbildung 14a	Darstellung des Transmissionsabfalls im Gerinnungstest unter Einwirkung von bestrahlten und unbestrahlten PBMNC

- Abbildung 14b Darstellung der  $t_{80}$ - sowie der  $t_{50}$ -Werte der nach Zugabe von bestrahlten und unbestrahlten PBMNC aufgezeichneten Gerinnungskurven
- Abbildung 15a Darstellung des Transmissionsabfalls im Gerinnungstest unter Einwirkung von Mikropartikeln
- Abbildung 15b Darstellung der  $t_{80}$ - sowie der  $t_{50}$ -Werte der nach Zugabe von Mikropartikeln aufgezeichneten Gerinnungskurven
- Abbildung 16 Darstellungen des Transmissionsabfalls im Gerinnungstest unter Einwirkung von Zell- und Mikropartikel- freien Zellkulturüberstands
- Abbildung 17 Darstellung des Abfalls der Lichttransmission nach Zugabe von bestrahlten PBMNC, Mikropartikeln oder Zellkulturüberstand

## 10. Literaturverzeichnis

- (1) Bachli MD. Historical review. *British Journal of Haematology* 2000;110(2):248-55.
- (2) WRIGHT IS. The nomenclature of blood clotting factors. *Thromb Diath Haemorrh* 1962 May 15;7:381-8.
- (3) Bach R, Nemerson Y, Konigsberg W. Purification and characterization of bovine tissue factor. *J Biol Chem* 1981 Aug 25;256(16):8324-31.
- (4) Scarpati EM, Wen D, Broze GJ, Jr., Miletich JP, Flandermeyer RR, Siegel NR, et al. Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry* 1987 Aug 25;26(17):5234-8.
- (5) Spicer EK, Horton R, Bloem L, Bach R, Williams KR, Guha A, et al. Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Aug;84(15):5148-52.
- (6) Morrissey JH, Fakhrai H, Edgington TS. Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell* 1987 Jul 3;50(1):129-35.
- (7) Fisher KL, Gorman CM, Vehar GA, O'Brien DP, Lawn RM. Cloning and expression of human tissue factor cDNA. *Thromb Res* 1987 Oct 1;48(1):89-99.
- (8) Carson SD, Henry WM, Shows TB. Tissue factor gene localized to human chromosome 1 (1pter----1p21). *Science* 1985 Sep 6;229(4717):991-3.
- (9) Kao FT, Hartz J, Horton R, Nemerson Y, Carson SD. Regional assignment of human tissue factor gene (F3) to chromosome 1p21-p22. *Somat Cell Mol Genet* 1988 Jul;14(4):407-10.
- (10) Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* 1989 Feb 21;28(4):1755-62.
- (11) Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *FASEB J* 1995 Jul;9(10):883-9.
- (12) Eilertsen KE, Osterud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004 Oct;15(7):521-38.

- (13) Armesilla AL, Lorenzo E, Gomez del AP, Martinez-Martinez S, Alfranca A, Redondo JM. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor of activated T cells in human endothelial cells: a role for tissue factor gene expression. *Mol Cell Biol* 1999 Mar;19(3):2032-43.
- (14) Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 2003 Apr;9(4):458-62.
- (15) Chand HS, Ness SA, Kisiel W. Identification of a novel human tissue factor splice variant that is upregulated in tumor cells. *Int J Cancer* 2006 Apr 1;118(7):1713-20.
- (16) Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 1991 Jul 12;66(1):67-79.
- (17) Harlos K, Martin DM, O'Brien DP, Jones EY, Stuart DI, Polikarpov I, et al. Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. *Nature* 1994 Aug 25;370(6491):662-6.
- (18) Muller YA, Ultsch MH, Kelley RF, de Vos AM. Structure of the extracellular domain of human tissue factor: location of the factor VIIa binding site. *Biochemistry* 1994 Sep 13;33(36):10864-70.
- (19) Ruf W, Edgington TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J* 1994 Apr 1;8(6):385-90.
- (20) Paborsky LR, Caras IW, Fisher KL, Gorman CM. Lipid association, but not the transmembrane domain, is required for tissue factor activity. Substitution of the transmembrane domain with a phosphatidylinositol anchor. *J Biol Chem* 1991 Nov 15;266(32):21911-6.
- (21) Cunningham MA, Romas P, Hutchinson P, Holdsworth SR, Tipping PG. Tissue Factor and Factor VIIa Receptor/Ligand Interactions Induce Proinflammatory Effects in Macrophages. *Blood* 1999 Nov 15;94(10):3413-20.
- (22) Parry GC, Mackman N. Mouse embryogenesis requires the tissue factor extracellular domain but not the cytoplasmic domain. *J Clin Invest* 2000 Jun;105(11):1547-54.
- (23) Melis E, Moons L, De MM, Herbert JM, Mackman N, Collen D, et al. Targeted deletion of the cytosolic domain of tissue factor in mice does not affect development. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Aug 24;286(3):580-6.

