

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

## Tissue Factor-vermittelte Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38

**Berthold Weigand**

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. I. Ott

2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 07.09.2004 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>2.</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>Tissue Factor</b> .....	<b>5</b>
2.1.1	Struktur.....	5
2.1.2	Expression.....	7
2.1.2.1	Regulation auf der Ebene der Transkription .....	7
2.1.2.2	Regulation der Aktivität .....	8
<b>2.2</b>	<b>Faktor VII</b> .....	<b>10</b>
2.2.1	Proteolytisch aktiver Faktor VIIa.....	10
2.2.2	Proteolytisch inaktiver Faktor VIIa .....	13
<b>2.3</b>	<b>Signaltransduktion</b> .....	<b>13</b>
2.3.1	Allgemein.....	13
2.3.1.1	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen .....	13
2.3.1.2	Andere Signalproteine.....	15
2.3.2	Tissue Factor und Signaltransduktion .....	16
2.3.2.1	Die Bedeutung der proteolytischen Aktivität von FVIIa .....	16
2.3.2.2	Die Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von Tissue Factor .....	20
2.3.2.3	Die Bedeutung der proteolytischen Aktivität von FVIIa und der zytoplasmatischen Domäne von Tissue Factor .....	21
2.3.2.4	Signaltransduktion durch Faktor Xa und Thrombin.....	22
<b>2.4</b>	<b>Migration</b> .....	<b>23</b>
2.4.1	Allgemein.....	23
2.4.2	Tissue Factor und Migration .....	24
<b>2.5</b>	<b>Proliferation</b> .....	<b>25</b>
2.5.1	Allgemein.....	25
2.5.2	Tissue Factor und Proliferation.....	26
<b>2.6</b>	<b>Tissue Factor-vermittelte Genexpression</b> .....	<b>27</b>

<b>3.</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Zellkultivierung .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2</b>	<b>In vitro Kinasen Assay .....</b>	<b>28</b>
4.2.1	p38 MAP Kinase Assay .....	28
4.2.2	p42/44 MAP Kinase Assay .....	29
4.2.3	SAPK/JNK Assay .....	29
<b>4.3</b>	<b>Proteinanalyse mittels Western Blot.....</b>	<b>29</b>
<b>4.4</b>	<b>Plasmid DNA Präparation .....</b>	<b>30</b>
4.4.1	Transformation und Kultur von E. coli.....	31
4.4.2	Aufreinigung der Plasmid DNA und Konzentrationbestimmung .....	31
<b>4.5</b>	<b>Transfektion der Endothelzellen .....</b>	<b>32</b>
<b>4.6</b>	<b>Auswertung und Darstellung.....</b>	<b>32</b>
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Tissue Factor Expression von koronaren glatten Muskelzellen und Blasenkarzinomzellen.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2</b>	<b>Tissue Factor-vermittelte Aktivierung der MAPK p38.....</b>	<b>34</b>
5.2.1	Dosisabhängigkeit .....	34
5.2.2	Zeitkurve.....	36
5.2.3	Inhibition mit TF-Antikörper .....	37
5.2.4	Die Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von Tissue Factor .....	38
<b>5.3</b>	<b>Tissue Factor-induzierte Aktivierung der MAPK p42/44 .....</b>	<b>39</b>
<b>5.4</b>	<b>Aktivierung der MAPK JNK.....</b>	<b>41</b>

<b>6.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>42</b>
<b>6.1</b>	<b>Signaltransduktion in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne von Tissue Factor.....</b>	<b>42</b>
<b>6.2</b>	<b>Signaltransduktion in Abhängigkeit von der proteolytischen Aktivität von Faktor VIIa .....</b>	<b>49</b>
<b>6.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>53</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>55</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>69</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>70</b>

# 1. Einleitung

Der Tissue Factor (TF) ist der entscheidende Initiator der Blutgerinnung (Ruf und Edgington, 1994; Camerer et al., 1996). Als Zellrezeptor bindet er das Zymogen Faktor VII und wandelt dieses in die aktive Serinprotease Faktor VIIa (FVIIa) um. Der Komplex TF/FVIIa führt zur Aktivierung der extrinsischen Blutgerinnung.

TF wird dauerhaft von perivaskulären Zellen wie Fibroblasten und Perizyten, sowie extravaskulären Zellen wie Keratinozyten exprimiert (Drake et al., 1989; Wilcox et al., 1989). Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen exprimieren keinen TF unter physiologischen Bedingungen. TF steht somit nicht mit dem Blut in Kontakt. Erst die Verletzung eines Gefäßes ermöglicht die Bindung des im Blut zirkulierenden FVII. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade hat den Verschluss des Gefäßes zur Folge. TF bildet um das Gefäß eine Art hämostatische Barriere.

Im Gegensatz dazu wird TF unter pathophysiologischen Bedingungen, wie beispielsweise atherosklerotischen Läsionen, auf Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und auf glatten Muskelzellen exprimiert (Hatakeyama et al., 1997; Taubman et al., 1997).

Nach neueren Erkenntnissen ist TF besonders unter solchen pathophysiologischen Bedingungen, aber auch unter physiologischen Bedingungen, an vielen biologischen Prozessen beteiligt. So zeigte sich, dass TF eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, der Zellausbreitung und der Zellmigration (Ott et al., 1998), der Angiogenese (Zhang et al., 1994), der Embryogenese (Bugge et al., 1996; Carmeliet et al., 1996), der Metastasierung (Mueller et al., 1992), der Entzündung (Ruf et al., 2000) und der Atherosklerose (Wilcox et al., 1989; Asada et al., 1998) spielt. Damit scheint TF auch wesentliche nichthämostatische Funktionen zu besitzen.

Sequenzhomologien zwischen TF und den Zytokinrezeptoren ließen eine Rezeptorfunktion von TF bei diesen biologischen Prozessen vermuten (Bazan, 1990; Banner et al., 1996). Den ersten direkten Hinweis auf eine Rezeptorfunktion von TF lieferten Versuche, bei denen es durch die Bindung von FVIIa an TF zu einer vorübergehenden intrazellulären Calciumerhöhung kam (Rottingen et al., 1995).

Die Signalwege der vielen biologischen Prozesse, an denen TF beteiligt ist, sind weiterhin Gegenstand der aktuellen Forschung. Zwei unterschiedliche Wege sind bekannt: der erste abhängig von der zytoplasmatischen Domäne von TF (Ott et al., 1998; Cunningham et al., 1999) und ein zweiter abhängig von der proteolytischen Aktivität von FVIIa (Camerer et al., 1996; Sorensen et al., 1999).

Die proteolytische Aktivität von FVIIa ist notwendig für die Aktivierung des PAR-2 (Protease-aktivierter Rezeptor-2) (Camerer et al., 2000; Riewald und Ruf, 2001) oder eines noch unbekanntem Rezeptors (Petersen et al., 2000). Unabhängig von der proteolytischen Aktivität führt die Ligandeninteraktion von TF zu einer Bindung der zytoplasmatischen Domäne von TF an ABP-280 (Aktin bindendes Protein 280) und einer Phosphorylierung von FAK (fokale Adhäsionskinase) (Ott et al., 1998).

Die genauere Kenntnis der einzelnen Schritte der Signaltransduktionswege und die Verbindung zu den grundlegenden Mechanismen Migration und Proliferation sind von entscheidender Bedeutung, um die biologischen Prozesse von TF zu beeinflussen.

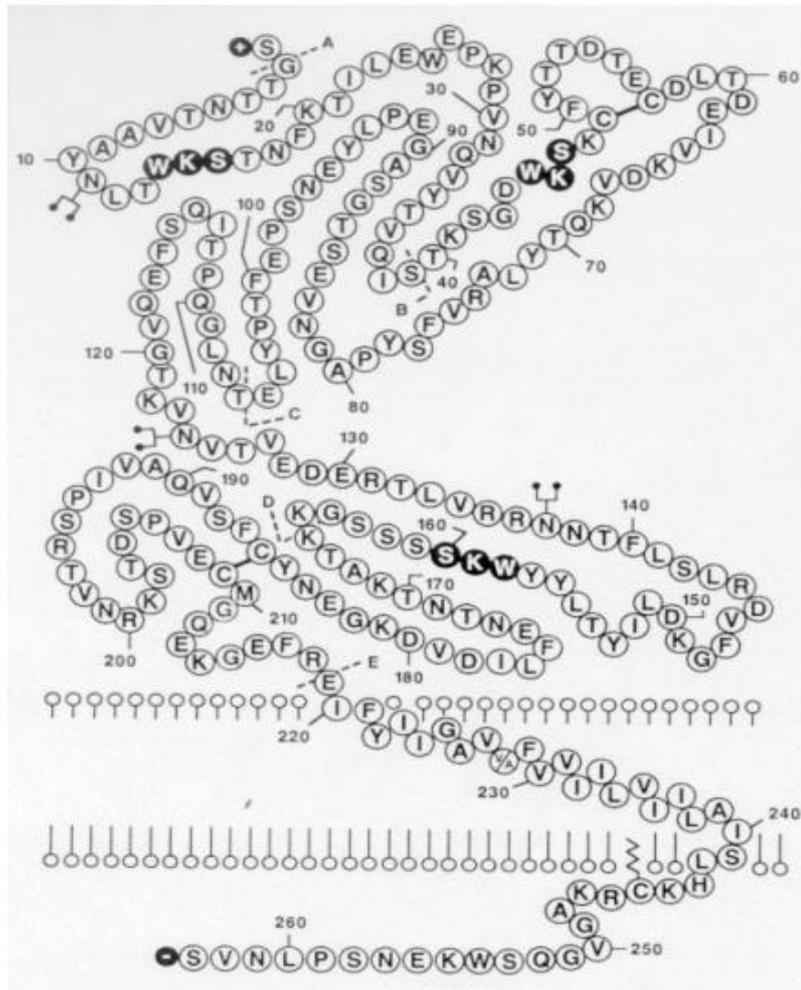
Die Verknüpfung von TF mit den vielen wichtigen biologischen Prozessen verspricht neue Therapiemöglichkeiten.

## **2. Theoretische Grundlagen**

### **2.1 Tissue Factor**

#### **2.1.1 Struktur**

Das menschliche Tissue Factor Gen besteht aus 12,4 Kilobasenpaaren (kBP) und ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert. Es beinhaltet sechs Exons im Wechsel mit fünf Introns. TF ist ein einzelkettiges integrales Glykoprotein der Zellmembran. Sein Molekulargewicht beträgt 47 kDa. Das exprimierte Protein hat eine Länge von 263 Aminosäuren (AS). Unterschieden werden drei Domänen: 219 AS bilden die extrazelluläre lösliche Domäne, 23 AS die transmembranöse unlösliche Domäne und 21 AS die zytoplasmatische Domäne (Ichinose und Davie, 1994; Broze, 1998). Von seiner Struktur her zeigt TF eine Sequenzhomologie zu der Zytokinrezeptorsuperfamilie der Klasse II (Bazan, 1990). Der extrazelluläre Teil besteht aus zwei Fibronectin Typ III ähnlichen Domänen (Banner, 1997). Die Bindungsstelle für FVIIa erstreckt sich über die gesamte extrazelluläre Domäne. Sie wird wiederum in drei wesentliche Kontaktstellen geteilt. Die erste zwischen der TF1 Domäne am N-Terminalen Ende und der EGF-2 Domäne von FVIIa, die zweite zwischen dem Übergang TH1/TH2 und der EGF-1 Domäne von FVIIa und die dritte zwischen der TF2 Domäne am C-Terminalen Ende und der Gla Domäne von FVIIa (Banner et al., 1996).



**Abbildung 1:** Molekulare Struktur von TF. Zu erkennen sind die drei Domänen: die extrazelluläre, die transmembranöse und die zytoplasmatische. Die Einzelbuchstaben stehen für die Aminosäuren. Die Klammern mit den zwei Punkten verdeutlichen Aminosäuren, an die Kohlenhydrate angehängt sind. Der doppelte Zacken zeigt verknüpfte Fette an. Die drei für die Bindung von FVII wichtigen Tryptophan-Lysin-Serin Sequenzen sind dunkel gekennzeichnet. Die Großbuchstaben geben die Intronstellen des Gens an (Lascalzo, Joseph und Schafer, Andrew I., Thrombosis and Hemorrhage, 1998).

## **2.1.2 Expression**

Der Tissue Factor wird konstitutiv von perivaskulären und extravaskulären Zellen exprimiert. Hier sind zu nennen die Fibroblasten der Adventitia, die Perizyten der renalen Glomerula, die Fibroblasten der Leber-, Nieren-, und Milzkapsel, die Kardiomyozyten (Luther und Mackman, 2001), die Keratinozyten der Haut und die Epithelien der Mukosa des Gastrointestinaltraktes. TF wurde auch im cerebralen Cortex, der Lunge, dem Urogenitaltrakt und der Plazenta nachgewiesen (Drake et al., 1989; Wilcox et al., 1989; Fleck et al., 1990). Die Zellen, die mit dem Blut in Kontakt stehen wie Monocyten Makrophagen und Endothelzellen, exprimieren TF nur nach Stimulation. Gleiches gilt auch für die TF-Expression von glatten Muskelzellen. Sie synthetisieren TF zwar in großer Menge, exprimieren ihn aber unter physiologischen Bedingungen nicht und wenn nur einen kleinen Teil (Schechter et al., 1997). In atherosklerotischen Läsionen (Hatakeyama et al., 1997; Taubman et al., 1997) und nach einer Angioplastie hingegen (Marmur et al., 1993) ist die TF-Expression von glatten Muskelzellen erhöht.

### **2.1.2.1 Regulation auf der Ebene der Transkription**

Die konstitutive und induzierbare Expression von TF wird über den TF Promotor gesteuert. Das TF Promotor Gen beinhaltet fünf Sp1 (Specificity protein 1) Bindungsstellen und zwei Enhancer, den nahen SRE (Serum Response Element) und den entfernten LRE (LPS Response Element). Der LRE-Enhancer enthält zwei AP-1 (Activator protein-1) Bindungsstellen und eine NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) Bindungsstelle. Die AP-1 Bindungsstelle wird von dem Transkriptionsfaktoren Komplex c-Fos/c-Jun (auch AP-1 genannt) und die NF- $\kappa$ B Bindungsstelle von den Transkriptionsfaktoren c-rel/p65 erkannt. Der SRE-Enhancer beinhaltet drei der Sp1 Bindungsstellen. Sie überlappen mit drei egr-1 (early growth response gene-1) Bindungsstellen. Sp1 reguliert die basale Expression von TF in Kultur. Die induzierbare Expression wird über c-Fos/c-Jun, c-rel/p65 und egr-1 gesteuert. Dabei verdrängt egr-1 das Specificity protein 1 (Sp1) von den drei nahen Bindungsstellen (Mackman, 1995; Mackman, 1997).

Induktoren von TF sind: PDGF (Platelet-derived-growth factor), speziell die Isoform PDGF-BB und MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) in Monozyten und glatten Muskelzellen (Ernofsson und Siegbahn, 1996; Schechter et al., 1997), PAR-2 Peptid in Huvec-Zellen (Langer et al., 1999), Thrombin in glatten Muskelzellen (Schechter et al., 1997; D'Andrea et al., 2003), IL-1 (Interleukin-1) (Drake et al., 1989), TNF- $\alpha$  (Tumour necrosis factor-alpha), LPS (Lipopolysaccharide) (Oeth und Mackman, 1995; Osnes et al., 1996) in Monozyten, LDL (Low-density lipoproteins) (Lesnik et al., 1992) und bFGF (basic

fibroblast growth factor) in Monozyten (Corseaux et al., 2000). Des Weiteren führt die Bindung von Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen über ihre Adhäsionsrezeptoren zu einer verstärkten TF-Expression. Die Adhäsionsrezeptoren sind P-Selektin und CD 40 Ligand (Lindmark et al., 2000) auf Monozyten und Makrophagen, CD 40 Ligand auf glatten Gefäßmuskelzellen (Schonbeck et al., 2000) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) auf EMPs (endothelial microparticles) oder Endothelzellen. Die TF-Expression in Endothelzellen wird nach Adhäsion von Monozyten über Rho A und NF- $\kappa$ B p65 induziert (Nagata et al., 2002; Sabatier et al., 2002; Ishibashi et al., 2003).

Hemmenden Einfluss auf die TF-Expression haben unter anderem IL-4, IL-10, IL-13 und cAMP in Monozyten und Endothelzellen und all-trans Retinoidsäuren in Leukämiezellen (Rao und Pendurthi, 1998). Nach neuesten Untersuchungen regulieren auch die zwei im Wein vorkommenden Polyphenole Resveratrol und Quercetin die TF-Expression über die Suppression der Degradation von I  $\kappa$ B  $\alpha$  herunter (Di Santo et al., 2003).

#### **2.1.2.2 Regulation der Aktivität**

Hinweise auf einen unterschiedlichen Aktivitätszustand von TF ergaben Untersuchungen, wonach die Sättigung der FVIIa Bindung an TF nicht mit der proteolytischen Aktivität korreliert. Es gibt also TF auf der Zellmembran, der mit TF-Antikörpern nachgewiesen werden kann, aber proteolytisch inaktiv ist. Der exprimierte, aber proteolytisch inaktive TF wurde als „nicht funktionell“ bezeichnet (Le et al., 1992).

Die proteolytische Aktivität war bereits bei einer TF-Sättigung von 10-20% maximal. Daraus lässt sich schließen, dass der überwiegende Teil von TF „nicht funktionell“, inaktiv ist (Ploplis et al., 1987; Le et al., 1992).

Als Regulatoren einer Inaktivierung (Encryption) und Aktivierung (De-Encryption) wurden verschiedene Mechanismen beschrieben. So haben die Membran-Phospholipide einen Einfluss auf die TF/FVIIa Aktivität. Anionische Phospholipide wie Phosphatidylserin (PS) fördern die proteolytische Aktivität in Phospholipidvesikeln, die als Modell dienen (Bach et al., 1986; Krishnaswamy et al., 1992). Phosphatidylethanolamin verstärkt die proteolytische Aktivität im Modell mit einem geringen Anteil von PS (Neuenschwander et al., 1995). Die Bedeutung von PS für die TF-Aktivität wurde auch in der Zellkultur gezeigt (Bach und Rifkin, 1990; Le et al., 1994; Carson, 1996).

Gegen eine alleinige Regulation der TF-Aktivität durch PS sprachen Versuche mit Monozyten. Die Blockade von PS nach Calcium Iontophorese konnte die vermehrte Aktivität nicht vollständig aufheben (Wolberg et al., 1999).

Als ein weiterer Mechanismus wurde das Vorliegen von TF in Dimeren und Monomeren untersucht. Dimeres Vorliegen von TF reduziert die Aktivität (Bach und Moldow, 1997).

Dagegen kam eine andere Gruppe zu dem Ergebnis, dass die Dimerisation die Autoaktivierung von FVII zu FVIIa und so die proteolytische Aktivität fördert (Donate et al., 2000).

Als dritter Mechanismus wurde die Endozytose des TF/FVIIa Komplex untersucht. Über den Mechanismus der Endozytose werden viele Rezeptoren in die Zelle aufgenommen. In Monozyten fand sich eine LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein)/Clathrin-abhängige Endozytose. Dabei bindet TFPI (tissue factor pathway inhibitor), der natürliche Inhibitor von TF, den Komplex TF/FVIIa/Xa. TFPI assoziiert mit LRP. Dies führt zu einer Internalisation und Degradation von TF (Hamik et al., 1999).

In BHK<sup>TF</sup>-Zellen (stable TF-transfected baby hamster kidney cells) fand sich dagegen eine LRP/Clathrin-unabhängige Endozytose. 20-25% des internalisierten FVIIa wurden recycelt. Der recycelte FVIIa war für 60-70% der proteolytischen Aktivität verantwortlich, obwohl dieser nur 10% des vorhandenen TF besetzt. Der Prozess verläuft wesentlich schneller als das reguläre Membranturnover. Es ist somit ein aktiver Rezeptor-vermittelter Prozess (Hansen et al., 2001).

In Fibroblasten konnten bereits zuvor zwei Wege der Endozytose beobachtet werden. Der eine Weg war abhängig von LRP und dem Inhibitor TFPI und der andere unabhängig von LRP und TFPI (Iakhiaev et al., 1999). Sie entsprechen den zwei genannten.

Der Mechanismus der Aktivierung und Inaktivierung ist unabhängig von der zytoplasmatischen Domäne von TF. In drei mit TF-Wildtyp oder TF-Mutanten (ohne zytoplasmatische Domäne) transfizierten Zelllinien, war der encryptete Anteil beinahe gleich groß. Eine Calcium-Iontophorese und eine Behandlung mit Detergentien führte ebenso zu keinem unterschiedlichen De-Encryption (Carson und Bromberg, 2000).

Dies konnte speziell für die LRP/Clathrin-unabhängige Endozytose gezeigt werden. Auch hier beeinflusste die Transfektion von BHK-Zellen mit TF-Mutanten ohne die zytoplasmatische Domäne die LRP/Clathrin-unabhängige Endozytose nicht (Hansen et al., 2001).

Der Ablauf des Recyclings und die intrazelluläre Verteilung von TF und FVIIa ist weitgehend unklar. In einer Studie konnte allerdings gezeigt werden, dass sich radioaktiv markierter FVIIa intrazellulär ansammelt. Im Fluoreszenzmikroskop war die Ansammlung perinukleär zu erkennen. Als Bindungsstellen zeigten sich Zytoskelettproteine wie Aktin und Tubulin. Die beiden Proteine hemmten dosisabhängig die Bindung von FVIIa an permeabilisierte Zellen. Die Inkubation mit TF-Antikörper verminderte nur die FVIIa Bindung an intakte Zellen, nicht jedoch an permeabilisierte. Dies galt für FFR-FVIIa (proteolytisch inaktiver FVIIa) in einem nur sehr geringen Maße. FVIIa und FFR-FVIIa unterschieden sich auch in ihrer Recyclingrate. FFR-FVIIa wurde zu einem viel höheren Teil recycelt (Iakhiaev et al., 2001).

Bei der Untersuchung von Zellmembrankompartimenten fand sich ein vierter möglicher Mechanismus zur Regulation der TF-Aktivität. Ein mit Caveolae assoziierter TF wies eine verminderte proteolytische Aktivität auf. Die Autoren beschrieben diese Assoziation in glatten Muskelzellen als „latenten Pool“ einer proteolytischen Aktivität (Mulder et al., 1996). Caveolae sind Regionen der Plasmamembran, die reich an Glykosphingolipiden und Cholesterol sind und spezifische Moleküle enthalten. So findet man häufig das Protein Caveolin und GPI- (Glycosyl phosphatidylinositol) verankerte Proteine. Caveolae scheinen an der Clathrin-unabhängigen Endozytose beteiligt zu sein. Dabei kommt es zu keiner Verschmelzung mit dem Lysosom und der folgenden Degradation. Ihre Funktion scheint die Beteiligung am Cholesterol Transport, am transzellulären Transport endothelialer Zellen von Flüssigkeiten und an der Signaltransduktion von Immun- und Wachstumsrezeptoren zu sein (Shin und Abraham, 2001).

Weitere Untersuchungen an ECV304-Zellen (human endothelial cell line) konnten zeigen, dass GPI-(Glycosyl phosphatidyl inositol) verankerter, endogener TFPI-1 (tissue factor pathway inhibitor-1) den TF/VIIa Komplex in glykosphingolipidreiche, durch Detergenzien unlösliche Membranareale, jene Caveolae, führt. Dadurch wird die proteolytische Aktivität herunterreguliert. Mit einem TFPI-Antikörper konnte die Inaktivierung verhindert werden (Sevinsky et al., 1996). Diese Aktivitätsminderung ist reversibel. Nach einer Inkubation von ECV304-Zellen von 12-24 Stunden ohne FVIIa und FX war die Reduktion der proteolytischen Aktivität nicht mehr nachweisbar (Ott et al., 2000). Die Transfektion von ECV304-Zellen mit GPI-verankertem TFPI-1 führte zu einer Überexpression von TFPI-1. Dagegen kam es nach Transfektion mit TFPI-1 Wildtyp lediglich zu einer erhöhten Freisetzung von TFPI-1. Die Überexpression von GPI-verankertem TFPI-1 hemmt die TF-Aktivität (Ott et al., 2003).

