Aus der Medizinischen Klinik I
Bereich Experimentelle Onkologie, Palliativmedizin und Ethik in der Onkologie
Universität zu Lübeck
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Steinhoff
Bereichsleiter: Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Isolation gerinnungsaktiver Mikropartikel aus malignen Ergüssen mithilfe Annexin-V-beschichteter „*Magnetic Microbeads*“

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Sektion Medizin –
vorgelegt von
Inga Hesse
aus Frankfurt/Oder
Lübeck, 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Gieseler

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Dirk Rades

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2017

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.12.2017

Promotionskommission der Sektion Medizin

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG 1

1.1 Definition Mikropartikel 1
1.2 Die Erforschung und Entdeckung der Mikropartikel 2
1.3 Die Entstehung von Mikropartikeln 2
1.4 Die Elimination der Mikropartikel 5
1.5 Mikropartikel und andere extrazelluläre Vesikelklassen im Vergleich 5
1.6 Die Asymmetrie der Zellmembran und die Rolle von Phosphatidylserin 8
1.7 Der Mechanismus der extrinsischen Gerinnung 10
1.8 Die klinische Bedeutung der Mikropartikel 11
1.8.1 Mikropartikel in gesunden Individuen 12
1.8.2 Die pathophysiologischen Funktionen der Mikropartikel 12
1.8.3 Mikropartikel und Tumorerkrankungen 14
1.9 Fragestellung 18

2 MATERIAL UND METHODEN 19

2.1 Materialien 19
2.1.1 Geräte 19
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien 19
2.1.3 Puffer und Lösungen 20
2.1.4 Kits 20
2.1.5 Sonstige Materialien 21
2.2 Methoden 22
2.2.1 Anreicherung von MP durch additive Zentrifugations-schritte 23
2.2.2 Isolationsmethode für MP mithilfe Magnetic Microbeads 26
2.2.3 Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 27
2.2.4 Durchflusszytometrie 31

3 ERGEBNISSE 35

3.1 Vergleichende MP-Proteinbestimmung nach verschiedenen Aufreinigungsverfahren 35
3.2 Kalziumkonzentration in malignen Ergüssen im Vergleich zu normalem Serum 38
3.3 Die Optimierung der Kalziumkonzentration 38
3.4 Annexin-V-Bindung an PS als Isolationsmethode für MP 39

3.5 Quantitativer Nachweis von MP mittels Durchflusszytometrie 40
3.5.1 Effekt der Anreicherung extrazellulärer Vesikel auf deren Zusammensetzung 43
3.6 Nachweis der funktionellen Aktivität der MP 45

4 DISKUSSION 47

5 ZUSAMMENFASSUNG 54

6 LITERATURVERZEICHNIS 56

7 ANHÄNGE 63

7.1 Abbildungsverzeichnis 63
7.2 Tabellenverzeichnis 65
7.3 Abkürzungen 66
7.4 Votum der Ethikkommission 68

8 DANKSAGUNGEN 69

9 LEBENSLAUF 70

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Mikropartikel sind subzelluläre Membranvesikel, die Zellinteraktionen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen regulieren. Sie finden sich in allen Körperflüssigkeiten, haben wichtige Funktionen bei der Blutgerinnung und Zellaggregation. Da die molekulare Wirkungsweise der Mikropartikel kaum bekannt ist, sind der quantitative Nachweis und die Möglichkeit, Bestandteile der Mikropartikel zu untersuchen, von großem wissenschaftlichem Interesse.

In dieser Arbeit wird eine spezifische Methode präsentiert, um Mikropartikel von Zellen aus malignen Ergüssen und anderen Körperflüssigkeiten zu isolieren. Dafür werden *Magnetic Microbeads* verwendet, welche mit Annexin-V beschichtet sind. Die Mikropartikel und andere Populationen extrazellulärer Vesikel können mit der Cytoflow-Technologie nachgewiesen werden. Weiterhin können die Vesikel nach der Isolation funktionell charakterisiert werden. Die Aufklärung der Rolle von Mikropartikeln ist von größter Wichtigkeit, da sie einen Einblick in zahlreiche Krankheitssituationen bietet und zur Entwicklung von spezifischen Therapiestrategien beitragen kann.

1.1 DEFINITION MIKROPARTIKEL

Mikropartikel (MP), auch Ektosomen genannt, sind 0,1–1 µm große Phospholipidvesikel, die sich aus Membranproteinen und zytosolischem Material der Zellen zusammensetzen, von denen sie sich ableiten. Einen Nukleus besitzen MP nicht (1). Sie zählen, wie auch apoptotische Körper und Exosomen, zur Klasse der Membranvesikel bzw. zu den extrazellulären Vesikeln (2). In der Literatur wird der Begriff des MP bisher nicht klar definiert. Er kann eine Reihe von Vesikeln von ähnlicher Größe beschreiben, wobei die Zusammensetzung nicht klassifiziert wird. Jedoch findet eine Trennung zwischen Mikrovesikeln und MP statt, die z. T. überlappend verwendet wird. In dieser Arbeit meint MP die Vesikelklasse, welche durch das Nachaußenstülpen der Plasmamembran und das Abschnüren mit nachfolgender Freisetzung in den Extrazellulärraum entsteht - die MP präsentieren häufig *Tissue Factor* (TF) auf ihrer Oberfläche (3). Nachdem nun ein Überblick über die MP gegeben wurde, wird im nächsten Punkt auf die Erforschung und Entdeckung der MP eingegangen.

1.2 Die Erforschung und Entdeckung der Mikropartikel

Das Interesse und die Forschung an der Funktionsweise der Gerinnung reichen bis in das 17. Jahrhundert mit den Beobachtungen von Malpighi zurück (4). Jedoch dauerte es bis in das vergangene Jahrhundert, bis Experimente durchgeführt werden konnten, um die Funktion und Wirkungsweise der MP zu beleuchten. In den 1940er Jahren erkannten Chargaff und West, dass thrombozytenfreies Plasma gerinnungsfördernde Eigenschaften aufweist, die durch Ultrazentrifugation signifikant herabgesetzt werden konnten (4). 1967 entdeckte der Brite Peter Wolf subzelluläres koagulierendes Material, das sowohl im Plasma als auch im Serum vorkommt, reich an Phospholipiden ist und sich aus den Thrombozyten bildet. Folglich wählte er den Begriff *platelet dust*. Schnell erkannte er, dass dieser Thrombozytenstaub genau wie Faktor-III (FIII/Thromboplastin) Prothrombin in das aktive Thrombin überführt. Wolf revolutionierte die Gerinnungsforschung und der Begriff Thrombozytenstaub wurde zunehmend durch den Begriff des MP ersetzt (4). In den letzten Jahrzehnten konnten MP verschiedener Zelltypen identifiziert werden und im Jahre 1983 wurden erstmals prokoagulierende, TF-tragende Vesikel aus Tumorzellen nachgewiesen (5, 6). Der TF ist der Initiator der extrinsischen Gerinnung (7). Die nachfolgende Forschung macht deutlich, dass MP eine wichtige Rolle in der Kommunikation zwischen Zellen spielen.

1.3 Die Entstehung von Mikropartikeln

Die Bildung von MP wurde sowohl bei Zellen des vaskulären Systems (Thrombozyten, Erythrozyten, Endothelzellen, Kardiomyozyten) als auch bei Tumorzellen beobachtet (3). Andere Quellen hingegen gehen davon aus, dass MP sich von jeder eukaryoten Zelle ableiten und eine Antwort auf zellulären Stress sein können (8). Die Angaben über deren Herkunft variieren in der Literatur. So lassen sich je nach Quelle von 39 % über 44 % auf bis zu 70–90 % der zirkulierenden MP auf Thrombozyten und Endothelzellen zurückführen. Diese weite Streuung erscheint laut der Literatur mit dem Isolationsprotokoll der MP zusammenzuhängen (1, 9). Da die Freisetzung von MP ein physiologischer Prozess ist, sind sie in jedem Individuum nachweisbar. Interessanterweise ist der MP-Spiegel bei Frauen höher als bei Männern und ist sowohl vom Menstruationszyklus als auch von der zirkadianen Rhythmik abhängig (1).

Bei der Bildung von MP wird die Plasmamembran einer Zelle nach außen gestülpt, im weiteren Verlauf das Zytoskelett reorganisiert und Änderungen der Phospholipidsymmetrie eingeleitet (3). Die Wirkung der Aktinfilamente ist ausschlaggebend für die MP-Entstehung. Als zweiter essenzieller Punkt der MP-Bildung wird die Außenlegung von Phosphatidylserin (PS) genannt, das von Annexin V (Anx V) gebunden werden kann (3).

Annexine gehören zu einer Familie von Proteinen, welche negativ geladene Phospholipide kalziumabhängig binden können (10). Diese Bindung entsteht durch Kalziumbrücken (11). Einer der frühesten Indikatoren des Zelltodes ist die Verlagerung von PS an die Zellmembranaußenseite. Anx V wurde erstmals 1985 isoliert und hat eine kompakte und kugelförmige Struktur, die sich größtenteils aus α-Helices in vier Domänen zusammensetzt (11). Es inhibiert durch die oben beschriebene hochspezifische Bindung die Fähigkeit von PS, den Prothrombinase-Komplex und somit die Gerinnungskaskade zu aktivieren, und stellt sich folglich als *in-vitro*-Antikoagulans dar. Demzufolge wird Anx V bereits experimentell zur Identifikation von apoptotischen Zellen verwendet (12).

Abbildung 1 stellt schematisch das Ausstülpen und die Reorganisation der Membran bei der Bildung der MP dar. Abbildung 2 zeigt in 30 000-facher Vergrößerung die Freisetzung von MP durch einen Thrombozyten. Zur selben Zeit können sich mehrere MP von einem Thrombozyten ausstülpen.

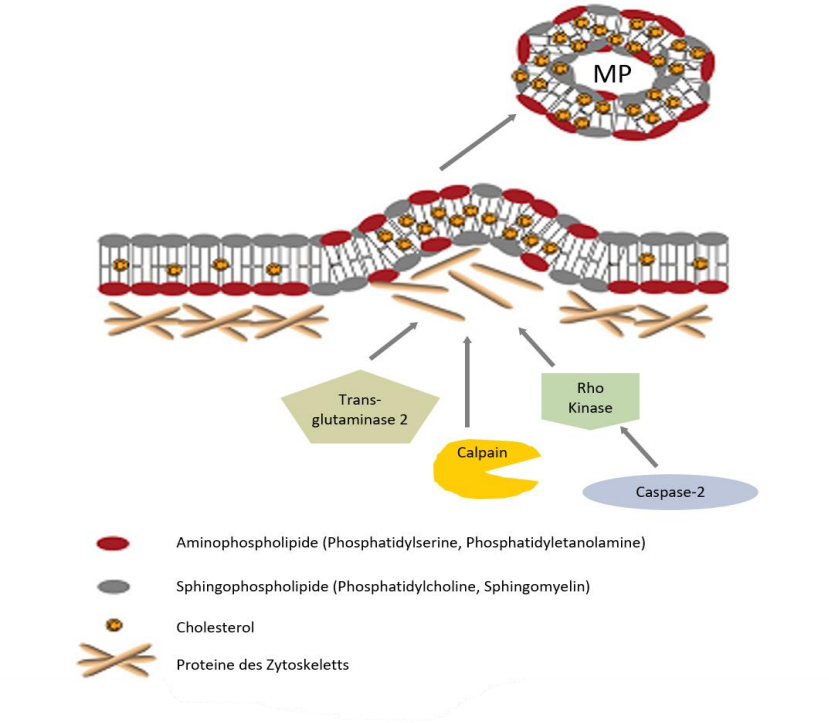

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Reorganisation des Zytoskeletts und der Membran. Daraufhin erfolgt die Ausstülpung der Membran und die Freisetzung des Mikropartikels (MP). Nach Ablösung eines MP von einer Zelle reorganisieren sich das Zytoskelett und die Zellmembran neu durch das Einwirken von verschiedenen Enzymen, wie der Rho-Kinase und der Transglutaminase (modifiziert nach (3)).

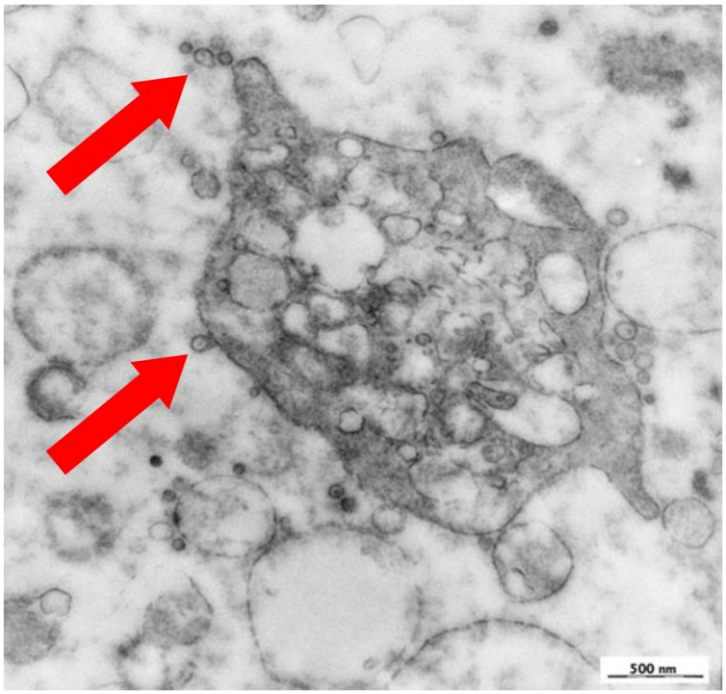

Abbildung 2: Abgebildet ist die Freisetzung von Mikropartikeln (MP) aus einem Thrombozyten. Die Pfeile zeigen an, wo sich ein MP abschnürt und die Plasmamembran nach außen gestülpt wurde (30 000-fache Vergrößerung) (modifiziert nach (2)).

1.4 Die Elimination der Mikropartikel

Im Gegensatz zur Bildung der MP ist nur wenig über deren Abbau bekannt. Als primärer Abbaumechanismus *in vivo* wird die Phagozytose vermutet. Zellkulturen, die sowohl MP von Thrombozyten als auch Makrophagen enthielten, konnten dies *in vitro* bestätigen. Die Phagozytose der MP scheint durch die exponierte Lage des PS in der Membranaußenseite bedingt zu sein, was ein Andockpunkt für den *High Density Lipoprotein Receptor* (HDL-Rezeptor) darstellt. Der HDL-Rezeptor ist an der Phagozytose von apoptotischen Körpern beteiligt, indem er eine Bindung mit PS eingeht (13).

1.5 Mikropartikel und andere extrazelluläre Vesikelklassen im Vergleich

Der bereits in Kapitel 1.3. beschriebene charakteristische Entstehungsweg der MP legt den Grundstein für die Alleinstellungsmerkmale dieser gegenüber anderen Vesikeln. Wie bereits erläutert sind in dieser Arbeit MP als Vesikel definiert, die durch Ausstülpung der Plasmamembran, nachfolgende Abschnürung und Freisetzung in den Extrazellulärraum entstanden sind.

MP können von anderen extrazellulären Vesikeln (EV), wie Exosomen oder apoptotischen Körpern, durch Größe, Entstehung und Inhalt unterschieden werden (3), wie in Tabelle 1 zusammengefasst zu entnehmen ist. Beispielsweise erreichen MP eine maximale Größe von 1 µm, wohingegen apoptotische Körper erst über dieser Größe definiert werden.

Eigenschaft	Mikropartikel/ Ektosomen	Exosomen	Apoptotische Körper	Quelle
Größe	0,1–1 µm	0,4-0,1 µm	> 1 µm	(3)
Entstehung	Ausstülpung der Membran und der Freisetzung in den Extrazellulärraum	Sowohl primär als auch durch Induktion der Exozytose von multivesikulären Körpern	Zellschrumpfung und Zelltod	(3)
Nachweisverfahren	Durchflusszytometrie, Elektronenmikroskopie, capture-based Assays	Durchflusszytometrie, Elektronenmikroskopie, Westernblot	Durchflusszytometrie, Elektronenmikroskopie	(2)
Charakteristika	Bindung mit Anx V, zellspezifische Oberflächenmarker, LAMP1	LAMP1, CD63 und TSG101	Bindung mit Anx V, DNA, permeable Membran	(3)
Zusammensetzung	Protein, RNA, miRNA	Protein, RNA, miRNA	Protein, DNA, Zellorganellen, RNA, miRNA	(2)
Membraneigenschaften	Externalisiertes PS, GP IIb/IIIa+GPIb/IX, unpermeabel, häufig Präsentation von TF	Reich an Lipiden, unpermeabel	Externalisiertes PS, permeabel	(3)

Tabelle 1: Vergleich verschiedener Vesikelklassen (3)

In Abbildung 3 werden die unterschiedlichen Entstehungswege der Vesikelklassen dargestellt. So werden Exosomen durch eine nach innen gerichtete Abschnürung der Zellmembran gebildet und dann in das extrazelluläre Milieu freigesetzt. Apoptotische Körper entstehen während der späten Phasen des Zelltodes nach der Zellschrumpfung und enthalten Zellorganelle und/oder DNA. MP resultieren aus einer Ausstülpung der Membran und der Freisetzung in den Extrazellulärraum (3). Durch die verschiedenen Entstehungswege der Vesikelklassen entstehen unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheit der Vesikel, was entscheidend für das in dieser Arbeit verwendete Isolationsprotokoll ist.

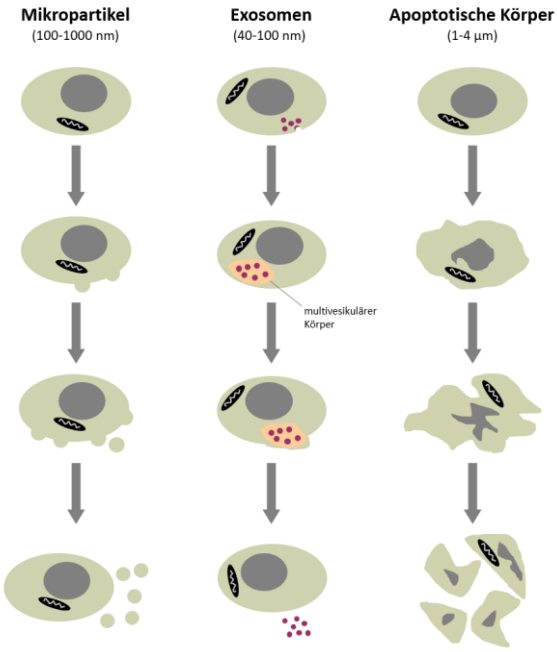

Abbildung 3: Herkunft der verschiedenen Vesikelklassen: Exosomen werden durch eine nach innen gerichtete Abschnürung der Zellmembran in einer Zelle gebildet und dann in das extrazelluläre Milieu freigesetzt. Apoptotische Körper entstehen während der späten Phasen des apoptotischen Zelltodes sowie nach der Zellschrumpfung und können Zellorganelle und/oder DNA enthalten. MP resultieren aus einer Ausstülpung der Membran und der Freisetzung in den Extrazellulärraum (modifiziert nach (3)).

Für die Trennung der Vesikelklassen durch Zentrifugation sind vor allem Größe und Dichte der Partikel von Relevanz, da die Stofftrennung mithilfe der Massenträgheit erfolgt. In Abbildung 4 ist ein Größenvergleich zwischen verschiedenen Vesikelklassen, aber auch Thrombozyten, Bakterien und Viren dargestellt. Da ein apoptotischer Körper eine größere Masse als ein MP aufweist, können diese beiden Vesikelklassen durch Zentrifugationsschritte voneinander getrennt werden.