- (24) Versteeg HH, Peppelenbosch MP, Spek CA. The pleiotropic effects of tissue factor: a possible role for factor VIIa-induced intracellular signalling? *Thromb Haemost* 2001 Dec;86(6):1353-9.
- (25) Morrissey JH. Tissue factor: an enzyme cofactor and a true receptor. *Thromb Haemost* 2001 Jul;86(1):66-74.
- (26) Szotowski B, Antoniak S, Rauch U. Alternatively spliced tissue factor: a previously unknown piece in the puzzle of hemostasis. *Trends Cardiovasc Med* 2006 Jul;16(5):177-82.
- (27) Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989 May;134(5):1087-97.
- (28) Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Mar 2;96(5):2311-5.
- (29) Rivers RP, Hathaway WE, Weston WL. The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes. *Br J Haematol* 1975 Jul;30(3):311-6.
- (30) Conkling PR, Greenberg CS, Weinberg JB. Tumor necrosis factor induces tissue factor-like activity in human leukemia cell line U937 and peripheral blood monocytes. *Blood* 1988 Jul;72(1):128-33.
- (31) Osterud B, Bjorklid E. Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost* 2006 Feb;32(1):11-23.
- (32) Bach RR, Moldow CF. Mechanism of Tissue Factor Activation on HL-60 Cells. *Blood* 1997 May 1;89(9):3270-6.
- (33) Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 2000 Jul 1;96(1):170-5.
- (34) Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Chary-Prigent J, Eschwege V, et al. Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* 1994 Oct 1;153(7):3245-55.
- (35) Bona R, Lee E, Rickles F. Tissue factor apoprotein: intracellular transport and expression in shed membrane vesicles. *Thromb Res* 1987 Nov 15;48(4):487-500.

- (36) Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000 Feb 1;95(3):930-5.
- (37) Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, et al. Elevated Levels of Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in the Peripheral Circulating Blood of Patients With Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2000 Feb 29;101(8):841-3.
- (38) DAVIE EW, RATNOFF OD. WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING. *Science* 1964 Sep 18;145:1310-2.
- (39) Lammle B, Wuillemin WA, Huber I, Krauskopf M, Zurcher C, Pflugshaupt R, et al. Thromboembolism and bleeding tendency in congenital factor XII deficiency--a study on 74 subjects from 14 Swiss families. *Thromb Haemost* 1991 Feb 12;65(2):117-21.
- (40) Bach RR. Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit Rev Biochem* 1988;23(4):339-68.
- (41) Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van V, I, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996 Sep 5;383(6595):73-5.
- (42) Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmback K, Danton MJ, et al. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Jun 25;93(13):6258-63.
- (43) Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ, Jr. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* 1996 Sep 1;88(5):1583-7.
- (44) Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood* 1988 Jan;71(1):1-8.
- (45) Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 1993 Feb 1;81(3):734-44.
- (46) Eilertsen KE, Osterud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004 Oct;15(7):521-38.

- (47) Ruf W, Rehemtulla A, Morrissey JH, Edgington TS. Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function. *J Biol Chem* 1991 Aug 25;266(24):16256.
- (48) Bach R, Gentry R, Nemerson Y. Factor VII binding to tissue factor in reconstituted phospholipid vesicles: induction of cooperativity by phosphatidylserine. *Biochemistry* 1986 Jul 15;25(14):4007-20.
- (49) Kunzelmann-Marche C, Satta N, Toti F, Zhang Y, Nawroth PP, Morrissey JH, et al. The influence exerted by a restricted phospholipid microenvironment on the expression of tissue factor activity at the cell plasma membrane surface. *Thromb Haemost* 2000 Feb;83(2):282-9.
- (50) Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 Dec;74(12):5260-4.
- (51) Orfeo T, Brufatto N, Nesheim ME, Xu H, Butenas S, Mann KG. The Factor V Activation Paradox. *J Biol Chem* 2004 May 7;279(19):19580-91.
- (52) Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG. Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* 2002 Jun 17;100(1):148-52.
- (53) Ahmad SS, Rawala-Sheikh R, Walsh PN. Components and assembly of the factor X activating complex. *Semin Thromb Hemost* 1992;18(3):311-23.
- (54) Hockin MF, Jones KC, Everse SJ, Mann KG. A Model for the Stoichiometric Regulation of Blood Coagulation. *J Biol Chem* 2002 May 17;277(21):18322-33.
- (55) Nesheim ME, Taswell JB, Mann KG. The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. *J Biol Chem* 1979 Nov 10;254(21):10952-62.
- (56) Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, et al. Tissue Factor Modulates the Thrombogenicity of Human Atherosclerotic Plaques. *Circulation* 1997 Feb 4;95(3):594-9.
- (57) Marmur JD, Thiruvikraman SV, Fyfe BS, Guha A, Sharma SK, Ambrose JA, et al. Identification of Active Tissue Factor in Human Coronary Atheroma. *Circulation* 1996 Sep 15;94(6):1226-32.



