

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
DIREKTOR: PROF. DR. G. SCHMITZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Prokoagulante Aktivität des Monozyten:
Fc γ -Rezeptoren als Trigger und Variable

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Martin Leonhard Fröbe

2008

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR KLINISCHE CHEMIE UND LABORATORIUMSMEDIZIN
DIREKTOR: PROF. DR. G. SCHMITZ
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Prokoagulante Aktivität des Monozyten:
Fc γ -Rezeptoren als Trigger und Variable

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Martin Leonhard Fröbe

2008

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerd Schmitz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Hengstenberg
Tag der mündlichen Prüfung: 24.3.2009

1 EINLEITUNG	1
1.1 Einführung	1
1.2 Tissue Factor	3
1.3 Gerinnungskaskade	6
1.4 Monozyten und monozytäre Subpopulationen.....	11
1.5 Fc γ -Rezeptoren.....	14
1.6 Wechselwirkungen der Fc γ -Rezeptoren mit ihren Liganden und Signaltransduktion.....	17
1.7 Induktion monozytärer (TF-assozierter) prokoagulanter Aktivität im Zusammenhang mit Fc γ -Rezeptoren.....	22
1.8 Ziele der Arbeit.....	24
2 MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Material	26
2.1.1 Geräte (Geräte für Stofftrennung, -mischung und -transfer; Inkubatoren; Messgeräte)	26
2.1.2 Verbrauchsmaterial (Einzelgefäße, Kulturschalen und Platten; Hilfsmittel für Stofftrennung, -mischung und -transfer)	27
2.1.3 Chemikalien (protektive Substanzen; Substanzen zur Zell- und Protein- desintegration; Salze und Zucker; Pufferlösungen und Lösemittel; Farbstoffe und Fluoreszenzmarker; Zellstimuli)	28
2.1.4 Nukleinsäuren (DNA; Primer; RNA).....	30
2.1.5 Proteine (Proteingemische und Aminosäuren; Antikörper und Fab-Fragmente; fluoreszenzmarkierte Antikörper).....	30
2.1.6 Blutbestandteile und Zellkulturmedien.....	32
2.1.7 Kits und Zubehör (Zellpräparation; Proteinbiochemie; Nukleinsäurepräparation)	32

2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Anmerkungen.....	35
2.2.2 Gewinnung von Blutzellen/-plasma	35
2.2.2.1 Buffy-Coat-Präparate.....	35
2.2.2.2 Venöses Vollblut.....	36
2.2.2.3 Poolplasma und autologes Plasma.....	36
2.2.3 Bestimmung der Leukozytenzahl	37
2.2.4 Isolierung von Monozyten und deren CD16 ⁺ /CD16 ⁻ -Subpopulationen	37
2.2.4.1 Isolierung mononukleärer Zellen (PBMC) aus Buffy-Coat-Präparaten mit Vacutainers oder FICOLL	37
2.2.4.2 Positivisolierung von Monozyten aus PBMC mit Magnetbeads.....	38
2.2.4.3 Negativisolierung von Monozyten aus PBMC mit Magnetbeads	39
2.2.4.4 Adhärenzselektion von Monozyten aus PBMC	40
2.2.4.5 Positiv- bzw. Negativisolierung von CD16 ⁺ - bzw. CD16 ⁻ -Monozyten aus negativisierten Monozyten mit Magnetbeads	40
2.2.5 Spezielle Inkubationen der Monozyten und Monozytensubpopulationen.....	41
2.2.5.1 Crosslinking von Fc γ -Rezeptoren mit immobilisierten Antikörpern	41
2.2.5.2 Crosslinking von Fc γ -Rezeptoren mit immobilisierten F(ab') ₂ -Fragmenten..	42
2.2.5.3 Crosslinking von Fc γ -Rezeptoren mit gelösten F(ab') ₂ -Fragmenten.....	43
2.2.6 Inkubation von Vollblut	45
2.2.7 Messung des Calcium-Influx	45
2.2.8 Messung der TF-mRNA-Expression.....	46
2.2.8.1 Konventionelle PCR mit dem Thermocycler	46
2.2.8.2 Erstellung von TF-Amplimer-Standards	47
2.2.8.3 RNA-Extraktion.....	48
2.2.8.4 Quantifizierung der RNA.....	48
2.2.8.5 Reverse Transkription	49
2.2.8.6 Real-Time-PCR am LightCycler mit SYBR Green I.....	50
2.2.9 Quantifizierung von Protein	51
2.2.9.1 Quantifizierung des Gesamtproteins.....	52
2.2.9.2 Quantifizierung von Tissue Factor mittels ELISA	52
2.2.10 Messung der Protein-Oberflächenexpression bzw. 4-Farb-Durchflusszytometrie	53
2.2.11 Messung der Rekalzifizierungszeit	54

2.2.12 Auswertung	54
2.2.12.1 Gating und Mittelwertberechnung in der Durchflusszytometrie	54
2.2.12.2 Absolute Quantifizierung von Matrizen-DNA.....	56
2.2.12.3 Korrekturmethoden.....	57
2.2.12.4 Statistische Methoden	58
2.2.12.5 Veranschaulichung statistischer Zusammenhänge	61
2.2.12.6 Geräteunabhängige Software und Datenbanken.....	63
3 ERGEBNISSE	64
3.1 Untersuchungen zu Isolierung, Subpopulationsisolierung und prokoagulanter Aktivität von Monozyten	64
3.1.1 Isolierung von Monozyten	64
3.1.2 Isolierung monozytärer CD16 ⁺ /CD16 ⁻ -Subpopulationen	65
3.1.3 Untersuchungen zur (relativen) prokoagulanten Aktivität.....	67
3.1.3.1 Zusammenhang zwischen (relativer) PCA und Rekalzifizierungszeit (RKZ)	67
3.1.3.2 Effekt eines neutralisierenden Anti-TF-Antikörpers auf die Rekalzifizierungszeit bzw. rPCA.....	71
3.1.3.3 Zusammenhang zwischen Rekalzifizierungszeit (RKZ) und monozytärer TF-Oberflächenexpression.....	73
3.1.2 Untersuchungen zur Variabilität monozytärer TF-mRNA-Expression mit absoluter Quantifizierung der TF-cDNA durch Real-Time-PCR	77
3.2.1 Reverse Transkription monozytärer Gesamt-RNA.....	77
3.2.2 Etablierung der quantitativen Real-Time-PCR.....	79
3.2.2.1 Primer-Spezifität und Amplimer-Aufreinigung	80
3.2.2.2 Erstellung von TF-Amplimer-Standardkurven	81
3.2.2.3 Absolute Quantifizierung der TF-cDNA.....	81
3.2.3 Variabilitätsabschätzungen	84
3.2.3.1 Abschätzung des Messbereichs	85
3.2.3.2 Intra- und Inter-Assay-Variabilität der Real-Time-PCR	86
3.2.3.3 Intra- und Inter-Assay-Variabilität der reversen Transkription	87
3.3 Fcγ-Rezeptoren als Trigger prokoagulanter Aktivität am Monozyten	89
3.3.1 Initiale Zellaktivierung (Calcium-Influx)	89
3.3.2 TF-mRNA-Expression	94
3.3.3 Gesamte TF-Proteinexpression.....	95
3.3.4 TF-Oberflächenexpression	101
3.3.5 Prokoagulante Aktivität.....	102

3.4 Fc γ -Rezeptor-III-Expression als Variable der Induktion prokoagulanter Aktivität am Monozyten.....	107
3.4.1 Fc γ -Rezeptor-III-Expression als abhängige Variable: Veränderung der Fc γ -Rezeptor-III-Oberflächenexpression (bzw. der CD16 $^+$ /CD16 $^-$ -Subpopulationen) unter PCA-Induktion mit LPS.....	107
3.4.2 Fc γ -Rezeptor-III-Expression als unabhängige Variable: TF-Oberflächenexpression und rPCA in Abhängigkeit von der Fc γ -Rezeptor-III-Oberflächenexpression (bzw. von der CD16 $^+$ /CD16 $^-$ -Subpopulation)	110
3.4.2.1 TF-Oberflächenexpression in Abhängigkeit von der Fc γ -Rezeptor-III-Oberflächenexpression	111
3.4.2.2 rPCA in Abhängigkeit von der monozytären Subpopulation (CD16 $^+$ bzw. CD16 $^-$).....	112
4 DISKUSSION	116
4.1 Isolierung von Monozyten	116
4.2 Isolierung monozytärer CD16 $^+$ /CD16 $^-$ -Subpopulationen	116
4.3 Zusammenhänge zwischen Rekalzifizierungszeit, prokoagulanter Aktivität, TF-Aktivität und TF-Oberflächenexpression beim Monozyten	118
4.3.1 Korrelation von blockierter und unblockierter rPCA – Beschreibung einer nicht blockierbaren rPCA	119
4.3.2 Korrelation von RKZ bzw. rPCA und TF-Oberflächenexpression.....	121
4.4 Real-Time-PCR für TF mit absoluter Quantifizierung von TF-cDNA	123
4.5 Effekt der selektiven Fc γ R-Stimulation mit immobilisierten Anti-Fc γ R-F(ab') $_2$ s bzw. -Antikörpern auf TF-/PCA-Induktion	124
4.6 Effekt der selektiven Fc γ R-Stimulation mit gelösten Anti-Fc γ R-F(ab') $_2$ s auf Zellaktivierung, TF- und PCA-Induktion.....	126
4.7 Regulation der CD16-Oberflächenexpression unter LPS-Stimulation.....	128
4.8 Abhängigkeit der TF-Expression und TF-Aktivität (bzw. rPCA) von der Fc γ RIII-Expression	129

5 ZUSAMMENFASSUNG.....	131
6 LITERATUR	134
7 ABKÜRZUNGEN UND STICHWORTE	153
DANKSAGUNG	158
LEBENSLAUF	159

1 EINLEITUNG

1.1 *Einführung*

Die Modulierung der Blutgerinnung spielt heutzutage in verschiedensten medizinischen Situationen eine essentielle Rolle. Einerseits die Hemmung des Gerinnungssystems bei thrombosebegünstigenden Erkrankungen oder Eingriffen, andererseits dessen Unterstützung im Rahmen angeborener oder erworbener Mindergerinnbarkeit stellen nicht mehr wegzudenkende Standardtherapien der klinischen Praxis dar. Seit der ersten detaillierteren Beschreibung der plasmatischen Gerinnungskaskade durch zwei Forschergruppen in den 60er Jahren [MacFarlane 1964, Davie and Ratnoff 1964] mussten die Modellvorstellungen jedoch immer wieder modifiziert werden, um die enorme Komplexität der Interaktionen beteiligter Zellen und Proteine besser verstehen zu können (vgl. 1.3). So konnte z. B. die Wichtigkeit des Zusammenwirkens von „plasmatischer“ und „zellulärer“ Gerinnung sowie von (klassischem) intrinsischem und (klassischem) extrinsischem Gerinnungssystem aufgezeigt werden (vgl. 1.3), wengleich Vieles noch unklar ist, wie z. B. der Mechanismus, über den der rekombinante Gerinnungsfaktor VIIa bei unterschiedlichen Gerinnungsdefekten hilft, oder die Rolle des erst in letzter Zeit entdeckten thrombozytären Tissue Factors [Mackman et al. 2007, Schwertz et al. 2006, Panes et al. 2007].

Innerhalb des Netzwerks der Blutgerinnungsregulation fällt dem Glykoprotein Tissue Factor eine wichtige Rolle zu. Es wird heutzutage als *der Initiator* der Gerinnungskaskade *in vivo* angesehen und scheint – aus verschiedenen Reservoirs stammend – sowohl für arterielle als auch für venöse Thrombosen einen entscheidenden Trigger darzustellen. Gerade die direkte Beeinflussung der Tissue-Factor-Regulation und -Wirkung ist somit als viel versprechender Ansatz in der Prävention und Therapie thromboembolischer Ereignisse anzusehen. [Mackman et al. 2007]

Aufgrund ausgiebiger Wechselwirkungen zwischen den phylogenetisch alten Reaktionen Blutgerinnung und Entzündung, die vor allem durch die Tissue-Factor-Aktivierungskaskade, Thrombin, das Protein-C-System und das fibrinolytische (oder Plasminogen-Plasmin-) System mediert werden, können Entzündungsreaktionen bzw. Aktivierungen des Immunsystems einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung der Gerinnungskaskade ausüben und umgekehrt. [Choi et al. 2006, Levi and van der Poll 2005] Dies wird eindrucksvoll deutlich bei Krankheitsbildern wie der bakteriellen Sepsis mit der Folge einer eventuellen disseminierten intravasalen Gerinnung (z. B.

beim Waterhouse-Friedrichsen-Syndrom [Henriksson et al. 2005]) oder den venösen und arteriellen Thrombosen beim Vollbild des Antiphospholipidsyndroms. Auch bei der Arteriosklerose führt eine Entzündungsreaktion in der Gefäßwand zur Akkumulation von Tissue Factor in der arteriosklerotischen Läsion und begünstigt somit die rasche Thrombusbildung nach einer Plaqueruptur [Levi and van der Poll 2005].

Innerhalb des Immunsystems wiederum fällt den Fc-Rezeptoren eine Schlüsselrolle zu. Auf mehreren Zellarten des Blutes exprimiert, stellen sie entscheidende Elemente in der Aktivierung und Abschwächung von Immunantworten dar und vernetzen humorale und zellvermittelte Immunität. Unter den Fc-Rezeptoren nehmen schließlich die Fc γ -Rezeptoren eine besondere Stellung ein, da ihre Klasse den einzigen bekannten inhibitorisch wirkenden Fc-Rezeptor beinhaltet, und die meisten der aktivierenden Fc-Rezeptoren mit den Fc γ -Rezeptoren gemeinsamen Untereinheit in Wechselwirkung treten. Obwohl die Fc γ -Rezeptoren bereits vor über 40 Jahren entdeckt wurden, wurde Ihre Schlüsselfunktion für den afferenten wie auch den effektorischen Weg der Immunantwort erst im letzten Jahrzehnt erkannt. [Nimmerjahn and Ravetch 2006, Takai 2005]

Monozyten stehen gewissermaßen an der Schnittstelle zwischen Immunsystem und Gerinnungssystem, da sie einerseits die Fc- bzw. Fc γ -Rezeptoren besitzen, denen eine Schlüsselstellung innerhalb des Immunsystems zufällt [Nimmerjahn and Ravetch 2006, Satta et al. 1994], andererseits den für die Initiierung und die Ausbreitung („propagation“) der Thrombinbildung entscheidenden Tissue Factor liefern können [Eilertsen and Østerud 2004]. Ihre Eigenschaft, eine geeignete Membranoberfläche für die Zusammenlagerung und Funktion aller Gerinnungskomplexe zu bieten, die im Rahmen der durch Tissue Factor eingeleiteten Thrombinproduktion erforderlich sind, wurde als einzigartig unter den Zellarten des Blutes beschrieben [Bouchard and Tracy 2001]. Intravasaler Tissue Factor, für den Monozyten eine der wichtigsten Quellen darstellen (vgl. 1.2), spielt schließlich bei der *pathologischen* Initiierung der Gerinnung im Rahmen von Entzündungsprozessen wie z. B. bei Sepsis (s. o.), Arteriosklerose oder Neoplasien eine zentrale, wenn nicht sogar die entscheidende Rolle [Choi et al. 2006, Tilley and Mackman 2006, Mackman et al. 2007]. Auch wenn wichtige Beiträge anderer Zellarten im komplexen Netzwerk der Blutgerinnung zunehmend erkannt werden, fällt dort dem Monozyten – neben dem Thrombozyten – weiterhin eine zentrale Stellung zu.

1.2 **Tissue Factor**

Tissue Factor (Synonyme: TF, Thromboplastin, Gewebethromboplastin, Gerinnungsfaktor III, CD142), ein zelluläres transmembranes Oberflächenglykoprotein ist der Initiator der Gerinnungskaskade in vivo (vgl. Abschnitt 1.3 und Abb. 1) [Bach 1988]. Er wird darüber hinaus wegen struktureller Gemeinsamkeiten mit dem Interferon- γ -Rezeptor als Klasse-II-Zytokinrezeptor eingeordnet und kann signalvermittelnd nach intrazellulär wirken [Versteeg and Ruf 2006]. Mehrere Studien implizieren wesentliche Funktionen für Tissue Factor bei der Thrombenbildung [Mackman et al. 2007], der embryonalen Blutgefäßentwicklung [Carmeliet et al. 1996], Angiogenese im Rahmen der Wundheilung [Nakagawa et al. 1998], tumorassozierter Gefäßneubildung und Metastasierung [Rak et al. 2006, Contrino et al. 1996], Zelladhäsion und -migration [Pyo et al. 2004, Randolph et al. 1998] sowie bei der Initiierung einer Entzündungsreaktion [Ahamed et al. 2006, Spek 2004]. Verschiedene Regulationsmechanismen bestimmen durch Oberflächenpräsentation (Regulation der Produktion auf transkriptionalem, translationalem und posttranskriptionalem Niveau und des Transports an die Zelloberfläche), Funktionalität (z. B. durch Maskierung/Demaskierung) und Wirkungsinhibition (vor allem durch die drei wichtigsten endogenen gerinnungshemmenden Wege TFPI, das Protein-C-System und Antithrombin) die lokale TF-Aktivität. [Monroe and Key 2007, Tilley and Mackman 2006, Eilertsen and Østerud 2004, Rao and Pendurthi 1998]

Die verschiedenen Lokalisationen von Tissue Factor bzw. TF-Pools [Morrissey 2003] umfassen zellmembrangebundenen TF, intrazellulären TF [Schecter et al. 1997, Mandal et al. 2006], TF-haltige extrazelluläre Mikropartikel/Mikrovesikel [Müller et al. 2003] und ungebundenen, löslichen TF im Blutplasma [Bogdanov et al. 2003] (vgl. Abb. 1 in Abschnitt 1.3). Intravasaler Tissue Factor wird auch durch die Begriffe „blood-borne tissue factor“ oder „circulating tissue factor“ beschrieben [Morrissey 2003]. Die funktionelle Unterteilung des oberflächenassoziierten TF in aktiv und inaktiv (s. u.) erhöht die Zahl der unterscheidbaren TF-Pools weiter. [Eilertsen and Østerud 2004, Schecter et al. 1997] Das Vorkommen von zellassoziiertem TF ist von der Zellart und dem jeweiligen Organ abhängig. TF kommt insbesondere in gut vaskularisierten Organen wie Plazenta, Gehirn, Herz, Nieren, Lunge, Uterus und Haut in relativ hohen Mengen vor [Drake et al. 1989, Fleck et al. 1990], weiterhin vor allem in Zellen, die die Blutgefäßwand umgeben (sog. „hemostatic envelope“ [Drake et al. 1989]), z. B. Fibroblasten der Gefäßadventitia, glatte Muskelzellen (v. a. der Gefäßmedia), Keratinozyten der Haut, Astroglia des Gehirns und Myozyten des Herzmuskels. Dahingegen kommt er nur unter bestimm-

ten Bedingungen auf Zellen vor, die in direktem Kontakt mit dem Blut stehen. Während eine TF-Eigenexpression von Monozyten seit längerem bekannt ist, konnte sie erst über die letzten Jahre auch für Thrombozyten [Müller et al. 2003, Panes et al. 2007, Schwertz et al. 2006], Granulozyten [Maugeri et al. 2006, Ritis et al. 2006, Moosbauer et al. 2007] und Endothelzellen [Contrino et al. 1996, Mackman et al. 2007] untermauert werden – während für Lymphozyten und Erythrozyten keine TF-Eigenexpression nachgewiesen werden konnte [Morrissey 2003, Eilertsen and Østerud 2004]. Komplizierend war und ist dabei insbesondere die Unterscheidung zwischen einer Eigenexpression und einer Exponierung infolge Erwerbs durch TF-haltige Mikropartikel. [Mackman et al. 2007, Reinhardt 2007] Weiterhin konnte inzwischen die Bildung TF-haltiger Mikropartikel durch Leukozyten (insbes. Monozyten), Endothelzellen, Thrombozyten, glatte Gefäßmuskulatur und aus arteriosklerotischen Plaques gezeigt werden [Mackman et al. 2007]. In den letzten Jahren stiegen die Anhalte dafür, dass Vollblut sogar beim Gesunden TF-Aktivität besitzen kann [Giesen et al. 1999, Østerud 1998], was allerdings immer noch kontrovers diskutiert wird [Monroe and Key 2007, Østerud and Bjorklid 2006, Butenas and Mann 2004].

Das Gen für Tissue Factor liegt auf Chromosom 1 und umfasst 6 Exons, die durch 5 Introns getrennt werden. Die Promotorregion hat Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 (transcription factor activator protein-1), NF-κB, Egr-1 (Early Growth Response Protein 1) und Sp1. Die TF-*Expression* kann durch LPS, Phorbolester, oxidierte Lipoproteine, VEGF (vascular endothelial growth factor) und proinflammatorische Stimuli wie Interleukin-1β und TNF-alpha induziert werden. [Eilertsen and Østerud 2004] Im Vollblut konnte eine monozytäre TF-*Induktion* bisher nur durch LPS und Immunkomplexe im Zusammenhang mit der Bildung proinflammatorischer Zytokine gezeigt werden [Eilertsen and Østerud 2005, Østerud 1998], wobei LPS die Aktivierung/Verstärkung der TF-Produktion vor allem auf transkriptionellem Niveau bedingt [Gregory et al. 1989]. In vitro hingegen wurde außerdem eine Aktivierung von Monozyten mit begleitender TF-Expression durch Komplementkomplexe, Tumorzellen, Anaphylatoxine, Lymphokine und proinflammatorische Zytokine gezeigt [Østerud 1998, Eilertsen and Østerud 2004].

Der aktivierende Effekt (bzw. die Funktionalität) von TF auf die Gerinnungskaskade (s. 1.3) unterscheidet sich je nach Vorkommensart. Keine Aktivierung erfolgt natürlicherweise durch intrazelluläre TF-Moleküle. Für die nicht mikropartikelgebundene lösliche Form von TF konnte zumindest bislang keine Initiierung der Faktor-VIIa-medierten Thrombingenerierung nachgewiesen werden, für den mit Mikroparti-

keln assoziierten TF hingegen schon. Nur ein Teil des auf der Zelloberfläche vorliegenden TF kann die Gerinnung aktivieren, der restliche Teil liegt in „schlafender“ oder „maskierter“ Form („dormant TF“, „encrypted TF“) vor und kann erst nach Demaskierung („de-encryption“) auch aktivierend wirken. Wodurch diese Maskierung/Demaskierung erreicht wird, ist noch nicht vollständig geklärt, es werden jedoch mindestens zwei verschiedene Mechanismen dafür diskutiert. Zum einen scheint das Phospholipid-Mikromilieu, insbesondere das Phosphatidylserin-Angebot [Wolberg et al. 1999], zum anderen eine Variabilität im oder um das TF-Molekül selbst (z. B. Dimer-/Clusterbildung der TF-Moleküle) eine wesentliche Rolle zu spielen [Henriksson 2005]. Zellmembranassozierter TF kann zwischen phospholipidreichen und glykosphingolipidreichen Membranmikrodomänen bzw. Membranrafts (vgl. 1.5) bewegt werden, wobei eine Aktivierung von Faktor X durch den TF-Faktor-VIIa-Komplex nur für TF in den phospholipidreichen Regionen gezeigt werden konnte, während maskierter TF in den glykosphingolipidreichen Membrandomänen/Caveolae nachgewiesen wurde [Monroe and Key 2007, Mandal et al. 2006, Sevinsky et al. 1996]. Insbesondere die Modifikation einer allosterischen Disulfidbindung im TF-Molekül scheint wesentliche Bedeutung sowohl für die TF-Maskierung/-Demaskierung als auch für die Doppelrolle des TF-Faktor-VIIa-Komplexes als Aktivator der Blutgerinnung und signalvermittelnder Rezeptor zu besitzen. Eine Protein-Disulfid-Isomerase vermittelte dabei zwischen dimerem TF mit reduzierter Disulfidbindung und Hauptfunktion als Zytokinrezeptor und gerinnungsaktivem monomeren TF mit intramolekularer Disulfidbindung [Monroe and Key 2007, Chen et al. 2006, Ahamed et al. 2006]. Die vom TF-Faktor-VIIa-Komplex abhängige Signaltransduktion umfasst ein breites Spektrum von zellulären Antworten mit Beeinflussung der Gentranskription und -translation, Modifikation des Zytoskeletts und Induktion von Apoptose; diese werden vor allem durch den PAR-2 (protease-activated receptor 2) vermittelt. [Monroe and Key 2007, Versteeg and Ruf 2006]

Die wesentliche physiologische Wirkungsinhibition und Elimination von TF wird durch den Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) vermittelt. Die fast ausschließlich an die Endothelzelloberfläche gebundene Splicing-Variante TFPI-beta ist der Hauptregulator der TF-Kaskade, obwohl sie nur 20 % des gesamten TFPI ausmacht [Monroe and Key 2007]. Der quaternäre Komplex aus TFPI und TF-FVIIa-FXa (vgl. 1.4) wird in zwei Phasen gebildet, wobei TFPI zuerst die aktive Region von FXa bindet und deaktiviert, sich dann an den TF-FVIIa-Komplex anlagert und eine weitere Aktivierung von FX verhindert. TFPI vermittelt weiterhin über das LDL receptor-related

binding protein (LRP) in glykosphingolipidreichen Mikrodomänen der Zellmembran die Endozytose der TF-FVIIa-Komplexe in Clathrin-ummantelte Endosomen [Monroe and Key 2007, Iakhiaev et al. 1999, Hamik et al. 1999]. LRP vermittelt außerdem die Internalisierung des okkupierten Urokinase-Rezeptors (uPAR, CD87), der – so wie TF bei der Gerinnungsinduktion – eine Schlüsselrolle bei der Fibrinolyse besitzt, da er Urokinase (uPA) und den Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) bindet. Nach Aufnahme des Komplexes uPAR-uPA-PAI-1 über LRP kehrt uPAR an die Zelloberfläche zurück, während uPA und PAI-1 abgebaut werden (vgl. Abb. 1 in Abschnitt 1.3) [Czekay et al. 2001, Lopez-Pedrera et al. 1997, Bene et al. 2004]. Da LRP weiterhin die Gerinnungsfaktoren VIII, VIIIa und IXa bindet und ihren Abbau vermitteln kann, besitzt es in gewissem Rahmen auch eine gerinnungsmodulierende Wirkung [Strickland and Medved 2006, Neels et al. 2000, Meijer et al. 2007].

1.3 Gerinnungskaskade

Bei der Aktivierung der Gerinnungskaskade („plasmatische Blutstillung“) wird historisch ein extrinsischer (extravaskulärer, exogener) und ein intrinsischer (intravaskulär, endogener) Weg unterschieden [Petrides 1998]. Neuere Daten belegen eine „initiation phase“ (mit Bildung geringster Mengen an Thrombin und Aktivierung kleiner Mengen anderer Gerinnungsfaktoren), eine „amplification phase“ (mit Schaffung der weiteren Voraussetzungen für die folgende Thrombinbildung im großen Stil mit Hilfe der bereits gebildeten geringsten Mengen an Thrombin) und eine „propagation phase“ (mit Auftreten des entscheidenden Schubs an Thrombinbildung und Aktivierung größerer Mengen der anderen Gerinnungsfaktoren). [Eilertsen and Østerud 2004, Hoffman 2003]

Die extrinsische Aktivierung (ursprünglich von Paul Morawitz beschrieben) erfolgt über den Gerinnungsfaktor III („Gewebethromboplastin“ oder „Tissue Factor“), der ursprünglich auf Bindegewebszellen entdeckt wurde, jedoch auch – insbesondere im Rahmen von Entzündungsreaktionen – auf Blutzellen (vor allem Monozyten) in löslicher Form sowie assoziiert mit Mikropartikeln (vgl. 1.2) auftritt. Der Gerinnungsfaktor III kann mit seinem extrazellulären Anteil (sog. Faktor-VII-Rezeptor) den im Serum vorliegenden – und auf Monozyten und Makrophagen exprimierbaren [Pejler and Geczy 2001, McGee et al. 1989] – Faktor VII (Proconvertin, stabiler Faktor) und den auch bereits in Spuren vorliegenden aktivierte Faktor VII (Faktor VIIa, Convertin) binden, wodurch ein „binärer“ Komplex entsteht. Dieser Prozess entspricht auch dem Beginn

der sog. „initiation phase“ der Blutgerinnung. Der Komplex aus Faktor-VII-Rezeptor (bzw. TF), Faktor VIIa und Phospholipiden (sog. „extrinsic factor Xase“) ist in der Anwesenheit von Calciumionen (Faktor IV) in der Lage, Faktor X (Stuart-Prower-Faktor) und Faktor IX (antihämophiler Faktor B, Christmas-Faktor) zu aktivieren. Der Komplex aus TF, Faktor VIIa und Faktor Xa wird auch als „ternärer“ Komplex bezeichnet. Der Prothrombinasekomplex, der die historische „gemeinsame Endstrecke“ der Gerinnungskaskade einleitet, wird von Faktor Xa, Faktor Va (Accelerin, Acceleratorglobulin, labiler Faktor) und Phosphatidylserin auf der Oberfläche der TF-tragenden Zelle gebildet [Hoffman 2003] und konvertiert in Anwesenheit von Ca^{2+} geringe Mengen Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa). Der dafür noch erforderliche *aktivierte* Faktor V (der z. B. auch von Lymphozyten synthetisiert wird [Shen et al. 1993]) kann durch Faktor Xa oder von nicht zum Gerinnungssystem gehörigen Proteasen (Elastase und Cathepsin G auf der Monozytenoberfläche) aus dem zirkulierenden Faktor V gebildet werden [Hoffman 2003, Allen and Tracy 1995]. Im Verlauf (s. u.) kann Faktor Va auch auf aktivierte Thrombozyten aus Faktor V entstehen. Der Prothrombinasekomplex führt außerdem in einer positiven Rückkopplung zur Bildung weiterer Mengen von Faktor VIIa, der sich an Thrombozyten anlagert und dort zusammen mit TF für eine zusätzliche Aktivierung von Faktor IX sorgt. Der TF auf Thrombozyten kann aus TF-haltigen Mikropartikeln stammen, aber auch aus den Thrombozyten selbst (vgl. u.).

Durch die geringen Mengen bereits gebildeten Thrombins wird die sog. „amplification phase“ eingeleitet. Thrombin aktiviert dabei die Thrombozyten (mit Exponierung von Rezeptoren und Bindungsstellen für aktivierte Gerinnungsfaktoren und Freisetzung von Faktor Va an ihrer Oberfläche) und auf deren Oberfläche dann die (Co)Faktoren V und VIII (antihämophiler Faktor A) und den Faktor XI („plasma thromboplastin antecedent“). Der bei der thrombininduzierten Spaltung des Faktor-VIII/vWF-Komplexes freigesetzte vWF vermittelt lokal Thrombozytenadhäsion und -aggregation. [Hoffman 2003]

Der entscheidende Anstoß der Thrombinbildung („burst of thrombin formation“ bzw. „propagation phase“) entsteht, wenn Faktor Xa über eine nachträgliche Aktivierung des intrinsischen Systems in weit größeren Mengen [Eilertsen and Osterud 2004, Lawson 1994] und am richtigen Ort – auf der Thrombozytenoberfläche – gebildet wird (da Faktor Xa aufgrund der schnellen Inhibierung durch TFPI und Antithrombin III bei Vorliegen in gelöster Form nicht effektiv von der TF-tragenden Zelle zum Thrombozyt

gelangen kann [Hoffman 2003]). Dies geschieht durch Wechselwirkung bzw. Komplexbildung von Faktor VIIIa (bereits durch Thrombin aktiviert) mit Faktor IXa auf der Phospholipid-Oberfläche von Thrombozyten (oder von Mikropartikeln), was als „intrinsic factor Xase“ oder „tenase complex“ bezeichnet wird. Alle am Prothrombinase- und am Tenase-Komplex beteiligten Proteine besitzen Affinität zur negativ geladenen Phospholipidoberfläche. [Petrides 1998, Eilertsen and Østerud 2004, Dahlbäck 2005, Hoffman 2003]

Thrombozyten sind eine wesentliche, wahrscheinlich sogar die einzige Quelle für die besonderen, zur effektiven In-vivo-Blutgerinnung zwingend erforderlichen Phospholipidmilieus (v. a. anionische Phospholipide wie Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin). Der entscheidende sog. „burst of thrombin-formation“ ist nach heutigem Kenntnisstand nur auf aktivierte Thrombozyten möglich [Eilertsen and Østerud 2004, Hoffman 2003, Butenas and Mann 2002, Monroe and Hoffman 2001].

Die hochaktive Protease Thrombin wandelt in kurzer Zeit große Mengen Fibrinogen (Faktor I) in Fibrinpolymere (Faktor Ia) um. Thrombin führt außerdem zur Aktivierung/Aggregation von Thrombozyten („zelluläre Blutstillung“) durch Spaltung des „protease activated receptor-1“ (PAR-1) [Mann et al. 2003], zur (bereits oben erwähnten) Aktivierung der Faktoren V (positive Rückkopplung der Thrombinbildung über Aktivierung von Faktor IX zusammen mit TF), VIII (positive Rückkopplung der Thrombinbildung als direkter Teil des Tenase-Komplexes) und XI (positive Rückkopplung der Thrombinbildung über eigenständige Aktivierung von Faktor IX) sowie durch die Aktivierung von Faktor XIII (fibrinstabilisierender Faktor = FSF, Loki-Lorand-Faktor) zur Stabilisierung der Fibrinpolymere. [Petrides 1998, Eilertsen and Østerud 2004]

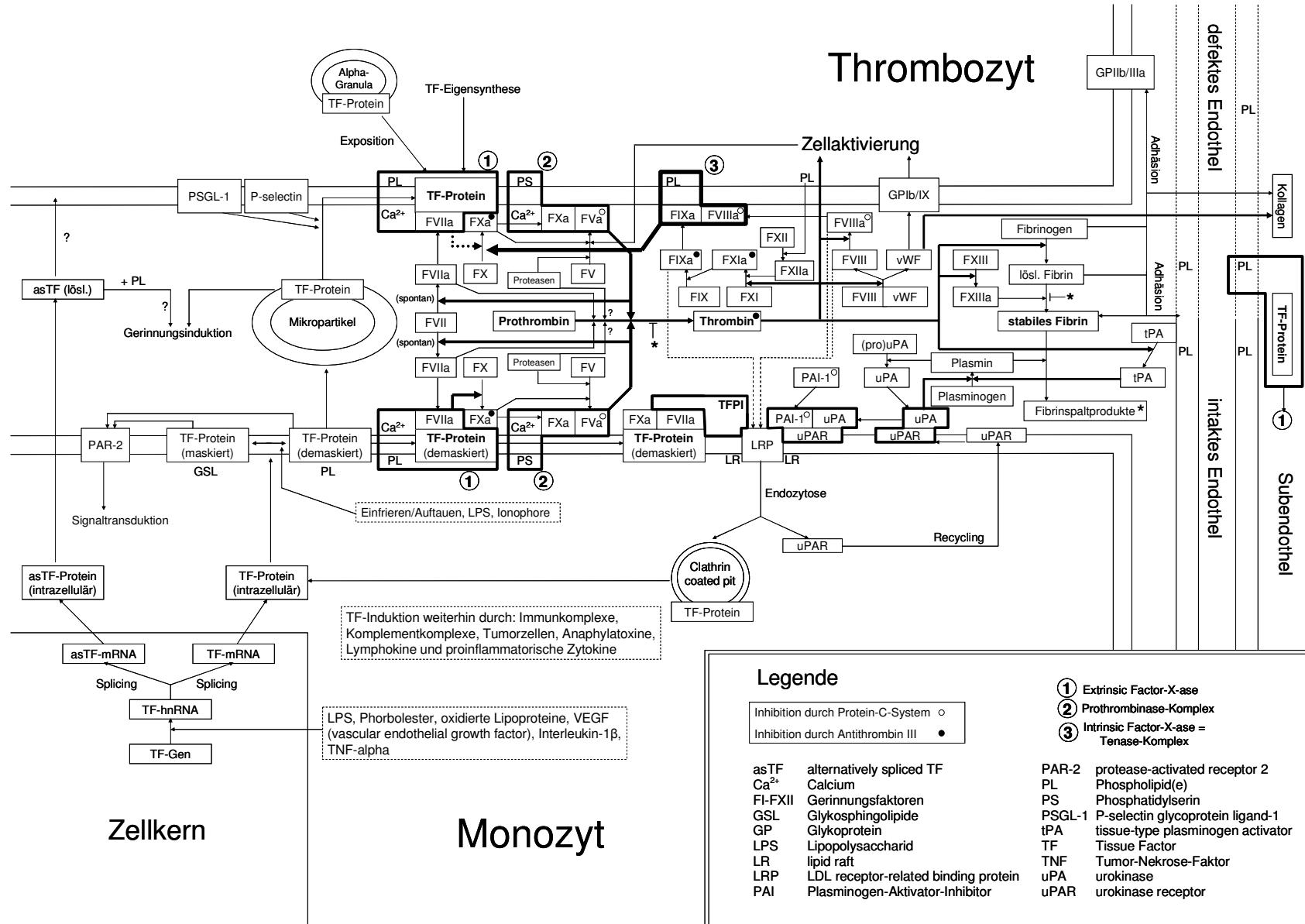
Diese auf neueren Forschungsergebnissen beruhenden, in den vorigen Absätzen dargestellten Wechselwirkungen von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten *untereinander* und *miteinander* zeigen komplexe Vernetzungen und Rückkopplungen. Eine wichtige Rolle fällt danach auch den Monozyten zu. So sollen durch Fusion ihnen entstammender Mikropartikel mit aktivierte Thrombozyten Hybrid-Zellen entstehen, die Tissue Factor und die wichtige Phospholipidoberfläche (und die Proteasen) aktiverter Thrombozyten zusammenführen. Schließlich tragen in vivo komplexe Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten zur Verstärkung der monozytären TF-Expression bei. [Eilertsen and Østerud 2005, Halvorsen et al. 1993] Dass der den Monozyten entstammende Tissue Factor *essentiell* für die Ausbreitung der Thrombinbildung („propagation phase“) sei [Eilertsen and Østerud

2004], muss allerdings zunehmend in Frage gestellt werden, da in neueren Studien eine TF-Expression der Thrombozyten selbst nachgewiesen werden konnte [Panes et al. 2007]. Dies könnte die Sichtweise der Regulation der Blutgerinnung drastisch verändern. [Mackman et al. 2007]

Begrenzt und abgeschwächt wird die Gerinnungskaskade durch inhibierende Faktoren, von denen TFPI, das Protein-C-System und Antithrombin [Tilley and Mackman 2006] die drei wichtigsten darstellen. TFPI hemmt zum einen direkt den Komplex aus TF, Faktor VIIa und Faktor Xa und fördert zum anderen die LRP-vermittelte Internalisierung des TF-Faktor-VIIa-Komplexes (s. 1.2). Protein C wirkt – verstärkbar durch Protein S – inhibierend auf Faktor VIIIa, Faktor Va und den Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI); PAI wiederum inhibiert die natürlichen Plasminogenaktivatoren Urokinase (uPA) und Gewebeplasminogenaktivator (t-PA) und verhindert damit die Bildung des fibrinspaltenden Plasmins aus Plasminogen. Antithrombin III hemmt Thrombin und die Gerinnungsfaktoren IXa, Xa, XIa, XIIa; seine Wirkung wird durch Heparin verstärkt.

Abb. 1 stellt zusammenfassend die Gerinnungskaskade mit den beteiligten aktivierenden und inhibierenden Proteinen dar, wobei der Fokus speziell auf Tissue Factor und Interaktionen zwischen Monozyt, Thrombozyt und Endothelzelle/Subendothelialraum gelegt wurde.

Abb. 1: Synthese, Wirkung, Inhibition und Eliminierung von Tissue Factor (TF) mit Benennung der gerinnungsinduzierenden Funktion und Darstellung der TF-Pools.



1.4 Monozyten und monozytäre Subpopulationen

Nach ursprünglicher Beschreibung anhand lichtmikroskopischer Kriterien können Monozyten heutzutage exakter durch ihre (mehr oder minder) hohe Expression von CD14 – eines Teils des Rezeptors für Lipopolysaccharid – identifiziert werden [Gordon and Taylor 2005].

Bereits anhand der *Dichte-eigenschaften* von Monozyten lassen sich auf einfache Weise Monozytensubpopulationen abgrenzen und gewinnen. So charakterisierten Akiyama et al. 1983 eine Hauptpopulation so genannter „regulärer“ Monozyten und eine kleinere Subpopulation „intermediärer“ Monozyten.

Eine erste wesentliche Unterscheidung in Subpopulationen aufgrund von *Anti-geneigenschaften* erfolgte mit der Beschreibung einer $CD14^{lo}CD16^{hi}$ -Subpopulation durch Ziegler-Heitbrock et al. 1988 und Passlick et al. 1989 (vgl. Abb. 2 a). Gewisse Ähnlichkeiten zeigten sich dabei zwischen den $CD14^{lo}CD16^{hi}$ - und den „intermediären“ Monozyten sowie zwischen der $CD14^+CD16^-$ -Monozytenhauptpopulation und den „regulären“ Monozyten [Grage-Griebenow et al. 2001a].

Die vier Subpopulationen, die sich durch gemeinsame Betrachtung dieses bedeutsamsten monozytären Subpopulationsmarkers CD16 und des monozytendefinierenden CD14 in Vollblutmonozyten ergeben (Abb. 2 b) wurden erstmals durch Rothe et al. 1996 differenziert beschrieben.

Diese Arbeit lieferte außerdem initiale und wegweisende Zusammenhänge zwischen einer monozytären Subpopulation und der Hypercholesterinämie (die $CD14^{dim}CD16^+$ - bzw. MNP3-Subpopulation war bei Patienten mit Hypercholesterinämie im Sinne eines Risikomarkers für Arteriosklerose erhöht) sowie Anhalte für unterschiedliche Reifungsstadien der beschriebenen Subpopulationen (Anhalte für eine Ausreifung der MNP1 über die MNP2 zu den MNP3).

Eine spätere Unterteilung der Monozyten aufgrund der CD16- und der CD64-Oberflächenexpression durch Grage-Griebenow et al. lieferte vier Subpopulationen, die sich aufgrund der positiven Korrelation von CD64- und CD14-Expression im wesentlichen mit denen von Rothe et al. beschriebenen deckten [Grage-Griebenow et al. 2001a, Grage-Griebenow et al. 2001b]. Auch dort wurde eine Zwischenstellung der $CD14^{hi}CD16^+CD64^+$ -Monozyten (entsprechend der MNP2 bei Rothe et al. 1996) betont, wobei diese im Bezug auf die Ausreifung zu verschiedenen Zelltypen denkbar wäre (insbesondere zu dendritischen Zellen oder auch zu Makrophagen oder zu sog.

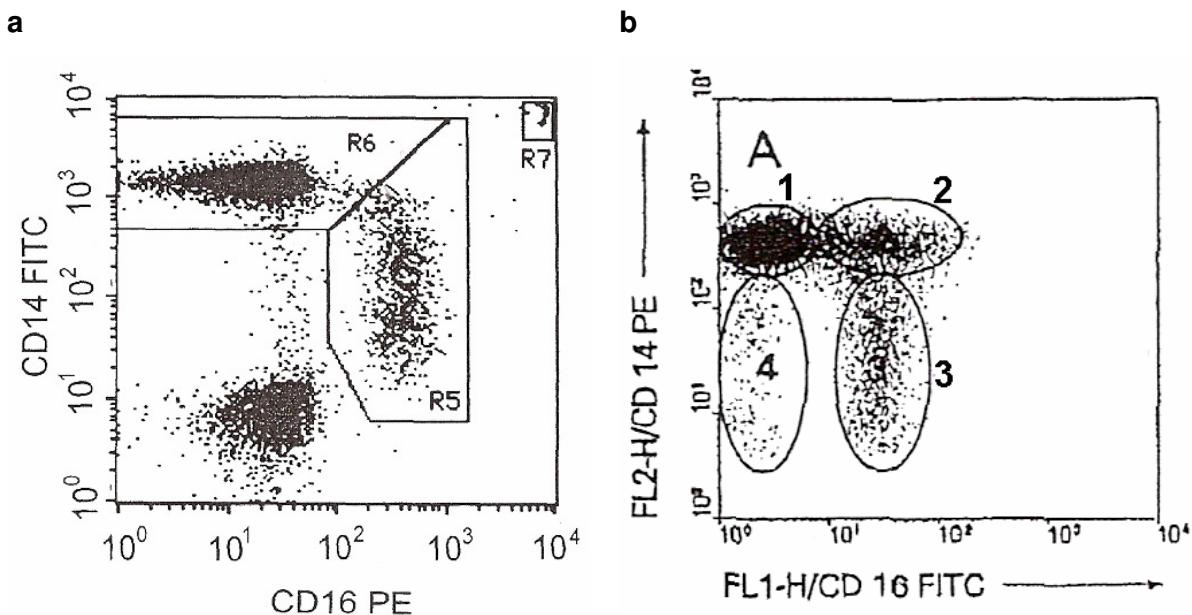


Abb. 2 a, b: Gatingvarianten für monozytäre Subpopulationen aus Ziegler-Heitbrock 2007 (a) und Rothe et al. 1996 (b). a zeigt die monozytären Subpopulationen CD14⁺⁺CD16⁻ („R6“) und CD14⁺CD16⁺ („R5“), b zeigt die monozytären Subpopulationen CD14⁺⁺CD16⁻ (MNP1 bzw. „1“), CD14⁺⁺CD16⁺ (MNP2 bzw. „2“), CD14⁺CD16⁺ (MNP3 bzw. „3“) und CD14⁺CD16⁻ (MNP4 bzw. „4“); MNP steht für mononukleäre Phagozyten. Die Originalabbildungen wurden modifiziert durch Achsentausch (a) bzw. zusätzliche Kennzeichnung der Subpopulationen 1–3 (b).

large granular lymphocytes [Grage-Griebenow et al. 2001a]), aber auch eine weitgehende Reversibilität der einzelnen Differenzierungsstadien angenommen wurde. Wie die CD64-Expression zeigt sich auch die CD32-Expression auf Monozyten deutlich mit der CD14-Expression korreliert [Grage-Griebenow et al. 2001a], was durch die von Pfeiffer et al. 2001 in ruhenden Monozyten beschriebene Kolokalisation von CD14 mit CD32 und CD64 gestützt wird und die herausragende Bedeutung von CD16 für die Subpopulationsdifferenzierung indirekt unterstreicht [Ziegler-Heitbrock 2007].

Im Entstehungsprozess der Arteriosklerose untermauern mehrere Arbeiten eine entscheidende Bedeutung speziell der CD14⁺⁺CD16⁺-Subpopulation (MNP2), die auch die höchste CD32-Expression und die stärkere phagozytäre Aktivität unter den CD16⁺-Monozyten besitzt [Skrzczynska-Moncznik et al. 2008, Grage-Griebenow et al. 2001a]. So zeigen MNP2-Monozyten die stärkste CD32-vermittelte E-LDL-Bindung mit konsekutiver Schaumzellbildung [Kapinsky et al. 2001], besitzen eine herausragende Bedeutung bei der Endotheltransmigration [Rothe et al. 1996, Stohr et al. 1998, Rothe et al. 1999, Meerschaert and Furie 1995], exprimieren unter frischen Monozyten den für oxidative Zellschädigung im Rahmen der Arteriosklerose bedeutenden Scavenger-Rezeptor CD163 am stärks-

ten [Schmitz and Grandl 2007, Buechler et al. 2000, Ritter et al. 1999] und konnten erst kürzlich bei Dialysepatienten positiv mit kardiovaskulären Ereignissen korreliert werden [Heine et al. 2008]. Die CD14⁺⁺CD16⁺-Subpopulation ist weiterhin bei Kleinkindern und dort speziell bei septischen Geschehen vermehrt [Skrzeczynska et al. 2002], und besitzt durch die unter den Monozyten höchste IL-10 Produktion antiinflammatorisches Potenzial [Skrzeczynska-Moncznik et al. 2008].

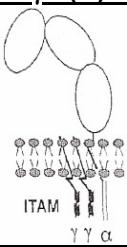
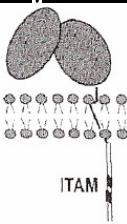
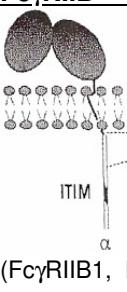
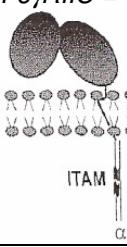
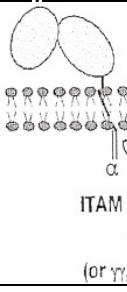
Bei den meisten Untersuchungen der monozytären Subpopulationen wurde allerdings nur zwischen der CD14⁺⁺CD16⁻-Hauptpopulation (in etwa MNP1 entsprechend) und den CD14⁺CD16⁺-Monozyten (in etwa MNP3 entsprechend) unterschieden (vgl. Abb. 2 a) [Strauss-Ayali et al. 2007, Ziegler-Heitbrock 2007, Gordon and Taylor 2005, Ellery and Crowe 2005]. Die CD14⁺CD16⁺-Monozyten werden auch als proinflammatorische Monozyten angesehen, da sie durch Stimulation des toll-like receptor (TLR) eine relativ hohe Menge des proinflammatorischen TNF und relativ kleine Mengen des antiinflammatorischen IL-10 produzieren und bei zahlreichen Entzündungszuständen (z. B. bei der bakteriellen Sepsis, lokalisierten Infektionen, Arthritis, Atherosklerose, HIV-Infektion, Neurodermitis, Sarkoidose, pulmonaler alveolärer Proteinose) vermehrt sind [Ellery and Crowe 2005, Ziegler-Heitbrock 2007]. Sie sind gegenüber den CD14⁺⁺CD16⁻-Monozyten etwas kleiner, phagozytisch weniger aktiv und scheinen Gewebsmakrophagen näher zu stehen [Ziegler-Heitbrock et al. 1993] und leichter zu dendritischen Zellen ausdifferenzierbar zu sein [Strauss-Ayali et al. 2007, Randolph et al. 2002].

Eine weitere erwähnenswerte monozytäre Subpopulation stellen CD56-positive Monozyten, die erstmals 1996 von Rothe et al. beschrieben wurden und für die inzwischen eine verstärkte T-Zell-Stimulation in Abhängigkeit von Fremdantigen [Sconocchia et al. 2005] und erst kürzlich eine Vermehrung bei aktivem Morbus Crohn [Grip et al. 2007] demonstriert werden konnte. Mit der zunehmenden Genauigkeit der Messmethoden und der Entdeckung neuer Oberflächenantigene sind weiter differenzierte Unterteilungen sowie die Charakterisierung neuer Subpopulationen zu erwarten. Grundsätzlich sind zur guten Vergleichbarkeit der Daten analoge Zellpräparationen, Antikörper- und Fluorochromwahl, Geräteeinstellungen/-sensitivitäten und Gatingkriterien wichtig und für die Beurteilung der funktionellen Eigenschaften mögliche Voraktivierungen durch Zellisolierung zu beachten [Ziegler-Heitbrock 2007].

1.5 Fc γ -Rezeptoren

Fc γ -Rezeptoren wurden vor über 40 Jahren durch die Beobachtung entdeckt, dass Antikörper vom Typ IgG direkt zytophil auf Makrophagen wirken können, wenn sie diesen an Oberflächenantigenen von Erythrozyten gebunden (Opsonierung der Erythrozyten) präsentiert wurden. Diese Eigenschaft war unabhängig von der F(ab)-Region des Antikörpers und erforderte nur Interaktionen mit dessen Fc-Region. [Ravetch and Bolland 2001] Die wichtigsten heutzutage bekannten Funktionen der Fc γ -Rezeptoren umfassen die Signaltransduktion mit verstärkender oder abschwächender Regulierung zellulärer Antworten und die Vermittlung der Aufnahme von Immunkomplexen mit konsekutiver Verstärkung der Antigenpräsentation. [Takai 2005]

Die Fc γ -Rezeptoren für das im Blutserum vorwiegend vorhandene Immunglobulin IgG werden heute beim Menschen in drei Klassen unterteilt: Fc γ RI = CD64, Fc γ RII = CD32, Fc γ RIII = CD16. Weiterhin lassen sich unter den humanen Fc γ -Rezeptoren noch Subtypen für den Fc γ RII (A, B1, B2 und C) und für den Fc γ RIII (A und B) abgrenzen (Tab. 1). Mit Fc γ RI wird vereinfacht seine normalerweise einzige exprimierte Isoform Fc γ RIA bezeichnet; zur Rolle der durch Interferon- γ auf Zellen der myeloischen Reihe (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten) induzierbaren Isoformen B und C ist weniger bekannt [Takai 2005, Dijstelbloem 2001, Paquette et al. 1995, Porges et al. 1992]. Die gebräuchlichen (und auch in dieser Arbeit verwendeten) Anti-Fc γ RII-Antikörper und -F(ab')₂s binden sowohl Fc γ RIIA als auch Fc γ RIIB was im Allgemeinen nicht speziell gekennzeichnet wird. Der Fc γ RIIIB – ein auf neutrophilen und eosinophilen Granulozyten [Zhu et al. 1998] exprimierter spezifischer „Decoy“-Rezeptor – vermittelt aufgrund fehlender transmembraner und zytoplasmatischer Regionen kein direktes Signal nach intrazellulär und besitzt damit eine Sonderstellung. Deswegen ist im Folgenden (im Zusammenhang mit Monozyten) mit Fc γ RIII normalerweise Fc γ RIIIA gemeint. Ein bei der Maus beschriebener und bei allen Säugetieren konservierter Fc γ RIV könnte beim Menschen sein Analogon im Fc γ RIIIA haben [Siberil et al. 2006, Nimmerjahn and Ravetch 2006]. Eine funktionelle Unterscheidung der Fc γ -Rezeptoren kann entsprechend aktivierender und inhibierender Wirkung getroffen werden. Die aktivierenden Fc γ -Rezeptoren (Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA – und beim Tier Fc γ RIV) sind auf den meisten Effektor-Zellen des Immunsystems inkl. Thrombozyten – unter den Lymphozyten jedoch nur auf einer kleinen T-Zell-Subpopulation

Fc γ R-Subtypen	Bindungseigenschaften	Vorkommen	Funktionen	Besonderheiten
FcγRI(A) =CD64(A) 	high affinity $K_A \approx 10^8 - 10^9 M^{-1}$ IgG3 > 1 > 4 >> 2	Monozyten , Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, CD34 $^{+}$ -Vorläuferzellen	ADCC, Endozytose, Phagozytose	bindet außer komplexiertem IgG auch monomeres IgG; kann CRP binden; Isoformen: Fc γ RB (nur 2 extrazelluläre Domänen; low affinity) und Fc γ RC;
FcγRIIA = CD32A 	low affinity $K_A < 10^7 M^{-1}$ <u>Variante Arg131:</u> IgG3* > 1 >> 2,4 <u>Variante His131:</u> IgG3* > 1 = 2 >> 4 (*für IgG3: His131 > Arg131)	Monozyten , Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile, Thrombozyten, Dendrit. Zellen Langerhansz.	Endozytose, Phagozytose, ADCC, Freisetzung von Entzündungsmediatoren	Hauptrezeptor für CRP; einige Fc γ R-Klasse, die auf Thrombozyten exprimiert wird
FcγRIIB = CD32B 	low affinity $K_A < 10^7 M^{-1}$ IgG3 > 1 > 4 >> 2 (Fc γ RIIB1, Fc γ RIIB2)	B-Zellen, Granulozyten Mastzellen, Monozyten , Makrophagen, Dendrit. Zellen Langerhansz. (alle Zellen des Immunsystems außer T- und NK-Zellen)	Blockade der B-Zell-Rezeptor-induzierten Aktivierung; B-Zell-Apoptose; Inhibierung der aktivierenden Fc γ Rs	einiger inhib. FcR (durch Koligation mit aktiv. Fc γ R); fragl. Wirkung unabhängig der aktivierenden Fc γ Rs; 2 Isoformen mit analogem Vorkommen: Fc γ RIIB1 und Fc γ RIIB2
FcγRIIC = CD32C 	low affinity $K_A < 10^7 M^{-1}$	NK-Zellen		
FcγRIIA = CD16A 	medium affinity $K_A \approx 3 \times 10^7 M^{-1}$ <u>Variante Val158:</u> IgG1* = 3* > 4 >> 2 <u>Variante Phe158:</u> IgG1* = 3* >> 2,4 (*für IgG1,3: Val158 > Phe158)	NK-Zellen, Mastzellen, Eosinophile, Dendrit. Zellen, Langerhansz., kleine T-Zell-Subpopulation Monozyten Makrophagen	ADCC, Phagozytose, Endozytose, Zytokin-Ausschüttung	u. U. Analogon zum murinen Fc γ IV
FcγRIIB = CD16B 	low affinity $K_A < 10^7 M^{-1}$ <u>Antig. Polymorph. 1:</u> IgG1* = 3* >> 2,4 <u>Antig. Polymorph. 2:</u> IgG1* = 3* >> 2,4	Neutrophile, Eosinophile	Degranul. der Neutrophilen; Prod. reaktiver Sauerst.-Spezies in Neutrophilen	einiger bek. FcR, der kein integrales Membranprotein ist (GPI-Ankerung); (*A.P. 1 internalisiert IgG1,3 besser)

Tab. 1: Überblick über humane Fc γ -Rezeptoren (nach Siberil et al. 2006, Takai 2005 und Dijstelbloem et al. 2001; Abb. aus Siberil et al. 2006). Monozyt. Fc γ Rs sind hervorgehoben.