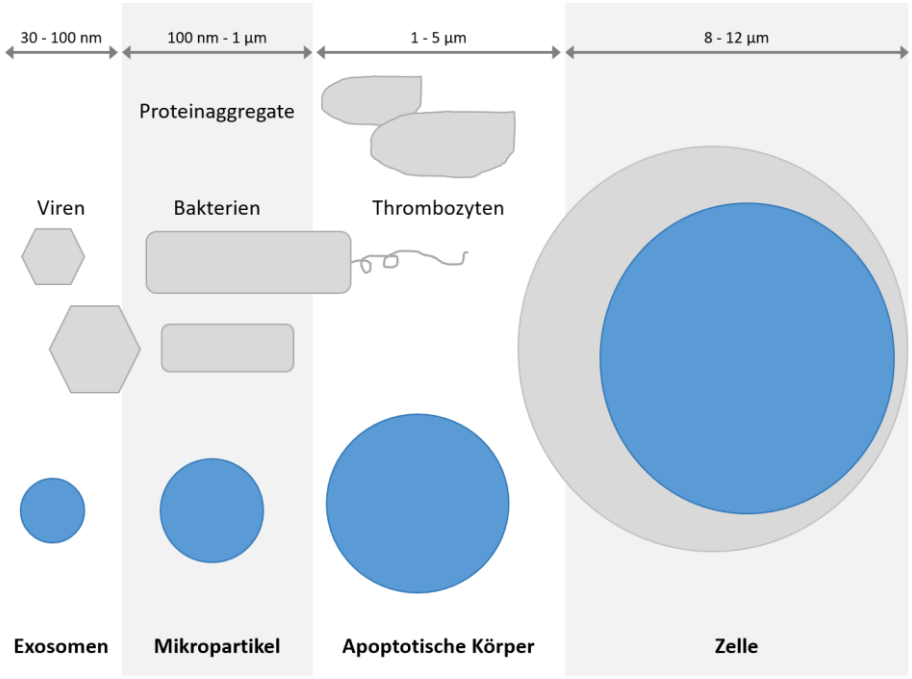

Abbildung 4: Größenvergleich von verschiedenen Vesikelklassen mit Viren, Bakterien und Thrombozyten. In dieser Abbildung wird der beträchtliche Größenunterschied der verschiedenen Vesikel deutlich, welchen wir uns für den ersten Schritt der von uns entwickelten Aufreinigung der MP mittels Zentrifugation zunutze machen (modifiziert nach (2)).

1.6 Die Asymmetrie der Zellmembran und die Rolle von Phosphatidylserin

Die eukaryote Zellmembran ist ein hochorganisiertes, dreidimensionales System, bestehend aus Lipiden, Glykanen und Proteinen. Beide Zellmembranblätter haben eine spezifische Lipidzusammensetzung. Aminophospholipide, wie das negativ geladene Phospholipid PS, befinden sich überwiegend an der Innenseite der Membran, wohingegen Phosphatidylcholine und Sphingomyeline mehrheitlich an der Membranaußenseite lokalisiert sind (8). Diese Asymmetrie der Membran wird durch aktiven Transport aufrechterhalten, für den bestimmte Enzyme benötigt werden. Die Flippase bewirkt die Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Translokation von PS und Phosphatidylethanolamin entgegen ihren elektrochemischen Gradienten auf die Membraninnenseite (3). Die Floppase katalysiert ATP-abhängig den Transport von PS an die Membranaußenseite (3). Das dritte Enzym ist die Scramblase, die ebenfalls ATP-abhängig die Translokation von PS an beide Membranschichten ermöglicht (3). Der Umbau der Zellmembran mit der beschriebenen Translokation von PS ist ein kritisches Ereignis der Zellantwort und findet während der Apoptose und Hämostase, aber interessanterweise auch in Tumorzellen und in Endothelzellen der den Tumor versorgenden Gefäße, statt

(14). In diesem Fall führt ein Anstieg des zytosolischen Kalziums zur Inhibierung der Flippase und einer Aktivierung der Floppase und Scramblase, wodurch es zur obengenannten Veränderung der Zellmembran kommt. Durch ihren charakteristischen Entstehungsweg verlagern auch MP das PS an ihre Außenseite. Abbildung 5 veranschaulicht das Wirken von Floppase, Scramblase und Flippase und die Externalisierung von PS. Es ist zu berücksichtigen, dass es auch MP ohne externalisiertes PS gibt, offensichtlich werden bei der Bildung der Vesikel nicht immer alle Enzymklassen (in diesem Fall die Scramblase) aktiviert.

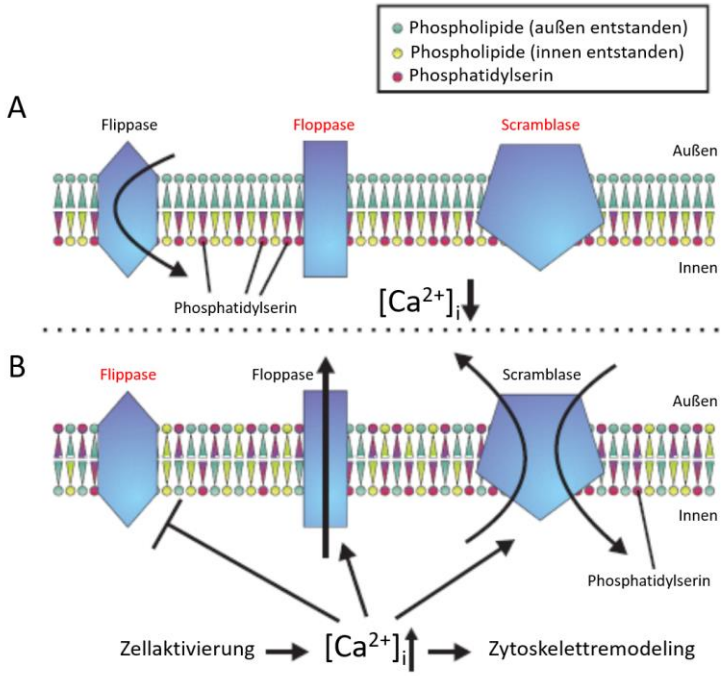

Abbildung 5: Schema der Zellmembran und Externalisierung von Phosphatidylserin: Die Abbildung zeigt zum einen in Zeile A die physiologische Lipidschicht der Zellmembran und wie diese durch die Enzyme Flippase, Floppase und Scramblase aufrechterhalten wird. Zum anderen wird in Zeile B die kalziumabhängige Reorganisation des Zytoskletts mit der Inhibierung der Flippase und Aktivierung der Floppase und Scramblase gezeigt. Phosphatidylserin wird an die Zellaußenseite verlagert. Dieser Vorgang findet während der Apoptose und Hämostase, aber auch in Tumorzellen und deren versorgenden Gefäßen, statt (modifiziert nach (15)).

Die Externalisierung von Phosphatidylserin bildet die molekulare Grundlage dieser Arbeit und für die Entwicklung der MP-Isolationsmethode. Die Membranasymmetrie beeinflusst auch die Blutgerinnung, da eine extrazelluläre Exposition von PS eine erhöhte Gerinnungsaktivität bedingt. PS, das an der Membranaußenseite lokalisiert ist, ist zusätzlich ein Erkennungsmerkmal zur Phagozytose während der Apoptose (8). Möglicherweise vermögen MP durch ihre geringe Größe der Phagozytose zu entgehen und verbleiben dadurch länger im Organismus, andererseits ermöglicht die Phagozytose

auch einen horizontalen Transfer des eingeschlossenen genetischen Materials (8). Auch bei der Thrombozytenaktivierung wird das PS in den Extrazellulärraum verlagert, was essenziell für die Bindung und Aktivierung des Prothrombinase-Komplexes ist (16). Ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit ist die Bindung, die Anx V und PS eingehen. Diese Bindung ist reversibel und kalziumabhängig und daher geeignet für die Bindung der MP an die mit Anx-V-beschichteten Magnetpartikel. Da diese Bindung bei einer Reihe von Krankheitsbildern, wie dem Antiphospholipid-Syndrom und dem systemischen Lupus erythematodes, eine entscheidende Rolle spielt, hat die vorgelegte Arbeit eine hohe klinische Relevanz (17).

1.7 Der Mechanismus der extrinsischen Gerinnung

Für das Zusammenspiel der MP und des TF ist die extrinsische Tenase des Gerinnungssystems unabdingbar. Physiologisch findet man eine strikte anatomische Trennung von für die Gerinnung verantwortlichen Proenzymen und den im Blut zirkulierenden Plättchen vor. Diese Trennung ist durch das TF-negative und gerinnungshemmende Endothel bedingt. Erst durch dessen Beschädigung wird die Hämostase aktiviert. Initial wird diese Kaskade durch die Verbindung des sich im Blut befindlichen FVII und seines Zell-assoziierten Rezeptors TF gestartet. Die Bildung des FVII/TF-Komplexes ist also nur dann möglich, wenn das Gefäßendothel beschädigt und das Blut mit der darunterliegenden Adventitia in Kontakt treten kann. Bemerkenswerterweise kann es bei längerfristigen Erkrankungen wie einem Tumorleiden zu anatomischen Störungen, Hyperpermeabilität oder funktionellen Änderungen des Endothels kommen, welche eine Interaktion von FVII und TF ohne Verletzung ermöglichen (18). Durch die Aktivierung von FVII zu FVIIa in Verbindung mit TF in Gegenwart von ionisiertem Kalzium aktiviert der entstandene FVIIa-TF-Komplex Faktor X (FX) und Faktor IX (FIX). Dadurch wird die Bildung von FVa ermöglicht. Das Zusammenwirken dieser Faktoren, auch Prothrombinase-Komplex genannt, spaltet zirkulierendes Prothrombin zu Thrombin (FIIA), das für die lokale Plättchenaktivierung und die Verstärkung des Gerinnungsprozesses durch die Bildung von Clotting-Faktoren (Faktor XIa (FXIa) und Faktor XIIIa (FXIIIa)) erforderlich ist. In der Folge wird Fibrinogen zu Fibrin umgewandelt und der Fibrinthrombus wird durch FXIIIa quervernetzt. Es kommt zum Verschluss des Endothelschadens. Das Ausmaß dieses Prozesses ist über zahlreiche Feedbackmecha-

nismen reguliert. So interagiert Thrombin mit Thrombomodulin; Protein C und das fibrinolytische System werden aktiviert. Der Thrombin-Antithrombin-Komplex wird gebildet und dabei ist der endotheliale *Tissue Factor Pathway Inhibitor 1* (TFPI-1) involviert (18).

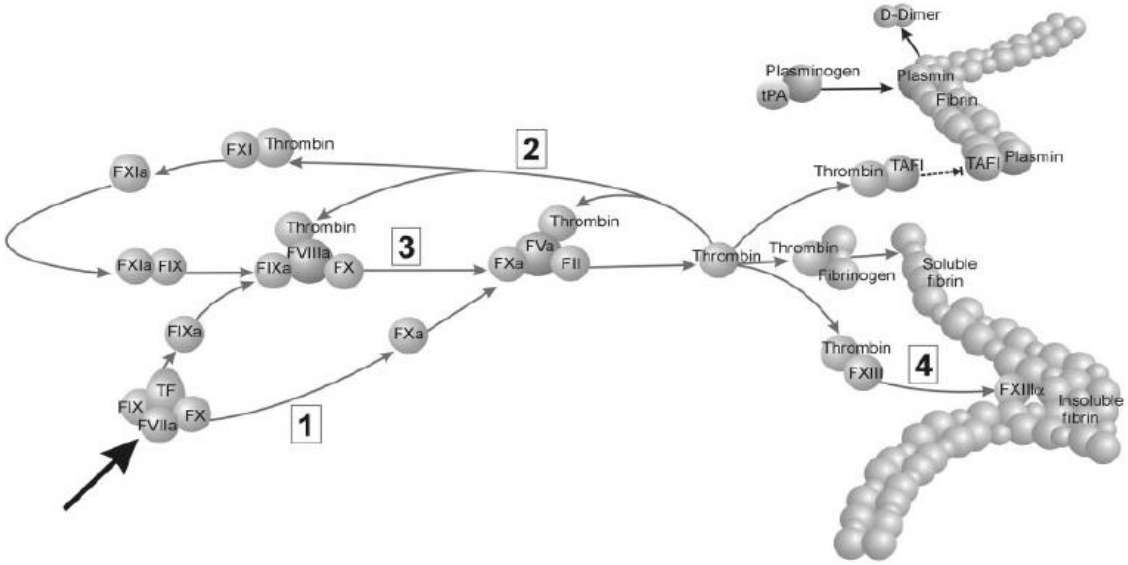

Abbildung 6: Gegenwärtiges Modell der Gerinnungskaskade und Fibrinolyse: *In vivo* wird die Gerinnung hauptsächlich vom FVIIa-TF-Komplex in Verbindung mit FIX und FX initiiert (schwarzer Pfeil). Durch die Aktivierung von FX (1) kann FV in seinen aktiven Zustand überführt werden und Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa) gespalten werden. Durch FIIa werden Clotting-Faktoren (FXI) aktiviert, Fibrinogen zu Fibrin umgewandelt und außerdem durch FXIII der Fibrinthrombus quervernetzt (modifiert nach (19)).

Durch Krebserkrankungen können diese Prozesse in chronischer und repetitiver Form auftreten und zu Koagulopathien führen, wobei eine Malignität typischerweise mit einer erhöhten Gerinnungsneigung einhergeht (18). Interessanterweise tragen die MP, die von Tumorzellen stammen, charakteristischerweise TF auf ihrer Oberfläche (20). TF, der Initiator der extrinsischen Gerinnung, ist auch in krebsassoziierte Prozesse, wie Hyperkoagulabilität, Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung, involviert (18). Es wurde nachgewiesen, dass die Höhe des TF-Spiegels mit der Invasivität von primären kolorektalen Karzinomen, Mammakarzinomen und Pankreaskarzinomen und deren Metastasierung korreliert (21).

1.8 Die klinische Bedeutung der Mikropartikel

Im Gegensatz zur ursprünglichen Annahme, dass es sich bei MP nur um Thrombozytenstaub handelt, werden sich Wissenschaftler und Ärzte ihrer großen Bedeutung bei

der interzellulären Kommunikation zunehmend bewusst (4). MP wurden in vielen Körperflüssigkeiten nachgewiesen, wie Blut, Urin, Pleuraergüssen und Aszites. Zudem sind ihre Anzahl, Herkunft, Funktion sowie ihre Bestandteile mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert (22). In deutlich kleineren Mengen sind sie auch im Blut von Gesunden nachweisbar. Das Gleichgewicht des MP-Spiegels im menschlichen Blut ist sowohl von deren Freisetzung als auch von deren Abbau abhängig (15). Da MP von einer Vielzahl von Zellen wie Plättchen, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten und anderen Zellen freigesetzt werden können, können Erkrankungen, die mit einer Veränderung der genannten Zellen einhergehen, zu Störungen im Gleichgewicht der MP-Produktion und des MP-Abbaus führen (15). In den folgenden Abschnitten wird die Bedeutung der MP unter physiologischen und pathologischen Gesichtspunkten beleuchtet, um die klinische Relevanz der MP zu verdeutlichen und folglich auch den wissenschaftlichen Stellenwert der in dieser Arbeit beschriebenen Methode zu unterstreichen.

1.8.1 Mikropartikel in gesunden Individuen

Die gegenwärtige Forschung hat sich hauptsächlich auf das Vorkommen der MP unter pathologischen Bedingungen fokussiert, sodass diese als rein schädigend missverstanden werden könnten. Diese Ansicht befindet sich jedoch im Wandel, da MP identifiziert werden konnten, die sowohl aktiviertes Protein C als auch endotheliale Protein-C-Rezeptoren beinhalten. Dieser Protein-Rezeptor-Komplex dient als Antikoagulans und kann antiinflammatorisch und zytoprotektiv wirken (4). Außerdem spielen MP durch die Aktivierung des Prothrombinasekomplexes auch eine wichtige Rolle bei der physiologischen Hämostase (23).

1.8.2 Die pathophysiologischen Funktionen der Mikropartikel

MP stehen mit einer Vielzahl von Erkrankungen in Verbindung. Sowohl bei Erkrankungen des Gerinnungssystems (z. B. Heparin-induzierte Thrombozytopenie – HIT) als auch bei kardiovaskulären Störungen (z. B. akutes Koronarsyndrom) und Infektionen (z. B. Sepsis) sind sowohl thrombembolische Ereignisse als auch Blutungen mit signifikant veränderten MP-Spiegeln im Blut assoziiert (15).

Vor allem in kleinen Arterien und Arteriolen, welche bereits Atherosklerose oder einen Vasospasmus vorweisen, führen Scherkräfte sowohl zu einer Aktivierung der Thrombozyten als auch zur Freisetzung von MP. Als Folge kann eine Obstruktion des Gefäßes auftreten (23). Auch bei Patienten mit pulmonaler Hypertension, akutem Atemnot-Syndrom (ARDS), chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) und bei Rauchern konnten vermehrt MP nachgewiesen werden (4). Bei Letzteren vor allem solche, die sich vom pulmonalen Kapillarendothel ableiteten. Dies führte zu der Annahme, dass in der Lunge von Rauchern eine verstärkte Apoptose der pulmonalen Kapillaren stattfindet, welche einen alveolären Schaden initiiert. Beim lebensbedrohlichem ARDS ließen sich in der bronchoalveolären Lavage erhöhte Spiegel von TF-tragenden MP nachweisen, was sich klinisch auf die alveoläre Gerinnungsneigung dieses Patientenklientels beziehen lässt (4).

MP, die sich bei den oben genannten Fällen von T-Zellen ableiteten, können zu einer Dysfunktion und Entzündung des Endothels führen. Dabei zeigt sich eine Veränderung der Prostazyklin- und Stickstoffoxid-Wirkung und die MP erlangen dadurch eine parakrine Wirkung (24). Eine Erkrankung, die die Bedeutsamkeit der MP während der physiologischen Gerinnung hervorhebt, ist das Scott-Syndrom. Dieses führt zu einer fehlerhaften Externalisierung von PS auf den Thrombozyten und dadurch zu einer fehlenden Freisetzung von MP, was mit einer hohen Blutungsneigung einher geht (4). In der nachfolgenden Tabelle 2 sind mit MP assoziierte Erkrankungen zusammengefasst.

Pathologie	MP-Herkunft	Quelle
Arterielle Hypertonie	Endothel, Thrombozyten, Monozyten	(24)
Lungenarterienembolie	Thrombozyten	(25)
Herzinsuffizienz	Endothel, Thrombozyten	(26)
Präeklampsie	Lymphozyten, Granulozyten	(27)
M. Crohn	Thrombozyten, Leukozyten, Endothel	(28)
Polytrauma	Thrombozyten	(29)
AIDS	Lymphozyten	(30)
HIT	Thrombozyten	(31)
KHK	Endothel, Thrombozyten, Monozyten	(32)
Sepsis	Thrombozyten, Granulozyten	(33)
Nächtliche paroxysmale Nykturie	Thrombozyten	(34)
APS	Endothel, Thrombozyten, Monozyten	(35)
Vaskuläre Demenz	Thrombozyten	(36)
Vaskulitis	Thrombozyten, Endothel	(35)
Diabetes mellitus Typ II	Thrombozyten, Endothel	(37)

Tabelle 2: Herkunft von MP bei verschiedenen Erkrankungen

1.8.3 Mikropartikel und Tumorerkrankungen

Patienten mit einem malignen Prozess weisen ein vier- bis fünffach erhöhtes Risiko auf, ein thrombembolisches Ereignis zu erleiden. Das höchste Thromboserisiko haben Patienten mit Glioblastom und mit Ovarial- und Pankreaskarzinomen. Häufig findet das thrombembolische Ereignis noch vor der eigentlichen Diagnose der malignen Erkrankung statt und führt zu einem ersten Arzt-Patienten-Kontakt mit anschließender Diagnostik. Häufig geht eine Thrombembolie mit einer verschlechterten Prognose des Patienten einher (20). Trotz der bekannten Verbindung von Malignom und thrombembolischen Ereignissen ist der pathophysiologische Zusammenhang bisher nur teilweise aufgeklärt.