Die Caveolae stehen womöglich auch in Zusammenhang mit der LPR/Clathrin-unabhängigen Endozytose (Rao und Pendurthi, 2003).

## **2.2 Faktor VII**

### **2.2.1 Proteolytisch aktiver Faktor VIIa**

Das menschliche Faktor VII (FVII) Gen besteht aus 12,8 kBP und ist auf dem Chromosom 13 lokalisiert. Es setzt sich aus 9 Exons und 8 Introns zusammen. FVII ist ein Einzelketten Glykoprotein. Es wird von der Leber synthetisiert und als Zymogen von 406 AS ins Blut sezerniert. Die AS Kette des FVII lässt sich folgendermaßen einteilen: in die Gla-Domäne (AS 1-37), eine kurze amphipatische Helix (AS 38-45), die EGF-1 Domäne (AS 46-83), die EGF-2 Domäne (AS 84-130), das Aktivierungspeptid (AS 131-167) und die Proteasen Domäne (AS 168-406), sowie ein Signalpeptid (-60 bis -18) und ein Propeptid (-17 bis -1),

die bei der intrazellulären Prozessierung abgespalten werden. Der aktivierte Faktor VIIa (FVIIa) entsteht durch Spaltung der Kette zwischen Arg152 und Ile153 in eine leichte Kette von 152 AS und eine schwere Kette von 254 AS. Diese zwei sind über eine Disulfidbrücke verbunden. FVIIa gehört zur Klasse der Serinproteasen (Ichinose und Davie, 1994; Broze, 1998).

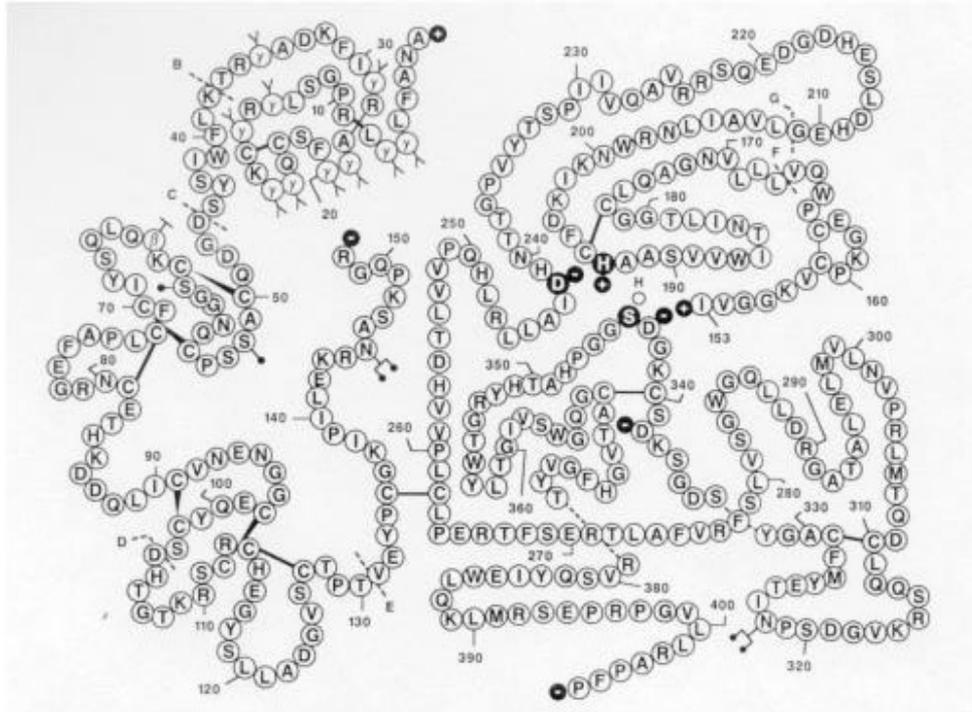
Nach neueren Erkenntnissen wird FVII auch extrahepatisch in Makrophagen und glatten Muskelzellen fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen synthetisiert. In der Färbung ließ sich FVII und in der in situ Hybridisierung sowie der RT-PCR FVII mRNA nachweisen (Wilcox et al., 2003).

Der wichtigste Rezeptor für FVII ist TF. Faktor VII bindet an TF und wird in die aktive Serinprotease Faktor VIIa (FVIIa) umgewandelt (Nemerson, 1994; Broze, 1998).

Daneben kann FVIIa an TF gebunden in einigen Zelllinien den PAR-2 (Protease-aktivierter Rezeptor-2) aktivieren. PAR-2 gehört zu einer ganzen Gruppe von Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs). Die PARs sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die durch die proteolytische Abspaltung einer N-terminalen extrazellulären Aminosäuresequenz aktiviert werden. Der neue N-Terminus dient als vierzähliger Ligand einer extrazellulären Domäne. Dessen Bindung führt zu einer Konformationsänderung und der Aktivierung des G-Proteins durch Austausch von GDP gegen GTP (Sugden und Clerk, 1997; Dery et al., 1998).

In TF-transfizierten KOLF-Zellen (Lungenfibroblasten der Maus), TF-transfizierten Xenopus Oocyten, HaCaT-Zellen (menschliche Keratinozyten), TF-transfizierten CHO-Zellen (chinese hamster ovary cells), glatten Muskelzellen und MDA-MB-231-Zellen (Brustkrebszellen) konnte eine PAR-2 Aktivierung gezeigt werden. Die proteolytische Aktivität von FVIIa war entscheidend. Die zytoplasmatische Domäne von TF hatte dagegen keine Bedeutung (Camerer et al., 2000; Riewald und Ruf, 2001; Hjortoe et al., 2004). Eine direkte Aktivierung von PAR-2 mit FVIIa war in TF-negativen Xenopus Oocyten nicht möglich (Camerer et al., 2000).

Gegenteilige Ergebnisse ergaben sich bei der Verwendung von BHK<sup>TF</sup>-Zellen (stable TF-transfected baby hamster kidney cells), konstitutiv TF-exprimierenden MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney cells) (Petersen et al., 2000) und mit TNF- $\alpha$  und VEGF zur TF-Expression stimulierten Huvec-Zellen (human umbilical vein endothelial cells) (Camerer et al., 2000). Die Stimulation von BHK<sup>TF</sup>-Zellen mit FVIIa und dem PAR-2 Peptid führte zu keiner Erhöhung der MAPKs Aktivität oder der intrazellulären Calciumfreisetzung (Petersen et al., 2000). In den Huvec-Zellen kam es nach Stimulation ebenfalls zu keiner intrazellulären Calciumerhöhung (Camerer et al., 2000).



**Abbildung 2:** Molekulare Struktur des aktivierten FVIIa. Zu erkennen sind die leichte Kette (links) und die schwere Kette (rechts), sowie die Disulfidbrücke der beiden Ketten zwischen Cystein 135 und Cystein 262. Die Aminosäuren sind durch einen Einzelbuchstabencode dargestellt. Y und  $\gamma$  zeigen die  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäureverknüpfungen an, sowie T und  $\beta$  die  $\beta$ -Hydroxyaspartatsäureverknüpfungen. Die Klammern oder die Striche mit Punkten geben die Glykosylierungsstellen an. Die katalytische Triade Histidin, Aspartat und Serin ist dunkel hervorgehoben. Großbuchstaben kennzeichnen die Introns des Gens (Lascalzo, Joseph und Schafer, Andrew I., Thrombosis and Hemorrhage, 1998).

## **2.2.2 Proteolytisch inaktiver Faktor VIIa**

Proteolytisch inaktiver Faktor VIIa (FFR-FVIIa) entsteht bei der Reaktion des aktiven Endes von FVIIa mit D-Phe-L-Phe-L-Arg chloromethyl keton (Sorensen et al., 1997). Seine Affinität zu TF ist höher als die von FVIIa zu TF (Sorensen und Rao, 1998). Die Verwendung von FFR-FVIIa schließt Effekte aus, die durch die proteolytische Aktivität von FVIIa hervorgerufen werden.

## **2.3 Signaltransduktion**

### **2.3.1 Allgemein**

Unter Signaltransduktion versteht man die intrazelluläre Übertragung eines Signals von dem Rezeptor auf den Effektor. Zwischen Rezeptor und Effektor liegen meist lange Signalkaskaden. An den Kaskaden sind unzählige Proteine beteiligt, die das Signal schrittweise weiterleiten und dabei modulieren. In diesen Kaskaden besitzen die MAPKs (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) eine ganz zentrale Stellung (Cooper, 2000b).

#### **2.3.1.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen**

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) sind wichtige Enzyme bei der Signaltransduktion eukaryonter Zellen (Chang und Karin, 2001). Sie übertragen extrazelluläre Signale ins Zellinnere. MAPKs gehören zur Gruppe der Serin/Threonin Kinasen (Cooper, 2000b). Bekannt sind bis jetzt vier verschiedene MAPKs: p42/44, auch ERK 1/2 (extrazellular signal-regulated kinases 1/2) genannt, p38, auch SAPK2 (stress-activated protein kinase 2) genannt, JNK (Jun amino-terminal kinase), auch p46/54 oder SAPK1 (stress-activated protein kinase 1) genannt, und ERK5 (extrazellular signal-regulated kinase 5). Diese werden von speziellen MAPKKs (mitogen-activated protein kinases kinases) reguliert und die MAPKKs wiederum von MAPKKKs (mitogen-activated protein kinases kinases kinases). Die spezifischen MAPKKs sind: MEK 1/2 für p42/44, MKK 3/6 für p38, MKK 4/7 für JNK und MEK5 für ERK5. Zu den MAPKKKs gehören u.a. c-Raf und MLK (mixed-lineage kinase) (Chang und Karin, 2001). Bei der Aktivierung von MAPKs kommt es zur Phosphorylierung eines Thyrosins (AS 183) und anschließend eines Threonins (AS 185). Diese doppelte Phosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung und ermöglicht damit die Bindung des Substrats (Lodish et al., 2000).

MAPK p38 steht für das Molekulargewicht des MAPKinasen Proteins von 38 kDa und den Arm des Chromosoms p. Vier Isoformen werden unterschieden: p38 $\alpha$  (= SAPK 2a), p38 $\beta$

(= SAPK 2b oder p38 $\beta$ II), p38 $\gamma$  (= SAPK 3 oder ERK6) und p38 $\delta$  (= SAPK 4) (Herlaar und Brown, 1999). p38 wurde ursprünglich nur in Verbindung mit zellulärem Stress und Apoptose gebracht. Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass p38 bei viel mehr Prozessen beteiligt ist. Hier sind zu nennen: die Immunantwort, insbesondere bei der Entzündung, die Zellproliferation und Differenzierung von Entzündungszellen, die allgemeine Rolle bei der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und dem Zellüberleben (Nebreda und Porras, 2000), die intestinale Wundheilung (Dieckgraefe et al., 1997), die Gefäßhyperplasie nach Verletzung und bei entzündlichen Erkrankungen (Ohashi et al., 2000; Ju et al., 2002), die Zellmigration (Hedges et al., 1999; Matsumoto et al., 1999) und die Steuerung auf der Ebene der Transkription und der Translation. p38 aktiviert den Transkriptionsfaktor ATF-2 (activating transcription factor-2) (Ono und Han, 2000). Für die Zellmigration konnte gezeigt werden, dass p38 in glatten Muskelzellen die Migration über die MAPKAP Kinase-2 (MAP kinase-activated protein kinase-2) und das HSP 27 (Hitzeschockprotein 27) beeinflusst (Hedges et al., 1999). Gleichzeitig steht p38 in Verbindung mit den Signalkaskaden der anderen MAPKs (Singh et al., 1999).

Die Stimuli für eine p38 Aktivierung sind vom Zelltyp abhängig. Zu ihnen gehören u.a.: PDGF (platelet-derived growth factor), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha), IL-1 (Interleukin-1), GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta) und PAF (platelet-activating factor) (Herlaar und Brown, 1999; Ono und Han, 2000).

MAPK p42/44 ist die am besten bekannte und beschriebene der vier MAPKs. Die Bezeichnung steht auch hier für das Molekulargewicht der zwei existierenden Formen und die Lokalisation auf dem Arm p des Chromosoms. Eine weitere Bezeichnung ist ERK 1/2 (extrazellulär signal-related kinases 1 und 2). Die MAPK p42/44 wurde erstmals bei der Zellproliferation beschrieben. Weiterhin soll p42/44 eine Rolle bei der Zelldifferenzierung und dem Zellüberleben spielen. Die Aktivatoren sind Wachstumshormone. Sie binden an Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR).

Bei der Bindung eines Liganden an RTKs kommt es zu einer Konformationsänderung und einer damit einhergehenden Autophosphorylierung an drei gegenüberliegenden intrazellulären Tyrosinresten. Zwei dieser autophosphorylierten Tyrosinreste sind Bindungsstellen für die SH2 Domäne von Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) und PLC- $\gamma$  (Phospholipase C-gamma).

Die Bindung von Grb2 transloziert SOS (sun of sevenless) an die Zellmembran. Hier kommt es zur Aktivierung des zellmembranverankerten kleinen GTP-bindenden Proteins Ras.

PLC- $\gamma$  wird bei seiner Bindung an autophosphorylierte RTKs aktiviert und spaltet PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat), ein Membranphospholipid, in IP<sub>3</sub> (Inositol 1,4,5-trisphosphat) und DAG (Diacylglycerol). DAG selbst aktiviert PKC (Protein Kinase C).

Sowohl Ras als auch PKC phosphorylieren die Serin/Threonin Kinase Raf. Raf aktiviert die doppelt spezifische Kinase MEK, den direkten Aktivator von p42/44. Ob das Signal stimulierend oder inhibierend ist, hängt vom Zelltyp ab (Cooper, 2000b).

GPCR werden durch die reversible Bindung des Liganden oder eine irreversible Proteolyse der N-terminalen Sequenz aktiviert. Dabei kommt es in beiden Fällen ebenfalls zu einer Konformationsänderung. Diese führt intrazellulär zur Bindung eines heterotrimeren G-Proteins und stimuliert den Austausch von GDP gegen GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Protein (Dery et al., 1998). Das dadurch aktivierte G-Protein aktiviert seinerseits die PLC- $\beta$  (Phospholipase C-beta) (Cooper, 2000b) oder Nonrezeptor Protein-Tyrosin Kinasen wie die Src-Familie (Sugden und Clerk, 1997). PLC- $\beta$  spaltet wie PLC- $\gamma$  PIP<sub>2</sub> in IP<sub>3</sub> und DAG (Cooper, 2000b). Src aktiviert wahrscheinlich Raf (Sugden und Clerk, 1997).

Die MAPK p42/44 kann die unterschiedlichsten Zielproteine phosphorylieren. Ein Teil wird direkt in den Kern transloziert. Dort reguliert p42/44 Transkriptionsfaktoren. Eine wesentliche Antwort auf die Stimulation von Wachstumsfaktoren ist die Transkription der sog. immediate-early genes. Deren Regulatoresequenz ist das SRE (serum response element). Dieses wird u.a. durch den Transkriptionsfaktor Elk-1 (Ets domain protein 1) und den SRF (serum response factor) erkannt. p42/44 phosphoryliert Elk-1 und aktiviert so die Transkription des immediate-early genes. Viele immediate-early genes kodieren wieder für einen Transkriptionsfaktor (Cooper, 2000b). Die Phosphorylierung der MAPK p42/44 hat eine proliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen (Cirillo et al., 2004).

MAPK JNK steht für Jun N-terminal kinase. Es sind zehn Isoformen mit einem Molekulargewicht von 46-54 kDa bekannt. Aktiviert wird JNK durch Zellstress wie Hitze, osmotischen Schock, UV-Licht, proinflammatorische Zytokine und Hypoxie. Die Zielstruktur ist u.a. der Transkriptionsfaktor c-Jun. Beteiligt ist JNK bei der frühen Embryogenese, der Apoptose, der Tumorgenese und der Immunantwort (Whitmarsh et al., 1998; Singh et al., 1999).

### **2.3.1.2 Andere Signalproteine**

Weitere zu nennende Gruppen von Proteinen bei der Signaltransduktion sind die G-Proteine, die Non-Rezeptor-Tyrosin Kinasen, die Phospholipasen, die Familie der Proteinkinase C, sowie die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und Akt.

Die G-Proteine umfassen zwei übergeordnete Gruppen: die heterodimeren G-Proteine und die sog. kleinen G-Proteine (Cooper, 2000b). Die kleinen G-Proteine werden in folgende fünf Untergruppen eingeteilt: die Ras-, Rho-, Rab-, Ran-, und Sar1/Arf-Familie. Die Ras-Familie ist an dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung, die Rho-Familie an der Organisation des Zytoskeletts, die Rab- und Sar1/Arf-Familie an dem Vesikeltransport und die Ran-Familie an dem Kernzytoplasmtransport und der Mikrotubuliorganisation beteiligt (Takai et al., 2001) Die heterodimeren G-Proteine sind an jene GPCRs (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) gebunden (Cooper, 2000b).

Zu den Non-Rezeptor-Tyrosin Kinasen zählen Jak (Janus family tyrosine kinase), FAK (fokale Adhäsionskinase) und Src (sarcoma-like kinase). Sie sind mit Zytokinrezeptoren und Integrinen assoziiert und an deren Signalübertragung beteiligt.

Die Phospholipasen mobilisieren Signalproteine aus den Phospholipiden der Zellmembran. Mehrere Isoformen werden unterschieden. Die einzelnen Phospholipasen sind spezifisch für das jeweilige Phospholipid. Das mobilisierte Signalprotein Diacylglycerol aktiviert Mitglieder aus der Familie der Proteinkinase C (Cooper, 2000b).

Die Proteinkinase C setzt sich aus drei Untergruppen von Isoformen zusammen: den klassischen, den neuen und den atypischen (Newton, 1995). Die Familie der Proteinkinase spielt beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung eine Rolle (Cooper, 2000b).

Die Phosphatidylinositol 3-Kinase wird durch RTKs und GPCR aktiviert. Ihre Aktivierung führt zur Phosphorylierung von Phospholipiden der Zellmembran. Diese phosphorylierten Phospholipide aktivieren Akt. PI3K und Akt sind an der Regulation des Zellüberlebens beteiligt (Cooper, 2000b).

### **2.3.2 Tissue Factor und Signaltransduktion**

Bei der Signalübertragung durch den TF/FVIIa Komplex lassen sich in der Theorie jene zwei Signalwege von einander trennen: der erste Weg abhängig von der proteolytischen Aktivität von FVIIa und der zweite abhängig von der zytoplasmatischen Domäne von TF. Diese Trennung liegt in vivo wohl nicht so eindeutig vor. Viele Versuche weisen auf ein Zusammenspiel hin. Trotzdem erscheint die Einteilung sinnvoll zum Verständnis der Rezeptorfunktion von TF.

#### **2.3.2.1 Die Bedeutung der proteolytischen Aktivität von FVIIa**

Den Hinweis auf eine TF/FVIIa-vermittelte Signalübertragung in Abhängigkeit von der proteolytischen Aktivität brachten Versuche mit Interleukin-1 $\beta$  stimulierten Huvec-Zellen (human umbilical vein endothelial cells), konstitutiv TF-exprimierenden J82-Zellen (Blasenkarzinomzellen) und MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney cells) sowie stabil

TF-transfizierten COS-1-Zellen (Nierenfibroblasten des Affens). Bei den Versuchen zeigte sich, dass die Bindung von FVIIa an TF innerhalb von Sekunden zu einer vorübergehenden intrazellulären Calciumerhöhung führte. Ein neutralisierender TF-Antikörper hob den Effekt auf (Rottingen et al., 1995). Ebenso verschwand der Effekt in MDCK-Zellen bei der Verwendung von FFR-FVIIa (proteolytisch inaktivem Faktor VIIa). Die zytoplasmatische Domäne war nicht von Bedeutung. Vermittelt wurde die intrazelluläre Calciumerhöhung durch PI-PLC (Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C). Deren Hemmung mit dem spezifischen Inhibitor U73122 blockte das Signal (Camerer et al., 1996). Die intrazelluläre Calciumerhöhung war zellspezifisch. Bei teils konstitutiv teils nach Stimulation TF-exprimierenden HK-2-Zellen (human kidney-2-cells) und stabil TF-transfizierten CHO-Zellen (chinese hamster ovary cells) war keine intrazelluläre Calciumfreisetzung nach Stimulation mit FVIIa zu beobachten (Prydz et al., 1999).

In weiteren Studien wurde die Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen untersucht. Die Inkubation mit FVIIa führte in Monozyten zu einer vorübergehenden Phosphorylierung eines 70 kDa Polypeptides an einem Tyrosinrest. Die Verwendung eines TF-Antikörper blockte die Phosphorylierung (Masuda et al., 1996).

In BHK<sup>TF</sup>-Zellen (stable TF-transfected baby hamster kidney cells) konnte gezeigt werden, dass die Bindung von FVIIa an TF zu einer Aktivierung der MAPK p42/44 führt. Die Verwendung des p42/44 Inhibitors PD98059 verhinderte die Phosphorylierung (Poulsen et al., 1998). FFR-FVIIa induzierte dagegen keine Phosphorylierung von p42/44. Die Phosphorylierung war abhängig von der proteolytischen Aktivität von FVIIa und unabhängig von der zytoplasmatischen Domäne von TF. Inhibitoren von FXa und Thrombin hoben die Phosphorylierung nicht auf (Sorensen et al., 1999). In beiden Studien wurde sowohl TF als auch die PARs (Protease-aktivierte Rezeptoren) als Rezeptoren der Signalübertragung diskutiert (Poulsen et al., 1998; Sorensen et al., 1999).

Die MAPK p42/44 Aktivierung durch FVIIa wird in BHK<sup>TF</sup>-Zellen und in HaCaT-Zellen (menschliche Keratinozytenzelllinie) über p21 Ras reguliert. Die p21 Ras Aktivierung beinhaltet wiederum einen PKC (Protein Kinase C) abhängigen Mechanismus in BHK<sup>TF</sup>-Zellen und einen Src (sarcoma-like Kinases) abhängigen Mechanismus in HaCaT-Zellen. In beiden Zelllinien hob die Blockierung, der in der klassischen Signalkaskade zwischen Ras und p42/44 gelegenen Raf Kinase die Phosphorylierung von p42/44 auf. Entscheidend war wieder die proteolytische Aktivität von FVIIa. Der Rezeptor der PKC oder Src Aktivierung durch FVIIa blieb offen (Versteeg et al., 2003).

In HaCaT-Zellen konnte in anderen Versuchen eine Phosphorylierung von p42/44, p38 und JNK nach der Inkubation mit FVIIa beobachtet werden. Dabei kam es über p42/44 zu

einer Hochregulierung des egr-1 (early growth response gene-1) Genes. Der Rezeptor für die Signalübertragung konnte nicht aufgeklärt werden (Camerer et al., 1999).

Versuche mit A14-Zellen (Fibroblasten) führten nach der Stimulation mit proteolytisch aktivem FVIIa zur Beschreibung eines Signalweges über die Src-ähnlichen Kinasen (c-Src, Lyn und Yes) und die PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) zu p42/44. Auch die MAPK p38 wurde bei diesen Versuchen über die Bindung von FVIIa an TF aktiviert. Das Signal lief wieder über Src-ähnliche Kinasen und die PI3K. Dabei wurden die GTPasen Rac und Cdc42 von PI3K aktiviert. Die Phosphorylierung von p38 war aber nicht abhängig von Cdc42. Als drittes Zielprotein von PI3K neben Rac und Cdc42 fand sich c-Akt/PKB (Versteeg et al., 2000). Der Rezeptor konnte nicht aufgeklärt werden. Die Ergebnisse von Versteeg et al., 2000 wurden allerdings größtenteils widerrufen (42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, 2000). Verantwortlich für die Effekte waren wohl Spuren von aktiviertem FXa und Thrombin. Damit war es kein TF-spezifischer Effekt (Pendurthi und Rao, 2002).