[Siberil et al. 2006] – zu finden. Die Signaltransduktion nach intrazellulär erfolgt über eine zytoplasmatische ITAM (immonoreceptor tyrosine-based activation motif) -Sequenz, die entweder als Untereinheit mit dem Rezeptor assoziiert (beim Fc γ RI homodimere $\gamma\gamma$ -Untereinheit; beim Fc γ RIIA heterodimere $\xi\gamma$ -Untereinheit oder homodimere $\gamma\gamma$ - oder $\xi\xi$ -Untereinheit), oder – beim Fc γ RIIA – ein fester Bestandteil des Rezeptors ist (vgl. Tab. 1). Der Vielzahl aktivierender Fc γ - bzw. Fc-Rezeptoren steht ein einziger inhibierender Fc-Rezeptor, nämlich der Fc γ RIIB (bzw. bei weiterer Unterteilung Fc γ RIIB1 und Fc γ RIIB2), gegenüber. Er wird auf allen Zellen des Immunsystems – außer auf T-Zellen und NK-Zellen – exprimiert und beinhaltet zur Signaltransduktion eine zytoplasmatische ITIM (immonoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) -Sequenz. [Takai 2005, Ravetch and Bolland 2001] Fc γ -Rezeptoren aller drei Klassen kommen auch in gelöster Form im Blutserum und anderen Körperflüssigkeiten vor [Galon et al. 1997]. Spezifität für IgG besitzt am Monozyten außer den Fc γ -Rezeptoren noch der neonatale Fc-Rezeptor (Fc n), der IgG transzellulär transportieren kann [Takai 2005]; die Rolle der vor allem auf B-Zellen exprimierten sog. Fc-Rezeptor-Homologen (FcRHs), deren Gene Ähnlichkeit mit denen der anderen Fc-Rezeptoren aufweisen, ist noch nicht ausreichend geklärt [Takai 2005].

Die Expression der Fc γ -Rezeptoren wird je nach Zelltyp durch verschiedene Stimuli bzw. Milieus reguliert. Die monozytäre CD16-Expression kann z. B. durch verschiedene Entzündungszustände steigen (s. 1.4). Eine wesentliche Rolle fällt diesbezüglich auch den Zytokinen zu. So wurde für Monozyten eine Hochregulierung aller aktivierenden Fc γ -Rezeptoren durch IL-10, eine Herunterregulierung von Fc γ RIIB durch TNF-alpha und eine Reduktion der Expression und Funktion aktivierender Fc γ -Rezeptoren durch IL-4 und IL-13 in Kombination mit TNF-alpha gezeigt [Liu et al. 2005, van Roon et al. 2003]. Weiterhin können γ -Interferon und die Komplementkomponente C5a über verschiedene Signalwege die Expression der niedrigaffinen Fc γ -Rezeptoren III und IIB auf Zellen der myeloischen Reihe sowohl erhöhen als auch vermindern [Konrad et al. 2007, Schmidt and Gessner 2005]. Durch γ -Interferon werden auch Isoformen des Fc γ RI auf Zellen der myeloischen Reihe induziert (s. o.).

Die Aktivierung der Fc γ -Rezeptoren hat ein breites Spektrum von Effekten zur Folge (vgl. Tab. 1). Über komplexe intrazelluläre Signalkaskaden (vgl. 1.6) kann z. B. in Monozyten TNF-alpha, NF- κ B, Prostaglandin E2, monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), Calcium-Influx und vermutlich (vgl. 1.7) auch prokoagulante Aktivität indu-

ziert werden [Drechsler et al. 2002, Marsh et al. 1997, Rankin et al. 1993, Debets et al. 1988]. Auf funktioneller und pathophysiologischer Ebene vermitteln Fc γ -Rezeptoren Phago- und Endozytose (z. B. die Aufnahme modifizierter Lipoproteine und Immunkomplexe), Entzündungsreaktionen, Antikörper-abhängige zellmedierte Zytotoxizität (ADCC), Zelladhäsion und z. B. die Degranulation von Neutrophilen, die Reifung von B-Zellen und dendritischen Zellen sowie die Apoptose von B-Zellen [Takai 2005, Dijstelbloem et al. 2001]. Des weiteren konnten wesentliche Zusammenhänge zwischen bestimmten Fc γ -Rezeptor-Klassen und Krankheitszuständen gezeigt werden, wie z. B. des Fc γ RI mit Arthritis und Hypersensitivitätsreaktionen [Ioan-Facsinay et al. 2002], des Fc γ RIII mit der IgG-abhängigen Anaphylaxie [Hazenbos et al. 1996] oder des Fc γ RIIB bei der Protektion vor Autoimmunerkrankungen wie z. B. Glomerulonephritiden [Schiller et al. 2000]. [Takai 2005]

Fc γ -Rezeptoren können insbesondere nach Bindung von IgG internalisiert und dadurch herunterreguliert werden; der Rücktransport an die Zelloberfläche (sog. „Recycling“) ist auch unter bestimmten Bedingungen möglich. Eine andere Art von Inhibition kann z. B. im Fall des Fc γ RI vorliegen. In vivo ist er annähernd mit monomeren IgG gesättigt und dadurch blockiert. Eine *Blockade* der Fc γ -Rezeptoren scheint auch bei der Hemmung von Immunreaktionen durch intravenöses Immunglobulin (IVIg) eine Rolle zu spielen. [Takai 2005, Guyre et al. 2001]

1.6 Wechselwirkungen der Fc γ -Rezeptoren mit ihren Liganden und Signaltransduktion

Die Aktivierung von Fc γ -Rezeptoren resultiert primär aus der *multivalenten Formation* von IgG-Fc (bzw. von *Anti-Fc γ -Rezeptor*-Fab in Form von einfachen Fab-Fragmenten oder als Teil von F(ab')₂-Fragmenten/Antikörpern) auf engem Raum, wie sie z. B. in Immunkomplexen auftritt [Mimura et al. 2001]. Dies wird auch durch die Begriffe „clustering“, „cross-linking“ oder „aggregation“ beschrieben [Takai 2005, Ravetch and Bolland 2001, Nimmerjahn and Ravetch 2006]. Für die Aktivierung der Fc γ -Rezeptoren spielt die spezifische Bindung von IgG-Fc somit eher eine permissive Rolle [Pfefferkorn et al. 1995], als dass sie eine essentiell erforderliche Komponente darstellen würde – auch wenn für eine messbare Aktivierung eine gewisse Menge von Fc γ -Rezeptoren in räumliche Nähe gebracht werden müssen [MacIntyre et al. 1988, Van de Winkel et al. 1990]. Ähnlich dazu

ist für die Aktivierung der Komplement-Komponente C1 die entscheidende Voraussetzung die Fixierung von Antikörpern bzw. deren Fc-Regionen auf engem Raum; eine Konformationsänderung der Fc-Region bzw. die spezifische Antigenbindung scheint nicht zwingend erforderlich zu sein [Watts et al. 1985, Shope 1993].

Die Wechselwirkung zwischen dem Fc-Teil des IgG und den Fc γ -Rezeptoren ist komplex. Für IgG₁ konnte eine asymmetrische Bindung mit dem Fc γ -Rezeptor gezeigt werden, bei der zuerst eine der beiden Fc-Ketten (im Bereich der unteren „Hinge“-Region und der C γ 2-Domäne) an die D2-Domäne des Fc γ -Rezeptors bindet, dann die andere Fc-Kette mit den gleichen Regionen an andere Bereiche dieses Rezeptors. Somit ist für monomeres IgG eine 1:1-Bindungsstöchiometrie anzunehmen. [Siberil et al. 2006, Takai 2005] Die höhere Affinität des Fc γ RI zum Fc-Teil von IgG im Vergleich zu Fc γ RII und Fc γ RIII wird auf eine zusätzliche (dritte) extrazelluläre Domäne zurückgeführt (vgl. Tab. 1, Abschnitt 1.5) [Sondermann et al. 2001]. Im Gegensatz zu Voll-Antikörpern zeigen sowohl Fab-Fragmente als auch F(ab')₂-Fragmente normalerweise keine aktivierenden Interaktionen mit dem Fc-Rezeptor [Spiridon et al. 2004].

Die Affinität des IgG-Moleküls zum Fc γ -Rezeptor wird entscheidend vom IgG-Subtyp bzw. von der Präferenz der betreffenden Fc γ -Rezeptor-Klasse zu diesem IgG-Subtyp bestimmt (vgl. Tab. 1, Abschnitt 1.5) [Nimmerjahn and Ravetch 2005]. Die Unterschiede der vier IgG-Subklassen (IgG₁–IgG₄) betreffen vor allem Struktur der sog. „Hinge“- bzw. „Scharnier“-Region mit resultierender variabler Flexibilität der Fab-„Arme“ [Brekke et al. 1995]. Für die spezifische Bindung von Anti-Fc γ -Rezeptor-IgG an (monozytäre) Fc γ -Rezeptoren sollte eine Fc-vermittelte (unspezifische) Interaktion mit diesen Fc γ -Rezeptoren vernachlässigbar klein sein oder eine vorgeschaltete Fc-Rezeptor-Blockade erfolgen. Dies spielt z. B. beim Einsatz spezifischer Anti-Fc γ -Rezeptor-Antikörper, fluoreszenzmarkierter Antikörper oder an Magnetbeads gekoppelter Antikörper (z. B. gerichtet gegen CD14 oder – im „Monocyte-Isolation-Kit“ – gegen nicht monozytäre Oberflächenantigene) eine Rolle. Unter den Fc γ -Rezeptoren bindet nur der Fc γ RI monomeres IgG mit hoher Affinität [Rankin et al. 1993]. Monomeres IgG₁ oder IgG_{2b} der Maus zeigt im Gegensatz zu monomerem IgG_{2a} oder IgG₃ der Maus nur geringe Wechselwirkung mit den Fc-Rezeptoren humaner Monozyten. So beobachteten z. B. Lubeck et al. bei vier IgG₁- bzw. vier IgG₂-Monomeren der Maus eine Affinität zum humanen Fc-Rezeptor, die nur ein Hundertstel bis ein Tausendstel der Affinität von humanem IgG₁ betrug [Lubeck et al. 1985, Ravetch and Kinet 1991]. Analog

gelang bei Rankin et al. 1993 mit mIgG₁ und mIgG_{2b} (im Gegensatz zu mIgG_{2a} und mIgG₃) nach deren Crosslinking keine Induktion eines Calcium-Influx in der monozytären Zelllinie THP-1, was gegen eine relevante Fc-abhängige Bindung dieser murinen Antikörper spricht.

Fc γ -Rezeptoren binden auch Pentraxine, eine Gruppe multimerer Proteine mit mustererkennenden Eigenschaften, von denen CRP und serum amyloid P-component (die klassischen Vertreter der *kurzen* Pentraxine) sowie PTX3 (der Prototyp der anderen Familie der *langen* Pentraxine) die wichtigsten darstellen [Mantovani et al. 2008, Bharadwaj et al. 2001]; dadurch ist eine Aktivierung der Fc γ -Rezeptoren möglich [Williams et al. 2004, Bodman-Smith et al. 2004]. Die Affinität zum Fc γ -Rezeptor ergibt sich z. B. für CRP aus dessen Sequenzhomologie zur CH3-Domäne von humanem IgG [Mortensen and Duszkiewicz 1977]. In humanen Leukozyten hat CRP hohe Affinität zum Fc γ RIIA (CD32A) und niedrigere Affinität zum Fc γ RI (CD64) [Stein et al. 2000, Bharadwaj et al. 1999]. Eine wesentliche Bedeutung hat diese Wechselwirkung z. B. für die Aufnahme von mit CRP (oder Antikörpern) opsoniertem Ox-LDL und E-LDL durch Monozyten/Makrophagen im Zusammenhang mit der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen [Schmitz and Grandl 2007, Singh et al. 2008b, Nagarajan 2007] – wobei CRP andererseits auch eine gewisse Protektion vor Schaumzellbildung zu bieten scheint [Singh et al. 2008a].

CD32 und CD64 sind auf ruhenden Monozyten u. a. mit CD14 und CD55 [Pfeiffer et al. 2001] sowie mit CD13 [Riemann et al. 2005] assoziiert – im Sinne eines multimeren Rezeptorkomplexes (vgl. 1.4). Auch CD16A kann z. B. durch Stimulation mit LPS in dieses Cluster eintreten [Pfeiffer et al. 2001]. Bei der Clusterbildung von Rezeptoren und der konsekutiven Signaltransduktion, insbesondere auch bei der Aktivierung monozytärer Fc γ -Rezeptoren spielen sog. Membran-Rafts eine entscheidende Rolle [Takai 2005, Hillyard et al. 2004]. Diese 10–200 nm großen, heterogenen Membran-Mikrodomänen sind reich an Sterol und Sphingolipiden; sie kompartimentieren zelluläre Prozesse und können – z. B. durch Zunahme des Ceridgehalts – zu größeren Lipid-Protein-Plattformen organisiert werden, die wesentliche Bedeutung für die Konzentrierung und Oligomerbildung von Proteinen sowie für die transmembrane Signaltransduktion besitzen [Schmitz and Grandl 2008, Schmitz and Grandl 2007, Pike 2006]. So folgt z. B. auf das Crosslinking des Fc γ RII (bzw. CD32) zunächst eine Produktion von Ceramid (was eine Assoziation kleinerer Membranmikrodomänen zu Rafts ermöglicht), dann eine Translokation des aktivierte CD32 in den Raft und schließlich dort die Signaltransduktion mit Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors [Abdel Shakor et al. 2004]. Beim

Krankheitsbild der heparininduzierten Thrombozytopenie (HIT) spielt am Thrombozyten die aktivierende Signaltransduktion über den Fc γ RIIA eine wesentliche Rolle, wofür thrombozytäre Lipidrafts die entscheidende Plattform darstellen [Bodin et al. 2003]. Grundlegende Details zur Fc γ -Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion nach intrazellär sind in Abb. 3 dargestellt.

Aktivierende und inhibierende Fc γ -Rezeptoren werden üblicherweise gleichzeitig auf einer Zelle exprimiert. Der Zelltyp, die Relation zwischen aktivierenden und inhibierenden Fc γ -Rezeptoren, deren spezifische Potenz sowie die spezifische Avidität der exprimierten Fc γ -Rezeptorklassen zum IgG-Subtyp (bzw. Pentraxin) und dessen Präsentationsart (Aggregationsdichte, Antigenbindung) bestimmen die zelluläre und letztlich die physiologische Antwort. Distal der unmittelbaren Signaltransduktion durch die Fc γ -Rezeptoren kann der spezifische Effekt vor und auch nach seiner eigentlichen Ausbildung vielschichtig moduliert werden. [Nimmerjahn and Ravetch 2006, Nimmerjahn and Ravetch 2005, Ravetch and Bolland 2001]

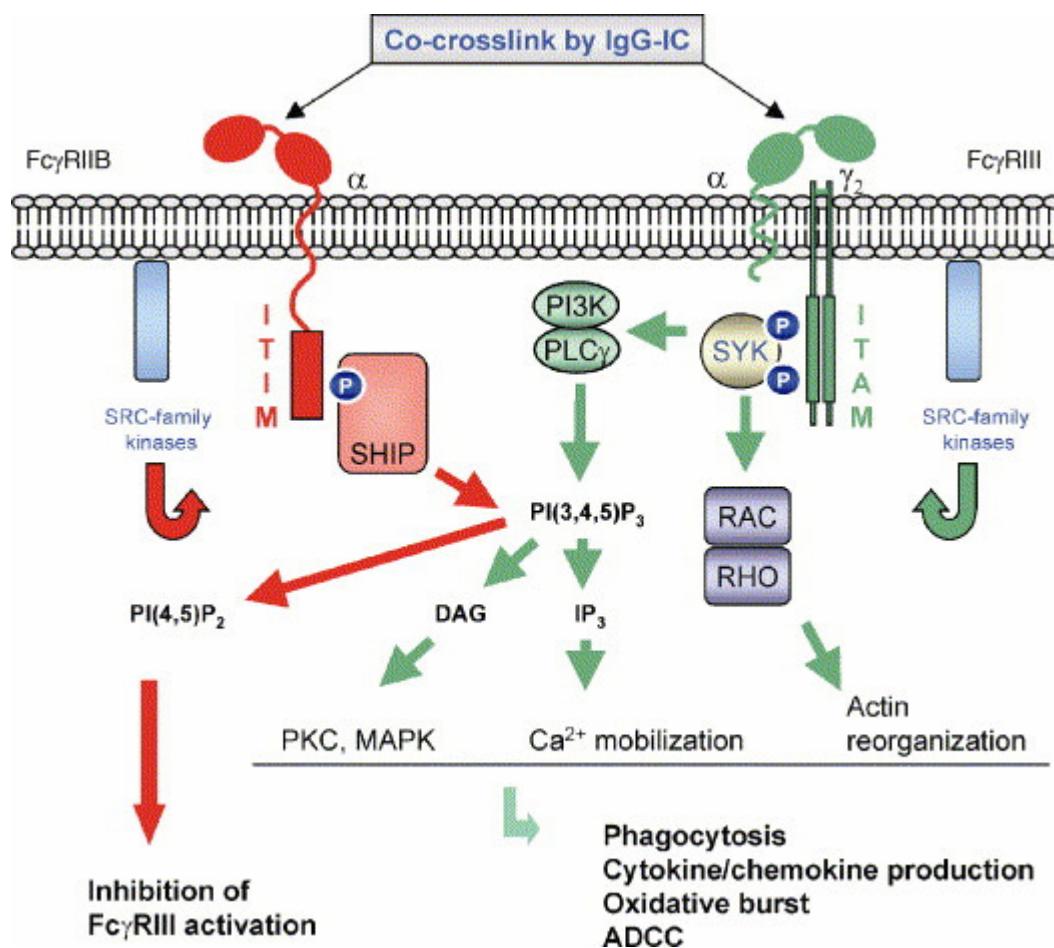


Abb. 3 (aus Schmidt and Gessner 2005): Das Clustering aktivierender Fc_γ-Rezeptoren, z. B. durch Immunkomplexe (IC) führt zur Phosphorylierung von Tyrosinresten im ITAM-Motiv (vgl. 1.5), was durch Proteinkinasen der SRC-Familie vermittelt wird. Dadurch wird die zytosolische Proteinkinase SYK aktiviert, die über die Stimulierung der Phospholipase-C_γ (PLC_γ), der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und der RHO- und RAC GTPasen eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), der Mitogen-activated protein kinase (MAPK), eine Calciummobilisierung und eine Reorganisierung des Zytoskeletts bedingt. Auf funktioneller Ebene kann daraus z. B. Phagozytose oder ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) resultieren. Der Aktivierungsprozess kann durch ein Co-Crosslinking des inhibierenden Fc_γRIIB an den ITAM-haltigen bzw. -assoziierten Fc_γ-Rezeptor abgeschwächt werden. Die dabei auftretende Phosphorylierung im ITIM-Motiv (vgl. 1.5) des Fc_γRIIB wird ebenfalls durch Proteinkinasen der SRC-Familie vermittelt und führt über den primären Effektor SHIP (SH2-domain-containing inositol polyphosphate 5' phosphatase) zur Hydrolyse von PI(3,4,5)P₃ (Phosphatidylinositoltriphosphat) zu PI(4,5)P₂; dies blockiert die PI(3,4,5)P₃-abhängige Bildung von IP₃ (inositol triphosphate), DAG (diacylglycerol) und den nachgeschalteten aktivierenden Prozessen. [Takai 2005, Nimmerjahn and Ravetch 2006]

1.7 Induktion monozytärer (TF-assozierter) prokoagulanter Aktivität im Zusammenhang mit Fc γ -Rezeptoren

Bei einer Vielzahl immunologischer Erkrankungen liegen in den Regionen der Gewebeschädigung Fibrin-/Fibrinogen-Antigen und leukozytäre Infiltrate vor. So z. B. bei der rheumatoïden Arthritis in der Gelenksynovia oder beim Lupus erythematoses und der Abstoßungsreaktion transplantiert Nieren insbesondere in den Nierenglomerula. [Rothberger et al. 1977] Zusammen mit der Beobachtung, dass Leukozyten potente prokoagulante Aktivität entwickeln können führte dies bereits in den späten 70er Jahren zu der Vermutung, dass Leukozyten eine immunologisch triggerbare, pathophysiologisch relevante Gerinnungsinduktion bewirken können. Dies konnte 1977 für die Inkubation von Leukozyten mit aggregiertem IgG und Immunkomplexen bestätigt werden [Rothberger et al. 1977], wobei sich in weiteren Arbeiten Monozyten als gerinnungsinduzierender Anteil der Leukozyten und Tissue Factor als dabei relevanter Induktor der Gerinnungskaskade herausstellten [Prydz et al. 1979].

Prydz et al. vermuteten, dass Immunkomplexe den Monozyten durch direkte Stimulation [Prydz et al. 1979, Lyberg et al. 1982] – z. T. über Fc γ -Rezeptoren [Lyberg and Prydz 1982] – zur Produktion prokoagulanter Aktivität veranlassen. Ein weiteres Indiz dafür, dass „aus der Aktivierung der (Fc γ R-positiven) Monozyten mittels Fc γ -Rezeptor-Crosslink hohe Mengen prokoagulanter Aktivität resultieren“ [Drechsler et al. 2002], lieferten Szabo und Miller-Graziano 1990. Bei ihnen zeigte sich (nur) in der Monozyten-subpopulation eine PCA-Induktion, in der die Immunkomplexe (Erythrozyten-Antikörper-Komplexe) an Fc γ -Rezeptoren (präferentiell Fc γ RI) banden. Szabo und Miller-Graziano vermuteten eine pathophysiologische Relevanz dieses Effektes bei Erkrankungen mit Bildung von Immunkomplexen (z. B. systemischer Lupus erythematoses), insbesondere nach einer dabei übernormal häufig erforderlichen Nierentransplantation. Keidan et al. beschrieben schließlich 1995 für das Crosslinking des monozytären Fc α -Rezeptors sowie für das als Kontrolle durchgeführte unselektive Crosslinking der Fc γ -Rezeptoren (ebenfalls präferentiell Fc γ RI) eine Induktion prokoagulanter Aktivität.

Eine Fc γ -Rezeptor-Aktivierung könnte mit zur Akkumulation von Tissue Factor in arteriosklerotischen Läsionen beitragen, infolge einer Wechselwirkung mit Pentraxinen (oder Immunglobulinen) die modifizierte Lipoproteine (z. B. Ox-LDL oder E-LDL) opsonieren und deren Aufnahme mit konsekutiver Schaumzellbildung fördern

[Schmitz and Grandl 2007, Calverley et al. 2004, Nagarajan 2007, Zwaka et al. 2001, Singh et al. 2008b]. Eine TF-Induktion durch Pentraxine über eine Fc γ -Rezeptor-Aktivierung ist denkbar [Wu et al. 2008, Cirillo et al. 2005, Cai et al. 2005, Cai et al. 2007, Napoleone et al. 2004], war aber zumindest in *isolierten* Monozyten/Makrophagen für die Pentraxine CRP und Serum Amyloid P component nicht nachzuweisen [Paffen et al. 2004, Sardo et al. 2008, Napoleone et al. 2004].

Ergebnisse von Schwartz und Edington von 1981 legten nahe, dass im Rahmen der Immunkomplex-induzierten monozytären PCA-Induktion eine (direkte) Aktivierung der Monozyten durch Lymphozyten zwingend erforderlich sei, was gegen einen direkten Effekt durch Fc γ R-Aktivierung spricht. Zumindest scheinen Zell-Zell-Interaktionen, z. B. auch mit Endothelzellen, für eine *volle* Entfaltung der prokoagulanten Aktivität erforderlich zu sein. Auch z. B. beim Antiphospholipidsyndrom spricht die Datenlage gegen eine Wirkungsentfaltung der Antiphospholipidantikörper über Fc γ R-Aktivierung [Wolberg and Roubey 2004b, Lopez-Pedrera et al. 2006, Wolberg 2007].

In einer Vollblut-Umgebung, wo bisher die monozytäre TF-Induktion nur für LPS und Immunkomplexe gezeigt werden konnte, scheinen wiederum spezielle proinflammatorische Zytokine für die Hochregulierung von TF und anderen prokoagulanten Proteinen verantwortlich zu sein [Eilertsen and Osterud 2005, Osterud 1998]. Dabei wird heutzutage IL-6 als Hauptmediator der durch Entzündung vermittelten Aktivierung der Blutgerinnung angesehen [Choi et al. 2006, Levi and van der Poll 2005].

Vor dem Hintergrund direkt durch Fc γ R-Crosslinking auslösbarer NF- κ B-Aktivierung [Drechsler et al. 2002], Calcium-Influx [Rankin et al. 1993] und TNF-alpha-Produktion [Debets et al. 1988] ist auch eine direkte Stimulierbarkeit der Monozyten zur PCA-Induktion durch Fc γ R-Aktivierung jedoch trotzdem für bestimmte Situationen denkbar – wie auch bei Prydz, Szabo und Keidan (vgl. oben) vermutet. Arbeiten zur Messung der monozytären TF-Expression oder PCA unter *selektivem* Crosslinking einer oder mehrerer monozytärer Fc γ -Rezeptor-Klassen konnten in der Literatur allerdings nicht gefunden werden – und für unselektives bzw. präferentielles Crosslinking nur die Arbeiten von Szabo und Keidan (s. o.).

1.8 Ziele der Arbeit

Grundlegendes Ziel der Arbeit war die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen den drei verschiedenen Fc γ -Rezeptor-Klassen und prokoagulanter Aktivität am Monozyten (vgl. 1.7) vor dem Hintergrund von Pathologien wie Immunkomplexerkrankungen oder Sepsis – mit spezieller Betrachtung der Korrelation der prokoagulanten Aktivität mit ihrem Hauptinitiator Tissue Factor.

Zum einen sollten dazu am Monozyten die drei Klassen humaner Fc γ -Rezeptoren vergleichend als Trigger prokoagulanter Aktivität untersucht werden (3.3). Die entsprechenden Messungen wurden auf mehreren Ebenen der TF- bzw. PCA-Induktion durchgeführt: auf der Ebene des Calcium-Influx als Sofortreaktion (3.3.1), der TF-mRNA-Expression (3.3.2), der gesamten TF-Proteinexpression (3.3.3), der TF-Oberflächenexpression (3.3.4) und der TF-Wirkung im Rekalzifizierungs-Assay (3.3.5). Dabei sollte die Etablierung einer speziellen Real-Time-PCR eine absolute Quantifizierung der revers transkribierten TF-mRNA bzw. TF-cDNA erlauben (3.2). Die Möglichkeit der TF-/PCA-Induktion wurde für immobilisierte Anti-Fc γ -Rezeptor-Antikörper, immobilisierte Anti-Fc γ -Rezeptor-F(ab')₂s und gelöste, sekundär vernetzte Anti-Fc γ -Rezeptor-F(ab')₂s beurteilt. Aufgrund der mehrfach gezeigten möglichen Divergenz der TF-Oberflächenexpression und der PCA am Monozyten (vgl. 4.3.2) erfolgte weiterhin die Ermittlung des durch einen neutralisierenden Anti-TF-Antikörper inhibierbaren Anteils der PCA (3.1.3.2) und eine direkte Korrelationsuntersuchung von TF-Oberflächenexpression und Rekalzifizierungszeit bzw. PCA (3.1.3.3).

Zum anderen sollte die Untersuchung der Fc γ -Rezeptor-Expression als Variable im Zusammenhang mit der Induzierbarkeit prokoagulanter Aktivität am Monozyten erfolgen (3.4). Dies wurde exemplarisch für den Fc γ -Rezeptor III (CD16) durchgeführt, der heutzutage den wohl bedeutendsten Marker monozytärer Subpopulationen darstellt [Ziegler-Heitbrock 2007] und gerade bei dem Krankheitsbild der Sepsis eine besondere Rolle spielt [Fingerle et al. 1993]. Als Modellsystem dienten dabei Monozyten in Vollblut und negativisolierte Monozyten, bei denen mittels Lipopolysaccharid TF/PCA induziert wurde; dieser Mechanismus ist speziell bei der Sepsis von hoher Relevanz. So wurde zunächst die Regulation von CD16 im Rahmen der PCA-Induktion (CD16-Expression als abhängige Variable; 3.4.1) untersucht. Schließlich sollte die Abhängigkeit der PCA-Induktion von der CD16-Expression (CD16-Expression als unabhängige Variable; 3.4.2) beurteilt werden. Über die Experimente mit Vollblut und negativ-

isolierten Monozyten hinaus war für die geplante getrennte Untersuchung der CD16⁺- und CD16⁻-Monozytensubpopulationen (3.4.2.2) die Etablierung deren Anreicherung erforderlich (3.1.2).

Grundlagen für die Experimente der beiden genannten Hauptteile der Arbeit wurden geschaffen durch Vorexperimente zur Isolierung der Monozyten (3.1.1) und zur Berechnung einer (relativen) prokoagulanten Aktivität (rPCA) aus der Rekalzifizierungszeit (3.1.3.1).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte (Geräte für Stofftrennung, -mischung und -transfer; Inkubatoren; Messgeräte)

Milli-Q (UF) Plus-Anlage	Millipore; Bedford, MA, USA
Heraeus Sepatech Magafuge 1.0 (R)	Heraeus Instruments; Hanau
Heraeus Biofuge 15 (R)	Heraeus Instruments; Hanau
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG; Zürich, Schweiz
Eppendorf ® Reference Series 2000	Eppendorf; Hamburg
Pipette (0,5–10 µl)	
Pipettus: Gilson Pipetman (10, 20, 50, 100, 200, 1000 µl)	Gilson, Inc.; WI, USA
Eppendorf Multipette plus pipetus®-akku	Eppendorf; Hamburg
Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt	
Elektrophorese-Kammer (inkl. Electrophoresis power supply - EPS 301)	Amersham pharmacia biotech Europe GmbH; Freiburg
Sterilbank LaminAir HB2472	Heraeus Instruments; Hanau
Zellkulturschrank 6000	Heraeus; Hanau
Wärmeschrank B6120	Heraeus; Hanau
Thermomixer compact	Eppendorf; Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf; Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf; Hamburg
Gene Amp PCR System 9600	Perkin Elmer; Überlingen
Schüttelwasserbad Julabo SW20C	JULABO Labortechnik GmbH; Seelbach
BIOMATIC K-10 inkl. 10-Kammer-Leiste und Schwingplättchen	Sarstedt; Nümbrecht
ADVIA® 120 Hematology System	Bayer Diagnostics; Fernwald
LightCycler (Ser. No. 1400769) inkl. LightCycler-Software Version 3.5	Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals; Mannheim
Lumi-Imager F1 inkl. LumiAnalyst 3.0-Software	Boehringer; Mannheim
FACSCalibur inkl. CellQuest-Software	Becton Dickinson; San José, CA, USA
Agilent 2100 Bioanalyzer System inkl. Software	Agilent Technologies; Palo Alto, CA, USA

GeneQuant pro RNA/DNA Calculator inkl. Quarzglasküvette (5 mm)	Biochrom Ltd; Cambridge, UK
Waage: Sartorius MC1 Laboratory LC820	Sartorius; Göttingen
Feinwaage: Sartorius Research ($e = 1$ mg)	Sartorius; Göttingen
EMax Microplate Reader	Molecular Devices Corporation; CA, USA
pH-Meter Knick Digital pH-Meter	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG; Berlin
Wilovert S-Mikroskop	Hund; Wetzlar

2.1.2 Verbrauchsmaterial (Einzelgefäße, Kulturschalen und Platten; Hilfsmittel für Stofftrennung, -mischung und -transfer)

LightCycler Sample Capillaries	Boehringer; Mannheim
0,2 ml PCR-SoftTubes (Art. Nr. 710908) / 0,5 ml PCR-SoftTubes (Art. Nr. 710918)	Biozym Scientific GmbH; Hess. Oldendorf
BD Falcon™ Multiwell Cell Culture Plates: 96-well flat-bottom with lid (Standard TC) (35 3072)	Becton Dickinson Discovery Labware; New Jersey, USA
Safe-Lock Reaktionsgefäß: 1,5 ml (0030 120.086) / 2,0 ml (0030 120.094)	Eppendorf; Hamburg
Safe-Lock Reaktionsgefäß: 1,5 ml, PCR clean (0030 123.328)	Eppendorf; Hamburg
MicroTubes for Cryogenic Applications: 1,5 ml , screw cap assembled, sterile (Ord. Nr. 72.692.005) / 2,0 ml , with graduation, skirted base, screw cap assembled, sterile (Ord. Nr. 72.694.006)	Sarstedt; Nümbrecht
BD Falcon™ Polystyrene Round Bottom Test Tubes	Becton Dickinson Discovery Labware; New Jersey, USA
BD Falcon™ Multiwell Cell Culture Plates: 6-well flat-bottom with lid (Standard TC) (35 3046)	Becton Dickinson Discovery Labware; New Jersey, USA
Costar Ultra Low Binding Plastic Plates (Cat. No. 3471); 6 Wells à Diam. 34,8 mm	Corning Life Sciences; NY, USA
100 x 20 mm Standard Cell Culture Dish , standard tissue-culture treated (Cat. No. 35 3003)	Becton Dickinson Discovery Labware; New Jersey, USA
Tube 15 ml , not sterile / Tube 50 ml , not sterile	Sarstedt; Nümbrecht
Tube 15 ml, sterile / Tube 50 ml, sterile	Sarstedt; Nümbrecht
S-Monovette®: Plasma, Lithium-Heparin 5,5 ml (03.1628.001)	Sarstedt; Nümbrecht

S-Monovette®: Hämatologie, Kalium-EDTA 9,0 ml (02.1066.001)	Sarstedt; Nümbrecht
Eppendorf Filtertips, steril, in Boxen (2,5 µl)	Eppendorf; Hamburg
Biozym SafeSeal-Tips (10, 20, 50, 100, 200, 1000 µl)	Biozym Diagnostik GmbH; Hess. Oldendorf
SLG® Filterspitzen FX0010E, FX0020, FX0100, FX0200, FX1000	Süd-Laborbedarf GmbH; Gauting
Sarstedt Pipette Tips: Typ E [0,1–10 µl] (70.1130.100), Typ D [0,5–20 µl] (70.1115), Typ A [2–100 µl] (70.760.002), Typ C [5–200 µl] (70.760.001), Typ B [100–1000 µl] (70.762)	Sarstedt; Nümbrecht
Eppendorf Combitips plus	Eppendorf; Hamburg
Disposable Serological Pipette, Polystyrene, Sterile, Non-Pyrogenic: 2, 5, 10, 25 ml	Sarstedt; Nümbrecht
Transferpipette 3,5 ml (86.1172.001)	Sarstedt; Nümbrecht
20 ml-Spritze Discardit II Sterile Syringe (BD) FRAGA SPAIN	Becton Dickinson Discovery Labware; New Jersey, USA
Disposable Glass Pasteur Pipettes (230 mm; REF D812; Cut Jet; Volac)	Poulten & Graf GmbH; Wertheim
Disposable Cell Scraper	Sarstedt; Nümbrecht
Acrodisc Syringe Filters with Supor PES Membrane for Sterile Filtration; PALL 32 mm 0,2/0,45 µm	Pall Corporation; NY, USA
CellStrainer 70 µm Nylon (352350)	Becton Dickinson Discovery Labware; New Jersey, USA
Parafilm® M Sealing Film	Brand GmbH & Co. KG; Wertheim

2.1.3 Chemikalien (protektive Substanzen; Substanzen zur Zell- und Proteindesintegration; Salze und Zucker; Pufferlösungen und Lösemittel; Farbstoffe und Fluoreszenzmarker; Zellstimuli)

2-Propanol 70 % (V/V)	B. Braun Melsungen AG; Melsungen
Pursept® A Sprühdesinfektion	Merz+Co.; Frankfurt
Pursept® A Desinfektionstücher für kleine Flächen	Merz+Co.; Frankfurt
RNase-Zap (RNase Decontamination Solution)	Ambion (Europe) Ltd.; Huntingdon Cambridgeshire, UK

Triton X-100	Sigma; Deisenhofen
FACS Lysing Solution (Cat. No. 349202)	Becton Dickinson Biosciences; San José, CA, USA
H ₂ SO ₄ (95–97%) (1.00731.1000)	Merck KGaA; Darmstadt
Sodium Chloride, Molecular Biology Grade	Calbiochem - Novabiochem Corporation; San Diego, CA, USA
CaCl ₂ (Salz)	Sigma; Deisenhofen
EDTA; Disodium Salt: Dihydrate, ACS Reagent, 500 g (E-4884)	Sigma; Deisenhofen
TRIS HCl pH 8,0	Sigma; Deisenhofen
Seakem LE Agarose	BioWhittaker Molecular Applications (BMA); Rockland, ME, USA
Aqua ad injectabilia Braun (1000 ml)	B. Braun Melsungen AG; Melsungen
Nuclease-Free Water (P1193)	Germany Promega GmbH; Mannheim
PBS-Dulbecco (1x) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , sterile (CatNo L1825)	Biochrom AG; Berlin
PBS Dulbecco's w/o sodium bicarbonate (14040-091)	GibcoBRL, Division of Invitrogen GmbH; Karlsruhe
TBE (Tris-Borate-EDTA), 10x liquid concentrate	Sigma; Deisenhofen
Biocoll Separating Solution (FICOLL Separating Solution) Cat. No. L6113	Biochrom AG; Berlin
Dimethylsulfoxide (DMSO) ACS-Reagenz (D-8779)	Sigma; Deisenhofen
Glycerin (87 %)	Sigma; Deisenhofen
Xylencyanol	Sigma; Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma; Deisenhofen
Fluo 3-AM; Approx. 70 %; 0,5 mg; (F-6142)	Sigma; Deisenhofen
Ethidiumbromide 10 mg/ml, for molecular biology, aqueous solution (E1510)	Sigma; Deisenhofen
Lipopolysaccharide (LPS) from <i>Salmonella enterica</i> serotype minnesota (L6261)	Sigma; Deisenhofen
Ionomycin Calcium Salt from <i>Streptomyces</i> <i>conglobatus</i> (1mg) (Prod. Nr.: I0634)	Sigma; Deisenhofen

2.1.4 Nukleinsäuren (DNA; Primer; RNA)

1 kB DNA-Ladder (Cat-No. 15 615-016) Invitrogen GmbH; Karlsruhe

Forward-Primer für TF: metabion; Martinsried

5'-ACT ACT GTT TCA GTG TTC AAG
CAG TGA TTC-3' [Scarpatti et al. 1987]

Länge: 30 bp; cDNA-Position: 722–751
(Exon 5); Amplimerlänge mit TF-r: 233 bp

Reverse-Primer für TF: metabion; Martinsried

5'-ATT CAG TGG GGA GTT CTC CTT
CCA GCT CTG-3' [Scarpatti et al. 1987]

Länge: 30 bp; cDNA-Position: 925–954
(Exon 6); Amplimerlänge mit TF-f: 233 bp

Forward-Primer für GAPDH: TIB MOLBIOL; Berlin

5'-TTG GTA TCG TGG AAG GAC
TCA-3' [Allen et al. 1987]

Länge: 21 bp; mRNA-Position: 504–524;
Amplimerlänge mit GAPDH-r: 270 bp

Reverse-Primer für GAPDH: TIB MOLBIOL; Berlin

5'-TGT CAT CAT ATT TGG CAG
GTT T-3' [Allen et al. 1987]

Länge: 22 bp; mRNA-Position: 752–773;
Amplimerlänge mit GAPDH-f: 270 bp

RNA 6000 Ladder Ambion (Europe) Ltd; Huntingdon, Cambridgeshire, UK

2.1.5 Proteine (Proteingemische und Aminosäuren; Antikörper und Fragmente; fluoreszenzmarkierte Antikörper)

Albumin bovine (**BSA**) Fraction V Biomol GmbH; Hamburg
(Art. Nr. 01400-1)

Albumin Bovine (**BSA**) Fraction V **Solution (7,5 %)**, prepared in DPBS, sterile filtered, Sigma; Deisenhofen endotoxin tested, cell culture tested
(A 8412; 100 ml)

L-Glutamine (100X), 100 ml, 200 mM, sterilfiltriert, Endotoxin-getestet (P04-80100) PAN Biotech GmbH; Aidenbach

Sandoglobulin®, 3 %ig; Wirkstoff: Immunglobulin vom Menschen zur intravenösen Anwendung (IVIg) <u>Wichtige Bestandteile der gebrauchsfertigen Lösung (200 ml):</u>	Novartis Pharma GmbH; Nürnberg
- Immunglobulin vom Menschen (mind. 96 % des humanes Proteins der Konzentration 30 g/l) mit IgG-Subklassenverteilung eines Normalserums und maximalem IgA-Gehalt von 2,4 g/l - humanes Protein außer Ig (max. Albumin-Gehalt 3 % des humanen Proteins) - Saccharose 5 g/l - Natriumchlorid	
Monoclonal antibody against human tissue factor (neutralizes the purified apoprotein of human tissue factor); mouse IgG1; myeloma cell line P3Ag8.653.1; Prod. No. 4509	American Diagnostica; Greenwich, CT, USA
Monoclonal anti-human CD16a (FcγRIII) mIgG₁; Clone Mem 154; Cat. Nr. CBL153	Cymbus Biotechnology [jetzt: Chemicon Europe Ltd.]; Hampshire, UK
Monoclonal anti-human CD32 (FcγRII) mIgG₁; Clone AT10; Cat. Nr. CBL552	Cymbus Biotechnology [jetzt: Chemicon Europe Ltd.]; Hampshire, UK
Monoclonal anti-human CD64 (FcγRI) mIgG₁; clone 10.1; Cat. Nr. CBL491	Cymbus Biotechnology [jetzt: Chemicon Europe Ltd.]; Hampshire, UK
Monoclonal anti-human CD16 (FcγRIII) F(ab')₂; Isotype: Mouse IgG₁; Clone: 3G8	Ancell Corporation; Bayport, MN, USA
Monoclonal anti-human CD32 (FcγRII) F(ab')₂; Isotype: Mouse IgG₁; Clone: 7.3	Ancell Corporation; Bayport, MN, USA
Monoclonal anti-human CD64 (FcγRI) F(ab')₂; Isotype: Mouse IgG₁; Clone: 10.1	Ancell Corporation; Bayport, MN, USA
AffiniPure anti-mouse IgG-light chain F(ab')₂; Isotype: goat F(ab')₂; fragment specific (minimal cross-reaction to Human, Bovine, and Horse Serum Proteins; may cross-react with immunoglobulins from other species)	Jackson Immuno Research Laboratories; West Grove, PA, USA
Monoclonal anti-human CD45 mouse IgG₁ (κ), clone 2D1; PerCP-conjugated; Cat. No. 347464	BD Biosciences; San José, CA, USA
Monoclonal anti-human CD14 mouse IgG_{2b} (κ), clone MφP9; APC-conjugated; Cat. No. 340436	BD Biosciences; San José, CA, USA
Monoclonal anti-human CD16 mouse IgG₁, clone 3G8; FITC-conjugated; Part No. IM0814	Beckman Coulter GmbH - Biomedical Research; Krefeld

Monoclonal anti-human CD16 mouse IgG ₁ , clone 3G8; PE-conjugated; Part No. IM1238	Beckman Coulter GmbH - Biomedical Research; Krefeld
Monoclonal anti-human CD142 mouse IgG ₁ (κ); clone HTF-1; PE-conjugated; Cat. No. 550312)	BD Biosciences BD Pharmingen; San Diego CA, USA

2.1.6 Blutbestandteile und Zellkulturmedien

Buffy-Coat-Präparate von gesunden Blutspendern	Rotes Kreuz; Regensburg
Venöses Vollblut von gesunden Spendern	Klinikum der Universität Regensburg, Transfusionsmedizin; Regensburg
Fötales Bovines Serum (FBS) (Cat. No. S 0113)	Biochrom KG; Berlin
VLE RPMI1640 Medium (1x) (Cat. Nr. F1415; w/o L-Glutamine)	Biochrom KG; Berlin

2.1.7 Kits und Zubehör (Zellpräparation; Proteinbiochemie; Nukleinsäurepräparation)

Vacutainer® CPT™ Cell Preparation Tube with Sodium Citrate	Becton Dickinson Vacutainer Systems; Franklin Lakes, NJ, USA
MACS CD14 MicroBeads: magnetische kolloidale Beads, konjugiert mit monoklonalem Maus-Antikörper (IgG2a) gegen humaines CD14	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
Monocyte Isolation Kit <u>Wichtige Bestandteile:</u> - Fc-Receptor Blocking Reagent: humaines Immunoglobulin - Hapten-Antibody-Cocktail: monoklonale, „Hapten“-konjugierte Maus-Antikörper gegen humaines CD3 (IgG2a), CD7 (IgG2a), CD19 (IgG1), CD45RA (IgG1), CD56 (IgG2b) und IgE (IgG2a) - Anti-Hapten MicroBeads: magnet. kolloidale Beads, konjugiert mit monoklonalen Anti-„Hapten“-Antikörpern	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
MACS CD16 MicroBeads (for isolation of eosinophils): magnet. kolloidale Beads, konjugiert mit monoklonalem Maus-Antikörper (IgM) gegen humaines CD16	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
MACS MultiStand MidiMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach

LS⁺ Separation Columns (positive selection of up to 10^8 positive cells from up to 2×10^9 total cells)	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
MiniMACS Separation Unit	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
MS Separation Columns (positive selection of up to 10^7 positive cells from up to 2×10^8 total cells)	Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach
Calibration beads: CALIBrite TM3	Becton Dickinson; San José, CA, USA
MicroBC Assay Protein Quantitation Kit <u>Wichtige Bestandteile:</u> Reagent A, B, C; BSA-Standard (0, 0,5, 1, 2,5, 5, 15, 40, 100 µg/ml)	KMF Laborchemie Handels GmbH; Sankt Augustin
Imubind® Tissue Factor ELISA Kit <u>Wichtige Bestandteile:</u> 6 x 16 well precoated micro-test strips; TF Standards (0, 50, 100, 200, 500, 1000 pg/ml); Detection Antibody (biotinylated anti-human TF F(ab') ₂); Substrate (TMB); Enzyme Conjugate (Streptavidin-horseradish peroxidase); Detergent (25 % Triton X-100); PBS Buffer pH 7,4	american diagnostica; Greenwich, CT, USA
High Pure RNA Isolation Kit <u>Wichtige Bestandteile:</u> Lyse-/Bindepuffer (RNase-inaktivierend); DNase-I; DNase Inkubationspuffer; Waschpuffer I; Waschpuffer II, Elutionspuffer, High Pure Filtrationsgefäße und Auffanggefäß	Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals; Mannheim
1 st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) <u>Wichtige Bestandteile:</u> 10x Reaction buffer; MgCl ₂ 25 mM; Deoxynucleotide Mix 40 mM; Random Primer p(dN)6 1,6 mg/ml bzw. 860 µM; RNase Inhibitor; AMV Reverse Transcriptase	Roche Diagnostics Corp., Roche Molecular Biochemicals; Indianapolis, IN, USA
Taq PCR Core Kit (1000) <u>Wichtige Bestandteile:</u> Solution Q; 10x-PCR-buffer; dNTP 40 mM; Taq-Polymerase 5 units/µl	Qiagen GmbH; Hilden
RNA 6000 LabChip® Kit <u>Wichtige Bestandteile:</u> RNA-Chips, RNA Dye Concentrate, RNA Sample Buffer, RNA Gel Matrix	Agilent Technologies; Palo Alto, CA, USA
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit <u>Wichtige Bestandteile:</u> GFX-Säulen; Collection-Tubes; Capture Buffer; Wash-Buffer	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH; Freiburg

LightCycler - FastStart DNA Master SYBR
Green I

Roche Diagnostics GmbH, Roche Molecular Biochemicals; Mannheim

Wichtige Bestandteile:

H₂O, sterile, PCR grade; MgCl₂ stock solution
25 mM; LightCycler-FastStart DNA Master
SYBR Green I

2.2 Methoden

2.2.1 Anmerkungen

Die Fettdrucke im Materialteil (2.1) sollen das Auffinden der hier eingesetzten Materialien erleichtern.

Zentrifugationen und Inkubationen wurden, wo nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Sterilfiltrierungen wurden mit einem Acrodisc Syringe Filter (0,45 µm) durchgeführt (2.1.2).

Salze wurden, wo nicht anders angegeben, in Aqua ad injectabilia gelöst. Die Stammlösung für LPS (Konzentration: 10 mg/ml) wurde auch mit Aqua ad injectabilia erstellt. Der neutralisierende Anti-TF-Antikörper wurde in lyophilisierter Form (0,5 mg) – aus einer Lösung (1 mg/ml) von 150 mM PBS (pH 7,4) mit 100 mM Mannitol stammend – mit 0,5 ml Aqua ad injectabilia zu einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Die drei monoklonalen Anti-FcγR-Antikörper wurden in einer Konzentration von ca. 0,2 mg/ml in PBS mit 10 mM Natriumazid (NaN_3) und mit 1 mg/ml BSA geliefert, die drei monoklonalen Anti-FcγR-F(ab')₂s in einer Konzentration von 1,0 mg/ml in einer Pufferlösung mit 50 mM Natriumphosphat (pH 7,5), 100 mM Kaliumchlorid und 150 mM NaCl. Das Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab')₂ lag in einer Konzentration von 1,3 mg/ml in einer Pufferlösung mit 10 mM Natriumphosphat (pH 7,6) und 250 mM NaCl vor.

Die für ein bestimmtes Experiment erforderliche Zusammenstellung der im Folgenden aufgeführten Methoden und Prozeduren ist im Ergebnisteil angegeben. Einfachere Abläufe und Prozeduren sind zur besseren Übersicht z. T. auch direkt im Ergebnisteil mit aufgeführt.

2.2.2 Gewinnung von Blutzellen/-plasma

2.2.2.1 Buffy-Coat-Präparate

Verwendet wurden Buffy-Coat-Präparate, die beim Blutspendedienst Bayerisches Rotes Kreuz gGmbH, Institut Regensburg (Hoher-Kreuz-Weg 7, 93055 Regensburg) aus Vollblutspenden von gesunden Blutspendern generiert wurden.

Die BuC-Präparate stellen den für Transfusionszwecke nicht benötigten Überrest der venösen Vollblutspende dar. Ausgangsmaterial war jeweils eine frische ve-

nöse Vollblutspende (ca. 500 ml), die mit 70 ml der Stabilisatorlösung CPD (Citronensäure-Monohydrat 3,27 g/l, Natriumcitrat-Dihydrat 26,3 g/l, Glucose-Monohydrat 25,5 g/l, Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 2,51 g/l) versetzt wurde. Nach Zentrifugation erfolgte das automatische Abpressen der einzelnen Schichten (Plasma, BuC, Erythrozyten). Das der BuC-Schicht entsprechende BuC-Präparat (Gesamtvolumen zwischen 35 und 60 ml) setzte sich somit zu einem Volumenanteil von 45 % aus Zellen (Erythrozyten und angereicherte Leukozyten) und einem Volumenanteil von ca. 55 % aus flüssigen Bestandteilen (7 Teile Blutplasma, 1 Teil CPD) zusammen.

Die Zeit vom Beginn der Blutspende bis zum Vorliegen des fertigen BuC-Präparats betrug ca. 2 h.

2.2.2.2 Venöses Vollblut

Verwendet wurde venöses Vollblut, das am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg (Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg) bei gesunden Spendern im Rahmen der Routinediagnostik mit abgenommen wurde. Das venöse Vollblut wurde nach Hautdesinfektion direkt in Lithium-Heparin-Monovetten abgenommen. Die Weiterverarbeitung erfolgte, wie in 2.2.6 beschrieben.

2.2.2.3 Poolplasma und autologes Plasma

Als Ausgangsmaterial für das Poolplasma diente venöses Vollblut, das am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg (Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053 Regensburg) von gesunden Spendern gewonnen wurde. Das venöse Vollblut von jeweils ca. 8 Spendern wurde nach Hautdesinfektion direkt in Kalium-EDTA-Monovetten abgenommen und darin zentrifugiert (1700 RCF, 30 min). Die Überstände wurden mit einer 3,5-ml-Transferpipette in sterile 15-ml-Tubes transferiert und erneut zentrifugiert (3023 RCF, 10 min), um Thrombozyten hinreichend zu depletieren. Alle Überstände wurden in einem sterilen 50-ml-Tube gesammelt und vorsichtig gemischt. Anschließend erfolgte die Aliquotierung in sterilen 1,5-ml-Micro-Tubes oder sterilen 15-ml-Tubes und das Einfrieren bei –20 °C bis zum Zeitpunkt der Verwendung.

Autologes Plasma wurde, wo erforderlich, im Rahmen der jeweiligen PBMC-Isolierung (2.2.4.1) aus dem BuC-Präparat mitgewonnen: entweder als Überstand des in Vacutainers zentrifugierten, 1:2-verdünnten BuC (2.2.4.1) oder als Überstand aus analog zentrifugiertem (1700 RCF, 30 min), unverdünntem BuC. In beiden Fällen erfolgte eine weitere Zentrifugation (3023 RCF, 10 min), um Thrombozyten hinreichend zu depletieren. Das autologe Plasma lag somit in einer 1:2-Verdünnung bzw. weitgehend unverdünnt vor (CPD-Anteil weitgehend vernachlässigbar) und wurde bis zur Verwendung bei 8 °C im Kühlschrank in einem sterilen 15-ml-Tube gelagert.

2.2.3 Bestimmung der Leukozytenzahl

Die Messung der Leukozytenzahl erfolgte grundsätzlich (wo nicht anders erwähnt) mit dem ADVIA 120 Hematology System (2.1.1). Die Zahl der weißen Blutzellen wird dort über einen Kanal für Peroxidase und einen Kanal für Basophile bestimmt. Der primäre Wert stammt aus dem Kanal für Basophile und kann durch den zusätzlichen Wert aus dem Kanal für Peroxidase geprüft und „balanciert“ werden.

2.2.4 Isolierung von Monozyten und deren CD16⁺/CD16⁻-Subpopulationen

Die zelluläre Zusammensetzung der Isolate wurde entweder direkt nach der Isolationsprozedur oder im Rahmen der anschließenden Experimente durchflusszytometrisch untersucht.

2.2.4.1 Isolierung mononukleärer Zellen (PBMC) aus Buffy-Coat-Präparaten mit Vacutainers oder FICOLL

Ein BuC-Präparat (Weiterverarbeitung meist innerhalb von 6 h, max. 20 h nach Herstellung) wurde 1:2 mit sterilem DPBS verdünnt und unter sterilen Bedingungen in Vacutainers (2.1.7) pipettiert. Durch 30 min Zentrifugation mit 1700 RCF sanken Erythrozyten und Granulozyten in die Gelmatrix und die PBMC reicherteten sich im Überstand stark an. Nach Resuspendierung der Zellpellets durch Schwenken der Vacutainers wurden die Überstände in sterilen 50-ml-Tubes gesammelt (s. u.). In wenigen Experimenten (dort explizit erwähnt) wurde anstatt der Vacutainers eine FI-

COLL-Lösung (2.1.3) eingesetzt. Der auch dort 1:2 mit sterilem DPBS verdünnte BuC wurde dabei vorsichtig auf 25 ml FICOLL pipettiert, anschließend 30 min mit 425 RCF zentrifugiert und schließlich die Fraktion mit den angereicherten PBMC (an der Grenze Überstand/FICOLL) vorsichtig manuell mit 3,5-ml-Transferpipetten abgezogen.

Die in zwei sterile 50-ml-Tubes gepoolten PBMC-Fraktionen aus den Vacutainers bzw. FICOLL-Ansätzen wurden durch erneute Zentrifugation (272 RCF, 10 min) pelletiert. Das Pellet wurde zur Reduktion von Plasmabestandteilen und Thrombozyten 2- bis 3-mal mit sterilem DPBS, 2 mM sterilfiltrierte EDTA-Lösung enthaltend, gewaschen (jeweils 10 min Zentrifugation mit 188 RCF) und zur Entfernung von Zellaggregaten (nach dem ersten Waschgang) durch einen 70-µm-CellStrainer gefiltert. Das Zellpellet wurde anschließend direkt weiterverarbeitet (bei geplanter monozytärer Negativisolierung mit anschließender Gewinnung der CD16⁺-Monozyten oder geplanter Positivisolierung) oder resuspendiert und vorübergehend gelagert (bei geplanter monozytärer Negativisolierung ohne anschließende Subpopulationsisolierung). Die Lagerung erfolgte – in Anlehnung an die Empfehlungen im Monocyte Isolation Kit – nach Resuspendierung des Pellets in 10–15 ml sterilem DPBS mit 2 mM sterilfiltrierter EDTA-Lösung und 5 % bzw. 10 % Volumenanteil autologem Plasma (entsprechend einer Zugabe von 10 % Volumenanteil 1:2-verdünntem bzw. unverdünntem autologen Plasma; Herkunft: 2.2.2.3) im Kühlschrank bei 8 °C für 10–15 h.

2.2.4.2 Positivisolierung von Monozyten aus PBMC mit Magnetbeads

Das Pellet der PBMC (2.2.4.1) wurde mit Waschpuffer (steriler DPBS mit 2 mM sterilfiltrierter EDTA-Lösung und mit sterilfiltrierter 7,5 %iger BSA-Lösung der Endkonzentration 0,5 %) resuspendiert und auf ca. $1,25 \cdot 10^5$ Leukozyten/µl eingestellt. Nach Zummischung von 1/4 Volumenteil MACS CD14-MicroBeads wurde die Suspension 15 min bei 6–12 °C inkubiert und ungebundener Antikörper durch anschließendes Waschen mit 20–40 ml Waschpuffer entfernt. Die pelletierten Zellen wurden mit diesem Puffer auf eine Konzentration von ca. $2,0 \cdot 10^5$ Leukozyten/µl eingestellt und auf vorgespülte, magnetisierte LS⁺-Säulen appliziert. Mittels 3-maliger Applikation von 3 ml Waschpuffer wurden ungebundene Zellen aus der Säule gespült. Die Monozytenfraktion wurde schließlich mit 5 ml Waschpuffer unter manuell erzeugtem Druck aus der entmagnetisierten Säule eluiert. Nach Zentrifugation des Eluats (425 RCF,

10 min) und Resuspendierung in ca. 2 ml Zellkulturmedium (primär L-Glutamin-freies RPMI1640 mit FBS in einem Volumenanteil von 10 % und L-Glutamin-Lösung in einem Volumenanteil von 1 % und mit einer Endkonzentration von 2 mM) wurde die Zellzahl bzw. Monozytenzahl näherungsweise anhand der Leukozytenzahl bestimmt. Die Leukozytenzahl wurde mit dem Zellkulturmedium auf 1 Mio./ml eingestellt. Nach vorübergehender Inkubation in Costar-6er-Zellkulturplatten über Nacht (17–18 h) wurden die Zellen entweder direkt in den Platten stimuliert oder vor der Stimulation geerntet, gepoolt, pelletiert (425 RCF, 10 min) und in dem anschließend benötigten Puffer resuspendiert.

2.2.4.3 Negativisolierung von Monozyten aus PBMC mit Magnetbeads

Die isolierten PBMC (2.2.4.1) wurden – sofern eine zwischenzeitliche Lagerung bei 8 °C stattgefunden hatte – mit sterilem DPBS mit 2 mM sterilfiltrierter EDTA-Lösung gemischt (Gesamtvolumen ca. 40 ml), mit sterilfiltrierter 7,5 %iger BSA-Lösung versetzt (Endkonzentration 0,5 %), bei Bedarf durch einen 70-µm-CellStrainer gefiltert und erneut pelletiert (10 min Zentrifugation mit 188 RCF bei 4 °C).