In den letzten Jahren zeigten viele Untersuchungen, dass dieser prothrombotische Zustand an die Anwesenheit von MP geknüpft ist (20). Einige Forschungsgruppen wiesen nach, dass Patienten mit einem Tumorleiden und einer tiefen Beinvenenthrombose (TVT) mehr TF-tragende MP und eine erhöhte Aktivität von TF aufweisen als die Vergleichsgruppe von Krebspatienten ohne Thrombembolie (38). Die Thromboseneigung bei Tumorpatienten kann zum einen durch die Überexpression von TF durch den Tumor sowie Zellen der Tumorumgebung erklärt werden und zum anderen wurden MP als die Hauptquelle von zirkulierendem aktiven TF identifiziert (20). In Tabelle 3 ist eine Auswahl an bereits in dieser Arbeit präsentierten Studien zusammengefasst, welche mit der vermehrten Ausschüttung von MP und erhöhter TF-Aktivität einhergehen.

Erkrankung	Ergebnisse	Quelle
Mamma-Ca	Erhöhte Spiegel von Anx V positiven MP bei Krebspatientinnen vs. Patientinnen mit benignen Knoten	(39)
Lungen-Ca	Vermehrtes TF-Ag, MP- und TF-Aktivität	(40)
Kolorektales Ca	MP-Summe gleich zur Kontrollgruppe, TF-positive MP doppelt so hoch wie in Kontrollgruppe	(41,42)

Tabelle 3*:* Erhöhte TF-Aktivität und MP-Spiegel im Blut von verschiedenen Tumorpatienten (39, 40, 41, 42)

Da MP den horizontalen Transfer bioaktiver Moleküle wie Proteine, RNA und MicroRNA erleichtern, wird weiterhin vermutet, dass sie Einfluss auf die Tumorentstehung, Metastasierung, Entzündung, Angiogenese, Gerinnung und Stammzellerneuerung sowie -nachbildung nehmen. Das Wissen, dass zwischen MP und dem Tumorstroma eine Kommunikation stattfindet, untermauert diese Hypothese (43). Kommunikation meint in diesem Zusammenhang, dass MP, die sich von einer hochmalignen Prostatakarzinomzelllinie (PC3) ableiten, die Beweglichkeit und den Widerstand gegen die Apoptose in Fibroblasten in der Mikroumgebung positiv zu beeinflussen vermögen. Die Fusion von MP, die sich auf Tumorzellen und Monozyten zurückführen lässt, war zudem in der Lage, das Immunsystem zu modulieren.

Die Differenzierung von Monozyten zu antigenpräsentierenden Zellen wurde unterbunden sowie die Ausschüttung von immunsuppressiven Zytokinen von Monozyten aktiviert, was die T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Funktion inhibiert (43). Dieser pathophysiologische Vorgang könnte auch die mangelnde T-Zell-Proliferation bei Epstein-Barr-

Virus-assoziierten Lymphomen erklären (44). Ferner gibt es Hypothesen, die besagen, dass die oben beschriebene Thromboseneigung der Tumorpatienten auch dem Überleben der Tumorzellen dient. Das Fibrin, das bei diesem Vorgang gebildet wird, soll demnach die Tumorzellen umhüllen, diese so vor einer Abwehrreaktion des Immunsystems schützen und gleichzeitig eine Matrix bilden. Diese soll die Angiogenese fördern, da sie ein entscheidender Faktor für das Tumorwachstum ist (45). Neue Blutgefäße sichern die ausreichende Versorgung mit Nährstoffen, Sauerstoff und Wachstumshormonen und ermöglichen gleichzeitig die Streuung von Tumorzellen (1).

MP verstärken auch die Metastasierung von Tumoren, da sie Proteasen, wie die Metalloproteinasen 1 und 2 und Plasminogenaktivatoren vom Typ der Urokinase, auf ihrer Oberfläche tragen. Die Wirkung dieser Proteinasen auf die Metastasierung, Angiogenese und Invasivität des Tumors konnte bereits bestätigt werden (1). MP können es einem Tumor ermöglichen, sowohl einer Immunantwort des Körpers als auch Chemotherapeutika zu entgehen. So konnten bei chemoresistenten Tumorzelllinien MP nachgewiesen werden, die einen höheren Gehalt an Chemotherapeutika enthielten als chemosensible Zelllinien und dadurch über die MP die Chemotherapeutika aus der Tumorzelle befördern (1).

Abbildung 7 enthält noch weitere Einflüsse der MP auf die Tumorfunktionen, wie eine Steigerung der Invasivität und die Bildung eines aggressiveren Tumorphänotyps.

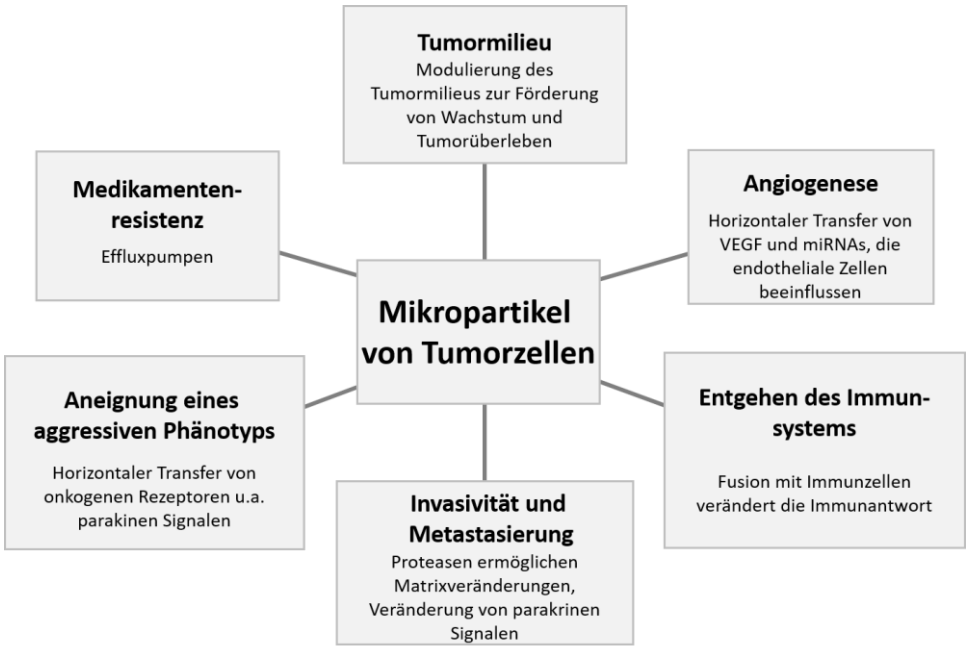

Abbildung 7: Funktionen der Mikropartikel von Tumoren: Mikropartikel beeinflussen viele Funktionen des Tumors. So begünstigen sie die Widerstandsfähigkeit gegenüber Chemotherapeutika, modulieren die Tumorumgebung zugunsten des Tumors, fördern die Angiogenese, verändern die Immunantwort des Körpers gegen diese Zellen, verhelfen zur Metastasierung sowie Invasivität und unterstützen die Bildung eines aggressiveren Tumorphänotyps (modifiziert nach (43)).

1.9 FRAGESTELLUNG

Ein erhöhter MP-Spiegel wurde bereits in einer Vielzahl von Erkrankungen wie Malignomen, Entzündungen und Thrombosen nachgewiesen. Die Herkunft, Zusammensetzung und Funktion können die zugrunde liegende Erkrankung reflektieren (1). Daher ist das Ziel dieser Arbeit zu evaluieren, ob MP als krankheitsassoziierte Marker (Surrogatmarker) verwendet werden können, um Rückschlüsse auf Erkrankungen ziehen zu können und eventuell spezifische Therapiestrategien zu entwickeln.

Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher, klinisch anwendbare Verfahren aufzuzeigen, mit denen MP aus Körperflüssigkeiten, in diesem Fall Aszites und Pleuraergüssen, isoliert werden können. Die Arbeiten sollen als *Proof of Principles* gelten, um später in klinischen Studien zu untersuchen, ob charakteristische MP als Surrogatmarker für die Erkennung von bösartigen Erkrankungen einsetzbar sind.

Es wurden drei Zielstellungen definiert:

1. Evaluation einer geeigneten Isolationsmethode von MP aus malignen Ergüssen von Krebspatienten und benignen Ergüssen unter Einbeziehung der dortigen Kalziumkonzentration.
2. Verwendung von *Magnetic Mircobeads* beschichtet mit Anx V, um PS auf MP-Oberfläche zu binden.
3. Verwendung der Durchflusszytometrie und ELISA-Technologie als Nachweismethode für eine strukturelle und funktionale Untersuchung von MP.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 GERÄTE

Geräte	Hersteller
Biofuge A, Heraeus	Thermofisher, Waltham, Massachusetts, USA
Centrifuge 5417	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
ELISA- Reader	Dynex Technologies, Buštěhrad,Tsche-chische Republik
NAVIOS	Beckman Coulter Inc., Brea, Kalifornien, USA
Vibrofix VF1	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Wasserbad 1002	GFL, Burgwedel, Deutschland
CO_2 Brutschrank BB 6060 CU, Heraeus	Thermofisher, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 4: Auflistung der Geräte

2.1.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Chemikalien	Bezugsquelle
H_2SO_4	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Wasser (destilliert)	

Tabelle 5: Auflistung der Chemikalien und Reagenzien

2.1.3 PUFFER UND LÖSUNGEN

Puffer und Reagenzien	Bezugsquelle
Dulbecco's PBS (without Ca^{2+})	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Dulbecco's PBS (with Ca^{2+})	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Isoton II Diluent (FACS-Puffer)	Beckman Coulter Inc., Brea, Kalifornien, USA

Tabelle 6: Auflistung der Puffer und Reagenzien

2.1.4 KITS

Kits	Bezugsquelle
DC Protein Assay	Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA
IMUBIND® Tissue Factor ELISA kit	Sekisui Diagnostics, Lexington, Massachusetts, USA
IMUBIND® Total TFPI ELISA kit	Sekisui Diagnostics, Lexington, Massachusetts, USA
Annexin V Micro Bead Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MP-Activity-Assay	Aniara, West Chester, OH, USA
MegaMix,	Biocytex, Marseille, Frankreich

Tabelle 7: Auflistung der Kits

2.1.5 SONSTIGE MATERIALIEN

Sonstige Materialien	Bezugsquelle
Eppendorftube	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FACS Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Serologische Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich

Tabelle 8: sonstige verwendete Materialien

2.2 METHODEN

In diesem Projekt wurden Ergüsse von Patienten benutzt, die aufgrund ihrer bösartigen Erkrankung im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) behandelt wurden. Die Ergüsse wurden von drei verschiedenen Patienten gesammelt, welche an kolorektalem Karzinom (CRC), Brustkrebs (BC) und kleinzelligem Lungenkarzinom (SCLC) litten. Die Forschung mit den hier benutzten menschlichen Materialien wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt (AZ 11 - 206, 22. April 2013).

Die Ergüsse wurden durch Aszites- und Pleurapunktionen gewonnen und bei -80°C eingefroren. Ergebnisse anderer Studien zeigen, dass dieses Vorgehen die MP-Analyse nicht signifikant beeinflusst (46). Bezogen auf die Empfehlungen der "*International Society of Thrombosis and Hemostasis"* wurden vor der Analyse zwei Zentrifugationsschritte durchgeführt, um Zellen, Zelltrümmer und apoptotische Körper zu entfernen, und zwar nach folgender Vorgabe: 15 min bei 2500 g zentrifugieren, Überstand überführen und diesen weitere 15 min bei 2500 g zentrifugieren (47). Dadurch werden MP von Exosomen und apoptotischen Körpern getrennt (43) und die Lösung ist reich an *low speed extracellular vesicles* (lsEV). Um die MP zu binden, wurde das *Annexin V MicroBead Kit* von Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland) verwendet, das ursprünglich für die positive Selektion oder Entfernung apoptotischer Zellen entwickelt wurde und auf deren Fähigkeit, Anx-V-beschichtete *Magnetic Microbeads* zu binden, beruht (9). Diese gebundenen MP werden als *captured microparticles* (capMP) bezeichnet. Die Unversehrtheit von mit MP assoziierten TF-Komplexen hängt von der physiologischen Kalziumkonzentration ab. Wegen der niedrigeren Kalziumkonzentration in den malignen Ergüssen verglichen mit dem physiologischen Serum fügten wir je 4 mM Kalziumchlorid vor und nach dem Bindungsprozess hinzu und verglichen die Ergebnisse miteinander.

Der Nachweis und die Analyse der MP wurden durch zwei unterschiedliche Methoden erreicht. Für die Durchflusszytometrie wurden die Größe und die TF-Expression als Marker benutzt und für die ELISA-Assays wurden die Anx-V-gekoppelten *Magnetic Microbeads* als Bindungsstruktur und die TF-Expression als Nachweismethode verwendet. Durch ihre geringe Größe (0,1–1 µm) erfordert die Arbeit mit MP und deren Analyse Arbeitsbedingungen, welche sich dicht an dem Sensitivitätslimit des Durch-

flusszytometers befinden. Wir benutzten ein hochauflösendes Navios Durchflusszytometer von Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA) und kalibrierten dieses System mit *Megamix Beads for Cytometer Settings in Microparticle Analysis* (Biocytex, Marseille,Frankreich). Das ist eine Kombination von fluoreszierenden Kügelchen, genannt *Beads*, mit variierenden Durchmessern, um die Größe der MP abzudecken (0,5 und 0,9 µm) (48).

Die Markierung mit TF-fluoreszierenden Antikörpern (*TF mouse anti-human monoclonal, FITC, CLB/TF-5, antibody-LS-C44960*, LifeSpanBiosciences, Seattle, USA) wurde durchgeführt, wie es vom Hersteller empfohlen wird. MP wurden als Partikel mit einer eindeutigen Größe definiert, welche die PS präsentieren. Da TF-tragende MP unser Ziel waren, definierten wir alle Partikel in dem vorbestimmten Größenbereich, die tatsächlich TF exprimierten, als richtig positiv.

Für die Berechnungen der Sensitivität und Spezifität waren die falsch positiven definiert als Partikel, die TF exprimierten, aber außerhalb des Größenbereichs lokalisiert waren; richtig negative als TF-negative Partikel außerhalb des Größenbereichs und falsch negative als TF-negative Partikel in dem von uns definierten Größenbereich. Um die MP-Aktivität in malignen Ergüssen festzustellen, benutzten wir den *ZYMUPHEN MP-activity kit* (Aniara, West Chester OH, USA). Auch wurde die TF- und die FX-Aktivität der gebundenen MP bestimmt, indem wir den *Human TF chromogenic activity assay kit* und den *AssaySense human FX chromogenic activity assay kit* (beide AssayPro, St. Charles, MO, USA) benutzten. Die Experimente wurden nach Anleitung der Hersteller durchgeführt.

2.2.1 Anreicherung von MP durch additive Zentrifugationsschritte

Für die Aufreinigung von MP aus den gewonnenen Ergüssen werden in dieser Arbeit zwei verschiedene Isolationsprotokolle verwendet. Zum einen das Verfahren nach Huica et al. (49) und jenes nach Stagnara et al. (50) (Tabelle 11). Bei Verfahren 1 (Huica et al.) sind zeitaufwendige Zentrifugationsschritte von insgesamt 50 Minuten sowie Ultrazentrifugation notwenig und bei Verfahren 2 (Stagnara et al.) dauert die MP-Aufreinigung nur 32 Minuten. In Tabelle 9 sind die Zentrifugationsschritte nach Huica und nach Stagnara aufgeführt.

Verfahren nach Huica		Verfahren nach Stagnara	
Dauer	**Arbeitsschritte**	**Dauer**	**Arbeitsschritte**
10 min	3 ml Erguss bei 1500 x g zentrifugieren	**15 min**	Bei 1500 x g zentrifugieren, Überstand in neues 1,5 ml Eppendorftube überführen
10 min	1 ml des Überstandes bei 13000 x g zentrifugieren	**2 min**	Diesen Überstand bei 13000 x g zentrifugieren, Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorftube überführen
30 min	800 µl des Überstandes bei 21250 x g ultrazentrifugieren, 700 µl des Überstandes verwerfen, in restlichen 100 µl das Pellet resuspendieren	**15 min**	Diesen Überstand bei 2500 x g zentrifugieren

Tabelle 9: Zentrifugationsprotokolle zur Isolation von Mikropartikeln nach Huica et al. und Stagnara et al.(49)

Um beide Zentrifugationsprotokolle miteinander zu vergleichen, führten wir eine Proteinbestimmung zur Erfolgskontrolle durch. Dazu wurde nach jedem Schritt des jeweiligen Zentrifugationsprotokolls eine Probe abgenommen, die mittels des *DC Protein Assays* (Bio Rad, Herts, Vereinigtes Königreich), das nach der Lowry-Methode arbeitet, untersucht wurde. Die Vorgehensweise hierfür entspricht der Anleitung von *Bio Rad*.

Nach eingehender Überprüfung und dem Vergleich beider Verfahren miteinander (siehe 3.1.), verwendeten wir das in Tabelle 10 stehende Verfahren zur Vorbereitung der Ergüsse.

Zeit	Verfahren	Bemerkung
15 min	Zentrifugation bei 2500 x g	Bei 4 °C
	Überstand in neues 1,5 ml Eppendorftube überführen	Bei RT
15 min	Überstand bei 2500 x g zentrifugieren	Bei 4 °C

Tabelle 10: Reduziertes Zentrifugationsprotokoll zur Isolation von Mikropartikeln

2.2.2 Isolationsmethode für MP mithilfe Magnetic Microbeads

Die Verwendung Anx-V-beschichteter *Magnetic Microbeads* isoliert die daran gebundenen MP von der sie umgebenden Flüssigkeit (zum Beispiel Blut, Urin, Pleuraergüssen oder Aszites). Hierfür machten wir uns die *Magnetic Cell Separation* (MACS) zunutze, was ein Verfahren ist, das Zellen, die sich in einer Lösung befinden, sortiert oder anhand verschiedener Oberflächenstrukturen und -merkmale voneinander trennt. Das von uns verwendete *Annexin V Micro Bead Kit* der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) wird für die Detektion und Isolation apoptotischer und nekrotischer Zellen verwendet. Die *Magnetic Microbeads* des Kits sind magnetisch und mit Anx V beschichtet und binden somit spezifisch das PS an der MP-Oberfläche.