- (58) Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of Tissue Factor in the Normal Vessel Wall and in the Atherosclerotic Plaque. PNAS 1989 Apr 15;86(8):2839-43.
- (59) Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A. Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in Human Atherosclerotic Plaques : A Role for Apoptosis in Plaque Thrombogenicity. Circulation 1999 Jan 26;99(3):348-53.
- (60) Rauch U, Nemerson Y. Circulating tissue factor and thrombosis. Curr Opin Hematol 2000 Sep;7(5):273-7.
- (61) Gando S, Nanzaki S, Sasaki S, Aoi K, Kemmotsu O. Activation of the extrinsic coagulation pathway in patients with severe sepsis and septic shock. Crit Care Med 1998 Dec;26(12):2005-9.
- (62) Suefuji H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Soejima H, Motoyama T, et al. Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction. Am Heart J 1997 Aug;134(2 Pt 1):253-9.
- (63) Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR. The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. Thromb Haemost 1998 Feb;79(2):276-81.
- (64) Key NS, Slungaard A, Dandele L, Nelson SC, Moertel C, Styles LA, et al. Whole Blood Tissue Factor Procoagulant Activity Is Elevated in Patients With Sickle Cell Disease. Blood 1998 Jun 1;91(11):4216-23.
- (65) Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. Circ Res 2005 Jun 24;96(12):1233-9.
- (66) Butenas S, Mann KG. Active tissue factor in blood? Nat Med 2004 Nov;10(11):1155-6.
- (67) Bowers DC, McNeil DE, Liu Y, Yasui Y, Stovall M, Gurney JG, et al. Stroke As a Late Treatment Effect of Hodgkin's Disease: A Report From the Childhood Cancer Survivor Study. J Clin Oncol 2005 Sep 20;23(27):6508-15.
- (68) Hull MC, Morris CG, Pepine CJ, Mendenhall NP. Valvular dysfunction and carotid, subclavian, and coronary artery disease in survivors of hodgkin lymphoma treated with radiation therapy. JAMA 2003 Dec 3;290(21):2831-7.

- (69) King V, Constine LS, Clark D, Schwartz RG, Muhs AG, Henzler M, et al. Symptomatic coronary artery disease after mantle irradiation for Hodgkin's disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996 Nov 1;36(4):881-9.
- (70) Waksman R, Bhargava B, Mintz GS, Mehran R, Lansky AJ, Satler LF, et al. Late total occlusion after intracoronary brachytherapy for patients with in-stent restenosis. *J Am Coll Cardiol* 2000 Jul;36(1):65-8.
- (71) Finkelstein A, Hausleiter J, Doherty T, Takizawa K, Bergman J, Liu M, et al. Intracoronary beta-irradiation enhances balloon-injury-induced tissue factor expression in the porcine injury model. *Int J Cardiovasc Intervent* 2004;6(1):20-7.
- (72) Verheij M, Dewit LG, van Mourik JA. The effect of ionizing radiation on endothelial tissue factor activity and its cellular localization. *Thromb Haemost* 1995 May;73(5):894-5.
- (73) Sreekumar A, Nyati MK, Varambally S, Barrette TR, Ghosh D, Lawrence TS, et al. Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. *Cancer Res* 2001 Oct 15;61(20):7585-93.
- (74) Garg SK, Niemetz J. Tissue factor activity of normal and leukemic cells. *Blood* 1973 Nov;42(5):729-35.
- (75) van der MA, Vandamme M, Squiban C, Gaugler MH, Mouthon MA. Inflammatory reaction and changes in expression of coagulation proteins on lung endothelial cells after total-body irradiation in mice. *Radiat Res* 2003 Dec;160(6):637-46.
- (76) Butenas S, Bouchard BA, Brummel-Ziedins KE, Parhami-Seren B, Mann KG. Tissue factor activity in whole blood. *Blood* 2005 Apr 1;105(7):2764-70.
- (77) Hachiya M, Shimizu S, Osawa Y, Akashi M. Endogenous production of tumour necrosis factor is required for manganese superoxide dismutase expression by irradiation in the human monocytic cell line THP-1. *Biochem J* 1997 Dec 1;328 ( Pt 2):615-23.
- (78) Sherman ML, Datta R, Hallahan DE, Weichselbaum RR, Kufe DW. Regulation of tumor necrosis factor gene expression by ionizing radiation in human myeloid leukemia cells and peripheral blood monocytes. *J Clin Invest* 1991 May;87(5):1794-7.
- (79) Hachiya M, Takada M, Sekikawa K, Akashi M. Endogenous production of TNFalpha is a potent trigger of NFkappaB activation by irradiation in human monocytic cells THP-1. *Cytokine* 2004 Feb 21;25(4):147-54.