In TF-transfizierten BHK<sup>TF</sup>-Zellen und in HaCaT-Zellen kommt es durch die TF/FVIIa Interaktion zur Phosphorylierung der zwei Translationsfaktoren p70/p85, RSK (ribosomale S6 kinase), und p90, S6K (S6 kinase). Die Phosphorylierung ist unabhängig von der zytoplasmatischen Domäne von TF. p70/85 trat gleichzeitig mit der Aktivierung der PKB (Protein Kinase B) und der GSK3 (glycogen synthase kinase 3) auf (Versteeg et al., 2002). p90 war sensitiv für PI3K und p42/44 Inhibitoren. Sowohl die p70/85 als auch die p90 Phosphorylierung führten zur einer Aktivierung des eIF-4E (eukaryotic initiation factor-4E) und einer Hochregulation der Proteinmenge von eEF-1 $\alpha$  (eukaryotic elongation factor-1 $\alpha$ ) und eEF-2 sowie einer beschleunigten Methionin Inkorporation. Der Effekt wurde durch FXa und Thrombin Inhibitoren nicht beeinflusst (Versteeg et al., 2002). Der Signalweg von der Interaktion von TF mit FVIIa bis zur Aktivierung der beschriebenen Effektoren ist noch unklar. Eine weitere Gruppe identifizierte in HaCaT-Zellen eine Phosphorylierung des Epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) und der Prolin-reichen Tyrosin Kinase 2 (PYK 2) durch Stimulation mit FVIIa. Im Western Blot ließ sich eine signifikante Phosphorylierung von EGFR und PYK 2 nachweisen. Die p42/44 Aktivierung durch den TF/FVIIa Komplex war mit den EGFRKinase-Inhibitoren AG 1478 und PD 153035 hemmbar. Auch die Hochregulation der Gene egr-1, hb-EGF (heparin binding epidermal growth factor) und IL-8 wurde durch den Inhibitor AG 1478 gehemmt. Die erhöhte PYK 2 Phosphorylierung verschwand bei der Präinkubation mit dem TF-Antikörper 6B4 oder der Stimulation mit FVIIai (proteolytisch inaktiver FVIIa). Die Phosphorylierung von EGFR wurde einer Koppelung mit einem GPCR zugeschrieben. Hier wurde PAR-2 genannt (Wiiger und Prydz, 2004).

Untersuchungen zu den Funktionen von TF zeigten, dass die normale Embryogenese von Mäusen der extrazellulären Domäne von TF und/oder der proteolytischen Fähigkeit von TF/FVIIa Komplex bedarf. Mäusemutanten ohne die extrazelluläre Domäne sterben in der Embryonalzeit. Die zytoplasmatische Domäne hat keine Relevanz (Parry und Mackman, 2000).

Zum gleichen Ergebnis kam eine zweite Gruppe. Sie zeigten darüber hinaus in den Mutanten ohne die zytoplasmatische Domäne eine unveränderte p42/44 Aktivierung (Melis et al., 2001). Beide Gruppen gingen von einer PAR-vermittelten Signalübertragung aus.

Die Blockierung von TF/FVIIa mit dem Inhibitor NAPc2 hemmt die Angiogenese und das Tumorwachstum im Mausmodell. Die Hemmung von FXa hat keinen Einfluss. Dies spricht für eine Signalübertragung durch den TF/FVIIa Komplex (Hembrough et al., 2003).

In all den genannten Arbeiten blieb damit die Antwort auf die wesentliche Frage offen, welcher Rezeptor durch die proteolytische Eigenschaft von FVIIa aktiviert wird.

Vier Versuchsgruppen konnten zeigen, dass FVIIa gebunden an TF den PAR-2 aktivieren kann. Diese Aktivierung konnte in TF- und PAR-2-transfizierten KOLF-Zellen (Lungenfibroblasten der Maus), TF- und PAR-2-transfizierten Xenopus Oocyten und HaCaT-Zellen (menschliche Keratinozyten) als verstärkte Calciumfreisetzung und Phosphoinositol Hydrolyse (FVIIa 50 nM) (Camerer et al., 2000), in TF- und PAR-2-transfizierten CHO-Zellen (chinese hamster ovary cells) als erhöhte MAPKs Aktivierung (FVIIa 50 nM) (Riewald und Ruf, 2001), in glatten Muskelzellen als verstärkte Zellmigration (TF/FVIIa 0,3 nM) (Marutsuka et al., 2002) und in MDA-MB-231-Zellen (Brustkrebszellen) als erhöhte IL-8 mRNA Expression und Migration (FVIIa 5-50 nM) (Hjortoe et al., 2004) gemessen werden. Für die IL-8 Expressionserhöhung und die Steigerung der Migration über PAR-2 wurde die Spezifität des Effektes mit einem PAR-2-Antikörper nachgewiesen (Hjortoe et al., 2004). Das Maximum der IL-8 mRNA Expression lag bei 75-120 Minuten. Die Verwendung von FFR-FVIIa und eines TF-Antikörpers verhinderte die Expression, nicht jedoch die Inhibition von FXa und Thrombin. PAR-1 Antikörper beeinflussten den Effekt nicht. Die Erhöhung der IL-8 mRNA Expression war Folge einer Neusynthese und keiner Stabilisierung vorhandener IL-8 mRNA (Hjortoe et al., 2004). Die IL-8 Erhöhung war abhängig von p42/44 und p38 (Wang et al., 2002).

In Xenopus Oocyten, die nur PAR-2 exprimieren, zeigte sich allerdings selbst mit 300 nM FVIIa kein Effekt. Bei alleiniger Transfektion mit TF war dieser auch nicht zu beobachten (Camerer et al., 2000). TF scheint eine Dockingstation für FVIIa zu dessen Positionierung und Konzentrierung darzustellen. Nur so kann FVIIa PAR-2 aktivieren (Camerer et al.,

2000). Die zytoplasmatische Domäne von TF war ohne Bedeutung. Die Verwendung des proteolytisch inaktiven Faktors VIIa (FFR-FVIIa) hob den Effekt auf (Camerer et al., 2000). Eine Gruppe schloss dagegen die Stimulation des PAR-2 und aller anderen bekannten PARs durch den TF/FVIIa Komplex aus. Sie konnten keine Erhöhung der Calciumfreisetzung und der MAPKs Aktivierung in BHK<sup>TF</sup>-Zellen und MDCK-Zellen (FVIIa 100 nM) messen (Petersen et al., 2000). Ebenfalls nicht beobachtet werden konnte der Effekt in mit TNF- $\alpha$  und VEGF stimulierten Huvec-Zellen (FVIIa 50 nM) (Camerer et al., 2000).

### **2.3.2.2 Die Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von Tissue Factor**

In der stabil TF-transfizierten humanen Nierenzelllinie 293 führte die Stimulation mit PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat) zur Phosphorylierung eines oder mehrerer Serine der zytoplasmatischen Domäne von TF. Die Phosphorylierung verschwand bei Verwendung eines Inhibitors für PKC (Protein Kinase C) (Zioncheck et al., 1992).

Die PKC-vermittelte Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF bestätigte sich in Folgeversuchen allerdings nicht. Im Gegenteil, eine Hemmung der PKC förderte die Phosphorylierung (Mody und Carson, 1997). Bei den Versuchen wurde TF mit Zelllysaten von Glioblastomzellen inkubiert. Dies führte zu einer Phosphorylierung an mehreren Stellen der zytoplasmatischen Domäne. Gleiches galt auch für ein künstlich synthetisiertes, korrespondierendes Peptid zur zytoplasmatischen Domäne von TF. Als eine Phosphorylierungsstelle der zytoplasmatischen Domäne von TF identifizierte die Gruppe Serin 253 und vermuteten außerdem Serin 258 (Mody und Carson, 1997).

In Huvec-Zellen wird die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF nach Stimulation mit PMA durch eine Palmitoylierung des Cystein 245 gesteuert (Dorfleutner und Ruf, 2003). Die Palmitoylierung reguliert negativ die Phosphorylierung von Serin 258. PKC $\alpha$  phosphoryliert Serin 253 der zytoplasmatischen Domäne von TF und fördert die Phosphorylierung von Serin 258. Ob die Phosphorylierung von Serin 258 in Folge oder parallel verläuft, ist offen. Die Phosphorylierung an Serin 258 induziert wohl die entscheidende Konformationsänderung der zytoplasmatischen Domäne. Veränderungen des Cholesterol Gehalts der Membran beeinflussen die Phosphorylierung. Ebenso ist die Phosphorylierung abhängig von einer Reifung von TF im Golgi-Apparat. Dabei kommt es zu einer Modifikation des N-verknüpften Kohlenhydrates. Die zytoplasmatische Domäne ist wesentlich für den Golgi-Transport und den Einbau in die Zellmembran. Die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne findet an der Zellmembran statt (Dorfleutner und Ruf, 2003).

Eine Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF wurde auch bei der endogen-vermittelten VEGF Produktion in Melanomzellen vermutet. Mutationen des Serin

253, dem Substrat von PKC, reduzierten den Effekt. Die Bindung von FVIIa an TF oder die Aktivierung von FXa und Thrombin war nicht nötig (Abe et al., 1999).

Bei den genannten Versuchen einer TF-Signaltransduktion in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne von TF blieb die Bedeutung der Phosphorylierung offen. Auch ein Effekt der Phosphorylierung fand sich nur bei der letzten Gruppe. Genauso fraglich blieb der natürliche Ligand für TF.

Nur eine Gruppe zeigte einen TF-vermittelten Effekt durch die Bindung eines TF-Liganden. Bei Clusteringversuchen von TF-exprimierenden Zellen kam es in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne zur Bindung von ABP-280 (Aktin bindendes Protein-280) und der Autophosphorylierung von FAK (fokale Adhäsionskinase). Die Interaktion mit ABP-280 und die Phosphorylierung von FAK steigerten die Zelladhäsion, Zellmotilität und Zellmigration (Ott et al., 1998).

### **2.3.2.3 Die Bedeutung der proteolytischen Aktivität von FVIIa und der zytoplasmatischen Domäne von Tissue Factor**

In TF-transfizierten U937-Zellen (menschliche Monozytenzelllinie) führt die Bindung von FVIIa an TF zu einer erhöhten Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern. Das Maximum der intrazellulären Calciumkonzentration lag bei 30 Sekunden. Der Effekt war abhängig von der proteolytischen Aktivität von FVIIa und der zytoplasmatischen Domäne. Bei der Verwendung von Monozyten, die mit TF-Mutanten ohne die zytoplasmatische Domäne transfiziert waren, oder FFR-FVIIa zeigte sich keine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels. Des weiteren verschwand der Effekt bei der Inkubation mit dem TF-Antikörper 6B4 und dem PI-PLC- $\beta$  Inhibitor U73122. Neben der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führte die Stimulation mit FVIIa zu einer Synthese von ROS (reaktive oxygen species). Das Maximum lag hier bei 24 Stunden. Als Rezeptor wurde TF betrachtet. Ein Korezeptor zu TF konnte aber nicht ausgeschlossen werden (Cunningham et al., 1999). Die Funktion der zytoplasmatischen Domäne von TF bei der beobachteten Steigerung der intrazellulären Calciumkonzentration wurde nicht geklärt.

In Huvec-Zellen führt der TF/FVIIa/Xa Komplex über PAR-2 zu einer Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF. PAR-1 konnte ausgeschlossen werden.

Der TF/FVIIa Komplex kann ebenfalls PAR-2 aktivieren, allerdings nur in Konzentrationen ab 50 nM. PAR-2 aktiviert die PC-PLC (Phosphatidylcholin spezifische Phospholipase C). Der PC-PLC Inhibitor D609 hemmte den Effekt dosisabhängig. Der spezifische PI-PLC- $\beta$  Inhibitor U73122 zeigte dagegen keinen Effekt auf die Phosphorylierung. PC-PLC spaltet PC (Phosphatidylcholin). Das dabei entstehende DAC führt über PKC- $\alpha$  zur Phosphorylierung des Serins 253 von TF. Das Maximum der Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF lag bei 5-10 Minuten. Nach einer Minute war die

Phosphorylierung nicht nachzuweisen (Ahamed und Ruf, 2004). Die Versuche beschreiben eine Signalübertragung durch die Verbindung der beiden Wege. Als physiologischer Auslöser der Signalübertragung wird nicht der Zweierkomplex TF/FVIIa, sondern der Dreierkomplex TF/FVIIa/Xa gesehen. Die Bedeutung und der Effektor der Phosphorylierung blieben ungeklärt.

Eine weitere Versuchsreihe zeigte, dass der TF/FVIIa Komplex über PAR-2 vermutlich die Angiogenese steuert. Die PAR-2 Signalübertragung wird negativ durch die zytoplasmatische Domäne von TF reguliert. In einem Aortenringmodell, von Mausmutanten ohne die zytoplasmatische Domäne von TF, zeigte sich unter Stimulation mit FVIIa und PDGF-BB eine verstärkte Angiogenese. Dies ließ sich auch in vivo in der neonatalen Retina von Mäusen mit einer Defizienz der zytoplasmatischen Domäne von TF zeigen. Die verstärkte Angiogenese war zudem abhängig von PAR-2. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF die Angiogenese reguliert. In Proben neovaskularisierter Iris von Patienten mit diabetischer Retinopathie fand sich eine Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne nur in den Bereichen der Neovaskularisation. Zusätzlich ließ sich eine Kolokalisation der phosphorylierten zytoplasmatischen Domäne von TF mit PAR-2 nachweisen. Bei gesunden Patienten lag dagegen keine Phosphorylierung vor (Belting et al., 2004).

Untersuchungen zu den Funktionen von TF zeigten, dass sowohl die zytoplasmatische Domäne (Bromberg et al., 1995) als auch die proteolytische Aktivität von FVIIa (Mueller und Ruf, 1998) für die Tumormetastasierung entscheidend zu sein scheinen. Proteolytisch inaktiver FVIIa (Mueller und Ruf, 1998) wie auch TF-Mutanten ohne zytoplasmatische Domäne (Bromberg et al., 1995) zeigten keinen Effekt. Als wesentlicher Mechanismus wurde die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF diskutiert (Bromberg et al., 1999).

#### **2.3.2.4 Signaltransduktion durch Faktor Xa und Thrombin**

Die Proteasen der extrinsischen Blutgerinnungskaskade unterhalb von FVIIa wie Faktor Xa und Thrombin können ebenfalls PARs aktivieren. Dieser Weg ist von den beiden anderen abzugrenzen. Es ist keine direkte Signalübertragung durch TF/FVIIa. FXa schneidet PAR-1 (Riewald und Ruf, 2002). Thrombin aktiviert PAR-1 sowie PAR-3 und PAR-4 (Coughlin, 2000). PAR-1-vermittelte Effekte sind u.a. die Zellverformung, die Migration, die Sekretion, die Integrin Aktivierung und die Transkription (Coughlin, 2000).

## 2.4 Migration

### 2.4.1 Allgemein

Unter Migration versteht man die Fähigkeit einer Zelle sich fortzubewegen. Abhängig ist diese Bewegung von den dynamischen Veränderungen des Zytoskelettes der Zelle. Der Vorgang ist sehr komplex und nur teilweise verstanden. Drei Stadien werden unterschieden: das Vorgreifen (Protrusion), das Anhaften bzw. Verankern (Anchoring) und das Lösen und Zurückziehen (Retraktion).

Das Vorgreifen geschieht mit Hilfe von sog. Mikrospikes oder Filopodien, Lamelopodien und Pseudopodien. Mikrospikes oder Filopodien enthalten Bündel von Aktinfilamenten und werden von vielen Zellen gebildet. Lamelopodien werden von Fibroblasten und Pseudopodien von Makrophagen und Amöben ausgebildet. Lamelopodien und Pseudopodien bestehen aus einem Netzwerk von Aktinfilamenten. Sie unterscheiden sich allerdings in ihrer Form. Alle drei entstehen durch die Polymerisation und die Vernetzung von Aktinfilamenten.

Die Anhaftung des vorgeschobenen oder ausgestülpten Teils der Zelle sichern fokale Kontakte sog. fokale Adhäsionen. Dies sind über Integrine vermittelte Kontakte der Aktinfilamente mit der extrazellulären Matrix.

Der letzte Schritt, der des Lösens und Zurückziehens, ist bis jetzt am wenigsten verstanden. Aus Versuchen geht hervor, dass hierbei Myosin II eine Rolle spielen muss. Es kommt wahrscheinlich zu einer Art Kontraktion, bei der das Ende nachgezogen wird (Cooper, 2000a). Die Lösung wird womöglich durch Proteasen bewerkstelligt. Ein beschriebenes Beispiel ist PAI-1 (plasminogen activator inhibitor). PAI-1 löst Adhäsionen über uPAR (urokinase plasminogen activator receptor) (Czekay et al., 2003). Ein weiteres Beispiel ist die MT1-MMP (Membran-Type 1 Matrix Metalloprotease) (Seiki et al., 2003).

Alle drei Schritte sind mit der Modulation des Zytoskeletts verbunden. Bei der Modulation des Zytoskeletts spielen HSP 27 (Hitze Schock Protein 27) und ABP-280 (Aktin-bindendes Protein 280) eine Rolle. Die Aktivierung von HSP 27 unterstützt die Polymerisation von G-Aktin (globuläres Aktin) zu F-Aktin (filamentöses Aktin). F-Aktin bildet die Aktinfilamente. ABP-280 ist bei der Vernetzung von Aktinfilamenten beteiligt. Gleichzeitig stellt es einen Kontakt zur Zellmembran her. Es trägt so zur Form und Bewegung der Zelle bei (Cooper, 2000a).

Die Steuerung der Modulation des Zytoskeletts scheint wesentlich zum Verständnis der Migration zu sein. Bekannt sind aber nur einzelne Bruchstücke. Die GTP-bindenden Proteine der Rho-Familie, Rho, Cdc42 und Rac (Nobes und Hall, 1995) sowie die MAPK p38 (Hedges et al., 1999) sind beteiligt. Cdc42 und Rac regulieren über PAK1 die p38

Aktivierung. Als Stimulus diente IL-1 (Zhang et al., 1995). Rac und PI3K sind an der Aktin Reorganisation durch PDGF Stimulation in PDGFR  $\beta$  exprimierenden (PDGF beta-receptor) PAE-Zellen (porcine aortic endothelial) beteiligt (Hooshmand-Rad et al., 1997). Auch  $\beta$ Pix (PAK-interacting exchange factor) spielt bei der Signalübermittlung eine Rolle.  $\beta$ Pix beschleunigte die p38 Aktivierung über Cdc42/Rac/PAK/MKK3/6 (Lee et al., 2001). In Versuchen mit Fibroblasten führte PDGF-BB (Plated-derived Growth Factor Isoform BB) zu einer Aktin Reorganisation und Migration über Ras und p38. Rac war nicht beteiligt (Matsumoto et al., 1999). Unterschiedliche Mechanismen wurden diskutiert. Die Gruppe vermutete einen von Rac getrennten Weg oder eine Aktivierung von Rac in der Signalkaskade unterhalb von p38 (Matsumoto et al., 1999). Die MAPK p38 aktiviert über die MAPKAP Kinase-2 (MAP kinase-activated protein kinase-2) HSP 27 in glatten Muskelzellen (Hedges et al., 1999). p38 wird durch PI3K reguliert (Yamboliev et al., 2001). Daneben können die bei der Migration so wichtigen Integrine der fokalen Adhäsionen zu einer Autophosphorylierung der zwei Nonrezeptor Protein-Tyrosin Kinases FAK und c-Src führen. Zusammen bilden sie einen Komplex (Aplin et al., 1998). FAK und c-Src stehen über PI3K in Verbindung zu p38 (Gerthoffer und Gunst, 2001). Gleichzeitig kann die autophosphorylierte fokale Adhäsionskinase Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) und damit SOS (sun of sevenless) binden. SOS aktiviert Ras, das GTP-bindende Protein des MAPK p42/44 Weges (Cooper, 2000b). Damit besteht außer über p38 eine weitere Verbindung zu den MAPKs.

Das Zusammenspiel der unterschiedlichen Mechanismen bei der Steuerung der Zytoskelettmodulation wird die drei Schritte der Migration bedingen.

#### **2.4.2 Tissue Factor und Migration**

Der TF/FVIIa Komplex hat eine chemotaktische Wirkung auf glatte Muskelzellen. Der Effekt ist vergleichbar mit der Wirkung von PDGF. Der Mechanismus blieb unklar (Sato et al., 1996). Entscheidend war allerdings die proteolytische Aktivität von FVIIa des TF/FVIIa Komplexes (Sato et al., 1997). Die Stimulation mit FVIIa allein förderte die Migration nicht (Sato et al., 1997).

Nach neueren Untersuchungen ist die durch den TF/FVIIa Komplex induzierte Migration von glatten Muskelzellen PAR-2-vermittelt (Marutsuka et al., 2002). Mit einem PAR-2 Antiserum war die Migration jedoch nicht vollständig hemmbar. Über die benötigte Zugabe des Komplexes als Stimulus wurde spekuliert (Marutsuka et al., 2002).

FVIIa fördert die Migration von TF-exprimierenden MDA-MB-231 Brustkrebszellen. Der Effekt war PAR-2- und IL-8-vermittelt. Die Verwendung eines PAR-2-Antikörpers inhibierte die Migration vollständig. Allerdings hatte das PAR-2 Peptid nicht dieselbe chemotaktische Wirkung wie FVIIa (Hjortoe et al., 2004).

Weitere Beobachtungen klären womöglich diese Widersprüche. So migrieren Blasenkarzinomzellen, die konstitutiv TF exprimieren, auf dem TF-Antikörper 6B4 (Ott et al., 1998). Diese Migration wird durch Zugabe von löslichem TF (sTF) gehemmt. Von Bedeutung war dabei die zytoplasmatische Domäne von TF. Die zytoplasmatische Domäne von TF bindet ABP-280 und ist darüber am Remodeling und der Migration beteiligt. Des Weiteren führt TF zu einer Phosphorylierung von FAK (fokale Adhäsionskinase) (Ott et al., 1998), einer Nonrezeptor Protein-Tyrosin Kinase. FAK ist mit fokalen Adhäsionen assoziiert. Diese spielen bei der Migration eine wesentliche Rolle (Cooper, 2000a). Ein zweiter Weg könnte somit über ABP-280 und FAK laufen.

## **2.5 Proliferation**

### **2.5.1 Allgemein**

Die Zellteilung ist die grundlegendste Fähigkeit einer Zelle bzw. eines lebenden Organismus. Sie sichert das Überleben durch Teilung und Vermehrung. In eukaryonten Zellen ist die Zellteilung ein sehr komplexer Vorgang. Man bezeichnet ihn auch als Zellzyklus. Zwei Phasen lassen sich im Zellzyklus grundsätzlich unterscheiden: die Mitose und die Interphase. Letztere wird weiter untergliedert in die G1-, S- und G2-Phase. Die Interphase, die eine Vorbereitungszeit darstellt, dauert wesentlich länger als die eigentliche Teilung, die Mitose. In der S-Phase der Interphase findet die Replikation der DNA statt. Die DNA wird zunächst für die Zellteilung vervielfältigt. In G1 bereitet sich die Zelle darauf vor. G2 ist eine Kontrollphase. Es wird die Richtigkeit der Replikation überprüft. Erst dann ist die Zelle teilungsbereit.