Das Zellpellet wurde mit Waschpuffer (wie in 2.2.4.2) resuspendiert und auf ca. $1,67 \cdot 10^5$ Leukozyten/µl eingestellt. Die Negativisolierung erfolgte mit dem Monocyte Isolation Kit, der monoklonale Maus-Antikörper gegen CD3 (auf T-Zellen und Thymozyten), CD7 (auf T-Zellen, Thymozyten und *lymphoiden Progenitorzellen* [Hao et al. 2001]), CD19 (auf B-Zellen), CD45RA (auf B-Zellen, naiven T-Zellen und aktivierten Monozyten [Schwinzer et al. 1992]), CD56 (auf NK-Zellen und einer kleinen monozytären Subpopulation [Rothe et al. 1996]) und gegen IgE (über IgE-Rezeptor auf basophilen Granulozyten) enthält. Dazu wurden zunächst 1/3 Volumenteil Fc-Receptor Blocking Reagent und 1/3 Volumenteil Hapten-Antibody-Cocktail zugemischt und die Suspension 5 min bei 6–12 °C inkubiert. Durch zwei Waschschrifte (jeweils 10 min Zentrifugation mit 188 RCF) mit dem Waschpuffer wurden überschüssige Antikörper entfernt und bereits gebundene Fc-Rezeptor-blockierende Antikörper (welche sich laut Hersteller relativ leicht wieder ablösen) abgelöst. Bei einer eingestellten Konzentration von erneut ca. $1,67 \cdot 10^5$ Leukozyten/µl wurden diesmal 1/3 Volumenteil Fc-Receptor Blocking Reagent und 1/3 Volumenteil Anti-Hapten MicroBeads zugemischt und die Suspension 15 min bei 6–12 °C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschritt mit dem Waschpuffer (10 min Zentrifugation mit 188 RCF) wurde das Zellpellet mit die-

sem Puffer auf eine Konzentration von $2,0 \cdot 10^5$ Leukozyten/ μl eingestellt, auf vorgespülte, magnetisierte LS⁺-Säulen appliziert und pro Säule vier Mal mit 3 ml Waschpuffer nachgespült. Die Säulendurchflüsse wurden gesammelt, pelletiert (425 RCF, 10 min) und in dem anschließend benötigten Puffer bzw. Zellkulturmedium resuspendiert.

2.2.4.4 Adhärenzselektion von Monozyten aus PBMC

In einem in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Experiment (3.2.3.1) erfolgte die Monozytenisolierung mittels Adhärenz am Schalenboden. Mit FICOLL-Lösung isolierte PBMC (2.2.4.1) wurden dazu unmittelbar nach der Gewinnung zu je 50 Mio. in Zellkulturmedium (wie in 2.2.4.2) in 100 x 20 mm Standard Cell Culture Dishes inkubiert (1 h, 37 °C, 5 % CO₂). Danach wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und einmal mit 10 ml sterilem DPBS gespült. Nach erneuter Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium erfolgte die Inkubation der weiterhin adhärenten Monozyten bis zur Stimulation (wieder bei 37 °C und 5 % CO₂).

2.2.4.5 Positiv- bzw. Negativisolierung von CD16⁺- bzw. CD16⁻-Monozyten aus negativisierten Monozyten mit Magnetbeads

Die Isolierung von CD16⁺-Monozyten erfolgte aus negativisierten Monozyten (2.2.4.3), die wiederum aus gewaschenen PBMC (2.2.4.1) ohne längere zwischenzeitliche Lagerung gewonnen wurden.

Das Pellet aus negativisierten Monozyten wurde in ca. 140 μl Waschpuffer (wie in 2.2.4.2) resuspendiert. Nach Zumischung von 10–15 μl MACS CD16 MicroBeads wurde die Suspension 30 min bei 6–12 °C inkubiert und anschließend mit Waschpuffer gewaschen (10 min Zentrifugation mit 188 RCF), zur Entfernung überschüssiger Beads. Gegenüber diesem optimiertem Inkubationsprotokoll bestanden in den ersten Experimenten minimale Abweichungen, insbesondere die Inkubationsdauern und MicroBead-Volumina betreffend. Nach Einstellung des Volumens mit Waschpuffer auf 500–1000 μl wurde die Zellsuspension auf eine vorgespülte, magnetisierte LS⁺- bzw. MS-Säule (mit der MS-Säule zeigten sich im Verlauf etwas höhere Reinheiten) appliziert und vier Mal mit 3 ml (LS⁺-Säule) bzw. drei Mal mit 500 μl (MS-Säule) Waschpuffer nachgespült. Die Säulendurchflüsse wurden als CD16-

Fraktion gesammelt. Die CD16⁺-Fraktion wurde mit 5 ml (LS⁺-Säule) bzw. 1 ml (MS-Säule) Waschpuffer und unter manuell erzeugtem Druck aus der entmagnetisierten Säule eluiert. Das Eluat wurde auf eine neue vorgespülte, magnetisierte LS⁺- bzw. MS-Säule appliziert und auf gleiche Weise (s. o.) als *zweifach angereicherte* CD16⁺-Fraktion eluiert.

2.2.5 Spezielle Inkubationen der Monozyten und Monozytensubpopulationen

Einfachere Inkubationen der Monozyten sind im Ergebnisteil jeweils kurz beschrieben wie z. B. die Stimulation der Monozyten oder Monozytensubpopulationen mit LPS. Die speziellen bzw. komplexeren Inkubationen sind im Folgenden aufgeführt. Die Inkubationszeiten für Proteinexpression und prokoagulante Aktivität orientieren sich z. T. an dem Zeitpunkt des Maximaleffekts der TF-Proteinexpression unter LPS, der z. B. nach Henriksson et al. bei ca. 4 h liegt [Henriksson et al. 2005].

2.2.5.1 Crosslinking von Fc γ -Rezeptoren mit immobilisierten Antikörpern

Falcon-6er-Zellkulturplatten wurden mindestens 14 h bei 4 °C mit sterilem DPBS (für Negativ- und Positivkontrolle), sterilem DPBS mit sterilfiltrierter 7,5 %iger BSA-Lösung der Endkonzentration 10 µg/ml, sterilem DPBS mit 10 µg IVIg/ml oder sterilem DPBS mit monoklonalem Anti-human-CD16A- bzw. Anti-human-CD32- bzw. Anti-human-CD64-mIgG₁ (Endkonzentration 10 µg/ml) vorinkubiert.

Angereicherte CD16⁺- und CD16⁻-Monozytensubpopulationen (2.2.4.5) – aus negativisierten Monozyten stammend (2.2.4.3) – wurden in die vorbeschichteten, gewaschenen (zweimaliges Spülen aller Schalen mit jeweils 2 ml sterilem DPBS) und mit Zellkulturmedium (wie in 2.2.4.2) beladenen Schalen pipettiert (à ca. 0,385 Mio.). Zum Vergleich wurden z. T. Inkubationen mit den Gesamtmonozyten vor der Subpopulationsauftrennung mitgeführt. Den Positivkontrollen wurde zusätzlich LPS in einer Endkonzentration von 150 ng/ml hinzugefügt. Nach einer 10-stündigen Inkubation erfolgte die Zellernte durch Zugabe von jeweils 1000 µl sterilem DPBS in die Schale und das Abkratzen vom Schalenboden. Direkt im Anschluss an eine Zentrifugation (447 RCF, 5 min) und einen Waschschnitt mit 1,5 ml sterilem DPBS (10 min Zentrifugation mit 181 RCF) wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von je ca. 530 µl

sterilem DPBS resuspendiert und à 100 µl im Rekalzifizierungs-Assay eingesetzt (2.2.11).

2.2.5.2 Crosslinking von Fcγ-Rezeptoren mit immobilisierten F(ab')₂-Fragmenten

Falcon-6er-Zellkulturplatten wurden über Nacht (14–17 h) bei 4 °C mit sterilem DPBS (für Negativ- und Positivkontrolle), sterilem DPBS mit sterilfiltrierter 7,5 %iger BSA-Lösung der Endkonzentration 10 µg/ml, sterilem DPBS mit 10 µg IVIg/ml oder sterilem DPBS mit monoklonalem Anti-human-CD16- bzw. Anti-human-CD32- bzw. Anti-human-CD64-F(ab')₂ (10 µg/ml) der Maus (mlG_{G1}) vorinkubiert. Das Volumen pro Well betrug dabei 1 ml. In vorangehenden Beschichtungsversuchen hatten sich für die drei F(ab')₂-Fragmente zwischen 0,13 bis 0,74 µg adhärentes Protein pro 9,35 cm² bzw. pro Well ergeben. Mit einer ungefähren Masse eines F(ab')₂-Fragments von 100 kDa und einem angenommenen Durchmesser von ca. 10 nm bei approximativ kreisrunder Fläche von $(\text{Durchmesser}/2)^2 * \pi$ könnte bei gleichmäßiger Verteilung damit theoretisch eine Fläche von ca. 615 cm² (66 Wells) abgedeckt werden.

Positiv- bzw. negativisierte Monozyten (2.2.4.2 bzw. 2.2.4.3) wurden in einer definierten Menge (ca. 2–5 ml) Zellkulturmedium (wie in 2.2.4.2) resuspendiert und die Leukozytenzahl darin gemessen. Nach dem Einfüllen von 750–950 µl Zellkulturmedium mit bzw. ohne LPS in die vorbeschichteten Schalen (unmittelbar vor dem Einfüllen zweimaliges Spülen aller Schalen mit jeweils 2 ml sterilem DPBS) wurde durch Zugabe von jeweils 50–250 µl der Monozytensuspension die Stimulation gestartet. Das Gesamtvolumen in jedem Well betrug somit ca. 1 ml, die Monozytenzahl (bzw. Leukozytenzahl) $770.000 \pm 5\%$ (Versuche mit positivisierten Monozyten) bzw. 1 Mio. $\pm 5\%$ (Versuche mit negativisierten Monozyten) und die LPS-Konzentration in den Schalen für die Positivkontrolle ca. 150 ng/ml. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ für verschiedene Zeiträume zwischen 0 h (keine Inkubation) und 20 h.

Am Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen eines Wells durch sorgfältiges Abkratzen vom Boden (mittels eines Cell Scrapers) mobilisiert, mit 1 ml eiskaltem sterilen DPBS vermischt und (mit einer sterilen 3,5-ml-Transferpipette) aus dem Well in ein (bis zum Einfrieren der Zellen) auf Eis gehaltenes, autoclaviertes 2-

ml-Safe-Lock-Reaktionsgefäß transferiert. Es folgte eine Zentrifugation (546 RCF, 5 min, 4 °C) mit anschließend sehr vorsichtigem, weitgehend vollständigem Absaugen des Überstands, Resuspendierung und Auffüllen des Reaktionsgefäßes mit jeweils 1000 µl eiskaltem, sterilem DPBS. Nach erneuter Zentrifugation (546 RCF, 7 min, 4 °C) und Absaugen des Überstands wurde das Pellet nach Zugabe von 100 µl eiskaltem, sterilem DPBS resuspendiert. Bis zur Messung des Gesamtprotein- und des TF-Gehalts (2.2.9.1, 2.2.9.2) wurde die Zellsuspension – auf 2 bis 3 autoclavierte 1,5-ml-Safe-Lock-Reaktionsgefäß aufgeteilt – eingefroren. Bis zur RNA-Extraktion für die Messung der TF-mRNA wurden die entsprechenden Inkubationen (100 µl) mit jeweils 200 µl Lyse-/Bindepuffer (2.1.7) vermischt und eingefroren.

2.2.5.3 Crosslinking von Fcγ-Rezeptoren mit gelösten F(ab')₂-Fragmenten

Um durch das Crosslinking der Fcγ-Rezeptoren mit *gelösten* F(ab')₂s einen ausreichenden Effekt zu erhalten, wurden zwei Schritte durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte die Inkubation der Monozyten mit einem gegen eine bestimmte humane Fcγ-Rezeptor-Klasse gerichteten *primären* F(ab')₂ der Maus. Im zweiten Schritt wurde mit einem gegen die Leichtketten des primären F(ab')₂ gerichteten *sekundären* F(ab')₂ der Ziege inkubiert. Die Zahl der Fcγ-Rezeptoren, die in unmittelbarer Nachbarschaft gehalten werden können steigt dabei theoretisch von jeweils zwei (erster Schritt) auf ein Vielfaches (zweiter Schritt). Vorexperimente bezüglich des Rezeptor-Crosslinkings hatten erst für eine Konzentration ab 25 µg/ml (sowohl für primäres als auch für sekundäres F(ab')₂) erste erkennbare Effekte gegenüber der Negativkontrolle ergeben. Zur Sicherheit wurde für die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Experimente dann eine Konzentration von 50 µg/ml gewählt, die in den Vorexperimenten durchweg gut erkennbare Effekte ergab. Zum Sparen der teuren F(ab')₂-Fragmente wurden keine noch höheren Konzentrationen eingesetzt.

Aus einem BuC-Präparat isolierte PBMC wurden über Nacht ca. 15 h lang gelagert (2.2.4.1). Mit dem Monocyte Isolation Kit wurden die Monozyten am nächsten Tag negativisoliert (2.2.4.3), in ca. 10 ml sterilem DPBS resuspendiert, 1–2 h im Kühlschrank bei 8 °C zwischengelagert und schließlich mit sterilem DPBS auf eine Zellzahl von 5000 Leukozyten/µl eingestellt (sog. Stammsuspension).

Aus der Stammsuspension wurden mehrere 100-µl-Aliquots in sterile 1,5-ml-Micro-Tubes transferiert. Ein Teil dieser Ansätze wurde mit 5 µl monoklonalem Anti-

human-CD16- bzw. Anti-human-CD32- bzw. Anti-human-CD64-F(ab')₂ der Maus (mlgG₁) versetzt (Endkonzentration ca. 50 µg/ml), die anderen Ansätze wurden als Negativ- bzw. Positivkontrollen zunächst noch unverändert belassen. Für alle Ansätze folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis, ein anschließendes Waschen (425 RCF, 7 min, 4 °C) und schließlich die Resuspendierung mit je 100 µl glutaminfreiem RPMI1640. Nach Zugabe von weiteren 154 µl dieses Mediums wurden die Ansätze auf Costar-6er-Zellkulturplatten übertragen (die Platten waren mit diesem Medium vorbenetzt worden) und bei 37 °C und 5 % CO₂ ca. ½–1 h bis zur Stimulation inkubiert.

Die Stimulation erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden 200 µl Basislösung zugegeben, die je nach Inkubation aus glutaminfreiem RPMI1640, IVIg (Endkonzentration des Immunglobulins 11,6 mg/ml bzw. 1:2,6-Verdünnung) oder autologem Plasma (gegenüber dem BuC-Präparat 1:2,6 verdünnt, gegenüber normalem Blutplasma 1:3,0 verdünnt; Gewinnung: 2.2.2.3) bestand. In einem zweiten Schritt wurde eine LPS-Verdünnung (Endkonzentration ca. 150 ng/ml) oder das AffiniPure Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab')₂ der Ziege (Endkonzentration ca. 50 µg/ml) zupipettiert, was dem eigentlichen Beginn der Stimulation entsprach. Das Gesamtvolumen im Well betrug somit ca. 520 µl, die Zellzahl ca. ½ Mio. Es folgte eine 6-stündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂.

Ein Teil der oben erwähnten Stammsuspension wurde – parallel zu obigen Arbeitsschritten – mit einer Fluo-3-AM-Lösung (4 mM in DMSO) versetzt (Endkonzentration 2 µM), à 50 µl auf autoclavierte 1,5-ml-Safe-Lock-Reaktionsgefäße aliquotiert und 30 min im Dunkeln bei 37 °C und Schüttelung inkubiert. Zu den Testansätzen wurden anschließend je 2,5 µl monoklonales Anti-human-CD16- bzw. Anti-human-CD32- bzw. Anti-human-CD64-F(ab')₂ der Maus (mlgG₁) zupipettiert (Endkonzentration ca. 50 µg/ml), die Positiv- und Negativkontrollen wurden unverändert belassen. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis und einem anschließenden Waschschritt (425 RCF, 7 min, 4 °C) wurden die Pellets mit je 100 µl DPBS (Ca²⁺-haltig) resuspendiert. Die Suspensionen wurden bis zur Stimulation und Messung am Durchflusszytometer (2.2.7) im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

Am Ende der 6-stündigen Inkubation (siehe vorletzter Absatz) wurden die Zellen nach Zugabe von 1 ml sterilem DPBS mit einer 3,5-ml-Transferpipette vom Plattenboden abgeschwemmt und in verschiedene eisgekühlte autoclavierte 2-ml-Safe-Lock-Reaktionsgefäße transferiert. Während der folgenden zwei Zentrifugati-

onsschritte (zuerst 7 min mit 425 RCF und anschließender Resuspendierung in ca. 1,5 ml sterilem DPBS, dann 5 min mit 425 RCF und anschließender Resuspendierung in gut 200 µl sterilem DPBS) und bis zur anschließenden Messung wurden die Zellen bzw. Zellsuspensionen ständig auf Eis gehalten. Das eine 100-µl-Aliquot wurde durchflusszytometrisch bezüglich der TF-MFI untersucht (2.2.10). Das zweite 100-µl-Aliquot wurde im RKZ-Assay bezüglich der RKZ bzw. rPCA untersucht (2.2.11) und dazu mit sterilem DPBS entweder auf 450 µl (für 4 RKZ-Ansätze) oder auf 900 µl gestreckt (für 4 RKZ-Ansätze vor, und weitere 4 RKZ-Ansätze nach 10-minütiger Inkubation mit dem neutralisierenden Anti-TF-Antikörper bei 37 °C).

2.2.6 Inkubation von Vollblut

Vollblutproben in Lithium-Heparin-Monovetten (Gewinnung: 2.2.2.2) wurden 1:2 mit RPMI1640 verdünnt und in Costar-6er-Zellkulturplatten mit 150 ng LPS/ml (Positivkontrolle) bzw. ohne Stimulus (Negativkontrolle) inkubiert (6 h, 37 °C, 5 % CO₂). Nach Ende der Inkubation wurde die Zellsuspension in jedem Well mit einer Pipette vorsichtig gemischt und davon jeweils 100 µl für die durchflusszytometrische Analyse der monozytären Oberflächenexpression von CD16 und CD142 eingesetzt (2.2.10, 2.2.12.1).

2.2.7 Messung des Calcium-Influx

Zu den in Abschnitt 2.2.5.3 für die Durchflusszytometrie vorbereiteten Zellen wurden unmittelbar vor der Messung noch 200 µl DPBS (Ca²⁺-haltig) hinzugegeben. Die Gesamtmenge von 300 µl wurde in ein Polystyrene-Test-Tube übertragen und im Durchflusszytometer 45 s (Geschwindigkeit "MED"; zeitliche Auflösung 500 ms) bei 530 nm (für Fluo-3-AM) vermessen. Die Messung wurde nach 45 s durch kurzes Entfernen des Tubes aus dem Durchflusszytometer unterbrochen; zu diesem Zeitpunkt lag ein Restvolumen von ca. 200 µl im Tube vor.

Zu den nicht mit Anti-FcγR-F(ab')₂s vorinkubierten Proben wurden 7,7 µl Ca²⁺-haltiger DPBS (Negativkontrolle), 7,7 µl AffiniPure Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab')₂ der Ziege mit einer Endkonzentration von ca. 50 µg/ml (Negativkontrolle für das sekundäre F(ab')₂) oder 7,7 µl Ionomycin (10 µg/ml in DMSO; Positivkontrolle) mit einer Endkonzentration von ca. 0,4 µg/ml gegeben. In einem Experiment wurden derartige Proben stattdessen mit 10 µl monoklonalem Anti-human-CD16- bzw. Anti-human-

CD32- bzw. Anti-human-CD64-F(ab')₂ der Maus (mlgG₁) versetzt (Endkonzentration ca. 50 µg/ml). Zu den mit Anti-FcγR-F(ab')₂s vorinkubierten Proben wurden jeweils 7,7 µl AffiniPure Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab')₂ der Ziege pipettiert (Endkonzentration ca. 50 µg/ml). Der Zeitraum zwischen dieser Zugabe und der Fortsetzung der Messung betrug etwa die letzten 5 s dieser ca. 30 s dauernden Unterbrechung. Unmittelbar danach wurde die Messung fortgesetzt, bis zum vollständigen Verbrauch des Inhalts des Tubes (ca. 4–5 min). Die Auswertung der Daten ist in 2.2.12.1 beschrieben.

2.2.8 Messung der TF-mRNA-Expression

2.2.8.1 Konventionelle PCR mit dem Thermocycler

Die konventionellen Thermocycler-PCRs für TF und GAPDH wurden mit dem Taq PCR Core Kit (2.1.7) durchgeführt. Ein PCR-Ansatz (50 µl) bestand aus einem Aliquot des Master-Mix (48 µl) und einem Aliquot der zu amplifizierenden DNA-Probe (2 µl mit ca. 7,5 bis 90 µg DNA). Bei den DNA-Proben handelte es sich um revers transkribierte Gesamt-RNA (2.2.8.3, 2.2.8.4, 2.2.8.5) aus Monozytenisolaten (2.2.4.1, 2.2.4.2, 2.2.4.3). Der Master-Mix enthielt je nach Zahl der zu amplifizierenden DNA-Proben ein Vielfaches der aufgeführten Basis-Mengen seiner Komponenten: nukleasfreies Wasser (29,75 µl), Solution Q (10 µl), 10x-PCR-buffer (5 µl), dNTP 40 mM (1 µl; Endkonzentration 0,8 mM bzw. für jedes Nukleotid 0,2 mM), TF- bzw. GAPDH-Forward-Primer 25 µM (1 µl; Endkonzentration 0,5 µM), TF- bzw. GAPDH-Reverse-Primer 25 µM (1 µl; Endkonzentration 0,5 µM), Taq-Polymerase 5 units/µl (0,25 µl; Endkonzentration 0,025 units/µl).

Auf Eis wurden die PCR-Komponenten in ein 1,5-ml-Safe-Lock-Reaktionsgefäß (PCR clean) pipettiert und Aliquots dieses Master-Mix zu den DNA-Proben in autoklavierte 0,5-ml-PCR-SoftTubes transferiert. Nach sorgfältiger Mischung dieser PCR-Ansätze erfolgte deren Inkubation im Thermocycler (Gene Amp PCR System) bei folgendem Programm: 5 min Denaturierungsphase bei 94 °C und Amplifikationsphase über 35 Zyklen, bestehend aus je 44 s bei 92 °C (Denaturierung), 40 s bei 62 bzw. 60 °C (Annealing; Temperaturen für TF-Primer bzw. GAPDH-Primer) und 46 s bei 72 °C (Elongation). Nach einer abschließenden 5-minütigen Elongation bei 72 °C wurden die PCR-Produkte auf 4 °C gekühlt. Sie wurden bis zur Analyse bzw.

Weiterverarbeitung maximal 3 Tage lang bei 4 °C gelagert oder bei –20 °C eingefroren.

Zur Analyse des PCR-Produkts wurde zunächst ein 2 %iges oder 3 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid erstellt. 50 ml 1 x TBE wurden dazu mit 1 g oder 1,5 g Seakem-LE-Agarose und 0,25 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration 50 ng/ml) vermischt, aufgekocht und zum Abkühlen in eine Form gegossen. Nach dem Erkalten wurde das Gel in eine mit 1 x TBE gefüllte Elektrophoresekammer gestellt. 10 µl des jeweiligen PCR-Produkts, 10 µl DNA-Standard (2 µl 1-kB-DNA-Ladder mit 8 µl nukleasefreiem Wasser) oder 10 µl nukleasefreies Wasser (als Negativkontrolle) wurden jeweils mit 2 µl 5 x „Loading dye“ auf Parafilm vermischt. 5 ml Loading dye setzten sich aus 3,45 ml 87 %igem Glycerin, 0,20 ml EDTA (20 mM, pH 8), 1,35 ml nukleasefreiem Wasser, 5 mg Bromphenolblau (Endkonzentration 0,1 %) und 5 mg Xylencyanol (Endkonzentration 0,1 %) zusammen, was gemischt und sterilfiltriert wurde. Nach der Beladung der Geltaschen mit den vermischten Ansätzen vom Parafilm wurde 2 h lang eine Spannung von ca. 80 V an die Elektrophoresekammer angelegt. Das Gel wurde zur Auswertung mit dem Lumi-Imager F1 bei der Wellenlänge 550 nm und 1 s Belichtungszeit digital photographiert.

2.2.8.2 Erstellung von TF-Amplimer-Standards

Mittels Agarosegel auf Spezifität kontrollierte PCR-Produkte der TF-Thermocycler-PCR (2.2.8.1) bzw. TF-Amplimere wurden mit dem GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (2.1.7) aufgereinigt. Dies erfolgte weitestgehend, wie im Kit beschrieben und ist im Folgenden kurz aufgeführt. Vier GFX-Säulen (die sich in Collection-Tubes befanden) wurden mit je 500 µl Capture Buffer und 100 µl PCR-Produkt (2 x 50 µl der TF-PCR-Produkte) beladen. Die Ansätze wurden gut gemischt und 30 s lang mit 18186 RCF zentrifugiert. Nach Entleerung des Collection-Tubes, wurden auf jede GFX-Säule 500 µl Wash-Buffer aufgebracht, und es erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 18186 RCF für 30 s. Die Säulen wurden nun in 1,5-ml-Safe-Lock-Reaktionsgefäß (PCR clean) gehängt und zur Maximierung der DNA-Endkonzentration mit nur 10 µl nukleasefreiem Wasser beladen. Nach einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch eine letzte Zentrifugation (18186 RCF, 1 min) die DNA in das Reaktionsgefäß eluiert.

Die vier Eluate wurden gepoolt und photometrisch mit Dreifach-Messungen auf Reinheitsgrad und DNA-Konzentration hin untersucht. Der Mittelwert der DNA-Konzentrationen im gepoolten Eluat betrug 76 ng/µl. Die Standardverdünnungen wurden mit nukleasefreiem Wasser durch serielle 1:10-Verdünnungen über einen Konzentrationsbereich von 1 ng/µl bis 10^{-10} ng/µl hergestellt.

2.2.8.3 RNA-Extraktion

Die Extraktionen von Gesamt-RNA wurden mit dem High Pure RNA Isolation Kit (2.1.7) durchgeführt. Dies erfolgte, wie im Kit beschrieben und ist im Folgenden kurz erläutert.

Die generierten Zellpellets/Zellsuspensionen (Herkunft z. B. 2.2.5.2) wurden grundsätzlich bis zur RNA-Extraktion eingefroren. Sie wurden noch vor dem Einfrieren (vgl. 2.2.5.2) oder erst zum Auftauen (vgl. 3.2.1, Experiment B) mit 100–200 µl sterilem DPBS resuspendiert und mit der doppelten Menge (200–400 µl) Lyse-/Bindepuffer (RNase-inaktivierend) vermischt. Die Suspension wurde in ein High Pure Filtrationsgefäß umpipettiert (welches sich in einem Auffanggefäß befand) und 15 s mit 8000 RCF zentrifugiert. Nach Entleerung des Auffanggefäßes wurden 100 µl einer frisch erstellten 1:10-Verdünnung des Enzyms DNase I (10 µl DNase I + 90 µl DNase Inkubationspuffer) auf das Glasvlies des Filtrationsgefäßes pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschrifte mit 500 µl Waschpuffer I (15 s Zentrifugation mit 8000 RCF), 500 µl Waschpuffer II (15 s Zentrifugation mit 8000 RCF) und 200 µl Waschpuffer II (2 min Zentrifugation mit ca. 13000 RCF). Die RNA wurde nach Zugabe von 18–30 µl (für jede Extraktion einheitliche Menge) Elutionspuffer (steriles, bidestilliertes, nuklasefreies H₂O) durch eine einminütige Zentrifugation mit 8000 RCF in 1,5-ml-Safe-Lock-Reaktionsgefäß (PCR clean) eluiert. Die RNA-Extrakte wurden bei –80 °C eingefroren und für Entnahme von Aliquots vorübergehend auf Eis aufgetaut.

2.2.8.4 Quantifizierung der RNA

Der RNA-Gehalt der RNA-Extrakte wurde mit dem RNA 6000 LabChip Kit (2.1.7) nach dem Prinzip der Gelelektrophorese quantifiziert. Die Messungen erfolgten entsprechend den Angaben des Herstellers und sind im Folgenden kurz aufgeführt. 9 µl Gel-Dye Mix (Gemisch aus 400 µl RNA Gel Matrix und 4 µl RNA Dye Concentrate)

wurden unter manuellem Druck (mittels einer Spritze) 30 s lang von einer Kammer aus in das Kapillarsystem des RNA-Chips verteilt. Zwei weitere Kammern des Chips wurden mit je 9 µl Gel-Dye Mix beladen. In jede der 12 Messkammern des Chips und in die Kammer für den DNA-Standard wurden 5 µl Sample Buffer und anschließend 1 µl RNA-Extrakt (bei weniger als 12 Messungen stattdessen 1 µl sample buffer) bzw. 1 µl RNA-Standard (RNA 6000 Ladder) pipettiert. Die RNA-Konzentrationen der Extrakte wurden in Doppel- oder Dreifachansätzen gemessen. Nach einer einminütigen mittelstarken Vortex-Schüttelung wurde der Chip in den Agilent 2100 Bioanalyzer eingesetzt, wo mittels elektrischer Spannung die RNA der Größe nach aufgetrennt wurde. Das Fluoreszenzsignal der markierten RNA wurde im zeitlichen Verlauf registriert und ermöglichte mit Hilfe der Software und der RNA-Ladder eine absolute RNA-Quantifizierung in einem Konzentrationsbereich von ca. 25–500 ng/µl.

2.2.8.5 Reverse Transkription

Die extrahierte (2.2.8.3) und auf eine feste Menge eingestellte (2.2.8.4) Gesamt-RNA wurde mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR revers transkribiert. Um bei der RT in parallel inkubierten Ansätzen – unabhängig von der Menge der mRNA oder TF-mRNA – vergleichbare cDNA-Synthesen und folglich vergleichbare Amplifikationsraten zu erzielen, wurden Primer-Hexamere mit zufälliger Abfolge der Nukleotid (sog. „Random-Primers“) eingesetzt. Sie führen nicht nur zu einer reversen Transkription spezifischer RNA (oder mRNA), sondern zur reversen Transkription der auch vorher gemessenen *gesamten* RNA (auf deren Menge die RNA-Extrakte normiert wurden).

Ein RT-Ansatz (20 µl) bestand aus einem Aliquot des Master-Mix (11,8 µl), A-liquots der zu transkribierenden Gesamt-RNA-Extrakte (< 8,2 µl; Volumen variabel, je nach Konzentration der Gesamt-RNA; die eingesetzte Menge war innerhalb jeder RT gleich und lag in verschiedenen RTs zwischen 0,25 und 1,0 µg) und nukleasefreiem Wasser (Volumen, das zum Erreichen von 20 µl Gesamtvolumen erforderlich war). Der Master-Mix enthielt je nach Zahl der zu transkribierenden RNA-Extrakte ein Vielfaches der aufgeführten Basis-Mengen seiner Komponenten: 10x Reaction buffer (2 µl), MgCl₂ 25 mM (4 µl; Endkonzentration 5 mM), Deoxynucleotide Mix 40 mM (2,0 µl; Endkonzentration 4 mM bzw. für jedes dNTP 1 mM), Random Primer p(dN)₆

1,6 mg/ml bzw. 860 µM (2 µl; Endkonzentration 86 µM), RNase Inhibitor 50 units (1 µl), AMV Reverse Transcriptase ≥ 20 units (0,8 µl).

Auf Eis wurden die RT-Komponenten in ein 1,5-ml-Safe-Lock-Reaktionsgefäß (PCR clean) pipettiert und Aliquots dieses Master-Mix zu den RNA-Extrakten in autoklavierte 0,5-ml-PCR-SoftTubes transferiert. Nach sorgfältiger Mischung dieser RT-Ansätze erfolgte deren Inkubation im Thermocycler (Gene Amp PCR System) bei folgendem Programm: 10 min Annealingphase bei 25 °C, 60 min reverse Transkription bei 42 °C und 5 min Denaturierung bei 99 °C. Danach wurden die RT-Produkte auf 4 °C gekühlt und bis zur Analyse bzw. Weiterverarbeitung maximal 3 Tage bei 4 °C gelagert oder bei –20 °C eingefroren.

Das Gelingen der rerversen Transkription wurde mittels konventioneller PCR und Agarosegel (2.2.8.1) oder mittels Real-Time-PCR (2.2.8.6) auf das Vorhandensein einer GAPDH-Bande (3.2.1) oder einer TF-Bande hin untersucht.

2.2.8.6 Real-Time-PCR am LightCycler mit SYBR Green I

Mit dem Kit „FastStart DNA Master SYBR Green I“ (2.1.7) wurden die RT-Produkte (2.2.8.5) hinsichtlich des Gehalts an TF-cDNA mit Hilfe der TF-Amplimer-Standards (2.2.8.2) am LightCycler absolut quantifiziert. Das Vorgehen erfolgte nach den Angaben im Kit und ist im Folgenden kurz aufgeführt.

Ein LightCycler-Ansatz (20 µl) bestand aus einem Aliquot des Master-Mix (18 µl) und einem Aliquot des zu amplifizierenden RT-Produkts (2 µl). Der Master-Mix enthielt je nach Zahl der zu amplifizierenden RT-Produkte ein Vielfaches der aufgeführten Basis-Mengen seiner Komponenten: H₂O (sterile, PCR grade; 12,8 µl), MgCl₂ stock solution 25 mM (2,4 µl; Endkonzentration 3,0 mM), LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (2,0 µl), TF-Forward-Primer 25 µM (0,4 µl; Endkonzentration 0,5 µM), TF-Reverse-Primer 25 µM (0,4 µl; Endkonzentration 0,5 µM). Das SYBR-Green-I-Reagenz beinhaltete den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (keine Konzentrationsangabe in der Kit-Beschreibung), MgCl₂ 10 mM (Endkonzentration 1,0 mM; zusammen mit der MgCl₂ stock solution ergab sich für MgCl₂ eine tatsächliche Endkonzentration von 4,0 mM), sowie „optimale“ (nach Technical Note 2/1999 von Roche) Konzentrationen von Nukleotiden, Taq-DNA-Polymerase und Taq-PCR-Puffer.

Alle Komponenten wurden in einem speziellen Kühlblock in die LightCycler-Kapillaren pipettiert. Vor dem Einbringen in den LightCycler wurden die Kapillaren mit Hilfe von Zentrifugen-Adaptoren für wenige Sekunden kurz bis auf 3331 RCF zentrifugiert. Das Inkubationsprogramm im LightCycler bestand aus 10 min Denaturierungsphase bei 95 °C und einer Amplifikationsphase über 40 Zyklen mit je 15 s bei 95 °C (Denaturierung), 5 s bei 62 °C (Annealing) und 10 s bei 72 °C (Elongation). Nach einer anschließenden Abkühlung auf 58 °C wurde 15 s diese Temperatur gehalten, dann durch langsame Steigerung der Temperatur um 0,2 °C/s die Schmelzkurve der PCR-Produkte ermittelt. Die PCR-Produkte wurden entweder bei –20 °C eingefroren oder bis maximal 2 Wochen bei 4 °C gelagert und anschließend auf einem Agarosegel (wie in 2.2.8.1) auf Spezifität des PCR-Produkts hin überprüft.

2.2.9 Quantifizierung von Protein

Die im TF-ELISA (2.1.7, 2.2.9.2) eingesetzten Proben wurden zusätzlich bezüglich ihres Proteingehalts quantifiziert. Hierzu wurden zwei ähnliche Protokolle verwendet.

Nach dem einen Protokoll (negativisierte Monozyten bzw. zweite Serie in 3.3.3) wurden von jeder zu messenden Probe gleiche Volumina – in Form zweier eingefrorener Aliquots – durch Vermischung mit PBS (aus dem TF ELISA Kit mit pH 7,4) mit Raumtemperatur und Triton X-100 (Endkonzentration 1 %) auf Eis aufgetaut. Eine 12-stündige Schüttelinkubation bei 4 °C schloss sich an. Damit unlösliche Bestandteile mittels Zentrifugation entfernt werden konnten, wurde das Volumen durch erneutes Zumischen von PBS auf ca. 0,5 ml gestreckt. Es folgte eine Zentrifugation (18186 RCF, 10 min, 4 °C) und eine Wiederholung dieser Zentrifugation mit den pärchenweise gepoolten zusammengehörigen Überständen. Zum anschließenden Einsatz im TF-ELISA (2.2.9.2) und im MicroBCA (2.2.9.1) wurden die Überstände der zweiten Zentrifugation jeweils in zwei gleiche Teile aliquotiert und mit sterilfiltrierter 7,5 %iger BSA-Lösung (Aliquot für TF-ELISA: BSA-Endkonzentration 1 %, Triton-X-100-Endkonzentration 0,14 %) bzw. PBS aus dem TF ELISA Kit (Aliquot für MicroBCA: Triton X-100-Endkonzentration 0,14 %) versetzt. Innerhalb jedes Experiments ergaben sich dabei einheitliche Endvolumina im Bereich 0,25–0,4 ml (Aliquot für TF-ELISA) bzw. um 0,3 ml (Aliquot für MicroBCA). Die Verarbeitung der Proben erfolgte ständig bei 4 °C bzw. auf Eis.

Nach dem anderen Protokoll (positivisierte Monozyten bzw. erste Serie in 3.3.3) wurde von jeder zu messenden Probe nur *ein* eingefrorenes Aliquot auf Eis

aufgetaut. Die Verarbeitung der Proben verlief im Anschluss daran wie im ersten Protokoll, außer dass die zweite Zentrifugation (und damit auch das Pooling) hier entfiel und geringfügig andere Triton-X-100-Endkonzentrationen vorlagen: beim Aliquot für den TF-ELISA mit 0,20 % eine etwas höhere, beim Aliquot für das MicroBCA mit 0,14 % eine identische Konzentration.

2.2.9.1 Quantifizierung des Gesamtproteins

Die Messungen des Proteingehalts wurden durchgeführt mit dem „MicroBC Assay: protein quantitation kit“ von Uptima. Für jedes Experiment wurden 8 frische BSA-Proteinstandards (0–100 µg/ml) mit der Lösung hergestellt, in der auch das zu testende Protein beim Einsatz im MicroBCA vorlag (PBS aus dem TF ELISA Kit – vgl. 2.2.9 – mit 0,14 % bzw. 0,20 % Triton X-100). In eine Falcon-96er-Zellkulturplatte wurden sowohl die Proteinstandards als auch die zu testenden Proben (s. 2.2.9) in einem Volumen von 150 µl in 2er oder 4er-Ansätzen pipettiert. Das BC Assay reagent, bestehend aus den Komponenten A, B und C wurde jeweils frisch zusammen-gemischt und in Aliquots von 150 µl hinzupipettiert. Es folgte die Inkubation der Platte bei 37 °C und nach 1 und 2 h die Messung der Absorption bei 550 nm in einem E-Max Microplate Reader. Die Protein-Konzentrationen wurden über die mitgeführten Standards anhand der Standardkurve ermittelt.

2.2.9.2 Quantifizierung von Tissue Factor mittels ELISA

Der TF-ELISA wurde in den vorbeschichteten Wells des IMUBIND Tissue Factor ELISA Kit von American Diagnostica durchgeführt. Die Proben (s. 2.2.9) wurden entsprechend den Angaben des Herstellers vorbereitet; die Proteinextraktion erfolgte aber wegen der geringen Zellmengen bereits in PBS (aus dem Kit) mit 1 % Triton X-100 anstatt in TBS mit 1 % Triton X-100. Der Restgehalt an Triton X-100 beim Einsatz im ELISA war hier mit 0,14 bzw. 0,20 % vergleichbar mit dem in der angegebenen Referenzprozedur (um 0,15 %). Der ELISA selbst erfolgte, wie im Kit beschrieben und ist im Folgenden kurz aufgeführt.

Die vorbereiteten Proben sowie die jeweils frisch aufgetauten TF-Standards (0–1000 pg/ml) wurden in Doppelansätzen à 100 µl in die ELISA-Wells pipettiert. Es folgte eine 3-stündige Inkubation bei Raumtemperatur und im Anschluss viermaliges Waschen mit 200 µl Wash Buffer (PBS mit 0,1 % Triton X-100) pro Well. Nach Ein-

bringen von 100 µl Detection Antibody pro Well wurde 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert und wieder 4-mal mit Wash Buffer gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Enzyme Conjugate-Verdünnung (1:10-Verdünnung des Enzyme Conjugate in Enzyme Conjugate Diluent) in jedes Well pipettiert, erneut 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich noch 4-mal mit Wash Buffer gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl Substrat pro Well wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Nach 20 min wurde die Reaktion mit 0,5 M H₂SO₄ beendet und die Absorptionen aller Wells bei 450 nm in einem Emax Microplate Reader gemessen. Die TF-Konzentrationen wurden über die mitgeführten Standards anhand der Standardkurve ermittelt.

2.2.10 Messung der Protein-Oberflächenexpression bzw. 4-Farb-Durchflusszytometrie

Als Ausgangsmaterial dienten meist Isolate von PBMC (2.2.4.1), Monozyten (2.2.4.2, 2.2.4.3) oder CD16⁺/CD16⁻-Monozytensubpopulationen (2.2.4.5), aber auch Vollblutproben (3.4).

Ca. 100 µl (entsprechend ca. 0,5–1 Mio. Zellen) der zu untersuchenden Zellsuspension wurden in ein Polystyrene-Test-Tube mit bereits vorpipettiertem 4-Farb-Antikörper-Mix (Mengen der einzelnen fluoreszenzmarkierten Antikörper nach Angaben des Herstellers) gegeben und 15 min lang auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die eingesetzten fluoreszenzmarkierten Antikörper sind in Abschnitt 2.1.5 aufgeführt, ihre Menge richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Nach Zugabe von ca. 3 ml verdünnter FACS Lysing Solution (1:10 in Aqua ad iniecatilia) und Vortexen folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Es schlossen sich zwei Zentrifugationen (jeweils 425 RCF, 5 min) mit nachfolgender Resuspendierung des Pellets zuerst in 2–3 ml DFZ-Waschpuffer (500 ml steriler DPBS mit 2,5 g BSA, Endkonzentration 0,5 %) und schließlich in ca. 100–300 µl sterilem DPBS an. Diese Zellsuspension wurde entweder gleich durchflusszytometrisch gemessen, oder bis zur Messung maximal 24 h im Kühlschrank gelagert.

Die 4-Farb-Messungen erfolgten auf der Basis routinemäßig nachjustierter Kompensationseinstellungen mittels „CALIBrite TM3“ Calibration beads (2.1.7). Forward- und Sidewards-Scatter wurden vor der jeweiligen Messung im Hinblick auf gute Trennschärfe der Leukozytensubpopulationen im FSC/SSC-Plot eingestellt, die Flussgeschwindigkeit wurde unter 1000 Events/s gehalten.

Angaben zur Auswertung finden sich in 2.2.12.1.

2.2.11 Messung der Rekalzifizierungszeit

In eine in dem BIOMATIC K-10 (2.1.1) auf 37 °C vorgewärmte 10-Kammer-Leiste wurden pro Kammer 100 µl gepooltes Plasma (Gewinnung: 2.2.2.3) einpipettiert, das jeweils kurz vor der Verwendung aufgetaut wurde. Bei Bedarf erfolgte die 10-minütige Inkubation eines Aliquots der zu testenden Zellsuspension mit einem neutralisierenden Anti-TF-Antikörper unterschiedlicher Konzentration (jeweils im Ergebnisteil mit angegeben) bei 37 °C in Anlehnung an Consonni und Bertina 1995. Anschließend wurden in jede Kammer 100 µl der jeweils zu testenden Zellsuspension zugemischt (mit bzw. ohne neutralisierendem Anti-TF-Antikörper vorinkubiert). Gemessen wurde mindestens in Doppelansätzen, z. T. in 3er- oder 4er-Ansätzen, wobei der Temperaturangleich an 37 °C durch eine 3-minütige Vorinkubation in den Kammer erreicht wurde. Daraufhin wurden die schwingenden Plättchen in die Ansätze eingetaucht und die Messung durch Zugabe von je 100 µl 50 mM CaCl₂ (Endkonzentration ca. 17 mM) pro Kammer gestartet. Die Rekalzifizierungszeit wurde hierbei bestimmt als Zeit vom Einpipettieren des CaCl₂ bis zum Erreichen des Gerinnungszustands, der durch die Zunahme der Zähigkeit des jeweiligen Ansatzes mechanisch erfasst wurde (vgl. z. B. [Broussas et al. 2000, Nguyen et al. 1999, Ferro et. al 1999]).

2.2.12 Auswertung

2.2.12.1 Gating und Mittelwertberechnung in der Durchflusszytometrie

Zur durchflusszytometrischen Auswertung wurde die Software WinMDI (Version 2.8 von Joseph Trotter) verwendet.

Die vier Farbkanäle des Durchflusszytometers wurden folgendermaßen genutzt (vgl. 2.1.5): der FITC-Kanal für die CD16-FI (alternativ für die FI von Fluo-3-AM in den Experimenten zur Bestimmung des Calcium-Influx), der PE-Kanal für die CD142-FI (z. T. auch für die CD16-FI), der PerCP-Kanal ausschließlich für die CD45-FI und der APC-Kanal ausschließlich für die CD14-FI.

Leukozytenpopulationen wurden im Dotplot optisch durch ihre CD45-Expression bzw. -Positivität ermittelt (rechteckiges Gate, das eine Mindestexpression an CD45 fordert).

Monozytenpopulationen wurden danach im CD45/CD14-Plot als zusammenhängende Leukozytensubpopulation mit hoher CD14-Expression abgegrenzt (rechteckiges Gate, das eine Mindestexpression an CD14 fordert). Für die Expressionsuntersuchungen im Vollblut (3.4) wurden die primär im CD45/CD14-Plot definierten Monozyten (Durchführung wie oben beschrieben) konsekutiv noch im FSC/SSC-Plot (rechteckiges Gate um die sich darstellenden Hauptpopulationen) und im CD16/CD45-Plot (freihändiges Gate um die im Bereich hoher CD45-Expression und eher niedriger CD16-Expression liegende Hauptpopulation) gegatet. Dies sollte speziell die Abgrenzung der CD16⁺-Monozyten gegenüber Granulozyten und Lymphozyten verbessern.

Für die Messung des Calcium-Influx (2.2.7) erfolgte das Monozyten-Gating im FSC/SSC-Plot (mit freihändigem Gate um die Monozytenpopulation), da bei diesen Ansätzen keine zusätzlichen Oberflächenmarker verwendet wurden. Dabei wurde auch ein zeitliches Gating durchgeführt, bei dem die 500-ms-Intervalle nur bis zu dem Zeitpunkt betrachtet wurden, wo sie noch mindestens 10 Monozyten-Events enthielten. Daraus ergab sich nach Stimulationsbeginn für alle vermessenen Proben ein maximal abdeckbarer Zeitraum [5 s; 140 s] von 5 s bis 140 s nach Stimulation.

Lymphozyten- bzw. Granulozytenpopulationen wurden der besseren Übersicht wegen auch im CD45/CD14-Plot mittels rechteckiger Gates abgegrenzt und zwar als jeweils gering CD14-exprimierende Leukozytensubpopulationen mit höherer bzw. niedrigerer CD45-Expression.

Das Gate für die CD16⁻-Monozyten (für die Unterscheidung von CD16⁻- und CD16⁺- Monozyten) wurde so festgelegt, dass im CD16-Histogramm die beiden Peaks für alle Inkubationen eines Experiments optisch so gut wie möglich getrennt werden konnten. Es erfolgte hier keine weitere Unterscheidung der CD16⁺- oder CD16⁻-Monozyten anhand ihrer CD14-Expression, da die beiden wichtigsten heutzutage unterschiedenen Subpopulationen CD14⁺⁺CD16⁻ (= CD14^{hi}CD16⁻) und CD14⁺CD16⁺ [Ziegler-Heitbrock 2007] in der vorliegenden Arbeit bereits den Hauptanteil im jeweiligen Gate (CD16⁺-Gate bzw. CD16⁻-Gate) stellten; außerdem gewährleistet die Unterscheidung allein anhand der CD16-Expression eine Vergleichbarkeit mit den isolierten CD16⁺/CD16⁻-Subpopulationen. Die CD16⁺- bzw. CD16⁻-Gates für gepaart verglichene Inkubationen innerhalb eines Experiments wurden prinzipiell identisch gewählt. Leicht differierende Gates wurden lediglich für die Monozyten vor Inkubation (Null-Stunden-Wert) gewählt, sofern das Zentren ihrer im Dotplot (gut abgrenzbaren)

CD14⁺CD16⁻-Hauptpopulation im Vergleich zum Zentrum der inkubierten Monozyten deutlich anders lag.

Für Angaben zur Oberflächenexpression der durchflusszytometrisch gemessenen Antigene CD142 und CD16 wurde grundsätzlich die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der jeweils untersuchten Zellpopulation verwendet. Hierbei wurde als Mittel bzw. als Maßzahl der Median eingesetzt, der gegenüber dem arithmetischen Mittel robuster gegen Mess-Ausreißer (vgl. auch 3.1.3.3) und robuster gegen artifizielle Veränderungen im Rahmen der Fluoreszenz-Kompensation ist [Baumgarth and Roederer 2000]. Vereinfacht wurde die MFI der gebundenen – spezifisch gegen ein Oberflächenantigen gerichteten – fluoreszenzmarkierten Antikörper als proportional zur vorhandenen Menge dieses Oberflächenantigens betrachtet.

Für die Bestimmung des Calcium-Influx wurde für den calciumsensitiven Marker Fluo-3-AM auch eine mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt, im Gegensatz zu der MFI bei den fluoreszenzmarkierten Anti-CD142- und Anti-CD16-Antikörpern (s. o.) jedoch durch (konventionelle) arithmetische Mittelung. Da hier aufgrund der hohen Zahl gemessener Events und einer Beschränkung auf eine „Ein-Farb“-Messung eine geringere Gefahr von Ausreißern bestand, konnte dadurch eine bessere Empfindlichkeit auch für kleinere Veränderungen gewährleistet werden.

2.2.12.2 Absolute Quantifizierung von Matrizen-DNA

Die Messung der (relativen) PCR-Produktmengen vor Erreichen der Plateauphase der PCR erlaubt prinzipiell die relative Quantifizierung verschiedener Ansätze (mit unterschiedlichen Mengen Matrizen-DNA) zueinander. Idealerweise erfolgt die Messung bei sehr geringen Produktmengen, fern von der Plateauphase, solange noch die sog. Log-lin-Phase der PCR vorliegt. Die Empfindlichkeit der Detektoren mit einem Grundrauschen bzw. hoher Variabilität der Messwerte im unteren Messbereich setzt dieser frühen Bestimmung jedoch Grenzen und macht eine gewisse Mindestmenge des PCR-Produkts erforderlich.

Bei der PCR mit SYBR Green I (2.2.8.6, 3.2.2.3) korreliert die detektierbare Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I (der sich unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagert und dadurch ein deutliches Fluoreszenzsignal liefert) positiv mit der PCR-Produktmenge. Für die Quantifizierung muss also ein möglichst niedriger Fluoreszenzwert gefunden werden, bei dem die von den verschiedenen

Ansätzen benötigten Zykluszahlen bis zum Erreichen dieser Fluoreszenz verglichen werden können.

Dieser Fluoreszenzwert kann manuell als sog. Crossing line in der frühen Log-lin-Phase der PCR im linear-logarithmischen Diagramm festgelegt werden, wenn sich Grundrauschen, Log-lin-Phase (linearer Anstieg) und Plateauphase der Amplifikation optisch gut voneinander abgrenzen lassen. Die Schnittpunkte der Fluoreszenzkurven mit der Crossing Line ergeben dann die sog. Crossing Points, jene Zykluszahlen (auch Zyklusbruchteile sind möglich), bei denen die Proben gleiche Mengen DNA enthalten. Die Differenz zweier Crossing Points (cp_1 , cp_2) gibt somit bei bekannter Effizienz (eff) das Verhältnis der ursprünglichen Matrizen-DNA-Konzentrationen (c_1 , c_2) in den zwei zugehörigen Kapillaren wieder: $c_1 / c_2 = (cp_2 - cp_1)^{\text{eff}}$.

Durch einen anderen Ansatz (bzw. ein anderes Modell) kann eine automatisierte Ermittlung standardisierter Referenzzyklen bzw. Crossing Points erfolgen. Dabei wird anhand einer sigmoidalen Näherungskurve der jeweiligen Fluoreszenzkurve der Zyklus bzw. Zyklusbruchteil bestimmt, bei dem die Kurve die stärkste Linkskrümmung (Maximum der 2. Ableitung = „Second Derivative Maximum“) besitzt. Diese Zyklen(bruchteile) sind Analoga zu den *Crossing Points* des zuvor erwähnten benutzerabhängigen Ansatzes und werden der Einfachheit wegen hier auch so bezeichnet; sie entstehen allerdings durch die Vergleichsbasis *stärkste Linkskrümmung der Fluoreszenzkurve* anstatt *Erreichen einer bestimmten Crossing-Line-Fluoreszenz durch die Fluoreszenzkurve*.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Crossing Points ausschließlich mit der Methode „Second Derivative Maximum“ ermittelt, um ein möglichst standardisiertes Vorgehen sicherzustellen.

2.2.12.3 Korrekturmethoden

Trotz der gleichartigen Verfahrensweise in Experimenten einer Serie können unterschiedliche Ausgangsbedingungen zu stark unterschiedlichen Messwerten für die gleiche Inkubation in verschiedenen Experimenten führen. Damit sind v. a. unterschiedliche Expressionsmuster und Aktivierungszustände der Monozyten von verschiedenen Spendern gemeint.

So kann die Variabilität innerhalb verschiedener Gruppen gleicher Behandlung sehr groß sein, wodurch die Unterschiede zwischen den Behandlungseffekten teil-

weise verwischt werden. Ist die Betrachtung zweier verschiedener Behandlungen zeitversetzt am gleichen Versuchsobjekt oder zeitgleich an möglichst identischen Versuchsobjekten (z. B. eineiige Zwillinge oder Aliquots genetisch identischer Monozyten eines Spenders) möglich, so kann dieses Problem reduziert werden. Die Versuchsobjekte (bzw. Stichproben) können dann als *verbunden* oder *abhängig* betrachtet werden. In die entsprechenden statistischen Tests (Tests für verbundene Stichproben) gehen dann nicht die Messwerte selbst ein, sondern die Differenzen der „verbundenen“ Messwerte. Diese Differenzbildung kann auch als eine Art *Inter-Assay-Korrektur* angesehen werden, da für jedes Wertepaar (bzw. Assay) jeweils ein Wert im Sinne eines Leerwerts vom anderen Wert abgezogen wird.

Eine *Transformation* der Messwerte kann der Herausstellung bestimmter Effekte dienen oder auch die Inter-Assay-Variabilität reduzieren; sie wurde in 3.3.3 (Abb. 29 b) eingesetzt. Noch vor der gepaartenen statistischen Betrachtung wurde dort jeder Messwert in einen prozentualen Anteil transformiert, was auch als eine Inter-Assay-Korrektur betrachtet werden könnte. Da wegen dieser Division keine Normalverteilung mehr vorlag, wurde zur statistischen Auswertung der verteilungsfreie Vorzeichentest (vgl. 2.2.12.4) eingesetzt.

Eine *Intra-Assay-Korrektur* ist dort sinnvoll, wo sich die Ausgangsbedingungen der Ansätze bereits innerhalb eines Experiments durch *geplant* unterschiedliche Behandlung *vor* der Zugabe des zu untersuchenden Stimulus unterscheiden. Bei nicht geplant unterschiedlicher Behandlung müsste hingegen von einer zufälligen Schwankung (oder einer Schwankung im Rahmen der natürlichen Streubreite der Messmethode) ausgegangen werden, die nicht kompensiert werden soll. In Abschnitt 3.3.1 wurde eine derartige Intra-Assay-Korrektur durchgeführt. Dort unterscheiden sich die Bedingungen der Vorinkubation geplanterweise; dadurch mögliche Unterschiede der Messwerte sollen jedoch nicht mit erfasst werden. Da die Intra-Assay-Korrektur einer Inkubation durch *Subtraktion* des Vorwerts vom Messwert erfolgt, ist die Differenz – sofern Vorwert und Messwert normalverteilt sind – auch normalverteilt.

2.2.12.4 Statistische Methoden

Als Lagemaße wurden das arithmetische Mittel und der Median verwendet. Wo nicht anders angegeben, bezeichnet „Mittel“ oder „Mittelwert“ das arithmetische Mittel. Als

Streuungsmaß wurde die Standardabweichung angegeben. Im Folgenden werden die verwendeten Lokalisationsvergleiche (Vergleich zweier Messreihen bzw. Stichproben anhand der Mittelwerte, der Rangsummen oder der Vorzeichen der gepaarten Differenzen), Variabilitätsabschätzungen, Korrelationsuntersuchungen sowie die Regressionsmethoden erläutert.

Der parametrische *Student-t-Test* für abhängige (vgl. 2.2.12.3) bzw. unabhängige Stichproben [Hartung 1999] wurde nur in den Fällen eingesetzt, wo er für vergleichbare Messparameter und Stichprobenumfänge bereits in der Literatur vorbeschrieben war, so für den Mittelwertvergleich

- der (*relativen*) prokoagulanten Aktivität (*rPCA*) im funktionellen Gerinnungstest (z. B. bei Kornberg et al. 1994, Wharram et al. 1991, Neumann et al. 1997 und Consonni und Bertina 1995)
- des gesamten *TF-Proteingehalts (TFp)* im ELISA (z. B. bei Broussas et al. 2000 und Neumann et al. 1997)
- der *durchflusszytometrisch bestimmten mittleren Fluoreszenzintensität (MFI)* der fluoreszenzmarkierten Anti-CD142- (z. B. bei Nguyen et al. 1999) und Anti-CD16-Antikörper (z. B. bei Liu et al. 2005)
- der *durchflusszytometrisch bestimmten mittleren Fluoreszenzintensität (MFI)* des calciumsensitiven *Fluo-3-AM* (Analogien z. B. bei Greimers et al. 1996 und Yan et al. 2003); sie ist in den hier verwendeten eher niedrigen Intensitätsbereichen vergleichbar der in der angegebenen Literatur betrachteten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verteilt.