- (80) Grimm S, Baeuerle PA. The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* 1993 Mar 1;290 ( Pt 2):297-308.
- (81) Morgan EN, Pohlman TH, Vocelka C, Farr A, Lindley G, Chandler W, et al. Nuclear factor  $\kappa$ B mediates a procoagulant response in monocytes during extracorporeal circulation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 125[1], 165-171. 2003.  
Ref Type: Abstract
- (82) Oeth PA, Parry GC, Kunsch C, Nantermet P, Rosen CA, Mackman N. Lipopolysaccharide induction of tissue factor gene expression in monocytic cells is mediated by binding of c-Rel/p65 heterodimers to a kappa B-like site. *Mol Cell Biol* 1994 Jun 1;14(6):3772-81.
- (83) Mackman N, Brand K, Edgington TS. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. *J Exp Med* 1991 Dec 1;174(6):1517-26.
- (84) Le DT, Rapaport SI, Rao LV. Relations between factor VIIa binding and expression of factor VIIa/tissue factor catalytic activity on cell surfaces. *J Biol Chem* 1992 Aug 5;267(22):15447-54.
- (85) Bach R, Rifkin DB. Expression of Tissue Factor Procoagulant Activity: Regulation by Cytosolic Calcium. *PNAS* 1990 Sep 15;87(18):6995-9.
- (86) Krishnaswamy S, Field KA, Edgington TS, Morrissey JH, Mann KG. Role of the membrane surface in the activation of human coagulation factor X. *J Biol Chem* 1992 Dec 25;267(36):26110-20.
- (87) Bruckheimer EM, Schroit AJ. Membrane phospholipid asymmetry: host response to the externalization of phosphatidylserine. *J Leukoc Biol* 1996 Jun;59(6):784-8.
- (88) Greeno EW, Bach RR, Moldow CF. Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. *Lab Invest* 1996 Aug;75(2):281-9.
- (89) Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992 Apr 1;148(7):2207-16.

- (90) Aupeix K, Toti F, Satta N, Bischoff P, Freyssinet JM. Oxysterols induce membrane procoagulant activity in monocytic THP-1 cells. *Biochem J* 1996 Mar 15;314 ( Pt 3):1027-33.
- (91) Goldin-Lang P, Niebergall F, Antoniak S, Szotowski B, Rosenthal P, Pels K, et al. Ionizing radiation induces upregulation of cellular procoagulability and tissue factor expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Thromb Res* 2007 Mar 1.
- (92) Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, Hoffman MR. Tissue factor de-encryption: ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999 Jun;10(4):201-10.
- (93) Bach RR, Moldow CF. Mechanism of Tissue Factor Activation on HL-60 Cells. *Blood* 1997 May 1;89(9):3270-6.
- (94) Caplice NM, Mueske CS, Kleppe LS, Simari RD. Presence of Tissue Factor Pathway Inhibitor in Human Atherosclerotic Plaques Is Associated With Reduced Tissue Factor Activity. *Circulation* 1998 Sep 15;98(11):1051-7.
- (95) Hamik A, Setiadi H, Bu G, McEver RP, Morrissey JH. Down-regulation of Monocyte Tissue Factor Mediated by Tissue Factor Pathway Inhibitor and the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein. *J Biol Chem* 1999 Feb 19;274(8):4962-9.
- (96) Zwaal RFA, Schroit AJ. Pathophysiologic Implications of Membrane Phospholipid Asymmetry in Blood Cells. *Blood* 1997 Feb 15;89(4):1121-32.
- (97) Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* 2003 Jul;1(7):1655-62.
- (98) gnat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2004 Apr;91(4):667-73.
- (99) Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000 Feb 1;95(3):930-5.
- (100) Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PG, et al. Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* 1997 Nov 18;96(10):3534-41.