Der entscheidende Punkt, an dem entschieden wird, ob die Zelle überhaupt in den Zellzyklus eintritt, befindet sich in der G1-Phase. Es handelt sich um den sog. Restriction Point. Eine Zelle, die an diesem Punkt arretiert wird, geht in die G0-Phase über. Sie teilt sich so lange nicht mehr, wie sie in dieser Phase bleibt. Sie kann aber von dort aus jeder Zeit wieder in den Zellzyklus eintreten. Die Übergänge der einzelnen Phasen werden durch sog. Cycline und Cdk's (Cyclin-dependent kinases) reguliert. Von Bedeutung ist am Restriction Point Cyclin D, Cdk4 und Cdk6. Nur der Komplex aus Cyclin D und Cdk4/Cdk6 ermöglicht den Eintritt einer Zelle in den Zellzyklus und damit die Zellteilung. Cyclin D wiederum wird über den MAPKinasen Weg p42/44 reguliert. Die Aktivierung des p42/44 Weges führt zur Synthese von Cyclin D (Cooper, 2000c). Weitere Aktivatoren des Zellzyklus sind die kleinen G-Proteine Rho, Rac und Cdc42 (Marshall, 1999).

## 2.5.2 Tissue Factor und Proliferation

Die Bindung von FVIIa an TF hat eine proliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen. Gemessen wurde dies als  $H^3$ -Thymidin Inkorporation. Die Proliferation glatter Muskelzellen ist dosisabhängig (25-100 nM). Sie läuft über p42/44 und AP-1. Proteolytisch inaktiver FVIIa hat keinen proliferativen Effekt (Cirillo et al., 2004). Der Mechanismus der Signalübertragung von extrazellulär auf intrazellulär ist unklar.

Daneben kann der durch die FVIIa Bindung an TF ausgelöste Effekt aber auch auf antiapoptotischen Mechanismen beruhen. FVIIa führt in serumgestarvten BHK<sup>TF</sup>-Zellen zu einer Reduktion der LDH Aktivität, einer Reduktion der Kernkondensation und einer Verminderung der Caspase-3 Aktivierung. Die reduzierte Caspase-3 Aktivität ist abhängig von PI3K. Die Verwendung eines PI3K Inhibitors hemmt synchron die Akt Phosphorylierung. Die Hemmung von p42/44 hat einen wesentlich geringeren Einfluss. Sie ruft aber doch eine signifikante Reduktion der Caspase-3 Aktivität hervor. Auf welche Weise FVIIa diese Signalübertragung induziert, blieb offen (Sorensen et al., 2003).

Ein verstärktes Zellüberleben ließ sich in serumgestarvten BHK<sup>TF</sup>-Zellen mit einem MTT Assay nachweisen. In nicht adhärenen Zellen war der Effekt geringer. Wieder zeigte sich, dass FVIIa die Caspase-3 Aktivität herunterreguliert. Dies galt sowohl für adhärenente Zellen als auch für Zellen in Suspension. FVIIa aktiviert PKB und p42/44 verlängert in BHK<sup>TF</sup>-Zellen in Suspension (Versteeg et al., 2004). In adhärenen Zellen war die Phosphorylierung dagegen nur transient (Versteeg et al., 2002). Die Hemmung der Caspase-3 Aktivität war bei diesen Versuchen sowohl von PI3K als auch p42/44 abhängig. Gleichzeitige Stimulation mit FX führte zu einem vermehrten Zellüberleben als FVIIa allein. Die alleinige Stimulation mit FXa hatte aber keinen Effekt. Proteolytisch inaktiver FVIIa hemmte das durch FVIIa verstärkte Zellüberleben. Der Rezeptor für die durch FVIIa und FXa ausgelöste Signalübertragung wurde nicht diskutiert (Versteeg et al., 2004).

Des weiteren induziert FVIIa in serumgestarvten BHK<sup>TF</sup>-Zellen über Jak2/STAT5 ein vermehrtes Zellüberleben. Dies war ebenfalls messbar in einem MTT Assay. Die STAT5 Phosphorylierung ist  $G_{12}/G_{13}$ -abhängig. Die zytoplasmatische Domäne spielt keine Rolle bei der STAT5 Phosphorylierung. Entscheidend ist die proteolytische Aktivität von FVIIa. STAT5 wird in den Kern transloziert. Die STAT5 Phosphorylierung ist Jak2-vermittelt. Über Jak2 wird auch PKB aktiviert. FVIIa induziert auf dem Jak2/STAT5 Weg über dies eine Bcl<sub>XL</sub> Expression. Als Rezeptor der Signalübertragung wurde PAR-2 vermutet (Versteeg et al., 2004).

## 2.6 Tissue Factor-vermittelte Genexpression

FVIIa reguliert durch Bindung an TF das PAP (Poly (A) Polymerase) Gen hoch (Pendurthi et al., 1997). Nach Stimulation von SW979 Pankreaskarzinomzellen mit FVIIa kommt es dosisabhängig zu einer Expression des uPAR-(urokinase receptor) Genes (Taniguchi et al., 1998).

In HaCaT-Zellen und COS-1-Zellen induziert TF durch Bindung von FVIIa das egr-1 Gen (early growth response gene-1) (Camerer et al., 1999).

Die VEGF (vascular endothelial growth factor) Expression wird in Meth-A sarcoma Zellen (Zhang et al., 1994) und in den beiden Melanomzelllinien RPMI-7951 und WM-115 (Abe et al., 1999) über TF reguliert.

Darüber hinaus kommt es durch den FVIIa/TF Komplex zur Expression von Transkriptionsregulatoren wie c-fos, egr-1, ETR101, BTEB2, c-myc, fra-1 und Tristetraprolin, Wachstumsfaktoren wie Amphiregulin, hb-EGF, CTGF, und FGF-5, proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1beta, IL-8, LIF und MIP2alpha (Camerer et al., 2000). Auch an der zellulären Reorganisation und Migration beteiligte Proteine wie RhoE, uPAR und Kollagenase1 und 3 werden hochreguliert. Des weiteren kommt es zu einer vermehrten Synthese von PAI-2, Cyclophilin, GADD45, Jagged1 und des Prostaglandin E<sub>2</sub>-Rezeptor (Camerer et al., 2000).

Weiterhin ließ sich durch die Bindung von FVIIa an TF eine Hochregulation des Cyr61 und des CTGF (connective tissue growth factor) Genes zeigen (Pendurthi et al., 2000).

Die Translation fördernden Faktoren wie p70/p85<sup>S6K</sup> und p90<sup>RSK</sup> werden ebenfalls über den FVIIa/TF Komplex vermehrt exprimiert (Versteeg et al., 2002).

Die Erhöhung der Expression von IL-8 durch die Bindung von FVIIa an TF war in HaCaT-Zellen und in MDA-MB-231 Brustkrebszellen im Serum nachweisbar (Wang et al., 2002; Hjortoe et al., 2004).

## 3. Zielsetzung

Die TF-Signaltransduktion über die MAPKs ist bis jetzt nicht geklärt. Einigkeit besteht nur über die Aktivierung der MAPK p42/44 in Abhängigkeit von der proteolytischen Aktivität von FVIIa. Eine Aktivierung der MAPK p38 und JNK wird sehr kontravers diskutiert. Besonders umstritten ist die Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von TF.

Folgende Fragen stellten sich: Kommt es durch die Bindung von Faktor VIIa an Tissue Factor zu einer Aktivierung der MAPKs p38 und JNK? Ist die Aktivierung spezifisch für Tissue Factor? Welche Bedeutung hat dabei die zytoplasmatische Domäne von Tissue Factor? Ist die Phosphorylierung von MAPKs abhängig oder unabhängig von der proteolytischen Aktivität von Faktor VIIa?

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Zellkultivierung**

Kultivierung von J82 Blasenkarzinomzellen (ATCC, Manassas, USA) in Nunclon Triple Flasks 500 cm<sup>2</sup> Polystyrol (Nunc, Wiesbaden) mit DMEM Medium (Dulbeco's Men 25MM Hepes Medium, Gibco Life Technologie, Karlsruhe) plus 5% FCS (fetales Kälberserum) (Biochrom, Berlin), 1% Penicillin/Streptomycin Solution (Sigma, Taufkirchen) und 1% L-Glutamin (Sigma). Die nahezu konfluenten J82-Zellen wurden für ca. 24 h mit DMEM Medium (Gibco) plus 1% Penicillin/Streptomycin Solution (Sigma) und 0% FCS Serum gestarvt.

Kultivierung von primären glatten Muskelzellen (Cell Systems, Washington, USA) in T175 Flaschen (rot) (Sarstedt, Newton, USA) mit SmGM-2 Medium (Clonetics, Bio Whittaker, Walkersville, USA). Die nahezu konfluenten primären glatten Muskelzellen wurden für ungefähr 24 h mit SmBM Medium plus 0,5 % FCS Serum gestarvt.

Kultivierung von Huvec Endothelzellen (PromoCell, Heidelberg) in T175 Flaschen (gelb) (Sarstedt, Newton, USA) mit M199 Medium (Sigma) plus 20% FCS (Biochrom, Berlin), 1% L-Glutamin (Sigma) und 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma). Es folgte die transiente nicht-liposomale Transfektion.

Die Zellen wurden mit Cell Dissoziation Solution (Sigma) abgelöst. Zentrifugation (Megafuge 1,0 R, Haereus, Osterode) bei 1200 U/min, 24°C, 5 min. Abnahme des Überstandes. Wiederaufnahme der Pellets in 1ml serumfreien Medium. Die Zellen wurden für 45 min ruhen gelassen.

Stimulation mit FFR-FVIIa oder FVIIa (NovoNordisk, Mainz) in den jeweiligen Konzentrationen für 8 min im Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg) bei 37°C.

### **4.2 In vitro Kinasen Assay**

#### **4.2.1 p38 MAP Kinase Assay**

Die Zellsuspension wurde bei 3000 U/min und 4°C für 1 min zentrifugiert (Biofuge fresco, Haereus, Osterode) und der Überstand vom Zellpellet abgenommen. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 500 µl 1X Cell Lysis Buffer (Kit New England Biolabs, Frankfurt). Zur Verbesserung der Lyse 4 x 5 sec Ultraschallung (Sonorex super RK 103 H, Bandelin elektronik, Berlin) und Trennung der zytosolischen Proteine von den Zellmembrantrümmern durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 U/min und 4°C.

400 µl des Überstandes wurden zur Präzipitation zu 40 µl Immobilized Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Monoclonal Antibody (Kit) gegeben. Rollern (Sysmex, RM 810, Norderstedt) bei 4°C über Nacht.

Viermaliger Waschschrift, je zweimal mit Cell Lysis Buffer (Kit) und Kinasen Buffer (Kit): Zugabe von 500 µl, Zentrifugation bei 13000 U/min für 1 min bei 4°C und Abnahme des Überstandes.

Es folgte die Kinasenreaktion mit 400 µl Pellet in 50 µl 1X Kinasen Buffer (Kit) mit 2 µg ATF-2 Fusions-Protein (Kit) und 200 µM ATP (Kit) für 30 min bei 30°C. Abschließend Zugabe des nicht-reduzierenden SDS (Sodium-Dodeacyl-Sulfat) Puffer nach Laemmli (Laemmli: 1,25 ml 1M Tris HCl (Sigma), pH 6,8; 2 ml 20% SDS (Biorad), 2 ml Glycin (Sigma), 1 ml 2-Mercaptoethanol (Sigma), 3,75 ml H<sub>2</sub>O und 1-2 Körnchen Bromphenol Blue (USB, Cleveland, USA)).

#### **4.2.2 p42/44 MAP Kinase Assay**

Gleiche Methode wie bei dem p38 MAP Kinase Assay Kit (New England Biolabs, Frankfurt), nur wurden 30 µl Immobilized Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Monoclonal Antibody zur Präzipitation verwendet. Die Kinasenreaktion erfolgte in 50 µl 1X Kinase (Kit) mit 2 µg Elk-1 Fusion Protein (Kit) und 200 µM ATP (Kit).

#### **4.2.3 SAPK/JNK Assay**

Gleiche Methode wie bei dem p38 MAP Kinase Assay Kit (New England Biolabs, Frankfurt), allerdings wurden 40 µl c-Jun (1-89) Fusion Protein Beads (Kit) verwendet. Die Kinasenreaktion erfolgte mit 450 µl Überstand in 50 µl 1X Kinasen Buffer (Kit) mit 100 µM ATP (Kit).

### **4.3 Proteinanalyse mittels Western Blot**

Reduzierung und Denaturierung mit Laemmli und durch Erhitzen auf 95°C für 5 min. Verwendung einer vertikalen Gelkammer (X Cell Sure Lock™ Novex Mini Cell, Invitrogen, Karlsruhe) und eines SDS Laufpuffers (3 g Tris Base, 14,4 g Glycine und 1 g SDS in 1 l). Eine Tasche eines 8-16% Tris/Glycin Gradientengeles 1,0 mm und 12 Taschen (NuPAGE, Invitrogen, Karlsruhe) wurde mit 20 µl Probe beladen. Die angelegte Spannung betrug 110 V (Power Pac BioRad, Hercules, USA).

Elektrophoretische Elution halb trocken im Sandwich-Verfahren. Zu unterst 5 Blotpapiere (Whatman Chromatography Paper 3MMChr, Maidstone, England) getränkt im Anodenpuffer I, darauf 5 Blotpapiere getränkt im Anodenpuffer II, dann die Membran (Immobilon™-P, Filter Type: PVDF, Pore Size: 0,45 µM; Millipore Cooperation, Bedford, England) getränkt in 100% Methanol (Merck, Hohnbrunn) gefolgt von dem Gel und 5

Blotpapieren getränkt im Kathodenpuffer. Puffer: Anode I (0,3 M Tris Base, 20% Methanol, pH 10,4), Anode II (83 ml Anode I, 183 ml Methanol) und Kathode (83 ml Anode I, 138 ml Methanol und 5,2 g  $\epsilon$ -amino-n-capid acid). Geblottet wurde bei 300 mA (Blotter: Sigma-Aldrich, Power Pac: BioRad) und anschließend geblockt für 1 h in TBST (20 nM Tris Base (Sigma), 137 nM NaCl, 1 M HCl+ 1%Tween (Sigma) mit 5% BSA (Sigma)).

Drei Waschschritte in TBST mit 1% BSA. Rollern (Sysmex) der Membran im jeweiligen 1. Antikörper: Phospho-ATF-2 (Thr71) Antibody (rabbit polyclonal IgG, affinity purified), Phospho-Elk-1 (Ser383) Antibody (rabbit polyclonal IgG, affinity purified) oder Phospho-c-Jun (Ser63) Antibody (rabbit polyclonal IgG, affinity purified) (Kit) bei 4°C über Nacht. Der 1. Antikörper wurde 1:1000 in TBST mit 1% BSA verdünnt.

Weitere drei Waschschritte in TBST mit 1% BSA. Rollern der Membran im 2. Antikörper (Anti-rabbit Ig, horseradish peroxidase-linked F(ab')<sub>2</sub> fragment from donkey, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der 2. Antikörper wurde 1:1000 in TBST mit 1% BSA verdünnt. Erneut drei Waschschritte in TBST mit 1% BSA. Verwendung des RPN 2109 ECL Western blotting detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Die Filme (T-Mat Plus DL, Kodak, Paris, Frankreich) wurden für die optimale Zeit belichtet. Entwicklung im Du Pont LINX LP 400 (Agfa, Mortsel, Belgien).

Einscannen des Blots mit dem Imaging Densitometer Gel Doc 2000 (BioRad, Hercules, USA). Messung der mittleren Intensität mit dem Programm Quantity One (BioRad, Hercules, USA). Die Einheit für die Intensität ist die optische Dichte (OD).

Bei dem Blotten gegen phosphoryliertes p38 und gesamt p38 wurden die Zellen wie beim in Vitro Kinasen Assay kultiviert. Auszählen der Zellen in der Neubauer Zählkammer. 45 min ruhen lassen und Stimulation mit FVIIa und FFR-FVIIa. Lyse der Zellen mit 3X SDS. Anschließend wurden ca. 80000 Zellen pro Tasche des Gels geladen. Elektrophoretische Trennung und Transfer. Rollern der Membran im 1. Antikörper, Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody oder p38 MAP Kinase Antibody (Cell Signaling Technology, New England Biolabs, Frankfurt), Verdünnung 1:1000 in TBST mit 1% BSA und anschließende Detektion sowie Quantifizierung.

#### **4.4 Plasmid DNA Präparation**

Verwendete Plasmide: pEGFP-C1, pEGFP-TF und pEGFP-TF 1-218 (BD Clontech, Heidelberg).

#### **4.4.1 Transformation und Kultur von E. coli**

1,5 µl DNA des jeweiligen Plasmids wurde mit 50 µl Max Efficiency DH5α™ competent cells pKC19 DNA (0,01 µg/ml) (Gibco, Karlsruhe) gemischt und gevortext. Inkubation bei 4°C für 30 min und anschließend für 60 sec im Wasserbad bei 42°C. Es folgten weitere 2 min bei 4°C. Zugabe von 1000 µl autoklaviertem LB-Medium. LB-Medium: 10 g Tryptone (Becton Dickinson, Heidelberg), 5 g Yeast extract (Becton Dickinson), 5 g NaCl (Merck) und 1 ml 1 M NaOH (Merck) pro Liter. Schütteln bei 37°C für 60 min und Zentrifugation für 1 min bei 13000 U/min (Biofuge fresco, Haereus, Osterode). Der Überstand wurde bis auf 100 µl abgenommen und das Pellet in zusätzlichen 100 µl LB-Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 100 µl auf zuvor gegossenen Agarplatten ausgestrichen. Agarplatten: 10 g Tryptone (Becton Dickinson), 5 g Yeast extract (Becton Dickinson), 5 g NaCl (Merck) 1 ml 1 M NaOH (Merck) und 15 g Agar (Becton Dickinson) pro Liter plus Antibiotikum des Resistenzplasmids. Inkubation bei 37°C über Nacht.

2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden vorgelegt, ein Klon von der Agarplatte gepickt und hineingegeben. Inkubation für 6-12 h bei 37°C im Schüttler. Am folgenden Tag wurde 1 ml der Bakteriensuspension in 250 ml LB-Medium mit 1% des entsprechenden Antibiotikums gegeben. Bebrüten im Schüttler bei 37°C eine weitere Nacht.

#### **4.4.2 Aufreinigung der Plasmid DNA und Konzentrationbestimmung**

Verwendung des EndoFree™ Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden). Lyse der Bakterien. Die Proteine, die Membranbestandteile und die chromosomale DNA wurden gefällt und abfiltriert. Die RNA wurde durch Zugabe von RNase fragmentiert. Bindung der Plasmid DNA mit Hilfe eines Anionen-Austauscherharzes. Die Endotoxine wurden zuvor neutralisiert. Sie konnten sich dadurch ebenso wenig wie die fragmentierte RNA an das Austauscherharz binden, sondern wurden durch die Poren der Membran durchgespült. In mehreren Waschgängen Entfernung bestehender Verunreinigungen. Anschließend wurde die DNA durch Änderung des pH's wieder herausgelöst und präzipitiert. Wiederaufnahmen des Pellets.

Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm am Spectrophotometer UVIKON (Kontron Medical, Ergolding). Berechnung der DNA Konzentration mit der folgenden Formel:  $OD_{260} \times 50 \text{ (Faktor DNA)} \times 100 \text{ (Verdünnungsfaktor)} / 1000 = \text{Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

## 4.5 Transfektion der Endothelzellen

Beschichtung von T175 Flaschen mit 0,2% Gelatine (Sigma) für 2 h bei 37°C. Ablösen der Zellen mit Detach Kit (PromoCell, Heidelberg) und Auslegung der Zellen 1:2 in die beschichteten T175 Flaschen 24 h vor Transfektion.

Verwendung des Effectene™ Transfection Reagent (Qiagen, Hilden). 30 µg des jeweiligen Plasmids wurden in 1500 µl EC Puffer gegeben und mit 48 µl Enhancer gemischt. Ruhen lassen für 5 min bei Raumtemperatur. Zugabe von 150 µl Effectene. Nochmals für 10 min inkubieren. Nun wurden 9 ml M199 Medium mit 20% FCS zu dem Komplex gegeben. Das Medium der Kulturflasche mit dem nahezu konfluenten Zellrasen war zu verwerfen. Vorlage von 24 ml M199 Medium + 20% FCS. Die 9 ml von dem Komplex wurden auf dem Zellrasen verteilt. Inkubation für 18 h im Brutschrank. Ablösen der Zellen mit Detach Kit (PromoCell). Ruhen lassen für 90 min. Es folgten die weiteren Schritte wie oben (Kapitel 4.2) unter In vitro Kinasen Assay beschrieben: die Stimulation, die Immunopräzipitation sowie der Western Blot.

1 ml der Zellsuspension wurde für 10 min bei 1600 U/min und 4°C abzentrifugiert. Anschließend Fixation mit Paraformaldehyd- (PFA-) Lösung. Die Proben wurden am Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Bestimmt wurden mit dem 448 nM Argonlaser die Parameter Zellgröße (Absorption) im Vorwärtsskater und die Granularität (Streuung bzw. Ablenkung) im Seitwärtsskater. Die entsprechende Zellpopulation wurde nun gated und die Fluoreszenz im Grünfilter quantifiziert.

## 4.6 Auswertung und Darstellung

Ausgewertet wurden n= 3-7 Versuche. Dargestellt ist der x-fache Anstieg als mean± SEM. Die Signifikanz wurde bei p< 0,05 angenommen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Tissue Factor Expression von koronaren glatten Muskelzellen und Blasenkarzinomzellen

Koronare glatte Muskelzellen (CASMC) exprimieren TF in Kultur (Abbildung 3). Nach dem Histogramm der Durchflusszytometrie sind es  $46,9 \pm 5,8\%$ . Die Expression in Blasenkarzinomzellen (J82) ist deutlich höher (Abbildung 4). Hier ergab das Histogramm einen Wert von  $99 \pm 3\%$ . J82 exprimieren konstitutiv TF. Blasenkarzinomzellen wurden daher als Modell verwendet.