Der nichtparametrische *Mann-Whitney-U-Test* (gleichwertig mit dem Wilcoxon-Rangsummentest) für unabhängige Stichproben [Hartung 1999] wurde ebenfalls nur dort eingesetzt, wo für analoge Situationen Beschreibungen in der Literatur vorlagen. So lag beim Mittelwert-Vergleich der *Anteile der CD14-positiven Leukozyten (d. h. der Monozyten)* an den Gesamtleukozyten in 3.1.1 eine Analogie zum Mittelwert-Vergleich der *Anteile der CD16-positiven (bzw. CD16-negativen) Monozyten* an den Gesamtmonozyten [Skrzczynska et al. 2002] vor.

Der *Vorzeichentest* (auch Zeichentest genannt) für abhängige Stichproben [Hartung 1999] wurde dort eingesetzt, wo in der Literatur keine Annahmen über die Verteilung gefunden wurden (z. B. für die Monozyten-Ausbeute in 3.1.1) oder die Messwerte (und damit ihre Verteilung) durch Transformation (vgl. Abb. 37 b, 3.4.2.1) verändert wurden. Er fordert lediglich ein mindestens ordinales Skalenniveau ohne wei-

tere Voraussetzungen, hat allerdings auch die geringste Trennschärfe der genannten Tests.

Die drei aufgeführten Tests erfolgten mit der Software SPSS 12.0 stets mit exakter Berechnung und *zweiseitig*, da Abweichungen in beide Richtungen entdeckt werden sollten [Hengst 1967, Lange and Bender 2001]. Die Nullhypothese, dass kein Unterschied zwischen den Lokalisationen der Stichprobenverteilungen besteht, wurde verworfen, wenn der verwendete Test sie zum vorgegebenen (üblichen) Signifikanzniveau von 0,050 ablehnte. In diesem Fall wurde der beobachtete Unterschied als statistisch signifikant bezeichnet [Lange and Bender 2001] (Kennzeichnung mit *), bei Ablehnung zu einem Niveau von 0,010 als statistisch hochsignifikant (Kennzeichnung mit #). Das Niveau, bei dem der verwendete Test gerade noch abgelehnt hätte (p-Wert) wurde in beiden Fällen mit angegeben. [Hartung 1999]

Zur groben Abschätzung der Variabilität von Messungen wurde in Kapitel 3.2.3 für Doppelmessungen eine *maximale prozentuale Messwertdifferenz* (MPMD = Betrag der Differenz dividiert durch den kleineren der beiden Werte) angegeben. Sie gibt bei Doppelmessungen an, wie viel Prozent eines Messwertes die Differenz der beiden Werte maximal beträgt. Unter der Annahme, dass die MPMD – ähnlich wie der Variationskoeffizient – eine Fehlerbetrachtung unabhängig von der Höhe der Absolutwerte erlaubt, ist eine Mittelung der MPMDs aus den Doppelmessungen verschiedener Ansätze zur verlässlicheren Bestimmung des mittleren vom Absolutwert unabhängigen Fehlers sinnvoll. Dieser mittlere Fehler, der dann eher durch die Messmethode, als durch die Höhe der absoluten Messwerte determiniert ist, wurde als *gemittelte* oder *mittlere MPMD* angegeben.

Zur Berechnung der Gleichung der *Regressionsgeraden* wurde die Methode der kleinsten Quadrate eingesetzt. Das Bestimmtheitsmaß $B_{Y,X}$ der Merkmale X und Y ist dabei identisch mit dem Quadrat der Korrelation r^2_{XY} , das vereinfacht auch mit „R²“ bezeichnet wird. Diese Methode kann analog eingesetzt werden, wenn sich eine Regressionsgerade (erst) durch logarithmische Skalierung einer oder beider Achsen ergibt.

Der *Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient* wurde dort eingesetzt, wo kein linearer Zusammenhang zwischen den Merkmalen X und Y vorausgesetzt werden konnte und keine andere Annahme über die Art des Zusammenhangs, den Grad der Korrelation beeinflussen sollte.

2.2.12.5 Veranschaulichung statistischer Zusammenhänge

Die graphische Darstellung von Mittelwerten (Balken im Diagramm), Standardabweichungen (Fehlerbalken mit begrenzenden Querstrichen, der einfachen Standardabweichung entsprechend) und ggf. Einzelwerten für zwei Stichproben soll grundsätzlich eine grobe optische Beurteilung bezüglich der Streuung der Werte und bezüglich eventueller signifikanter Unterschiede zwischen der Lokalisation der beiden Stichproben (vgl. 2.2.12.4) erlauben.

Die Standardabweichung beschreibt anschaulich die Streuung der Werte derart, dass im Intervall Erwartungswert $\pm 1 \times$ Standardabweichung bei zugrunde liegender *Normalverteilung* Werte mit der Wahrscheinlichkeit von 0,683 auftreten (0,954 bzw. 0,997 für das Intervall Erwartungswert $\pm 2 \times$ bzw. $3 \times$ Standardabweichung), bei *beliebiger Verteilung* nur mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 0 (0,750 bzw. 0,889 für das Intervall Erwartungswert $\pm 2 \times$ bzw. $3 \times$ Standardabweichung). [Hartung 1999]

Die in der vorliegenden Arbeit graphisch dargestellten Daten wurden statistisch entweder mit dem auf einer Normalverteilung basierenden *Student-t-Test* oder dem verteilungsfreien *Vorzeichentest* analysiert.

Beim Student-t-Test für zwei *unverbundene Stichproben* korreliert bei festem und gleich großen Stichprobenumfängen das Verhältnis V_U der Hypothenusenlänge eines rechtwinkligen Dreiecks mit den beiden Standardabweichungen als Kathetenlängen zu der Differenz der Stichprobenmittelwerte positiv mit dem p-Wert des t-Tests. [Hartung 1999] Die Standardabweichungen und die Stichprobenmittelwerte sind dabei direkt in der Darstellung ablesbar. Für einen festen Stichprobenumfang ist dann ein Höchstwert für V_U angebbar, unter dem der p-Wert das Signifikanzniveau von 0,050 unterschreitet. Für einen Stichprobenumfang von 3 betrüge dieser Höchstwert bei zweiseitigem Test 0,54.

Beim Student-t-Test für zwei *verbundene Stichproben* korreliert bei festem Stichprobenumfang das Verhältnis V_V der Standardabweichung der Differenzen zu dem Mittelwert der Differenzen der beiden Stichproben positiv mit dem p-Wert des t-Tests. Der Mittelwert der Differenzen entspricht dabei der Differenz der direkt ablesbaren Mittelwerte. Die Standardabweichung der Differenzen hingegen wird normalerweise nicht zusätzlich dargestellt, da sie für jedes zu vergleichende Stichprobenpaar unterschiedlich wäre und eine Aufführung für alle möglichen Paare die Abbildung unübersichtlich machen würde. Sie ist jedoch *maximal so groß wie die Summe*

der Standardabweichungen der beiden zu vergleichenden Stichproben und kann so zumindest auch in der konventionellen Darstellung grob abgeschätzt werden [Hartung 1999]. Gerade bei hoher Inter-Assay-Variabilität der Werte einer Stichprobe bzw. Inkubationsart und relativ geringen Unterschieden zwischen den Stichproben liefern aber die dann relativ großen Standardabweichungen der Stichproben keine hilfreichen Informationen mehr über eine eventuelle statistische Bedeutung der Unterschiede; sie machen dagegen die Abbildung sogar unnötig unübersichtlich. Eine sog. alternative Darstellung kann hier Abhilfe schaffen und wurde aus den genannten Gründen in 3.3 z. T. eingesetzt. Sie zeigt die Inkubationen bzw. Stichproben *relativ zur Negativkontrolle* – durch Subtraktion des Leerwertes der Negativkontrolle von jedem Messwert bzw. in den Zeitverläufen durch Subtraktion des über das gesamte mit Messwerten abdeckbare Zeitintervall gemittelten Wertes der Negativkontrolle. Außer der besseren Hervorhebung geringer Unterschiede gegenüber der Negativkontrolle bietet dies zwei Vorteile. Zum einen verkleinert die Betrachtung der Relativwerte – die auch als Inter-Assay-Korrektur gedeutet werden kann (vgl. 2.2.12.3) – aufgrund der gepaarten Testsituation im Allgemeinen die Standardabweichungen bei gleich bleibenden Differenzen der Mittelwerte (vgl. oben); die für den statistischen Vergleich zweier beliebiger Stichproben relevante Standardabweichung der Differenzen für V_V ist damit auch besser eingrenzbar. Zum anderen entspricht die Standardabweichung dieser dargestellten Relativwerte dann genau der für V_V benötigten Standardabweichung der Differenzen von betrachteter Stichprobe und Negativ-Stichprobe, d. h. der grundsätzlich bedeutsame Vergleich einer Stichprobe mit der Negativ-Stichprobe ist direkt aus der Abbildung möglich. Für diesen Vergleich wurden in der alternativen Darstellung (hoch)signifikante Unterschiede direkt an der entsprechenden Standardabweichung markiert. Die Negativkontrolle besitzt in dieser Darstellung den Relativwert Null und keine Standardabweichung; sie wurde deshalb nicht immer mit abgebildet, ihr Absolutwert aber stets angegeben. Als Beispiel für den anschaulichen statistischen Vergleich von Inkubationen mit der Negativkontrolle mit der alternativen Darstellung sei auf Abb. 22 b (3.3.1) verwiesen. Dort lässt sich bei Kenntnis der Obergrenzen von V_V für Signifikanz bzw. Hochsignifikanz (0,87 bzw. 0,55 bei $n = 5$ und zweiseitigem verbundenen t-Test) z. B. Signifikanz für den Vergleich der Anti-CD16- und Anti-CD32-F(ab')₂-Inkubationen mit der Negativkontrolle (V_V ca. 2/3) und Hochsignifikanz für den Vergleich der Anti-CD64-F(ab')₂-Inkubation mit der Negativkontrolle (V_V etwas kleiner als 0,5) optisch ableiten.

Beim Vorzeichentest muss für Signifikanz oder Hochsignifikanz eines Unterschieds zwischen zwei Stichproben der Wert der einen Stichprobe in einer Mindestzahl der n Experimente stets größer oder stets kleiner als der Wert der anderen Stichprobe sein. Die Darstellung der Einzelwerte erlaubt dabei den direkten Größenvergleich. Signifikanz (mit $p < 0,05$) kann beim zweiseitigen Vorzeichentest prinzipiell erst ab $n \geq 6$ erreicht werden und für $n = 6$ nur dann, wenn in *allen* 6 Experimenten stets die gleiche Stichprobe den größeren der beiden Werte besitzt.

Einzelwerte wurden *zusätzlich* zur Standardabweichung eingetragen, wo sie der Anschaulichkeit dienlich waren und nicht zur Überladung der Darstellung führten. Standardabweichungen wurden grundsätzlich als Fehlerbalken mit kleinem Querstrich am Ende dargestellt. Fehlerbalkenenden ohne Querstrich markieren die Extremwerte einer Messung.

2.2.12.6 Geräteunabhängige Software und Datenbanken

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit WinMDI, Version 2.8 von Joseph Trotter. Die Datenorganisation und einfache Berechnungen erfolgten mit Microsoft Excel 95 und Microsoft Excel 2003. Statistische Auswertungen wurden mit SPSS 12.0, Microsoft Excel 95 und Microsoft Excel 2003 durchgeführt. Die Arbeit wurde mit Microsoft Word 95 und Microsoft Word 2003 erstellt. Die Literaturrecherche erfolgte über „http://www.medline.de/k_finder.html“.

3 ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zu Isolierung, Subpopulationsisolierung und prokoagulanter Aktivität von Monozyten

Die Isolierung von Monozyten mittels antikörpergekoppelter magnetischer Beads wurde auf Qualität und Ausbeute hin untersucht. Weiterhin wurde eine Methode zur Anreicherung von CD16⁺- bzw. CD16⁻-Monozyten mit magnetischen Beads etabliert.

Messungen der Rekalzifizierungszeit von Monozytenproben in definierten Verdünnungen erbrachten Informationen zur Sensitivität und Trennschärfe des RKZ-Assays und erlaubten die Berechnung einer relativen prokoagulanten Aktivität (rPCA).

Zuletzt wurden die TF-MFI (als Maß für die TF-Oberflächenexpression), die rPCA und die – mit einem neutralisierenden Anti-TF-Antikörper – blockierbare rPCA für unterschiedliche Monozyteninkubationen auf Korrelation untersucht.

3.1.1 Isolierung von Monozyten

Reinheit und Ausbeute der beiden verwendeten Isolationskits für Monozyten (Positiv- und Negativisolation; s. 2.2.4.2 und 2.2.4.3) wurden für aus BuC-Präparaten gewonnene PBMC (s. 2.2.4.1) verglichen (exemplarische Darstellung in Abb. 4 a–c).

Dabei betrug in 3 unabhängigen Experimenten mit dem Positiv-Kit die erzielte Reinheit (= $CD45^+CD14^+ / CD45^+$ im Isolat) im Mittel 96 % (min. 94 %, max. 98 %). Die unspezifische Monozyten-Ausbeute (= $CD45^+CD14^+$ im Isolat / eingesetzte Leukozyten) betrug im Mittel 26 % (min. 21 %, max. 35 %).

Weiterhin wurden in 5 unabhängigen Experimenten mit dem Negativ-Kit im Mittel Reinheiten von 89 % (min. 80 %, max. 93 %) erzielt. Die unspezifische Monozyten-Ausbeute betrug hier 13 % (min. 9 %, max. 19 %). Hier erlaubten zusätzliche Messungen die Bestimmung einer spezifischen Monozyten-Ausbeute [$CD45^+CD14^+$ im Isolat / eingesetzte $CD45^+CD14^+$], für die sich 61 % (min. 53 %, max. 71 %) ergab.

Der Positiv-Kit lieferte signifikant höhere Reinheiten ($p = 0,036$ im Mann-Whitney-U-Test). Die unspezifischen Monozyten-Ausbeuten lagen für den Positiv-Kit durchweg höher (keine Signifikanz im Vorzeichentest) als für den Negativ-Kit (s. o.). Vergleichend ist festzustellen, dass im Mittel der Positiv-Kit pro Einheit eingesetzter

Leukozyten etwa doppelt so viele Monozyten liefert wie der Negativ-Kit und dabei nur etwa ein Drittel so viele unerwünschte Leukozyten zurücklässt.

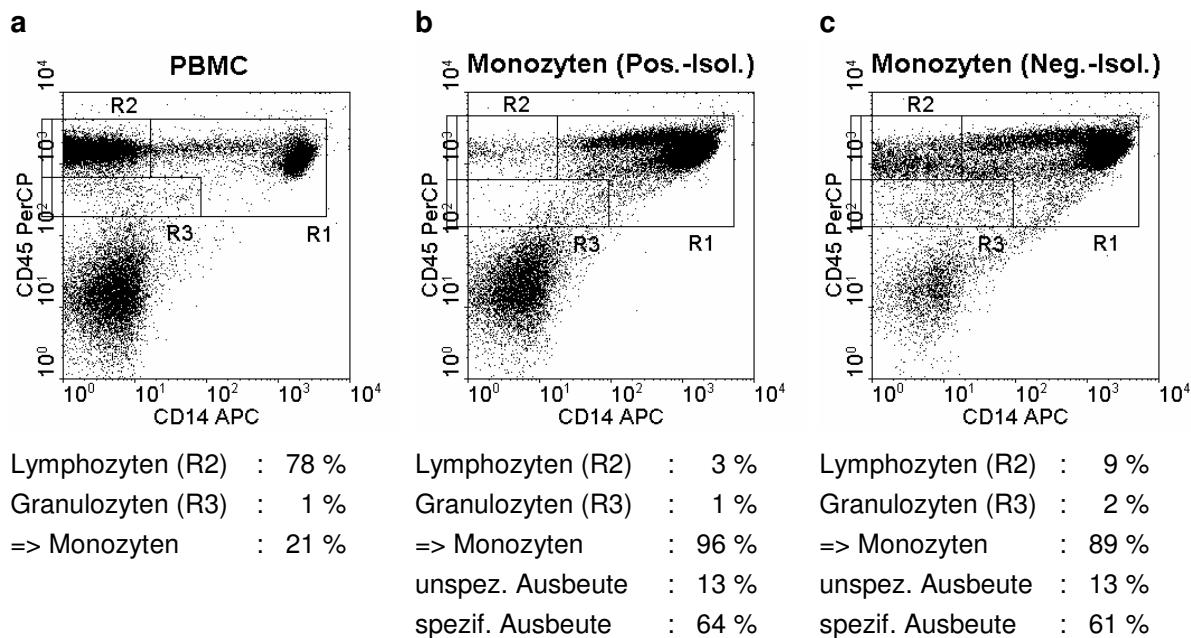


Abb. 4 a–c: Durchflusszytometrische Untersuchung der Leukozyten (R1) vor (a) und nach (b, c) Anreicherung von Monozyten aus PBMC mittels Positiv- (b) bzw. Negativisolierung (c). Beide Isolationsarten wurden hier mit Aliquots der PBMC *eines* Spenders durchgeführt. Die Prozentangaben sind auf die Leukozytenregion (R1 entspricht 100 %) bezogen.

3.1.2 Isolierung monozytärer CD16⁺/CD16⁻-Subpopulationen

Für die Auf trennung in Subpopulationen wurden *negativisierte* Monozyten eingesetzt, um eventuelle Interferenzen zwischen verschiedenen Arten von Beads und eine eventuelle Voraktivierung durch CD14-Beads zu umgehen. Die Isolierung der CD16⁺-Subpopulation erfolgte anschließend mittels an magnetische Beads gekoppelter Anti-CD16-Antikörper von Miltenyi, so wie sie z. B. auch bei Ellery und Crowe durchgeführt wurde [Ellery and Crowe 2005]. Durch einen zweiten Säulenlauf der CD16⁺-Fraktion sollte die Ratio CD14⁺CD16⁺ / CD14⁺CD16⁻ nochmals gesteigert werden.

Bei dreien der 8 unabhängigen Experimente, in denen die CD16⁺-Monozyten angereichert wurden (2.2.4.4), wurde ein zweiter Säulenlauf zur Verbesserung der Reinheit der Positivfraktion nachgeschaltet. Die durchflusszytometrische Beurteilung der Fraktionen wurde – wie z. B. bei Ellery und Crowe – mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern des 3G8-Klons durchgeführt und das Ergebnis für eines der Experimente exemplarisch in Abb. 5 a–e dargestellt.

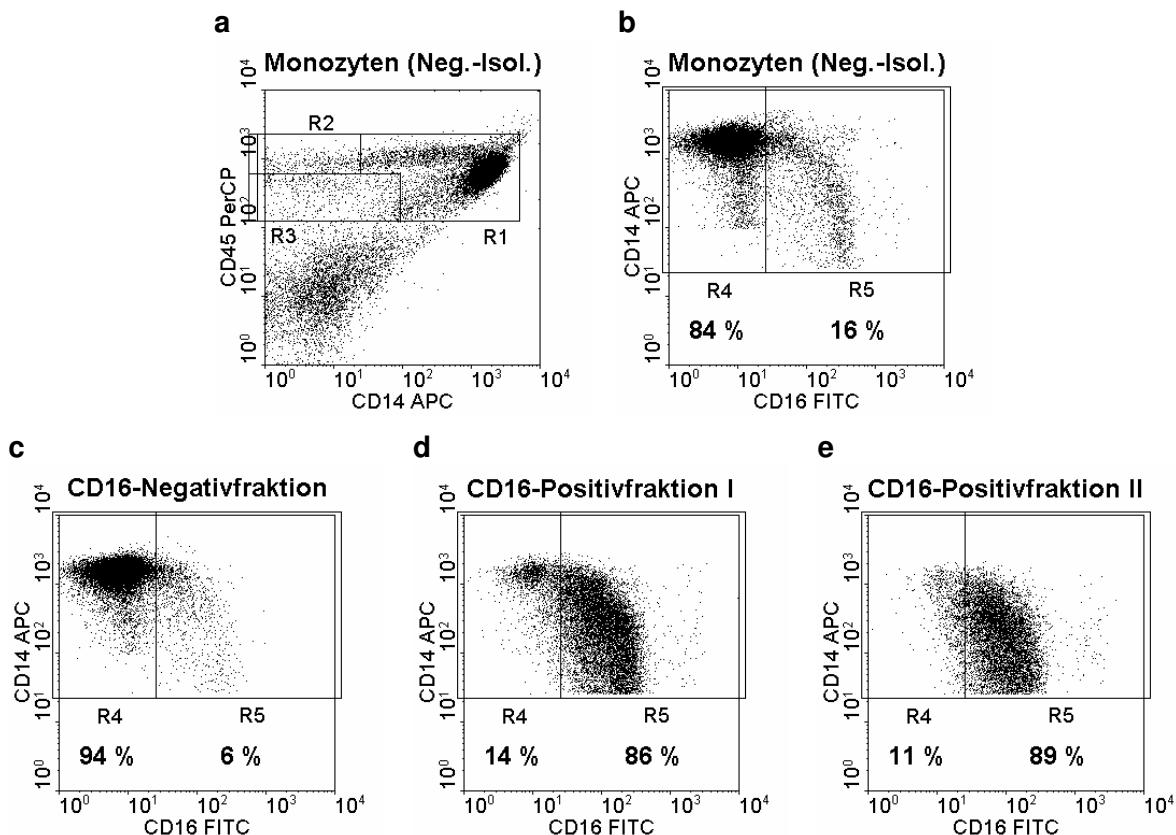


Abb. 5 a–e: Negativisierte Monozyten nach Leukozyten (R1), Lymphozyten (R2) und Granulozyten (R3) gegatet (a). In b–e ist die Monozytenfraktion (R1 ohne R2 und ohne R3) mit einheitlichen Gates für die CD16⁻ (R4) und CD16⁺ (R5) Subpopulationen dargestellt. In b ist die gesamte Monozytenfraktion abgebildet, in c die CD16⁻-Fraktion, in d bzw. e die CD16⁺-Fraktion nach dem ersten bzw. zweiten Säulenlauf. Die Prozentzahlen geben den Anteil der Events im Gate an, bezogen auf die Gesamtevents im Dotplot.

Der Anteil der CD16⁺-Monozyten an den Gesamtmonozyten konnte im Mittel durch den *ersten Säulenlauf* im Eluat von ursprünglich 18 % auf 54 % hochsignifikant gesteigert und im Durchfluss von 18 % auf 8 % hochsignifikant reduziert werden (jeweils $p = 0,008$ im Vorzeichentest). Für den bei dreien dieser Experimente nachgeschalteten *zweiten Säulenlauf* konnte der Anteil der CD16⁺-Monozyten im Eluat von 72 % noch leicht (nicht signifikant) auf 79 % erhöht werden. Der Anteil der CD16⁻-Monozyten nach Anreicherung betrug im Mittel bereits 92 % (s. o.), weswegen hier auf einen *zweiten Säulenlauf* (zur weiteren Depletion der restlichen CD16⁺-Monozyten) verzichtet wurde. Der Anteil der Granulozyten an den Gesamtleukozyten stieg im Mittel von 12 % auf 28 % (*erster Säulenlauf*) bzw. 37 % (*zweiter Säulenlauf*) an.

3.1.3 Untersuchungen zur (relativen) prokoagulanten Aktivität

Zunächst wurde die Grundlage für die Berechnung einer zur Monozytenzahl proportionalen prokoagulanten Aktivität (PCA) – bzw. ihres Relativwerts (rPCA) – aus Rekalzifizierungszeiten unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten geschaffen.

Die Inkubation unterschiedlich stimulierter Monozyten mit einem neutralisierenden Anti-TF-Antikörper und der Zusammenhang der rPCA mit der TF-Oberflächenexpression sollte schließlich die hauptsächliche Herkunft der beobachteten monozytären rPCA klären.

3.1.3.1 Zusammenhang zwischen (relativer) PCA und Rekalzifizierungszeit (RKZ)

Die PCA ist im Gegensatz zur RKZ direkt proportional zur Menge des gerinnungsinduzierenden Agens (GIA) und somit auch zur Zahl eingesetzter Monozyten aus der gleichen Stammlösung. Um die RKZ in einen PCA-Wert transformieren zu können, wurde deshalb die RKZ für definierte Verdünnungen LPS-stimulierter bzw. unstimulierter Monozyten bestimmt. Auf analoge Weise wurde z. B. bei Conkling et al. für definierte Aktivitäten bzw. Verdünnungen eines Thromboplastin-Standards („rabbit brain thromboplastin standard“) die RKZ bestimmt und daraus eine Standardkurve erstellt [Conkling et al. 1988]. Die Thromboplastin-Aktivität und die Menge des gerinnungsinduzierenden Agens sind dabei als verschiedene Bezeichnungen für die gleiche Eigenschaft zu sehen, nämlich die Blutgerinnung im RKZ-Assay zu induzieren.

Nach Isolation von PBMC aus einem BuC-Präparat (2.2.4.1) wurden direkt im Anschluss die Monozyten daraus negativisiert (2.2.4.3). Bis zur Stimulation erfolgte eine Lagerung der Monozyten über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ in Costar-6er-Zellkulturplatten (je 1 Mio. in 1000 µl in Zellkulturmedium, wie z. B. in 2.2.4.2 beschrieben). Der Hälfte der Schalen wurden dann 1000 µl Zellkulturmedium, der anderen Hälfte 1000 µl Zellkulturmedium mit LPS (Endkonzentration 150 ng/ml) zugesetzt (Zeitpunkt 0 h). Direkt darauf folgte der Transfer der jeweils ca. 2 ml Zellsuspension in Falcon-6er-Zellkulturplatten zur Inkubation (5 h, 37 °C, 5 % CO₂). Die stimulierten und unstimulierten Monozyten wurden nach 8,5 h getrennt geerntet, jeweils in einem sterilen 15-ml-Tube gepoolt, 5 min mit 425 RCF zentrifugiert und einmal mit steriles DPBS gewaschen (188 RCF, 10 min). Daraufhin wurden die beiden Pellets mit steriles DPBS resuspendiert und damit auf jeweils 1300 µl eingestellt. Diese beiden

Stammlösungen dienten der Erstellung von 1:2-, 1:4-, 1:8- und 1:16- Verdünnungen in steriles DPBS. Die Messungen der RKZ wurden dann an jeweils zwei Aliquots à 100 µl der Stammlösung/Verdünnung (frisch geerntet bzw. zwischenzeitlich eingefroren) mit Aliquots eines Poolplasmas (Gewinnung 2.2.2.3) durchgeführt. Dieses Poolplasma erhielt die Bezeichnung *Eichplasma*.

Die Korrelation der Menge des gerinnungsinduzierenden Agens mit der RKZ lässt sich bei doppelt-logarithmischer Skalierung – wie z. B. bei Conkling et al. – sehr gut durch eine Gerade nähern (Abb. 6 a und b).

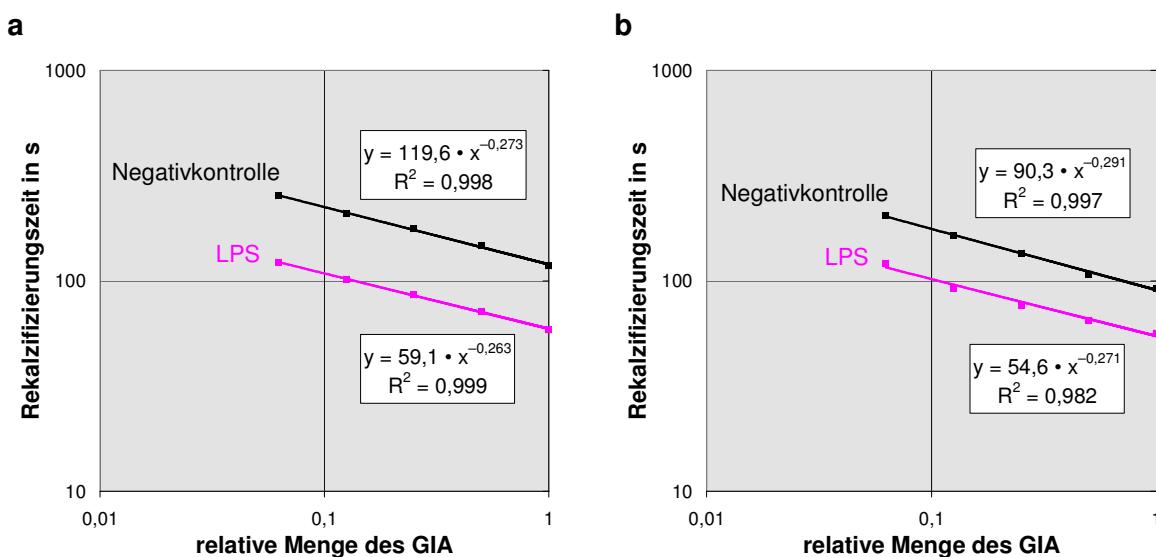


Abb. 6 a, b: Zusammenhang zwischen der relativen Menge des gerinnungsinduzierenden Agens und der Rekalifizierungszeit bei frisch eingesetzten (a) bzw. zwischenzeitlich eingefrorenen (b) Monozyten (blau = unstimuliert; rosa = LPS-stimuliert) im Vergleich. Jeweils Mittelwerte aus Doppel- bis 4fach-Messungen. Der RKZ der unverdünnten Stammlösung wurde die PCA 1 zugeordnet.

Es zeigt sich außerdem eine gute Trennschärfe zwischen der Inkubation mit LPS und der Negativkontrolle. Das Einfrieren/Auftauen bedingt eine höhere PCA (kürzere RKZ) im Sinne einer höheren Grundaktivität und reduziert dadurch die Trennschärfe. Anhand der mit den nicht eingefrorenen Monozyten gewonnenen Daten war bei nahezu gleicher Steigung der beiden Geraden (Positivkontrolle $-0,263$; Negativkontrolle $-0,273$) die Einführung einer gemeinsamen Näherungsgeraden für den gesamten mit Messwerten abgedeckten Bereich (59 bis 253 s) möglich (Abb. 7).

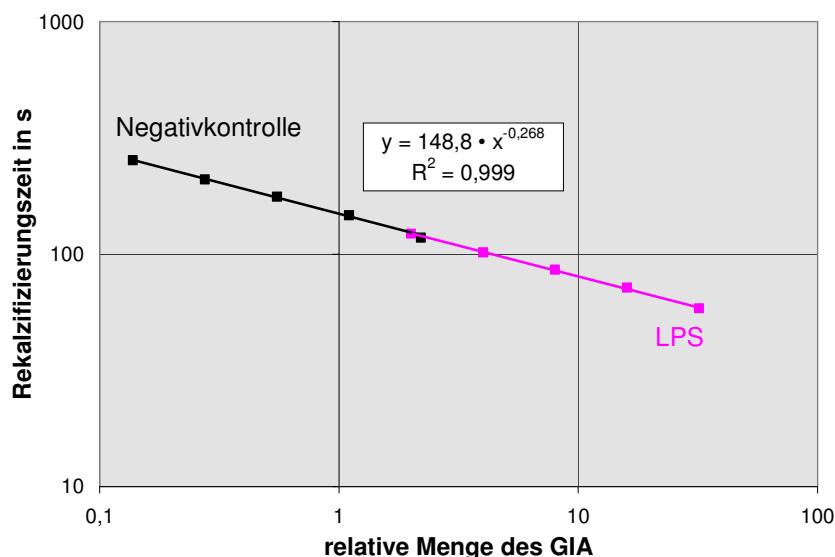


Abb. 7: Gemeinsame Näherungsgerade über den gesamten aus Abb. 6 a mit Daten nicht eingefrorener Monozyten (unstimuliert und stimuliert) abdeckbaren Bereich.

Der zugrunde liegende Potenz-Zusammenhang ist für das untersuchte Eichplasma gültig und lautet mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,999:

$$\text{RKZ} = 148,8 \text{ s} \cdot \text{PCA}^{-0,268}$$

bzw.

$$\text{PCA} = (\text{RKZ}/148,8 \text{ s})^{-3,73}$$

Die PCA nimmt also bei der im mittleren Bereich der Geraden liegenden RKZ von 148,8 s den Wert 1 an. Dieser Zusammenhang gilt für den untersuchten Bereich 59 bis 253 s. Näherungsweise wird im Folgenden dieser Zusammenhang auch für eine $\text{RKZ} > 253$ s angewendet. Für die Negativkontrolle mit steriles DPBS ergibt sich damit eine von Null verschiedene PCA im Bereich von 0,01.

Um Vergleichbarkeit mit einem später erstellten Poolplasma herzustellen, wurde für 3 Ansätze (DPBS-Kontrolle, nicht stimuliert Monozyten, LPS-stimulierte Monozyten) zunächst mit dem Eichplasma die RKZ gemessen und daraus die PCA berechnet (obere Gerade in Abb. 8). Der Zusammenhang zwischen RKZ und PCA für das neuere Poolplasma ergibt sich aus der Rekalifizierungszeit der gleichartigen Ansätze mit diesem Plasma und der nunmehr bekannten PCA (untere Gerade in Abb. 8)):

$$\text{RKZ} = 190,3 \text{ s} \cdot \text{PCA}^{-0,295}$$

bzw.

$$\text{PCA} = (\text{RKZ}/190,3 \text{ s})^{-3,39}$$

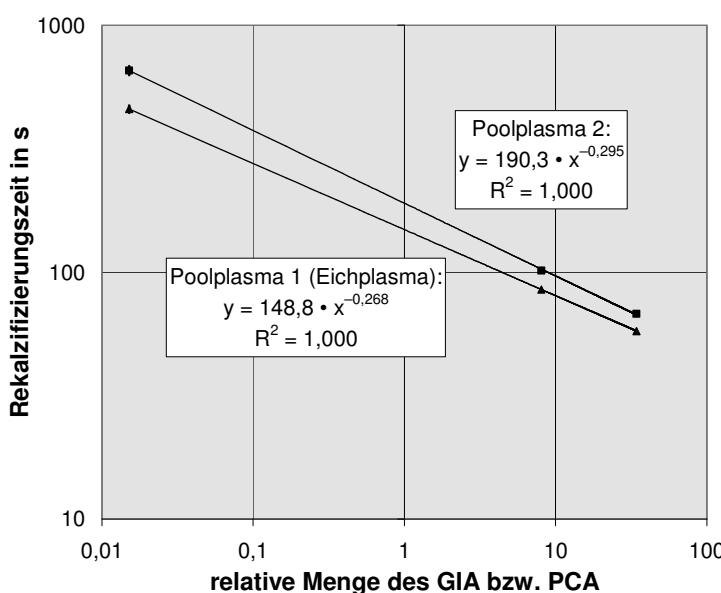


Abb. 8: Zusammenhang zwischen RKZ und PCA für zwei verschiedene Poolplasmen. Anhand der Formel für das Eichplasma wurde für 3 verschiedene Ansätze mit dem bereits untersuchten Poolplasma die PCA ermittelt (untere Gerade). Diese Werte ergaben zusammen mit der RKZ der Ansätze (bei Verwendung des neuen Poolplasmas) die obere Gerade. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppel- bis 4fach-Ansätzen, die Balken für die Extremwerte sind ähnlich klein wie die Symbole.

Da auch das neuere Plasma im doppelt-logarithmischen Diagramm eine Gerade liefert, liegt die Annahme nahe, dass dieser Potenz-Zusammenhang zwischen RKZ und PCA ($\text{RKZ} = a \cdot \text{PCA}^b \cdot s$ bzw. $\text{PCA} = [(\text{RKZ} \cdot s^{-1})/a]^{1/b}$) unabhängig vom Plasma besteht. Der Exponent b zeigt eine Abhängigkeit vom Plasma. Der Faktor a , dessen Veränderung eine Parallelverschiebung der Geraden im Diagramm zur Folge hat, wird nur benötigt, um die Vergleichbarkeit verschiedener Poolplasmen zu gewährleisten. Da aber bei den im Folgenden direkt miteinander verglichenen Messungen stets Aliquots eines einzigen Poolplasmas eingesetzt wurden, könnte dieser Faktor vernachlässigt bzw. gleich 1 gesetzt werden. Man erhält so eine relative PCA (rPCA), die zur PCA proportional ist. Damit diese für die gängigen Rekalzifizierungszeiten zwischen 50 und 400 s anschauliche Werte im Bereich um 1 annimmt, wird der Faktor a gleich 200 gesetzt. Die rPCA nimmt dann unabhängig vom Poolplasma für eine RKZ von 200 s den Wert 1 an.

$$\text{RKZ} = 200 \text{ s} \cdot \text{rPCA}^b$$

bzw.

$$\text{rPCA} = (\text{RKZ}/200 \text{ s})^{1/b}$$

Die rPCA erlaubt, bei festem Poolplasma Vervielfachungen der PCA zu ermitteln oder Differenzen der PCA zu vergleichen, was für die weiteren Betrachtungen ausreicht.

3.1.3.2 Effekt eines neutralisierenden Anti-TF-Antikörpers auf die Rekalzifizierungszeit bzw. rPCA

Der Anteil, zu dem die TF-Proteinexpression für die rPCA verantwortlich ist, wurde mit Hilfe eines neutralisierenden Anti-TF-Antikörpers bestimmt (2.2.11).

Für eine relevante Beeinflussung des Rekalzifizierungs-Assays durch freien Anti-TF-Antikörper ergaben sich in Vergleichsmessungen der rPCAs von steriles DPBS und steriles DPBS mit neutralisierendem Anti-TF-Antikörper keine Anhaltspunkte (Abb. 9). Deswegen wurde im Folgenden davon ausgegangen, dass dieser Antikörper den Gerinnungsvorgang nicht unspezifisch, d. h. TF-unabhängig, beeinflusst.

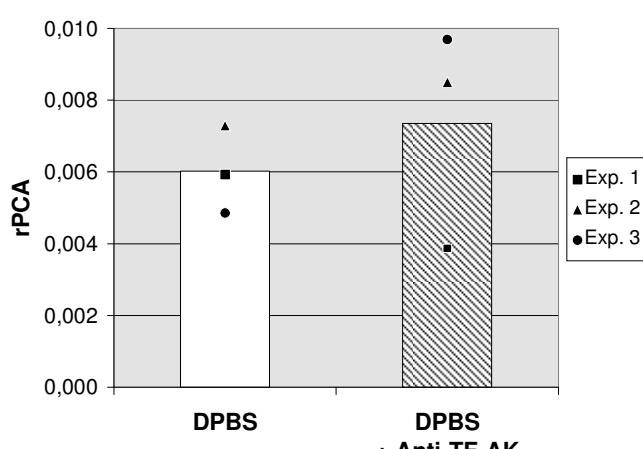


Abb. 9: Gemittelte rPCA aus 3 unabhängigen Experimenten im RKZ-Assay. Pro Experiment wurden je 2–3 getrennte Inkubationen mit 100 µl sterilem DPBS + neutralisierendem Anti-TF-Antikörper (40 µg/ml) als Testlösung und 2–5 getrennte Inkubationen mit 100 µl sterilem DPBS als Testlösung) durchgeführt. Die dargestellten Unterschiede der rPCA sind in Bezug auf die rPCA-Werte bei Messungen an Monozyten vernachlässigbar klein.

6 Stunden lang mit Anti-FcγR-F(ab')₂s, AffiniPure Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab')₂, IVIg, autologem Plasma, LPS und als Kontrollen inkubierte Monozyten aus zwei unabhängigen Experimenten (jeweils 12 Inkubationen pro Experiment, wie in 3.3.5 beschrieben) wurden nach einer anschließenden 10-minütigen Inkubation ohne bzw. mit neutralisierendem Anti-TF-Antikörper (4 µg/ml) im Rekalzifizierungs-Assay gemessen (2.2.11). Durch eine Regressionsgerade im halblogarithmischen Diagramm bzw. eine Logarithmusfunktion (Abb. 10) kann der Zusammenhang zwischen den Rekalzifizierungszeiten ohne TF-Blockade (RKZ) und mit TF-Blockade (RKZ') mit sehr guter Korrelation wiedergegeben werden.

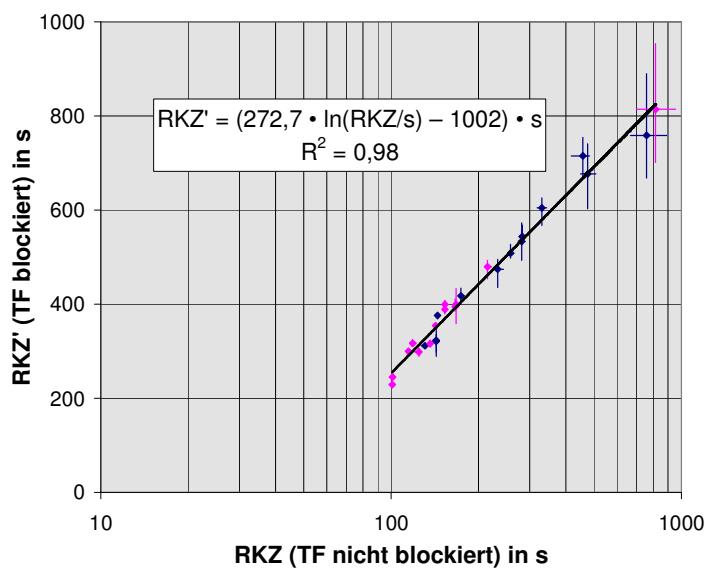


Abb. 10: Logarithmischer Zusammenhang zwischen RKZ ohne und mit Blockade von TF mit neutralisierendem Anti-TF-Antikörper (4 µg/ml). Die Daten der zwei unabhängigen Experimente sind durch blaue bzw. pinkfarbene Punkte dargestellt. Die Fehlerbalkenenden markieren hier jeweils die Extremwerte aus Doppel- bis 4fach-Messungen. Die beiden Punkte ganz rechts entsprechen den Kontrollen mit steriles DPBS.

Im Gegensatz zur RKZ erlaubt die über die Formel in 3.1.3.1 berechenbare rPCA Aussagen dazu, welcher *Anteil der prokoagulanten Aktivität* des Ansatzes blockiert werden konnte. Da die blockierte rPCA (rPCA') z. T. sehr klein war – d. h. in der Nähe der Eigen-PCA des Leer-Ansatzes mit steriles DPBS lag – war für eine auch in diesen Bereichen exakte Betrachtung die Bestimmung der „Netto-rPCA“ gegenüber dem Leer-Ansatz erforderlich. Die Netto-rPCA ergab sich also aus dem rPCA-Wert der Inkubation minus dem rPCA-Wert des Leer-Ansatzes. Passend zu der gefundenen Abhängigkeit der RKZ' von der RKZ zeigte sich auch die Netto-rPCA' stark abhängig von der Netto-rPCA, mit einem relativ konstanten Anteil um 5 %. Das heißt, dass etwa 95 % der prokoagulanten Aktivität des Ansatzes blockierbar waren (Abb. 11).

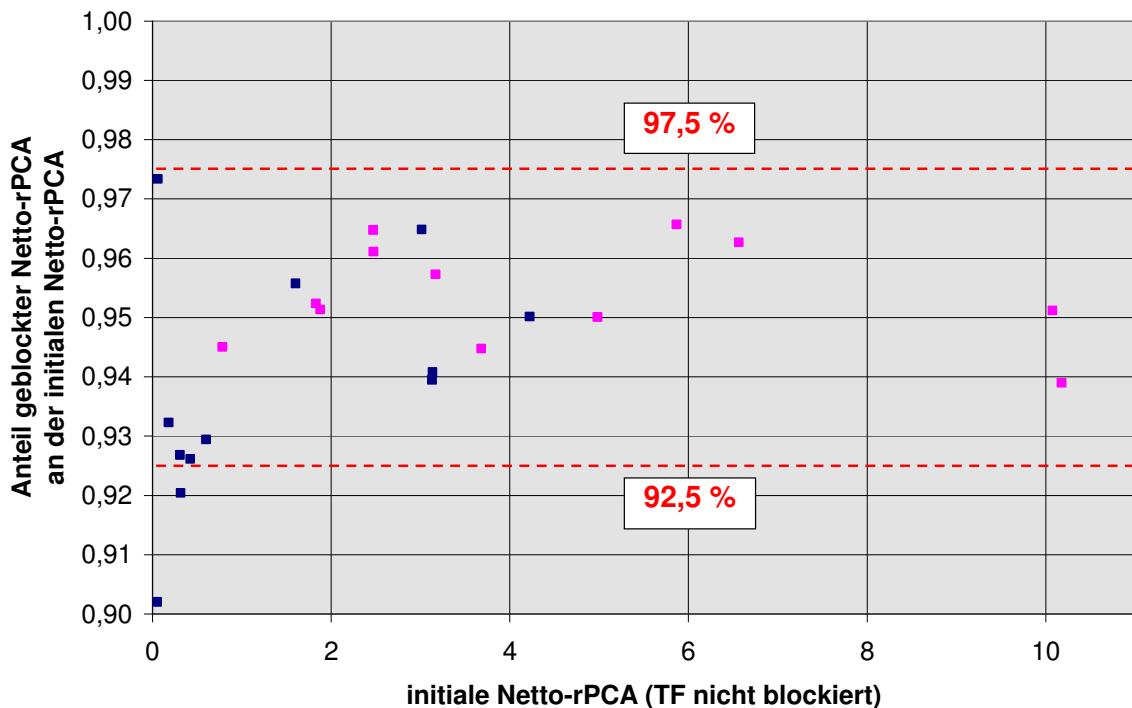


Abb. 11: Darstellung des Zusammenhangs der Netto-rPCA für unblockierte und mit neutralisierendem Anti-TF-Antikörper blockierte Monozyteninkubationen aus zwei unabhängigen Experimenten (blau bzw. pinkfarben).

3.1.3.3 Zusammenhang zwischen Rekalzifizierungszeit (RKZ) und monozytärer TF-Oberflächenexpression

Da rPCA und blockierbare rPCA über weite Strecken weitgehend proportional sind (3.1.3.2), wurde ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der rPCA und der monozytären TF-Oberflächenexpression (die ja das Ziel der TF-Blockade darstellt) erwartet. 5 unabhängige Experimente mit jeweils 8 bis 16 6-stündigen Inkubationen (3.3.5) negativisolierte Monozyten dienten als Grundlage dieser Korrelationsuntersuchung.

Zur semiquantitativen Bestimmung der Zellzahl wurden die durchflusszytometrischen Messungen bis zum vollständigen Verbrauch der jeweiligen Probe durchgeführt. Für die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von CD142 (als Maß für die TF-Oberflächenexpression) sowie der Anzahl der gesamten Monozyten-Events erfolgte das Gating der Monozyten wie in (2.2.12.1) beschrieben.

Um mit möglichst wenigen zusätzlichen Annahmen eine Korrelation der an Aliquot A (vgl. 3.3.5) gemessenen monozytären TF-MFI (als Maß für die monozytäre TF-Oberflächenexpression) und der an Aliquot B gemessenen Rekalzifizierungszeit (als Maß für die rPCA) zu finden, wurde die Rangkorrelation mit dem Spearman-

schen Rangkorrelationskoeffizienten bestimmt. Die vorherige Festlegung auf eine den Zusammenhang beschreibende Funktion bzw. Kurve wurde dadurch vermieden. Es ergab sich eine deutliche Korrelation, die bei Verwendung des Medians (im Vergleich zum arithmetischen oder geometrischen Mittel) für die monozytäre TF-MFI mit einem Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten von 0,66 am höchsten war (vgl. Abb. 12).

Aufgrund der insgesamt geringen und (deshalb) auch stark unterschiedlichen durchflusszytometrisch ermittelten Zellzahlen bzw. Monozytenzahlen in den Aliquots wurde von der Berücksichtigung der Zellzahl eine Verbesserung der Korrelation erwartet. Um wieder auf möglichst wenige zusätzliche, möglicherweise fehlerbehaftete Annahmen angewiesen zu sein, erfolgte allerdings nicht die *Normierung der RKZ auf eine Zelle* (wie auch der Mittelwert bzw. der Median der TF-Fluoreszenzintensität auf eine Zelle normiert ist), da dazu die Berechnung der rPCA nötig gewesen wäre. Stattdessen erfolgte die Berechnung der *monozytären summierten TF-Fluoreszenzintensität im Ansatz (monozytäre TF-SFI oder TF-SFI_{MO})* anhand der jeweiligen Monozytenzahl, indem die (medianen) TF-MFI_{MO} mit der Monozytenzahl multipliziert wurde. Die erhaltene monozytäre TF-SFI ist näherungsweise proportional zur monozytären Gesamt-TF-Oberflächenexpression im Ansatz. Bei den meist relativ hohen CD142-Fluoreszenzintensitäten der Monozyten wurde weitgehende Proportionalität der Fluoreszenzintensität und der Oberflächenexpression ohne wesentliche Störung durch Autofluoreszenz oder unspezifische Antikörperbindung angenommen. Dieses Vorgehen erschien nahe liegender und weniger störanfällig als die wesentlich komplexere Transformation der nicht linear mit der Zellzahl zusammenhängenden RKZ in die linear mit der Zellzahl zusammenhängende rPCA. Die besten Korrelationen ergaben sich wieder bei Verwendung des *Medians*; der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient nahm weiter zu und betrug dann im Mittel 0,92 (Abb. 12). Die Korrelation der auf *alle gemessenen Events* hochgerechneten TF-SFI mit der RKZ war deutlich schwächer (nicht dargestellt), was auf mitbetrachtete Zellbruchteile oder Überreste anderer Leukozytensubpopulationen mit nur geringer CD142-Expression (vgl. o.) zurückzuführen sein könnte.

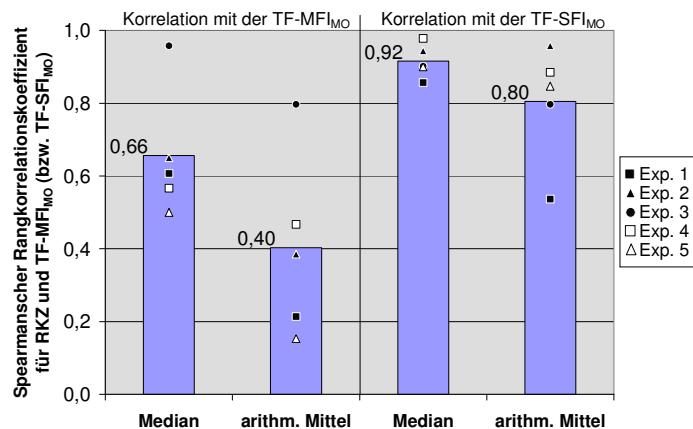


Abb. 12: Zunahme des aus 5 unabhängigen Experimenten gemittelten Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten für RKZ und monozytäre TF-MFI bzw. RKZ und monozytäre TF-SFI auf der Basis des arithmetischen Mittels bzw. des Medians. Jeweils Überlegenheit des Medians mit zusätzlich geringerer Streubreite.

Der gefundene Zusammenhang der monozytären TF-SFI mit der RKZ des Ansatzes sollte nun möglichst gut durch eine einfache Funktion beschrieben werden im Sinne von $\text{TF-SFI}_{\text{MO}} = f(\text{RKZ} \cdot s^{-1})$. Unter den basalen Näherungsfunktionen lieferte die Näherung über eine Potenzfunktion $f(x) = a \cdot x^b$ (deren Graph im doppelt-logarithmischen Diagramm einer Geraden entspricht) für alle 5 Experimente die besten Korrelationskoeffizienten. Dabei lagen die Exponenten b bis auf einen Wert ($-0,412$) nahe um $-0,295$ (Abb. 13), dem Wert des Exponenten, der den Zusammenhang zwischen der rPCA und der RKZ des Ansatzes für das verwendete Poolplasma beschreibt (vgl. 3.1.3.1). Bei Betrachtung aller Experimente zusammen lag der Exponent mit $-0,289$ auch nahe bei $-0,295$. Die $\text{TF-SFI}_{\text{MO}}$ (und näherungsweise die gesamte TF-Oberflächenexpression im Ansatz) wäre somit im betrachteten Bereich weitgehend proportional zur rPCA des Ansatzes. Werden die RKZ-Werte aus Abb. 13 in rPCA-Werte umgerechnet (vgl. 3.1.3.1), so ist die Korrelation von rPCA und $\text{TF-SFI}_{\text{MO}}$ tatsächlich bei *linearer Regression* am besten. Das Bestimmtheitsmaß R^2 betrug in den 5 Einzelexperimenten 0,84–0,95, bei gemeinsamer Betrachtung 0,87.

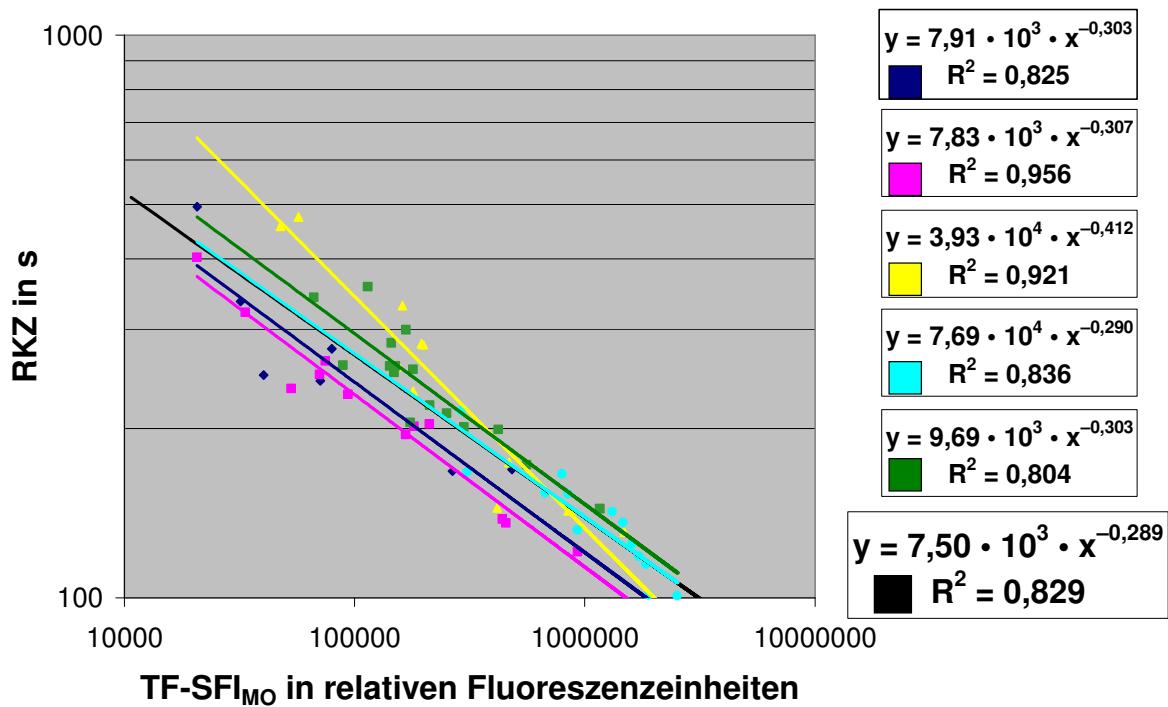


Abb. 13: Darstellung der monozytären TF-SFI (die näherungsweise proportional zur gesamten TF-Oberflächenexpression ist) und der RKZ für die Inkubationen 5 unabhängiger Experimente (farbig) inkl. Regressionskurven und Regressionskurve aller Inkubationen (schwarz).

3.2 Untersuchungen zur Variabilität monozytärer TF-mRNA-Expression mit absoluter Quantifizierung der TF-cDNA durch Real-Time-PCR

Um die cDNA-Menge von TF in Monozyten messen und damit indirekt die TF-mRNA-Expression abschätzen zu können, wurde eine *RT* (3.2.1) *mit anschließender quantitativer Real-Time PCR am LightCycler* (3.2.2) etabliert und auf Variabilität untersucht (3.2.3). Als Standards mit bekannter Konzentration von Matrizen-DNA dienten spezifische TF-Amplimere aus vorangegangenen PCRs.

3.2.1 Reverse Transkription monozytärer Gesamt-RNA

Die reverse Transkription wird hier exemplarisch für RNA-Extrakte in zwei unabhängigen Experimenten (A und B) dargestellt.

In Experiment A wurden aus einem BuC-Präparat zunächst PBMC mittels V-a cutainers isoliert (2.2.4.1), daraus dann Monozyten durch Positivisolierung (2.2.4.2) gewonnen und über Nacht (ca. 17–18 h) à 2 Mio. Zellen in Zellkulturmedium in Costar-6er-Zellkulturplatten gelagert (Einzelheiten in 2.2.4.2). Die Stimulation wurde nach Transfer in Falcon-6er-Zellkulturplatten durch Zugabe von 150 ng LPS/ml in die Positivkontrolle (A+) gestartet, die Negativkontrolle (A–) wurde unbehandelt gelassen (2.2.5.2). Nach 8,5 h erfolgte die Ernte von Doppelinkubationen der Positiv- und Negativkontrolle, das zweimalige Waschen (526 RCF, 5 bzw. 7 min, 4 °C) mit sterilem DPBS und das sofortige Einfrieren der Zellen nach Zugabe von 200 µl Lyse-/Bindepuffer aus dem High Pure RNA Isolation Kit zu den 100 µl Zellsuspension in sterilem DPBS (2.2.5.2). Zur Steigerung der RNA-Ausbeute wurden die Doppelinkubationen sofort nach dem Auftauen gepoolt.

In Experiment B erfolgte dagegen die PBMC-Gewinnung mit FICOLL (2.2.4.1), die Monozytentengewinnung durch Negativisolierung (2.2.4.3) und die Lagerung für 9 h (à 1,25 Mio. Zellen in jeweils 2,2 ml Zellkulturmedium). Die Zellen wurden direkt in den Costar-6er-Zellkulturplatten analog stimuliert, nach 1 h geerntet, pelletiert (425 RCF, 5 min) und nach dem Abziehen des Überstands sofort eingefroren (–80 °C). Das Auftauen erfolgte durch Zugabe von 400 µl Lyse-/Bindepuffer und 200 µl steriles DPBS.

Die Gesamt-RNA wurde dann mit dem High Pure RNA Isolation Kit extrahiert (2.2.8.3), mit nukleasefreiem Wasser aus der Matrix des Filtrationsgefäßes eluiert und bei -80°C gelagert. Alle RNA-Extrakte wurden vor der reversen Transkription mit dem RNA 6000 LabChip auf Qualität und Quantität hin untersucht (Abb. 14 a–d).