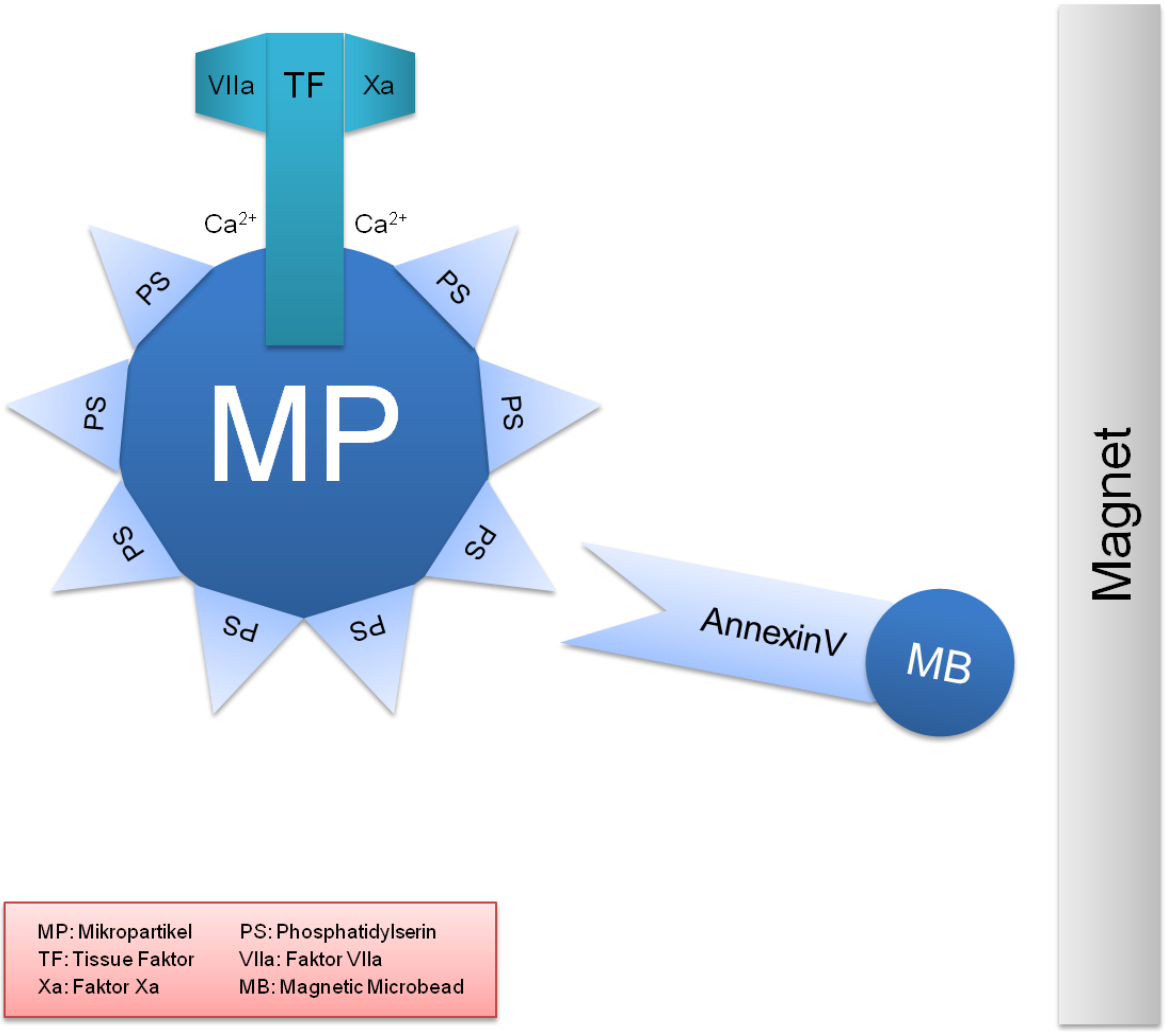

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Isolation von Phosphatidylserin-präsentierenden Mikropartikeln (MP) mittels *Magnetic Microbeads*: Das Phosphatidylserin an der MP-Oberfläche wird spezifisch durch die mit Annexin-V-beschichteten *Magnetic Microbeads* gebunden. Nun können die MP mittels *Magnetic Cell Separation* von anderen Vesikeln, welche sich in der Lösung befinden, über einen Magneten getrennt werden.

2.2.3 Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Das Prinzip basiert auf einer Bindung zwischen einem spezifischen Antikörper und einem entsprechenden Antigen.

Für diese Arbeit wurden Sandwich-ELISA verwendet, die eine hohe Sensitivität durch den Einsatz von zwei spezifischen Antikörpern aufweisen. Abbildung 9 zeigt eine schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA.

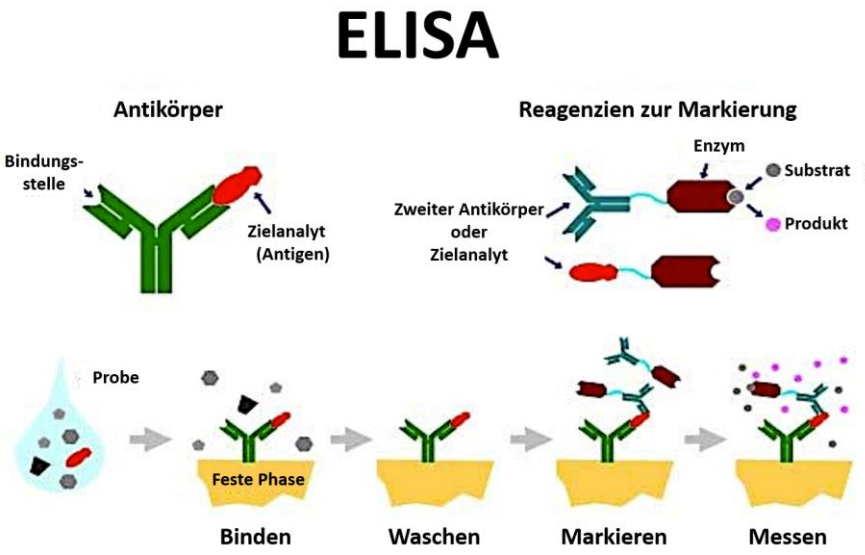

Abbildung 9: Prinzip des Sandwich-ELISA: Der Erstantikörper ist an eine feste Phase gebunden, dieser bindet spezifisch das zu untersuchende Substrat. Der Zweitantikörper wird hinzugegeben und verbindet sich mit dem Substrat, was nach wie vor mit dem Erstantikörper verbunden ist. Durch das Enzym, welches sich am Zweitantikörper befindet, wird ein spezifisches Substrat umgesetzt, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt. Nun kann im Fotometer die Konzentrationsänderung des entstandenen Farbumschlags gemessen werden, um dadurch auf die Konzentration des Zielmoleküls rückzuschließen (modifiziert nach (51))

Wie in der Abbildung 9 zu sehen, ist der Erstantikörper an eine feste Phase gebunden, an die nun das spezifische Substrat bindet. Nach einem anschließenden Waschschritt folgt die Hinzugabe des Zweitantikörpers, welcher nun spezifisch an das am Erstantikörper gebundene Substrat bindet. Am Zweitantikörper ist ein Enzym gekoppelt, meistens das Enzym Meerrettichperoxidase (*Horseradish Peroxidase*; HRP). Das Enzym setzt ein spezifisches Substrat um, wodurch ein Farbumschlag zu beobachten ist.

Je stärker die Farbintensität ist, desto mehr Substrat wurde umgesetzt, desto mehr spezifischer substratgekoppelter Zweitantikörper wurde gebunden und desto mehr bestimmende Antigene wurden spezifisch an dem an der Festphase gekoppelten Erstantikörper gebunden. Die Signalstärke verhält sich als Funktion der Antigenkonzentration proportional zu der des Substrates.

Die Konzentrationsänderung des durch die enzymatische Reaktion entstandenen Farbstoffes kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz mit dem Fotometer anhand der folgenden Formel untersucht werden:

$$E_\lambda = lg\frac{I_0}{I_1} = \varepsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

- I_0: Intensität des einfallenden Lichts
- I_1: Intensität des transmittierten Lichts
- c: Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit
- ε_λ: Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
- d: Schichtdicke des durchstrahlenden Körpers

2.2.3.1 Probenvorbereitung für die anschließende Analyse mittels ELISA

Die Ergüsse wurden aufgetaut und anschließend zwei Mal bei bei 2500 x g 4°C zentrifugiert (Tabelle 11). Der Überstand wurde überführt, mit 100 mM $CaCl_2$ angereichert und mit *Magnetic Mircobeads* versehen. Nach der Inkubation für 15 min auf dem Drehteller wurden die Säulen bei Raumtemperatur in ein Magnetfeld gestellt und mit 500 µl *Binding Buffer* gespült. Der Überstand wurde mit 250 µl *Magnetic Microbeads* und 10 µl $CaCl_2$ versehen. Danach erfolgte ein 15-minütiger Inkubationsschritt bei 4°C auf dem Drehteller. Nachdem die Säulen in das Magnetfeld gestellt wurden, mussten diese noch wiederholt mit *Binding Buffer* gespült werden, wie Tabelle 11 entnommen werden kann. Im Anschluss sind die capMP für den ELISA verwendbar.

Zeit	Verfahren	Bemerkung
15 min	Auftauen	Bei 37 °C
15 min	Zentrifugieren (2500 x g)	Bei 4 °C
15 min	Zentrifugieren (2500 x g)	Bei 4 °C
	1. Ansatz: 400 µl Erguss/Plasma in 1,5 ml Eppendorftube	Zum Erguss 16 µl $CaCl_2$ (100 mM); kann nun für ELISA verwendet werden
	2. Ansatz: 500 µl Erguss/Plasma in 1,5 ml Eppendorftube	Zum Erguss 20 µl $CaCl_2$ (100 mM)
	Überstand mit 250 µl *Magnetic Microbeads* versehen	Zum Erguss 10 µl $CaCl_2$ (100 mM)
15 min	Auf Drehteller inkubieren	Bei 4 °C
	Säulen in Magnetfeld stellen	Bei RT
	Säulen mit 500 µl 1x *Binding Buffer* spülen	Vollständig durchlaufen lassen
	Vom 2. Ansatz 215 µl in neues 1,5 ml Eppendorftube	
	2. Ansatz auf Säule geben	Vollständig durchlaufen lassen und Durchlauf auffangen; 2. Ansatz kann nun für ELISA verwendet werden
	Säulen 3 Mal mit 215 µl 1x Binding Buffer waschen	3 ml 1x Binding Buffer + 40 µl $CaCl_2$ (100 mM) verwenden
	Säulen in 1,5 ml Eppendorftube stellen; Zentrifuge auf 800 rpm hochfahren lassen	Inhalt des 1,5 ml Eppendorftube kann nun für ELISA verwendet werden

Tabelle 11: Probenvorbereitung für die anschließende Analyse mittels ELISA

2.2.3.2 Durchführung der ELISAs

Die Analysen wurden mit dem *ELISA No. 845* und dem *ELISA No. 849* (beides Sekisui Diagnostics, Lexington, MA, USA) durchgeführt. Die verwendeten Ergüsse wurden wie in Tabelle 11 beschrieben aufgereinigt. Der *ELISA No. 845* dient der quantitativen Analyse der TF-Konzentration in einer Probe. Der TF wird durch einen murinen anti-human-TF-monoklonalen Antikörper erkannt. Der Erstantikörper ist fest an die ELISA-Platte gebunden. Zunächst wurden 100 µl des Ergusses und jeweils 100 µl des mitgeführten Standards auf die Platte aufgetragen und inkubierten bei 4 °C über Nacht. Nach der Inkubationszeit erfolgte ein viermaliges Waschen mit dem Wash-Puffer, um nicht gebundene Moleküle zu entfernen. Anschließend wurde der Detektionsantikörper hinzugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Abermals wurde die Platte viermal mit dem Wash-Puffer gewaschen. Nur so konnte sichergestellt werden, dass nur die gebundenen Detektionsantikörper das im Anschluss hinzugegebene Substrat umgesetzt haben. Am Detektionsantikörper ist HRP gebunden; bei dem Substrat handelt es sich um 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). TMB reagiert mit HRP, und es kommt zu einer Blaufärbung. Nach zwanzigminütiger Inkubationszeit des TMB wurde die Reaktion durch 0,5 M H_2SO_4-Lösung gestoppt. Dies hatte eine Gelbfärbung zur Folge. Die Platte wurde innerhalb von 30 min bei 450 nm fotometrisch analysiert. Durch die mitgeführte Standardreihe errechnete das verwendete Computerprogramm die Konzentration der TF-haltigen MP.

ELISA No. 849 wurde auf dieselbe Weise wie der beschriebene *ELISA No. 845* durchgeführt; nur der gebundene Erstantikörper richtet sich hier spezifisch gegen humanen TFPI.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der quantitativen Analyse der Ergüsse auf MP und wird nachfolgend im Detail dargestellt.

2.2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird zur Klassifizierung von Zellen hinsichtlich deren Eigenschaften bezüglich der Granularität, Größe und Fluoreszenzintensität verwendet. Das Prinzip beruht auf der Streuung optischer Signale, die auf Zellen oder Partikel treffen beziehungsweise diese passieren. Die sich in einer Suspension befindenden Partikel werden angesaugt und dann der Strömungskammer zugeführt. Die Strömungskammer besteht aus einem zentralen Kanal, durch den die Suspension mit den Partikeln geleitet wird. Der Kanal wird von einer Trägerflüssigkeit umgeben (Isoton II Diluent (FACS-Puffer)). Da diese Trägerflüssigkeit schneller fließt als die Probensuspension, entsteht ein Sog, der auf die Probensuspension wirkt. Somit können die zu untersuchenden Partikel nacheinander herausgesogen werden und einzeln auf den Laser treffen.

Im Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*; FSC) wird in einem flachen Winkel die Beugung des Lichts gemessen und ist somit proportional abhängig von der Größe des Partikels beziehungsweise der Zelle. Im Seitwärtsstreulicht (*side scatter*; SSC) wird hingegen die Brechung des Lichts im rechten Winkel gemessen und ist somit proportional abhängig von der Granularität des Partikels/der Zelle. Das Durchflusszytometer kann auch Fluoreszenzfarben messen, was auf der Markierung der Partikel mit fluoreszierenden Antikörpern beruht. Es befinden sich verschiedene Laser mit verschiedenen Wellenlängen im Durchflusszytometer, welche die partikelgebundenen Fluoreszenzfarbstoffe anregen. Wenn sie sich im angeregten Zustand befinden, dann emittieren die Elektronen das aufgenommene Licht, indem sie auf das ursprüngliche Energieniveau zurückfallen, was von dem Gerät gemessen wird. Für die durchgeführten Versuche wurde das Navios™ 10/3 Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) verwendet, welches mit drei Lasern ausgestattet ist: einem bei 405 nm, einem bei 488 nm und einem bei 638 nm.

Die Messung von bis zu zehn Farben ist im Bereich 450–755 nm (450 nm, 550 nm = FL1; 525 nm, 575 nm, 620 nm, 675/695 nm, 755 nm = FL2; 660 nm, 725 nm, 755 nm = FL3) möglich. Das Verfahren ist in Abbildung 10 grafisch dargestellt.

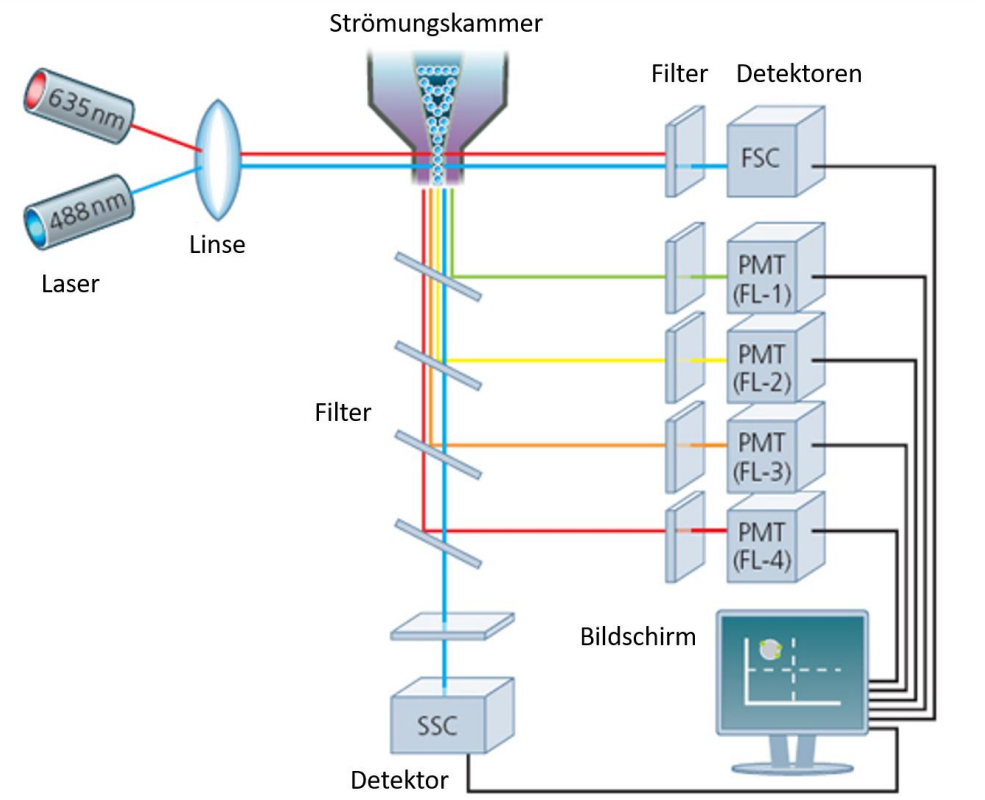

Abbildung 10: Aufbau des optischen Systems eines typischen Durchflusszytometers (nicht Navios 10/3): Der Laser trifft auf die Zellen. Das Streulicht trifft auf den *forward scatter (FCS, Vorwärtsstreulicht)*, der die Größe der Zellen detektiert. Orthogonal dazu positioniert, ermittelt der *side scatter* (SSC, Seitwärtsstreulicht) die Zellgranularität. *Photomultiplier tubes* (PMT) weisen die Fluoreszenzsignale der markierten Zellen nach (modifiziert nach (52)

Abbildung 10 zeigt, dass der Laser durch die erste Linse fokussiert wird und anschließend auf die Zellen trifft. Das Streulicht wird von dem FSC detektiert, dessen Daten in Beziehung zu der Größe der Zellen gesetzt werden können. Der SSC steht orthogonal zum Laserstrahl und lässt Rückschlüsse auf die Granularität zu. Die wellenlängenspezifischen Detektoren (*photomultiplier tubes*, PMT) stehen ebenfalls senkrecht zum Strahlengang des Lasers, wodurch es möglich ist, Fluoreszenzsignale markierter Zellen nachzuweisen.

2.2.4.2 MESSVORBEREITUNGEN

Für die Durchführung der Experimente wurde ein Messprotokoll unter Anleitung der *Fluorescence Microspheres* (Bangs Laboratories Inc., Fishers, USA) erstellt. Mithilfe der aus Polyester bestehenden *Beads* konnten *Gates* gesetzt werden, insbesondere wurde das *Gate* nach unten bei 0,5 µM begrenzt, denn dies entspricht den Literaturangaben der Größe von Ectosomen (Mikropartikeln). *Gates* sind vom Anwender definierte Felder, die ausnahmslos eine bestimmte Zellpopulation beinhalten. Nachdem ein solches *Gate* definiert ist, wertet der Computer nur die innerhalb dieses *Gates* liegenden Zellen oder Zellbestandteile hinsichtlich ihrer Fluoreszenz aus. Somit kann die Expression eines bestimmten Oberflächenmoleküls in einer definierten Zellpopulation bestimmt werden. So wurde durch uns ein *Gate* zur Definition der MP angelegt (siehe Abbildung 15).

2.2.4.3 PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE ANSCHLIEßENDE ANALYSE MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)

Nachdem die Ergüsse bei 37 °C aufgetaut wurden, zentrifugierten wir sie 15 min bei 2500 x g. Der Überstand wurde erneut bei gleichen Parametern zentrifugiert. Um eine Unterscheidung der Qualität der Aufreinigungsmethode zu ermöglichen, arbeiteten wir mit einem nativen Ansatz, einem zentrifugierten und einem Ansatz mit *Magnetic Microbeads.* Aufgrund der Komplexität der anschließenden Schritte sind diese Tabelle 12 zu entnehmen.