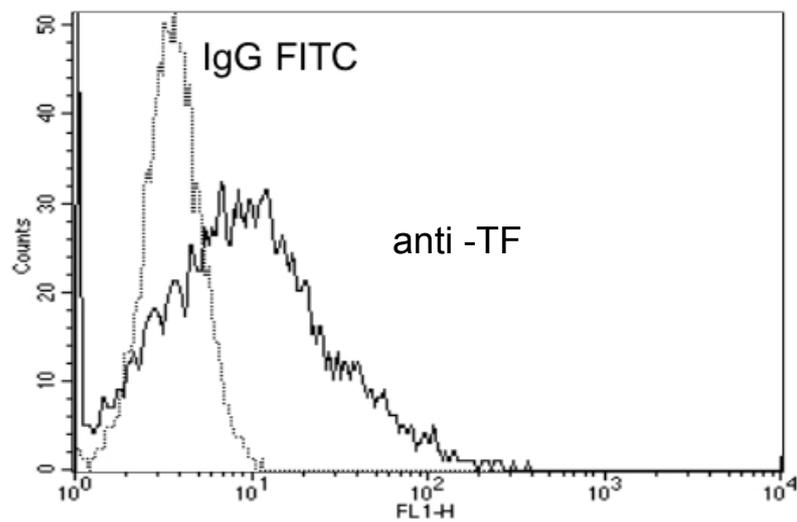


Abbildung 3: TF-Expression koronarer glatter Muskelzellen

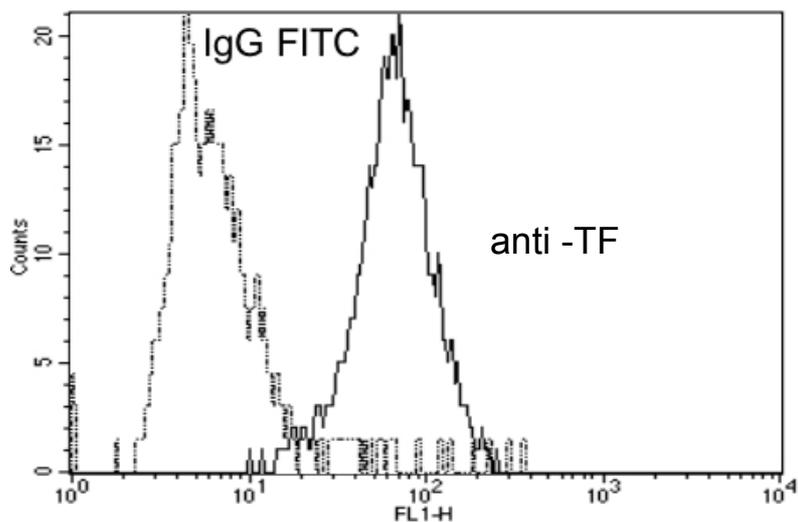


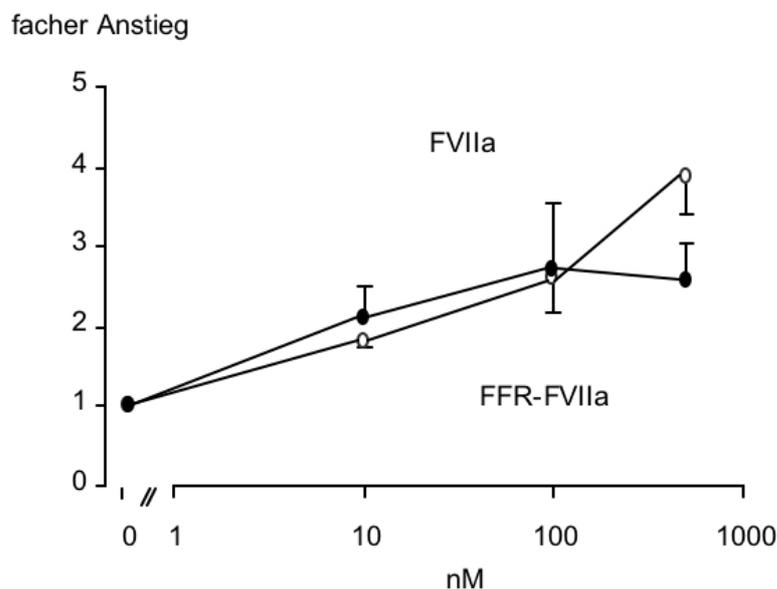
Abbildung 4: TF-Expression der Blasenkarzinomzelllinie J82

## 5.2 Tissue Factor-vermittelte Aktivierung der MAPK p38

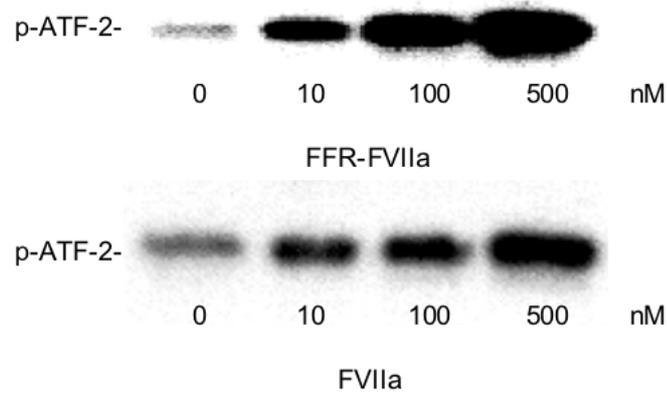
Bei fast allen Versuchen wurde die *in vitro* Kinasen Aktivität von p38 gemessen. Dabei diente die Phosphorylierung von ATF-2 als Marker. Diese Methode hat eine höhere Sensitivität als das Blotting mit dem Phospho-p38 MAPKinasen Antikörper.

### 5.2.1 Dosisabhängigkeit

Die *in vitro* Kinasen Aktivität von p38 in J82 Blasenkarzinomzellen wird dosisabhängig gesteigert (Abbildung 5). Verwendet wurde FVIIa und FFR-FVIIa zur Stimulation in den Konzentrationen 0, 10, 100 und 500 nM. Die Stimulationszeit betrug 8 Minuten. Dabei ergibt die quantitative Auswertung bei einer Konzentration von 500 nM FVIIa und FFR-FVIIa im Mittel eine Steigerung jeweils um das dreifache gegenüber dem Kontrollwert. Diese Steigerung ist signifikant. Die Abbildung 6 zeigt einen exemplarischen Western Blot der *in vitro* Kinasen Aktivität von p38 in J82 Blasenkarzinomzellen durch Stimulation mit FVIIa und FFR-FVIIa.



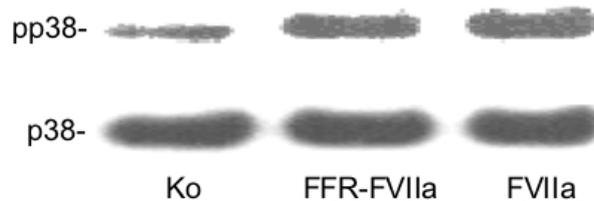
**Abbildung 5:** Dosisabhängige Aktivierung der MAPK p38 in J82 Blasenkarzinomzellen durch Stimulation mit FVIIa (geschlossene Kreise) und FFR-FVIIa (offene Kreise)



**Abbildung 6:** Exemplarischer Western Blot der Dosisabhängigkeit in J82 Blasenkarzinomzellen



**Abbildung 7:** Phosphorylierung von ATF-2 in koronaren glatten Muskelzellen durch Stimulation mit FVIIa (500nM) und FFR-FVIIa (500nM)

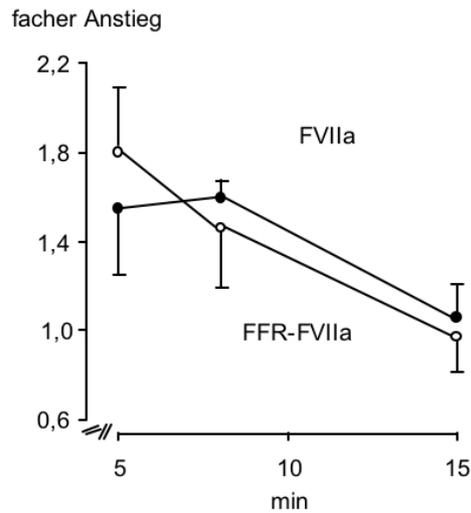


**Abbildung 8:** Phosphorylierung von der MAPK p38 in J82 Blasenkarzinomzellen durch Stimulation mit FVIIa (500nM) und FFR-FVIIa (500nM)

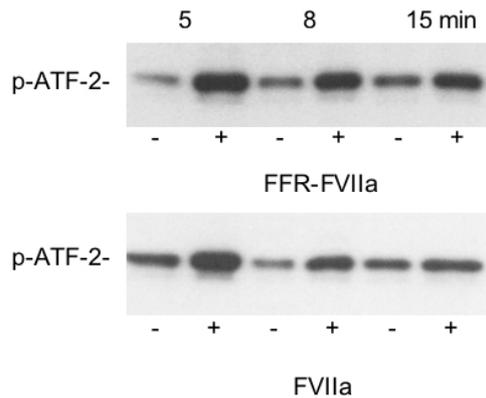
Die Steigerung der in vitro Kinase Aktivität von p38 in koronaren glatten Muskelzellen ist anhand eines exemplarischen Western Blots dargestellt (Abbildung 7). Auch in einem Western Blot gegen phosphoryliertes p38 konnte der Effekt gezeigt werden (Abbildung 8). Stimulationszeit war bei beiden Versuchen 8 Minuten und die Konzentration von FVIIa und FFR-FVIIa betrug jeweils 500 nM.

### 5.2.2 Zeitkurve

Die Zellen wurden für 5, 8 und 15 Minuten stimuliert. Die optimale Zeitdauer der Stimulation lag bei sieben Minuten (Abbildung 9). Bei längerer Stimulation verlor sich der Effekt wieder. Verwendet wurde FVIIa und FFR-FVIIa in einer Konzentration von 100 nM. Die Abbildung 10 zeigt einen exemplarischen Western Blot.



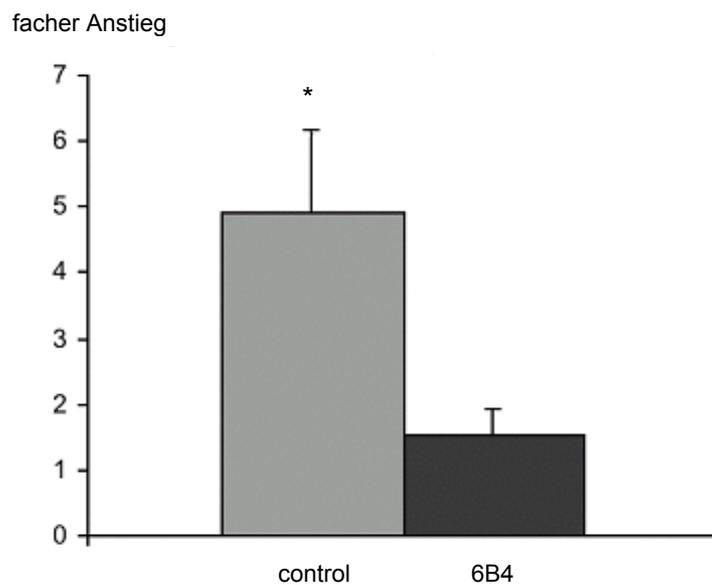
**Abbildung 9:** Zeitabhängige Aktivierung der MAPK p38 in J82 Blasenkarzinomzellen durch Stimulation mit FVIIa (100nM) und FFR-FVIIa (100nM)



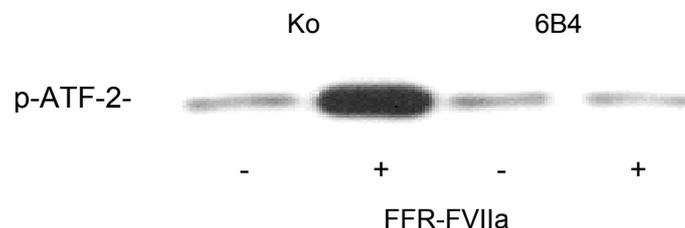
**Abbildung 10:** Exemplarischer Western Blot der Zeitabhängigkeit in J82 Blasenkarzinomzellen

### 5.2.3 Inhibition mit TF-Antikörper

Die Steigerung der in vitro Kinasen Aktivität von p38 ist spezifisch für TF (Abbildung 11). Der FFR-FVIIa (500 nM) Effekt verschwand bei der Präinkubation mit dem TF-Antikörper 6B4 (100 µg). Die quantitative Auswertung ergab in der Kontrolle einen fast 5-fachen Anstieg. Nach Präinkubation mit dem TF-Antikörper kam es zu einer signifikanten Hemmung. Ein weiterer Rezeptor für den proteolytisch inaktiven Faktor VIIa ist nicht bekannt. Der Effekt muss damit TF-vermittelt sein. Abbildung 12 zeigt einen exemplarischen Western Blot.



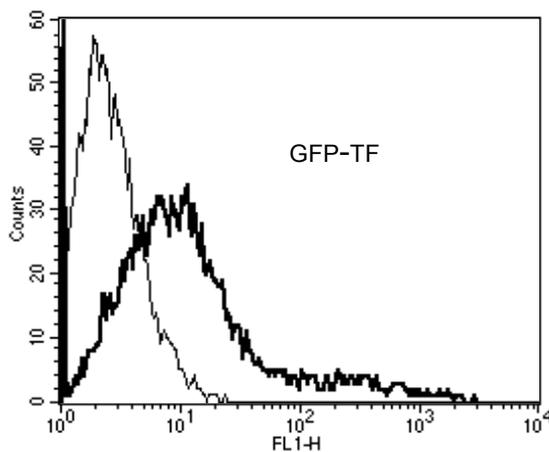
**Abbildung 11:** Signifikante Hemmung der mit FFR-FVIIa (500nM) auslösbaren Aktivierung der MAPK p38 in J82 Blasenkarzinomzellen durch Präinkubation mit dem TF-Antikörper 6B4 (100µg)



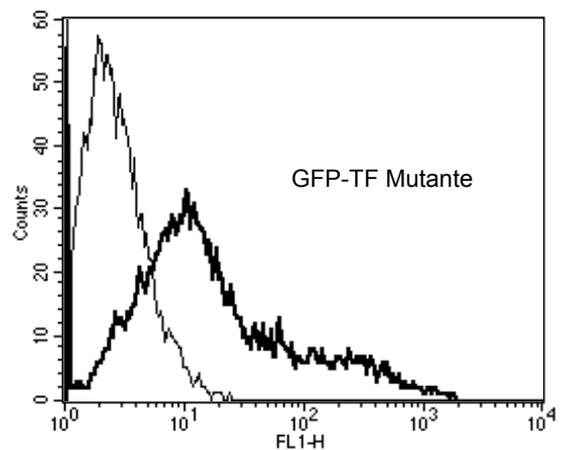
**Abbildung 12:** Exemplarischer Western Blot der Hemmung der MAPK p38 Aktivierung in J82 Blasenkarzinomzellen durch Präinkubation mit dem TF-Antikörper 6B4

#### 5.2.4 Die Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von Tissue Factor

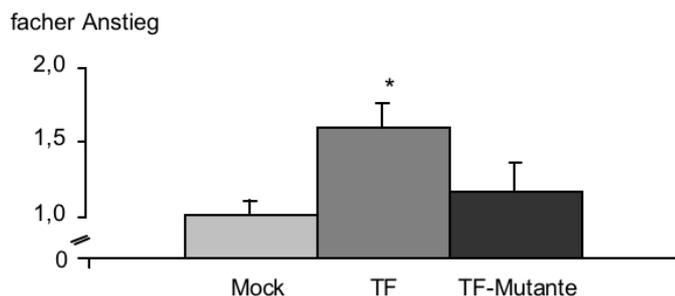
Um die Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne bei der p38 Aktivierung zu zeigen, wurden Huvec-Zellen transient mit einem Leervektor, einer TF-Mutante und einem TF-Wildtyp transfiziert. Huvec-Zellen exprimieren konstitutiv fast keinen TF. Verwendet wurde der Leervektor pEGFP-C1 (Mock), der Wildtyp von TF pEGFP-TF (TF) und die TF-Mutante ohne die zytoplasmatische Domäne pEGFP-TF 1-218 (TF Mutante). Die Transfektionseffizienzen waren nahezu gleich und lagen bei ca. 30% (Abbildung 13 und 14). Stimuliert wurde mit FFR-FVIIa (500nM). Die in vitro Kinasen Aktivität von p38 wurde durch die TF-Mutante ohne zytoplasmatische Domäne aufgehoben (Abbildung 15). Beim Wildtyp ergab sich eine Steigerung um das 1,6-fache. Die Hemmung ist hoch signifikant. Die fehlende Aktivierung mit dem Leervektor bestätigt nochmals die Abhängigkeit dieses Effektes von TF. Die Abbildung 16 zeigt einen exemplarischen Western Blot.



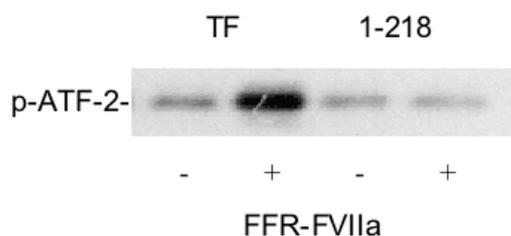
**Abbildung 13:** Expression des GFP-TF Wildtyps in Huvec Endothelzellen nach transienter Transfektion mit dem Plasmid



**Abbildung 14:** Expression der GFP-TF Mutante in Huvec Endothelzellen nach transienter Transfektion mit dem Plasmid



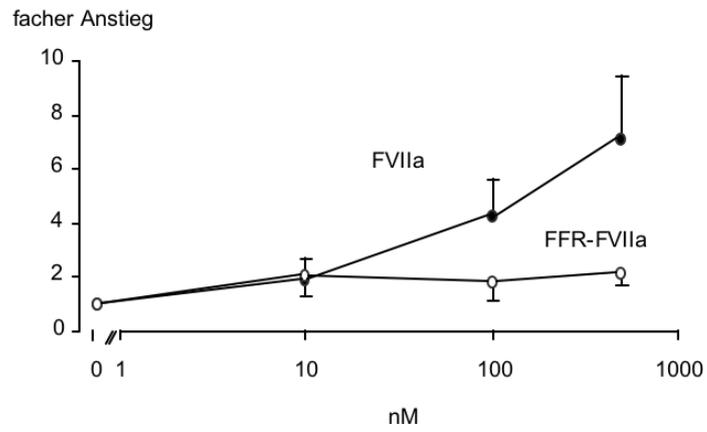
**Abbildung 15:** Die TF-Mutante ohne zytoplasmatische Domäne verhindert die Aktivierung der MAPK p38 durch Stimulation mit FFR-FVIIa (500nM) in Huvec Endothelzellen.



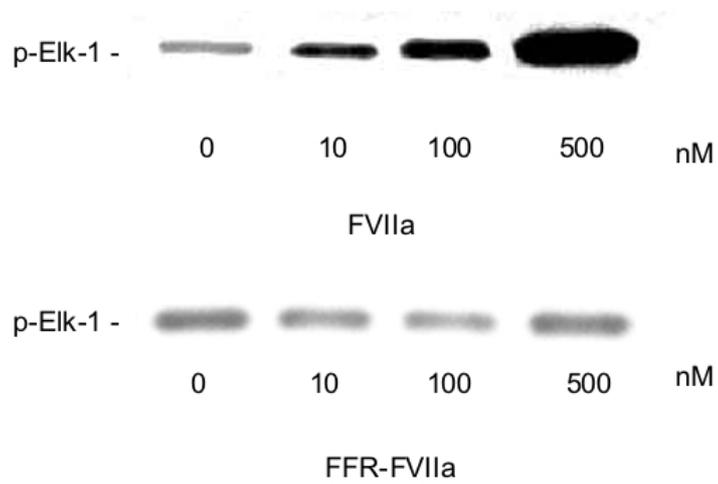
**Abbildung 16:** Exemplarischer Western Blot der Hemmung der MAPK p38 Aktivierung in Huvec Endothelzellen nach Transfektion mit der TF-Mutante ohne zytoplasmatische Domäne (1-218)

### 5.3 Tissue Factor-induzierte Aktivierung der MAPK p42/44

Die in vitro Kinasen Aktivität von p42/44 in J82 wird durch die Stimulation mit proteolytisch aktivem FVIIa erhöht (Abbildung 17). Die Aktivierung ist dosisabhängig. Es wurde FVIIa in den Konzentrationen 0, 10, 100 und 500 nM verwendet. Die Stimulationzeit betrug 8 Minuten. Dabei kommt es bei 500 nM zu einer Steigerung um das 7-fache im Vergleich zur Kontrolle. Mit FFR-FVIIa ist im Gegensatz dazu eine vernachlässigbare Steigerung zu verzeichnen. Für die Aktivierung von p42/44 ist somit die proteolytische Aktivität von FVIIa von Bedeutung. Die Abbildung 18 zeigt einen exemplarischen Western Blot.



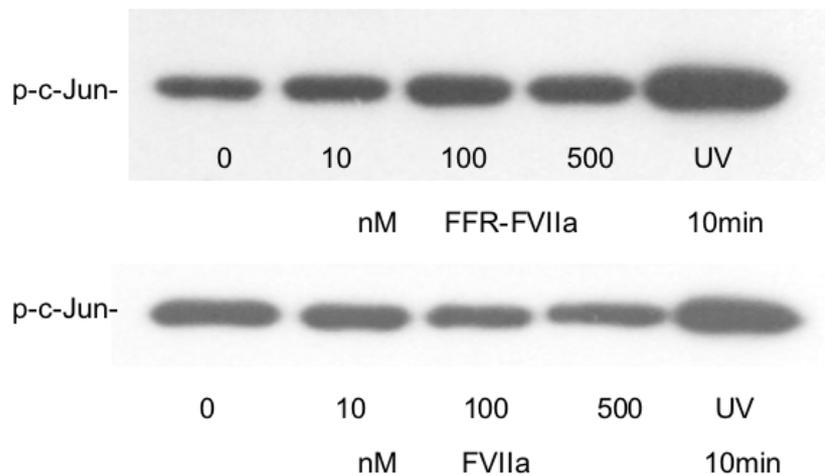
**Abbildung 17:** Dosisabhängige Aktivierung der MAPK p42/44 durch FVIIa in J82 Blasenkarzinomzellen



**Abbildung 18:** Exemplarischer Western Blot der MAPK p42/44 Aktivierung in J82 Blasenkarzinomzellen

## 5.4 Aktivierung der MAPK JNK

Die in vitro Kinasen Aktivität von JNK wird in J82 Blasenkarzinomzellen weder durch FVIIa (500 nM) noch durch FFR-FVIIa (500 nM) gesteigert. Als Positivkontrolle diente eine 10 Minuten lange Bestrahlung der Zellen mit einer UVB-Lampe (Wellenlänge  $\lambda = 310$  nm). Abbildung 19 zeigt einen exemplarischen Western Blot. Der Anstieg nach UVB-Bestrahlung ist deutlich zu sehen.



**Abbildung 19:** Keine Aktivierung der MAPK JNK in J82 Blasenkarzinomzellen durch Stimulation mit FVIIa und FFR-FVIIa. Als Positivkontrolle diente eine UV-Lichtbestrahlung von 10 Minuten.

## 6. Diskussion

Die Funktion von TF in biologischen Prozessen scheint sowohl durch die proteolytische Aktivität von FVIIa als auch durch die zytoplasmatische Domäne von TF bedingt zu sein. Die Einzelheiten der beiden Mechanismen sind nicht geklärt. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass es durch die Bindung von FVIIa an TF in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne von TF zu einer Aktivierung der MAPK p38 kommt. Diese Aktivierung ist unabhängig von der proteolytischen Aktivität von FVIIa.

### 6.1 Signaltransduktion in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne von Tissue Factor

Die Ergebnisse zeigen, dass es bei der Bindung von FVIIa und FFR-FVIIa an TF zu einer Phosphorylierung der MAPK p38 kommt. Dieser Effekt ist spezifisch für TF. Der TF-Antikörper 6B4 blockte die p38 Phosphorylierung. Durch die Verwendung des proteolytisch inaktiven FVIIa (FFR-FVIIa) konnten proteolytische PAR- (protease-activated receptor) vermittelte Effekte ausgeschlossen werden. Entscheidend für die TF-vermittelte Signalübertragung war die zytoplasmatische Domäne von TF. Nach Transfektion von Huvec-Zellen mit TF-Wildtyp (pEGFP-TF) ließ sich durch Stimulation mit FFR-FVIIa eine signifikante p38 Aktivierung induzieren. Dagegen war der Effekt in Huvec-Zellen, die mit einer TF-Mutante (pEGFP-TF 1-218) ohne zytoplasmatische Domäne transfiziert wurden, nicht zu beobachten. Die p38 Phosphorylierung ist somit abhängig von der zytoplasmatische Domäne von TF.

Die p38 Aktivierung ist ein direktes TF-Signaling. PAR-vermittelte Effekte wurden durch die Verwendung von FFR-FVIIa ausgeschlossen. Die Signalübertragung ist damit von den vielfach untersuchten proteolytischen Effekten zu trennen. Die TF-vermittelte Phosphorylierung von p38 durch Bindung von FVIIa und speziell FFR-FVIIa an TF konnte in J82-Blasenkarzinomzellen, Huvec-Endothelzellen und glatten Muskelzellen (SMCs) nachgewiesen werden. Huvec-Zellen exprimieren konstitutiv PAR-2. SMCs in Kultur exprimieren PAR-2 und in geringen Mengen TF. Die J82 Blasenkarzinomzellen zeigen keine mRNA Expression von PAR-2. Gemessen wurde dies mittels PCR.