- (101) Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000 Feb 1;95(3):930-5.
- (102) gnat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F, Arnoux D, Anfosso F, Bardin N, et al. Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 2004 Apr;91(4):667-73.
- (103) Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001 Apr;85(4):639-46.
- (104) Biro E, Sturk-Maquelin KN, Vogel GM, Meuleman DG, Smit MJ, Hack CE, et al. Human cell-derived microparticles promote thrombus formation in vivo in a tissue factor-dependent manner. *J Thromb Haemost* 2003 Dec;1(12):2561-8.
- (105) Losche W, Scholz T, Temmler U, Oberle V, Claus RA. Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor to monocytes but not to neutrophils. *Platelets* 2004 Mar;15(2):109-15.
- (106) Osterud B. The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Semin Hematol* 2001 Oct;38(4 Suppl 12):2-5.
- (107) Shinomiya N. New concepts in radiation-induced apoptosis: 'premitotic apoptosis' and 'postmitotic apoptosis'. *J Cell Mol Med* 2001 Jul;5(3):240-53.
- (108) Verheij M, Bartelink H. *Cell and Tissue Research* 2000;301(1):133-42.
- (109) Koyama T, Nishida K, Ohdama S, Sawada M, Murakami N, Hirosawa S, et al. Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. *Br J Haematol* 1994 Jun;87(2):343-7.
- (110) Sturk-Maquelin KN, Nieuwland R, Romijn FPHT, Eijssman L, Hack CE, Sturk A. Pro- and non-coagulant forms of non-cell-bound tissue factor in vivo. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2003;1(9):1920-6.
- (111) Conomy JP, Kellermeyer RW. Delayed cerebrovascular consequences of therapeutic radiation. A clinicopathologic study of a stroke associated with radiation-related carotid arteriopathy. *Cancer* 1975 Nov;36(5):1702-8.
- (112) Brown JM, Farjardo LF, Stewart JR. Mural thrombosis of the heart induced by radiation. *Arch Pathol* 1973 Jul;96(1):1-4.

- (113) Mavor GE, Kasenally AT, Harper DR, Woodruff PW. Thrombosis of the subclavian-axillary artery following radiotherapy for carcinoma of the breast. *Br J Surg* 1973 Dec;60(12):983-5.
- (114) Costa MA, Sabate M, van der Giessen WJ, Kay IP, Cervinka P, Ligthart JMR, et al. Late Coronary Occlusion After Intracoronary Brachytherapy. *Circulation* 1999 Aug 24;100(8):789-92.
- (115) Waksman R, Ajani AE, White RL, Pinnow E, Dieble R, Bui AB, et al. Prolonged Antiplatelet Therapy to Prevent Late Thrombosis After Intracoronary  $\gamma$ -Radiation in Patients With In-Stent Restenosis : Washington Radiation for In-Stent Restenosis Trial Plus 6 Months of Clopidogrel (WRIST PLUS). *Circulation* 2001 May 15;103(19):2332-5.
- (116) Waksman R, Ajani AE, Pinnow E, Cheneau E, Leborgne L, Dieble R, et al. Twelve Versus Six Months of Clopidogrel to Reduce Major Cardiac Events in Patients Undergoing  $\gamma$ -Radiation Therapy for In-Stent Restenosis: Washington Radiation for In-Stent restenosis Trial (WRIST) 12 Versus WRIST PLUS. *Circulation* 2002 Aug 13;106(7):776-8.
- (117) Waksman R. Late Thrombosis After Radiation : Sitting on a Time Bomb. *Circulation* 1999 Aug 24;100(8):780-2.
- (118) Harker LA, Hanson SR, Wilcox JN, Kelly AB. Antithrombotic and antilesion benefits without hemorrhagic risks by inhibiting tissue factor pathway. *Haemostasis* 1996;26 Suppl 1:76-82.
- (119) Bierhaus A, Zhang Y, Quehenberger P, Luther T, Haase M, Muller M, et al. The dietary pigment curcumin reduces endothelial tissue factor gene expression by inhibiting binding of AP-1 to the DNA and activation of NF-kappa B. *Thromb Haemost* 1997 Apr;77(4):772-82.
- (120) Pendurthi UR, Williams JT, Rao LVM. Inhibition of Tissue Factor Gene Activation in Cultured Endothelial Cells by Curcumin : Suppression of Activation of Transcription Factors Egr-1, AP-1, and NF- $\kappa$ B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Dec 1;17(12):3406-13.
- (121) Stephens AC, Rivers RP. Suppression of human monocyte tissue factor synthesis by antisense oligodeoxynucleotide. *Thromb Res* 1997 Mar 1;85(5):387-98.
- (122) Cavusoglu E, Chen I, Rappaport J, Marmur JD. Inhibition of Tissue Factor Gene Induction and Activity Using a Hairpin Ribozyme. *Circulation* 2002 May 14;105(19):2282-7.