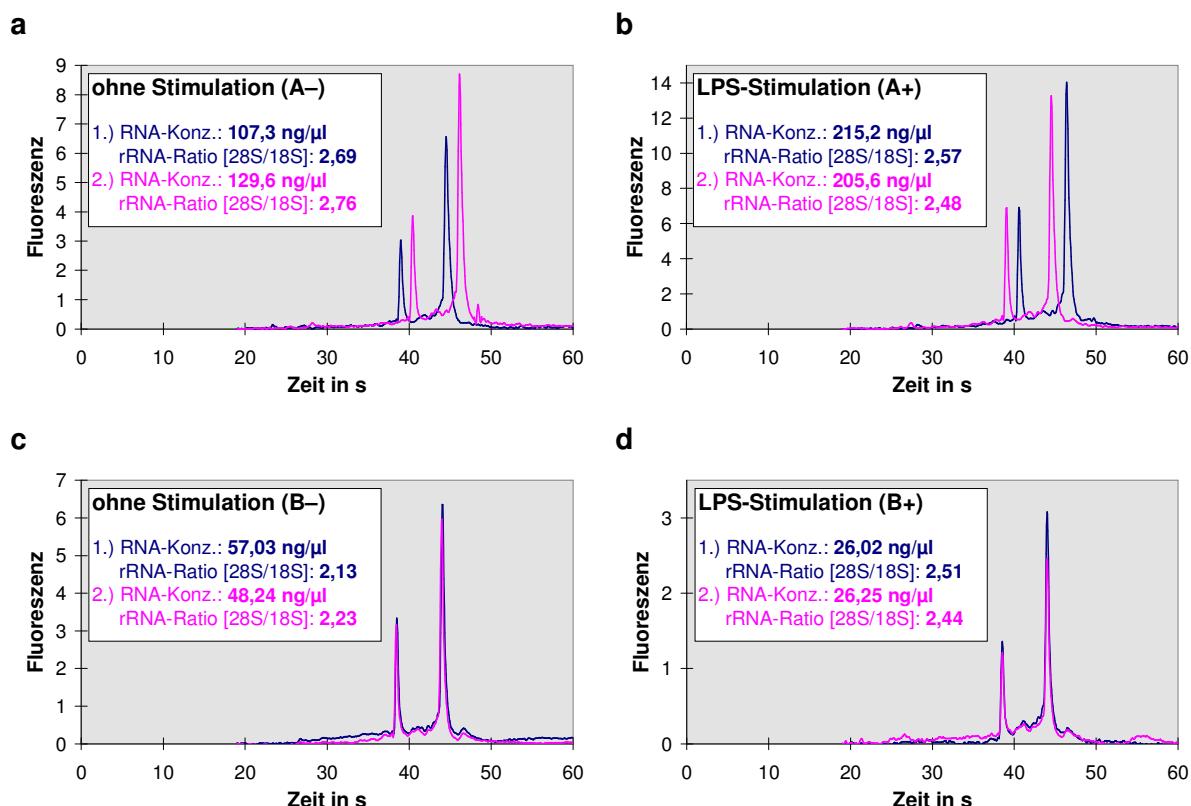


Abb. 14 a–d: Exemplarische Darstellung der Längenverteilung der RNA im Elektrophrogramm für nicht stimulierte und LPS-stimulierte Inkubationen aus Experiment A (**a, b**) und Experiment B (**c, d**). Die 28S- und 18S-Peaks sind deutlich erkennbar, die rRNA-Ratios liegen über 2. Gezeigt sind jeweils die Messungen von Doppelansätzen. Die Verschiebung in den Abbildungen kommt durch unterschiedliche Laufstrecken durch das Kapillarsystem des Chips zustande und hat für die Quantifizierung keine Bedeutung.

Die rRNA-Ratios > 2 sprachen für eine gute Qualität der RNA-Extrakte, die Konzentrationen lagen alle in dem zur zuverlässigen Quantifizierung erforderlichen Bereich (25–500 ng/µl).

Die reverse Transkription erfolgte mittels Random Primer-Hexameren, wie in 2.2.8.5 beschrieben [Liu et al. 2005]. Eingesetzt wurden 200 ng (Experiment A) bzw. 150 ng (Experiment B) Gesamt-RNA. Die Normierung erfolgte auf Gesamt-RNA (die hauptsächlich aus ribosomaler 18S- und 28S-rRNA besteht), da ihre Menge durch Variationen der mRNA nicht höhergradig verändert wird [Thellin et al. 1999].

Der Erfolg der RT wurde qualitativ mittels einer anschließenden konventionellen PCR für eine Sequenz des Housekeeping-Gens GAPDH (vgl. dazu 3.2.2.1) überprüft (Abb. 15). Hier zeigten sich durchweg die erwarteten Banden, auch ohne wesentliche Intensitätsunterschiede.

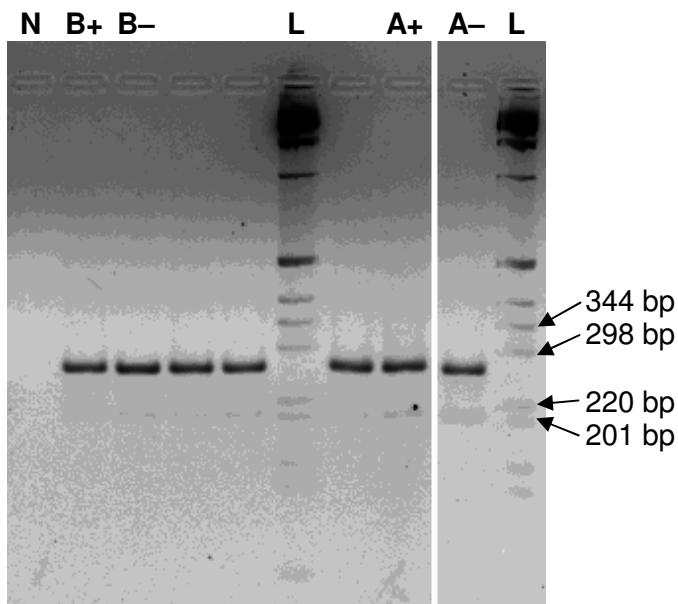


Abb. 15: Dargestellt ist ein 3 %iges Agarosegel mit den Produkten einer GAPDH-PCR (GAPDH-Primer; DNA-Transkripte der monozytären Gesamt-RNA der Experimente A und B als Ausgangsmaterial). Sowohl bei unstimulierten (-) als auch bei stimulierten (+) Monozyten zeigt sich deutlich die erwartete Bande bei 270 bp (vgl. 3.2.2.1 bzgl. der weiteren, sehr schwachen Bande bei ca. 205 bp). "N" steht für die H₂O-Kontrolle der GAPDH-PCR. "L" steht für die "Ladder", einen 1-kB-DNA-Standard.

Die DNA der anderen Experimente bzw. Inkubationen (3.2.3 und 3.3.2) wurde analog zu den erwähnten Beispielexperimenten generiert oder es wurde direkt ein TF-Amplimer-Standard eingesetzt.

3.2.2 Etablierung der quantitativen Real-Time-PCR

Zur Quantifizierung von Matrizen-DNA ist die Real-Time-PCR besonders geeignet, da sie durch zyklische Messung der DNA-Menge die einfache Identifizierung der Log-lin-Phase bzw. des Punktes der stärksten Kurvenkrümmung erlaubt. Dort ist die DNA-Menge (bzw. DNA-Fluoreszenz) in verschiedenen Ansätzen noch proportional zur Menge an eingesetzter Matrizen-DNA. In späteren Zyklen wird u. a. durch Verbrauch der PCR-Komponenten, durch den Aktivitätsverlust der Polymerase und durch die Kompetition der PCR-Produkte die Effizienz der PCR schnell schwächer, so dass die Produktmenge ein Plateau erreicht. Ideal ist eine Betrachtung der frühen Log-lin-Phase, in der die DNA-Menge schon zuverlässig messbar, aber die Effizienz noch nicht relevant verringert ist.

3.2.2.1 Primer-Spezifität und Amplimer-Aufreinigung

Mit TF-Primern durchgeführte PCRs (mit revers transkribierten Gesamt-RNA-Extrakten aus positiv isolierten Monozyten, wie in 2.2.8.3, 2.2.8.4 und 2.2.8.5 beschrieben) lieferten Produkte (Abb. 16 a), die durch DNA-Extraktion aufgereinigt wurden. Anschließend erfolgte gelelektrophoretisch die Kontrolle auf Spezifität des Produkts (Abb. 16 b) und photometrisch die Untersuchung auf Reinheit und DNA-Konzentration. Der 260 nm/280 nm-Quotient für das TF-PCR-Produkt betrug 1,80, die Konzentration 76 ng/ μ l (Mittelwerte aus Tripel-Messungen).

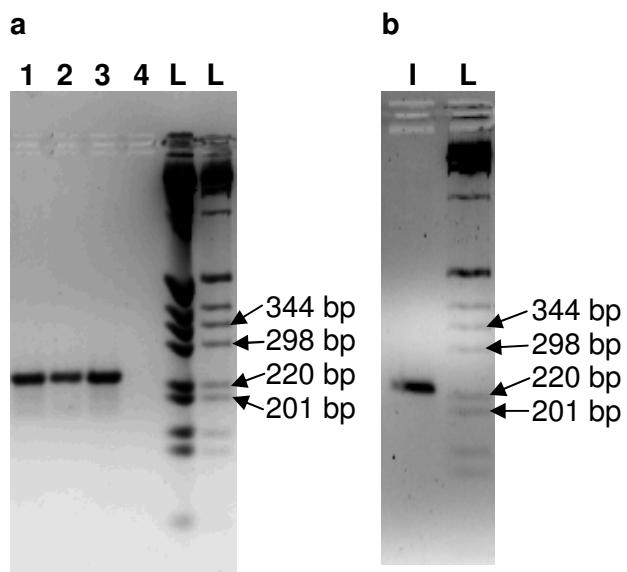


Abb. 16 a, b: Dargestellt sind zwei 3 %ige Agarosegele. Gel **a** zeigt die Produkte einer TF-PCR (TF-Primer; DNA-Transkripte monozytärer Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial) mit spezifischer Bande bei 233 bp (Taschen 1–3) sowie die Negativkontrolle (Tasche 4). Gel **b** zeigt die durch DNA-Extraktion aufgereinigten Produkte aus acht zu **a** analogen PCR-Ansätzen (Tasche I). "L" steht für die "Ladder", den 1-kB-DNA-Standard.

PCRs mit GAPDH-Primern dienten zur qualitativen Untersuchung von RT-Produkten (vgl. 3.2.1), die im Anschluss absolut quantifiziert wurden (3.2.2.3). Die spezifische Bande für GAPDH ist in Abb. 17 dargestellt; eine dort zusätzlich sichtbare Bande ist sehr schwach und beeinträchtigt die qualitative Aussage nicht.

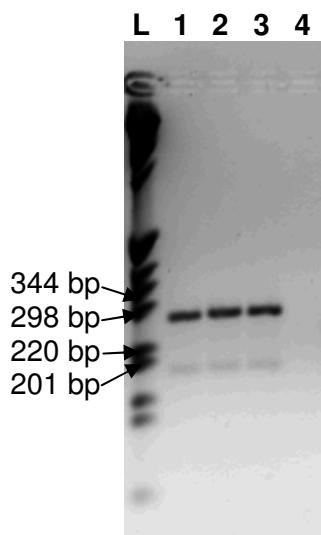


Abb. 17: Dargestellt ist ein 3 %iges Agarosegel mit den Produkten einer GAPDH-PCR (GAPDH-Primer; DNA-Transkripte monozytärer Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial) mit spezifischer Bande bei 270 bp (weitere, sehr schwache Bande bei ca. 187 bp) in den Taschen 1–3. Tasche 4 enthält die Negativkontrolle. "L" steht für die "Ladder", einen 1 kB DNA-Standard.

3.2.2.2 Erstellung von TF-Amplimer-Standardkurven

Von den in 3.2.2.1 gewonnenen PCR-Produkten (d. h. TF-Amplimer-Lösungen) wurden nach Einstellung der Stammlösung auf eine DNA-Konzentration von 1 ng/ μ l zehn 1:10-Serienverdünnungen mit nukleasefreiem Wasser erstellt. Die Spezifität der Amplifikation der TF-Amplimer-Standards am LightCycler wurde mittels Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese der LightCycler-Produkte (Abb. 18 a–c) geprüft.

Es ergab sich eine Standardkurve mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 1,00 (Abb. 18 a). Aus der Steigung ließ sich eine Amplifikations-Effizienz von 1,92 (für Amplifikation von TF) errechnen. Der Übersichtlichkeit wegen sind diese Ergebnisse zusammen mit der absoluten TF-cDNA-Quantifizierung in Abschnitt 3.2.2.3 dargestellt.

3.2.2.3 Absolute Quantifizierung der TF-cDNA

Die durch reverse Transkription aus Gesamt-RNA (Herkunft wie in 3.2.1 beschrieben) gewonnene DNA wurde zusammen mit dem auch für die Erstellung der Standardkurven verwendeten TF-Amplimer-Standard (3.2.2.2) in einer Real-Time-PCR am LightCycler mit den TF-Primern eingesetzt. Die entsprechenden Fluoreszenzkurven, Gelelektrophoresen (3 %iges Agarosegel) und Schmelzkurven der LightCycler-PCR-Produkte sind in Abb. 19 a–c zusammengestellt. Die Methodik zu dieser PCR ist in Abschnitt 2.2.8.6 erläutert, die Auswertung in 2.2.12.2. Die Kombination einer RT (mit Gesamt-RNA und Primer-Hexameren) mit einer SYBR-Green-PCR ist z. B. bei Liu et al. 2005 für Fc γ RIIA- bzw. Fc γ RIIB-mRNA beschrieben.

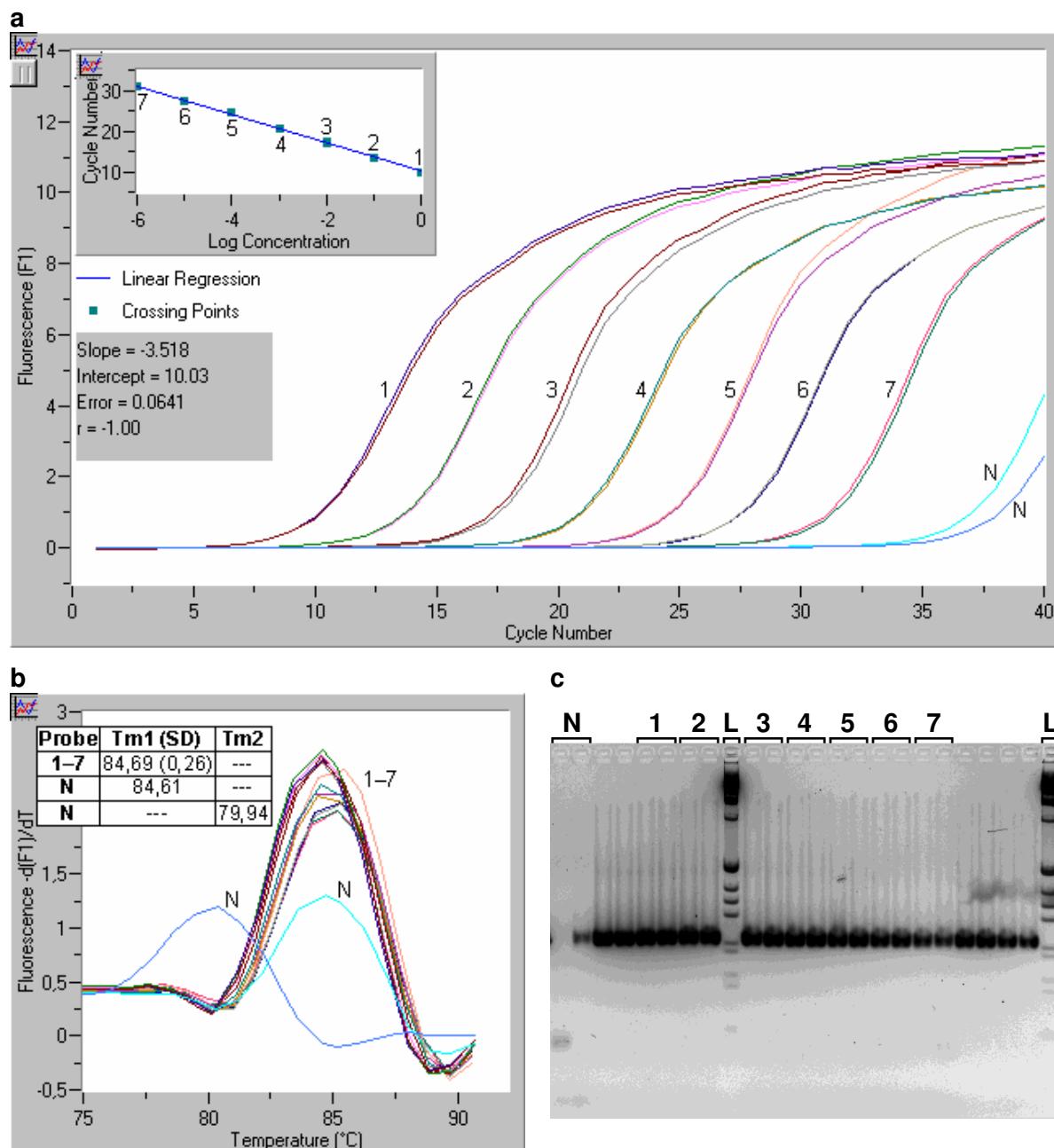


Abb. 18 a–c: Erstellung einer Standardkurve für TF-Amplimer-Standards mittels Real-Time-PCR (a). Die Standards sind von 1 bis 7 durchnummeriert, 1 entspricht einer Konzentration von 1 pg TF-Amplimer/ μl , 7 einer Konzentration von 10^{-6} pg TF-Amplimer/ μl (vgl. 3.2.2.2). Aus der Steigung ergibt sich eine PCR-Effizienz von 1,92. In b sind die Schmelzkurven („Tm“ = Schmelztemperatur, „SD“ = Standardabweichung), in c die Agarosegele der PCR-Produkte dargestellt. „N“ bezeichnet die Negativkontrolle mit nukleasefreiem Wasser.

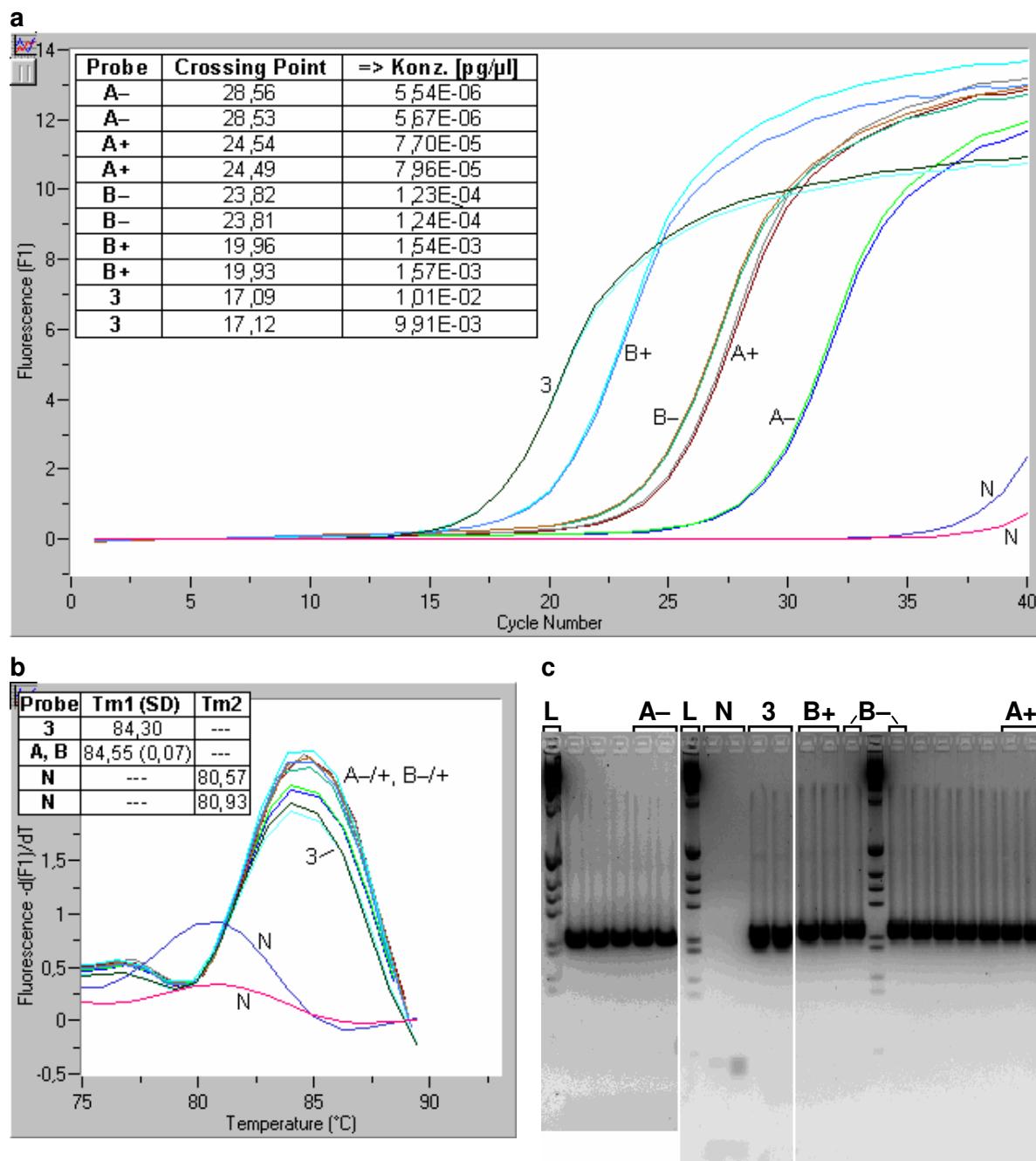


Abb. 19 a-c: Absolute Quantifizierung der TF-cDNA in den zwei Probenpaaren A und B (jeweils „–“ ohne Stimulus und „+“ mit LPS) durch Mitführung des Standards „3“ aus Abb. 18 und Anwendung der Steigung $-3,518$ der entsprechenden Standardkurve. Der Stimulus LPS bewirkt gegenüber der unstimulierten Inkubation eine Vervielfachung der TF-cDNA um den Faktor 13,9 in Experiment A und um den Faktor 12,5 in Experiment B (bei einer Effizienz von 1,92; vgl. Abb. 18). „N“ bezeichnet die Negativkontrolle mit nukleosafreiem Wasser. In **b** bezeichnet Tm die Schmelztemperatur und SD die Standardabweichung.

In Experiment A führte die LPS-Stimulation zu einem Anwachsen des in der LightCycler-PCR nachweisbaren TF-Amplimers um den Faktor 13,9 von $5,60 \cdot 10^{-6}$ auf $7,83 \cdot 10^{-5}$ pg/μl (Konzentrationen in der LightCycler-Kapillare). Mit der groben

Abschätzung aus Abschnitt 3.2.3.3 (RT-Effizienz ca. 60 %) und dem Gewicht eines TF-Amplimers ($1,201 \cdot 10^{-19}$ g bzw. $1,201 \cdot 10^{-7}$ g) ergibt sich ein Anstieg der TF-mRNA von 0,052 Mio. ($\pm 50\%$) auf 0,72 Mio. ($\pm 50\%$) Kopien/ μg Gesamt-RNA.

In Experiment B führte die LPS-Stimulation zu einem Anwachsen des in der LightCycler-PCR nachweisbaren TF-Amplimers um den Faktor 12,5 von $1,23 \cdot 10^{-4}$ auf $1,55 \cdot 10^{-3}$ pg/ μl (Konzentrationen in der LightCycler-Kapillare). Analog Experiment A ergibt sich hier ein Anstieg der TF-mRNA von 1,5 Mio. ($\pm 50\%$) auf 19 Mio. ($\pm 50\%$) Kopien/ μg Gesamt-RNA.

Bei den zusätzlichen, z. T. sehr schwachen Banden bei den Wasserkontrollen („N“ in Abb. 18 c und Abb. 19 c) handelt es sich um Primer-Dimere (Bande extrapoliert bei ca. 68 bp) und um Primerreste (Bande extrapoliert bei ca. 29 bp). Bei der spezifischen TF-Bande (Abb. 18 c unter „N“) bzw. TF-Schmelzkurve (Abb. 18 b, türkise Kurve) einer der zwei Wasserkontrollen handelt es sich am ehesten um eine Verschleppung von TF-cDNA. Diese Verschleppung ist jedoch so gering (Abb. 18 a), dass sie die Fluoreszenzkurve erst ab ca. Zyklus 32,5 und somit erst *nach* den Crossing Points der TF-Standards (bis max. ca. Zyklus 31,5) merklich beeinflusst.

In dem zweiten LightCycler-Experiment wurde auch cDNA aus Inkubationen mit immobilisierten Fc γ -Rezeptor-F(ab') $_2$ s eingesetzt. Die Ergebnisse sind zur besseren Übersicht zusammen mit anderen Ergebnissen zur selektiven Fc γ -Rezeptor-Stimulation in Abschnitt 3.3.2 aufgeführt.

3.2.3 Variabilitätsabschätzungen

Die Abschätzung der Variabilität der TF-mRNA-Expression und der Intra- und Inter-Assay-Variabilitäten erfolgte mittels Real-Time-PCRs ohne Mitführung spezieller Standards; es handelte sich somit um relative Quantifizierungen bzw. Fehlerbetrachtungen. Die ermittelten Variabilitäten wurden deshalb als Relativwerte bzw. Prozentwerte angegeben.

Bei der im Folgenden verwendeten einfachsten Art der relativen Quantifizierung – der so genannten ΔC_t -Methode – wird meist von einer Effizienz von 2 ausgegangen, was einem Anwachsen des Amplifikats bzw. der spezifischen SYBR-Green-I-Fluoreszenz auf das 2^n fache innerhalb von n Zyklen entspricht. Die in der Realität vorliegende Effizienz ist praktisch immer kleiner als 2, wodurch die Berechnung der

Fehler mit dieser Methode im Folgenden eher zu einer Fehlerüberschätzung führt – im Sinne einer pessimistischeren oder konservativeren Fehlerbetrachtung.

Andere, aufwändigeren Methoden zur genaueren Bestimmung der Effizienz in einer einzigen Kapillare ohne Erfordernis spezieller Standards wurden z. B. von Liu und Saint [Liu and Saint 2002] beschrieben. Sie erfordern jedoch meist die zusätzliche optische Beurteilung der Amplifikationskurve durch den Anwender.

3.2.3.1 Abschätzung des Messbereichs

Die Variabilität bzw. der Messbereich der mRNA-Expression wurde durch Messung an Inkubationen ohne Stimulation (Minimaleffekt) und Inkubationen mit dem hochpotenten Stimulus LPS (Maximaleffekt) abgeschätzt. Die 4 unabhängigen Experimente unterschieden sich hinsichtlich der Gewinnung der Monozyten, der Stimulation (Art der Zellkulturplatte, Stimulationsdauer) und des Zeitpunkts der RNA-Extraktion (Tab. 2).

Tab. 2

	Monozytenisolierung	Stimulation	RNA-Extraktion
Exp. 1	FICOLL, Adhärenz (2.2.4.4)	Falcon-6er-Zellkulturplatten; 2 h	sofort
Exp. 2	Vacutainers, CD14-Beads	Falcon-6er-Zellkulturplatten; 2 h	sofort
Exp. 3	Vacutainers, CD14-Beads	Falcon-6er-Zellkulturplatten; 8,5 h	nach Einfrieren
Exp. 4	FICOLL, Monocyte Isolation Kit	Costar-6er-Zellkulturplatten; 1 h	nach Einfrieren

Die Relationen von Maximal- zu Minimaleffekt für die 4 Experimente sind in Tab. 3 dargestellt. Da die cDNA-Präparationen der Experimente 1 und 2 gleichartig mit denen der Experimente 3 und 4 waren, wurde (zur Veranschaulichung) auch für diese Experimente die Vervielfachung mit der Effizienz 1,92 berechnet.

Tab. 3

	Crossing Point		Faktor	
	ohne Stim.	+ LPS	E = 2,00	E = 1,92
Exp. 1	28,30	19,22	541,2	373,6
Exp. 2	25,43	20,79	24,9	20,6
Exp. 3	28,55	24,52	16,3	13,9
Exp. 4	23,82	19,95	14,6	12,5

Das arithmetische Mittel der Faktoren betrug 105 bzw. 7,1 Zyklen, der maximale Faktor 374 bzw. 9,1 Zyklen. Der hohe Faktor in Experiment 1 könnte durch Sensibilisierung der Monozyten infolge der Adhärenzselektion bedingt sein.

3.2.3.2 Intra- und Inter-Assay-Variabilität der Real-Time-PCR

Die Doppelansätze der LightCycler-PCR stellen ein Mittel für eine systematische Beobachtung der *Intra-Assay-Variabilität* der LightCycler-PCR dar. Bei 19 Doppelansätzen (11 x DNA aus reverser Transkription, 8 x TF-Amplimer-Standard, zwei verschiedene LightCycler-Experimente) betrug die gemittelte MPMD 6,4 % (MPMD = maximale prozentuale Messwertdifferenz; vgl. 2.2.12.4). Der unvermeidliche Pipettierfehler trägt als am wenigsten automatisierter Schritt den größten Teil zu diesem Intra-Assay-Fehler bei.

Nach den Angaben im LightCycler-Manual darf die Steigung einer Standardkurve und damit die *Effizienz* einer PCR in eine andere gleichartige PCR übernommen werden; in dieser zweiten LightCycler-PCR reicht dann die Mitführung lediglich eines dieser Standards zur Ermittlung der Lage der Standardkurve – und damit zur absoluten Quantifizierung – aus. Mitbedingt durch dieses in der vorliegenden Arbeit angewendete Vorgehen hängt die *Inter-Assay-Variabilität* der Real-Time-PCR vor allem von Schwankungen der Effizienz der PCR (z. B. durch leicht unterschiedliche Konzentrationen/Aktivität der Komponenten im Master-Mix) und der Konzentration der DNA-Matrize (z. B. durch einen systematischen Pipettierfehler innerhalb eines Experiments oder Abbau der DNA zwischen den einzelnen Experimenten) ab.

Zur Abschätzung der *interexperimentellen Schwankungen der Effizienz* wurden 4 Proben (TF-Amplimer-Standards) zunächst in jeweils einem von 4 unabhängigen Experimenten (I bis IV) mit der ΔC_t -Methode relativ quantifiziert. Aus den Cros-

sing Points und der hypothetischen Effizienz von 2 ergaben sich damit relative Konzentrationen für die 4 Proben. Für die anderen 3 Experimente konnten aus diesen als „wahr“ angenommenen Konzentrations-Relationen und den Crossing Points des jeweiligen Experiments wieder Effizienzen berechnet werden. Die aus den berechneten Effizienzen über den maximalen Messbereich von ca. 10 Zyklen (3.2.3.1) resultierende MPMD beträgt bis zu 49,3 %. Für kleinere Effizienzen ergeben sich kleinere Obergrenzen für die MPMDs, wie z. B. 44,9 % für die hypothetische Effizienz von 1,9. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 und Tab. 5 dargestellt (hypothetische Effizienz fettgedruckt, resultierende Effizienzen kursiv gedruckt).

Tab. 4

Exp. I	Exp. II	Exp. III	Exp. IV	MPMD
2,00	→ 2,00	→ 2,02	→ 1,94	46,6 %
→ 2,00	2,00	→ 2,02	→ 1,94	46,6 %
→ 1,99	→ 1,98	2,00	→ 1,93	46,0 %
→ 2,07	→ 2,07	→ 2,08	2,00	49,3 %

Tab. 5

Exp. I	Exp. II	Exp. III	Exp. IV	MPMD
1,90	→ 1,90	→ 1,91	→ 1,85	42,5 %
→ 1,90	1,90	→ 1,91	→ 1,85	42,5 %
→ 1,89	→ 1,89	1,90	→ 1,83	42,0 %
→ 1,96	→ 1,96	→ 1,97	1,90	44,9 %

3.2.3.3 Intra- und Inter-Assay-Variabilität der reversen Transkription

Bei möglicherweise stark unterschiedlicher Vervielfältigung in verschiedenen RTs wurden am LightCycler später nur die Proben direkt verglichen, die zur gleichen Zeit unter identischen Inkubationsbedingungen revers transkribiert worden waren. Die *Inter-Assay-Variabilität* der RT wurde hier deshalb auch nicht experimentell untersucht. Um allerdings Rückschlüsse von der cDNA-Menge auf die mRNA-Menge ziehen zu können, wurde der Bereich für die RT-Effizienz abgeschätzt.

Die Effizienz einer RT kann grob zwischen 5 % und 90 % angesiedelt werden [Freeman et al. 1999], für den AMV-Kit wird für den Standard "Neo pa-RNA" bei 1000 ng

RNA im Ansatz eine Ausbeute bzw. Effizienz von $\geq 30\%$ (entsprechend 300 ng cDNA) angegeben. Wegen der hier geringeren eingesetzten Mengen von 150–200 ng Gesamt-RNA wurde von einer mindestens so großen Ausbeute ausgegangen (30 % bis 90 %); dies entspricht einer gegenüber dem Gesamt-RNA-Transkript im Mittel 2,22 ($\pm 50\%$) -fachen Gesamt-RNA-Menge (1,11fach bei 90 % Effizienz, 3,33fach bei 30 % Effizienz; vgl. 3.2.2.3). Die Mitführung spezieller RNA-Standards würde die genaue Bestimmung der RT-Effizienz erlauben und dadurch eine absolute Quantifizierung der TF-mRNA anstatt der TF-cDNA ermöglichen.

Da die Gesamt-RNA der auf Unterschiede im TF-mRNA-Gehalt zu vergleichenden Proben stets in einheitlicher Konzentration in die gleiche RT-Reaktion eingesetzt wurde, konnte für die Proben dieser RT-Reaktion auch eine weitgehend gleiche Transkriptions-Effizienz erwartet werden. Diese Erwartung wurde durch eine Untersuchung der *Intra-Assay-Variabilität* der RT geprüft. Zwei verschiedene RNA-Extrakte (LPS-stimulierte und unstimulierte Monozyten aus Experiment 1 in 3.2.3.1) wurden auf jeweils zwei Ansätze aufgeteilt (RT-Ansätze 1 und 2) und revers transkribiert. Die anschließende LightCycler-PCR lieferte mit der ΔC_t -Methode die in Tab. 6 angegebenen Crossing Points.

Tab. 6

	ohne Stim.	+ LPS
RT-Ansatz 1	28,27	19,31
RT-Ansatz 2	28,34	19,14
MPMD	5,0 %	12,1 %

Die aus der Tab. 6 resultierende gemittelte MPMD von 8,5 % setzt sich sowohl aus dem Intra-Assay-Fehler der RT als auch aus dem Intra-Assay-Fehler der LightCycler-PCR (6,4 % gemittelte MPMD; vgl. oben) zusammen. Nach den hier aufgeführten Daten liegt der Intra-Assay-Fehler der RT nicht wesentlich höher als der der LightCycler-PCR. Der Intra-Assay-Fehler der RT ist möglicherweise auch zu einem erheblichen Teil auf den Pipettierfehler zurückzuführen.

3.3 *Fc γ -Rezeptoren als Trigger prokoagulanter Aktivität am Monozyten*

Die drei Fc γ -Rezeptor-Klassen wurden durch selektives Crosslinking je einer Klasse auf eine unterschiedliche Potenz für die Induktion prokoagulanter Aktivität am Monozyten untersucht. Als direktes Maß prokoagulanter Aktivität diente dabei die Fähigkeit aktiverter Monozyten, die Gerinnungszeit von Blutplasma zu beschleunigen. Die Oberflächenexpression von TF-Protein, die gesamte zelluläre Expression von TF-Protein und die TF-mRNA-Expression dienten als weitere Anhaltspunkte für die prokoagulante Aktivität der Monozyten. Zusätzlich wurde die relative Stärke der zellulären Sofortreaktion über den Calcium-Influx abgeschätzt. Somit konnten auf verschiedenen Ebenen der Aktivierungskaskade Informationen über den prokoagulanten Effekt der Fc γ -Rezeptor-Stimulation gewonnen werden.

3.3.1 **Initiale Zellaktivierung (Calcium-Influx)**

Für die Untersuchung der initialen Zellaktivierung mittels Messung des Calcium-Influx wurden 5 unabhängige Experimente durchgeführt. Negativisierte Monozyten wurden – wie im Methodikteil beschrieben (2.2.5.3) – zunächst mit Fluo-3-AM, dann mit einem der drei Anti-Fc γ -Rezeptor-F(ab')₂s bzw. ohne Zusatz vorinkubiert, bis schließlich das Crosslinking mit dem Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab')₂ unter durchflusszytometrischer Kontrolle erfolgte. Ein analoges Crosslinking mit primären Anti-Fc γ -Rezeptor-F(ab')₂s der Maus und sekundären Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab')₂s der Ziege wurde z. B. bei Kocher et al. 1997 mit neutrophilen Granulozyten durchgeführt.

Unterschiedliche Voraktivierungen der einzelnen Inkubationen vor Zugabe des Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab')₂ reduzierten die Trennschärfe zwischen den verschiedenen Inkubationsarten, was durch eine Intra-Assay-Korrektur (s. 2.2.12.1) z. T. kompensiert werden konnte. Die Intra-Assay-Korrektur wurde dadurch erreicht, dass der Stimulationseffekt nicht durch die *absolute* mittlere Fluoreszenzintensität von Fluo 3-AM beschrieben wurde, sondern durch den mittleren Fluoreszenzintensitätszuwachs (Δ MFI). Der Δ MFI einer Probe in einem *bestimmten Zeitintervall* ist die Differenz aus der MFI in diesem Intervall und der MFI des ca. 45 s langen Zeitintervalls vor Zugabe des Stimulus (basale MFI), wobei „0 s“ den Zeitpunkt der Stimulation bezeichnet. Die Zunahme der Trennschärfe zwischen zwei Inkubationsarten durch die-

se Intra-Assay-Korrektur kann an der Verkleinerung des Quotienten aus der Standardabweichung der Differenzen und dem Mittelwert der Differenzen (aus den 5 Experimenten) beobachtet werden (vgl. 2.2.12.5). So lag dieser Quotient für den ΔMFI gegenüber der MFI nur für ein Vergleichspaar ($\text{Anti-CD16-F(ab')}_2$ - $\text{Anti-CD32-F(ab')}_2$) höher (4,81 vs. 2,97), für ein weiteres Vergleichspaar etwa gleich hoch (0,52 vs. 0,51), aber für die restlichen 8 Paare jeweils deutlich niedriger (Median: 0,60 vs. 2,15) als der für die MFI, was die höhere Trennschärfe belegt.

Trotz der z. T. deutlich verschiedenen starken Voraktivierungen ergab sich kein Anhalt für eine Abhängigkeit der Voraktivierung von der Art der Vorinkubation mit/ohne Anti-Fc γ -Rezeptor-F(ab') $_2$ (Abb. 20).

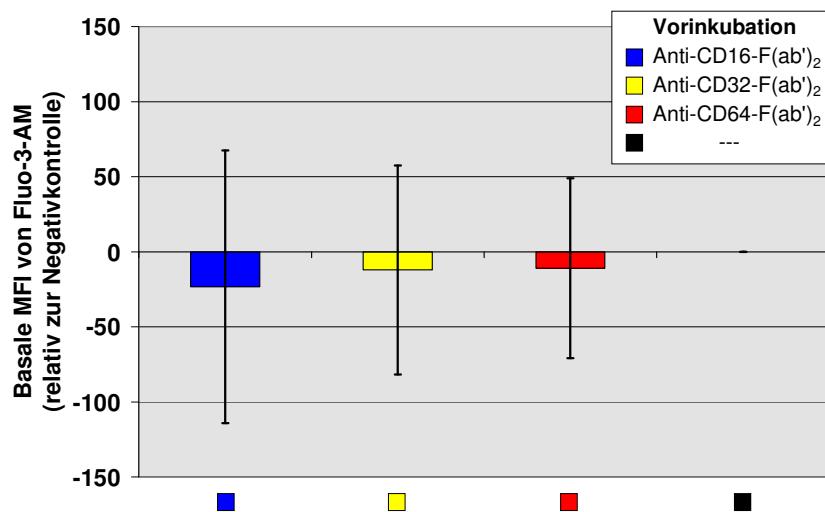
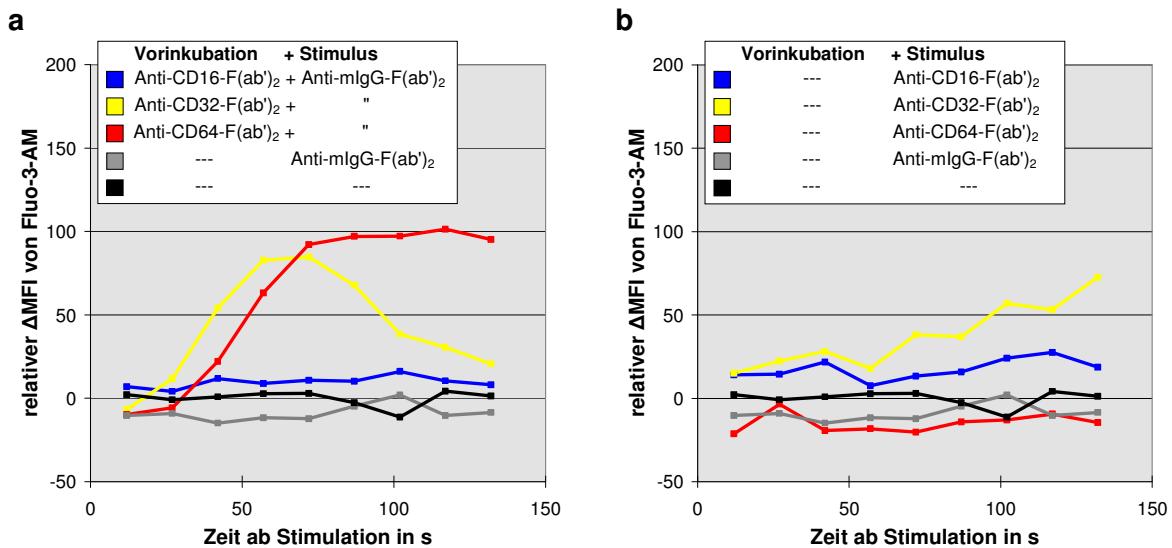


Abb. 20: Die basale MFI für das calciumsensitive Fluo-3-AM zeigt zwischen den mit verschiedenen F(ab') $_2$ s vorinkubierten Proben und gegenüber der ohne Zusatz vorinkubierten Negativkontrolle im gepaartem t-Test keinen signifikanten Unterschied ($n = 5$). Es sind Relativwerte dargestellt (vgl. 2.2.12.5), der Mittelwert der (absoluten) basalen MFI der Negativkontrolle lag bei 312.

Die exemplarische Applikation der Anti-Fc γ -Rezeptor-F(ab') $_2$ s zu Proben ohne F(ab') $_2$ -Vorinkubation zeigte im Gegensatz zur Applikation von Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab') $_2$ zu den mit Anti-Fc γ -Rezeptor-F(ab') $_2$ s vorinkubierten Proben einen schwächeren bzw. zögerlicheren Calcium-Influx (Abb. 21 a, b). Insbesondere fehlte dort (Abb. 21 b) auch vollständig der in den 5 Experimenten konsistent deutliche Anstieg des Calcium-Influx bei Stimulation des Fc γ -RI (vgl. Abb. 22 a, b).



Die intra-assay-korrigierten Daten der 5 unabhängigen Experimente sind in Abb. 22 a, b und Abb. 23 a, b dargestellt. Bei den Zeitverläufen in Abb. 22 a und Abb. 23 a wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit signifikante Unterschiede nicht speziell gekennzeichnet.

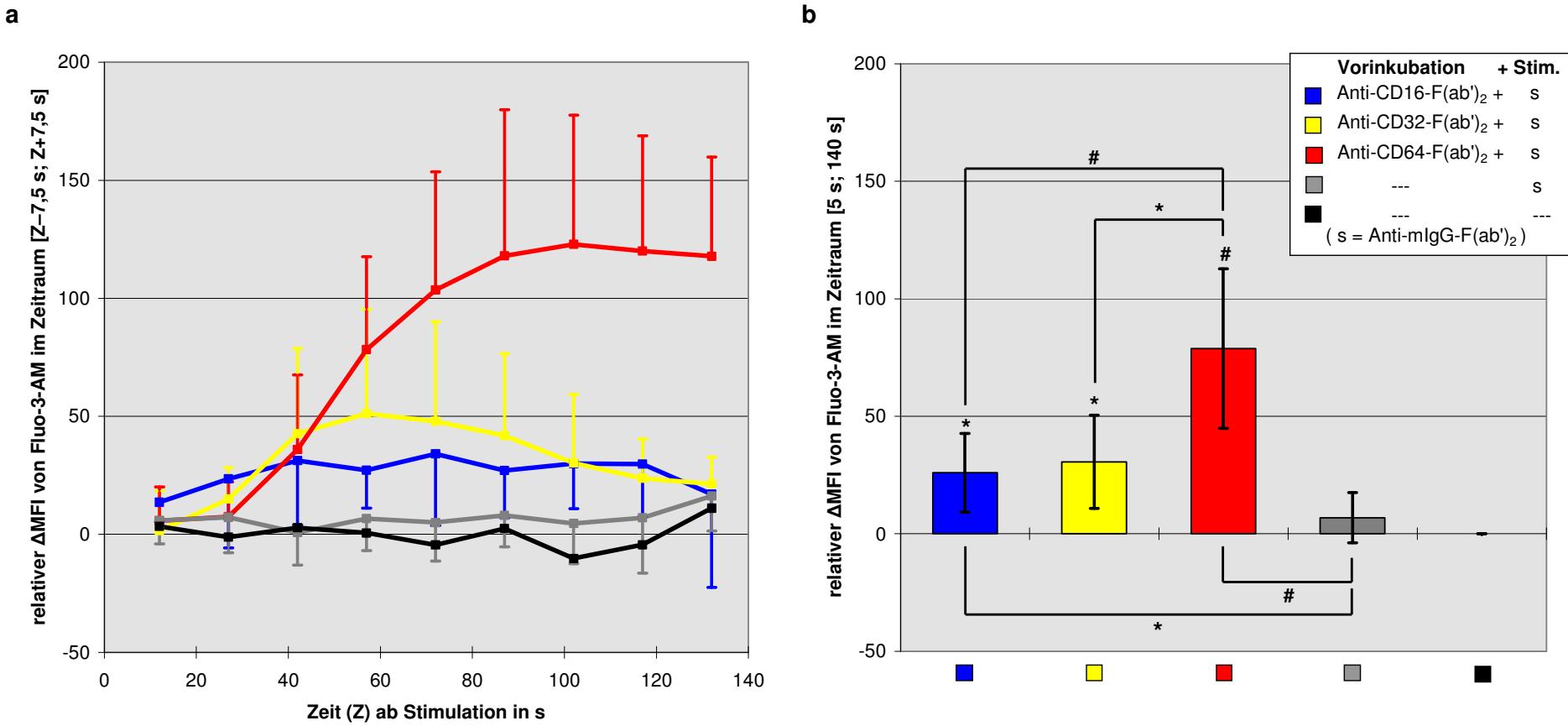


Abb. 22 a, b: In **a** ist der zeitliche Verlauf des relativen ΔMFI für Fluo-3-AM zusammengefasst, als Mittelwert aus 5 unabhängigen Experimenten. **b** zeigt die aus den 5 Experimenten gemittelten relativen Fluoreszenzzuwächse im Zeitintervall 5–140 s für die jeweilige Inkubationsart. Wie in Kapitel 2.2.12.5 beschrieben sind in **a** und **b** die ΔMFI -Werte *relativ zur Negativkontrolle* dargestellt, der Mittelwert des absoluten $\Delta\text{MFI}[5 \text{ s}; 140 \text{ s}]$ für die Negativkontrolle beträgt 21,7. Die statistische Analyse erfolgte mit gepaartem t-Test.

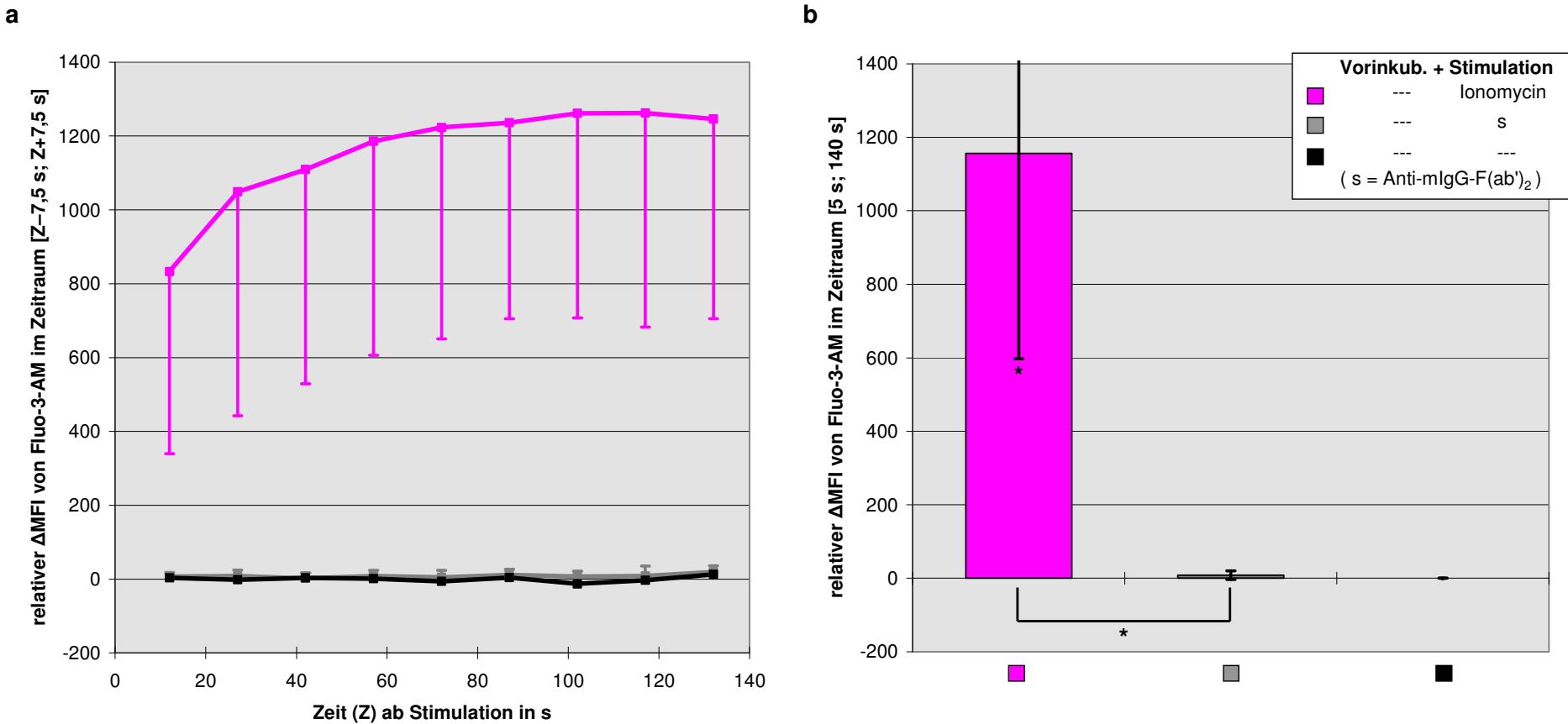


Abb. 23 a, b: **a** stellt analog Abb. 22 a den zeitlichen Verlauf des relativen ΔMFI für die Proben ohne Zusatz (Negativkontrolle), mit Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab')₂ alleinig und mit Ionomycin (Endkonzentration 0,4 µg/ml) für 4 unabhängige Experimente dar. **b** stellt analog Abb. 22 b für diese 4 Experimente die Mittelwerte des relativen $\Delta MFI[5\text{ s}; 140\text{ s}]$ dar. Eines der 5 Experimente (vgl. Abb. 22) wurde wegen wesentlich geringerer Ionomycin-Konzentration hier nicht aufgeführt. Bei Hinzunahme der Daten dieses Experiments bleiben die dargestellten Signifikanzen aber erhalten. Wie in Abb. 22 sind Relativwerte für den ΔMFI abgebildet, der Mittelwert des absoluten $\Delta MFI[5\text{ s}; 140\text{ s}]$ für die Negativkontrolle beträgt 23,8. Die statistische Analyse erfolgte mit gepaartem t-Test.

3.3.2 TF-mRNA-Expression

Mittels CD14-MicroBeads isolierte Monozyten wurden in beschichteten Kulturschalen inkubiert (Beschichtung mit F(ab')₂-Fragmenten gegen Fc γ RI, Fc γ RII bzw. Fc γ RIII; 2.2.5.2). Als Kontrollen dienten Inkubationen in BSA- bzw. IVIg-beschichteten Schalen sowie Inkubationen in unbeschichteten Schalen mit Zusatz von LPS bzw. ohne Zusatz. Die Werte für die Ansätze mit LPS und ohne Zusatz wurden bereits in 3.2.2.3 (als Experiment A) dargestellt. Für die hier aufgeführten Inkubationen mit immobilisierten F(ab')₂s wurde bis auf das nicht durchgeführte Crosslinking genauso verfahren, wie in 3.2.1 (Experiment A) für die Inkubation mit LPS und die Negativkontrolle beschrieben. Die gewonnene cDNA wurde schließlich unter Mitführung der TF-Amplimer-Standards am LightCycler bezüglich des Gehalts an TF-cDNA absolut quantifiziert (Abb. 24).

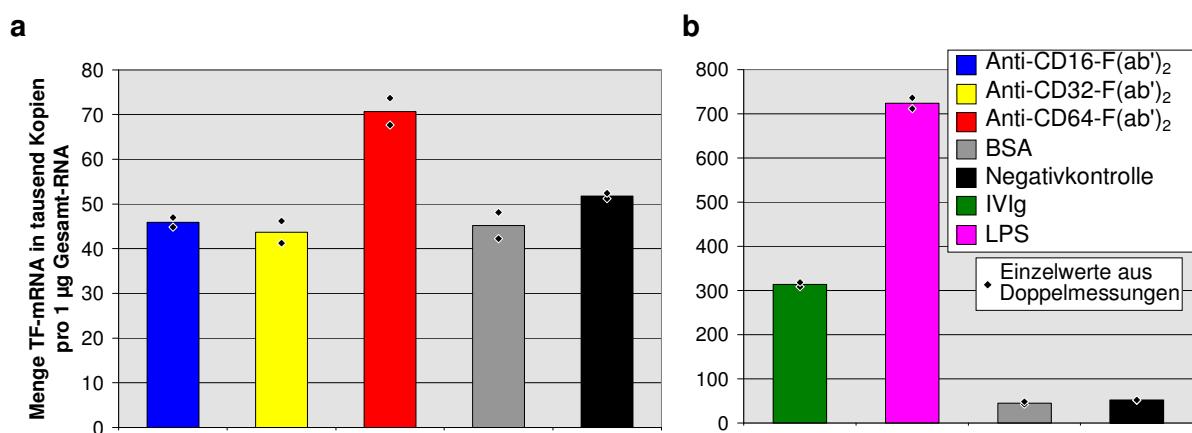


Abb. 24 a, b: Basierend auf der in 3.2.3.3 beschriebenen Abschätzung sind in **a** und **b** die absoluten Kopienzahlen der TF-mRNA in tausend Kopien pro 1 µg in die RT eingesetzter Gesamt-RNA für die Inkubationen mit immobilisierten Anti-Fc γ R-F(ab')₂s (**a**) und den Kontrollinkubationen ohne Beschichtung, mit BSA, IVIg und LPS (**b**) dargestellt. Die Punkte geben die Einzelwerte aus Doppelmessungen in der Real-Time-PCR an.

Die Rangfolge der TF-mRNA-Expression unter selektivem Fc γ -Rezeptor-Crosslinking (Anti-CD64-F(ab')₂ > Anti-CD32-F(ab')₂ >/≈ Anti-CD16-F(ab')₂) passt mit den anderen Daten aus 3.3 sehr gut zusammen. Die IVIg-Inkubation hebt sich ebenfalls deutlich ab, ähnlich wie in 3.3.3. Eine zweite unabhängige Messung dieser 7 Proben (ohne mitgeführte Standards) ergab eine identische Rangfolge (Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient 1,000), und eine sehr gute lineare Korrelation der Crossing Points ($R^2 = 0,9993$). Das exemplarische Experiment erlaubt jedoch keine Aussagen zur Signifikanz von Unterschieden der einzelnen Inkubationen.

3.3.3 Gesamte TF-Proteinexpression

In zwei 3er-Serien von Experimenten wurde durch selektives Crosslinking der drei Fc γ -Rezeptor-Klassen deren Potenz für die Induktion von TF-Protein beim Monozyten untersucht und verglichen. Dazu erfolgte die Inkubation der Monozyten in Kulturschalen, die mit F(ab') $_2$ -Fragmenten gegen Fc γ RI, Fc γ RII bzw. Fc γ RIII (10 mg/ml) vorbeschichtet waren (2.2.5.2). Als Kontrollen dienten Inkubationen in BSA- bzw. IVIg-beschichteten Schalen (auch jeweils 10 mg/ml) sowie Inkubationen in unbeschichteten Schalen mit Zusatz von LPS (150 ng/ml) bzw. ohne Zusatz. Die TF-Proteinexpression (TFp) wurde mit einem TF-ELISA gemessen und auf Gesamtprotein normiert (2.2.9, 2.2.9.1, 2.2.9.2).

In der ersten Serie wurden Monozyten eingesetzt, die mit CD14-Beads isoliert worden waren (2.2.4.2), was eine hohe Reinheit gewährleisten sollte. In der zweiten Serie wurden Monozyten verwendet, die mit dem Monocyte Isolation Kit isoliert worden waren (2.2.4.3); so sollte eine mögliche Voraktivierung durch die Bindung der CD14-Beads umgangen werden. Die Inkubation der Monozyten erfolgte für Zeiträume von 0 h, 2,5 h, 4 h, 5,75 h und 12,5 h in der ersten Serie und für Zeiträume von 0 h, 6 h, 12 h und 20 h in der zweiten Serie. Die „krummen“ Werte in der ersten Serie sind Mittelwerte aus verschieden langen Inkubationszeiten (\pm 1/2 h) bei verschiedenen Experimenten.