Die proteolytische Fähigkeit von FVIIa hat bei diesem Signalweg keine wesentliche Bedeutung. Die Steigerung der Phosphorylierung nach Stimulation mit FVIIa oder FFR-FVIIa war trotz des unterschiedlichen Expressionsmusters von PAR-2 in allen drei Zelllinien so gut wie gleich.

Mit diesen Versuchen wird erstmalig die p38 Phosphorylierung in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne von TF durch Stimulation mit proteolytisch inaktiven FVIIa gezeigt.

Die Phosphorylierung von p38 durch Stimulation mit FVIIa konnten dagegen auch schon andere Gruppen in HaCaT-Zellen (menschliche Keratinozytenzelllinie) (10 min, 50 nM) (Camerer et al., 1999) und A14-Zellen (Fibroblasten) (10 min, 10 µg/ml (~200 nM)) (Versteeg et al., 2000) zeigen. Die Ergebnisse von Versteeg et al., 2000 sind mittlerweile aber größtenteils widerrufen (42<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, 2000). Sie beruhen wohl auf Spuren von Thrombin. Ob die Phosphorylierung PAR- oder TF-vermittelt war, blieb bei beiden Versuchsreihen allerdings offen.

Speziell PAR-2 kann unter den bekannten PARs durch den TF/FVIIa Komplex aktiviert werden (Camerer et al., 2000; Riewald und Ruf, 2001). Die Bedeutung einer PAR-2-vermittelten Phosphorylierung von p38 durch die Bindung von FVIIa kann nach der aktuellen Datenlage aber wohl ausgeschlossen werden. Versuche mit bekannten PAR-2 Stimulanzien wie Trypsin (30 nM) und PAR-2 Peptid (SLIGRL 300 µM) an RASMC-Zellen (rat aortic smooth muscle cell) und BPAF-Zellen (bovine pulmonary arterial fibroblast) (Belham et al., 1996) und PAR-2 Peptid an Kardiomyozyten (SLIGRL 300 µM) (Sabri et al., 2000), zeigten einen vergleichsweise vernachlässigbaren Effekt.

Keine p38 Phosphorylierung durch FVIIa (100 nM, 15 min) konnte in Versuchen mit BHK<sup>TF</sup>-Zellen (stabile TF-transfected baby hamster kidney cells) beobachtet werden (Poulsen et al., 1998). Eine Zellspezifität kann aber nicht ausgeschlossen werden. Genaue Daten von diesen Versuchen sind allerdings nicht veröffentlicht.

Die Stimulation der p38 Phosphorylierung in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne war zeitabhängig. Das Optimum lag bei sieben Minuten. Langzeiteffekte wie eine geänderte Expression von TF (Wilcox et al., 1989; Schechter et al., 1997) oder die Freisetzung von FVIIa (Langer et al., 1999; Wilcox et al., 2003) können mit Stimulationzeiten bei den Versuchen im Minutenbereich ausgeschlossen werden. Andere Gruppen maßen die p38 Aktivierung nach 10 Minuten (Camerer et al., 1999) bzw. stellten einen Effekt ab 10 Minuten bis zu 40 Minuten fest (Versteeg et al., 2000). Im Vergleich liegt das Zeitmaximum für andere Stimulanzien einer p38 Aktivierung wie IL-1, TNF und PDGF-BB bei 10 Minuten. Die Aktivierung ist messbar zwischen 5 und 30 Minuten (Matsumoto et al., 1999; Surapisitchat et al., 2001).

Die zeitliche Abhängigkeit lässt ein gegenteiliges Ergebnis der p38 Phosphorylierung durch Stimulation mit proteolytisch inaktivem FVIIa (Camerer et al., 1999) erklären. In HaCaT-Zellen blockte eine zweistündige Präinkubation mit FVIIai (proteolytisch inaktiver FVIIa) den Effekt von FVIIa. Dies dürfte durch die FVIIai Blockierung des TF-Rezeptors für FVIIa bedingt sein. Das Recycling von TF/FFR-FVIIa dauert ca. 30 Minuten. Die Recyclingrate von TF/FFR-FVIIa ist höher als die für TF/FVIIa. Die Recyclingrate beträgt zwar auch nur 25-30%, der recycelte Komplex ist aber für 60-65% der proteolytischen

Aktivität verantwortlich (Hansen et al., 2001). Die entscheidenden TF-Rezeptoren dürften also besetzt bleiben. Eine aktuelle Studie bestätigt diese Vermutung einer langen Bindung von FVIIa (Cirillo et al., 2003). Damit ist eine erneute Aktivierung nicht mehr möglich. Die durch FVIIa ausgelöste p38 Phosphorylierung ist nach zwei Stunden nicht mehr messbar. Des Weiteren war die Stimulation der p38 Phosphorylierung in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne dosisabhängig (FVIIa und FFR-FVIIa 10-500 nM). Ein Sättigungseffekt war bei 500 nM zu beobachten.

Auch andere Autoren verwendeten die hohen Dosen bei ihren Versuchen zur MAPKs Aktivierung: 50 nM (Camerer et al., 1999), 100 nM (Versteeg et al., 2000), 100 nM (Sorensen et al., 1999) und 100-400 nM (Poulsen et al., 1998) FVIIa.

Bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $K_d$ ) von FVIIa für TF gibt es unter den Versuchsgruppen große Unterschiede:  $K_d$  von 314 pM (Fair und MacDonald, 1987),  $K_d$  von 123 pM (Ploplis et al., 1987),  $K_d$  von 3,25 nM (Sakai et al., 1989),  $K_d$  von 7,3 pM (bei 25°C) (Waxman et al., 1992),  $K_d$  von 1,6 nM (Le et al., 1992), und  $K_d$  von 2,0 nM (hochaffine Bindungsstellen) und 12 nM (niedrigaffine Bindungsstellen) gegenüber 2,7 nM bei FFR-FVIIa (beide Bindungsstellen) (Sorensen und Rao, 1998). Lehrbücher geben einen Bereich an für FVIIa von 80 pM-2 nM (Broze, 1998) bzw. 90 pM-3 nM (Nemerson, 1994). Ein für alle Zelllinien und Versuchsbedingungen zutreffender  $K_d$  lässt sich wohl schwer ermitteln. Versuche einer Gruppe zeigten schon den Unterschied bei der  $K_d$  für löslichen und gebundenen TF (Waxman et al., 1992).

Die Expressionsdichte von TF ist von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich. TF wird konstitutiv von perivaskulären und extravaskulären Zellen exprimiert. Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und glatte Muskelzellen exprimieren TF dagegen nur nach Stimulation (Drake et al., 1989; Wilcox et al., 1989; Fleck et al., 1990). Eine Vielzahl von Stimuli kann eine TF-Expression hervorrufen (Drake et al., 1989; Schechter et al., 1997).

Die TF-Expression wird auch in einem Zellverband nicht überall gleich sein. So ist die TF-Expression in einem atherosklerotischen Plaque um ein Vielfaches höher (Wilcox et al., 1989; Marmur et al., 1996). Auch nach einer Angioplastie kommt es zu einer vermehrten Expression von TF im betroffenen Gefäßbett (Marmur et al., 1993).

Die Regulation der auf der Zellmembran bestehenden TF/VIIa Komplexe beeinflusst die Expressionsdichte und die proteolytische Aktivität von TF. Zwei Mechanismen der Endozytose von TF/FVIIa Komplexen werden für die Regulation verantwortlich gemacht. Der erste soll durch TFPI (tissue factor pathway inhibitor) über eine LRP-(low-density lipoprotein receptor-related protein) abhängige Internalisation und Degradation durch Clathrin-ummantelte Einstülpungen eine dauerhafte Herunterregulation hervorrufen. Die Versuche wurden an Monozyten durchgeführt (Hamik et al., 1999). Der zweite Mechanismus soll in der Abwesenheit eines Inhibitors durch LRP-unabhängige und nicht

Clathrin-ummantelte Einstülpungen verursacht sein. Als Zelllinie wurden BHK<sup>TF</sup>-Zellen verwendet (Hansen et al., 2001). Beide Wege der Endozytose wurden in Fibroblasten beschrieben (Iakhiaev et al., 1999). In beiden Mechanismen wird ein Teil recycelt und ist wieder an der Zellmembran nachweisbar. Die Recyclingrate ist im letzten Fall größer (Hansen et al., 2001).

Daneben beeinflussen umgebende Strukturen die TF-Aktivität. So sind Zellmembranphospholipide für die proteolytische Aktivität von TF von Bedeutung (Bach et al., 1986; Bach und Rifkin, 1990; Krishnaswamy et al., 1992; Le et al., 1994; Carson, 1996).

Geichzeitig wird die TF-Aktivität durch seinen natürlichen Inhibitor TFPI-1 (tissue factor pathway inhibitor-1) reguliert. GPI-(Glycosyl phosphatidylinositol) verankerter endogener TFPI-1 führte den TF/VIIa Komplex in glykosphingolipidreiche, durch Detergenzien unlösliche Membranareale (Sevinsky et al., 1996). Dies bewirkte eine reversible Herunterregulierung der proteolytischen Aktivität von TF (Ott et al., 2000). Eine Überexpression von GPI-verankertem TFPI-1 inhibiert die TF-Aktivität (Ott et al., 2003).

Die Expression und Verteilung von TFPI ist damit eine weitere Einflußgröße. Das Expression- und Verteilungsmuster ist zellspezifisch (Bajaj et al., 1999).

Auch TF selbst soll durch die Vorlage in Dimeren und Monomeren seine Aktivität beeinflussen (Donate et al., 2000). Die Dimerisation beschleunigt die Autoaktivierung von FVII.

Die TF/VIIa Komplexe liegen in funktionell aktiver (proteolytisch aktiv) und inaktiver Form vor. Die Höhe der TF-Antikörper Bindung korreliert nicht mit der proteolytischen Aktivität. Die Bindungssättigung sagt daher nichts über die proteolytische Aktivität des TF/VIIa Komplexes aus. Für die proteolytische Aktivität ist entscheidend in welcher Form der TF/VIIa Komplex vorliegt (Ploplis et al., 1987; Le et al., 1992).

In einer Studie zur Untersuchung der K<sub>d</sub> von FVIIa und FFR-FVIIa für TF fanden sich zwei unterschiedliche Werte für FVIIa (Sorensen und Rao, 1998). Der Wert von 2,0 nM galt für hochaffine Bindungsstellen, der Wert von 12,0 nM für niedrigaffine. Die Autoren übertrugen dies auf die Theorie eines funktionell aktiven TF und funktionell inaktiven TF. Danach könnten die hochaffinen Bindungsstellen dem funktionell aktiven TF und die niedrigaffinen dem funktionell inaktiven TF entsprechen. FFR-FVIIa bindet nach der Theorie mit der gleichen K<sub>d</sub> an beide Formen (Sorensen und Rao, 1998).

Die Aktivität des TF/FVIIa Komplexes wurde immer für proteolytische Effekte untersucht. Eine Bestimmung der Aktivität für nichtproteolytische Effekte liegt nicht vor. Vielleicht sind diese inaktiven TF/VIIa Komplexe signalkompetent. Sie repräsentierten folglich einen alternativen Mechanismus, der unabhängig von Xa operiert (Riewald und Ruf, 2002). Damit wären diese TF/FVIIa Komplexe doch „funktionell aktiv“. Vielleicht ist es also nicht

richtig, den Begriff „funktionell aktiv“ nur an der proteolytischen Aktivität festzumachen. Womöglich ist der nichtproteolytische Effekt über die Besetzung der proteolytisch inaktiven Komplexe steigerbar. Ob die nichtproteolytische Aktivität des TF/FVIIa Komplexes synchron zur proteolytischen Aktivität reguliert wird, ist ebenfalls nicht untersucht. Die Regulation nichthämostatischer Funktionen von TF über nichtproteolytische Mechanismen war nicht bekannt.

Neben den vorliegenden Versuchen eines TF-Signalweges in Abhängigkeit von seiner zytoplasmatischen Domäne sind auch einige andere von der zytoplasmatischen Domäne von TF-abhängige Effekte bekannt. Durch Stimulation von stabil TF-transfizierten menschlichen Nierenzellen 293 mit PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) kam es zur Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF. Die Phosphorylierung an einem Serinrest war abhängig von der PKC (Proteinkinase C) (Zioncheck et al., 1992). Auch bei der Inkubation von TF mit Zelllysaten von Glioblastomzellen kam es zu einer Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF. Bei den Versuchen konnte eine Mehrfachphosphorylierung beobachtet werden. Als Phosphorylierungsstelle wurde nur Serin 253 direkt identifiziert. Die Phosphorylierung war in diesen Versuchen unabhängig von der PKC (Mody und Carson, 1997). Der physiologische Ligand bedürfte allerdings noch der Klärung. Effekte der Phosphorylierung konnten nicht aufgezeigt werden.

Der eigentliche Auslöser der Phosphorylierung blieb auch bei Versuchen mit malignen Melanomzellen ungeklärt. Die VEGF Produktion und die Angiogenese wird in malignen Melanomzellen ebenfalls über die zytoplasmatische Domäne von TF reguliert. Antagonisten von PKC (Proteinkinase C) inhibierten die VEGF Produktion. Daraus lässt sich folgern, dass PKC an einer möglichen Regulation über die zytoplasmatische Domäne im Sinne einer Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne beteiligt ist. Die Bindung von FVIIa an TF war nicht nötig (Abe et al., 1999).

In Huvec-Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch PKC $\alpha$  am Serin 253 stattfindet. Die Phosphorylierung an Serin 253 beschleunigte die Phosphorylierung an Serin 258. Diese wiederum wurde zusätzlich negativ durch eine Palmitoylierung an Cystein 245 gesteuert. Die Phosphorylierung findet an der Zelloberfläche statt. Stimuliert wurde mit PMA (Dorfleutner und Ruf, 2003). Diese Versuche klären einzelne Schritte der Phosphorylierung, aber erneut nicht den physiologischen Auslöser.

Als physiologischen Auslöser der Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF wurde nun in TF-transfizierten Huvec-Zellen, CHO-Zellen und MDA-MB-231-Zellen der TF/FVIIa/FXa Komplex identifiziert. TF/FVIIa Komplex induzierte eine Phosphorylierung erst in Dosen von FVIIa ab 50 nM. PAR-2 aktivierte PKC $\alpha$  über PC-PLC und das aus der

Spaltung von PC resultierende DAG. Die Phosphorylierung war nach 5-10 Minuten nachweisbar (Ahamed und Ruf, 2004).

Die Bedeutung der Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF wird nach weiteren Untersuchungen in der Regulation der Angiogenese gesehen. Im *in vitro* und im Mausmodell hemmte TF-Wildtyp die Angiogenese, während die TF-Mutante ohne zytoplasmatische Domäne diese fördert. Die *in vitro* Versuche zeigten allerdings, dass bei Serumfreiheit eine alleinige Stimulation mit FVIIa nicht ausreichte. Die synergistische Wirkung von PDGF-BB war notwendig. Gleichzeitig fand sich bei diesen Versuchen eine Kolo-kalisation von phosphoryliertem TF und PAR-2 in pathologischen Prozessen wie einer fortgeschrittenen diabetischen Retinopathie. Daraus schloss die Gruppe, dass eine Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF dieser Deletion der zytoplasmatischen Domäne gleich kommt (Belting et al., 2004). Der Beweis für diese Hypothese steht aus. Der Effekt war, im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen der Gruppe in Huvec-Zellen, durch den TF/FVIIa Komplex vermittelt und unabhängig von FXa. Dieser Unterschied lässt die Übertragung der zuvor gewonnenen Ergebnisse fragwürdig erscheinen. Sicherlich ist auch das Vorhandensein von Korezeptor wie PAR-2 auf den unterschiedlichen Zelllinien für die Signalübertragung von Bedeutung. PAR-2 wird auf Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen, T-Zellen, Neutrophilen Granulozyten und vielen Tumorzelllinien exprimiert (Dery et al., 1998).

In malignen Melanomzellen konnte eine TF-vermittelte Metastasierung in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne gezeigt werden (Bromberg et al., 1995). Weitere Versuche zur Tumormetastasierung in CHO-Zellen und Melanomzellen ergaben die Kooperation von extrazellulärer und intrazellulärer Domäne. Die Mutation der zytoplasmatischen Phosphorylierungsstellen, Serin 253 und Serin 258, zu Alanin reduzierte den metastatischen Effekt (Mueller und Ruf, 1998; Bromberg et al., 1999). Die Versuche geben leider keinen Aufschluss über den Signalweg.

In Makrophagen hatte die Stimulation mit FVIIa (2,5 µg/ml (~ 50 nM)) eine intrazelluläre Calciumerhöhung nach 30 Sekunden und eine Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen nach Stunden zur Folge. Die intrazelluläre Calciumerhöhung war abhängig von der Bindung von FVIIa an TF und von der zytoplasmatischen Domäne von TF. TF-Antikörper und eine TF-Mutante ohne die zytoplasmatische Domäne verhinderten die Calciumerhöhung. Der Signalweg lief wahrscheinlich G-Protein-gekoppelt über die PLC (Phospholipase C). Ein weiterer Rezeptor neben TF konnte nicht ausgeschlossen werden (Cunningham et al., 1999).

Die mögliche Übertragung der Versuche auf den Mechanismus der PAR-2-abhängigen Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF ist aufgrund der zeitlichen Unterschiede nicht möglich. Die Calciumerhöhung in Monozyten war innerhalb von

Sekunden zu beobachten (Cunningham et al., 1999). Die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF in Huvec-Zellen lag im Minutenbereich (Ahamed und Ruf, 2004).

Versuche zur Klärung des zytoplasmatischen Signalings führten weiterhin zur Beobachtung der Bindung von ABP-280 (Aktin bindendes Protein-280) an die zytoplasmatische Domäne von TF und einer Aktivierung von FAK (fokale Adhäsionskinase) in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne von TF. Auslöser des Signalings war die extrazelluläre Ligation von TF. Die beiden Mechanismen beeinflussten die Zelladhäsion, die Zellausbreitung und die Zellmigration (Ott et al., 1998). Mit den hier dargestellten Ergebnissen wird die Aktivierung der MAPK p38 durch Bindung von FFR-FVIIa oder FVIIa an TF in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne von TF gezeigt. Die Versuche weisen erstmalig ein direktes TF-Signaling durch Bindung seines natürlichen Liganden nach, da die proteolytische Fähigkeit von FVIIa keine Rolle spielt. Die Versuche belegen somit, dass TF als transmembranöser Rezeptor selber Signale vermitteln kann.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse ist in den vielseitigen Verknüpfungen der MAPK p38 zu sehen. So reguliert p38 über die MAPKAP Kinase-2 (MAP kinase-activated protein kinase-2) und HSP 27 die Migration glatter Muskelzellen (Hedges et al., 1999).

Tierexperimentelle Versuche stützen die mögliche Beteiligung von p38 bei der Zellmigration. In zwei Studien kam es nach Ballonverletzung in Rattencarotiden bzw. Rattenfemoralfäßen zu einer deutlichen Aktivierung von p38 und einer folgenden p38-abhängigen Intimahyperplasie (Ohashi et al., 2000; Ju et al., 2002). Der Mechanismus ist nicht geklärt. Er könnte TF- und/oder PAR-2-vermittelt sein. Die Verletzung führt zur Freilegung von TF.

Die PAR-2-vermittelte Migration durch TF/VIIa Komplex (0,3 nM) in SMCs ist beschrieben (Marutsuka et al., 2002). Die Stimulation mit FVIIa reichte nicht aus (Sato et al., 1996; Sato et al., 1997). Die Bedeutung des zugegebenen TF ist fraglich. PAR-2 Peptid (SLIGKV 100 µM) führte zu derselben Migrationszunahme. Der Effekt war vergleichbar zur Stimulation mit PDGF-BB. Antiserum gegen PAR-2 Peptid (11,1 mg Protein/ml) hemmte den Effekt zu 70-80%. Ein weiterer Rezeptor muss bestehen, da eine Hemmung mit TFPI zum 100% tigen Block führte (Marutsuka et al., 2002).

Widersprüche zeigten sich auch bei Migrationsversuchen mit konstitutiv TF-exprimierenden MDA-MB-231 Brustkrebszellen. FVIIa (10-50 nM) stimulierte die Migration. Der Effekt war PAR-2- und IL-8-vermittelt. Allerdings hatte PAR-2-Peptid (SLIGKV 25 µM) nicht dieselbe chemotaktische Wirkung wie FVIIa. Die Verwendung eines PAR-2-Antikörpers (500 µg/ml) inhibierte die Migration vollständig (Hjortoe et al., 2004).

Die Lücken und Widersprüche in den beiden Versuchen einer PAR-2-vermittelten Migration könnten bereits auf die Mitbeteiligung von TF bei der Migration hinweisen.

Mit Migrationsassays konnte in unserer Gruppe erstmals die TF-vermittelte Migration auf Fibronectin durch Stimulation mit FFR-FVIIa gezeigt werden. Die Migration war abhängig von p38. Der p38 Inhibitor SB203580 und dominant negatives p38 (p38 D168A und p38 T180EY182E) hemmten die Migration signifikant (Ott et al., submitted).

Damit kann die Zellmotilität durch TF, neben der Interaktion der zytoplasmatischen Domäne TF mit ABP-280 und der Aktivierung von FAK (Ott et al., 1998), über p38 gesteigert werden.

SMCs und Fibroblasten synthetisieren in atherosklerotischen Gefäßen selbst FVIIa im erhöhtem Maße. Dies ergäbe die Möglichkeit einer autokrinen oder parakrinen Stimulation unabhängig von der proteolytischen Aktivität (Wilcox et al., 2003).

Für die Gewichtung des PAR-2- oder des TF-vermittelten Weges dürfte wieder das vorliegende Expressionmuster auf den jeweiligen Zellen entscheidend sein.

## **6.2 Signaltransduktion in Abhängigkeit von der proteolytischen Aktivität von Faktor VIIa**

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die bekannten Versuche einer Phosphorylierung von p42/44 in Abhängigkeit von der proteolytischen Aktivität von FVIIa (Poulsen et al., 1998; Sorensen et al., 1999). Die zytoplasmatische Domäne von TF hat keine Bedeutung (Sorensen et al., 1999). Die Verwendung von proteolytisch inaktivem Faktor VIIa (FFR-FVIIa) führte auch in den vorliegenden Versuchen zu keiner Phosphorylierung der MAPK p42/44. Der Signalweg von p42/44 unterscheidet sich damit wesentlich von dem der MAPK p38.

Für den Signalweg in Abhängigkeit von der proteolytischen Aktivität kommen mehrere mögliche Rezeptoren in Frage. Die Bindung des FVII an TF und dessen Umwandlung in den proteolytisch aktiven FVIIa hat die Aktivierung der Proteasen FXa und Thrombin zur Folge. FXa aktiviert PAR-1 und PAR-2 (Bono et al., 2000; Camerer et al., 2000; Riewald und Ruf, 2001). Thrombin aktiviert dagegen PAR-1, PAR-3 und PAR-4 (Dery et al., 1998; Coughlin, 2000).

FXa bewirkt in Konzentrationen im Picomolarbereich (50 pM) eine PAR-1- und PAR-2-vermittelte intrazelluläre Calciumerhöhung (Camerer et al., 2000).

Der Dreierkomplex FVIIa/TF/FXa führt in heterolog transfizierten CHO-Zellen und Huvec-Zellen zu einer effektiven p42/44 Aktivierung über PAR-1 und PAR-2 (Riewald und Ruf, 2001).

Dagegen kommt es nur über PAR-2 zu einer Phosphorylierung der zytosmatischen Domäne von TF durch den Dreierkomplex FVIIa/TF/FXa (Ahamed und Ruf, 2004).