- (123) Presta L, Sims P, Meng YG, Moran P, Bullens S, Bunting S, et al. Generation of a humanized, high affinity anti-tissue factor antibody for use as a novel antithrombotic therapeutic. *Thromb Haemost* 2001 Mar;85(3):379-89.
- (124) Suleymanov OD, Szalony JA, Salyers AK, LaChance RM, Parlow JJ, South MS, et al. Pharmacological Interruption of Acute Thrombus Formation with Minimal Hemorrhagic Complications by a Small Molecule Tissue Factor/Factor VIIa Inhibitor: Comparison to Factor Xa and Thrombin Inhibition in a Nonhuman Primate Thrombosis Model. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 Sep 1;306(3):1115-21.
- (125) Suleymanov OD, Szalony JA, Salyers AK, LaChance RM, Parlow JJ, South MS, et al. Pharmacological Interruption of Acute Thrombus Formation with Minimal Hemorrhagic Complications by a Small Molecule Tissue Factor/Factor VIIa Inhibitor: Comparison to Factor Xa and Thrombin Inhibition in a Nonhuman Primate Thrombosis Model. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 Sep 1;306(3):1115-21.
- (126) de JE, Dekkers PE, Creasey AA, Hack CE, Paulson SK, Karim A, et al. Tissue factor pathway inhibitor dose-dependently inhibits coagulation activation without influencing the fibrinolytic and cytokine response during human endotoxemia. *Blood* 2000 Feb 15;95(4):1124-9.
- (127) Abraham E, Reinhart K, Opal S, Demeyer I, Doig C, Rodriguez AL, et al. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003 Jul 9;290(2):238-47.
- (128) Koh KK, Quon MJ, Han SH, Ahn JY, Lee Y, Shin EK. Combined therapy with ramipril and simvastatin has beneficial additive effects on tissue factor activity and prothrombin fragment 1+2 in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2006 Sep 9.

## **11. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## 12. Erklärung über Selbständigkeit

„Ich, Florian Niebergall erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: **„Einfluss der ionisierenden Bestrahlung auf den Gerinnungsfaktor Tissue Faktor in peripheren mononukleären Blutzellen“** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## 13. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ursula Rauch-Kröhnert für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der für diese Arbeit erforderlichen Mittel und Geräte. Besonders hervorheben möchte ich hierbei ihre stets vorbildliche Betreuung, die von einer freundlichen, unkomplizierten und kollegialen Atmosphäre geprägt war.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere meinem Kommilitonen Henry Kayser, Viet Tran, Björn Szotowski, Silvio Antoniak, Franziska Bleis sowie Dr. Petra Goldin-Lang für die nette Zusammenarbeit, die praktischen Tipps und die gegenseitige moralische Unterstützung bedanken.

Ferner gebührt mein Dank den Mitarbeitern der Medizinphysik im Campus Benjamin Franklin der Charité, Herrn Dr. Rosenthal, Frau Köhler und Herrn Sailer sowie allen anderen dortigen Kollegen für ihre hilfreiche Kooperation bei der Durchführung der Bestrahlungsexperimente.

Des weitern danke ich meiner Familie, meinem Vater Gerhard, der mich all die Jahre großzügig unterstützte und mich immer wieder ermutigte, die Doktorarbeit zügig abzuschließen sowie meiner Schwester Roda, für ihre nützlichen Tipps zur Verbesserung dieser Arbeit. Außerdem Tai-Yang Kim für sein Korrekturlesen sowie meiner Freundin Franziska Vater.