Zeit	Verfahren	Bemerkung
	nativer Ansatz: 150 µl Erguss + 6 µl $CaCl_2$ (100 mM)	Kann nun für FACS verwendet werden
15 min	Auftauen	Bei 37 °C
15 min	Zentrifugieren (2500 x g)	Bei 4 °C
15 min	Überstand zentrifugieren (2500 x g)	Bei 4 °C
	zentrifugierter Ansatz: 150 µl Erguss + 6 µl $CaCl_2$ (100 mM)	Kann nun für FACS verwendet werden
	Ansatz für capMP: 500 µl Erguss + 250 µl *Magnetic Microbeads* + 30 µl $CaCl_2$ (100 mM)	
15 min	Drehteller inkubieren	Bei 4 °C
10 min	Antikörper zentrifugieren bei 13200 x g	Bei 4 °C, CAVE: Antikörper sind sehr lichtempfindlich und verbleiben bis zum Gebrauch in der Zentrifuge
	Säulen in Magnetfeld stellen	Bei RT
	leere Säulen mit Ethanol spülen	
	Säulen mit 500 µl Binding Buffer aus *Magnetic Microbead* Kit 2 x spülen	Vollständig durchlaufen lassen
	Ansatz für capMP in Säule geben	
	2 x Säule spülen (je 100 µl Binding Buffer+$CaCl_2$)	
	Zentrifugieren	Bei RT, 700 rpm
	Nativer bzw. zentrifugierter Ansatz: 30 µl vom nativen bzw. zentrifugierten Ansatz + 5µl PBS + 5 µl Antikörper (zentrifugiert)	
	Negativkontrolle: 30 µl + 5 µl PBS	
	Ansatz mit capMP: 30 µl MB + 5 µl PBS + 5 µl Antikörper (zentrifugiert)	
	Ansatz Spülflüssigkeit: 30 µl Spülflüssigkeit + 5 µl PBS + 5 µl Antikörper (zentrifugiert)	
	Tubes mit Parafilm verschließen und vor Licht schützen	
30min	Inkubieren der Proben	Bei 4 °C im Kühlraum auf der Rüttelplatte
	Je 30 µl Cytocount + 150 µl PBS in jedes Tube	Megamix und Cytocount müssen unbedingt in den Kühlschrank

Tabelle 12: Probenvorbereitung für die anschließende FACS-Analyse

3 ERGEBNISSE

3.1 VERGLEICHENDE MP-PROTEINBESTIMMUNG NACH VERSCHIEDENEN AUFREINIGUNGSVERFAHREN

Wie bereits erwähnt, wurden für die Aufreinigung von MP aus Blutplasma zwei verschiedene Isolationsverfahren verwendet. Zum einen das Protokoll nach Huica et al. (49), welches Ultrazentrifugation beeinhaltete, und das nach Stagnara et al. (50), welches weniger zeitintensive Zentrifugationsschritte enthielt. Zum Vergleich der Effizienz beider Verfahren wurde der Proteingehalt der Ergüsse nach jedem Zentrifugationsschritt ermittelt (Abbildung 11 und 12). Die Proteinausbeute bei den beiden Verfahren war annähernd gleich. Die Sensitivität beider Verfahren war demnach ähnlich. Die höchste Proteinkonzentration bei maximal 40 mg/ml wurde bei den Ergüssen bei einer dekompensierten Herzinsuffizienz detektiert.

Um nun die Arbeitsschritte für die folgenden Ergebnisse ergiebig und effizient zu gestalten, wurde ein verkürztes MP-Isolationsverfahren mit nur zwei Zentrifugationsschritten verwendet nach Gyorgy et al. (2), bei dem angereicherte MP durch das Einfrieren bei -80 °C nicht geschädigt werden (53).

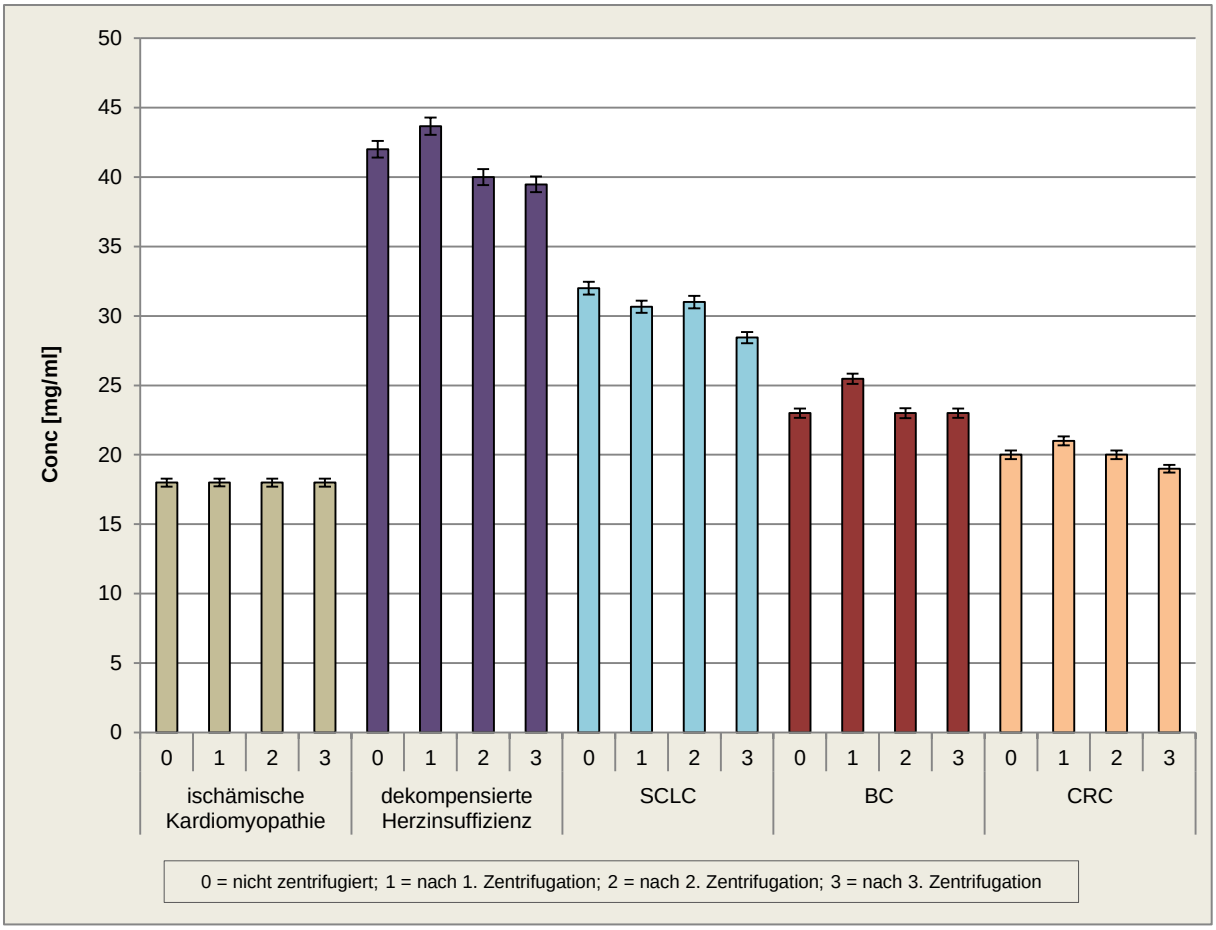

Abbildung 11 Proteinbestimmung mit ELISA der Proben nach den Zentrifugationsschritten nach dem Stagnaraprotokoll: Nach jedem Zentrifugationschritt führten wir eine Proteinbestimmung durch. Es ließ sich keine signifikante Veränderung des Proteingehalts der jeweiligen Ergüsse bzw. des Aszites nachweisen (50).

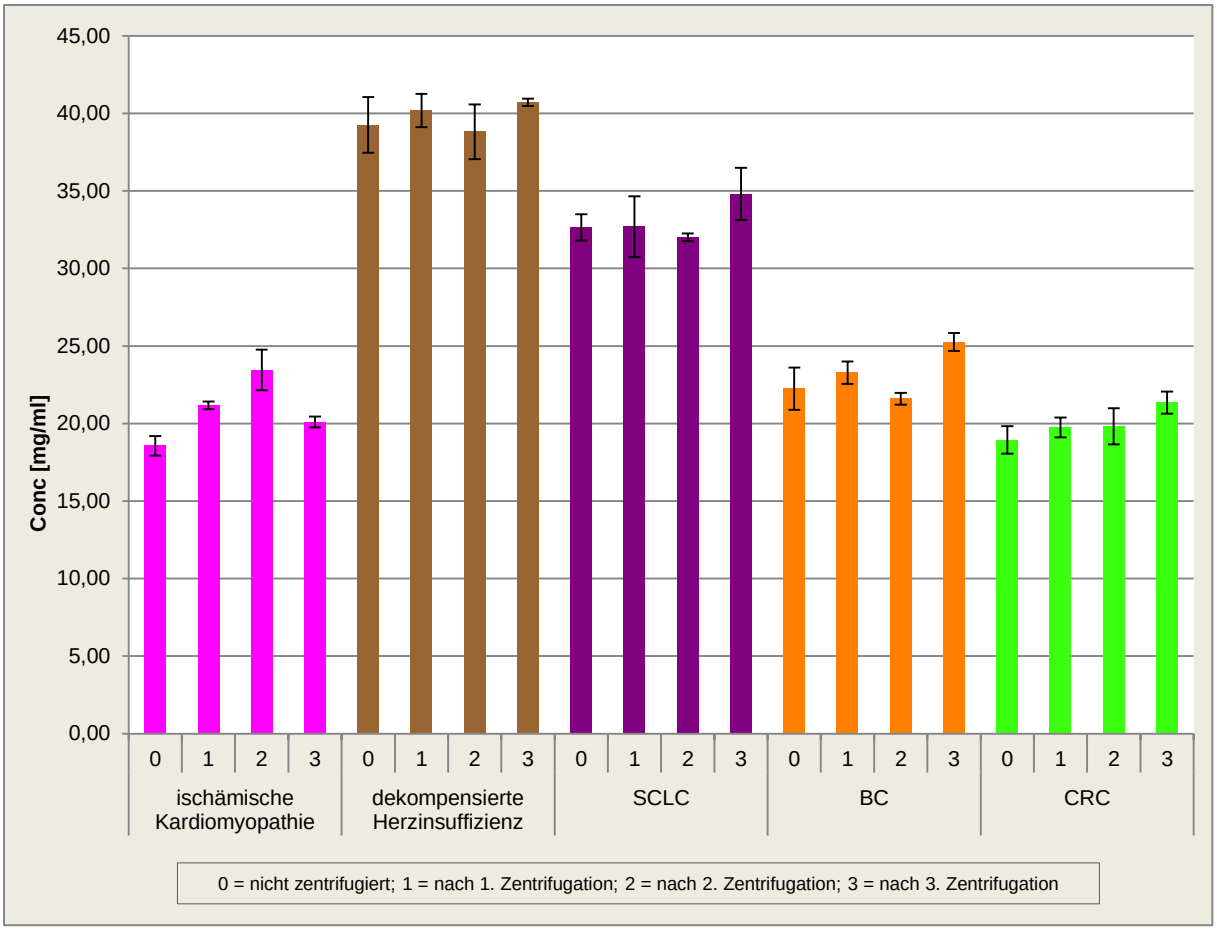

Abbildung 12: Proteinbestimmung mit ELISA der Proben nach den Zentrifugationsschritten nach dem Huicaprotokoll: Nach jedem Zentrifugationschritt führten wir eine Proteinbestimmung durch. Es ließ sich keine signifikante Veränderung des Proteingehalts der jeweiligen Ergüsse bzw. des Aszites nachweisen (49).

3.2 KALZIUMKONZENTRATION IN MALIGNEN ERGÜSSEN IM VERGLEICH ZU NORMALEM SERUM

Die PS-Präsentation ist in hohem Maße von der Kalziumkonzentration in der Umgebung der MP abhängig (11). Um hier bestmögliche Voraussetzungen für unsere neuartige Isolationsmethode zu schaffen, untersuchten wir zunächst die Kalziumkonzentration und den pH-Wert von 49 malignen Ergüssen. Die Kalziumkonzentration in den verwendeten malignen Ergüssen war um 22% verringert verglichen mit der im Serum (Tabelle 13).

Parameter	Erguss	Serum*
pH	7.73 ± 0.23	7.36 - 7.44
Ca^{2+} (mM)	1.64 ± 0.42	2.1 - 2.7

* Normale Serumwerte von 10 gesunden Testpersonen.
Unterschiede auf dem 0.001-Niveau signifikant (t-Test).

Tabelle 13: Kalziumkonzentration und pH-Wert in malignen Ergüssen; n=49

3.3 DIE OPTIMIERUNG DER KALZIUMKONZENTRATION

Um die gleichen Voraussetzungen für die zu untersuchenden malignen Ergüsse und Serumproben zu schaffen, bestimmten wir den Effekt von der Zugabe von $CaCl_2$ auf die PS-Restkonzentration. Dabei sollten die Bedingungen für den Anx-V-Bindungsprozess optimiert werden. Einer definierten Menge an MP wurden ansteigende $CaCl_2$-Konzentrationen von 0 bis 10 mM zugesetzt und der ELISA anschließend durchgeführt.

Durch die Zugabe von $CaCl_2$ erhöht sich das präsentierte PS direkt proportional (Abbildung 13). Die höchste PS-Menge wurde bei einer $CaCl_2$-Konzentration von 4–6 mM präsentiert. Daher wurden bei den Folgeexperimenten 4 mM $CaCl_2$ zu den malignen Ergüssen hinzugefügt.

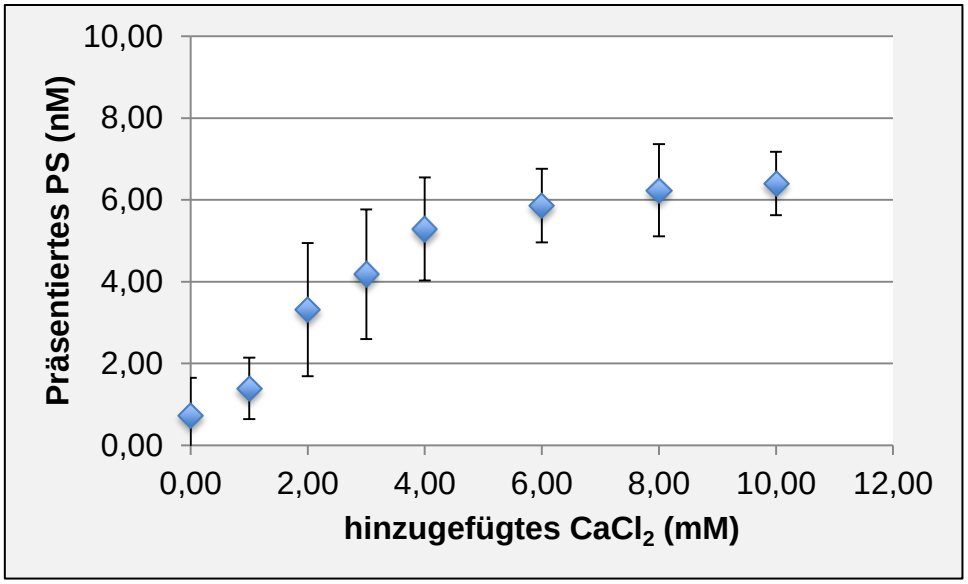

Abbildung 13: Der Effekt von Kalziumchlorid auf das präsentierte PS: Mit zunehmender Kalziumkonzentration wird von den MP mehr PS präsentiert.

3.4 Annexin-V-Bindung an PS als Isolationsmethode für MP

Nachdem wir die Aufreinigungsprotokolle mittels einer Proteinbestimmung verglichen haben (siehe Abb. 11 und 12), kamen wir zu dem Ergebnis, dass nur ein Zentrifugationsschritt nicht ausreichend ist, um MP von anderen Zellbestandteilen und insbesondere auch Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die sich in den zu untersuchenden Körperflüssigkeiten befinden, zu trennen. Auch György et al. beschreiben in *„Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles“* aus dem Jahr 2011 dieses Problem und kommen zu demselben Schluss (2).

Um durch Zentrifugation isolierte MP von verbliebenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen aufzureinigen, müssen MP qualitativ aus der Konzentrationsphase extrahiert werden. Dafür verwendeten wir eine spezielle Methode, bei der sich MP an eine Anx-V-beschichtete Phase binden und anschließend mittels Antikörperbindung detektiert werden können (*MP-Activity-Assay*, Aniara, West Chester OH, USA) (54). Diese gebundenen MP werden als *captured Microparticles* (capMP) bezeichnet. Im Detail handelt es sich dabei um MP, deren Entstehung durch die Aktivierung der Scramblase bedingt ist und auf deren Oberfläche negativ geladene PS präsentiert werden (54).

Wir verglichen die Isolationsmethoden, Zentrifugation mit und ohne anschließenden MP-Activity Assay (Aniara, West Chester OH, USA), mit nativen, unzentrifugierten Ergüssen auf ihre Sensitivität und Spezifität der enthaltenen MP. Sensitivität meint, dass die als MP erkannten Events auch tatsächlich MP sind. Spezifität bedeutet, dass die nicht als MP registrierten auch wirklich keine MP sind. Wir definierten als richtig positiv jene Partikel, die sich innerhalb des definierten Größenbereichs befanden und TF exprimierten. Als falsch positiv galten Partikel, die zwar TF exprimierten, jedoch außerhalb des *Gates* lagen. Richtig negativ meint Partikel, die sowohl außerhalb des *Gates* lagen als auch kein TF auf der Oberfläche trugen. Und als falsch negativ bezeichneten wir TF-negative Partikel im umschriebenen *Gate* (Abbildung 14). Wir beobachteten eine Zunahme der Sensitivität von 77,30 % auf 80,95 % und der Spezifität von 0,03 % auf 15,8 % durch den zusätzlich durchgeführten *MP-Activity Assay* nach der Zentrifugation der Ergüsse. Die Anzahl der TF-positiven Events im *Gate*, verglichen mit der alleinigen Zentrifugation, stiegen somit an, und die TF-negativen MP im *Gate*, verglichen mit dem unzentrifugierten Erguss, nahmen deutlich ab. Insgesamt waren 81 % der MP TF-positiv und 19 % TF-negativ in dem untersuchten malignen Erguss.

3.5 Quantitativer Nachweis von MP mittels Durchflusszytometrie

Für den quantitativen Nachweis von MP verwendeten wir den Goldstandard, ein Durchflusszytometer, welches eine sehr große Auflösung für kleinste Partikel hat (0,1–1 µM). Wie bereits im Kapitel 2.2.4.1. erwähnt, wurde das richtige Fenster, in dem die MP gezählt wurden, mithilfe kleiner Kunststoffkügelchen (MegaMix, Biocytex, Marseille, Frankreich) definiert.

Folgende Parameter wurden für die Ermittlung verwendet:

1. Ein definierter Größenbereich wurde mit dem MegaMix kalibriert, um die Größe der MP abzudecken.
2. Nach der Markierung mit TF-fluoreszierenden Antikörpern konnte die Expression von TF bestimmt werden.