Das Signal ist in diesen Fällen jedoch nicht TF/FVIIa-vermittelt. Viele Autoren schlossen diesen Weg als alleinigen Mechanismus durch die Verwendung von spezifischen Inhibitoren von FXa und Thrombin aus.

Der TF/FVIIa Komplex kann durch die proteolytische Aktivität von FVIIa auch selbst PAR-2 und womöglich andere Rezeptoren aktivieren.

In TF- und PAR-2-transfizierten *Xenopus* Oocyten, in TF- und PAR-2-transfizierten KOLF-Zellen (Lungenfibroblastenzelllinie der Maus) und HaCaT-Zellen (menschliche Keratinozytenzelllinie) konnte gezeigt werden, dass es PAR-2-vermittelt bei der Stimulation mit FVIIa zu einer intrazellulären Calciumerhöhung oder Phosphoinositol Hydrolyse kommt (Camerer et al., 2000). Der Effekt war TF-abhängig. TF diente als eine Art Dockingstation für FVIIa zur Aktivierung von PAR-2. Für die direkte Aktivierung von PAR-2 durch den TF/FVIIa Komplex wurden Konzentrationen im Nanomolarbereich (4nM) benötigt (Camerer et al., 2000).

In TF- und PAR-2-transfizierten CHO-Zellen (chinese hamster ovary cells) konnte ebenfalls eine PAR-2 Aktivierung durch den TF/FVIIa Komplex nachgewiesen werden. Als Indikator diente bei den Versuchen die p42/44 Aktivierung durch den TF/FVIIa Komplex (Riewald und Ruf, 2002).

In glatten Muskelzellen wurde eine verstärkte Zellmigration über PAR-2 durch Stimulation mit TF/FVIIa Komplex (TF/FVIIa 0,3 nM) beobachtet (Marutsuka et al., 2002). Problematisch ist allerdings der Spezifitätsnachweis von PAR-2 mit einem Antiserum. Das Antiserum hemmte den Effekt auch nur zu 70-80% (Marutsuka et al., 2002). Zusätzlich blieb unklar, warum die Stimulation mit FVIIa allein nicht ausreichte (Sato et al., 1997).

In MDA-MB-231 Brustkrebszellen führte die Stimulation mit FVIIa (5-50 nM) zu einer PAR-2-vermittelten Erhöhung der IL-8 mRNA Expression und Migration. Die Spezifität wurde mit einem spezifischen PAR-2-Antikörper nachgewiesen (Hjortoe et al., 2004). Spezifitätsnachweise mit Zellen ohne PAR-2-Expression liegen nicht vor. Die wirkliche Spezifität des PAR-2-Antikörpers ist nicht belegt.

Dagegen schlossen Versuche mit BHK<sup>TF</sup>- und MDCK-Zellen alle bis jetzt bekannten vier PARs bei der Phosphorylierung von p42/44 durch Stimulation mit FVIIa (100nM) aus (Petersen et al., 2000). Keines der PAR-Peptide für PAR-1 (SFLLRN), PAR-2 (SLIGRL), PAR-3 (TRFGAP) oder PAR-4 (GYPGQV oder GYPGKF) führte zu einer p42/44 Aktivierung. Allerdings konnte bei der Stimulation mit den PAR-Peptiden für PAR-1 und PAR-2 eine intrazellulären Calciumerhöhung beobachtet werden. Dies galt wiederum nicht für die Stimulation mit FVIIa. Desensitivierungsversuche bestätigten diese Ergebnisse. Eine Vorstimulation mit FVIIa hatte keinen Einfluss auf die Höhe der

Calciumkonzentration durch Stimulation mit PAR-1 oder PAR-2 Peptid. Dagegen ließ die Vorstimulation mit PAR-1 oder PAR-2 Peptid die bekannte Erhöhung des intrazellulären Calciums durch Thrombin verschwinden. Der Autor vermutet aufgrund dieser Ergebnisse einen noch unbekanntem PAR (Petersen et al., 2000).

Die aktuellen Versuche deuten ebenfalls darauf hin. So konnten wir zeigen, dass J82-Zellen keinen PAR-2 exprimieren (Daten nicht veröffentlicht). Da es trotzdem zu einer Aktivierung von p42/44 kam, müssen wir diesen neuen PAR postulieren.

Nach den momentanen Ergebnissen ist es also nicht eindeutig geklärt, ob PAR-2 der wesentliche Rezeptor für die proteolytische p42/44 Aktivierung ist.

Die Freisetzung von wachstumsfaktorähnlichen Substanzen durch die Stimulation mit FVIIa ist ausgeschlossen worden. Mediumüberstände mit FVIIa stimulierter Zellen, aus denen der zugegebene FVIIa wieder entfernt wurde, führten zu keiner p42/44 Aktivierung (Petersen et al., 2000). Eine Neusynthese von Aktivatoren ist bei Effekten im Minutenbereich nicht möglich.

Die durch die proteolytische Aktivität von FVIIa hervorgerufenen Effekte sind nach der momentanen Datenlage den Zellzyklus beeinflussende proliferative und antiapoptotische Mechanismen. Die FVIIa Bindung an TF fördert dosisabhängig (25-100 nM) die Proliferation ( $H^3$ -Thymidin Inkorporation) glatter Muskelzellen. Die Proliferation ist p42/44 abhängig. Proteolytisch inaktiver FVIIa hat keinen proliferativen Effekt (Cirillo et al., 2004). Der Rezeptor blieb allerdings offen. In älteren Untersuchungen konnte eine PAR-2-vermittelte Proliferation (Zellzahl/well) in glatten Muskelzellen gezeigt werden (Bono et al., 1997). Womöglich ist PAR-2 in dem genannten Proliferationsversuch der Rezeptor. FXa wurde ausgeschlossen (Cirillo et al., 2004). Hier kam allerdings eine zweite Gruppe zu dem gegenteiligen Ergebnis. Sie zeigte, dass der proliferative Effekt FXa-vermittelt ist. Verwendet wurden embryonale Fibroblasten von TF-Wildtyp-, TF-defizienten- und TF-mutanten- (ohne zytoplasmatische Domäne) Mäusen (Herbert et al., 2001). Die Datenlage ist in Hinsicht auf den möglichen Rezeptor des Signalweges also unklar.

Mehrfach und genauer untersucht sind die antiapoptotischen Effekte. FVIIa reduziert in serumgestarvten BHK<sup>TF</sup>-Zellen die Caspase-3 Aktivierung, die Kernkondensation und die LDH Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Die reduzierte Caspase-3 Aktivität ist abhängig von PI3K. Die Verwendung eines PI3K Inhibitors hemmt ebenso die Akt Phosphorylierung. Der p42/44 Inhibitor hat einen wesentlich geringeren Einfluss auf Phosphorylierung von Akt. Die Caspase-3 Aktivität ist aber signifikant reduziert (Sorensen et al., 2003).

Ein vermehrtes Zellüberleben (MTT Assay) zeigte sich in serumgestarvten adhärennten BHK<sup>TF</sup>-Zellen. Der Effekt war in nicht adhärennten Zellen geringer. FVIIa führte zu einer

verlängerten Aktivierung von PKB und p42/44 in Zellen in Suspension (Versteeg et al., 2004). Diese war dagegen in adhärenen Zellen nur transient (Versteeg et al., 2002). Die Hemmung der Caspase-3 Aktivität war bei diesen Versuchen von PI3K und p42/44 abhängig. FVIIa regulierte erneut die Caspase-3 Aktivität herunter. Dies galt für adhärenen und Zellen in Suspension. Gleichzeitige Stimulation mit FXa führte zu einem vermehrten Zellüberleben. Die alleinige Stimulation mit FXa hatte aber keinen Effekt. Proteolytisch inaktiver FVIIa hemmte das durch FVIIa verstärkte Zellüberleben (Versteeg et al., 2004). Des weiteren kommt es durch FVIIa in serumgestarvten BHK<sup>TF</sup>-Zellen über Jak2/STAT5 auch zu einem vermehrten Zellüberleben (MTT Assay). Die STAT5 Phosphorylierung ist G<sub>12</sub>/G<sub>13</sub>-abhängig. Die zytoplasmatische Domäne spielt keine Rolle bei der STAT5 Phosphorylierung. STAT5 wird in den Kern transloziert. Die STAT5 Phosphorylierung ist Jak2-vermittelt. Über Jak2 wird auch PKB aktiviert. FVIIa induziert auf dem Jak2/STAT5 Weg die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl<sub>xL</sub> (Versteeg et al., 2004). Der Jak/STAT Weg wurde erstmals bei der Signalübertragung von Zytokinrezeptoren untersucht. Die STAT (signal transducer and activator of transcription) Proteine sind eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die über eine SH2 Domäne direkt an den aktivierten Rezeptor binden. Hier werden die STAT Proteine durch Mitglieder der Jak Familie phosphoryliert. Dies führt zu einer Dimerisation von STAT Proteinen und Translokation in den Kern. Im Kern kommt es zur Aktivierung der Transkription von ihren Zielgenen (Cooper, 2000b).

Der Rezeptor jener untersuchten Signalwege eines antiapoptotischen Mechanismus von FVIIa konnte bei den Versuchen nicht geklärt werden. Diskutiert wurde der PAR-2.

Damit lassen sich für die TF-Signaltransduktion in Abhängigkeit von der proteolytischen Aktivität von FVIIa keine eindeutigen Wege beschreiben. Der Rezeptor bleibt umstritten.

Die Bedeutung der möglichen Wege hängt auch hier von der Rezeptorexpression der einzelnen Zelle ab. Eine Zellspezifität ist sicherlich gegeben.

Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass es durch Stimulation mit FVIIa und FFR-FVIIa zu keiner Aktivierung der MAPK JNK in J82-Zellen kommt. Die Positivkontrolle mit UV-Licht führte dagegen zu einer deutlichen Phosphorylierung. JNK scheint gegenüber den beiden anderen MAPKs nach den aktuellen Ergebnissen keine Rolle bei der Signalübertragung von TF zu spielen. In BHK<sup>TF</sup>-Zellen kam eine andere Gruppe zu demselben Ergebnis. Die Stimulation mit FVIIa (100 nM) führte zu keiner Aktivierung der MAPK JNK (Poulsen et al., 1998).

In HaCaT-Zellen wurde dagegen eine Phosphorylierung der MAPK JNK durch Stimulation mit FVIIa (50 nM) beobachtet (Camerer et al., 1999). Gleiches galt auch für die

Stimulation von glatten Muskelzellen mit FVIIa (Cirillo et al., 2004). Der Rezeptor wurde in beiden Versuchen nicht aufgeklärt.

Den möglichen Signalweg über den PAR-2 schlossen andere Gruppen in Versuchen mit RASMC-Zellen, BPAF-Zellen und Kardiomyozyten aus (Belham et al., 1996; Sabri et al., 2000). Es kam zu keiner Aktivierung von JNK über den PAR-2.

Die Möglichkeit der Zellspezifität oder eines unbekanntes PARs bleibt bestehen.

Die jetzigen Ergebnisse sprechen gegen einen TF-vermittelten Signalweg über JNK in Blasenkarzinomzellen.

### **6.3 Ausblick**

Die Bindung von FVIIa an TF führt nach den vorliegenden Ergebnissen unabhängig von der proteolytischen Aktivität aber in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne von TF zu einer Phosphorylierung der MAPK p38. p38 beeinflusst über die MAPKAP Kinase-2 und HSP 27 die Migration glatter Muskelzellen (Hedges et al., 1999). Damit kann TF über diesen Weg die Migration fördern. So kommt es durch Stimulation mit FFR-FVIIa in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne von TF zu einer Steigerung der Migration auf Fibronectin (Ott et al., submitted). Die Migration war abhängig von der MAPK p38.

In atherosklerotischen Läsionen (Taubman et al., 1997) und nach interventionellen Eingriffen wie Angioplastie und Stentimplantation (Marmur et al., 1996) ist die TF-Expression glatter Muskelzellen erhöht. Über den Kontakt des mit dem Blut zirkulierenden FVIIa oder auch mit endogen produziertem FVIIa in atherosklerotischen Läsionen (Wilcox et al., 2003) kann es zu einer verstärkten TF-vermittelten Migration glatter Muskelzellen kommen. Die beschriebene TF-vermittelte Migration könnte damit zum Gefäßumbau und der Neointimabildung beitragen.

Die Unterbrechung des beschriebenen Signalweges ergäbe neue therapeutische Möglichkeiten. Erste Hinweise bestehen. So führte die Hemmung von p38 in Tierexperimenten zu einer deutlichen Verminderung der Intimahyperplasie (Ju et al., 2002).

Daneben exprimieren Endothelzellen nach Stimulation vermehrt TF (Drake et al., 1989; Wilcox et al., 1989; Fleck et al., 1990). Die Steigerung der Endothelzellmigration trägt entscheidend zur Förderung der Angiogenese bei.

Die Arbeit zeigt einen grundlegenden Mechanismus des proangiogenetischen Effektes von TF. Erste Untersuchungen unserer Gruppe weisen darauf hin, dass FFR-FVIIa die Angiogenese fördert. FFR-FVIIa hemmt darüber hinaus auch effektiv die Blutgerinnung (Golino et al., 2000; Cirillo et al., 2003; Sorensen et al., 2003). Bei der Verwendung von

FFR-FVIIa zur Therapie ließe sich womöglich diese proangiogenetische Wirkung mit der antikoagulatorischen Wirkung kombinieren.

Praktische Relevanz hätte dieser Effekt bei Erkrankungen wie der peripher arteriellen Verschlusskrankheit und der koronaren Herzkrankheit. Die Angiogenese wäre hier neben der Antikoagulation erwünscht.

## 7. Zusammenfassung

Der Tissue Factor spielt neben der Aktivierung der Gerinnungskaskade eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, der Tumormetastasierung, der Entzündung, der Zelladhäsion und der Zellmigration. Die Signalwege und Mechanismen sind jedoch weitgehend unerforscht. Eine Gruppe von Kinasen, die sog. Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), ist bekanntlich bei vielen Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der MAPKs p38, p42/44 und JNK bei der Signalübertragung durch FVIIa untersucht. Die Aktivierung der MAPKs wurde mit einem *in vitro* Kinasen Assay bestimmt. Dabei zeigte sich eine durch TF-Ligandeninteraktion induzierte Aktivierung von p38 in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne aber unabhängig von der proteolytischen Aktivität von FVIIa. Die Phosphorylierung von p38 war zeit- und dosisabhängig. Neben der Interaktion der zytoplasmatischen Domäne mit ABP-280 und der Phosphorylierung von FAK könnte TF damit über die Aktivierung von p38 die Zellmotilität beeinflussen. Proteolytisch inaktiver FVIIa (FFR-FVIIa) steigert die Migration in Abhängigkeit von der p38 Aktivierung.

Zur Aktivierung der MAPK p42/44 kommt es dagegen nur durch die Stimulation mit proteolytisch aktiven FVIIa. Die zytoplasmatische Domäne hat dabei keine Bedeutung. Protease-aktivierte-Rezeptoren könnten ursächlich an dem Mechanismus beteiligt sein.

Weder die Stimulation mit FFR-FVIIa noch die mit FVIIa führten zu einer Phosphorylierung der MAPK JNK. JNK hat also keine Bedeutung bei der Signalübertragung von TF.

Die Ergebnisse zeigen somit zwei verschiedene Signalwege. Erstens wird die MAPK p38 Aktivität durch einen von der zytoplasmatischen Domäne von TF abhängigen aber von der proteolytischen Aktivität von FVIIa unabhängigen Weg gesteigert. Zweitens wird die MAPK p42/44 Aktivität durch einen von der proteolytisch Aktivität von FVIIa abhängigen aber von der zytoplasmatischen Domäne von TF unabhängigen Weg erhöht.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

A14-Zellen (Fibroblasten)  
ABP-280 (Aktin bindendes Protein-280)  
Aminosäuren (AS)  
AP-1 (Activator protein-1)  
ATF-2 (activating transcription factor-2)  
bFGF (basic fibroblast growth factor)  
BHK<sup>TF</sup>-Zellen (stable TF-transfected baby hamster kidney cells)  
Cdc42 (Cell division cycle protein 42)  
Cdk (Cyclin-dependent kinase)  
CHO-Zellen (chinese hamster ovary cells)  
c-myc (cellular homologue of avian myelocytomatosis virus oncogene)  
COS-1-Zellen (Nierenfibroblasten des Affens)  
CTGF (connective tissue growth factor)  
DAC (Diacylglycerol)  
eEF (eukaryotic elongation factor)  
EGFR (epidermal growth factor receptor)  
egr-1 (early growth response gene-1)  
eIF (eukaryotic initiation factor)  
Elk-1 (Ets domain protein 1)  
EMPs (endothelial microparticles)  
ERK 1/2 (extrazellulär signal-regulated kinases 1 und 2)  
ERK5 (extrazellulär signal-regulated kinase 5)  
FAK (fokale Adhäsionskinase)  
F-Aktin (filamentöses Aktin)  
FFR-FVIIa (proteolytisch inaktiver Faktor VIIa)  
FVIIa (Faktor VIIa)  
G-Aktin (globuläres Aktin)  
GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor)  
GPCR (G-Proteine-gekoppelte Rezeptoren)  
GPI (Glycosyl phosphatidyl inositol)  
Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2)  
HaCaT-Zellen (menschliche Keratinozytenzelllinie)  
hb-EGF (heparin binding epidermal growth factor)  
HK-2-Zellen (human kidney-2 cells)  
HSP 27 (Hitze Schock Protein 27)

Huvec-Zellen (human umbilical vein endothelial cells)  
ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)  
IL (Interleukin)  
IP<sub>3</sub> (Inositol 1,4,5-trisphosphat)  
J82-Zellen (Blasenkarzinomzellen)  
Jak2 (Janus kinase 2)  
JNK (Jun amino-terminal kinase)  
Kilobasenpaaren (kBP)  
KOLF-Zellen (Lungenfibroblasten der Maus)  
LDL (Low-density lipoproteins)  
LPS (Lipopolysaccharide)  
LRE (LPS Response Element)  
MAPKAP Kinase-2 (MAP kinase-activated protein kinase-2)  
MAPKKs (mitogen-activated protein kinases kinases kinases)  
MAPKKs (mitogen-activated protein kinases kinases)  
MAPKs (mitogen-activated protein kinases)  
MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1)  
MDA-MB-231-Zellen (Brustkrebszellen)  
MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney cells)  
MLK (mixed-lineage kinase)  
MT1-MMP (Membran-Typ 1 Matrix Metalloprotease)  
NF-κB (Nuclear Factor-kappa B)  
p70/p85, RSK (ribosomale S6 kinase)  
p90, S6K (S6 kinase)  
PAE-Zellen (porcine aortic endothelial cells)  
PAF (platelet-activating factor)  
PAI (Plasminogen Aktivator Inhibitor)  
PAP (Poly (A) Polymerase)  
PARs (Protease-aktivierte Rezeptoren)  
PC (Phosphatidylcholin)  
PDGF-BB (Plated-derived Growth Factor Isoform BB)  
PDGFR-β (PDGF Rezeptor-beta)  
PI-PLC (Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C)  
PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase)  
PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat)  
PKB (Proteinkinase B)  
PKC (Proteinkinase C)

PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat)  
ROS (reaktive oxygen species)  
RTK (Rezeptor-Tyrosinkinase)  
SAPK (stress-activated protein kinase )  
SMC-Zellen (smooth muscle cells)  
SOS (sun of sevenless)  
Sp1 (Specificity protein 1)  
Src (sarcoma-like kinases)  
SRE (serum response element)  
SRF (serum response factor)  
STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5)  
TF (Tissue Factor)  
TFPI-1 (tissue factor pathway inhibitor-1)  
TGF- $\beta$  (transforming growth factor beta)  
TNF- $\alpha$  (Tumornekrose Faktor-alpha)  
U937-Zellen (menschliche Monozytenzelllinie)  
uPAR (urokinase plaminogen activator receptor)  
VEGF (vascular endothelial growth factor)  
 $\beta$ Pix (PAK-interacting exchange factor)

## 9. Literaturverzeichnis

Abe, K., Shoji, M., Chen, J., Bierhaus, A., Danave, I., Micko, C., Casper, K., Dillehay, D. L., Nawroth, P. P., Rickles, F. R., Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96 (1999) 8663-8668

Ahamed, J., Ruf, W., Protease-activated Receptor 2-dependent Phosphorylation of the Tissue Factor Cytoplasmic Domain. *J Biol Chem.* 279 (2004) 23038-23044

Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K., Juliano, R. L., Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev.* 50 (1998) 197-263

Asada, Y., Marutsuka, K., Hatakeyama, K., Sato, Y., Hara, S., Kisanuki, A., Sumiyoshi, A., The role of tissue factor in the pathogenesis of thrombosis and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 4 (1998) 135-139

Bach, R., Gentry, R., Nemerson, Y., Factor VII binding to tissue factor in reconstituted phospholipid vesicles: induction of cooperativity by phosphatidylserine. *Biochemistry.* 25 (1986) 4007-4020

Bach, R., Rifkin, D. B., Expression of tissue factor procoagulant activity: regulation by cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87 (1990) 6995-6999

Bach, R. R., Moldow, C. F., Mechanism of tissue factor activation on HL-60 cells. *Blood.* 89 (1997) 3270-3276

Bajaj, M. S., Kuppaswamy, M. N., Manepalli, A. N., Bajaj, S. P., Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin and von Willebrand factor in normal human tissues. *Thromb Haemost.* 82 (1999) 1047-1052

Banner, D. W., The factor VIIa/tissue factor complex. *Thromb Haemost.* 78 (1997) 512-515

Banner, D. W., D'Arcy, A., Chene, C., Winkler, F. K., Guha, A., Konigsberg, W. H., Nemerson, Y., Kirchhofer, D., The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature.* 380 (1996) 41-46

Bazan, J. F., Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87 (1990) 6934-6938

Belham, C. M., Tate, R. J., Scott, P. H., Pemberton, A. D., Miller, H. R., Wadsworth, R. M., Gould, G. W., Plevin, R., Trypsin stimulates proteinase-activated receptor-2-dependent and -independent activation of mitogen-activated protein kinases. *Biochem J.* 320 ( Pt 3) (1996) 939-946

Belting, M., Dorrell, M. I., Sandgren, S., Aguilar, E., Ahamed, J., Dorfleutner, A., Carmeliet, P., Mueller, B. M., Friedlander, M., Ruf, W., Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med.* 10 (2004) 502-509

Bono, F., Lamarche, I., Herbert, J. M., Induction of vascular smooth muscle cell growth by selective activation of the proteinase activated receptor-2 (PAR-2). *Biochem Biophys Res Commun.* 241 (1997) 762-764

Bono, F., Schaeffer, P., Herault, J. P., Michaux, C., Nestor, A. L., Guillemot, J. C., Herbert, J. M., Factor Xa activates endothelial cells by a receptor cascade between EPR-1 and PAR-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20 (2000) E107-112