Die TFp in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abb. 25 a und Abb. 26 a (erste Serie) sowie in Abb. 27 a und Abb. 28 a (zweite Serie) dargestellt. Für die Zusammenfassung der für unterschiedliche Zeitpunkte vorliegenden TFp-Werte einer Inkubationsart wurden diese im Zeitintervall 0–12,5 h (erste Serie) bzw. 0–12 h (zweite Serie) zeitlich gemittelt; dies ist in Abb. 25 b und Abb. 26 b bzw. Abb. 27 b und Abb. 28 b dargestellt. Bei den Zeitverläufen in Abb. 25 a, Abb. 26 a, Abb. 27 a und Abb. 28 a wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit signifikante Unterschiede nicht speziell gekennzeichnet.

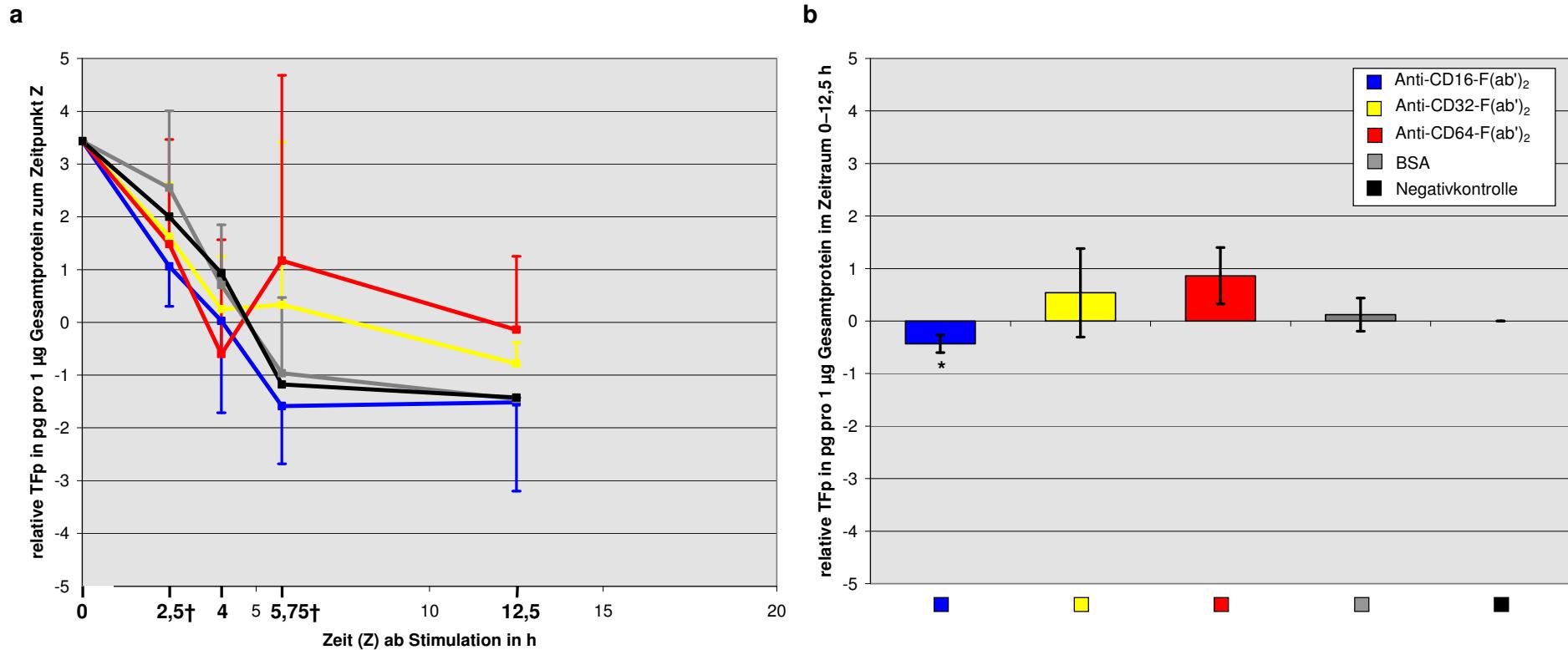


Abb. 25 a, b: In a ist der zeitliche Verlauf der relativen TFP für die erste Experimentenserie dargestellt. Ein Punkt im Diagramm repräsentiert zum Zeitpunkt Z den Mittelwert der TFP aus 3 unabhängigen Experimenten relativ zur Negativkontrolle (vgl. 2.2.12.5). Je ein nicht vorliegender Wert bei 2,5 h und 5,75 h wurde durch lineare Interpolation aus den umgebenden Werten genähert († in a). Die zeitlichen Mittel der relativen TFP im Zeitraum 0–12,5 h sind in b dargestellt. Der einzige signifikante Unterschied zeigt sich in b für das Anti-CD16-F(ab')₂ gegenüber der Negativkontrolle ($p = 0,046$ im gepaarten t-Test). Der Mittelwert der absoluten TFP für die Negativkontrolle beträgt 6,3 pg/µg.

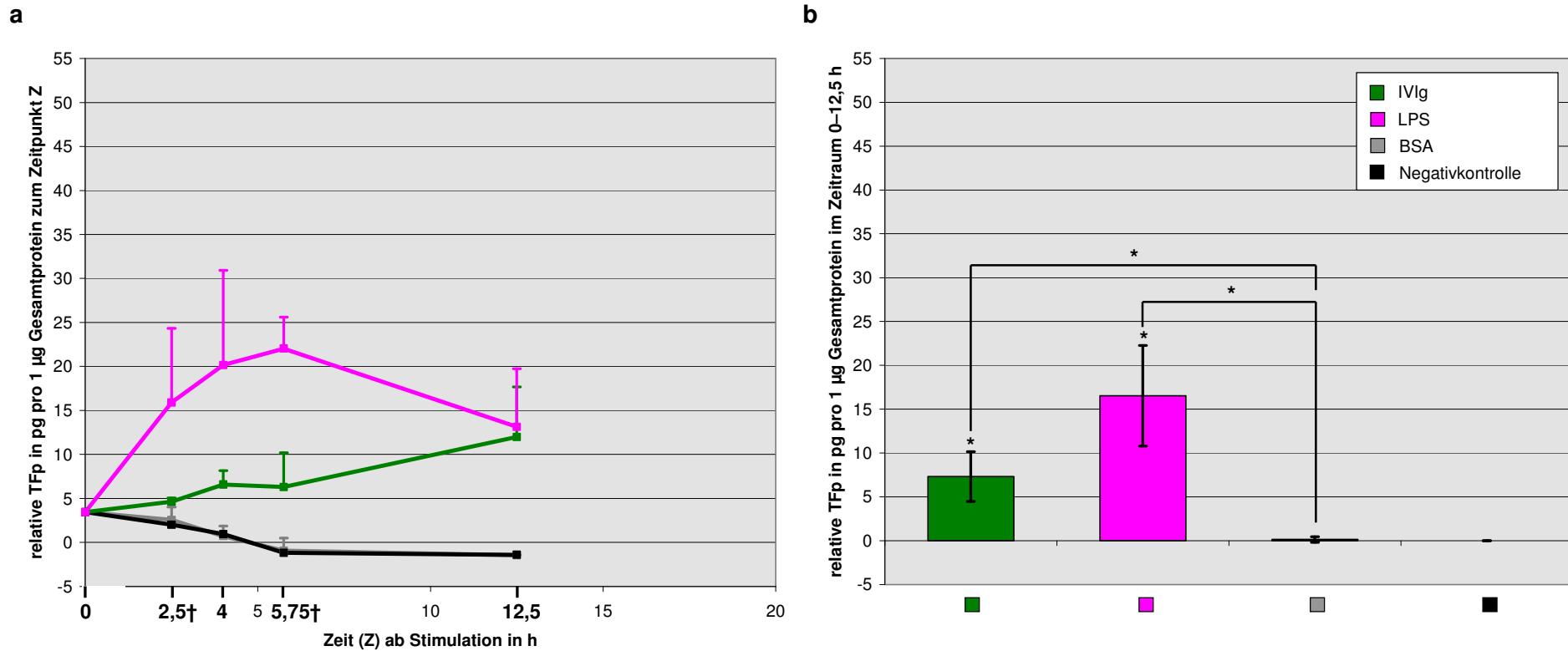


Abb. 26 a, b: a stellt analog Abb. 25 a (dort auch Erläuterung zu †) den zeitlichen Verlauf der relativen TFP der ersten Experimentenserie dar, hier jedoch für die Inkubationen mit LPS bzw. IVIg im Vergleich mit der Negativkontrolle und BSA. Wegen hoher TFP-Werte erfolgte eine separate Darstellung gegenüber Abb. 25. b stellt analog Abb. 25 b die Mittelwerte der (auch im Zeitraum 0–12,5 h) zeitlich gemittelten relativen TFP dar. Es bestehen im gepaarten t-Test signifikante Unterschiede für LPS und IVIg gegenüber BSA und der Negativkontrolle (in b eingetragen) sowie gegenüber Anti-CD16-F(ab')₂ und Anti-CD64-F(ab')₂ (nicht dargestellt). Der Mittelwert der absoluten TFP für die Negativkontrolle beträgt 6,3 pg/µg.

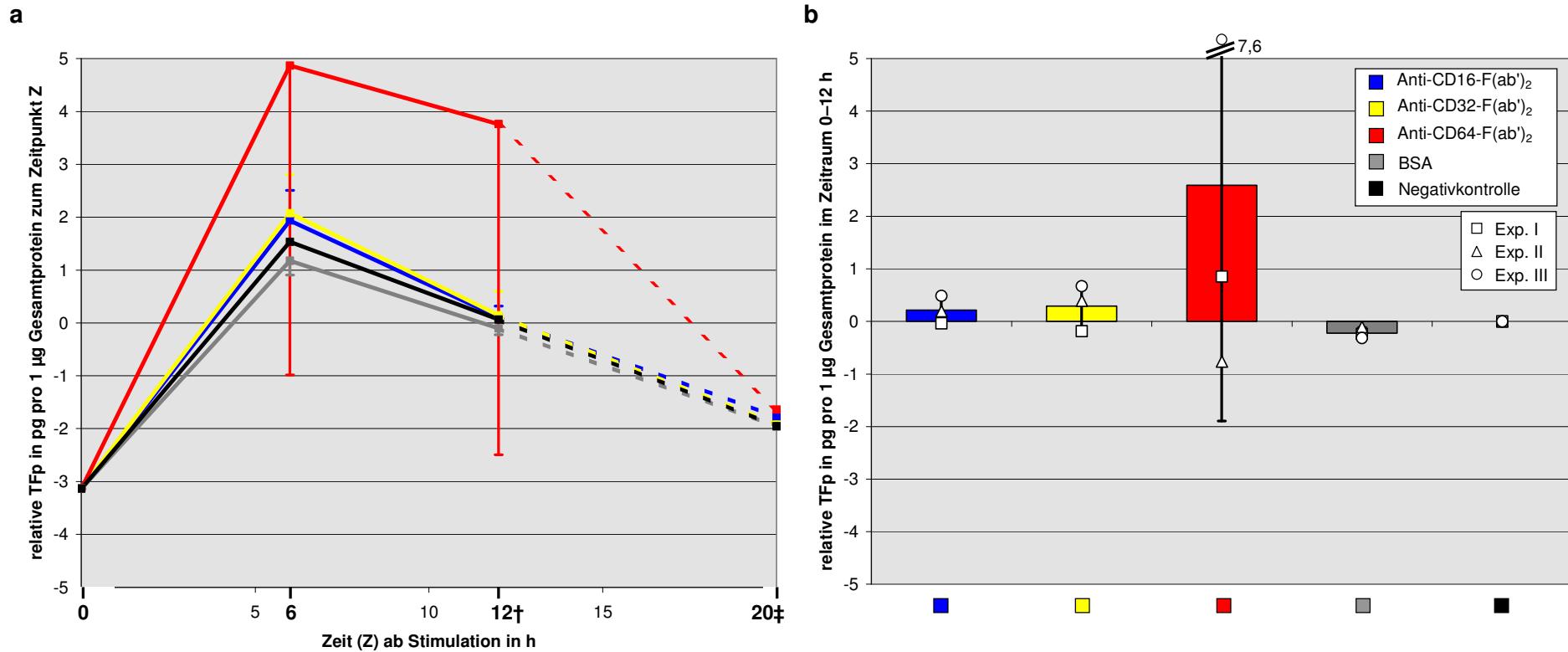


Abb. 27 a, b: a stellt analog Abb. 25 a die Daten der zweiten Experimentenserie dar († lineare Interpolation bei 12 h analog Abb. 25 a; ‡ bei 20 h lagen nur 2 Werte vor, deswegen ist die Verlaufslinie dorthin gestrichelt). In b wurde wie in Abb. 25 b zeitlich gemittelt, allerdings über den Zeitraum 0–12 h. In b sind zusätzlich die Einzelwerte mit dargestellt, die im Experiment II für die Inkubation mit Anti-CD64-F(ab')₂ einen Ausreißer darstellen; das erklärt die hohe Standardabweichung (vgl. Abb. 28 b). In b bestehen im gepaarten t-Test keine signifikanten Unterschiede. Der Mittelwert der absoluten TFP für die Negativkontrolle beträgt 3,3 pg/µg.

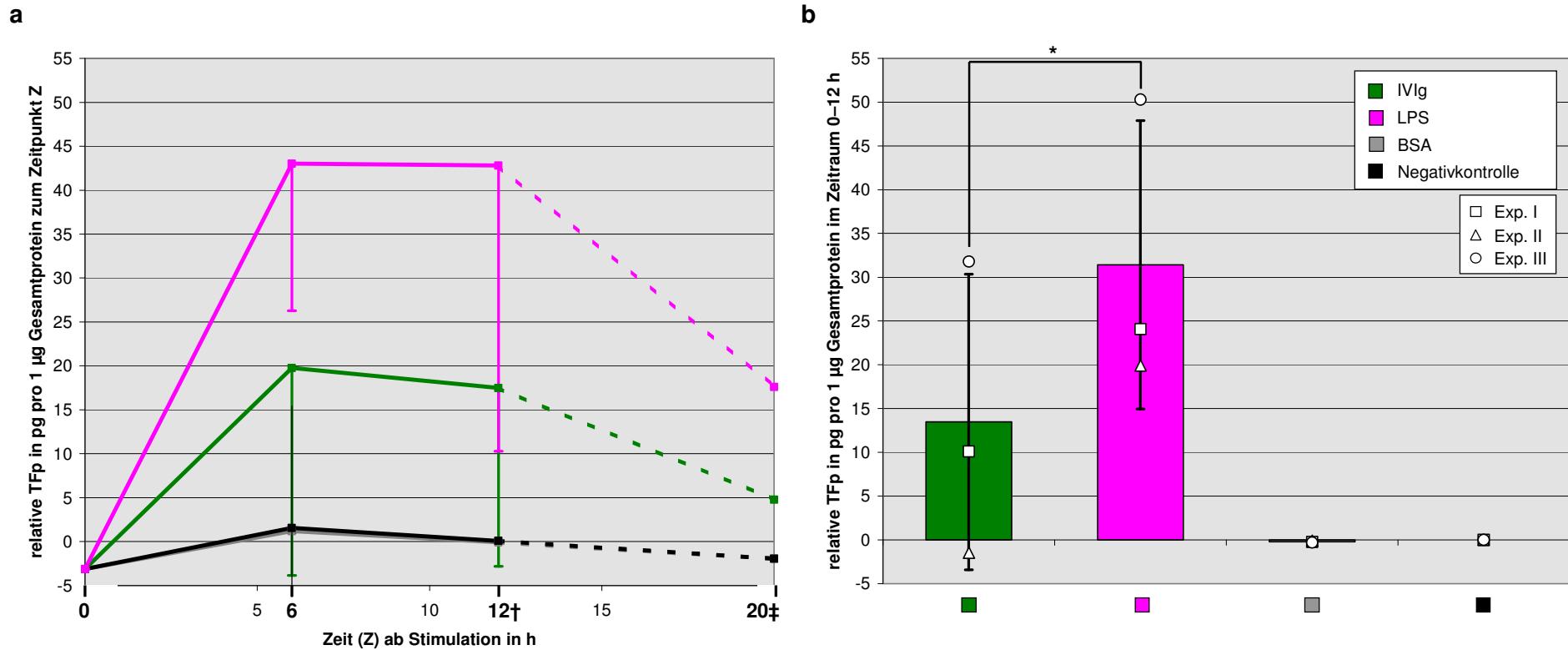


Abb. 28 a, b: a stellt analog Abb. 27 a (dort auch Erläuterung zu † und ‡) die Daten der zweiten Experimentenserie dar, für LPS und IVIg im Vergleich mit der Negativkontrolle und BSA. In b wurde wie in Abb. 26 b zeitlich gemittelt, allerdings über den Zeitraum 0–12 h. In b sind (wie in Abb. 27 b) zusätzlich die Einzelwerte mit dargestellt. Die hohe Standardabweichung in der IVIg-Inkubation wird wieder durch Experiment II verursacht (wie in Abb. 27 b bei der Inkubation mit Anti-CD64-F(ab')₂). In b ergibt sich nur für den Unterschied zwischen LPS und IVIg Signifikanz ($p = 0,014$ im gepaarten t-Test). Der Mittelwert der absoluten TFP für die Negativkontrolle beträgt 3,3 pg/µg.

Das Experiment II der zweiten Serie stellt eine Ausnahme dar, da sich alleinig dort für die IVIg-Kontrolle und die Anti-CD64-F(ab')₂-Inkubation gegenüber der Negativ- und der BSA-Kontrolle ein Abfall der TFp zeigte; dies sowohl im zeitlichen Mittel (Abb. 27 b und Abb. 28 b), als auch für die Einzelwerte bei 6 h und 12 h.

Eine gemeinsame Betrachtung speziell der Fc γ R-Stimulationen der 6 Experimente beider Serien (im Zeitraum 0–12 h) hilft, konsistente Effekte besser herauszustellen. So wird dabei vor allem die Haupttendenz der beiden Experimentenserien – die *herausragende Wirkung der Fc γ RI-Stimulation* auf die TFp – veranschaulicht, und es zeigt sich eine Abstufung des TFp-Effekts für die drei Fc γ -Rezeptor-Klassen mit Fc γ RI > Fc γ RII > Fc γ RIII (Abb. 29 a). Würde Experiment II dort nicht mit betrachtet (vgl. o.), so ergäbe sich für den TFp-Effekt der Fc γ RI-Stimulation gegenüber dem der Fc γ RIII-Stimulation, der Negativ- und der BSA-Kontrolle im Vorzeichentest (der t-Test war hier wegen hoher Intra-Assay-Variabilität weniger trennscharf) grenzwertige zweiseitige Signifikanz ($p = 0,063$) sowie erfüllte einseitige Signifikanz ($p = 0,031$). Wird in einer anderen Zusammenfassung der 6 Experimente (Abb. 29 b) die durch

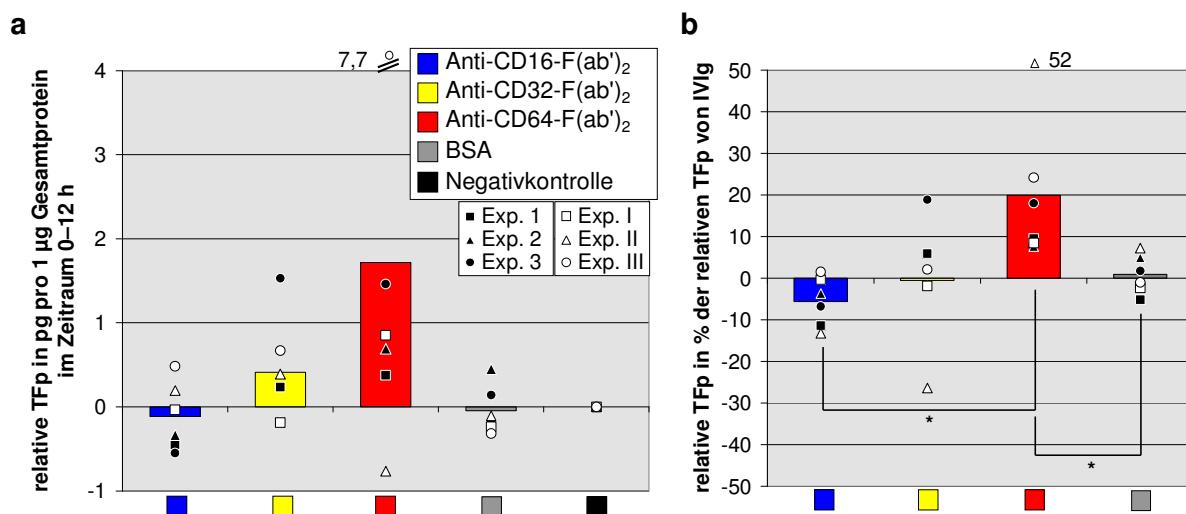


Abb. 29 a, b: In a ist die relative TFp im Zeitraum 0–12 h für die insgesamt 6 unabhängigen Experimente beider Serien gemittelt dargestellt (Synthese von Abb. 25 b und Abb. 27 b). b zeigt für die gleichen Inkubationen die relative TFp in Prozent der durch IVIg erreichten relativen TFp (prozentualer IVIg-Effekt). Der Mittelwert der absoluten TFp für die Negativkontrolle beträgt 4,8 pg/µg, der Mittelwert für die relative TFp von IVIg 10,3 pg/µg.

IVIg bewirkte relative TFp als Vergleichsbasis für die relativen TFps der Fc γ R-Stimulationen herangezogen (Betrachtung des *prozentualen IVIg-Effekts*), so ergeben sich einzig für die Fc γ RI-Stimulation konsistent von der BSA-Kontrolle und von

der Fc γ RIII-Stimulation abgrenzbare Effekte; diese erreichen auch Signifikanzniveau (jeweils $p = 0,031$ im zweiseitigen Vorzeichentest). Die Wirkung der Fc γ RIII-Stimulation auf die TFp zeigt sich dabei in 5 der 6 Experimente überzufällig häufig (ohne Signifikanz) der von IVIg entgegengerichtet.

Die Absolutwerte der TFp für die Inkubationen ohne Stimulus und mit LPS sind in Abb. 30 zusammengefasst. Es zeigen sich Anhalte für eine zu Beginn der Hauptinkubation (noch) höhere Voraktivierung durch die Positivisolierung mit den CD14-Beads – jedoch ohne Signifikanz im t-Test für unverbundene Stichproben.

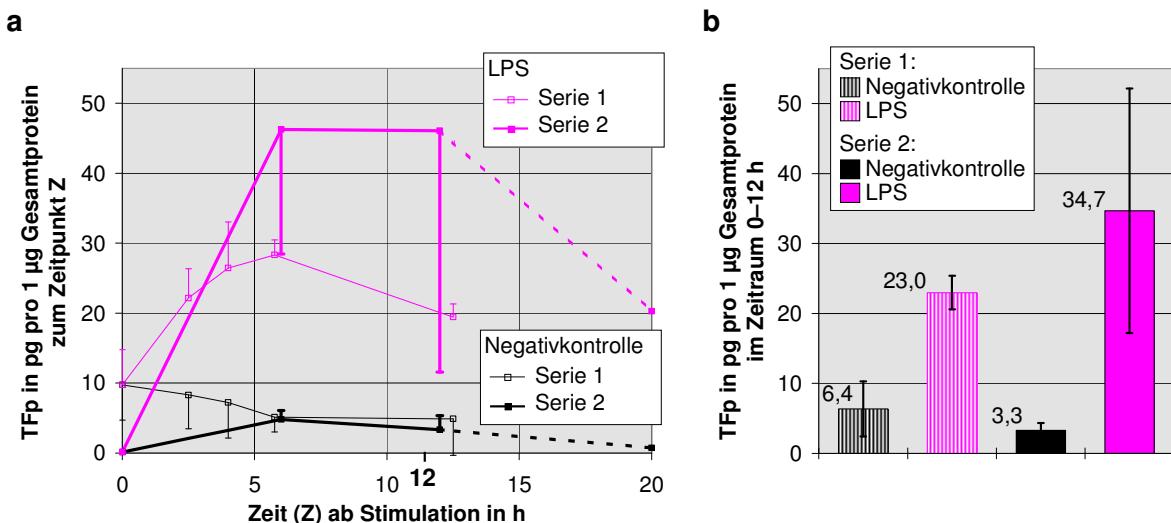


Abb. 30 a, b: Vergleichende Darstellung der unstimulierten Inkubationen der beiden Serien bzw. der LPS-stimulierten Inkubationen der beiden Serien (Serie 1: Positivisolierung mit CD14-Beads; Serie 2: Negativisolierung mit Monocyte Isolation Kit). Dazu sind Daten aus Abb. 26 a, b und aus Abb. 28 a, b kombiniert, deren Mittelwerte und Standardabweichungen hier aber aus den *Absolut*werten gebildet wurden (vgl. 2.2.12.5), aufgrund der Unabhängigkeit der verglichenen Inkubationen. Die zeitliche Mittelung erfolgte hier für beide Serien für den Zeitraum 0–12 h (deswegen hier Mittelwert 6,4 pg/µg für Serie 1, anstatt 6,3 pg/µg wie in Abb. 25 und Abb. 26).

3.3.4 TF-Oberflächenexpression

Die TF-MFI, die als Messparameter für die TF-Oberflächenexpression diente, wurde für Inkubationen von Monozyten mit *immobilisierten* Anti-Fc γ R-F(ab')₂s exemplarisch im Rahmen zweier der in 3.3.3 aufgeführten Experimente mitbestimmt (im Folgenden dargestellt) und außerdem für Inkubationen mit *gelösten* Anti-Fc γ R-F(ab')₂s und Crosslinking mit Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab')₂s im Rahmen fünf weiterer Experimente (in 3.3.5 zusammen mit der rPCA aufgeführt).

Bei 23 verschiedenen Inkubationen aus der zweiten Experimentenserie (3.3.3) ergab sich *insgesamt* eine relativ gute Korrelation der TF-MFI mit der TFp ($R^2 = 0,90$ über eine lineare Näherungskurve im Lin-log-Diagramm). *Im Einzelnen* konnte der in 3.3.3 für die TFp – unter den Anti-Fc γ R-F(ab') $_2$ -Inkubationen – bei Anti-CD64-F(ab') $_2$ stärkste Effekt analog bei der TF-MFI beobachtet werden (Experiment III, Abb. 31); bei Experiment II wurde der geringere Effekt von Anti-CD64-F(ab') $_2$ und IVIg gegenüber BSA und Negativkontrolle auch für die TF-MFI gefunden (nicht dargestellt).

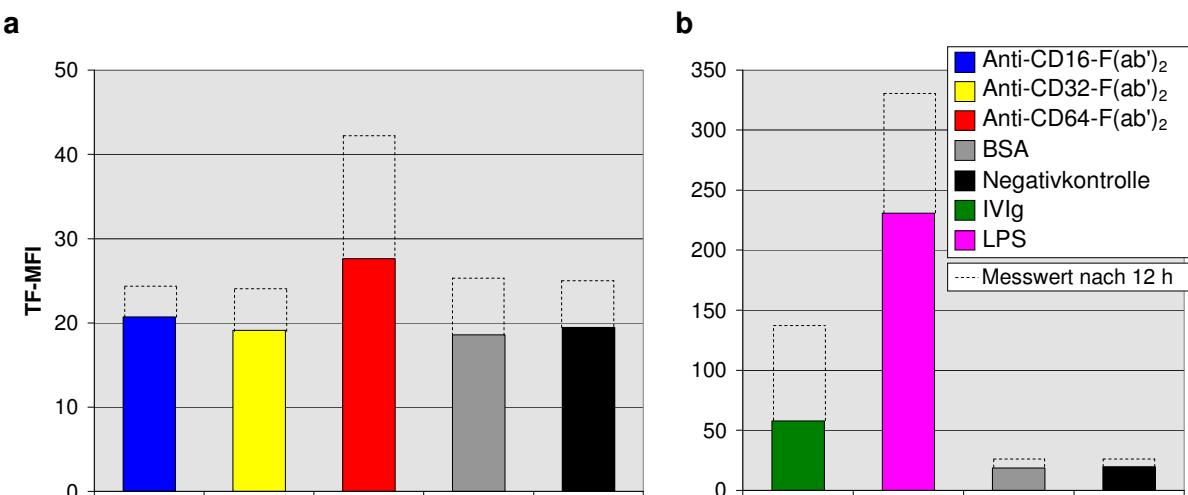


Abb. 31 a, b: TF-MFI verschieden inkubierter Monozyten nach 6-stündiger (farbige Balken) und 12-stündiger (gestrichelte Verlängerungen der Balken) Inkubation. Exemplarische Daten aus einem Experiment.

Bei den *löslichen* Anti-Fc γ R-F(ab') $_2$ s (mit Crosslinking mit Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab') $_2$ s) lässt sich die ansonsten in 3.3 sichtbare Abstufung der Effekte, nämlich Anti-CD64-F(ab') $_2$ > Anti-CD32-F(ab') $_2$ >/≈ Anti-CD16-F(ab') $_2$, nicht reproduzieren (s. 3.3.5), obwohl in den gleichen Experimenten dieser Unterschied beim Calcium-Influx (3.3.1) schon vorlag.

3.3.5 Prokoagulante Aktivität

In 5 unabhängigen Experimenten (s. 3.1.3.3) erfolgte die 6-stündige Inkubation von zuvor mit Anti-CD16-, Anti-CD32-, Anti-CD64-F(ab') $_2$ bzw. ohne Zusatz *vorinkubierten* Monozyten mit Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab') $_2$ (2.2.5.3). Als Kontrollen dienten in allen Experimenten Doppelinkubationen ohne Zusatz (Negativkontrolle) und mit Zusatz von 150 ng LPS/ml (Positivkontrolle); weitere Kontrollinkubationen mit autologem Plasma oder IVIg (jeweils mit/ohne Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab') $_2$) er-

folgten bei 4 der 5 Experimente. Gemessen wurden die rPCA mit/ohne Vorinkubation mit neutralisierendem Anti-TF-Antikörper und die TF-MFI. Wegen unterschiedlicher Zellzahlen in den Aliquots verschiedener Inkubationen wurde die rPCA jeweils auf 10.000 Monozyten-Events genormt (vgl. 3.1.3.3). Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t-Test (vgl. 2.2.12.4).

Die Abb. 32 a, b zeigen aus den 5 unabhängigen Experimenten Mittelwerte für 5 verschiedene Inkubationen relativ zur jeweiligen Negativkontrolle. In Abb. 32 a ist die MFI für TF bzw. CD142 (als approximatives Maß für die relative TF-Oberflächenexpression pro Monozyt) dargestellt, in Abb. 32 b die rPCA der entsprechenden Inkubationen. Abgebildet wurden jeweils die auf die Negativkontrolle bezogenen Relativwerte (vgl. 2.2.12.5). Die deutlich höheren Werte der LPS-Kontrolle sind jeweils abgetrennt mit anderer Skalierung dargestellt. Wie erwartet sind die rPCA (a) und die TF-MFI (b) für die Positivkontrolle LPS größer als für die Negativkontrolle ($p = 0,035$ bzw. $p = 0,019$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Crosslinks mit primärem *und* sekundärem $F(ab')_2$ ergibt sich weder bezüglich der rPCA noch bezüglich der TF-MFI. Die Inkubationen der ohne Zusatz von primärem $F(ab')_2$ mit sekundärem $F(ab')_2$ inkubierten Monozyten zeigen im Gegensatz zu den Daten von 3.3.1 einen ausgeprägten Eigeneffekt, der für die rPCA gegenüber der Negativkontrolle sogar hochsignifikant ($p = 0,005$) ist. Der einzige signifikante Unterschied zwischen Inkubationen mit Zugabe von sekundärem $F(ab')_2$ besteht zwischen den ohne primäres $F(ab')_2$ vorinkubierten Monozyten und den mit Anti-CD16- $F(ab')_2$ vorinkubierten Monozyten: deren rPCA ist mit $p = 0,031$ kleiner. Analog dazu wurde bereits in 3.3.3 ein signifikanter, leicht hemmender Effekt des Crosslinkings des CD16-Rezeptors mit immobilisiertem Anti-CD16- $F(ab')_2$ auf die TF-Proteinexpression beobachtet.

Die Abb. 32 c, d zeigen Daten für 4 weitere Inkubationen, die bei 4 der 5 unabhängigen Experimente mitgeführt wurden. Die Darstellung in Abb. 32 c erfolgte dabei analog zu Abb. 32 a, die Darstellung in Abb. 32 d analog zu Abb. 32 b. Der LPS-Effekt ist wegen der Betrachtung nur dieser 4 Experimente im Gegensatz zu Abb. 32 a und b nicht signifikant. Da in Abb. 32 d nur aus 3 Experimenten Werte für die Inkubation mit IVIg vorlagen, sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen TF-MFI bei diesen 3 Experimenten mittels gepunkteter Querstriche zusätzlich dargestellt. IVIg zeigte hier im Gegensatz zu den Experimenten mit immobilisier-

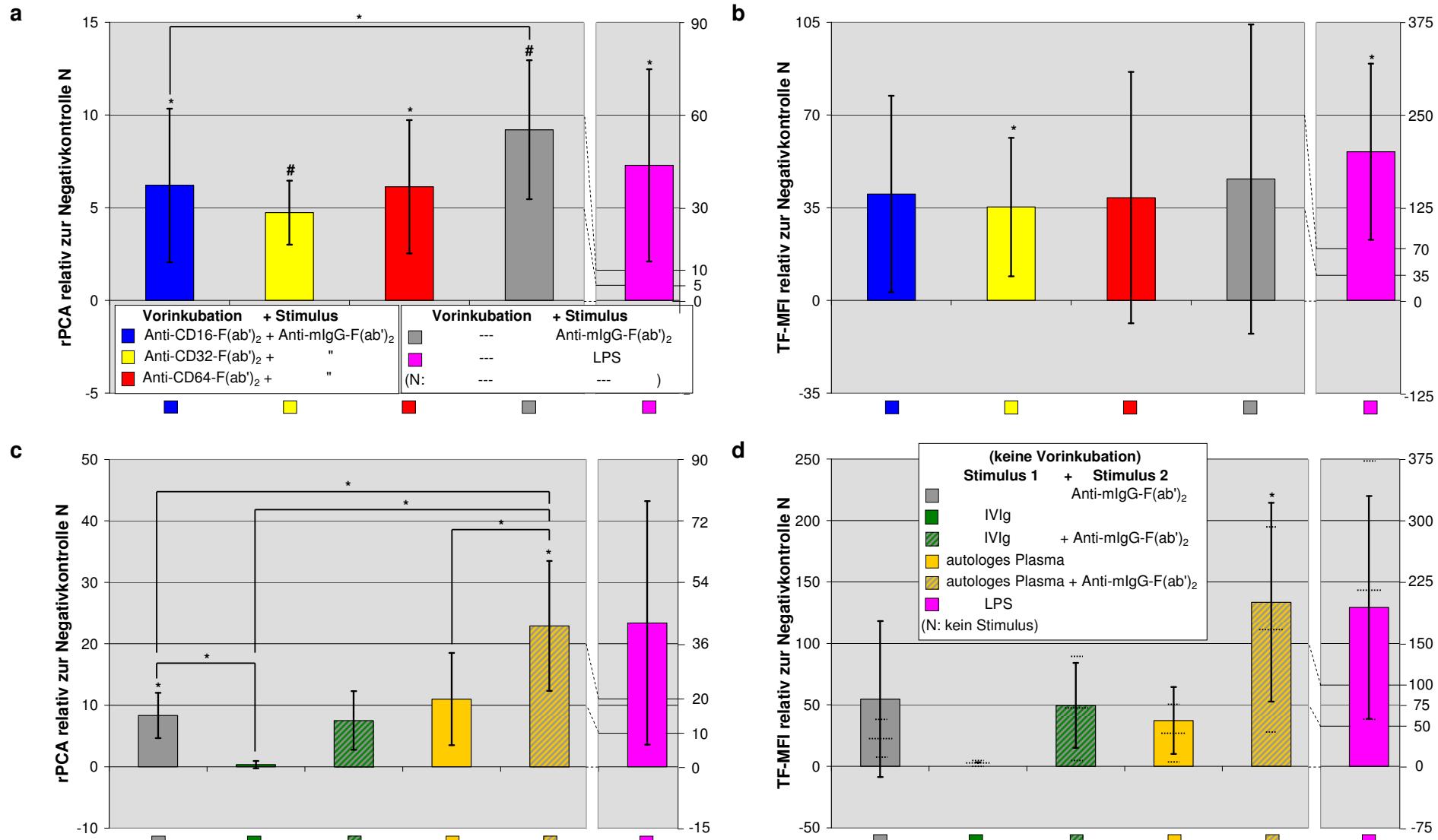


Abb. 32 a–d: Relativwerte für rPCA bzw. TF-MFI (Absolutwert der Neg.-Kontr. 2,9 bzw. 22). Mittelw. aus 5 (a, b) bzw. 4 (c, d) unabh. Exp.

ten F(ab')₂s oder immobilisierten Antikörpern keinen Effekt, weder bzgl. rPCA noch bzgl. TF-MFI. Andererseits zeigte das sekundäre F(ab')₂ den aktivierenden Eigeneffekt (vgl. Abb. 32 a, b) auch in Anwesenheit von zusätzlich autologem Plasma (Signifikanz mit $p = 0,017$) oder IVIg (grenzwertige Signifikanz mit $p = 0,050$). Ein indirekter Hinweis auf eine signifikante aktivierende Wirkung von autologem Plasma ergab sich bei Vergleich der Inkubationen mit alleine sekundärem F(ab')₂ und mit zusätzlich autologem Plasma. Bei Letzterer lagen rPCA ($p = 0,033$) und TF-MFI ($p = 0,060$) signifikant bzw. grenzwertig signifikant höher.

Zusammenfassend ergab sich insbesondere kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Inkubationen mit Anti-Fcγ-Rezeptor-F(ab')₂s, weder für die rPCA noch für die TF-MFI (obwohl in den gleichen Experimenten ein Unterschied beim Calcium-Influx vorlag, vgl. 3.3.1). Die Variabilität der TF-MFI war deutlich größer als die der rPCA, weswegen trotz weitgehend gleicher Rangfolge der Inkubationen für beide Parameter die Unterschiede der TF-MFI wesentlich seltener Signifikanz erlangten. Das Anti-mouse-IgG-light-chain-F(ab')₂ zeigte eine Induktion von TF-MFI und rPCA (signifikant für die rPCA) und eine mögliche Wirkungsverstärkung des Effekts von autologem Plasma (Gesamteffekt für rPCA- und TF-MFI jeweils etwas größer als die Summe der Einzeleffekte). Eine auf die Anti-Fcγ-Rezeptor-F(ab')₂s zurückführbare rPCA-/TF(-MFI)-Induktion konnte in diesen Experimenten nicht nachgewiesen werden; es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Anti-Fcγ-Rezeptor-III-F(ab')₂ eine signifikante Abschwächung der vermutlich durch das sekundäre F(ab')₂ induzierten rPCA bewirkte.

In zwei anderen unabhängigen Experimenten erfolgte die 10-stündige Inkubation negativisolierter Monozyten (die entweder direkt als Gesamtmonozyten oder als CD16⁻-angereicherte Fraktion eingesetzt wurden und somit in beiden Fällen frei von Magnetbeads waren) mit *immobilisierten* Anti-CD16-, Anti-CD32-, Anti-CD64-Antikörpern (2.2.5.1) und Kontrollinkubationen (kein Stimulus, LPS, BSA, IVIg). In jedem Experiment wurden wiederum Doppelinkubationen durchgeführt, in denen das Verhältnis der CD16⁺- zu den CD16⁻-Monozyten 18 % / 82 % (erstes Experiment) bzw. 6 % / 94 % (zweites Experiment) betrug. Die Messung der RKZ bzw. rPCA erfolgte ohne zwischenzeitliches Einfrieren (2.2.5.1). Es zeigte sich – wie in Abb. 33 dargestellt – ein konsistenter Unterschied in der Antwort der rPCA mit der Rangfolge Anti-CD64- > Anti-CD32- > Anti-CD16-Antikörper in jeder der vier Inkubationen. Da es sich aber nur um zwei unabhängige Experimente (mit je zwei gleichartigen Inku-

bationsserien bzw. Doppelinkubationen) handelt, ist hier keine Aussage zu eventueller Signifikanz möglich. Die *Konsistenz der Rangfolge* innerhalb jedes Experiments und zwischen den beiden Experimenten, zusammen mit der Analogie zu den vorherigen Experimenten ($\text{Anti-CD64-F(ab')}_2 > \text{Anti-CD32-F(ab')}_2 >/\approx \text{Anti-CD16-F(ab')}_2$), erhöht allerdings das Gewicht der Ergebnisse dieser exemplarischen Messungen.

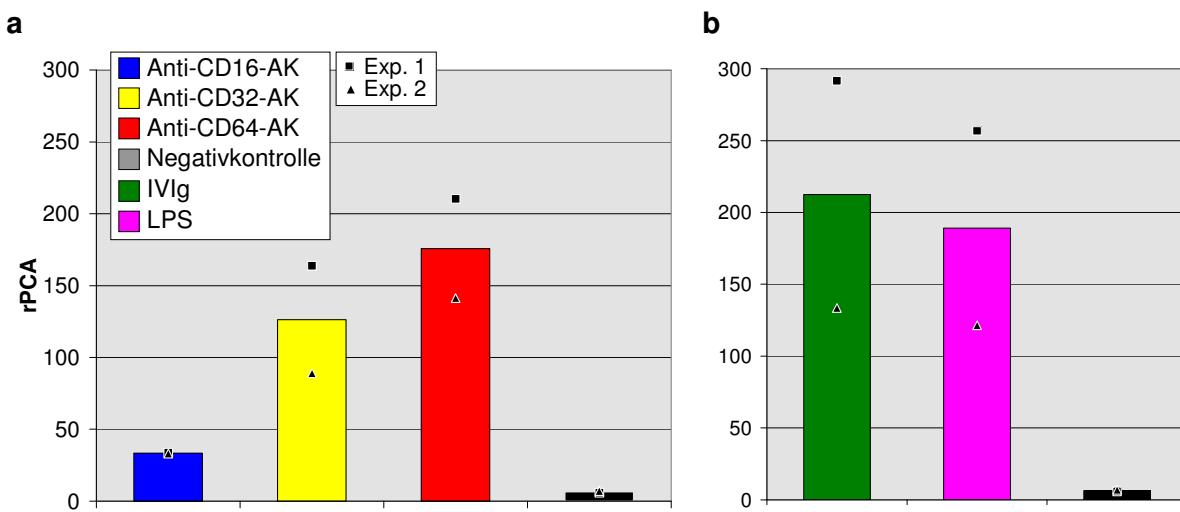


Abb. 33 a, b: Mittelwerte der rPCA für verschiedene inkubierte Monozyten aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Inkubationen mit IVIg und LPS (b) sind wie in den vorangehenden Abbildungen abgetrennt dargestellt. Die abgebildeten Einzelwerte sind Mittelwerte aus Doppelinkubationen.

3.4 Fc γ -Rezeptor-III-Expression als Variable der Induktion prokogastraler Aktivität am Monozyten

Dieser Teil der Arbeit wurde auf den *Fc γ -Rezeptor III (CD16)* beschränkt, der in der Unterklassifizierung der Monozyten in Subpopulationen die größte Rolle spielt.

Zunächst erfolgte die Betrachtung der Fc γ -Rezeptor-III-Expression als *abhängige Variable* im Zusammenhang mit der PCA-Induktion am Monozyten. Dabei wurde der Einfluss der PCA-/TF-Induktion auf die Fc γ -Rezeptor-III-Oberflächenexpression (bzw. -MFI) und den Anteil der CD16 $^{+}$ -Monozyten im Rahmen eines seit langem studierten Systems untersucht, nämlich der PCA-/TF-Induktion durch den hochpotenten Stimulus LPS. Sowohl negativisierte Monozyten als auch Vollblutproben wurden dazu eingesetzt.

Schließlich wurde der Einfluss der vorbestehenden Fc γ -Rezeptor-III-Oberflächenexpression (Fc γ -Rezeptor-III-Expression als *unabhängige Variable*) auf dieses Modellsystem der PCA-/TF-Induktion durch LPS untersucht. Diese Experimente fanden ebenfalls mit Vollblut und negativisierten Monozyten statt (Bestimmung der TF-Oberflächenexpression bzw. -MFI), zusätzlich mit vorher isolierten CD16 $^{+}$ /CD16 $^{-}$ -Monozytensubpopulationen (Bestimmung der rPCA).

3.4.1 Fc γ -Rezeptor-III-Expression als abhängige Variable: Veränderung der Fc γ -Rezeptor-III-Oberflächenexpression (bzw. der CD16 $^{+}$ /CD16 $^{-}$ -Subpopulationen) unter PCA-Induktion mit LPS

Die Veränderung der monozytären CD16-Oberflächenexpression im Rahmen der PCA-Induktion mittels LPS wurde im Rahmen zweier Serien von Experimenten untersucht. In der *ersten Serie* wurden venöse Vollblutproben 6 verschiedener Spender (Gewinnung in 2.2.2.2) 1:2 mit RPMI1640 oder sterilem DPBS verdünnt und für 5 Stunden ohne bzw. mit 150 ng LPS/ml in Costar-6er-Zellkulturschalen inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). In der *zweiten Serie* wurden aus BuC-Präparaten 3 verschiedener Blutspender Monozyten negativisiert und für 6 Stunden ohne bzw. mit 150 ng LPS/ml in Costar-6er-Zellkulturplatten inkubiert. Die Isolierung und Behandlung erfolgte analog der zweiten 3er-Serie in 3.3.3. Durchfluszytometrische Plots repräsentativer Experimente (Abb. 34) sind der statistischen Auswertung vorangestellt, um die

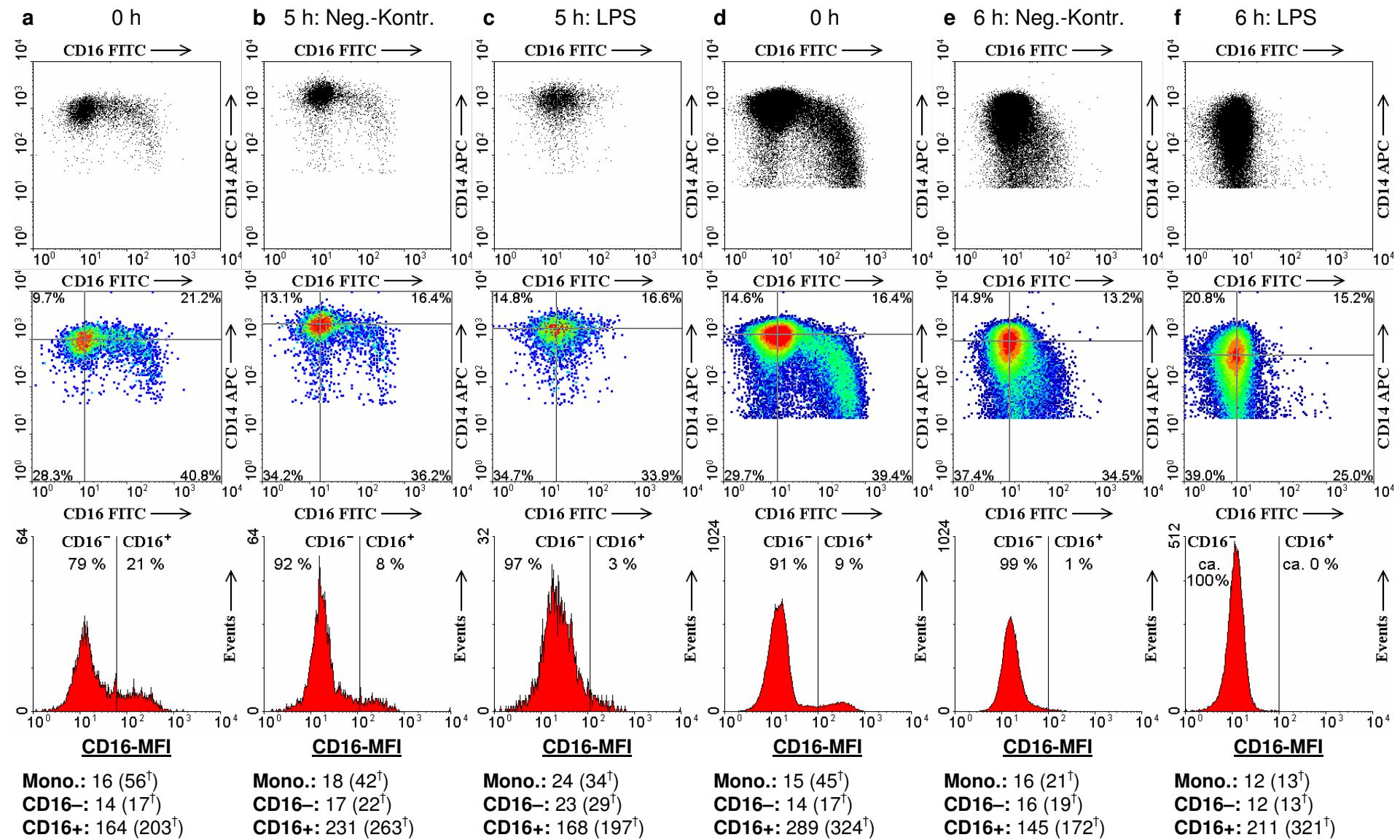


Abb. 34: DFZ-Daten repräsentativer Exp. mit Vollblut (a–c) und negativisol. Monozyten (d–e). MFI-Berechnung mit Median bzw. arithm. Mittel ([†]).

komplexen Auswirkungen der Inkubation und LPS-Stimulation auf die Oberflächenexpression von CD16 zu veranschaulichen. In Abb. 34 sind von oben nach unten dargestellt: Inkubationsart, Dotplot, Density-Plot (mit Markierung des Zentrums der Hauptpopulation und Angabe der Anteile in den resultierenden Quadranten), Histogramm (mit Kennzeichnung der Grenze der CD16⁻/CD16⁺-Monozyten und Angabe ihrer Anteile) und CD16-MFI für die Gesamtpopulation der Monozyten (Mono), die CD16⁻-Subpopulation („CD16⁻“) und die CD16⁺-Subpopulation („CD16⁺“). Die CD16-MFI ist dabei jeweils mit Mittelung durch den Median (erster Wert) und durch das arithmetische Mittel (Wert in Klammern) aufgeführt.

In beiden dargestellten Experimenten zeigt sich ein Rückgang der schweifartig neben der Hauptpopulation liegenden stark CD16-exprimierenden Monozyten durch Inkubation ohne Stimulus und eine Verstärkung des Rückgangs durch LPS-Stimulation. Auch an den sinkenden Prozentzahlen der CD16⁺-Monozyten ist dieser Effekt ablesbar. Bei Betrachtung aller 6 Spender der Vollblut-Experimente erreicht dieser Effekt Signifikanz (Abb. 35).

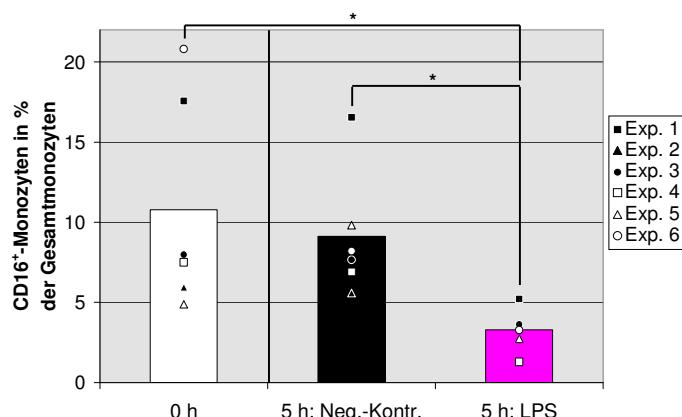


Abb. 35: Prozentuale Anteile der CD16⁺-Monozyten an den Gesamtmonozyten in Vollblutproben vor und nach 5-stündiger Inkubation von Vollblut ohne bzw. mit LPS (Einzelwerte und Mittelwerte für 6 verschiedene Spender bzw. Experimente). Für die dargestellten Signifikanzen beträgt p jeweils 0,031 im Vorzeichentest.

In zwei der drei Experimente mit negativisierten Monozyten tritt die Reduktion der CD16⁺-Monozyten auch in der in Abb. 35 dargestellten Rangfolge („0 h“ > „5 h: Neg.-Kontr.“ > „5 h: LPS“) auf, in dem dritten Experiment ist diese Rangfolge mit „0 h“ ≈ „5 h: Neg.-Kontr.“ > „5 h: LPS“ ähnlich.

Die Lage der Monozytenhauptpopulation auf der CD16-Achse (Abb. 34) bzw. die mediane CD16-MFI (vgl. 2.2.12.1) aller Monozyten verändert sich durch alleinige

5- bzw. 6-stündige (unstimulierte) Inkubation gegenüber dem Inkubationsbeginn („0 h“) sowohl bei den Vollblut-Experimenten als auch bei den Experimenten mit negativisolierten Monozyten zu höheren Werten hin (Abb. 36). Der Effekt von LPS auf die CD16-MFI (bzw. auf die Lage der Monozytenhauptpopulation) ist jedoch für die Vollblut-Experimente und die Experimente mit negativisolierten Monozyten entgegengesetzt. So erhöht LPS in den Vollblut-Inkubationen die monozytären (mediane) CD16-MFI, während es sie in den Inkubationen negativisolierter Monozyten senkt (Abb. 36).

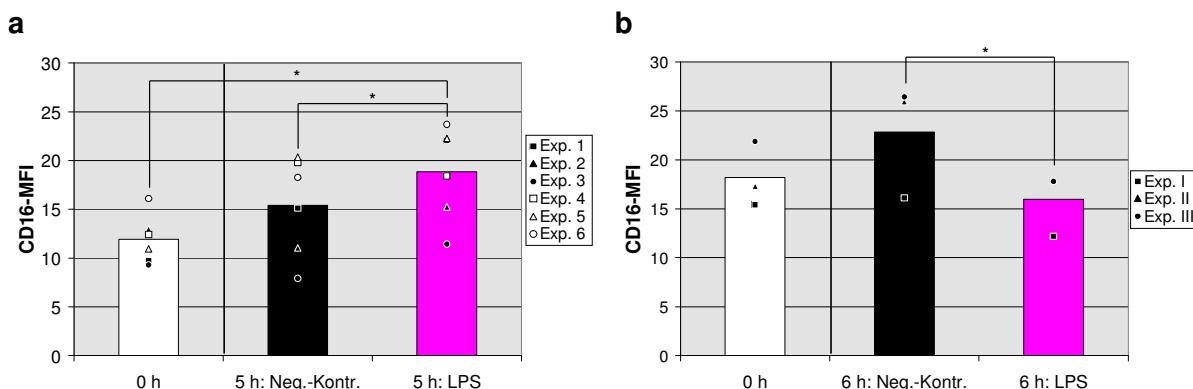


Abb. 36 a, b: Gemittelte CD16-MFI ohne und mit LPS-Stimulation (6 h bzw. 5 h Inkubation) für Vollblutproben 6 verschiedener Spender (a) und negativisierte Monozyten 3 verschiedener Spender (b). Die (mediane) CD16-MFI steigt tendenziell allein durch Inkubation ohne Stimulation an. Die (mediane) CD16-MFI liegt weiterhin für LPS-stimulierte Monozyten in den Vollblutproben signifikant höher ($p = 0,034$ im gepaarten t-Test) und in den Monozytenisolaten signifikant niedriger ($p = 0,044$ im gepaarten t-Test) als für unstimulierte Monozyten.

3.4.2 Fc γ -Rezeptor-III-Expression als unabhängige Variable: TF-Oberflächenexpression und rPCA in Abhängigkeit von der Fc γ -Rezeptor-III-Oberflächenexpression (bzw. von der CD16 $^+$ /CD16 $^-$ -Subpopulation)

Die (mediane) TF-MFI als approximatives Maß für die TF-Oberflächenexpression bzw. für die rPCA wurden im Folgenden an gemeinsam (in Vollblut und Monozyten-Negativisolaten) bzw. an getrennt inkubierten Isolaten monozytärer CD16 $^+$ /CD16 $^-$ -Subpopulationen untersucht.

3.4.2.1 TF-Oberflächenexpression in Abhängigkeit von der Fc γ -Rezeptor-III-Oberflächenexpression

Vollblutproben (Gewinnung: 2.2.2.2) von 5 verschiedenen Spendern wurden als 1:2-Verdünnung mit RPMI1640 oder sterilem DPBS 5 Stunden lang mit bzw. ohne 150 ng LPS/ml inkubiert (2.2.6). Folgendes wurde festgestellt:

- Die TF-MFI der CD16 $^-$ -Monozytensubpopulation war bei Inkubationsbeginn („0 h“), nach Inkubation ohne Stimulus („5 h: Neg.-Kontr.“) und nach Inkubation mit LPS („5 h: LPS“) im Mittel größer, als die der CD16 $^+$ -Monozytensubpopulation (Abb. 37 a). Im gepaarten t-Test zeigte dieser Unterschied Signifikanz für „0 h“ ($p = 0,020$) und „5 h: Neg.-Kontr.“ ($p = 0,029$).
- Der Anstieg der TF-MFI unter LPS war bei der CD16 $^-$ -Monozytensubpopulation im Vergleich zur CD16 $^+$ -Monozytensubpopulation tendenziell mehr (bei Betrachtung gegenüber dem Inkubationsbeginn; Abb. 37 b) bzw. etwa gleich stark (bei Betrachtung gegenüber der Inkubation ohne Stimulus).