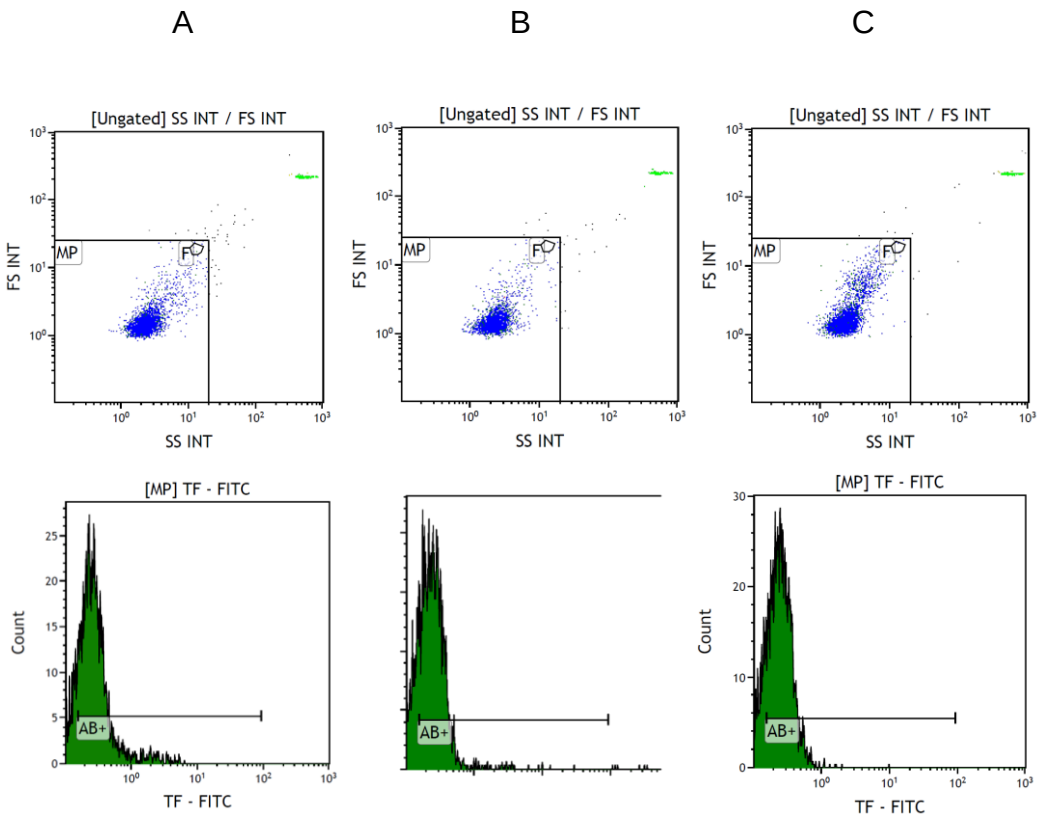

Abbildung 14: Nachweis von Mikropartikeln (MP) (A) im nativen Erguss, (B) im zentrifugierten Erguss und (C) nach der Bindung.

1. Reihe: Bestimmung nach Größe und Dichte (FSC/SSC): Die obere Reihe zeigt die im NAVIOS entstandenen DotPlots; (FS) gegen (SS) logarithmisch aufgetragen. Alle Events, die in diesem *Gate* angezeigt werden, weisen die Granularität und die Größe der mittels MegaMix definierten MP auf. Bei den blauen Punkten handelt es sich jeweils um ein Event. Mit bloßem Auge lässt sich aufgrund der Vielzahl an Events keine genaue Aussage zum Ergebnis treffen .
2. Reihe: TF-positive Fraktion im definierten Größenbereich: Die untere Reihe zeigt die Histogramme der TF-positiven Fraktion im zuvor markierten Gate. Optische Unterschiede sind nicht erkennbar.

Die Gesamtmenge an TF-positiven MP sank durch die Zentrifugation um 47 %. Die weitere Aufreinigung mit *Magnetic Microbeads* brachte keine weitere Änderung. Ein Vergleich der aufeinanderfolgenden Aufreinigungsschritte zeigte einen Anstieg der Spezifität von 0,03 % im nativen Erguss auf 5,31 % nach der Zentrifugation und weiter auf 15,80 % nach der von uns entwickelten Aufreinigungsmethode. Die Kombination aus zwei Zentrifugationsschritten und der Verwendung der *Magnetic Microbeads* zeigte sich der alleinigen Isolation von MP mittels Zentrifugation überlegen (Tabelle 14).

	Nicht im Gate	Im Gate	Gesamt
Native, unzentrifugierte Ergüsse			
TF-positiv	359,8 ± 207,7	6150,0 ± 1884,6	6509,8
TF-negativ	12,0 ± 7,3	1486,0 ± 441,3	1498,0
Gesamt	371,8	7636,0	8007,8
Sensitivität: 80,54 %, Spezifität: 0,03 %			
Zentrifugierte Ergüsse			
TF-positiv	58,0 ± 31,3	3007,5 ± 1081,0	3065,5
TF-negativ	3,3 ± 1,5	883,0 ± 471,2	886,3
Gesamt	61,3	3890,7	3952,0
Sensitivität: 77,30 %, Spezifität: 5,31 %			
Mit *Magnetic Microbeads* isolierte MP			
TF-positiv	61,3 ± 28,9	3777,5 ± 1535,8	3838,9
TF-negativ	11,5 ± 8,7	889,2 ± 426,4	900,7
Gesamt	72,8	4666,8	4739,5
Sensitivität: 80,95 %, Spezifität: 15,80 %			

Tabelle 14: Effizienzvergleich verschiedener Aufreinigungsschritte von Mikropartikeln

3.5.1 Effekt der Anreicherung extrazellulärer Vesikel auf deren Zusammensetzung

Im Jahre 2014 publizierten wir eine innovative Methode, um mithilfe von Anx-V-beschichteten *Magnetic Microbeads* aktive zelluläre MP aus Körperflüssigkeiten anzureichern ohne die Verwendung einer Ultrazentrifuge (55). Zum damaligen Zeitpunkt konnte eine Analyse der erhaltenen MP-Präparation nur mit einem Navios Flow Cytometer durchgeführt werden, was aufgrund der geringeren Auflösung zwar eine Quantifizierung, jedoch keine weitere Differenzierung der Partikel erlaubte. Aktuell führen wir die Methode mit einem CytoFLEX Flow-Cytometer (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) durch, das uns mit einer speziellen Schaltung und Optik zur hochauflösenden Darstellung von Nanopartikeln eine weitere Differenzierung der MP in den gewonnenen Proben erlaubt (56).

Um die MP von Zelltrümmern und dem größten Teil der apoptotischen Körper zu trennen und somit lsEV zu erhalten, wurden die Proben nach dem in Tabelle 10 beschriebenen Zentrifugationsverfahren vorbereitet. Im Flow-Cytometer wurden aus den Präparationen mithilfe von mit Anx-V-beschichteten *Magnetic Microbeads* die Vesikel selektiert, die negativ geladenes PS auf ihrer äußeren Membran präsentierten (55). Die Partikelgröße von MP wurde auf 0,3 bis 0,9 µm im Durchflusszytometer definiert.

Die Eichung des Flow-Zytometers erfolgte mit Megamix-Polystyren-Partikeln, die es erlauben, ein *Megamix Gate* (grünes Kästchen) zu definieren, das die erwartete Größe von MP (0,3–0,9 µm) definiert. Abbildung 15 zeigt die Eichung und das so eingerichtete Gate (57).

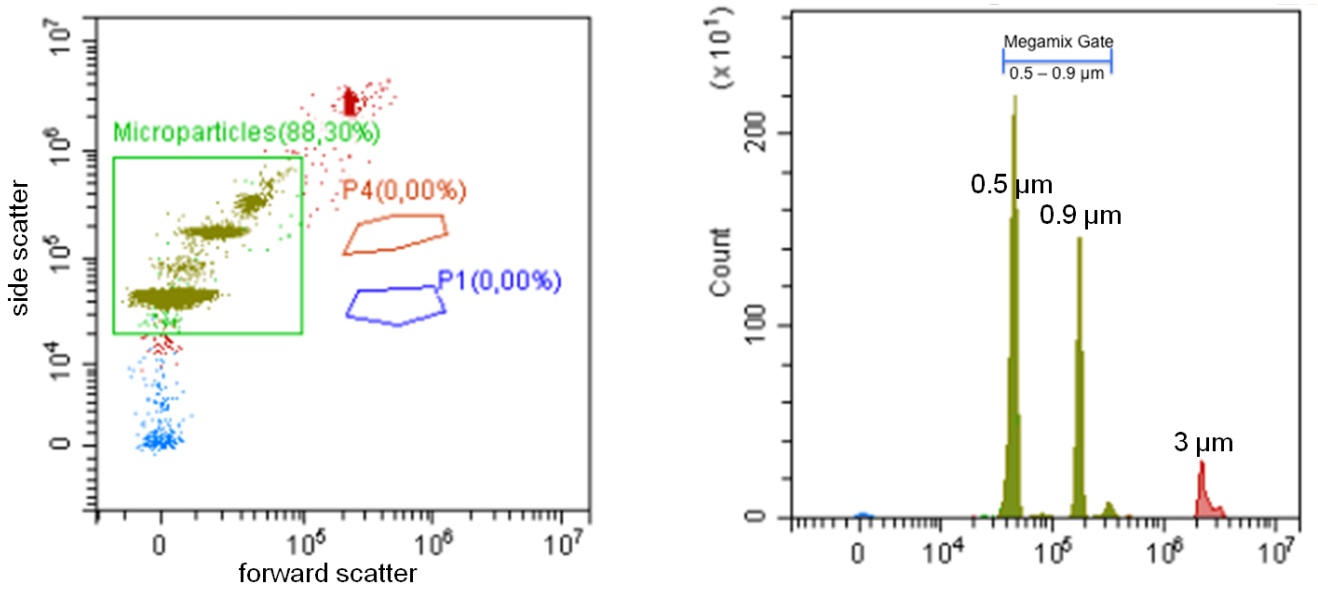

Abbildung 15: Eichung des Durchflusszytometers (Cytoflex, Beckman Coulter) und Schaffen eines *Mikropartikel-Gates* mit Megamix-Polystyren-Partikeln: Auf der linken Bildhälfte sieht man den *forward scatter* gegen den *side scatter* aufgetragen. Mithilfe der Megamix-Polystyren-Partikel wurde ein Größenbereich von 0,5-0,9 µm als Bereich der Mikropartikel definiert (grünes Kästchen). Durch die Untergrenze von 0,5µm werden Zelltrümmer und kleinere Vesikel von der Berechnung ausgeschlossen.

Wie bereits gezeigt, entfernten wir mittels der durchgeführten Zentrifugationsschritte bereits die Mehrzahl der apoptotischen Körper aus den malignen Ergüssen. Der verbliebene Rest konnte noch weiter durch die Präparationen mithilfe von mit Anx-V-beschichteten *Magnetic Microbeads* minimiert werden, was deutlich in Abbildung 16 erkennbar ist. Während lsEV im Wesentlichen Exosomen und MP enthalten, finden sich in der capMP-Präparation eine hohe Anreicherung von MP und kaum noch Exosomen.

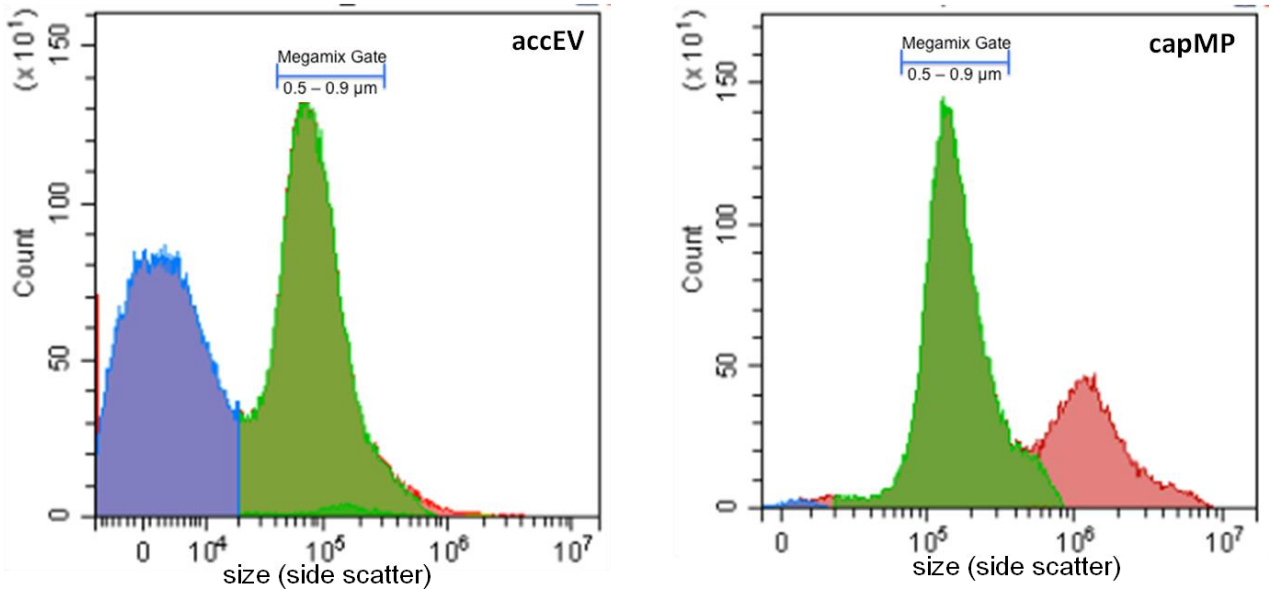

Abbildung 16: Verteilung der Mikropartikel nach der Zentrifugation und nach Anreicherung durch Annexin-V-gekoppelte *Magnetic Microbeads*: Die Farbkodierungen beschreiben die einzelnen Populationen der extrazellulären Vesikel - definiert nach der Größenkalibrierung des Durchflusszytometers mittels Megamix, wie in Abb. 15 gezeigt. Das mittels des Megamix definierte *Gate* 0,5-0,9 µm, in dem sich definitionsgemäß die Mikropartikel befinden, ist eingezeichnet. Die grün kodierten Partikel entsprechen dieser Größe. Daneben findet sich eine Population, die kleiner ist (blau) und eine größere (rot).

Es wurde beschrieben, dass mittels einer Zentrifugation von lsEV bei 10.000 x g ein ähnlicher Effekt erreicht wird; allerdings benötigt man hierzu eine Ultrazentrifuge (58).

3.6 Nachweis der funktionellen Aktivität der MP

Wir benutzten, wie bereits erwähnt, Anx-V-*Magnetic Microbeads* zum Binden der lsEV und erhielten für die drei verwendeten malignen Ergüsse eine äquivalente Menge an MP. Um zu beweisen, dass die Ergüsse immer noch funktionell aktiv waren, untersuchten wir die Aktivität zweier Gerinnungsfaktoren (TF und FX) mittels eines ELISA-Assays.

Es zeigte sich, dass die Gerinnungsfaktoren TF und FX nach Isolation/Zentrifugation immer noch aktiv waren und somit die capMP für weiterführende Analysen verwendbar sind (Tabelle 15).

MP-Herkunft	TF-Aktivität (pM)	FX-Aktivität (nM)
CRC	110,7 ± 8,1	16,8 ± 11,3
BC	98,4 ± 10,8	19,8 ± 11,0
SCLC	64,8 ± 23,0	16,0 ± 10,2
Mittelwert	**91,30 ± 14,0**	**17,5 ± 10,8**

Tabelle 15: Gerinnungsfaktoraktivitäten der gebundenen Mikropartikel: Ergüsse von drei verschiedenen Patienten: kolorektales Karzinom (CRC), Brustkrebs (BC), kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC)

4 DISKUSSION

MP können von vielen Zellen gebildet werden und regulieren Zellinteraktionen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Sie finden sich in einer Vielzahl von Körperflüssigkeiten, wie in den von uns verwendeten Pleuraergüssen und Aszites. Sie haben eine wichtige Funktion bei der Blutgerinnung und intensivieren die Zellaggregation. Die quantitative und im Besonderen die qualitative Untersuchung der MP ist daher von großem wissenschaftlichem Interesse, um einen Einblick in die zahlreichen Krankheitsbilder, welche mit MP assoziiert sind, zu gewinnen und neue Therapiestrategien zu entwickeln. Im Unterschied zu nicht-malignen Zellen, die MP nur bei Zytokin-Stimulation im entzündlichen Milieu freisetzen, bilden Tumorzellen ständig und unreguliert MP. In dieser Arbeit stellten wir eine innovative Methode zur Isolation von zellulären MP aus Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin, Aszites und Pleuraergüssen vor. Die capMP können sowohl zu Analysezwecken als auch zur Bestimmung der Antigenexpression, der Gerinnungsaktivität und der Signalwege verwendet werden. Wir zeigten, dass eine Aufreinigung mithilfe des *MACS AnxV microbead Kit* möglich ist und die capMP intakt bleiben, sodass sie im Anschluss zur weiteren Diagnostik verwendet werden können (9). Belegt haben wir dies exemplarisch mit ELISAs zur Bestimmung der Aktivität von FX und TF.

Voraussetzung der hier präsentierten Methode ist die Zusammensetzung der MP-Oberfläche mit der pathophysiologischen Präsentation von negativ geladenem PS. Während der Entstehung der MP wird die Struktur der Zellmembran dereguliert und es kommt zur Reorganisation des Zytoskeletts, wobei PS an die Zellaußenseite verlagert wird (3). Diese Reorganisation der Membran erfordert ein abgestimmtes Zusammenspiel verschiedener Enzyme, wie Flippase, Floppase und Scramblase (54). Diese Charakteristik der MP im Vergleich zu anderen Vesikelklassen machten wir uns zunutze. Die von uns entwickelte Isolationsmethode der MP beruht auf der hohen Bindungsaffinität des Anx V an negativ geladenes PS (59). Um eine möglichst hohe Spezifität in Bezug auf die MP-Isolation zu erhalten, müssen diese vor der Isolation von anderen extrazellulären Vesikeln – insbesondere von apoptotischen Körpern und Exosomen – getrennt werden. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass wir uns bei der Definition der verschiedenen Vesikelklassen auf die gemessenen Größen und die in der Literatur

verfügbaren Größenangaben berufen. Weitere Untersuchungen zur Definition wurden nicht durchgeführt. Für die Richtigkeit der Annahme spricht aber, dass die von uns definierten MP mehr PS und größtenteils TF präsentieren.

Bislang gibt es eine Vielzahl an Zentrifugationsprotokollen, von denen wir die zwei am häufigsten angewendeten Verfahren (nach Huica et al. und nach Stagnara et al.) in ihrer Effektivität miteinander verglichen (49). In dieser Arbeit zeigten wir, dass sich durch die Durchführung eines dritten Zentrifugationsschritts die Spezifität zur Gewinnung von lsEV nicht erhöhen ließ. Daher verwendeten wir nach einigen Vorexperimenten schließlich ein von der ISTH empfohlenes Zentrifugationsprotokoll mit zwei aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten (2 x 15 min bei 2500 x g) (47). Ein weiterer Aufreinigungsschritt der Ergüsse war zur Optimierung der MP-Isolation vonnöten.

Da die Größe der verschiedenen Vesikelklassen, wie Exosomen, apoptotischen Körpern und MP, nicht genau definiert ist und sich die angegebenen Größenbereiche zum Teil überlappen, ist eine ganz exakte Separation nicht zu erreichen (3). Die Separation durch Zentrifugation nach Kriterien der Größe und Dichte muss also für eine spezifischere Aufreinigung der MP mit einem anderen Verfahren kombiniert werden. Beide Verfahren – alleinige Zentrifugation und die Kombination aus Zentrifugation und Bindung mit den *Magnetic Microbeads* – verglichen wir mittels Durchflusszytometrie miteinander. Ein Vergleich der Verfahren zeigte einen Anstieg der Spezifität im nativen Erguss auf 5,31 % nach der Zentrifugation - und weiter auf 15,80 % nach der von uns entwickelten Aufreinigungsmethode. Folglich ist das von uns entwickelte Verfahren – die Kombination aus zwei Zentrifugationsschritten und der Verwendung des *Annexin V MicroBead Kit* – der alleinigen Isolation von MP mittels Zentrifugation überlegen. Diese Erkenntnisse haben wir 2013 in der Zeitschrift *Cell Biology International* publiziert (55). Eine aktuelle Untersuchung der *International Society for Extracellular Vesicles* zeigt, dass inzwischen mehr als 15% der internationalen Arbeitsgruppen unsere Methode mit *Magnetic Microbeads* verwenden (61).

Tait et al. zeigten, dass die Dichte der Bindungsstellen, das heißt die PS-Präsentation, stark von der Kalziumkonzentration abhängig ist (11). Eine Bestimmung der Kalziumkonzentration in malignen Ergüssen zeigte, dass Kalzium im Vergleich zur Konzentration im Serum gesunder Probanden deutlich niedriger ist. Aufgrund dieser Erkenntnisse bestimmten wir den Effekt von hinzugefügtem Kalzium auf die PS-Freilegung der

MP. Abbildung 13 zeigt, dass die PS-Präsentation ein Maximum erreicht, wenn je 4–6 mM $CaCl_2$ vor und während des Bindungsprozesses hinzugefügt werden. Zusätzlich zur PS-Präsentation ist auch die Bindung von PS an Anx V von Kalzium abhängig und somit von essenzieller Wichtigkeit für unseren Versuch (10). Folglich optimierten wir unser Verfahren entsprechend nach diesen Ergebnissen. Die niedrige Kalziumkonzentration in den malignen Ergüssen könnte erklären, warum dort keine Gerinnungsaktivität stattfindet - Fibrinkonglomerate sind selten zu beobachten (60).

Um einen direkten klinischen Bezug zu erhalten, verwendeten wir maligne Ergüsse von Patienten. Auch unsere Arbeitsgruppe zeigte bereits früher, dass Aszites und Pleuraergüsse von Tumorpatienten eine hohe Anzahl von MP enthalten, die zum größten Teil von Tumorzellen erzeugt wurden (60). Neue Studien haben gezeigt, dass die Gegenwart von TF-tragenden MP mit einem bis zu siebenfach erhöhten Risiko für thrombembolische Ereignisse bei Tumorerkrankungen in Verbindung steht (20). Erst kürzlich wurde darüber diskutiert, dass MP, die sich von Tumorzellen ableiten, im Gegensatz zu MP anderer Zellen charakteristischerweise TF und andere funktionell relevante Marker exprimieren (20). Interessanterweise sind 19 % der von uns im Durchflusszytometer untersuchten MP im definierten *Gate* TF-negativ. Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die an die *Magnetic Microbeads* gebundenen capMP immer noch eine funktionelle Aktivität besitzen und für weitere Analysen verwendet werden können. Von besonderem Interesse für uns ist der aktive TF, da dieser FVIIa bindet, um den TF/FVIIa-Komplex zu bilden, welcher wiederum FIX, FX und FXII aktiviert (62). Dieser Mechanismus könnte eine Ursache für die erhöhte Thromboserate bei Tumorpatienten sein und wurde in diesem Sinne mehrfach in der Literatur diskutiert (63). Zusätzlich vermögen sowohl der TF selbst als auch die beschriebenen TF-Komplexe Zellsignalkaskaden in Gang zu setzen, die das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese fördern. In diesem Zusammenhang wurde die proteolytische Spaltung von *protein-activated-receptors* (PAR) (Typ 1 und 2) beschrieben (64). Die freigesetzten MP haben somit einen Einfluss auf vielfältige Bereiche, wie auf die Metastasierung, Tumorumgebung und auf die Angiogenese. Bei dieser Betrachtung wird klar, dass eine pathophysiologische Bedeutung der MP nicht nur in ihrer Quantität, sondern insbesondere auch in ihrer funktionellen Zusammensetzung und der Präsentation funktioneller Oberflächenstruktur zu suchen ist. Aus diesem Grund haben wir bei den hier entwickelten Methoden großen Wert darauf gelegt, dass die capMP nach der spezifischen

Isolation weiterhin funktionell intakt sind. Im Gegensatz zu den von Tumorzellen abgeleiteten MP wurde bei granulozytären MP beschrieben, dass sie mit funktionell aktiven Zytokinen beladen sind, die in den Entzündungsprozess eingreifen (65). Eine Veröffentlichung von Dolo et al. verdeutlicht am Beispiel der Funktion von MP, die durch Neurone und Astrozyten gebildet werden und Wachstumsfaktoren enthalten, dass MP grundlegend unterschiedliche Effekte und Wirkungsweisen durch ihre Entstehung aufweisen (66). Somit kann der Einfluss der MP auf Umgebungsgewebe und Zielorgane als funktionell spezifisch angenommen werden.

Zentrale Vorteile unserer MP-Isolationsmethode gegenüber anderen Protokollen sind die Einfachheit und die Schnelligkeit des Verfahrens. So können im Vergleich mit den etablierten Protokollen nach Huica et al. und Stagnara et al. durch die spezifische Bindung von Anx V und PS die Zentrifugationsvorgänge abgekürzt werden und es wird weiterhin keine Ultrazentrifuge benötigt (50). Bei der hier beschriebenen Methode werden die MP nicht an Anx V in einer festen Phase, sondern an Anx-V-beschichtete *Magnetic Microbeads* gebunden. Durch diese Isolationsmethode findet im Gegensatz zu anderen Verfahren eine Standardisierung der isolierten MP-Menge statt, da in jedem Ansatz dieselbe Menge an *Magnetic Microbeads* verwendet wird. Dies ermöglicht eine vergleichende Analyse der verschiedenen Ansätze. Durch die unterschiedliche pathophysiologische Herkunft der Ergüsse variieren die MP-Mengen der Ergüsse untereinander. Daher ist es für den effektiven Vergleich der MP-Qualität und -Aktivität wichtig, dass sich in den zu untersuchenden Materialen dieselbe Menge von MP befindet.

Die Größenkalibrierung durch Polstyren-Partikel wie den *Megamix* ist inzwischen kritisch hinterfragt worden. Die Diskussion ist noch nicht beendet, aber eventuell müssen die Größenangaben retrospektiv angepasst werden (67) (68)

Die Arbeitsgruppe um Thaler veröffentlichte 2012 eine Arbeit, bei der vor allem von methodischen Problemen der MP-Forschung die Rede ist (69). Diese Arbeitsgruppe stellt in dieser vergleichenden Arbeit die These auf, dass eine vollständige Klärung des Einflusses der MP auf thrombembolische Ereignisse durch die Unterschiedlichkeit der Isolationsprotokolle nicht möglich sei (69). Hier könnte unser Protokoll einen entscheidenden Vorteil hinsichtlich qualitativ orientierter Experimente bieten. Aktuelle Arbeiten der Arbeitsgruppe um Pabinger und Thaler zeigten, dass eine quantitative Erfassung der MP-Spiegel zwar bei einigen Tumorerkrankungen diagnostisch wertvoll war (zum

Beispiel beim Pankreaskarzinom), insgesamt aber keine wesentlichen Erkenntnisse bezüglich eines klinischen Verlaufs der Erkrankungen erbracht hat (69). Es ist anzunehmen, dass zelluläre MP bezüglich ihres molekularen Aufbaus und der Präsentation funktionell aktiver Oberflächenstrukturen heterogen sind. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse der funktionellen Assays, die in Tabelle 15 dargestellt sind. Die aus den Aszitesproben unterschiedlicher Patienten isolierten MP unterscheiden sich so erheblich in ihrer TF- oder FXa-Expression.

Hieraus kann man schließen, dass die rein quantitative Bestimmung der MP-Menge keine ausreichenden Informationen zur funktionellen Auswirkung und damit für ihre Verwendung als Surrogatparameter liefert. Die prothrombotische Bedeutung der MP ergibt sich aus mehreren Oberflächenstrukturen. Dazu gehören die Präsentation von P-Selektinen, von PS und von TF sowie der darauffolgenden Assoziation von Kalzium und FVII. Der daraus entstehende TF-Komplex wird damit zur potenten Tenase mit der Fähigkeit FX zu aktivieren, was eine zentrale Rolle in der extrinsischen Gerinnungskaskade einnimmt (7). Die massenhafte Freisetzung von PS- und TF-präsentierenden MP in die Blutbahn führt also zu einer systemischen Gerinnungsaktivierung und damit zu einer klinisch relevanten Thrombophilie (70). Ein Zusammenhang zwischen erhöhten TF-Spiegeln und der TVT bei Krebspatienten wurde bereits nachgewiesen (71). Zusätzlich zu diesen Gerinnungsprozessen zeigten Jiang et al., dass TF an Prozessen der Embryogenese, Entzündung, Sepsis, Zellmigration, Angiogenese, Tumorwachstum und -metastasierung sowie an Zellsignalwegen beteiligt ist (72). Auch die Überlebenszeit von Malignompatienten bei hohen TF-Spiegeln ist deutlich herabgesetzt und geht mit einer erhöhten Tumoraggressivität einher. Tumoren werden als „Wunden, die nicht heilen“ bezeichnet, da durch die massenhafte Freisetzung von TF-tragenden MP der extrinsische Gerinnungsweg ständig aktiviert ist (71). In dem Zusammenhang konnten Rak et al. zeigen, dass eine verminderte TF-Exprimierung das Wachstum eines kolorektalen Karzinoms verlangsamte (18).

Neben ihrer primären Rolle in der Gerinnung können TF-tragende MP PARs aktivieren (73). TF kann im Komplex mit FVII die Aktivierung von PAR-2 und FX in Kombination mit TF und FVII die Aktivierung von PAR-1 und PAR-2 induzieren (74). Die klinische Relevanz der PARs ergibt sich aus der aktuellen Studienlage: So konnten in einer

Vielzahl von Malignomentitäten (Adenokarzinome, Glioblastome, Meningeome, Osteosarkome, Leukämien) besonders häufig PAR-1 (77,3 %) und PAR-2 (79,5 %) nachgewiesen werden (75). Sogar der Grad der Malignität korreliert mit dem Maß derjenigen von PAR-Expression auf Tumorzellen (75).

Die Expression von PARs ist aber nicht nur auf pathologische Zellen beschränkt, sondern findet sich zudem in einer Reihe gesunder, physiologisch arbeitender Zellen, wie zum Beispiel in renalen, gastrointestinalen, vaskulären und respiratorischen Zellen sowie in Muskel- und Nervenzellen (75). Es wurde nachgewiesen, dass die PAR-Aktivierung bei Gesunden Einfluss auf das renale, respiratorische, gastrointestinale, neuronale und muskuloskelettale Gewebe hat (75). PARs sind weiterhin an Entzündungsprozessen und der Nozizeption beteiligt (20). Die Diskussion hält an, ob die Bestandteile dieses PAR-aktivierenden Komplexes ausschlaggebend für spezifische Signalfunktionen sind (76, 77).

Die von uns neu entwickelte Methode ermöglichte auch unserer Arbeitsgruppe eine qualitative Untersuchung der MP. So konnten wir zeigen, dass die isolierten MP die Migration von Pankreaskarzinomzellen im Migrationsassay induzieren. Hinter diesem Effekt wird eine Induktion des PAR-2 durch MP vermutet, welche TF an ihrer Oberfläche tragen (TFMP) (78). Dieser Effekt konnte mit Tinzaparin, einem niedermolekularen Heparin (NMH), inhibiert werden (78), das für die höchste Freisetzung von TFPI unter den NMH sorgt und somit die TFMP hemmt (79). Die Relevanz kann für zukünftige Therapiekonzepte diskutiert werden.

Die Forschungsergebnisse, die aus dieser Arbeit hervorgegangen sind, wurden bereits vielfach von fachkundigen Kollegen als Referenz verwendet. Krejcova et al. zitieren unsere Arbeit als ein gut gelungenes Beispiel, wie man mithilfe von *Magnetic Microbeads* Zellen und zelluläre Partikel isolieren kann (80). Julich et al. postulierten, dass ein dringender wissenschaftlicher Bedarf an einer Standardisierung und Vereinfachung der Methode zur Isolation extrazellulärer Vesikel einschließlich zellulärer MP besteht. Unsere Arbeit wurde als ein wichtiger Schritt in diese Richtung gewertet (81). Shih et al. zeigten aktuell in ihrer Arbeit auf, dass unsere Methode geeignet ist, auch DNA- und RNA-haltige MP aus dem Blut zu isolieren. Sie begründen die von ihnen entwickelten Methoden unter anderem mit den Ergebnissen aus unserer Publikation (4). Berezin et al. beschreiben, dass endotheliale MP eine hohe Anx-V-Bindungskapazität

aufweisen und empfehlen deshalb unsere Methode als eine Möglichkeit, die MP mit hoher Spezifität zu isolieren (82). Mit der hier präsentierten Methode können nun weitere Studien zur klinischen Bedeutung zirkulierender MP durchgeführt werden, die zum einen individuelle Marker zur Verlaufs- und Therapiekontrolle bei Entzündungen und Autoimmunerkrankungen oder Malignomen definieren und zum anderen die Forschungen an den MP als mögliches Therapieziel vorantreiben.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend finden wir durch die hier dargestellte Methode folgende Vorteile:

1. Die Methode ist einfach und in jedem Forschungslabor anwendbar – eine Ultrazentrifuge ist nicht erforderlich.
2. Mikropartikel (MP) sind aus allen Körperflüssigkeiten, wie Blut, Urin, Aszites und Pleuraergüssen, isolierbar.
3. Die Menge der MP wird durch die Anzahl der eingesetzten *Magnetic Microbeads* kalibriert - funktionale Ergebnisse können nun miteinander verglichen werden.
4. Die MP werden durch die hier getestete Isolationsmethode nicht zerstört und sind daher funktionell weiterhin aktiv - durch die Kalibrierung wird eine Vergleichbarkeit ermöglicht.
5. Die MP werden frei von der sie umgebenden Flüssigkeit in einer definierten Pufferlösung aufgenommen.

Insbesondere der letzte Punkt ist für eine spezifische Analyse der MP-Wirkung unerlässlich, denn bei allen reinen Zentrifugationsprotokollen sind weiterhin Zytokine und Wachstumsfaktoren der untersuchten Flüssigkeiten enthalten.

MP können eine Vielzahl von Effekten unter physiologischen und pathologischen Bedingungen auslösen und regulieren. Aufgrund ihrer geringen Größe von 0,1–1 µm entgehen sie der konventionellen Histologie und auch anderen Detektionsverfahren, wie der Konfokalmikroskopie und den meisten Durchflusszytometern. MP finden sich in allen Körperflüssigkeiten und haben wichtige Funktionen in der Blutgerinnung. Sie intensivieren die Zellaggregation und sind an Entzündungsprozessen sowie der Regulation der Sauerstoffradikalproduktion, Angiogenese und Apoptose beteiligt. Nach neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen agieren MP auch als Transporter für mikroRNA, welche bei der Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen eine Rolle spielen können. Durch die Freisetzung der MP wird auch Tissue Faktor auf ihrer Oberfläche freigesetzt. Dieser wirkt in Kombination mit Faktor VII nicht nur prokoagulativ, sondern kann auch *Protease Activated Receptors* (PARs) aktivieren und damit zelluläre Signalketten auslösen.

PARs sind Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen, welche durch Proteinasen wie Thrombin, Metalloproteinasen, Kallikreine, Plasmin, Faktor X, aktivierten Protein C, neutrophile Elastase oder Trypsin aktiviert werden können. Diese Rezeptoren – und hier PAR-2 im Besonderen – fördern durch die Initiation einer G-Protein gekoppelten Signalkette die Tumorzellproliferation und -migration. Auch die Aktivierung von Matrix-Metallo-Proteinasen durch MP kann von pathophysiologischer Bedeutung sein, was bereits bei der Entwicklung der Peritonealkarzinose beim Ovarialkarzinom beschrieben ist.

Da bisher nur wenig darüber bekannt ist, welche regulatorische Rolle die einzelnen Bestandteile der MP spielen, sind sowohl der quantitative Nachweis als auch die Untersuchung der Zusammensetzung der MP von wissenschaftlichem Interesse. In dieser Studie präsentieren wir eine Methode, mit der zelluläre MP aus Körperflüssigkeiten wie Blut und malignen Ergüssen mit hoher Spezifität und Sensitivität isoliert werden können, durch die Verwendung von Annexin-V-gekoppelten *Magnetic Microbeads*. Die Auftrennung erfolgt anschließend mittels eines Magnetfeldes. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die MP auf diese Weise mit einer Spezifität von über 81 % isoliert werden können und nach wie vor funktionell aktiv sind. Die so gebundenen MP können dann quantitativ und bezüglich ihrer Zusammensetzung mit der Cytoflow-Technologie nachgewiesen und qualitativ mithilfe von ELISA-Analysen charakterisiert werden.

Durch unsere Methode können die MP für weitere Analysen verwendet werden. Zukünftig erwarten wir, dass die MP uns detaillierte weitere Einblicke in zahlreiche Krankheitssituationen bieten und darauf aufbauend die Entwicklung spezifischer Therapiestrategien in der Onkologie liefern.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Zahra S, Anderson JA, Stirling D, Ludlam CA. Microparticles, malignancy and thrombosis. Br J Haematol. 2011 ;152(6):688-700.

2. Gyorgy B, Szabo TG, Pasztoi M, Pal Z, Misjak P, Aradi B, Laszlo V, Pallinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzas EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. Cell Mol Life Sci. 2011 ;68(16):2667-88.

3. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. Clin Sci (Lond). 2013 ;124(7):423-41.

4. Hargett LA, Bauer NN. On the origin of microparticles: From "platelet dust" to mediators of intercellular communication. Pulm Circ. 2013 ;3(2):329-40.

5. Dvorak HF, Quay SC, Orenstein NS, Dvorak AM, Hahn P, Bitzer AM, Carvalho AC. Tumor shedding and coagulation. Science. 1981 22;212(4497):923-4.

6. Dvorak HF, Van DeWater L, Bitzer AM, Dvorak AM, Anderson D, Harvey VS, Bach R, Davis GL, DeWolf W, Carvalho AC. Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by cultured tumor cells. Cancer Res.1983 ;43(9):4434-42.

7. Preissner KT. Physiologie der Blutgerinnung und Fibrinolyse: Schattauer Gmbh; 2008.

8. Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. Semin Immunopathol. 2011 ;33(5):469-86.

9. Miltenyi-Biotec. Annexin V MicroBead Kit. Bergisch-Gladbach [Tag des Zugriffs: 2013 05/03]; Available from: http://www.miltenyibiotec.com.

10. Pelusa HcF, Valdés MadlÀ, Daniele SM, Almará AM, Svetaz MaJ, Bearzotti M, Paparella CV, Bouvet BR, Ghersevich SA, Arriaga SM. Quantification of autoantibodies to annexin V in plasma by an "in house" sandwich ELISA. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2012;23:453-60.

11. Tait JF, Gibson D. Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidylserine content. Arch Biochem Biophys. 1992 ;298(1):187-91.

12. Applebaum MA, Sambrano E, Lee S, Goldsby R, Matthay KK, DuBois SG. Evaluation of plasma annexin V levels in children and young adults with solid tumors. Int J Biol Markers. 2012 -;27(2):e164-6.

13. Distler JH, Huber LC, Hueber AJ, Reich CF, 3rd, Gay S, Distler O, Pisetsky DS. The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. Apoptosis. 2005 ;10(4):731-41.