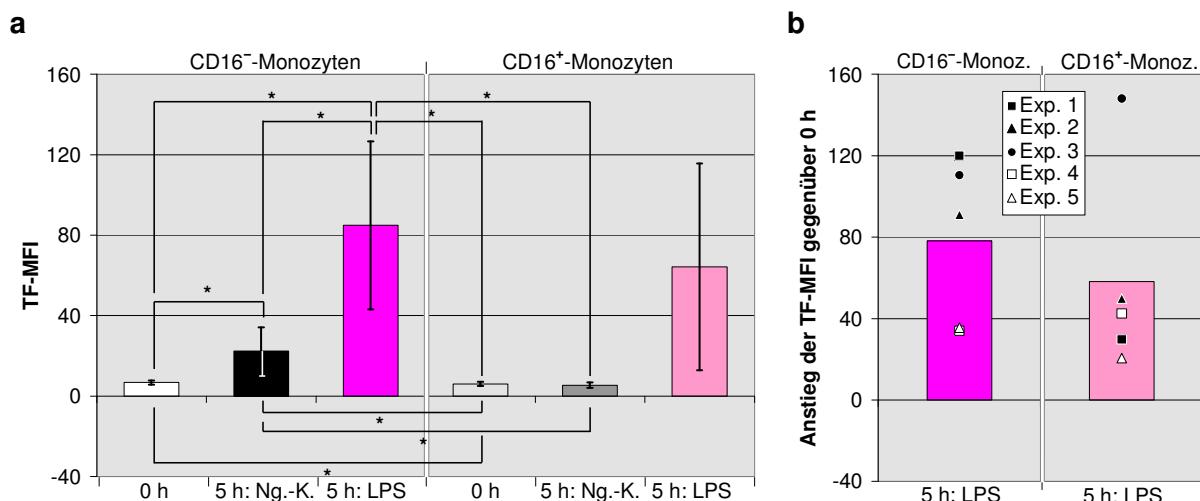


Abb. 37 a, b: a stellt die Mittelwerte der (medianen) TF-MFI für die durchflusszytometrisch gegateten monozytären CD16 $^-$ /CD16 $^+$ -Subpopulationen im Vergleich dar ($n = 5$; Analyse im gepaarten t-Test). In b ist für die Inkubationen aus a der Anstieg der TF-MFI durch LPS-Stimulation gegenüber dem Inkubationsbeginn für beide Subpopulationen getrennt dargestellt.

Weiterhin zeigt sich die TF-MFI der CD16 $^-$ -Monozyten im Gegensatz zu der der CD16 $^+$ -Monozyten nach 5-stündiger Inkubation *ohne Stimulus* signifikant erhöht gegenüber dem Inkubationsbeginn „0 h“.

Bei den Experimenten mit negativisolierten Monozyten (vgl. 3.4.1) war die CD16⁺-Subpopulation nach der 6-stündigen Inkubation mit LPS jeweils verschwindend gering (vgl. Abb. 34). Ein analoger Vergleich der TF-MFIs der CD16⁻/CD16⁺-Subpopulationen (so wie bei den Vollblut-Experimenten) war deswegen hier nicht möglich. Mittels einer alternativen Methode, bei der die Monozytenpopulation anhand ihrer (medianen) CD16-MFI in 2 Hälften gegatet wurde (50 % niedriger CD16-exprimierende Monozyten und 50 % höher CD16-exprimierende Monozyten) konnte trotzdem eine standardisierte Aussage über die TF-MFI (bzw. die TF-Oberflächenexpression) in Abhängigkeit von der CD16-MFI (bzw. der CD16-Oberflächenexpression) getroffen werden. Im Vergleich mit einem gleichartigen Gating der Vollblutexperimente ergab sich lediglich bei den *unstimulierten* 5- bzw. 6-stündigen Inkubationen eine inverse Konstellation – mit höherer CD142-MFI der CD16-positiven Hälfte der negativisolierten Monozyten und niedrigerer CD142-MFI der CD16-positiven Hälfte der Vollblut-Monozyten (beides jedoch ohne Signifikanz) – ansonsten aber eine identische Rangfolge der Mittelwerte.

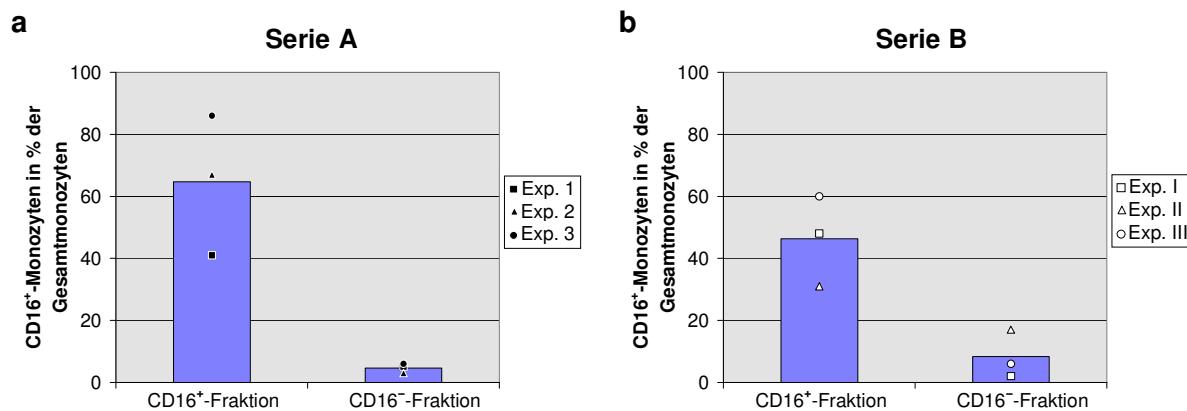
Die Beurteilbarkeit der TF-MFI (bzw. der TF-Oberflächenexpression) der CD16⁻/CD16⁺-Subpopulationen im zeitlichen Verlauf bzw. in Abhängigkeit von der Inkubationsart ist in 3.4.2.1 aber insgesamt eingeschränkt, da die CD16-MFI bzw. die CD16-Oberflächenexpression und damit die Zuordnung der Monozyten zu den beiden Subpopulationen unter LPS-Stimulation variiert (vgl. 3.4.1). Genau genommen wurden *Korrelationen von CD16- und CD142-MFI* zu bestimmten Zeitpunkten erfasst. Die Ergebnisse des folgenden Abschnitts (3.4.2.2) hingegen erlauben eine derartige Verlaufsbeurteilung für die in der vorliegenden Arbeit eng mit der TF-MFI bzw. TF-Oberflächenexpression korrelierende rPCA.

3.4.2.2 rPCA in Abhängigkeit von der monozytären Subpopulation (CD16⁺ bzw. CD16⁻)

In zwei 3er-Serien (Serie A und Serie B) wurden aus negativisolierten Monozyten (2.2.4.1, 2.2.4.3) die CD16⁺- und CD16⁻-Monozytensubpopulationen angereichert (2.2.4.5). In Serie A erfolgten 6-stündige Inkubationen in Costar-6er-Zellkulturplatten (300.000–1.400.000 Monozyten/Well), in Serie B 10-stündige Inkubationen in Falcon-6er-Zellkulturplatten (300.000–400.000 Monozyten/Well). Diese Inkubationen wurden in Zellkulturmedium (siehe z. B. 2.2.4.2) getrennt für CD16⁺- und CD16⁻-Monozyten

jeweils mit und ohne LPS (150 ng/ml) durchgeführt. In Serie A befanden sich die Zellen zum Zeitpunkt der Stimulation bereits 7 bis 14 Stunden vorinkubiert in den Wells.

Die Anteile der CD16⁺-Monozyten an den Gesamtmonozyten in den beiden Serien und den entsprechenden Anreicherungen sind in Abb. 38 dargestellt.



Mit Hilfe der Zusammenhänge aus (3.1.3.1) und des für das verwendete Plasma ermittelten Exponenten $-0,231$ ergab sich die rPCA aus der Rekalzifizierungszeit mit:

$$\text{rPCA} = (\text{RKZ}/200 \text{ s})^{1/-0,231} = (\text{RKZ}/200 \text{ s})^{-4,33}$$

Um sinnvolle Vergleiche zu ermöglichen wurde der rPCA-Wert für eine einheitliche Zellzahl berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 39 a dargestellt. Wegen der geringen Zahl von jeweils 3 Experimenten ergibt sich bei getrennter Betrachtung der beiden Serien kein signifikanter Unterschied. Bei Zusammenfassung der (in den wesentlichen Punkten identischen) Experimente zeigt sich Signifikanz für die wichtigen Einzelaspekte von Abb. 39 a (Abb. 39 b). So ist der Effekt von LPS in beiden Subpopulationen im gepaarten t-Test signifikant ($p = 0,013$ für CD16⁻-Monozyten bzw. $p = 0,049$ für CD16⁺-Monozyten). Weiterhin zeigen die LPS-stimulierten CD16⁻-Monozyten (gegenüber den LPS-stimulierten CD16⁺-Monozyten) im gepaarten t-Test eine signifikant höhere rPCA ($p = 0,030$). Serie A legt eine höhere basale rPCA für die CD16⁺-Monozyten nahe, die sich jedoch in der gemeinsamen Betrachtung der beiden Serien als nicht signifikant erweist. Gegenüber den CD16⁺-Monozyten reagie-

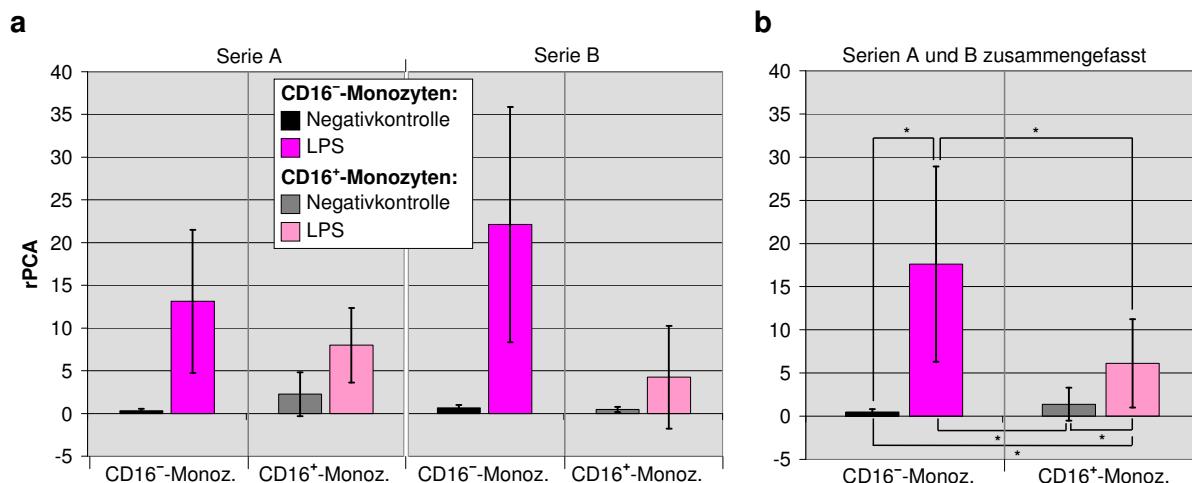


Abb. 39 a, b: Darstellung der rPCA für die beiden Experimentenserien A (6 h Inkubation) und B (10 h Inkubation), getrennt (a) und zusammengefasst (b). In b zeigt sich im gepaarten t-Test eine signifikant höhere mit LPS induzierbare rPCA der CD16⁻-Monozyten, jedoch nur in Serie A auch eine niedrigere (nicht signifikant) basale rPCA der CD16⁻-Monozyten (b).

ren die CD16⁻-Monozyten bezüglich ihrer rPCA außerdem signifikant stärker auf die LPS-Stimulation. Der absolute Anstieg der rPCA ist für CD16⁻-Monozyten signifikant ausgeprägter ($p = 0,014$ im gepaarten t-Test) als für CD16⁺-Monozyten (nicht abgebildet).

Für eines der Experimente aus Serie A wurde ein Zeitverlauf für den LPS-Effekt – getrennt für CD16⁺- und CD16⁻-angereicherte Monozyten erfasst (Abb. 40 a–c). Dabei wurden zusätzlich zu den Standardinkubationen (0,33 Mio. CD16⁺-Monozyten und 0,33 Mio. CD16⁻-Monozyten) noch Inkubationen mit doppelter Menge (0,66 Mio.) der CD16⁻-Monozyten mitgeführt. Die Inkubationen wurden analog zu den anderen Experimenten dieser Serie geerntet, gewaschen und unmittelbar im Anschluss zu definierten Zeitpunkten (1 h, 2 h, 3 h 10 min, 4 h 20 min, 5 h 50 min) im Rekalzifizierungs-Assay gemessen. Es zeigte sich ein registrierbarer Effekt nach 2–3 Stunden und ein Überschreiten des maximalen rPCA-Anstiegs nach 6 Stunden. Die höhere basale rPCA und der kleinere rPCA-Zuwachs der CD16⁺-Monozyten in Serie A sind somit auch im Zeitverlauf nachvollziehbar. In diesem Experiment liegt – im Gegensatz zu den meisten anderen derartigen Experimenten – die rPCA der LPS-stimulierten CD16⁺-Monozyten nach 6 h etwa auf dem gleichen Niveau wie die der CD16⁻-Monozyten.

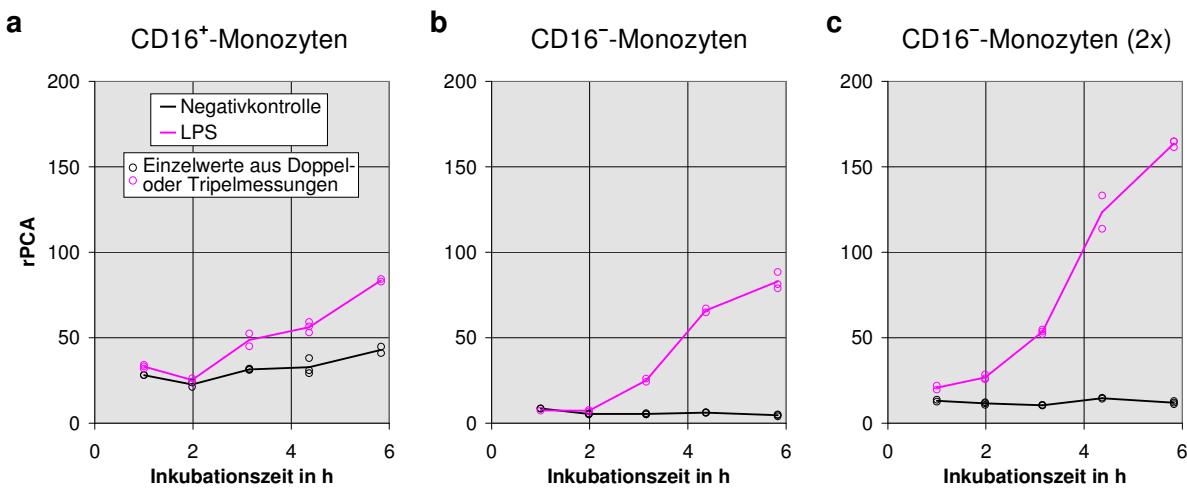


Abb. 40 a–c: Zeitlicher Verlauf der rPCA mit und ohne LPS-Stimulation für CD16⁺-Monozyten und CD16⁻-Monozyten der gleichen Menge (a, b) sowie CD16⁻-Monozyten der doppelten Menge (c).

Passend zu den bisher dargestellten Ergebnissen zeigten schwach (25 % CD16-positiv) und stark (95 % CD16-positiv) CD16⁺-angereicherte Monozyten auch für die Stimulation mit adhärenten Anti-CD16-/CD32-/CD64-Antikörpern einen durchweg schwächeren Effekt auf die rPCA, als die mitgeführten CD16⁻-angereicherten Monozyten (13 % CD16-positiv bzw. 0,5 % CD16-positiv). Diese CD16⁺-angereicherten Monozyten wurden im Rahmen der in Abb. 33, Abschnitt 3.3.5 dargestellten Experimente gewonnen und analog behandelt.

Zusammenfassend für Abschnitt 3.4.2 ergeben sich Anhalte für eine geringere Reaktionsfähigkeit der CD16⁺-Monozyten auf LPS (Abb. 38).

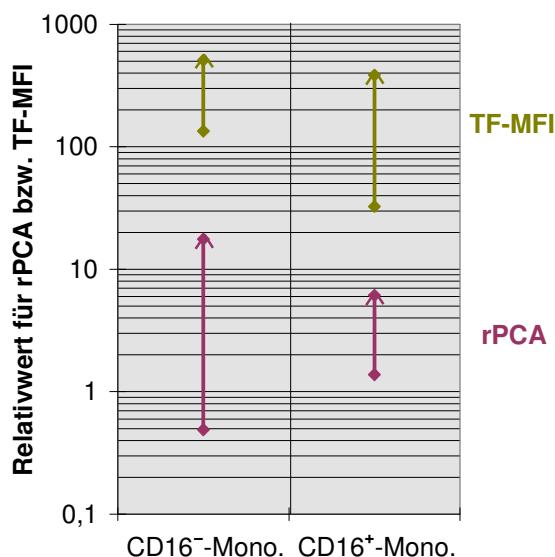


Abb. 41: Dargestellt ist halbschematisch die Variationsbreite der TF-MFI und der rPCA für CD16⁺- bzw. CD16⁻-Monozyten. Anhand der Ergebnisse aus 3.4.2 wurde die Länge der Pfeile und die Lage der Punkte zueinander ermittelt (Pfeilfuß = Wert nach Inkubation ohne Stim., Pfeilspitze = Wert nach Inkubation mit LPS als Maximalstimulus). Die absoluten Positionen der Pfeilfüße/-spitzen sind willkürlich gewählt, ebenso die Farben der Pfeile.

4 DISKUSSION

4.1 Isolierung von Monozyten

Eine der am häufigsten eingesetzten Isolierungsmethoden für Monozyten ist deren Adhärenzselektion aus den durch Ficoll-Hypaque-(Dichtegradienten-)Zentrifugation gewonnenen PBMC [de Almeida et al. 2000, Bennett and Breit 1994]. Alternative Methoden zur Monozytenisolierung bzw. -anreicherung sind die Selektion nach immunologischen Eigenschaften (Oberflächenantigene) mittels fluoreszenz- oder Magnetbead-markierter Antikörper oder nach Sedimentierungscharakteristik mittels, meist an die Dichtegradientenzentrifugation angeschlossener, Gegenstrom-Elutriation (sog. „counterflow centrifugal elutriation“) [Pretlow and Pretlow 1979, Garner et al. 1994]. Bei den Isolierungsprozeduren kann es zur Ausbildung prokoagulanter Aktivität der PBMC bzw. Monozyten kommen, wie z. B. für die Dichtegradientenzentrifugation 2003 von Meisel et al. demonstriert wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Isolierung mittels antikörpergekoppelter Magnetbeads ermöglicht bei Positivisolierung über das CD14-Oberflächenantigen eine hochspezifische Anreicherung der Monozyten (3.1.1). Wegen der relativ hohen Kosten wird sie allerdings – wie auch hier – vor allem für kleinere Mengen zellulären Ausgangsmaterials verwendet. Der Nachteil einer eventuellen Aktivierung durch Antikörperbindung (vgl. 3.3.3) konnte durch eine Negativisolierung mittels eines Antikörper-Mixes umgangen werden. Dabei war jedoch eine ausreichende Abtrennung der Granulozyten bereits im Rahmen der PBMC-Gewinnung wichtig, da sich im Mix keine Anti-CD16-Antikörper befanden; diese hätten sonst ungewünscht mit den CD16⁺-Monozyten interferiert.

Die mittleren Reinheiten von 96 % (Positivisolierung) und 89 % (Negativisolierung) entsprechen weitgehend gängigen Qualitätsanforderungen mit einer Reinheit > 90 % [de Almeida et al. 2000].

4.2 Isolierung monozytärer CD16⁺/CD16⁻-Subpopulationen

Mittels Anti-CD16-Magnetbeads war eine deutliche Anreicherung von CD16⁺- und CD16⁻-Monozyten möglich, was mit Hilfe der Durchfluszytometrie gut illustriert werden konnte (3.1.2). Der Anteil der CD16⁺-Monozyten an den Gesamtmonozyten be-

trug im Mittel 72 % und konnte durch einen zweiten Säulenlauf auf bis zu 90 % (im Mittel 79 %) gesteigert werden.

Die Datenlage zur Auf trennung von Monozyten anhand ihrer CD16-Oberflächenexpression ist eher spärlich. Für eine Auf trennung mittels antikörpergekoppelter Magnetbeads konnte bei einer ausführlichen Medline-Recherche nur *ein* entsprechender Artikel gefunden werden [Ellery and Crowe 2005], für Auf trennung mittels fluoreszenzabhängiger Zellsortierung noch ein weiterer Artikel [Thomas and Lipsky 1994]. Die bei Ellery und Crowe erzielten Reinheiten sind mit > 95 % angegeben. Möglicherweise hängen die in der vorliegenden Arbeit geringeren Reinheiten (im Mittel ca. 72 % bzw. 79 % nach einem bzw. zwei Säulenläufen) mit einer Störung der Bindung der fluoreszenzmarkierten Anti-CD16-Antikörper durch die Magnetbead-gekoppelten Anti-CD16-Antikörper zusammen – wie auch bei Ellery und Crowe als Möglichkeit erwähnt.

Bei dieser Art der Subpopulationsisolierung können Rest-Granulozyten aus der PBMC-Fraktion aufgrund ihrer hohen CD16-Expression zusammen mit den CD16⁺-Monozyten in der CD16⁺-Fraktion angereichert werden, was auch beobachtet wurde. Die Möglichkeit einer Voraktivierung – insbesondere im Rahmen der Bindung der Magnetbead-gekoppelten Anti-CD16-Antikörper – ist auch eine mögliche Erklärung für eine z. T. bei den CD16⁺-Monozyten gemessene höhere prokoagulante Aktivität (3.4.2) [Ellery and Crowe 2005, Ziegler-Heitbrock 2007]. Eine „no-touch“-Isolierung für CD16-positive Monozyten wurde 2007 von Ziegler-Heitbrock gefordert, eine diesbezügliche Kompromisslösung mit Depletierung vor allem der CD16-negativen Monozytenhauptpopulation stellt z. B. die Nutzung des CD64-Oberflächenmarkers dar, entweder *selektiv*, wie z. B. bei Grage-Griebenow et al. 1993 beschrieben, oder *präferentiell* (mittels Rosettenbildung der Monozyten durch Erythrozyten-Antikörper-Komplexe), wie bereits früher eingesetzt (z. B. bei Szabo and Miller-Graziano 1990). In diesem Zusammenhang könnten CD15, CD38, CD62L (L-Selectin), CD163, der C3-Komplement-Rezeptor und verschiedene Chemokinrezeptoren [Strauss-Ayali et al. 2007, Ziegler-Heitbrock 2007, Grage-Griebenow et al. 2001a] weitere hilfreiche Oberflächenmarker sein, da sie zumindest auf dem Hauptteil der CD16-positiven Monozyten deutlich unterrepräsentiert sind.

4.3 Zusammenhänge zwischen Rekalzifizierungszeit, prokoagulanter Aktivität, TF-Aktivität und TF-Oberflächenexpression beim Monozyten

Die rPCA bzw. Rekalzifizierungszeit in den untersuchten Inkubationen wird vor allem durch die Menge des exponierten und aktiven (bzw. „de-encrypted“) Tissue Factors und die Menge frei zugänglicher spezieller anionischer Phospholipidregionen bestimmt. Beide Komponenten liegen prinzipiell nicht nur auf dem Monozyten vor, sondern auch auf u. a. vom Monozyten stammenden Membranvesikeln bzw. Mikropartikeln sowie auf Thrombozyten [Henriksson et al. 2005, Satta et al. 1994]. Thrombozyten-Reste sind sowohl in den Monozytenisolaten [Pejler and Geczy 2001] als auch im plättchenarmen Poolplasma anzunehmen und kommen als mögliche TF-Quelle in Frage [Müller et al. 2003]. Höhere Komplexität entsteht dadurch, dass TF auch auf Granulozyten und auf Endothelzellen vorliegen kann (vgl. 1.2). Als limitierender Faktor für die TF-abhängige Gerinnungsaktivierung bewirken die genannten Phospholipide eine TF-„de-encryption“ *im weiteren Sinne*. Weiterhin scheinen noch unbekannte Phosphatidylserin-unabhängige Mechanismen, möglicherweise reversible TF-Inaktivierung durch Homo- oder Heterodimerbildung auf der Zelloberfläche [Bach and Moldow 1997], eine Rolle für die TF-Aktivierung/-Inaktivierung (TF-„de-encryption“ *im engeren Sinne*) zu spielen [Henriksson et al. 2005].

Die prokoagulante Aktivität ist als anschauliches Maß für die Gerinnungsinduktion besser geeignet als die Rekalzifizierungszeit, da sie linear mit der Menge des gerinnungsinduzierenden Agens im Ansatz korreliert. Die hier empirisch (über Verdünnungsreihen stimulierter und unstimulierter Monozyten) gefundene Korrelation von RKZ und rPCA mit Beschreibbarkeit als Gerade im doppelt-logarithmischen Diagramm (bzw. mit Potenzzusammenhang) ist in der Literatur mehrfach erwähnt [Conkling et al. 1988, Tsao et al. 1984, Neumann et al. 1997, Schwartz and Edington 1981]. Eine „relative PCA“ wurde explizit auch bei Rothberger et al. als Messgröße verwendet [Rothberger et al. 1977]. Die Zelldesintegration, die in der vorliegenden Arbeit im Rahmen des Einfrierens und Auftauens auftrat, führt am Monozyten häufig zur Erhöhung der prokoagulanten Aktivität [Neumann et al. 1997]. Beim direkten Vergleich frischer und einmalig eingefrorener Aliquots wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine Zunahme der rPCA bzw. eine Abnahme der RKZ beobachtet. Die geringere Zunahme bei LPS-stimulierten Monozyten ist dabei ein möglicher Hinweis auf eine dort bereits im fri-

schen Zustand ausgeprägtere Phosphatidylserin-Exposition und/oder Zelldesintegration [Wolberg et al. 1999, Henriksson et al. 2005].

4.3.1 Korrelation von blockierter und unblockierter rPCA – Beschreibung einer nicht blockierbaren rPCA

Durch Einsatz eines neutralisierenden Anti-TF-Antikörpers ließ sich in der vorliegenden Arbeit die induzierte Beschleunigung der Rekalzifizierungszeit nicht komplett aufheben, auch die Positiv- und die Negativkontrolle glichen sich nicht vollständig an.

Eine derartige *nicht blockierbare prokoagulante Aktivität* ist für LPS- oder Antikörper-stimulierte Monozyten (oder PBMC) nach Inkubation mit blockierendem bzw. neutralisierendem Anti-TF-Antikörper in mehreren Studien nachvollziehbar [Henriksson et al. 2005, Lackner et al. 2000, Wolberg et al. 1999, Nguyen et al. 1999, Neumann et al. 1997, Consonni and Bertina 1995, Walsh and Geczy 1991]. Dabei zeigt sich, dass bei dem zumeist verwendeten Assay (Messung der Faktor-Xa-Produktion, die unmittelbar auf die Wechselwirkung von TF mit Faktor VIIa zurückgeht) mitunter in Studien konsistente – d. h. wiederholt gemessene – rund 100 %ige Blockaden erreicht wurden [Henriksson et al. 2005, Satta et al. 1994]. Dagegen konnten bei Verwendung der anderen Assays (Thrombinproduktion, Rekalzifizierungszeit oder Fibrinopeptid A-Produktion als Parameter der Fibrinbildung) keine Studienergebnisse für eine konsistente, praktisch 100 %ige Blockade gefunden werden. Illustriert wird diese Datenlage am besten in der Studie von Henriksson et al., wo LPS-stimulierte (0 und 1 sowie 1000 ng/ml) PBMC mittels einer Mischung blockierender Anti-TF-Antikörper („TF8-569“ und „TF9-5B7“) hinsichtlich ihrer Faktor-Xa-Produktion komplett (zu 100 %) blockiert werden konnten, hinsichtlich ihrer Produktion des Fibrinopeptids A jedoch nur zu Anteilen zwischen 35 und 95 %. Die Rangfolge der prokoagulanten Aktivität – abgeleitet aus der Produktion des Fibrinopeptids A – für die Inkubationen mit 0 und 1 sowie 1000 ng LPS/ml blieb dabei (analog zu den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen zur PCA) auch in den TF-blockierten Inkubationen erhalten. Für eine komplette Blockade des TF-Effekts ist natürlich auch die ausreichende Konzentration des Anti-TF-Antikörpers [Satta et al. 1994] und die Suffizienz seiner blockierenden Eigenschaften [Nguyen et al. 1999] entscheidende Voraussetzung, was aber nur in diesen zwei der vorher genannten Studien offensichtlich zu (mitunter) insuffizienten Blockaden geführt hatte. Beim Vergleich der oben erwähnten Studien war weiterhin zu beachten, ob die Blockade nur den (zur Negativkontrolle) relativen LPS-Effekt der PCA komensierte (100 % LPS-

PCA), oder die komplette PCA gegenüber einem Leer-Ansatz ohne Zellmaterial (100 % PCA), da auch in der Negativkontrolle durchaus PCA vorhanden war.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene gute Korrelation der RKZ vor und nach Blockade deutet darauf hin, dass eher die Höhe der RKZ vor Blockade als ihr Provokationsmechanismus (spezifisches Fc γ R-Crosslinking/Anti-Fc γ R-F(ab') $_2$ s, IVIg, autologes Plasma oder LPS) die RKZ nach Blockade und damit die TF-Aktivität bestimmten. Über einen großen Bereich zeigte sich dabei eine nicht blockierbare rPCA mit einem weitgehend konstanten Anteil von ca. 5 % der Ausgangs-rPCA – was auch gegen eine zu geringe Konzentration des neutralisierenden Anti-TF-Antikörpers als Ursache der unvollständigen Blockade spricht. Die Menge/Aktivität der für diese nicht blockierbare PCA verantwortlichen *gerinnungsaktivierenden Substanzen* sollte somit weitgehend proportional zur Menge/Aktivität des vorhandenen monozytären Tissue Factors sein [Bach and Rifkin 1990]. Ein Weg für eine derartige TF-unabhängige Gerinnungsbildung wäre über eine direkte Aktivierung von Gerinnungsfaktoren durch exponierte Phospholipide denkbar [Henriksson et al. 2005, Barrowcliffe et al. 2002, Setty et al. 2000]. Der Faktor XII (Hageman-Faktor) im Poolplasma, der die klassische Aktivierung des intrinsischen Systems einleitet [Radcliffe et al. 1977, Johne et al. 2006] könnte dabei – wie von Petrides beschrieben – an Phospholipiden in Membranen von Monozyten oder Rest-Thrombozyten (aus dem Ansatz oder dem Poolplasma des RKZ-Assays stammend) aktiviert werden [Petrides 1998]. Eine TF-unabhängige Thrombinaktivierung wäre außerdem durch exprimierte oder sezernierte Proteasen (vgl. 1.3, [Miller et al. 1981] und [Sekiya et al. 1994]) oder – zumindest in geringem Maße – durch Faktor VIIa denkbar [Kjalke et al. 2000, Butenas et al. 2002, Hoffman et al. 1994]. Eine TF-unabhängige prokoagulante Aktivität konnte z. B. für TF-negative Mikropartikel gezeigt werden [Mackman et al. 2007]. Möglicherweise sind für das Auftreten dieser nicht blockierbaren PCA auch intakte zelluläre Regulationsmechanismen erforderlich, da in der vorliegenden Arbeit in Vorexperimenten mit vorübergehend eingefrorenen Monozytenproben z. T. 100 %ige Blockaden erreicht wurden. Für das Gerinnen des Poolplasmas im RKZ-Ansatz mit sterilem DPBS als Probe ist darüber hinaus eine Gerinnungsaktivierung durch eine prokoagulante Eigenaktivität des Plasmas in Wechselwirkung mit den Kunststoffoberflächen des Behältnisses in Betracht zu ziehen. Bei allen genannten Arten der TF-unabhängigen Gerinnungsaktivierung könnte die Phospholipid-/Phosphatidylserinmenge limitierend und damit determinierend für die TF-unabhängige PCA-Induktion sein [Barrowcliffe et al. 2002]. Der relativ konstante Anteil nicht blockierbarer PCA wäre

dann ein Hinweis auf eine miteinander einhergehende Steigerung von TF-Oberflächenexpression und Phospholipid-Exposition.

4.3.2 Korrelation von RKZ bzw. rPCA und TF-Oberflächenexpression

Für ein breites Spektrum von Inkubationsarten (spezifisches Fc γ R-Crosslinking/Anti-Fc γ R-F(ab') $_2$ s, IVIg, autologes Plasma, LPS und Negativkontrollen) zeigte sich in insgesamt 5 unabhängigen Experimenten mit 60 Einzelinkubationen für RKZ und monozytäre summierte TF-Fluoreszenzintensität ($TF-SFI_{MO} = (\text{mediane})\ TF-MFI$ der Monozytenpopulation, multipliziert mit deren Zellzahl) eine gute lineare Korrelation im doppelt-logarithmischen Diagramm; entsprechend ergab sich für rPCA und $TF-SFI_{MO}$ eine gute lineare Korrelation im normalen, doppelt-linearen Diagramm (echte lineare Korrelation). Diese über einen weiten Aktivitätsbereich bestehenden Zusammenhänge mit weiterhin empirischer Reproduzierbarkeit einer Aktivitätskonstante des eingesetzten Poolplasmas stützen die Annahme, dass von Autofluoreszenz und unspezifischer Antikörperbindung keine wesentliche Störung ausging. Zusammen mit der Tatsache, dass Tissue Factor in den durchgeföhrten Experimenten (mit Monozytenisolaten) hauptsächlich von Monozyten stammt, kann dort näherungsweise von einer linearen Korrelation auch von rPCA und *TF-Oberflächenexpression* gesprochen werden. Dies steht wiederum im Einklang mit der über weite Konzentrationsbereiche zur rPCA proportionalen blockierbaren – also durch TF verursachten – rPCA (vgl. 4.3.1).

Eine *direkte* bzw. *konsistente* Korrelation der Menge des oberflächenassoziierten TF (-Antigens) mit der oberflächenassoziierten TF-Aktivität ist allerdings nicht grundsätzlich zu erwarten [Eilertsen and Osterud 2004]. Mehrere Studien belegen für bestimmte Situationen eine Divergenz dieser beiden Merkmale mit bis zu 11fachem Anstieg der TF-Aktivität gegenüber der messbaren TF-Oberflächenexpression [Wolberg and Roubey 2004b, Henriksson et al. 2005]. Beispiele dafür sind die „Zellstimulation“ mit Reagenzien wie Calcium-Ionophoren, Cycloheximid oder wiederholtes Einfrieren/Auftauen der Zellen [Wolberg et al. 1999]. Auch für die Stimulation mit LPS in einer Konzentration von mehr als 1 ng/ml wird diese Divergenz beschrieben; ein Zusammenhang mit Apoptose und Zelldesintegration wird angenommen.

Dies bedeutet jedoch nicht, dass eine Korrelation in vielen anderen Situationen nicht trotzdem vorliegen kann, so z. B. – im Gegensatz zu Henriksson et al. – bei Jude et al. und bei Luther et al. für LPS-Stimulation über weite Konzentrationsberei-

che (0,001 bis 100.000 ng/ml) und bei Wolberg und Roubey für Anti-beta-2-Glykoprotein-I-Antikörper, aufgrund einer Aktivitätssteigerung durch Transkription und Translation bei ausbleibender TF-Deencryption [Henriksson et al. 2005, Jude et al. 1995, Luther et al. 1990, Wolberg and Roubey 2004a, Wolberg and Roubey 2004b]. So zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit (3.1.3.3) eine Korrelation von durchflusszytometrisch gemessenen oberflächenassoziierten (monozytärem) TF-Antigen und Beschleunigung der Rekalzifizierungszeit als indirektem Parameter der oberflächenassoziierten TF-Aktivität. Gegenüber Jude et al. wurde nicht der Anteil „*TF-positiver*“ Zellen der CD14⁺-Zellen, sondern die (mediane) *TF-SFI* der CD14-positiven Zellen ermittelt (in Analogie z. B. zu Nguyen et al. 1999). Möglicherweise dadurch bedingt war zum einen in der vorliegenden Arbeit die Korrelation mit der PCA (in Form der RKZ) wesentlich besser als bei Jude et al. (mittlerer Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient 0,92 vs. ca. 0,50), zum anderen war die Trennschärfe der durchflusszytometrischen Messung gegenüber der des PCA-Assays deutlich erhöht (Vervielfachung des DFZ-Parameters bei 15facher Vervielfachung des PCA-Parameters: ca. 14fach vs. 3fach). So hat die derartige Bestimmung der *TF-SFI_{MO}* eine ähnliche Trennschärfe wie der ELISA bei Jude et al. (PCA-Parameter: 15fach, DFZ-Parameter 15fach) bei noch besserer Korrelation zur PCA als der ELISA (mittlerer Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient 0,92 vs. 0,8).

Diese Methode könnte somit in *bestimmten Fällen* zur Abschätzung der monozytären PCA dienen, abgesehen von den Situationen, in denen die TF-Encryption/Deencryption eine wesentliche Rolle spielt. Ein Hinweis auf eine auch in der vorliegenden Arbeit relevante TF-Encryption/Deencryption könnte der deutliche Unterschied der Variabilitäten der funktionellen rPCA-Messungen und der durchflusszytometrischen TF-Messungen sein, welche eine hohe Inter-Assay-Variabilität bzw. weniger Signifikanzen zeigen (vgl. 3.3.5). Eine mögliche Erklärung wäre, dass *im Großen* (hohes n) ein genereller Zusammenhang aufgedeckt wird, der *im Kleinen* von einer *in bestimmten Fällen* vorliegenden hohen Variabilität verschleiert wird. Eine Etablierung der genannten Methode würde somit weitere Experimente mit u. a. Vergleich unterschiedlicher Poolplasmen sowie Messungen mit aufsteigenden Konzentrationen des zu beurteilenden Stimulus voraussetzen.

4.4 Real-Time-PCR für TF mit absoluter Quantifizierung von TF-cDNA

Als wesentliche Voraussetzung für die absolute Quantifizierung der TF-cDNA konnte die Spezifität der bei Scarpati et al. 1987 beschriebenen TF-Primer auch für die Real-Time-PCR am LightCycler mittels Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese der PCR-Produkte gezeigt werden (vgl. 3.2.2.3).

Anstatt eines Housekeeping-Gens diente die Menge Gesamt-RNA vor der reversen Transkription als Bezugsgröße für die TF-mRNA-Quantifizierung in unterschiedlichen Proben. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeföhrten Variabilitätsabschätzungen illustrieren, dass sich auf dem Weg von der RNA zum Crossing Point bei der LightCycler-PCR der Fehler in Maßen hält. Der Vorteil, ribosomale RNA oder Gesamt-RNA (zum größten Teil aus ribosomaler RNA und wesentlich weniger aus mRNA bestehend) als Referenz zu verwenden, ist ihre geringe Variabilität bei Änderung der mRNA-Expression verschiedener Gene [Thellin et al. 1999].

Der wesentliche Einfluss der Effizienz auf die Konzentrationsbestimmung der TF-cDNA zeigt sich in 3.2.3.2. Bereits kleine Änderungen der Effizienz können bei um mehrere Zyklen differierenden Proben große Auswirkungen haben (hier bis 50 %). Für die absolute Bestimmung der Konzentrationen ist in der vorliegenden Arbeit auch eine weitgehend gleiche Effizienz für TF-Standards (Amplimere) und Proben (DNA-Transkript der Gesamt-RNA) erforderlich. Für die aufgeführten Experimente legen parallele Kurvenverläufe der SYBR-Green-I-Fluoreszenz eine vergleichbare Effizienz nahe.

Die hier eingesetzte Methode „Second Derivative Maximum“ erlaubt eine benutzerunabhängige einfache Ermittlung von Crossing Points und wurde deswegen der Methode „Fit Points“ vorgezogen. Der Nutzen der etwas höheren Genauigkeit im Rahmen der Fit-Points-Methode würde durch die assoziierten benutzerabhängigen Fehlermöglichkeiten und die anderen Variabilitäten auf dem Weg von mRNA zum Crossing Point relativiert werden.

Die absolute Quantifizierung von mRNA könnte mit hoher Genauigkeit (anstatt der hier verwendeten Approximation aus der absoluten cDNA-Menge) durch zusätzliche Bestimmung der *RT-Effizienz* erfolgen. Die approximierten mRNA-Kopienzahlen aus einem in Abschnitt 3.2.2.3 aufgeführten Experiment stehen mit 1,5 Mio. Kopien/ μ g Gesamt-RNA (einstündige Inkubation ohne Stimulation) bzw. 19 Mio. Kopien/ μ g Gesamt-RNA (einstündige Inkubation mit 150 ng LPS/ml) z. B. gut in Ein-

klang mit den bei van Deursen et al. für humane Monozyten ermittelten Kopienzahlen von 1,5 Mio. Kopien/ μg Gesamt-RNA (Ausgangswert bei 0 h) bzw. 49 Mio. Kopien/ μg Gesamt-RNA (zweistündige Inkubation mit 100 ng LPS/ml) [van Deursen et al. 1999]. Dies spricht für eine realistische Einschätzung der mittleren RT-Effizienz und für eine bezüglich der Größenordnung realistische Quantifizierung der mRNA bzw. cDNA durch die vorgestellte Methode.

4.5 Effekt der selektiven $\text{Fc}\gamma\text{R}$ -Stimulation mit immobilisierten Anti- $\text{Fc}\gamma\text{R-F(ab')}_2\text{s bzw. -Antikörpern auf TF-/PCA-Induktion}$

Auf verschiedenen Ebenen der TF-/PCA-Induktion konnte ein Effekt der $\text{Fc}\gamma\text{R}$ -Stimulation durch immobilisierte Anti- $\text{Fc}\gamma\text{R-F(ab')}_2\text{s bzw. -Antikörper}$ gezeigt werden: für die Ebenen der mRNA-Expression, der gesamten TF-Proteinexpression, der TF-Oberflächenexpression und der prokoagulanten Aktivität wurde ein herausragender Effekt der $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptor-I-Stimulation beobachtet, der z. T. Signifikanzniveau erreichte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Daten von Lyberg und Prydz, Szabo und Miller-Graziano und Keidan et al. [Lyberg and Prydz 1982, Lyberg et al. 1982, Szabo and Miller-Graziano 1990, Keidan et al. 1995], wo eine antikörpervermittelte $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptor-Stimulation zu einem Zuwachs an PCA bzw. TF-Aktivität führte. Die stimulierenden Antikörperaggregate lagen dort in Form von Immunkomplexen (humane Serumalbumin/Transferrin + Antiserum vom Hasen oder immunkomplexhaltige Seren von Menschen mit Autoimmunerkrankungen), Erythrozyten-Antikörper-Komplexen (humane Rh0(D)-Erythrozyten + humanoes Anti-Rh0(D)-Immunglobulin) oder Antikörper-Antikörper-Komplexen (Anti-human-IgG-Antikörper der Ziege + humanoes IgG-haltiges Serum) vor und stimulierten *vorwiegend* bzw. *präferentiell* den $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptor I – aufgrund der hohen Affinität des $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptors I zu IgG. Die in der vorliegenden Arbeit für immobilisierte Antikörper (im IVIg) und Anti- $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptor-I- $\text{F(ab')}_2\text{s}$ gleichartige Induktion von TF-Protein unterstreicht die Bedeutung des $\text{Fc}\gamma$ -Rezeptors I für Voll-Antikörper. Der relativ stärkste Effekt der $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ -Stimulation auch bei Verwendung von F(ab')_2 -Fragmenten könnte prinzipiell von einer *höheren Expressionsdichte* oder einer stärkeren *Aktivierungspotenz* des $\text{Fc}\gamma\text{RI}$ im Vergleich zu $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ und $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ herrühren. Eine komplette Beschichtung des Schalenbodens

durch die eingesetzten Antikörper bzw. F(ab')₂-Fragmente konnte durch Vorexperimente bestätigt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit besonders ausgeprägte PCA-Induktion durch immobilisierte *Antikörper* (IVIg und Anti-Fcγ-Rezeptor-Antikörper) gegenüber den Anti-FcγR-F(ab')₂s könnte ein Hinweis auf eine zusätzliche effektverstärkende Interaktion zwischen Fc-Teil des Antikörpers und Fcγ-Rezeptor I sein. Ein derartiger potenzierender oder permissiver Effekt wurde 1995 von Pfefferkorn et al. für bestimmte IgG-Subklassen verschiedener Spezies beschrieben, zumindest bei murinem IgG₁ (Subklasse der verwendeten Anti-Fcγ-Rezeptor-Antikörper) waren die entsprechenden Wechselwirkungen allerdings sehr gering. Auch wenn zur vollen Entfaltung der durch Antikörper vermittelbaren prokoagulanten Aktivität (z. B. bei der Stimulation mit Immunkomplexen) zusätzliche Mechanismen außer Koligation von Fcγ-Rezeptoren und Bindung von Fc-Regionen erforderlich sind, liefert die vorliegende Arbeit weitere Indizien dafür, dass eine alleinige FcγR-Stimulation bzw. -Koligation zur Entwicklung messbarer prokoagulanter Aktivität ausreichen kann. Für die normalerweise überwiegend CD16-negativen Gesamtmonozyten wäre eine Verhalten ähnlich der speziell hier verwendeten Anreicherungen CD16-negativer Monozyten denkbar.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Zeitverläufe für die Gesamt-Proteinexpression von TF implizieren, dass der Haupteffekt der TF-Proteinsynthese nach 6–12 Stunden erreicht ist. Die in zwei der oben zitierten Arbeiten erfasste prokoagulante Aktivität gipfelte etwas später nach ca. 15 h bzw. ca. 20 h. Dies ist kein Widerspruch, da die PCA auch durch Umverteilung von TF an die Oberfläche, Aktivierung von bereits oberflächenassoziiertem TF oder zusätzliche Phospholipidexposition gesteigert werden kann. Die Zeitverläufe der Negativkontrollen weisen außerdem auf eine Hochregulierung von TF-Protein sowohl bei Positiv- als auch bei Negativisierung hin. Die der Hauptinkubation vorangehende ca. 17-stündige Vorinkubation der positivisolierten Monozyten bietet eine Erklärung dafür, dass deren TF-Proteinexpression – wie bei den negativisolierten Monozyten ca. 17 h nach Inkubationsbeginn – abfällt.

Weiterhin lieferte die vorliegende Arbeit Anhalte für eine variable Induktion von TF-Expression bzw. PCA bei Stimulation des Fcγ-Rezeptors II; nahezu kein Effekt (z. T. auch ein leicht negativer Effekt) wurde bei Stimulation des Fcγ-Rezeptors III beobachtet. Arbeiten zur selektiven Fcγ-Rezeptor-II- oder Fcγ-Rezeptor-III-Stimulation konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Diese Ergebnisse der

vorliegenden Arbeit sind jedoch gut mit der heutigen Datenlage vereinbar, was in Abschnitt 4.6 noch weiter ausgeführt ist. Für die Heterogenität der Effekte des Fc γ -Rezeptors II ist seine Doppelrolle (Aktivierung durch Fc γ RIIA und Inhibierung durch Fc γ RIIB) eine mögliche Erklärung. Differenziertere Untersuchungen werden durch erst kürzlich beschriebene, hochselektiv gegen den humanen Fc γ RIIB gerichtete Antikörper ermöglicht [Veri et al. 2007].

4.6 Effekt der selektiven Fc γ R-Stimulation mit gelösten Anti-Fc γ R-F(ab')₂s auf Zellaktivierung, TF- und PCA-Induktion

Das selektive Crosslinking der drei Fc γ -Rezeptor-Klassen mit primären und sekundären *gelösten* F(ab')₂s zeigte beim zellulären Calcium-Influx als Sofortreaktion eine der TF-/PCA-Induktion (4.5) vergleichbare Effektkonstellation mit z. T. statistischer Signifikanz: der stärkste Calcium-Influx wurde durch die Anti-Fc γ -RI-F(ab')₂s vermittelt, der schwächste durch die Anti-Fc γ -RIII-F(ab')₂s, für die Anti-Fc γ -RII-F(ab')₂s ergab sich eine Mittelstellung. Die alleinige Inkubation mit dem „primären“, gegen den Fc γ -Rezeptor gerichteten F(ab')₂ ergab insbesondere für das Anti-Fc γ RI-F(ab')₂ keinen sofortigen Effekt, eine unterschiedliche Voraktivierung innerhalb der ersten 1–2 Stunden nach Beladung mit primären Anti-Fc γ R-F(ab')₂s konnte auch nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von MacIntyre et al. und Van de Winkel et al., die Ende der 80er Jahre die Aktivierung von Monozyten der humanen monozytären Zelllinie U937 durch Crosslinking des Fc γ RII untersuchten [MacIntyre et al. 1988, Van de Winkel et al. 1990]. Dort konnte auch erst ein relevanter Calcium-Influx erzeugt werden, als die Anti-Fc γ RII-F(ab')₂s mit sekundären F(ab')₂s vernetzt wurden. Eine ähnliche Abstufung von Effekten zeigte sich auch bei Rankin et al. [Rankin et al. 1993], wo für Monozyten der Zelllinie THP-1 ein analoges Crosslinking mit primären und sekundären F(ab')₂-Fragmenten – selektiv für die drei Fc γ -Rezeptorklassen – erfolgte.

Bei Drechsler et al. ergab sich 2002 für das Crosslinking von Fc γ -Rezeptoren humaner Spendermonozyten (primär monoklonaler Antikörper, sekundär IgG-Fab) hinsichtlich der Aktivierung des vielseitigen Transkriptionsregulators NF-κB eine Abstufung der Effekte mit Fc γ RI > Fc γ RII > Fc γ RIII ≈ Kontrolle analog der in der vorliegenden Arbeit für den Calcium-Influx gefundenen Rangfolge. Über NF-κB könnte ein

derartiges Fc γ R-Crosslinking schließlich auch zur Hochregulierung der Transkription des TF-Gens und damit zur PCA-Induktion führen, wofür aber keine entsprechende Literatur gefunden wurde. In der vorliegenden Arbeit resultierten die noch beim Calcium-Influx für die drei Fc γ R-Klassen unterschiedlichen Effekte nach prolongierter 6-stündiger Inkubation mit den sekundären F(ab') $_2$ s auch nicht in analogen Veränderungen der TF-MFI (als grobes Maß für die TF-Oberflächenexpression) oder der Rekalzifizierungszeit (als Maß für die prokoagulante Aktivität). Der einzige Fc γ R-spezifische Effekt war ein statistisch signifikanter Abfall der TF-MFI unter Crosslinking des Fc γ RIII gegenüber der Kontrollinkubation mit alleinig sekundärem F(ab') $_2$ – was prinzipiell zu der ansonsten bei Fc γ RIII-Aktivierung ausgebliebenen (und z. T. sogar abgeschwächten) TF-/PCA-Induktion passt. Weitere geringe Unterschiede könnten auch durch einen beobachteten aktivierenden Effekt des sekundären F(ab') $_2$ s bezüglich rPCA- und TF-Induktion verwischt worden sein. Dieser war klein, aber statistisch signifikant. Aufgrund der vorbeschriebenen minimalen Kreuzreaktivitäten und der ausbleibenden Wirkung beim Calcium-Influx sind dabei aktivierende Wechselwirkungen in Betracht zu ziehen, die mit der stundenlangen Präsenz des sekundären F(ab') $_2$ s in der Inkubationslösung zu tun haben könnten, so z. B. Internalisierung oder Reaktion auf dieses „Fremdantigen“. Möglicherweise ist aber der Effekt des Fc γ R-Crosslinkings nur von kurzer Dauer und reicht alleine nicht aus, eine Veränderung der TF-Expression oder PCA auszulösen. Analogien finden sich z. B. bei MacIntyre et al. 1988. Dort konnte mit primären, gegen den Fc γ RII gerichteten F(ab') $_2$ s und sekundären F(ab') $_2$ s zwar ein Calcium-Influx erreicht werden, eine komplexere Zellreaktion (Produktion des Hyperoxid-Anions O $_2^-$) trat jedoch nur bei *zusätzlicher Vorbehandlung mit γ -Interferon* auf. Der grundlegendste Unterschied zwischen den gelösten und den adhärenten F(ab') $_2$ s betrifft ihre Mobilität. So können adhärente, im Gegensatz zu gelösten F(ab') $_2$ s, IgG-Antikörpern (vgl. [Guyre et al. 2001]) und Immunkomplexen [Takai 2005], nicht von den Monozyten aufgenommen werden. Eine Abschwächung des Stimulationseffektes nach Aufnahme (bei fehlender Dauerexposition) ist gut möglich, während bei fehlender Aufnahmemöglichkeit (oder Dauerexposition) die Stimulation protrahiert verlaufen kann. Außerdem können die Fc γ -Rezeptoren herunterreguliert [Guyre et al. 2001] oder – im Falle der gelösten F(ab') $_2$ s – internalisiert werden, wodurch eine weitere Stimulation durch noch vorhandene gelöste Anti-Fc γ R-F(ab') $_2$ s unterdrückt würde. Dass sich beim Calcium-Influx *kurz* nach

Crosslinking der Fc γ -Rezeptoren ein Effekt ähnlich den Ergebnissen bei adhärenten F(ab')₂s zeigt, wäre damit vereinbar.

4.7 Regulation der CD16-Oberflächenexpression unter LPS-Stimulation

Der Anteil der CD16 $^{+}$ -Monozyten (Gesamtbetrachtung der Subpopulationen CD14 $^{\text{lo}}$ CD16 $^{+}$ und CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$) nahm unter Stimulation mit LPS sowohl in Inkubationen mit Vollblut als auch in den Inkubationen mit negativisolierten Monozyten ab.

Im Gegensatz zu den Daten dieser Arbeit wird für viele Entzündungszustände, insbesondere für die Sepsis ein erhöhter Anteil an CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$ -Monozyten beschrieben [Ziegler-Heitbrock 2007, Fingerle et al. 1993]. Sehr anschaulich illustrieren dies die Darstellungen der durchflusszytometrischen Daten bei Mackensen et al., wo Monozyten in vivo durch Injektionen mit LPS exponiert wurden [Mackensen et al. 1992]. Für die CD14 $^{\text{dim}}$ CD16 $^{+}$ -Subpopulation wurde z. B. von Skinner et al. für LPS-Stimulation unter ähnlichen Bedingungen (Vollblut gesunder Blutspender, das 0, 2 und 20 h mit 100 ng/ml LPS von *E. coli* O55:B5 inkubiert wurde) sowie für Stimulation mit SEB (Staphylokokken-Enterotoxin B, 100 ng/ml) eine signifikante Vermehrung gezeigt [Skinner et al. 2005]. Bei vergleichender Betrachtung der Dotplots von Skinner et al. (die exemplarisch nur für die Stimulation mit SEB dargestellt wurden) mit den Dotplots der Vollblutinkubationen dieser Arbeit (Abb. 34 a, b, c) zeigen sich dennoch wesentliche Gemeinsamkeiten. So verlagert sich in beiden Arbeiten die Hauptpopulation der Monozyten nach rechts hin zu höheren CD16-Expressionen. Dies würde auch in der vorliegenden Arbeit – bei Wahl der CD16 $^{-}$ /CD16 $^{+}$ -Grenze etwa im Zentrum der Monozyten-Hauptpopulation (ähnlich wie bei Skinner et al.) – zu einer Zunahme der CD16 $^{+}$ -Monozyten unter LPS-Stimulation führen.

Im Einklang mit den Daten dieser Arbeit stehen Ergebnisse von Otterlei et al. [Otterlei et al. 1995]. Dort zeigten sich für aus BuC-Präparaten stammende, adhärentselektierte Monozyten bei LPS-Stimulation (1000 ng/ml) folgende Veränderungen. Der Anteil der CD16 $^{+}$ -Monozyten (CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$ und CD14 $^{-}$ CD16 $^{+}$) fiel von 71 % auf 45 % (nach 2 h) bzw. auf 51 % (über Nacht) und für andere Anti-CD14- und Anti-CD16-Antikörper von 69 % auf 55 % (nach 2 h) bzw. auf 62 % (über Nacht). Die CD14 $^{-}$ /CD16 $^{+}$ -Subpopulation sank dabei von 29 % über Nacht auf 7 % (31 % nach 2 h) und für die anderen Anti-CD14- und Anti-CD16-Antikörper von 14 % über Nacht

auf 2 % (19 % nach 2 h). Erwähnenswert ist noch der bei Otterlei et al. bereits vor Stimulation außergewöhnlich hohe Anteil an CD16⁺-Monozyten (ca. 70 %) – was hauptsächlich durch das Gating, möglicherweise aber auch durch die vorangehende Isolierung der Monozyten bedingt schien.

Diese Ergebnisse und die der vorliegenden Arbeit illustrieren die Komplexität der Veränderungen der CD14- und CD16-Oberflächenexpression bzw. -MFI und die Notwendigkeit, genaue Kriterien für Gating und Messung zu definieren, damit Ergebnisse sinnvoll miteinander verglichen werden können (vgl. [Ziegler-Heitbrock 2007]). Außer diesen Messkriterien sind weitere bedeutende Einflussfaktoren auf den Messwert für die CD16-MFI und damit auf die ermittelte CD16-Oberflächenexpression möglich, insbesondere das Milieu der Stimulation (in vivo/in vitro; Beschreibungen einer Hochregulation von CD16 unter Zellkulturbedingungen [Clarkson and Ory 1988, Darby et al. 1994]), ggf. die Isolierungsmethode, die Medien (z. B. Hochregulation der CD16-Expression von Monozyten bei Raumtemperatur, wenn das Blut in Lithium-Heparin oder ACD abgenommen wird [Ellery and Crowe 2005]), die Konzentration von LPS und möglicherweise sogar die Art des LPS. Eine artifizielle Reduktion der CD16⁺-Monozyten durch Adhärenz (wie für künstliche Membranen vermutet und in mehreren Studien gezeigt [Ziegler-Heitbrock 2007, Sester et al. 2001]) sollte in der vorliegenden Arbeit keine wesentliche Rolle spielen, da gerade für Kunststoffoberflächen eine geringere Adhärenz der CD16⁺-Monozyten beschrieben wurde [Passlick et al. 1989].

4.8 Abhängigkeit der TF-Expression und TF-Aktivität (bzw. rPCA) von der Fc γ RIII-Expression

Die TF-MFI bzw. die rPCA der CD16⁺-Monozyten war nach Stimulation mit LPS im Mittel kleiner als die der CD16⁻-Monozyten. In den Inkubationen ohne Stimulus zeigte sich bei den CD16⁺-Monozyten nur die TF-MFI geringer, nicht jedoch die rPCA, die sich auf gleichem bzw. höherem Niveau wie die der CD16⁻-Monozyten befand.

Der Grund dafür, dass bei den CD16⁺-Monozyten die rPCA nicht – wie die TF-MFI – niedriger war, als bei den CD16⁻-Monozyten, könnte darin liegen, dass die Isolationsprozedur besonders die CD16⁺-Monozyten aktivierte [Ellery and Crowe 2005, Ziegler-Heitbrock 2007]. Passend zu den hier erhobenen Daten trüte dann diese Voraktivierung mit zunehmender Inkubationsdauer in den Hintergrund. So zeigten die CD16⁺-Monozyten nach 6 h Inkubation ohne LPS noch eine höhere rPCA als die CD16⁻

Monozyten, nach 10 h Inkubation aber bereits eine vergleichbare rPCA. Dass dieser Effekt nicht auch bei den Inkubationen mit LPS auftrat, könnte an der vergleichsweise überragend starken Wirkung von LPS liegen.

Analoge Arbeiten, in denen die Induktion von TF bzw. rPCA durch LPS für CD16⁻/CD16⁺-Monozytensubpopulationen verglichen wird, konnten im Rahmen einer Medline-Recherche (1960–2007) nicht gefunden werden. Die in einem Review von Grage-Griebenow et al. [Grage-Griebenow et al. 2001a] zusammengestellten funktionellen Eigenschaften der CD16⁺(CD14^{dim})-Monozyten und der CD16⁻(CD14⁺)-Monozyten implizieren aber zusammen mit den Daten von Guha und Mackman [Guha and Mackman 2001] ein Verhalten, wie es in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. So zeigt die normalerweise mit mehr als 80 % vorherrschende CD16⁻(CD14⁺)-Subpopulation eine höhere Zytokin-Freisetzung (TNF-alpha, IL-1 und IL-6), eine höhere Phagozytose- und Myeloperoxidase-Aktivität sowie eine höhere antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität, als die normalerweise zu weniger als 10 % vorliegende CD16⁺(CD14^{dim})-Subpopulation. Außer der Expression von TF kann gerade auch die Freisetzung dieser genannten Zytokine durch LPS induziert bzw. über CD14 vermittelt werden [Guha and Mackman 2001]. Bei Grage-Griebenow wird zwar als weitere CD16-positive, größtmäßig relevante Subpopulation noch die CD16⁺CD14⁺CD64⁺-Subpopulation abgegrenzt, die ein ähnliches Verhalten wie die CD16⁻(CD14⁺)-Subpopulation zeigt; da beide CD16-positiven Subpopulationen aber in vergleichbaren Größenordnungen (jeweils < 10 %) vorliegen, wäre eine gewisse Prägung des Summeneffekts der CD16⁺-Monozyten durch die CD16⁺(CD14^{dim})-Subpopulation zu erwarten.

Eine nahe liegende Erklärung für die verminderte LPS-Empfindlichkeit der CD16⁺-Monozyten wäre die (im Mittel) geringere Expression der LPS-Rezeptorkomponente CD14 auf dieser Monozytensubpopulation (z. B. [Grage-Griebenow et al. 2001a]). Die niedrigere CD14-Expression wäre somit evtl. Ausdruck einer geringeren Relevanz des LPS-Rezeptorkomplexes auf den CD16⁺-Monozyten. Für diese Erklärung spricht, dass außer der TF-Expression gerade die oben erwähnte Zytokin-Freisetzung (TNF-alpha, IL-1 und IL-6) LPS-induziert bzw. CD14-vermittelt ist [Guha and Mackman 2001].

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit liefert Anhalte für eine unterschiedlich ausgeprägte Induzierbarkeit von Tissue Factor (TF) bzw. prokoagulanter Aktivität (PCA) durch selektive Stimulation der drei monozytären Fc γ -Rezeptor-Klassen Fc γ RI, Fc γ RII(A/B) und Fc γ RIIA. Auf verschiedenen Ebenen der TF- bzw. Gerinnungsinduktion konnte ein herausragender Stimulationseffekt des Fc γ -Rezeptors I gegenüber den Fc γ -Rezeptoren IIA/B und IIIA gezeigt werden; auf RNA-Ebene gelang dies durch Etablierung einer Real-Time-PCR (inkl. reverser Transkription) mit absoluter Quantifizierung der TF-cDNA. Über den Fc γ -Rezeptor IIIA wurde keine TF-/Gerinnungsinduktion erreicht, während die unselektive Stimulation der Fc γ -Rezeptoren IIA/B diesbezüglich bei variablen Effekten eine Zwischenstellung einnahm. Diese Ergebnisse sind weitere Indizien für die in der Literatur z. T. kontrovers diskutierte eigenständige Rolle der Fc γ -Rezeptoren der Induktion von Tissue Factor bzw. prokoagulanter Aktivität. Ob der herausragende Effekt des Fc γ -Rezeptors I auf einer relativ höheren Oberflächenexpression oder auf einer relativ höheren Aktivierungspotenz beruht, ist anhand der Daten nicht sicher zu entscheiden, eine besondere Stellung unter den Fc γ -Rezeptoren ist jedoch in beiden Fällen anzunehmen. Die Abstufung der Effekte der drei Fc γ -Rezeptor-Klassen auf die TF-Expression bzw. PCA zeigt Analogien zu deren Wirkung auf den zellulären Calcium-Influx und die NF- κ B-Expression; die Zwischenstellung des Fc γ RII kann durch eine gleichzeitige Aktivierung (Fc γ RIIA) und Inhibition (Fc γ RIIB) verursacht sein.

Obwohl eine gezielte Aktivierung der Fc γ -Rezeptoren sowohl mit Anti-Fc γ R-Antikörpern als auch mit Anti-Fc γ R-F(ab') $_2$ -Fragmenten und sowohl mit immobilisierten wie auch mit gelösten Anti-Fc γ R-F(ab') $_2$ -Fragmenten gezeigt werden konnte, ergeben sich dabei auch wesentliche Unterschiede. So war die TF-/PCA-Induktion mit immobilisierten Anti-Fc γ R-Antikörpern stärker ausgeprägt als mit immobilisierten Anti-Fc γ R-F(ab') $_2$ s – mit gelösten Anti-Fc γ R-F(ab') $_2$ s (und crosslinkenden sekundären F(ab') $_2$ s) konnte sie nur am Anfang der Aktivierungskaskade über den Calcium-Influx nachgewiesen werden. Speziesübergreifende Wechselwirkungen des Fc-Teils der Antikörper mit den Fc γ -Rezeptoren sowie Aufnahme von gebundenen Anti-Fc γ R-F(ab') $_2$ s durch die Fc γ -Rezeptoren könnten dabei eine Rolle spielen.

Die prokoagulante Aktivität konnte für ein breites Spektrum von Inkubationsarten (Fc γ -Rezeptor-Crosslinking, Lipopolysaccharid, intravenöses Immunglobulin, autologes Plasma) weitestgehend – aber nicht vollständig – auf Tissue Factor zurückgeführt werden. Einerseits gelang mit einem neutralisierenden Anti-TF-Antikörper ein Blockade von ca. 95 % der prokoagulanten Aktivität, andererseits korrelierte die monozytäre Tissue-Factor-Fluoreszenzintensität in der vorliegenden Arbeit gut mit der prokoagulanten Aktivität. Die nicht blockierbare PCA kann auf eine TF-unabhängige Gerinnungsinduktion hinweisen. Die gute Korrelation zwischen messbarer Menge an TF und Gerinnungsinduktion ist bemerkenswert, da in verschiedenen Situationen auch eine deutliche Diskrepanz vorliegen kann. Die dafür verantwortliche sog. TF-Encryption/-Deencryption ist noch nicht gänzlich verstanden und stellt ein weiterhin intensiv beforschtes Feld dar.

Der Fc γ -Rezeptor-IIIA als wichtigster Marker monozytärer Subpopulationen zeigte in seiner Oberflächenexpression überwiegendst negative Korrelationen mit dem vorhandenen Grad und der Induzierbarkeit von TF-Oberflächenexpression bzw. PCA. Die Regulation der CD16-Oberflächenexpression unter LPS erwies sich als komplex und leicht verschieden für Inkubationen mit Vollblut und negativisierten Monozyten. Hauptmerkmal war der Verlust der stark CD16-exprimierenden Monozyten durch unstimulierte Inkubation und ausgeprägter durch Inkubation mit LPS; damit einhergehend verlagerte sich die Monozytenhauptpopulation zu höherer CD16-Expression (Vollblut-Monozyten) bzw. entgegengesetzt (negativisierte Monozyten). Passend zu dem beobachteten Verlust der CD16-Expression unter LPS korrelierte bei den Vollblut-Monozyten und den negativisierten Monozyten nach LPS-Stimulation eine hohe CD142-Fluoreszenzintensität mit einer niedrigen CD16-Fluoreszenzintensität und umgekehrt. Die Etablierung der Anreicherung von CD16 $^{+}$ /CD16 $^{-}$ -Monozyten ermöglichte schließlich getrennte Untersuchungen dieser Subpopulationen: für den potenteren Stimulus LPS zeigten die angereicherten CD16 $^{+}$ -Monozyten im Mittel eine geringere PCA-Antwort als die angereicherten CD16 $^{-}$ -Monozyten. Insbesondere der Verlust der stärker CD16-exprimierenden Monozyten unter LPS ist nach der heutigen Datenlage untypisch – in der Literatur finden sich aber auch vereinzelt Parallelen, wobei den durchflusszytometrischen Gating-Kriterien entscheidende Bedeutung zukommt. Für die gemessene geringere PCA und TF-Oberflächenexpression der CD16 $^{+}$ -Monozyten unter LPS konnten in der Literatur

keine Analoga gefunden werden, ein entsprechendes Verhalten steht jedoch prinzipiell im Einklang mit den Kenntnissen über die CD16⁻/CD16⁺-Subpopulationen.

Zusammengenommen prägen diese Ergebnisse somit ein Bild vom Fc γ -Rezeptor IIIA als Negativ-Indikator für PCA bzw. PCA-Induzierbarkeit und vom Fc γ -Rezeptor I als entsprechendem Positivindikator; weiterhin wurden die Relevanz der Stimulationsart der Fc γ -Rezeptoren hervorgehoben und mögliche Zusammenhänge zwischen PCA und TF-Oberflächenexpression aufgezeigt.

Das bessere Verständnis der Rolle der Fc γ -Rezeptoren kann helfen, eine pathologische Gerinnungsinduktion im Rahmen akuter Erkrankungen (wie disseminierte intravasale Gerinnung) oder chronischer Entzündungsprozesse (wie Arteriosklerose oder Autoimmunerkrankungen mit Immunkomplexbildung) zu modulieren. Dabei kann das Expressionsmuster der Fc γ -Rezeptoren diagnostische und prognostische Bedeutung haben, die Oberflächenexpression von TF als Ansatzpunkt für medikamentöse Intervention, und unter bestimmten Bedingungen als Marker für die prokoagulante Aktivität dienen. Die einzigartige Funktion, die Monozyten an der Schnittstelle zwischen Immun- und Gerinnungssystem wahrnehmen, macht in diesem Kontext weitere Untersuchungen lohnenswert. So wäre im Rahmen der Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen bzw. Schaumzellbildung die PCA-Induzierbarkeit insbesondere der CD14⁺⁺CD16⁺CD32⁺-Monozyten durch Fc γ -Rezeptor-Stimulation über IgG- oder CRP-opsoniertes modifiziertes LDL interessant; die CD32-Expression könnte dabei mit Hilfe neuer hochselektiver Antikörper hinsichtlich aktivierendem CD32A und inhibierendem CD32B spezifiziert werden. Die Maskierung/Demaskierung von Tissue Factor und die Tissue-Factor-unabhängige Gerinnungsaktivierung stellen weitere pathophysiologisch relevante Aspekte dar, deren Erforschung von Bedeutung ist.

6 LITERATUR

- Abdel Shakor AB, Kwiatkowska K, Sobota A** (2004). Cell surface ceramide generation precedes and controls FcgammaRII clustering and phosphorylation in rafts. *J Biol Chem (United States)*, 279(35), 36778–87
- Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, et al.** (2006). Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A (United States)*, 103(38), 13932–7
- Akiyama Y, Miller PJ, Thurman GB, et al.** (1983). Characterization of a human blood monocyte subset with low peroxidase activity. *J Clin Invest (United States)*, 72(3), 1093–105
- Allen DH, Tracy PB** (1995). Human coagulation factor V is activated to the functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface. *J Biol Chem (United States)*, 270(3), 1408–15
- Allen RW, Trach KA, Hoch JA** (1987). Identification of the 37-kDa protein displaying a variable interaction with the erythroid cell membrane as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem (United States)*, 262(2), 649–53
- Bach R, Rifkin DB** (1990). Expression of tissue factor procoagulant activity: regulation by cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A (United States)*, 87(18), 6995–9
- Bach RR** (1988). Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit Rev Biochem (United States)*, 23: 339–68
- Bach RR, Moldow CF** (1997). Mechanism of tissue factor activation on HL-60 cells. *Blood (United States)*, 89(9), 3270–6
- Barrowcliffe TW, Fabregas P, Jardi M, et al.** (2002). Procoagulant activity of T lymphoblastoid cells due to exposure of negatively charged phospholipid. *Thromb Haemost (Germany)*, 87(3), 442–9
- Baumgarth N, Roederer M** (2000). A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods (Netherlands)*, 243(1–2), 77–97
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al.** (2004). CD87 (urokinase-type plasminogen activator receptor), function and pathology in hematological disorders: a review. *Leukemia (U. K.)*, 18(3), 394–400

- Bennett** S, Breit SN (1994). Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. *J Leukoc Biol* (United States), 56(3), 236–40
- Bharadwaj** D, Mold C, Markham E, et al. (2001). Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol* (United States), 166(11), 6735–41
- Bharadwaj** D, Stein MP, Volzer M, et al. (1999). The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. *J Exp Med* (United States), 190(4), 585–90
- Bodin** S, Viala C, Ragab A, et al. (2003). A critical role of lipid rafts in the organization of a key FcgammaRIIa-mediated signaling pathway in human platelets. *Thromb Haemost* (Germany), 89(2), 318–30
- Bodman-Smith** KB, Gregory RE, Harrison PT, et al. (2004). FcgammaRIIa expression with FcgammaRI results in C-reactive protein- and IgG-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* (United States), 75(6), 1029–35
- Bogdanov** VY, Balasubramanian V, Hathcock J, et al. (2003). Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* (United States), 9(4), 458–62
- Bouchard** BA, Tracy PB (2001). Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr Opin Hematol* (United States), 8(5): 263–9
- Brekke** OH, Michaelsen TE, Sandlie I (1995). The structural requirements for complement activation by IgG: does it hinge on the hinge? *Immunol Today* (U. K.), 16(2), 85–90
- Broussas** M, Cornillet-Lefebre P, Bernard J, et al. (2000). Separation of dendritic cells from highly purified human monocytes by counterflow centrifugation induces tissue factor expression. *Transfusion* (United States), 40(9), 1088–94
- Buechler** C, Ritter M, Orso E, et al. (2000). Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* (United States), 67(1), 97–103
- Butenas** S, Brummel KE, Branda RF, et al. (2002). Mechanism of factor VIIa-dependent coagulation in hemophilia blood. *Blood* (United States), 99(3), 923–30
- Butenas** S, Mann KG (2002). Blood coagulation. *Biochemistry* (Russia, Mosc), 67: 3–12

- Butenas** S, Mann KG (2004). Active tissue factor in blood ? Nat Med (United States), 10: 1155–6
- Cai** H, Song C, Endoh I, et al. (2007). Serum amyloid A induces monocyte tissue factor. J Immunol (United States), 178(3), 1852–60
- Cai** H, Song C, Lim IG, et al. (2005). Importance of C-reactive protein in regulating monocyte tissue factor expression in patients with inflammatory rheumatic diseases. J Rheumatol (Canada), 32(7), 1224–31
- Calverley** DC, Varteresian T, Brass E, et al. (2004). Association between monocyte Fcgamma subclass expression and acute coronary syndrome. Immun Ageing (U. K.), 1(1), 4
- Carmeliet** P, Mackman N, Moons L, et al. (1996). Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. Nature (U. K.), 383, 73–5
- Chen** VM, Ahamed J, Versteeg HH, et al. (2006). Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond. Biochemistry (United States), 45(39), 12020–8
- Choi** G, Schultz MJ, Levi M, van der Poll T (2006). The relationship between inflammation and the coagulation system. Swiss Med Wkly (Switzerland), 136: 139–44
- Cirillo** P, Golino P, Calabro P, et al. (2005). C-reactive protein induces tissue factor expression and promotes smooth muscle and endothelial cell proliferation. Cardiovasc Res (Netherlands), 68(1), 47–55
- Clarkson** SB, Ory PA (1988). CD16. Developmentally regulated IgG Fc receptors on cultured human monocytes. J Exp Med (United States), 167(2), 408–20
- Conkling** PR, Greenberg CS, Weinberg JB (1988). Tumor necrosis factor induces tissue factor-like activity in human leukemia cell line U937 and peripheral blood monocytes. Blood (United States), 72(1), 128–33
- Consonni** R, Bertina RM (1995). Antigen and functional expression of tissue factor in endotoxin stimulated U937 cells: regulation of activity by calcium ionophore A23187. Thromb Haemost (Germany), 74(3), 904–9
- Contrino** J, Hair G, Kreutzer DL, et al. (1996). In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. Nat Med (United States), 2(2), 209–15
- Czekay** RP, Kuemmel TA, Orlando RA, et al. (2001). Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. Mol Biol Cell (United States), 12(5), 1467–79

- Dahlbäck** B (2005). Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases. *Journal of Internal Medicine (Sweden)*, 257: 209–23
- Darby** C, Geahlen RL, Schreiber AD (1994). Stimulation of macrophage Fc gamma RIIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95Vav and p62/GAP-associated protein. *J Immunol (United States)*, 152(11), 5429–37
- Davie** EW, Ratnoff OD (1964). Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science (United States)*, 145: 1310–2
- de Almeida** MC, Silva AC, Barral A, et al. (2000). A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz (Brazil)*, 95(2), 221–3
- Debets** JM, Van der Linden CJ, Dieteren IE, et al. (1988). Fc-receptor cross-linking induces rapid secretion of tumor necrosis factor (cachectin) by human peripheral blood monocytes. *J Immunol (United States)*, 141(4), 1197–201
- Dijstelbloem** HM, van de Winkel JG, Kallenberg CG (2001). Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol (U. K.)*, 22(9), 510–6
- Doshi** SN, Marmor JD (2002). Evolving role of tissue factor and its pathway inhibitor. *Crit Care Med (United States)*, 30(5 Suppl): 241–50
- Drake** TA, Morrissey JH, Edgington TS (1989). Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol (United States)*, 134(5), 1087–97
- Drechsler** Y, Chavan S, Catalano D, et al. (2002). FcgammaR cross-linking mediates NF-kappaB activation, reduced antigen presentation capacity, and decreased IL-12 production in monocytes without modulation of myeloid dendritic cell development. *J Leukoc Biol (United States)*, 72(4), 657–67
- Egorina** EM, Sovershaev MA, Olsen JO, et al. (2008). Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood (United States)*, 111(3), 1208–16
- Eilertsen** KE, Østerud B (2004). Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood coagulation and Fibrinolysis (United States)*, 15: 521–38
- Eilertsen** KE, Østerud B (2005). The role of blood cells and their microparticles in blood coagulation. *Biochem Soc Trans (U. K.)*, 33(Pt 2), 418–22
- Ellery** PJ, Crowe SM (2005). Phenotypic characterization of blood monocytes from HIV-infected individuals. *Methods Mol Biol (United States)*, 304, 343–53

- Ferro** D, Basili S, Pratico D, et al. (1999). Vitamin E reduces monocyte tissue factor expression in cirrhotic patients. *Blood* (United States), 93(9), 2945–50
- Fingerle** G, Pforte A, Passlick B, et al. (1993). The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* (United States), 82(10), 3170–6
- Fleck** RA, Rao LV, Rapaport SI, et al. (1990). Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res* (United States), 59(2), 421–37
- Freeman** WM, Walker SJ, Vrana KE (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* (United States), 26(1) 112–22, 124–5
- Galon** J, Paulet P, Galinha A, et al. (1997). Soluble Fc gamma receptors: interaction with ligands and biological consequences. *Int Rev Immunol* (Switzerland), 16(1–2), 87–111
- Garner** SF, Thomson AR, Lubenko A, et al. (1994). Monocyte isolation by flow cytometer-monitored centrifugal elutriation: a preparative tool for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) assays. *Br J Biomed Sci* (U. K.), 51(1), 35–43
- Giesen** PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, et al. (1999). Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (United States), 96: 2311–5
- Gordon** S, Taylor PR (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* (U. K.), 5(12), 953–64
- Grage-Griebenow** E, Flad HD, Ernst M (2001a). Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol* (United States), 69(1), 11–20
- Grage-Griebenow** E, Lorenzen D, Fetting R, et al. (1993). Phenotypical and functional characterization of Fc gamma receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. *Eur J Immunol* (Germany), 23(12), 3126–35
- Grage-Griebenow** E, Zawatzky R, Kahlert H, et al. (2001b). Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur J Immunol* (Germany), 31(1), 48–56
- Gregory** SA, Morrissey JH, Edgington TS (1989). Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procoagulant response to endotoxin. *Mol Cell Biol* (United States), 9(6), 2752–5

- Greimers R, Trebak M, Moutschen M, et al.** (1996). Improved four-color flow cytometry method using fluo-3 and triple immunofluorescence for analysis of intracellular calcium ion ($[Ca^{2+}]_i$) fluxes among mouse lymph node B- and T-lymphocyte subsets. *Cytometry (United States)*, 23(3), 205–17
- Grip O, Bredberg A, Lindgren S, et al.** (2007). Increased subpopulations of CD16(+) and CD56(+) blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis (United States)*, 13(5), 566–72
- Guha M, Mackman N** (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal (U. K.)*, 13(2), 85–94
- Guyre CA, Keler T, Swink SL, et al.** (2001). Receptor modulation by Fc gamma RI-specific fusion proteins is dependent on receptor number and modified by IgG. *J Immunol (United States)*, 167(11), 6303–11
- Halvorsen H, Olsen JO, Osterud B** (1993). Granulocytes enhance LPS-induced tissue factor activity in monocytes via an interaction with platelets. *J Leukoc Biol (United States)*, 54(4), 275–82
- Hamik A, Setiadi H, Bu G, et al.** (1999). Down-regulation of monocyte tissue factor mediated by tissue factor pathway inhibitor and the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem (United States)*, 274(8), 4962–9
- Hao QL, Zhu J, Price MA, et al.** (2001). Identification of a novel, human multilymphoid progenitor in cord blood. *Blood (United States)*, 97(12), 3683–90
- Hartung J, Elpelt B, Klösener KH** (1999). Statistik: Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik, Oldenbourg R. Verlag München Wien, 12. Auflage
- Hazebos WL, Gessner JE, Hofhuis FM, et al.** (1996). Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity (United States)*, 5(2), 181–8
- Heine GH, Ulrich C, Seibert E, et al.** (2008). CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int (United States)*, 73(5), 622–9
- Hengst M** (1967). Einführung in die Mathematische Statistik und ihre Anwendung, Bibliographisches Institut AG Mannheim, 1. Auflage
- Henriksson CE, Klingenberg O, Ovstebo R, et al.** (2005). Discrepancy between tissue factor activity and tissue factor expression in endotoxin-induced monocytes is associated with apoptosis and necrosis. *Thromb Haemost (Germany)*, 94(6), 1236–44

- Hillyard** DZ, Jardine AG, McDonald KJ, et al. (2004). Fluvastatin inhibits raft dependent Fcgamma receptor signalling in human monocytes. *Atherosclerosis* (Ireland), 172(2), 219–28
- Hoffman** M (2003). Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis* (Netherlands), 16(1–2), 17–20
- Hoffman** M, Monroe DM, Roberts HR (1994). Human monocytes support factor X activation by factor VIIa, independent of tissue factor: implications for the therapeutic mechanism of high-dose factor VIIa in hemophilia. *Blood* (United States), 83(1), 38–42
- Hume** DA (2006). The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol* (U. K.), 18(1), 49–53
- Iakhiaev** A, Pendurthi UR, Voigt J, et al. (1999). Catabolism of factor VIIa bound to tissue factor in fibroblasts in the presence and absence of tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem* (United States), 274(52), 36995–7003
- Ioan-Facsinay** A, de Kimpe SJ, Hellwig SM, et al. (2002). FcgammaRI (CD64) contributes substantially to severity of arthritis, hypersensitivity responses, and protection from bacterial infection. *Immunity* (United States), 16(3), 391–402
- Johns** J, Blume C, Benz PM, et al. (2006). Platelets promote coagulation factor XII-mediated proteolytic cascade systems in plasma. *Biol Chem* (Germany), 387(2), 173–8
- Jude** B, Suseń S, Flan B, et al. (1995). Detection of monocyte tissue factor after endotoxin stimulation: comparison of one functional and three immunological methods. *Thromb Res* (United States), 79(1), 65–72
- Kapinsky** M, Torzewski M, Buchler C, et al. (2001). Enzymatically degraded LDL preferentially binds to CD14(high) CD16(+) monocytes and induces foam cell formation mediated only in part by the class B scavenger-receptor CD36. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (United States), 21(6), 1004–10
- Keidan** I, Laufer J, Shor R, et al. (1995). Activation of monocytes via their Fc alpha R increases procoagulant activity. *J Lab Clin Med* (United States), 125(1), 72–8
- Kjalke** M, Silveira A, Hamsten A, et al. (2000). Plasma lipoproteins enhance tissue factor-independent factor VII activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (United States), 20(7), 1835–41

- Kocher M, Siegel ME, Edberg JC, et al.** (1997). Cross-linking of Fc gamma receptor IIa and Fc gamma receptor IIIb induces different proadhesive phenotypes on human neutrophils. *J Immunol (United States)*, 159(8), 3940–8
- Konrad S, Engling L, Schmidt RE, et al.** (2007). Characterization of the murine IgG Fc receptor III and IIB gene promoters: a single two-nucleotide difference determines their inverse responsiveness to C5a. *J Biol Chem (United States)*, 282(52), 37906–12
- Kornberg A, Blank M, Kaufman S, et al.** (1994). Induction of tissue factor-like activity in monocytes by anti-cardiolipin antibodies. *J Immunol (United States)*, 153(3), 1328–32
- Lackner KJ, von Landenberg C, Barlage S, et al.** (2000). Analysis of prothrombotic effects of two human monoclonal IgG antiphospholipid antibodies of apparently similar specificity. *Thromb Haemost (Germany)*, 83(4), 583–8
- Lang IM, Mackman N, Kriett JM, et al.** (1996). Prothrombotic activation of pulmonary arterial endothelial cells in a patient with tuberculosis. *Hum Pathol (United States)*, 27(4), 423–7
- Lange S, Bender R** (2001). Was ist ein Signifikanztest ? Allgemeine Aspekte. *Dtsch Med Wochenschr (Germany)*, 126: T42–44
- Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, et al.** (1994). A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J Biol Chem (United States)*, 269(37), 23357–66
- Levi M, van der Poll T** (2005). Two-Way Interactions Between Inflammation and Coagulation. *Trends Cardiovasc Med (United States)*, 15: 254–9
- Liu W, Saint DA** (2002). A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem (United States)*, 302(1), 52–9
- Liu Y, Masuda E, Blank MC, et al.** (2005). Cytokine-mediated regulation of activating and inhibitory Fc gamma receptors in human monocytes. *J Leukoc Biol (United States)*, 77(5), 767–76
- Lopez-Pedrera Ch, Buendia P, Aguirre MA, et al.** (2006). Antiphospholipid syndrome and tissue factor: a thrombotic couple. *Lupus (U. K.)*, 15(3), 161–6
- Lopez-Pedrera C, Jardi M, del Mar Malagon M, et al.** (1997). Tissue factor (TF) and urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) and bleeding complications in leukemic patients. *Thromb Haemost (Germany)*, 77(1), 62–70

- Lubeck** MD, Steplewski Z, Baglia F, et al. (1985). The interaction of murine IgG subclass proteins with human monocyte Fc receptors. *J Immunol* (United States), 135(2), 1299–304
- Luther** T, Flossel C, Hietschhold V, et al. (1990). Flow cytometric analysis of tissue factor (TF) expression on stimulated monocytes--comparison to procoagulant activity of mononuclear blood cells. *Blut* (Germany), 61(6), 375–8
- Lyberg** T, Prydz H (1982). Thromboplastin (factor III) activity in human monocytes induced by immune complexes. *Eur J Clin Invest* (U. K.), 12(3), 229–34
- Lyberg** T, Prydz H, Baklien K, et al. (1982). Effect of immune complex-containing sera from patients with rheumatic diseases on thromboplastin activity of monocytes. *Thromb Res* (United States), 25(3), 193–202
- MacFarlane** RG (1964). An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. *Nature* (U. K.), 202: 498–9
- MacIntyre** EA, Roberts PJ, Abdul-Gaffar R, et al. (1988). Mechanism of human monocyte activation via the 40-kDa Fc receptor for IgG. *J Immunol* (United States), 141(12), 4333–43
- Mackensen** A, Galanos C, Wehr U, et al. (1992). Endotoxin tolerance: regulation of cytokine production and cellular changes in response to endotoxin application in cancer patients. *Eur Cytokine Netw* (France), 3(6), 571–9
- Mackman** N, Tilley RE, Key NS (2007). Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (United States), 27(8), 1687–93
- Mandal** SK, Pendurthi UR, Rao LV (2006). Cellular localization and trafficking of tissue factor. *Blood* (United States), 107(12), 4746–53
- Mann** KG, Brummel K, Butenas S (2003). What is all that thrombin for ? *J Thromb Haemost* (U. K.), 1: 1504–14
- Mantovani** A, Garlanda C, Doni A, et al. (2008). Pentraxins in Innate Immunity: From C-Reactive Protein to the Long Pentraxin PTX3. *J Clin Immunol* (United States), 28(1), 1–13
- Marsh** CB, Wewers MD, Tan LC, et al. (1997). Fc(gamma) receptor cross-linking induces peripheral blood mononuclear cell monocyte chemoattractant protein-1 expression: role of lymphocyte Fc(gamma)RIII. *J Immunol* (United States), 158(3), 1078–84

- Maugeri** N, Brambilla M, Camera M, et al. (2006). Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J Thromb Haemost (U. K.)*, 4(6), 1323–30
- McGee** MP, Wallin R, Devlin R, et al. (1989). Identification of mRNA coding for factor VII protein in human alveolar macrophages--coagulant expression may be limited due to deficient postribosomal processing. *Thromb Haemost (Germany, West)*, 61(2), 170–4
- Meerschaert** J, Furie MB (1995). The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium. *J Immunol (United States)*, 154(8), 4099–112
- Meijer** AB, Rohlena J, van der Zwaan C, et al. (2007). Functional duplication of ligand-binding domains within low-density lipoprotein receptor-related protein for interaction with receptor associated protein, alpha2-macroglobulin, factor IXa and factor VIII. *Biochim Biophys Acta (Netherlands)*, 1774(6), 714–22
- Meisel** SR, Shechter M, Xu XP, et al. (2003). Platelet-induced expression of tissue factor procoagulant activity in freshly isolated human mononuclear cells: implications for experimental use. *Clin Lab Haematol (U. K.)*, 25(5), 321–5
- Miller** CL, Graziano C, Lim RC, et al. (1981). Generation of tissue factor by patient monocytes: correlation to thromboembolic complications. *Thromb Haemost (Germany, West)*, 46(2), 489–95
- Mimura** Y, Ghirlando R, Sondermann P, et al. (2001). The molecular specificity of IgG-Fc interactions with Fc gamma receptors. *Adv Exp Med Biol (United States)*, 495, 49–53
- Monroe** DM, Hoffman M (2001). A cell based model of hemostasis. *Thromb Haemost (Germany)*, 85: 958–65
- Monroe** DM, Key NS (2007). The tissue factor-factor VIIa complex: procoagulant activity, regulation, and multitasking. *J Thromb Haemost (U. K.)*, 5(6), 1097–105
- Moosbauer** C, Morgenstern E, Cuvelier SL, et al. (2007). Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. *Blood (United States)*, 109(3), 995–1002
- More** L, Sim R, Hudson M, et al. (1993). Immunohistochemical study of tissue factor expression in normal intestine and idiopathic inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol (U. K.)*, 46(8) p703–8

- Morrissey JH** (2003). Tissue factor: in at the start...and the finish? *J Thromb Haemost (U. K.)*, 1(5), 878–80
- Mortensen RF**, Duszkiewicz JA (1977). Mediation of CRP-dependent phagocytosis through mouse macrophage Fc-receptors. *J Immunol (United States)*, 119(5), 1611–6
- Müller I**, Klocke A, Alex M, et al. (2003). Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J (United States)*, 17(3), 476–8
- Nagarajan S** (2007). Anti-OxLDL IgG blocks OxLDL interaction with CD36, but promotes FcgammaR, CD32A-dependent inflammatory cell adhesion. *Immunol Lett (Netherlands)*, 108(1), 52–61
- Nakagawa K**, Zhang Y, Tsuji H, et al. (1998). The angiogenic effect of tissue factor on tumors and wounds. *Semin Thromb Hemost (United States)*, 24(3), 207–10
- Napoleone E**, di Santo A, Peri G, et al. (2004). The long pentraxin PTX3 up-regulates tissue factor in activated monocytes: another link between inflammation and clotting activation. *J Leukoc Biol (United States)*, 76(1), 203–9
- Neels JG**, Bovenschen N, van Zonneveld AJ, et al. (2000). Interaction between factor VIII and LDL receptor-related protein. Modulation of coagulation? *Trends Cardiovasc Med (United States)*, 10(1), 8–14
- Neumann FJ**, Ott I, Marx N, et al. (1997). Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol (United States)*, 17(12), 3399–405
- Nguyen P**, Broussas M, Cornillet-Lefebvre P, et al. (1999). Coexpression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes purified by leukapheresis and elutriation. Response of nonadherent cells to lipopolysaccharide. *Transfusion (United States)*, 39(9), 975–82
- Nimmerjahn F**, Ravetch JV (2005). Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science (United States)*, 310(5753), 1510–2
- Nimmerjahn F**, Ravetch JV (2006). Fcγ Receptors: Old Friends and New Family Members. *Immunity (United States)*, 24, 19–28
- Østerud B** (1998). Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis (United States)*, 9 (Suppl 1): 9–14
- Osterud B**, Bjorklid E (2006). Sources of tissue factor.. *Semin Thromb Hemost (United States)*, 32(1), 11–23

- Otterlei** M, Sundan A, Ryan L, et al. (1995). Effects of anti-CD18 and LPS on CD14 expression on human monocytes. *Scand J Immunol (U. K.)*, 41(6), 583–92
- Paffen** E, Vos HL, Bertina RM (2004). C-reactive protein does not directly induce tissue factor in human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol (United States)*, 24(5), 975–81
- Panes** O, Matus V, Saez CG, et al. (2007). Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood (United States)*, 109(12), 5242–50
- Paquette** RL, Minosa MR, Verma MC, et al. (1995). An interferon-gamma activation sequence mediates the transcriptional regulation of the IgG Fc receptor type IC gene by interferon-gamma. *Mol Immunol (U. K.)*, 32(12), 841–51
- Passlick** B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood (United States)*, 74(7), 2527–34
- Pejler** G, Geczy CL (2001). Human peripheral blood mononuclear cells require factor X and platelets for expression of prothrombinase activity in response to bacterial lipopolysaccharide. *Ann Hematol (Germany)*, 80: 278–83
- Petrides** PE (1998). Blutstillung. In: Biochemie und Pathobiochemie, Hrsg. Löffler G, Petrides PE, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, S. 920-931, 6. Auflage
- Pfefferkorn** LC, van de Winkel JGJ, Swink SL (1995). A Novel Role for IgG-Fc. Transductional Potentiation for Human High Affinity Fc γ Receptor (Fc γ RI) Signaling. *J Biol Chem (United States)*, Vol. 270, No. 14, 8164–71
- Pfeiffer** A, Bottcher A, Orso E, et al. (2001). Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol (Germany)*, 31(11), 3153–64
- Pike** LJ (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res (United States)*, 47(7), 1597–8
- Porges** AJ, Redecha PB, Doebele R, et al. (1992). Novel Fc gamma receptor I family gene products in human mononuclear cells. *J Clin Invest (United States)*, 90(5), 2102–9
- Pretlow** TG, Pretlow TP (1979). Centrifugal elutriation (counterstreaming centrifugation) of cells. *Cell Biophys (United States)*, 1(2), 195–210
- Prydz** H, Lyberg T, Deteix P, et al. (1979). In vitro stimulation of tissue thromboplastin (factor III) activity in human monocytes by immune complexes and lectins. *Thromb Res (United States)*, 15(3–4), 465–74

- Pyo** RT, Sato Y, Mackman N, et al. (2004). Mice deficient in tissue factor demonstrate attenuated intimal hyperplasia in response to vascular injury and decreased smooth muscle cell migration. *Thromb Haemost (Germany)*, 92(3), 451–8
- Radcliffe** R, Bagdasarian A, Colman R, et al. (1977). Activation of bovine factor VII by hageman factor fragments. *Blood (United States)*, 50(4), 611–7
- Rak** J, Milsom C, May L, et al. (2006). Tissue factor in cancer and angiogenesis: the molecular link between genetic tumor progression, tumor neovascularization, and cancer coagulopathy. *Semin Thromb Hemost (United States)*, 32(1), 54–70
- Randolph** GJ, Luther T, Albrecht S, et al. (1998). Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. *Blood (United States)*, 92(11), 4167–77
- Randolph** GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, et al. (2002). The CD16(+) (Fc γ RIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med (United States)*, 196(4), 517–27
- Rankin** BM, Yocum SA, Mittler RS, et al. (1993). Stimulation of tyrosine phosphorylation and calcium mobilization by Fc gamma receptor cross-linking. Regulation by the phosphotyrosine phosphatase CD45. *J Immunol (United States)*, 150(2), 605–16
- Rao** LV, Pendurthi UR (1998). Tissue factor on cells. *Blood Coagul Fibrinolysis (U. K.)*, 9 Suppl 1, S27–35
- Ravetch** JV, Bolland S (2001). IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol (United States)*, 19, 275–90
- Ravetch** JV, Kinet JP (1991). Fc receptors. *Annu Rev Immunol (United States)*, 9, 457–92
- Reinhardt** C (2007). New locations of intravascular tissue factor: indications. *Hämostaseologie (Germany)*, 27(1), 55–8
- Riemann** D, Tcherkes A, Hansen GH, et al. (2005). Functional co-localization of monocytic aminopeptidase N/CD13 with the Fc gamma receptors CD32 and CD64. *Biochem Biophys Res Commun (United States)*, 331(4), 1408–12
- Ritis** K, Doumas M, Mastellos D, et al. (2006). A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol (United States)*, 177(7), 4794–802
- Ritter** M, Buechler C, Langmann T, et al. (1999). The scavenger receptor CD163: regulation, promoter structure and genomic organization. *Pathobiology (Switzerland)*, 1999, 67(5-6), 257–61

- Rothberger** H, Zimmerman TS, Spiegelberg HL, et al. (1977). Leukocyte procoagulant activity: enhancement of production in vitro by IgG and antigen-antibody complexes. *J Clin Invest (United States)*, 59(3), 549-57
- Rothe** G, Gabriel H, Kovacs E, et al. (1996). Peripheral blood mononuclear phagocyte subpopulations as cellular markers in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol (United States)*, 16(12), 1437-47
- Rothe** G, Herr AS, Stohr J, et al. (1999). A more mature phenotype of blood mononuclear phagocytes is induced by fluvastatin treatment in hypercholesterolemic patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis (Ireland)*, 144(1), 251-61
- Sardo** MA, Campo S, Mandraffino G, et al. (2008). Tissue Factor and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression in Hypertensive Individuals with Normal or Increased Carotid Intima-Media Wall Thickness. *Clin Chem (United States)*, [epub ahead of print]
- Satta** N, Toti F, Feugeas O, et al. (1994). Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol (United States)*, 153(7), 3245-55
- Scarpati** EM, Wen D, Broze GJ, et al. (1987). Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry (United States)*, 26(17), 5234-8
- Schecter** AD, Giesen PL, Taby O, et al. (1997). Tissue factor expression in human arterial smooth muscle cells. TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation. *J Clin Invest (United States)*, 100(9), 2276-85
- Schiller** C, Janssen-Graafls I, Baumann U, et al. (2000). Mouse FcgammaRII is a negative regulator of FcgammaRIII in IgG immune complex-triggered inflammation but not in autoantibody-induced hemolysis. *Eur J Immunol (Germany)*, 30(2), 481-90
- Schmidt** RE, Gessner JE (2005). Fc receptors and their interaction with complement in autoimmunity. *Immunol Lett (Netherlands)*, 100(1), 56-67
- Schmitz** G, Grandl M (2007). Role of redox regulation and lipid rafts in macrophages during Ox-LDL-mediated foam cell formation. *Antioxid Redox Signal (United States)*, 9(9), 1499-518
- Schmitz** G, Grandl M (2008). Update on lipid membrane microdomains. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care (U. K.)*, 11(2), 106-12

- Schwartz** BS, Edgington TS (1981). Immune complex-induced human monocyte procoagulant activity. I. a rapid unidirectional lymphocyte-instructed pathway. *J Exp Med (United States)*, 154(3), 892–906
- Schwartz** H, Tolley ND, Foulks JM, et al. (2006). Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med (United States)*, 203(11), 2433–40
- Schwinzer** R, Schraven B, Kyas U, et al. (1992). Phenotypical and biochemical characterization of a variant CD45R expression pattern in human leukocytes. *Eur J Immunol (Germany)*, 22(4), 1095–8
- Sconocchia** G, Keyvanfar K, El Ouraghli F, et al. (2005). Phenotype and function of a CD56+ peripheral blood monocyte. *Leukemia (U. K.)*, 19(1), 69–76
- Sekiya** F, Usui H, Inoue K, et al. (1994). Activation of prothrombin by a novel membrane-associated protease. An alternative pathway for thrombin generation independent of the coagulation cascade. *J Biol Chem (United States)*, 269(51), 32441–5
- Sester** U, Sester M, Heine G, et al. (2001). Strong depletion of CD14(+)CD16(+) monocytes during haemodialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant (U. K.)*, 16(7), 1402–8
- Setty** BN, Kulkarni S, Rao AK, et al. (2000). Fetal hemoglobin in sickle cell disease: relationship to erythrocyte phosphatidylserine exposure and coagulation activation. *Blood (United States)*, 96(3), 1119–24
- Sevinsky** JR, Rao LV, Ruf W (1996). Ligand-induced protease receptor translocation into caveolae: a mechanism for regulating cell surface proteolysis of the tissue factor-dependent coagulation pathway. *J Cell Biol (United States)*, 133(2), 293–304
- Shen** NL, Fan ST, Pyati J, et al. (1993). The serine protease cofactor factor V is synthesized by lymphocytes. *J Immunol (United States)*, 150(7), 2992–3001
- Shopes** B (1993). A genetically engineered human IgG with limited flexibility fully initiates cytolysis via complement. *Mol Immunol (U. K.)*, 30(6), 603–9
- Siberil** S, Dutertre CA, Boix C, et al. (2006). Molecular aspects of human FcgammaR interactions with IgG: functional and therapeutic consequences. *Immunol Lett (Netherlands)*, 106(2), 111–8
- Singh** SK, Suresh MV, Prayther DC, et al. (2008a). C-reactive protein-bound enzymatically modified low-density lipoprotein does not transform macrophages into foam cells. *J Immunol (United States)*, 180(6), 4316–22

- Singh** U, Dasu MR, Yancey PG, et al. (2008b). Human C-reactive protein promotes oxidized low density lipoprotein uptake and matrix metalloproteinase-9 release in Wistar rats. *J Lipid Res* (United States), 49(5), 1015–23
- Skinner** NA, MacIsaac CM, Hamilton JA, et al. (2005). Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14dimCD16+ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin Exp Immunol* (U. K.), 141(2), 270–8
- Skrzeczynska** J, Kobylarz K, Hartwich Z, et al. (2002). CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand J Immunol* (U. K.), 55(6), 629–38
- Skrzeczynska-Moncznik** J, Bzowska M, Loseke S, et al. (2008). Peripheral blood CD14high CD16+ monocytes are main producers of IL-10. *Scand J Immunol* (U. K.), 67(2), 152–9
- Solberg** S, Osterud B, Larsen T, et al. (1990). Lack of ability to synthesize tissue factor by endothelial cells in intact human saphenous veins. *Blood Coagul Fibrinolysis* (U. K.), 1(6), 595–600
- Sondermann** P, Kaiser J, Jacob U (2001). Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. *J Mol Biol* (U. K.), 309(3), 737–49
- Spek** CA (2004). Tissue factor: from 'just one of the coagulation factors' to a major player in physiology. *Blood Coagul Fibrinolysis* (England), 15 Suppl 1, S3–10
- Spiridon** CI, Guinn S, Vitetta ES (2004). A comparison of the in vitro and in vivo activities of IgG and F(ab')2 fragments of a mixture of three monoclonal anti-Her-2 antibodies. *Clin Cancer Res* (United States), 10(10), 3542–51
- Stein** MP, Mold C, Du Clos TW (2000). C-reactive protein binding to murine leukocytes requires Fc gamma receptors. *J Immunol* (United States), 164(3), 1514–20
- Stohr** J, Schindler G, Rothe G, et al. (1998). Enhanced upregulation of the Fc gamma receptor IIIa (CD16a) during in vitro differentiation of ApoE4/4 monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (United States), 18(9), 1424–32
- Strauss-Ayali** D, Conrad SM, Mosser DM (2007). Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol* (United States), 82(2), 244–52
- Strickland** DK, Medved L (2006). Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)-mediated clearance of activated blood coagulation co-factors and proteases: clearance mechanism or regulation? *J Thromb Haemost* (England), 4(7), 1484–6

- Szabo** G, Miller-Graziano CL (1990). Induction and regulation of monocyte procoagulant activity. *Transplantation* (United States), 50(2), 301–9
- Takai** T (2005). Fc Receptors and Their Role in Immune Regulation and Autoimmunity. *J Clin Immunol* (United States), Vol. 25, No. 1, 1–18
- Tannenbaum** SH, Finko R, Cines DB (1986). Antibody and immune complexes induce tissue factor production by human endothelial cells. *J Immunol* (United States), 137(5), 1532–7
- Thellin** O, Zorzi W, Lakaye B, et al. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* (Netherlands), 75(2–3), 291–5
- Thiruvikraman** SV, Guha A, Roboz J, et al. (1996). In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin-labeled factors VIIa and X. *Lab Invest* (United States), 75(4), 451–61
- Thomas** R, Lipsky PE (1994). Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J Immunol* (United States), 153(9), 4016–28
- Tilley** R, Mackman N (2006). Tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* (United States), 32(1), 5–10
- Tsao** BP, Fair DS, Curtiss LK, et al. (1984). Monocytes can be induced by lipopolysaccharide-triggered T lymphocytes to express functional factor VII/VIIa protease activity. *J Exp Med* (United States), 159(4), 1042–57
- van Deursen** PB, Gunther AW, van Riel CC, et al. (1999). A novel quantitative multiplex NASBA method: application to measuring tissue factor and CD14 mRNA levels in human monocytes. *Nucleic Acids Res* (U. K.), 27(17), 15
- van de Winkel** JG, Tax WJ, Jacobs CW, et al. (1990). Cross-linking of both types of IgG Fc receptors, Fc gamma RI and Fc gamma RII, enhances intracellular free Ca²⁺ in the monocytic cell line U937. *Scand J Immunol* (U. K.), 31(3), 315–25
- van Roon** J, Wijngaarden S, Lafeber FP, et al. (2003). Interleukin 10 treatment of patients with rheumatoid arthritis enhances Fc gamma receptor expression on monocytes and responsiveness to immune complex stimulation. *J Rheumatol* (Canada), 30(4), 648–51
- Veri** MC, Gorlatov S, Li H, et al. (2007). Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcgamma-receptor IIB (CD32B) from the activating Fcgamma-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology* (U. K.), 121(3), 392–404

- Versteeg HH, Ruf W** (2006). Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events. *Semin Thromb Hemost* (United States), 32(1), 24–32
- Walsh JD, Geczy CL** (1991). Discordant expression of tissue factor antigen and pro-coagulant activity on human monocytes activated with LPS and low dose cycloheximide. *Thromb Haemost* (Germany), 66(5), 552–8
- Watts HF, Anderson VA, Cole VM, et al.** (1985). Activation of complement pathways by univalent antibody derivatives with intact Fc zones. *Mol Immunol* (U. K.), 22(7), 803–10
- Wharram BL, Fitting K, Kunkel SL, et al.** (1991). Tissue factor expression in endothelial cell/monocyte cocultures stimulated by lipopolysaccharide and/or aggregated IgG. Mechanisms of cell:cell communication. *J Immunol* (United States), 146(5), 1437–45
- Williams TN, Zhang CX, Game BA, et al.** (2004). C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through Fc[gamma]RII and extracellular signal-regulated kinase pathway:: an implication of CRP involvement in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (United States), 24(1), 61–6
- Wolberg AS, Monroe DM, Roberts HR, et al.** (1999). Tissue factor de-encryption: ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms. *Blood Coagul Fibrinolysis* (U. K.), 10(4), 201–10
- Wolberg AS** (2007). Antiphospholipid antibody effects on monocytes. *Curr Rheumatol Rep* (United States), 9(3), 198–204
- Wolberg AS, Roubey RA** (2004a). Anti-beta 2-glycoprotein I antibodies do not increase TF activity by de-encryption. *Thromb Res* (United States), 114(1), 67–71
- Wolberg AS, Roubey RA** (2004b). Mechanisms of autoantibody-induced monocyte tissue factor expression. *Thromb Res* (United States), 114(5–6), 391–6
- Wu J, Stevenson MJ, Brown JM, et al.** (2008). C-reactive protein enhances tissue factor expression by vascular smooth muscle cells: mechanisms and in vivo significance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (United States), 28(4), 698–704
- Yan JC, Wu ZG, Kong XT, et al.** (2003). Effect of CD40-CD40 ligand interaction on diacylglycerol-protein kinase C signal transduction pathway and intracellular calcium in cultured human monocytes. *Acta Pharmacol Sin* (China), 24(7), 687–91
- Zhu X, Hamann KJ, Munoz NM, et al.** (1998). Intracellular expression of Fc gamma RIII (CD16) and its mobilization by chemoattractants in human eosinophils. *J Immunol* (United States), 161(5), 2574–9

- Ziegler-Heitbrock HW, Fingerle G, Strobel M, et al.** (1993). The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol (Germany)*, 23(9), 2053–8
- Ziegler-Heitbrock HW, Passlick B, Flieger D** (1988). The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma (United States)*, 7(6), 521–7
- Ziegler-Heitbrock L** (2007). The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol (United States)*, 81(3), 584–92
- Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J** (2001). C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation (United States)*, 103(9), 1194–7

7 ABKÜRZUNGEN UND STICHWORTE

Abb.	Abbildung
ACD	Acid-Citrate-Dextrose (Blutgerinnungsinhibitor)
ADCC	Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity
AK	Antikörper
AP-1	transcription factor activator protein-1 (Transkriptionsfaktor)
APC	Allophycocyanin
BC	Bicinchoninic-Acid
BCA	Bicinchoninic-Acid-Assay
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin
BuC	Buffy Coat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca²⁺	Calcium (im engeren Sinne das zweiwertige Calcium-Ion)
caveolae	50-100 nm große, flaschenhalsartige Invaginationen der Zellmembran mit definierter Lipid-/Proteinkomposition und speziellen Funktionen insbesondere für Signaltransduktion und Endozytose
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre (complementary) Desoxyribonukleinsäure
CO₂	Kohlendioxid
CPD	Stabilisatorlösung mit Citrat, Phosphat und Dextrose (Glucose)
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton (Atomare Masseneinheit 1 Da = 1 u = $1,66 \cdot 10^{-27}$ kg)
DFZ	Durchflusszytometrie
d. h.	das heißt
dim	diminished (bezogen auf die Oberflächenexpression eines Antigens)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dotplot	Darstellungsform für durchflusszytometrische Daten (x-y-Diagramm, in dem für jedes Messereignis bzw. jede Zelle über eine Punkt-Markierung zwei Merkmale quantifiziert werden)

DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethyldiamin-Tetra-Essigsäure
Egr-1	Early Growth Response Protein 1 (Transkriptionsfaktor)
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
Event	Messereignis in der Durchflusszytometrie (im Allgemeinen einer Zelle entsprechend)
Exp.	Experiment
F	(Gerinnungs-)Faktor
FBS	Fetal Bovine Serum
Fab	Antigenbindendes Fragment bzw. „Arm“ eines Antikörpermoleküls (das zweite Fab-Fragment und das Fc-Fragment fehlen)
F(ab')₂	Fragment der beiden zusammenhängenden antigenbindenden Teile bzw. „Arme“ eines Antikörpermoleküls (das Fc-Fragment fehlt)
primäres F(ab')₂	direkt gegen einen Fcγ-Rezeptor gerichtetes F(ab') ₂
sekundäres F(ab')₂	gegen ein (gebundenes) primäres F(ab') ₂ gerichtetes F(ab') ₂
Fc(γ)	(leicht) kristallisierbares Fragment bzw. „Stamm“ eines Antikörpermoleküls (vom Typ IgG)
Fc(γ)R	Fc(γ)-Rezeptor für den Fc-Teil eines Antikörpers (vom Typ IgG)
Fcn	neonataler Fc-Rezeptor
FcRH	Fc-Rezeptor-Homolog
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIA	gerinnungsinduzierendes Agens
h	Stunde(n)
hi	high (bezogen auf die Oberflächenexpression eines Antigens)
H₂O	(reines) Wasser
H₂SO₄	Schwefelsäure
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G

IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
inkl.	inklusive
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
IVIg	intravenöses Immunglobulin (im engeren Sinne Sandoglobulin®)
k	Kilo... bzw. Tausend
kB	Kilobase(n)
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo-Dalton
LDL	low density lipoprotein
lo	low (bezogen auf die Oberflächenexpression eines Antigens)
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	LDL receptor-related binding protein
m	Milli... bzw. Tausendstel
M	molar (Mol/Liter)
μ	Mikro... bzw. Millionstel
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität (Mittelung je nach Zusammenhang über den Median oder das arithmetische Mittel)
mlg(G)	murines bzw. von der Maus stammendes Immunglobulin (G)
min	Minute(n)
Mio.	Million(en)
MNP	mononukleäre Phagozyten
MPMD	Maximale prozentuale Messwertdifferenz (vgl. 2.2.12.4)
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Nano... bzw. 10^{-9}
NF-κB	Nukleärer Faktor κB (Transkriptionsfaktor)
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
p	Pico... bzw. 10^{-12}
π	Kreiszahl Pi ($\approx 3,141593$)
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PAR-2	protease-activated receptor 2

PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	prokoagulante Aktivität
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PerCP	Perinidin-Chlorophyll-Protein
R	Kurzbezeichnung für eine durchflusszytometrische Region im Dotplot
R²	Bestimmtheitsmaß
raft	organisierte Zellmembrandomäne, die insbesondere als Plattform für Signalprozesse dient (s. 1.5)
RCF	Relative Centrifugal Force (Relative Zentrifugalkraft in Vielfachen der Erdbeschleunigung g , die ca. $9,81 \text{ m/s}^2$ beträgt)
RKZ	Rekalzifizierungszeit
RNA	Ribonukleinsäure
rPCA	relative prokoagulante Aktivität
RT	reverse Transkription
s	Sekunde(n)
s.	siehe
S	Svedberg (Maßeinheit für den Sedimentationskoeffizienten); z. B. zur Charakterisierung ribosomaler RNA eingesetzt ($1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s}$)
SFI	Summierte Fluoreszenzintensität
SFI_{Mo}	Summierte Fluoreszenzintensität der Monozytenpopulation
SSC	Sidewards Scatter
s. o.	siehe oben
sog.	so genannte(r/s)
Sp1	Transkriptionsfaktor „Sp1“
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer (Borat = Salz der Borsäure)
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TFp	(gesamte) Proteinexpression von Tissue Factor
TLR	toll-like receptor
TNF(-alpha)	Tumor-Nekrose-Faktor(- α)

t-PA	tissue-type plasminogen activator
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem
uPA	urokinase-type plasminogen activator (= urokinase)
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor (= urokinase receptor)
v. a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
vs.	versus
V_U	Beim Vergleich zweier unverbundener Stichproben: Verhältnis der Hypothenusenlänge eines rechtwinkligen Dreiecks (mit den beiden Standardabweichungen als Kathetenlängen) zur Differenz der Mittelwerte (s. 2.2.12.5)
V_V	Beim Vergleich zweier verbundener Stichproben: Verhältnis der Standardabweichung der Differenzen zum Mittelwert der Differenzen (vgl. 2.2.12.5)
vWF	von-Willebrand-Faktor
Well	abgegrenzte Inkubationsvertiefung einer Zellkulturplatte
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. G. Schmitz danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Herrn Dr. S. Barlage gilt mein besonderer Dank für die konsistente Unterstützung und die wertvollen Anregungen und Hilfestellungen während meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. G. Rothe danke ich für die hilfreichen Diskussionen von Experimentaldesigns und Ergebnissen.

Für die stets schnelle und freundliche Unterstützung in der Molekularbiologie danke ich Herrn Prof. Dr. C. Aslanidis.

Für die praktische Unterweisung in die Techniken und geduldige Hilfe bei speziellen methodischen Fragen bedanke ich mich bei Dr. D. Kielar, Dr. T. Langmann, Dr. G. Maa-Bared und Dr. A. Böttcher.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie bin ich für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft dankbar, die zu einer guten Arbeitsatmosphäre geführt haben.

Ich danke dem Roten Kreuz Regensburg für die Überlassung der Buffy-Coat-Präparate.

Mein besonderer Dank gilt meiner Ehefrau und meinen Eltern für ihre Geduld und Unterstützung.

LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name	Fröbe
Vorname	Martin Leonhard
Geburtsdatum	14.12.1976
Geburtsort	Amberg (Oberpfalz)
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Fröbe Dietmar, Gymnasiallehrer (Mathematik, Physik) Fröbe Brigitte, Gymnasiallehrerin (Mathematik, Erdkunde)

Ausbildung

1983–1987	Grundschule in Nabburg (Landkreis Schwandorf)
1987–1996	Johann-Andreas-Schmeller-Gymnasium Nabburg
6/1996	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
8/1996–8/1997	Zivildienst in der Krankenpflege, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg
10/1997–4/2004	Studium der Humanmedizin in Regensburg
4/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruf

6/2004–10/2004	Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik II am Klinikum St. Marien Amberg
10/2004	Erwerb der Approbation als Arzt
seit 10/2004	Assistenzarzt in Weiterbildung zum Internisten am Klinikum St. Marien Amberg

Veröffentlichung

7/2004	Bronchobiliäre Fistel bei kombiniertem Lungen-Leber-Abszess. Med Klin (Germany), 99(7): 391–5
--------	--