14. Demchenko AP. The change of cellular membranes on apoptosis: fluorescence detection. Exp Oncol. 2012 ;34(3):263-8.

15. Burnier L, Fontana P, Kwak BR, Angelillo-Scherrer A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. Thromb Haemost. 2009 ;101(3):439-51.

16. Thiagarajan P, Tait JF. Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. J Biol Chem. 1990 15;265(29):17420-3.

17. Rand JH, Wu XX, Lapinski R, van Heerde WL, Reutelingsperger CP, Chen PP, Ortel TL. Detection of antibody-mediated reduction of annexin A5 anticoagulant activity in plasmas of patients with the antiphospholipid syndrome. Blood. 2004 1;104(9):2783-90.

18. Rak J, Milsom C, L, Klement P, Yu J. Tissue factor in cancer and angiogenesis: the molecular link between genetic tumor progression, tumor neovascularization, and cancer coagulopathy. Semin Thromb Hemost. 2006 ;32(1):54-70.

19. Bombeli T, Spahn DR. Updates in perioperative coagulation: physiology and management of thromboembolism and haemorrhage. Br J Anaesth. 2004 ;93(2):275-87.

20. Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, Furie B. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. Clin Cancer Res. 2009 15;15(22):6830-40.

21. Schaffner F, Ruf W. Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 ;29(12):1999-2004.

22. Graves LE, Ariztia EV, Navari JR, Matzel HJ, Stack MS, Fishman DA. Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. Cancer Res. 2004 1;64(19):7045-9.

23. Nomura S. Function and clinical significance of platelet-derived microparticles. Int J Hematol. 2001 ;74(4):397-404.

24. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. Hypertension. 2003 ;41(2):211-7.

25. Inami N, Nomura S, Kikuchi H, Kajiura T, Yamada K, Nakamori H, Takahashi N, Tsuda N, Hikosaka M, Masaki M, Iwasaka T. P-selectin and platelet-derived microparticles associated with monocyte activation markers in patients with pulmonary embolism. Clin Appl Thromb Hemos 2003 ;9(4):309-16.

26. Serebruany VL, Malinin AI, Jerome SD, Lowry DR, Morgan AW, Sane DC, Tanguay JF, Steinhubl SR, O'Connor C M. Effects of clopidogrel and aspirin combination versus aspirin alone on platelet aggregation and major receptor expression in patients with heart failure: the Plavix Use for Treatment Of Congestive Heart Failure (PLUTO-CHF) trial. Am Heart J. 2003 ;146(4):713-20.

27. VanWijk MJ, Nieuwland R, Boer K, van der Post JA, VanBavel E, Sturk A. Microparticle subpopulations are increased in preeclampsia: possible involvement in vascular dysfunction? Am J Obstet Gynecol. 2002 ;187(2):450-6.

28. Chamouard P, Desprez D, Hugel B, Kunzelmann C, Gidon-Jeangirard C, Lessard M, Baumann R, Freyssinet JM, Grunebaum L. Circulating cell-derived microparticles in Crohn's disease. Dig Dis Sci. 2005 ;50(3):574-80.

29. Ogura H, Kawasaki T, Tanaka H, Koh T, Tanaka R, Ozeki Y, Hosotsubo H, Kuwagata Y, Shimazu T, Sugimoto H. Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis. J Trauma. 2001 ;50(5):801-9.

30. Aupeix K, Hugel B, Martin T, Bischoff P, Lill H, Pasquali JL, Freyssinet JM. The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection. J Clin Invest. 1997 1;99(7):1546-54.

31. Walenga JM, Jeske WP, Messmore HL. Mechanisms of venous and arterial thrombosis in heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Thrombolysis. 2000 ;10 Suppl 1:13-20.

32. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. Circulation.2000 29;101(8):841-3.

33. Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. Blood. [2000 1;95(3):930-5.

34. Hugel B, Socie G, Vu T, Toti F, Gluckman E, Freyssinet JM, Scrobohaci ML. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. Blood.. 1999 15;93(10):3451-6.

35. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Dignat-George F. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. J Clin Invest. 1999 ;104(1):93-102.

36. Lee YJ, Jy W, Horstman LL, Janania J, Reyes Y, Kelley RE, Ahn YS. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. Thromb Res. 1993 15;72(4):295-304.

37. Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. Diabetes. 2002 Sep;51(9):2840-5.

38. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? J Thromb Haemost. 2007 ;5(3):520-7.

39. Toth B, Nikolajek K, Rank A, Nieuwland R, Lohse P, Pihusch V, Friese K, Thaler CJ. Gender-specific and menstrual cycle dependent differences in circulating microparticles. Platelets. 2007 ;18(7):515-21.

40. Del Conde I, Bharwani LD, Dietzen DJ, Pendurthi U, Thiagarajan P, Lopez JA. Microvesicle-associated tissue factor and Trousseau's syndrome. J Thromb Haemost.2007 ;5(1):70-4.

41. Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberger P, Eichinger S, Kyrle PA, Weltermann A. Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. Thromb Haemost. 2007 ;97(1):119-23.

42. Tilley RE, Holscher T, Belani R, Nieva J, Mackman N. Tissue factor activity is increased in a combined platelet and microparticle sample from cancer patients. Thromb Res. 2008;122(5):604-9.

43. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. J Cell Sci. [. 2010 15;123(Pt 10):1603-11.

44. van Doormaal FF, Kleinjan A, Di Nisio M, Buller HR, Nieuwland R. Cell-derived microvesicles and cancer. Neth J Med. [Review]. 2009 ;67(7):266-73.

45. Goon PK, Lip GY, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD. Circulating endothelial cells, endothelial progenitor cells, and endothelial microparticles in cancer. Neoplasia. 2006 ;8(2):79-88.

46. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Dignat-George F. Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2010 ;36(8):807-18.

47. Lacroix R. The importance of pre-analytics in microparticle (MP) analysis. International Society on Thrombosis and Hemostasis, 56th Annual Scientific and Standartization Committee Meeting; Cairo, Egypt2010.

48. Biocytex. Package Insert Megamix. Marseille, France2011 [Tag des Zugriffs 2013 03/06]; Available from: www.biocytex.com/products-services/catalogue/detail/product/megamix/?no_cache.

49. Huica R. Flow cytometric assessment of circulating microparticles - towards a more objective analysis. Romanian Biotechnological Letters. 2011;16, No. 3.

50. Stagnara J, Garnache Ottou F, Angelot F, Mourey G, Seilles E, Biichle S, Saas P, Racadot E. Correlation between platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry and phospholipid-dependent procoagulant activity in microparticles: the centrifugation step matters! Thromb Haemost 2012 ;107(6):1185-7.

51. ELISA T. http://www.thefutureofthings.com/upload/image/articles/2006/biopen/biopen-elisa-schematic.jpg. 2006 [Tag des Zugriffs 2015 23.11.].

52. Rahman M. Introduction to Flow Cytometry. 2010 [Tag des Zugriffs 2015 11/23]; Available from: https://www.abdserotec.com/flow-cytometry-sognal-processing.html.

53. Lacroix R, Judicone C, Poncelet P, Robert S, Arnaud L, Sampol J, Dignat-George F. Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. J Thromb Haemost. 2012 ;10(3):437-46.

54. Nomura S, Shimizu M. Clinical significance of procoagulant microparticles. J Intensive Care. [Review]. 2015;3(1):2.

55. Gieseler F, Gamperl H, Theophil F, Stenzel I, Quecke T, Ungefroren H, Lehnert H. Using annexin V-coated magnetic beads to capture active tissue factor-bearing microparticles from body fluids. Cell Biol Int. 2014 ;38(2):277-81.

56. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. Blood. 1999 1;94(11):3791-9.

57. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Kasthuri RS, Key NS, Dignat-George F. Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. J Thromb Haemost. 2010 ;8(11):2571-4

58. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, D'Souza-Schorey C. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. Curr Biol. 2009 1;19(22):1875-85.

59. Moss SE, Edwards HC, Crumpton MJ. Diversity in the Annexin Family. In: Heizmann CW, editor. Novel Calcium-Binding Proteins: Fundamentals and Clinical Implications. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1991. p. 535-66.

60. Gieseler F, Luhr I, Kunze T, Mundhenke C, Maass N, Erhart T, Denker M, Beckmann D, Tiemann M, Schulte C, Dohrmann P, Cavaille F, Godeau F, Gespach C. Activated coagulation factors in human malignant effusions and their contribution to cancer cell metastasis and therapy. Thromb Haemost. 2007 ;97(6):1023-30.

61. Gardiner C, Di Vizio D, Sahoo S, Thery C, Witwer KW, Wauben M, Hill AF. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. J Extracell Vesicles. 2016;5:32945.

62. Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation. N Engl J Med. 2008 28;359(9):938-49.

63. Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. J Exp Med. 2009 31;206(9):1913-27.

64. Kasthuri RS, Taubman MB, Mackman N. Role of tissue factor in cancer. J Clin Oncol.2009 10;27(29):4834-8.

65. Koppler B, Cohen C, Schlondorff D, Mack M. Differential mechanisms of microparticle transfer toB cells and monocytes: anti-inflammatory propertiesof microparticles. Eur J Immunol. 2006 ;36(3):648-60.

66. Dolo V, D'Ascenzo S, Violini S, Pompucci L, Festuccia C, Ginestra A, Vittorelli ML, Canevari S, Pavan A. Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro. Clin Exp Metastasis.. 1999 ;17(2):131-40.

67. Cointe S, Judicone C, Robert S, Mooberry MJ, Poncelet P, Wauben M, Nieuwland R, Key NS, Dignat-George F, Lacroix R. Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop. J Thromb Haemost. 2017 ;15(1):187-93.

68. Poncelet P, Robert S, Bouriche T, Bez J, Lacroix R, Dignat-George F. Standardized counting of circulating platelet microparticles using currently available flow cytometers and scatter-based triggering: Forward or side scatter? Cytometry A. 2016 ;89(2):148-58.

69. Thaler J, Ay C, Pabinger I. Clinical significance of circulating microparticles for venous thromboembolism in cancer patients. Hamostaseologie. 2012;32(2):127-31.

70. Zwicker JI, Trenor CC, 3rd, Furie BC, Furie B. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011 ;31(4):728-33.

71. McEachron T, Mackman N. Tumors, ticks and tissue factor. J Thromb Haemost. 2009 ;7(11):1852-4.

72. Jiang X, Bailly MA, Panetti TS, Cappello M, Konigsberg WH, Bromberg ME. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex promotes cellular signaling and migration of human breast cancer cells. J Thromb Haemost. 2004 ;2(1):93-101.

73. Med. Diss., Bohn B. Thrombinrezeptorexpression und -funktionaltät maligner Pankreaszellen. Rostock: Universität Rostock; 2011.

74. Schuepbach RA, Riewald M. Coagulation factor Xa cleaves protease-activated receptor-1 and mediates signaling dependent on binding to the endothelial protein C receptor. J Thromb Haemost. 2010 ;8(2):379-88.

75. Elste AP, Petersen I. Expression of proteinase-activated receptor 1-4 (PAR 1-4) in human cancer. J Mol Histol. 2010 ;41(2-3):89-99.

76. Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, Ruf W. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 19;103(38):13932-7.

77. Reinhardt C, von Bruhl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, Dlugai S, Hess S, Konrad I, Orschiedt L, Mackman N, Ruddock L, Massberg S, Engelmann B. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. J Clin Invest. 2008 ;118(3):1110-22.

78. Gieseler F, Gamperl H, Plattfaut C, Theophil F, Quecke T. Inhibition of microparticle induced tumor cell migration by LMWH tinzaparin. J Thromb Haemost. 2015;13(2):263.

79. Gieseler F, Stenzel I, Gamperl H, Theophil F, Ungefroren H. PAR-2 activating tissue factor complexes within malignant effusions are able to induce tumor cell migration. GTH-Jahrestagung; Wien2013.

80. Kreycova L, Hynek D, Guran R, Michalek P, Moulick A, Kopel P, Tmejova K, Viet Hoai N, Adam V, Hubalek J, Kynicky J, Kizek R. Beads Based Electrochemical Assay for Detection of Hemagglutinin Labeled by Two Different Types of Cadmium Quantum Dots. Int J Electrochem Sci. 2014;9:3349-63.

81. Julich H, Willms A, Lukacs-Kornek V, Kornek M. Extracellular vesicle profiling and their use as potential disease specific biomarker. Front Immunol.. 2014;5:413.

82. Berezin A, Zulli A, Kerrigan S, Petrovic D, Kruzliak P. Predictive role of circulating endothelial-derived microparticles in cardiovascular diseases. Clin Biochem. [Research Support, 2015 ;48(9):562-8.

7 ANHÄNGE

7.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Nr.	Titel	Seite
1	Schematische Darstellung der Reorganisation des Zytoskeletts und der Membran	4
2	Transmissions-Elektronenmikroskop-Aufnahme von einem Thrombozyten, der MP ausschüttet (30.000-fach vergrößert)	4
3	Herkunft der verschiedenen Vesikel-Klassen	7
4	Größenvergleich von verschiedenen Vesikelklassen mit Viren, Bakterien und Thrombozyten	8
5	Schema der Zellmembran und Externalisierung von Phosphatidylserin	9
6	Gegenwärtiges Modell der Gerinnnungskaskade und Fibrinolyse	11
7	Funktion der MP von Tumoren	17
8	Schematische Darstellung der Isolation von PS-präsentierenden MP mittels *Magnetic Microbeads*	26
9	Prinzip des Sandwich-ELISAs	27
10	Aufbau des optischen Systems eines typischen Durchflusszytometers	32
11	Proteinbestimmung mit ELISA der Proben nach den Zentrifugationsschritten nach dem Stagnarotokoll	36
12	Proteinbestimmung mit ELISA der Proben nach den Zentrifugationsschritten nach dem Huicaprotokoll	37
13	Der Effekt von Kalziumchlorid auf das präsentierte PS	39
14	Nachweis von MP	41

15	Eichung des Durchflusszytometers (Cytoflex, Beckman Coulter) mit Megamix-Polystyren-Partikeln	44
16	Verteilung der MP nach der Zentrifugation und nach Anreicherung durch Anx-V-gekoppelte Magnetic Beads	45

7.2 TABELLENVERZEICHNIS

Nr.	Titel	Seite
1	Vergleich verschiedener Vesikelklassen	6
2	Herkunft von MP bei verschiedenen Erkrankungen	14
3	erhöhte TF-Aktivität und MP-Spiegel im Blut von verschiedenen Tumorpatienten	15
4	Auflistung der Geräte	19
5	Auflistung der Chemikalien und Reagenzien	19
6	Auflistung der Puffer und Reagenzien	20
7	Auflistung der Kits	20
8	sonstige verwendete Materialien	21
9	Zentrifugationsprotokoll zur Isolation von MP nach Huica et al. und Stagnara et al.	24
10	Reduziertes Zentrifugationsprotokoll	25
11	Probenvorbereitung für die anschließende ELISA	29
12	Probenvorbereitung für die anschließende FACS-Analyse	34
13	Kalziumkonzentration und pH-Wert in malignen Ergüssen	38
14	Effizienzvergleich verschiedener Aufreinigungsschritte von MP	42
15	Gerinnungsfaktoraktivitäten der gebundenen Mikropartikel	46

7.3 ABKÜRZUNGEN

lsEV	Zentrifugierte extrazelluläre Vesikel low speed extracellular vesicles)
Anti-Pl-Ak	Anti-Phospholipid-Antikörper
Anx V	Annexin V
APS	Antiphospholipid-Syndrom
ARDS	Akutes Atemnotsyndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BC	Mammakarzinom
capMP	Gebundene MP (captured MP)
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CRC	Kolorektales Karzinom
EBV	Epstein-Barr-Virus
FIII	Faktor III
FSC	Forward scatter/Vorwärtsstreulicht
FVII	Faktor VII
FX	Faktor X
HDL	High density lipoprotein
HRP	Horseradish peroxidase
KHK	Koronare Herzkrankheit
MACS	Magnetic Cell Separation
MP	Mikropartikel
NMH	Niedermolekulares Heparin
PAR	Protease activated receptor
PS	Phosphatidylserin
SCLC	Kleinzelliges Bronchialkarzinom
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SSC	Side scatter/Seitwärtsstreulicht
TF	Tissue Factor/Gewebefaktor

TFMP	Tissue Factor tragende Mikropartikel
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TL	tethered ligand
TVT	tiefe Beinvenenthrombose

7.4 VOTUM DER ETHIKKOMMISSION

Voraussetzung für den experimentellen Umgang mit menschlichem Material ist das positive Votum der Ethikkommission. Hierzu wurden keine Bedenken bezüglich des Antrags 11-206 (29. April 2013) mit dem Titel „Molekulare Interaktionen zwischen dem aktivierten Gerinnungssystem von Tumorpatienten und der Progression und Metastasierung von Tumorpatienten“ geäußert.

8 DANKSAGUNGEN

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Gieseler für den anregenden und aufschlussreichen fachlichen Diskurs und die stets hervorragende Betreuung im Rahmen meiner Dissertation.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Bereichs Experimentelle Onkologie der Medizinischen Klinik I bedanken. Insbesondere ist hier Frau Vollmert zu nennen, deren Geduld meine Einarbeitung in das experimentelle Arbeiten wesentlich unterstützt hat.

Mein Dank richtet sich auch an meinen Mann Moritz und seine Eltern, die mich bei der Korrektur und den technischen Herausforderungen dieser Arbeit helfend begleitet haben.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Mutter, deren Liebe und Hingabe in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg als Ärztin gelegt haben.

9 LEBENSLAUF

Zur Person

Name	Inga Hesse, geb. Stenzel
Geburtsdatum	3. November 1987
Geburtsort	Frankfurt/Oder (Brandenburg)

Hochschulstudium

07/2007	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
10/2008	Immatrikulation zum Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
04/2011	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Physikum)
04/2014	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (schriftlicher Teil)
05/2015	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (mündlicher Teil)

Beruflicher Werdegang

01–04/2007	Pflegepraktikum, Helios Klinikum Bad Saarow
10/2008–08/2011	Extrawache, verschiedene Stationen, Universitätsklinik zu Lübeck
08–09/2011	Famulatur, Anästhesie, München
03–04/2012 und 08–09/2012	Famulatur, Gynäkologie und Geburtshilfe, Helios Klinikum Bad Saarow
07–08/2013 und 10/2013	Ambulante Famulatur, Gynäkologie, Fürstenwalde
09/2013	Ambulante Famulatur, Pädiatrie, Fürstenwalde

05–09/2014	1. Tertial des PJ, Anästhesie und Intensivmedizin, WKK Heide
09–12/2014	2. Tertial des PJ, Innere Medizin, Fachkrankenhaus Coswig
12/2014–04/2015	3. Tertial des PJ, Chirurgie, Uniklinikum Dresden und Herzzentrum Dresden
12/2015–07/2016	Assistenzärztin für Anästhesiologie, Städtisches Krankenhaus Dresden Friedrichstadt
seit 07/2016	Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtsghilfe, Städtisches Krankenhaus Dresden Friedrichstadt

Zeitraum der Dissertation

2012–2017	Zeitraum der Dissertation

Publikationen

10/2013	Gamperl H, Theophil F, **Stenzel I**, Quecke T, Ungefroren H, Gieseler F.: *Capture of tissue-factor-bearing microparticles with using annexin-V bound magnetic beads.*Onkologie. 2013; 36:266. (s. unten)
02/2014	Gieseler F, Gamperl H, Theophil F, **Stenzel I**, Quecke T, Ungefroren H, et al. *Using annexin V-coated magnetic beads to capture active tissue factor-bearing microparticles from body fluids*. Cell Biology International. 2014; 38(2):277-81. (s. unten)