- Bromberg, M. E., Konigsberg, W. H., Madison, J. F., Pawashe, A., Garen, A., Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (1995) 8205-8209
- Bromberg, M. E., Sundaram, R., Homer, R. J., Garen, A., Konigsberg, W. H., Role of tissue factor in metastasis: functions of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule. *Thromb Haemost.* 82 (1999) 88-92
- Broze, G. J., Jr., The tissue factor pathway of coagulation. In: "Thrombosis and Hemorrhage", Loscalzo, J., Schafer, A. I. (Ed.), Blackwell Scientific Publications, Boston-Oxford-London-Edinburg-Melbourne-Paris-Berlin-Wien, 1998, second edition, 57-73
- Bugge, T. H., Xiao, Q., Kombrinck, K. W., Flick, M. J., Holmback, K., Danton, M. J., Colbert, M. C., Witte, D. P., Fujikawa, K., Davie, E. W., Degen, J. L., Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93 (1996) 6258-6263
- Camerer, E., Gjernes, E., Wiiger, M., Pringle, S., Prydz, H., Binding of factor VIIa to tissue factor on keratinocytes induces gene expression. *J Biol Chem.* 275 (2000) 6580-6585
- Camerer, E., Huang, W., Coughlin, S. R., Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97 (2000) 5255-5260
- Camerer, E., Kolsto, A. B., Prydz, H., Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res.* 81 (1996) 1-41
- Camerer, E., Pringle, S., Skartlien, A. H., Wiiger, M., Prydz, K., Kolsto, A. B., Prydz, H., Opposite sorting of tissue factor in human umbilical vein endothelial cells and Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Blood.* 88 (1996) 1339-1349
- Camerer, E., Rottingen, J. A., Gjernes, E., Larsen, K., Skartlien, A. H., Iversen, J. G., Prydz, H., Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the *egr-1* gene. *J Biol Chem.* 274 (1999) 32225-32233
- Camerer, E., Rottingen, J. A., Iversen, J. G., Prydz, H., Coagulation factors VII and X induce Ca<sup>2+</sup> oscillations in Madin-Darby canine kidney cells only when proteolytically active. *J Biol Chem.* 271 (1996) 29034-29042
- Carmeliet, P., Mackman, N., Moons, L., Luther, T., Gressens, P., Van Vlaenderen, I., Demunck, H., Kasper, M., Breier, G., Evrard, P., Muller, M., Risau, W., Edgington, T., Collen, D., Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature.* 383 (1996) 73-75
- Carson, S. D., Manifestation of cryptic fibroblast tissue factor occurs at detergent concentrations which dissolve the plasma membrane. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 7 (1996) 303-313
- Carson, S. D., Bromberg, M. E., Tissue factor encryption/de-encryption is not altered in the absence of the cytoplasmic domain. *Thromb Haemost.* 84 (2000) 657-663
- Chang, L., Karin, M., Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410 (2001) 37-40
- Cirillo, P., Cali, G., Golino, P., Calabro, P., Forte, L., De Rosa, S., Pacileo, M., Ragni, M., Scopacasa, F., Nitsch, L., Chiariello, M., Tissue factor binding of activated factor VII triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase activation. *Circulation.* 109 (2004) 2911-2916
- Cirillo, P., Golino, P., Ragni, M., D'Andrea, D., Calabro, P., Corcione, N., Vigorito, F., Ravera, M., Chiariello, M., Long-lasting antithrombotic effects of a single dose of human recombinant, active site-blocked factor VII: insights into possible mechanism(s) of action. *J Thromb Haemost.* 1 (2003) 992-998

- Cooper, G. M., The Cytoskeleton and Cell Movement. In: "The Cell, A Molecular Approach", Cooper, G. M. (Ed.), ASM Press, Washington, 2000a, second Edition, 421-465
- Cooper, G. M., Cell Signaling. In: "The Cell, A Molecular Approach ", Cooper, G. M. (Ed.), ASM Press, Washington, 2000b, second Edition, 523-570
- Cooper, G. M., The Cell Cycle. In: "The Cell, A Molecular Approach ", Cooper, G. M. (Ed.), ASM Press, Washington, 2000c, second Edition, 571-607
- Corseaux, D., Meurice, T., Six, I., Rugeri, L., Ezekowitz, M. D., Rouvier, P., Bordet, R., Bauters, C., Jude, B., Basic fibroblast growth factor increases tissue factor expression in circulating monocytes and in vascular wall. *Circulation*. 101 (2000) 2000-2006
- Coughlin, S. R., Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 407 (2000) 258-264
- Cunningham, M. A., Romas, P., Hutchinson, P., Holdsworth, S. R., Tipping, P. G., Tissue factor and factor VIIa receptor/ligand interactions induce proinflammatory effects in macrophages. *Blood*. 94 (1999) 3413-3420
- Czekay, R. P., Aertgeerts, K., Curriden, S. A., Loskutoff, D. J., Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *J Cell Biol*. 160 (2003) 781-791
- D'Andrea, D., Ravera, M., Golino, P., Rosica, A., De Felice, M., Ragni, M., Cirillo, P., Vigorito, F., Corcione, N., Tommasini, P., Gargiulo, A., Piro, O., Calabro, P., Chiariello, M., Induction of tissue factor in the arterial wall during recurrent thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23 (2003) 1684-1689
- Dery, O., Corvera, C. U., Steinhoff, M., Bunnett, N. W., Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol*. 274 (1998) C1429-1452
- Di Santo, A., Mezzetti, A., Napoleone, E., Di Tommaso, R., Donati, M. B., De Gaetano, G., Lorenzet, R., Resveratrol and quercetin down-regulate tissue factor expression by human stimulated vascular cells. *J Thromb Haemost*. 1 (2003) 1089-1095
- Dieckgraefe, B. K., Weems, D. M., Santoro, S. A., Alpers, D. H., ERK and p38 MAP kinase pathways are mediators of intestinal epithelial wound-induced signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 233 (1997) 389-394
- Donate, F., Kelly, C. R., Ruf, W., Edgington, T. S., Dimerization of tissue factor supports solution-phase autoactivation of factor VII without influencing proteolytic activation of factor X. *Biochemistry*. 39 (2000) 11467-11476
- Dorfleutner, A., Ruf, W., Regulation of tissue factor cytoplasmic domain phosphorylation by palmitoylation. *Blood* (2003)
- Drake, T. A., Morrissey, J. H., Edgington, T. S., Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol*. 134 (1989) 1087-1097
- Ernoffsson, M., Siegbahn, A., Platelet-derived growth factor-BB and monocyte chemotactic protein-1 induce human peripheral blood monocytes to express tissue factor. *Thromb Res*. 83 (1996) 307-320
- Fair, D. S., MacDonald, M. J., Cooperative interaction between factor VII and cell surface-expressed tissue factor. *J Biol Chem*. 262 (1987) 11692-11698
- Fleck, R. A., Rao, L. V., Rapaport, S. I., Varki, N., Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res*. 59 (1990) 421-437

Gerthoffer, W. T., Gunst, S. J., Invited review: focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *J Appl Physiol.* 91 (2001) 963-972

Golino, P., Ragni, M., Cirillo, P., Scognamiglio, A., Ravera, A., Buono, C., Guarino, A., Piro, O., Lambiase, C., Botticella, F., Ezban, M., Condorelli, M., Chiariello, M., Recombinant human, active site-blocked factor VIIa reduces infarct size and no-reflow phenomenon in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278 (2000) H1507-1516

Hamik, A., Setiadi, H., Bu, G., McEver, R. P., Morrissey, J. H., Down-regulation of monocyte tissue factor mediated by tissue factor pathway inhibitor and the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 274 (1999) 4962-4969

Hansen, C. B., Pyke, C., Petersen, L. C., Rao, L. V., Tissue factor-mediated endocytosis, recycling, and degradation of factor VIIa by a clathrin-independent mechanism not requiring the cytoplasmic domain of tissue factor. *Blood.* 97 (2001) 1712-1720

Hatakeyama, K., Asada, Y., Marutsuka, K., Sato, Y., Kamikubo, Y., Sumiyoshi, A., Localization and activity of tissue factor in human aortic atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis.* 133 (1997) 213-219

Hedges, J. C., Dechert, M. A., Yamboliev, I. A., Martin, J. L., Hickey, E., Weber, L. A., Gerthoffer, W. T., A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J Biol Chem.* 274 (1999) 24211-24219

Hembrough, T. A., Swartz, G. M., Papathanassiou, A., Vlasuk, G. P., Rote, W. E., Green, S. J., Pribluda, V. S., Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res.* 63 (2003) 2997-3000

Herbert, J. M., de Prost, D., Ollivier, V., Melis, E., Carmeliet, P., Tissue factor is not involved in the mitogenic activity of factor VIIa. *Biochem Biophys Res Commun.* 281 (2001) 1074-1077

Herlaar, E., Brown, Z., p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today.* 5 (1999) 439-447

Hjortoe, G. M., Petersen, L. C., Albrektsen, T., Sorensen, B. B., Norby, P. L., Mandal, S. K., Pendurthi, U. R., Rao, L. V., Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood.* 103 (2004) 3029-3037

Hooshmand-Rad, R., Claesson-Welsh, L., Wennstrom, S., Yokote, K., Siegbahn, A., Heldin, C. H., Involvement of phosphatidylinositide 3'-kinase and Rac in platelet-derived growth factor-induced actin reorganization and chemotaxis. *Exp Cell Res.* 234 (1997) 434-441

Iakhiaev, A., Pendurthi, U. R., Rao, L. V., Active site blockade of factor VIIa alters its intracellular distribution. *J Biol Chem.* 276 (2001) 45895-45901

Iakhiaev, A., Pendurthi, U. R., Voigt, J., Ezban, M., Vijaya Mohan Rao, L., Catabolism of factor VIIa bound to tissue factor in fibroblasts in the presence and absence of tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem.* 274 (1999) 36995-37003

Ichinose, A., Davie, E. W., The Blood Coagulation, Factors: Their cDNAs, Genes, and Expression. In: "Haemostasis and Thrombosis", Colman, R. W., Hirsh, J., Marder, V. J., Salzman, E. W. (Ed.), J.B.Lippincott Company, Philadelphia, 1994, third Edition, 19-44

Ishibashi, T., Sakamoto, T., Ohkawara, H., Nagata, K., Sugimoto, K., Sakurada, S., Sugimoto, N., Watanabe, A., Yokoyama, K., Sakamoto, N., Kurabayashi, M., Takuwa, Y., Maruyama, Y., Integral Role of RhoA Activation in Monocyte Adhesion-Triggered Tissue Factor Expression in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23 (2003) 681-687

- Ju, H., Nerurkar, S., Sauermelch, C. F., Olzinski, A. R., Mirabile, R., Zimmerman, D., Lee, J. C., Adams, J., Sisko, J., Berova, M., Willette, R. N., Sustained activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to the vascular response to injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 301 (2002) 15-20
- Krishnaswamy, S., Field, K. A., Edgington, T. S., Morrissey, J. H., Mann, K. G., Role of the membrane surface in the activation of human coagulation factor X. *J Biol Chem.* 267 (1992) 26110-26120
- Langer, F., Morys-Wortmann, C., Kusters, B., Storck, J., Endothelial protease-activated receptor-2 induces tissue factor expression and von Willebrand factor release. *Br J Haematol.* 105 (1999) 542-550
- Le, D. T., Rapaport, S. I., Rao, L. V., Relations between factor VIIa binding and expression of factor VIIa/tissue factor catalytic activity on cell surfaces. *J Biol Chem.* 267 (1992) 15447-15454
- Le, D. T., Rapaport, S. I., Rao, L. V., Studies of the mechanism for enhanced cell surface factor VIIa/tissue factor activation of factor X on fibroblast monolayers after their exposure to N-ethylmaleimide. *Thromb Haemost.* 72 (1994) 848-855
- Lee, S. H., Eom, M., Lee, S. J., Kim, S., Park, H. J., Park, D., BetaPix-enhanced p38 activation by Cdc42/Rac/PAK/MKK3/6-mediated pathway. Implication in the regulation of membrane ruffling. *J Biol Chem.* 276 (2001) 25066-25072
- Lesnik, P., Rouis, M., Skarlatos, S., Kruth, H. S., Chapman, M. J., Uptake of exogenous free cholesterol induces upregulation of tissue factor expression in human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (1992) 10370-10374
- Lindmark, E., Tenno, T., Siegbahn, A., Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20 (2000) 2322-2328
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. E., MAP Kinase Pathways. In: "Molecular Cell Biology", Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. E. (Ed.), WH. Freeman&Co, New York, 2000, fourth edition, 878-884
- Luther, T., Mackman, N., Tissue factor in the heart. Multiple roles in hemostasis, thrombosis, and inflammation. *Trends Cardiovasc Med.* 11 (2001) 307-312
- Mackman, N., Regulation of the tissue factor gene. *Faseb J.* 9 (1995) 883-889
- Mackman, N., Regulation of the tissue factor gene. *Thromb Haemost.* 78 (1997) 747-754
- Marmur, J. D., Rossikhina, M., Guha, A., Fyfe, B., Friedrich, V., Mendlowitz, M., Nemerson, Y., Taubman, M. B., Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. *J Clin Invest.* 91 (1993) 2253-2259
- Marmur, J. D., Thiruvikraman, S. V., Fyfe, B. S., Guha, A., Sharma, S. K., Ambrose, J. A., Fallon, J. T., Nemerson, Y., Taubman, M. B., Identification of active tissue factor in human coronary atheroma. *Circulation.* 94 (1996) 1226-1232
- Marshall, C., How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol.* 11 (1999) 732-736
- Marutsuka, K., Hatakeyama, K., Sato, Y., Yamashita, A., Sumiyoshi, A., Asada, Y., Protease-activated receptor 2 (PAR2) mediates vascular smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex. *Thromb Res.* 107 (2002) 271-276
- Masuda, M., Nakamura, S., Murakami, T., Komiyama, Y., Takahashi, H., Association of tissue factor with a gamma chain homodimer of the IgE receptor type I in cultured human monocytes. *Eur J Immunol.* 26 (1996) 2529-2532

- Matsumoto, T., Yokote, K., Tamura, K., Takemoto, M., Ueno, H., Saito, Y., Mori, S., Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J Biol Chem.* 274 (1999) 13954-13960
- Melis, E., Moons, L., De Mol, M., Herbert, J. M., Mackman, N., Collen, D., Carmeliet, P., Dewerchin, M., Targeted deletion of the cytosolic domain of tissue factor in mice does not affect development. *Biochem Biophys Res Commun.* 286 (2001) 580-586
- Mody, R. S., Carson, S. D., Tissue factor cytoplasmic domain peptide is multiply phosphorylated in vitro. *Biochemistry.* 36 (1997) 7869-7875
- Mueller, B. M., Reisfeld, R. A., Edgington, T. S., Ruf, W., Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89 (1992) 11832-11836
- Mueller, B. M., Ruf, W., Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest.* 101 (1998) 1372-1378
- Mulder, A. B., Smit, J. W., Bom, V. J., Blom, N. R., Ruiters, M. H., Halie, M. R., van der Meer, J., Association of smooth muscle cell tissue factor with caveolae. *Blood.* 88 (1996) 1306-1313
- Nagata, K., Ishibashi, T., Sakamoto, T., Ohkawara, H., Shindo, J., Yokoyama, K., Sugimoto, K., Sakurada, S., Takuwa, Y., Nakamura, S., Teramoto, T., Maruyama, Y., Rho/Rho-kinase is involved in the synthesis of tissue factor in human monocytes. *Atherosclerosis.* 163 (2002) 39-47
- Nebreda, A. R., Porras, A., p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci.* 25 (2000) 257-260
- Nemerson, Y., The Tissue Factor Pathway of Blood Coagulation. In: "Haemostasis and Thrombosis", Colman, R. W., Hirsh, J., Marder, V. J., Salzman, E. W. (Ed.), J.B.Lippincott Company, Philadelphia, 1994, third Edition, 81-91
- Neuenschwander, P. F., Bianco-Fisher, E., Rezaie, A. R., Morrissey, J. H., Phosphatidylethanolamine augments factor VIIa-tissue factor activity: enhancement of sensitivity to phosphatidylserine. *Biochemistry.* 34 (1995) 13988-13993
- Newton, A. C., Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 270 (1995) 28495-28498
- Nobes, C. D., Hall, A., Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81 (1995) 53-62
- Oeth, P., Mackman, N., Salicylates inhibit lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of the tissue factor gene in human monocytic cells. *Blood.* 86 (1995) 4144-4152
- Ohashi, N., Matsumori, A., Furukawa, Y., Ono, K., Okada, M., Iwasaki, A., Miyamoto, T., Nakano, A., Sasayama, S., Role of p38 mitogen-activated protein kinase in neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20 (2000) 2521-2526
- Ono, K., Han, J., The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.* 12 (2000) 1-13
- Osnes, L. T., Foss, K. B., Joo, G. B., Okkenhaug, C., Westvik, A. B., Ovstebo, R., Kierulf, P., Acetylsalicylic acid and sodium salicylate inhibit LPS-induced NF-kappa B/c-Rel nuclear translocation, and synthesis of tissue factor (TF) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in human monocytes. *Thromb Haemost.* 76 (1996) 970-976
- Ott, I., Fischer, E. G., Miyagi, Y., Mueller, B. M., Ruf, W., A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J Cell Biol.* 140 (1998) 1241-1253

- Ott, I., Miyagi, Y., Miyazaki, K., Heeb, M. J., Mueller, B. M., Rao, L. V., Ruf, W., Reversible regulation of tissue factor-induced coagulation by glycosyl phosphatidylinositol-anchored tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20 (2000) 874-882
- Ott, I., Vukovich, R., Schomig, A., Neumann, F. J., Overexpression of glycosyl phosphatidylinositol-anchored tissue factor pathway inhibitor-1 inhibits tissue factor activity. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 14 (2003) 539-544
- Parry, G. C., Mackman, N., Mouse embryogenesis requires the tissue factor extracellular domain but not the cytoplasmic domain. *J Clin Invest.* 105 (2000) 1547-1554
- Pendurthi, U. R., Allen, K. E., Ezban, M., Rao, L. V., Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 275 (2000) 14632-14641
- Pendurthi, U. R., Alok, D., Rao, L. V., Binding of factor VIIa to tissue factor induces alterations in gene expression in human fibroblast cells: up-regulation of poly(A) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94 (1997) 12598-12603
- Pendurthi, U. R., Rao, L. V., Factor VIIa/tissue factor-induced signaling: a link between clotting and disease. *Vitam Horm.* 64 (2002) 323-355
- Petersen, L. C., Thastrup, O., Hagel, G., Sorensen, B. B., Freskgard, P. O., Rao, L. V., Ezban, M., Exclusion of known protease-activated receptors in factor VIIa-induced signal transduction. *Thromb Haemost.* 83 (2000) 571-576
- Ploplis, V. A., Edgington, T. S., Fair, D. S., Initiation of the extrinsic pathway of coagulation. Association of factor VIIa with a cell line expressing tissue factor. *J Biol Chem.* 262 (1987) 9503-9508
- Poulsen, L. K., Jacobsen, N., Sorensen, B. B., Bergenhem, N. C., Kelly, J. D., Foster, D. C., Thastrup, O., Ezban, M., Petersen, L. C., Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor. *J Biol Chem.* 273 (1998) 6228-6232
- Prydz, H., Camerer, E., Rottingen, J. A., Wiiger, M. T., Gjernes, E., Cellular consequences of the initiation of blood coagulation. *Thromb Haemost.* 82 (1999) 183-192
- Rao, L. V., Pendurthi, U. R., Tissue factor on cells. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 9 Suppl 1 (1998) S27-35
- Rao, L. V., Pendurthi, U. R., Regulation of tissue factor-factor VIIa expression on cell surfaces: a role for tissue factor-factor VIIa endocytosis. *Mol Cell Biochem.* 253 (2003) 131-140
- Riewald, M., Ruf, W., Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (2001) 7742-7747
- Riewald, M., Ruf, W., Orchestration of coagulation protease signaling by tissue factor. *Trends Cardiovasc Med.* 12 (2002) 149-154
- Rottingen, J. A., Enden, T., Camerer, E., Iversen, J. G., Prydz, H., Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals in J82 cells, transfected COS-1 cells, Madin-Darby canine kidney cells and in human endothelial cells induced to synthesize tissue factor. *J Biol Chem.* 270 (1995) 4650-4660
- Ruf, W., Edgington, T. S., Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *Faseb J.* 8 (1994) 385-390
- Ruf, W., Fischer, E. G., Huang, H. Y., Miyagi, Y., Ott, I., Riewald, M., Mueller, B. M., Diverse functions of protease receptor tissue factor in inflammation and metastasis. *Immunol Res.* 21 (2000) 289-292

- Ruf, W., Mueller, B. M., Tissue factor in cancer angiogenesis and metastasis. *Curr Opin Hematol.* 3 (1996) 379-384
- Sabatier, F., Roux, V., Anfosso, F., Camoin, L., Sampol, J., Dignat-George, F., Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood.* 99 (2002) 3962-3970
- Sabri, A., Muske, G., Zhang, H., Pak, E., Darrow, A., Andrade-Gordon, P., Steinberg, S. F., Signaling properties and functions of two distinct cardiomyocyte protease-activated receptors. *Circ Res.* 86 (2000) 1054-1061
- Sakai, T., Lund-Hansen, T., Paborsky, L., Pedersen, A. H., Kisiel, W., Binding of human factors VII and VIIa to a human bladder carcinoma cell line (J82). Implications for the initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation. *J Biol Chem.* 264 (1989) 9980-9988
- Sato, Y., Asada, Y., Marutsuka, K., Hatakeyama, K., Kamikubo, Y., Sumiyoshi, A., Tissue factor pathway inhibitor inhibits aortic smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex. *Thromb Haemost.* 78 (1997) 1138-1141
- Sato, Y., Asada, Y., Marutsuka, K., Hatakeyama, K., Sumiyoshi, A., Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells. *Thromb Haemost.* 75 (1996) 389-392
- Schechter, A. D., Giesen, P. L., Taby, O., Rosenfield, C. L., Rossikhina, M., Fyfe, B. S., Kohtz, D. S., Fallon, J. T., Nemerson, Y., Taubman, M. B., Tissue factor expression in human arterial smooth muscle cells. TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation. *J Clin Invest.* 100 (1997) 2276-2285
- Schechter, A. D., Rollins, B. J., Zhang, Y. J., Charo, I. F., Fallon, J. T., Rossikhina, M., Giesen, P. L., Nemerson, Y., Taubman, M. B., Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells. *J Biol Chem.* 272 (1997) 28568-28573
- Schonbeck, U., Mach, F., Sukhova, G. K., Herman, M., Graber, P., Kehry, M. R., Libby, P., CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 156 (2000) 7-14
- Seiki, M., Mori, H., Kajita, M., Uekita, T., Itoh, Y., Membrane-type 1 matrix metalloproteinase and cell migration. *Biochem Soc Symp* (2003) 253-262
- Sevinsky, J. R., Rao, L. V., Ruf, W., Ligand-induced protease receptor translocation into caveolae: a mechanism for regulating cell surface proteolysis of the tissue factor-dependent coagulation pathway. *J Cell Biol.* 133 (1996) 293-304
- Shin, J. S., Abraham, S. N., Cell biology. Caveolae--not just craters in the cellular landscape. *Science.* 293 (2001) 1447-1448
- Singh, R. P., Dhawan, P., Golden, C., Kapoor, G. S., Mehta, K. D., One-way cross-talk between p38(MAPK) and p42/44(MAPK). Inhibition of p38(MAPK) induces low density lipoprotein receptor expression through activation of the p42/44(MAPK) cascade. *J Biol Chem.* 274 (1999) 19593-19600
- Sorensen, B. B., Freskgard, P. O., Nielsen, L. S., Rao, L. V., Ezban, M., Petersen, L. C., Factor VIIa-induced p44/42 mitogen-activated protein kinase activation requires the proteolytic activity of factor VIIa and is independent of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 274 (1999) 21349-21354
- Sorensen, B. B., Hedner, U., Erhardttsen, E., rFVIIa in Acute Coronary Syndromes. *Semin Vasc Med.* 3 (2003) 199-204
- Sorensen, B. B., Persson, E., Freskgard, P. O., Kjalke, M., Ezban, M., Williams, T., Rao, L. V., Incorporation of an active site inhibitor in factor VIIa alters the affinity for tissue factor. *J Biol Chem.* 272 (1997) 11863-11868

- Sorensen, B. B., Rao, L. V., Interaction of activated factor VII and active site-inhibited activated factor VII with tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 9 Suppl 1 (1998) S67-71
- Sorensen, B. B., Rao, L. V., Tornehave, D., Gammeltoft, S., Petersen, L. C., Antiapoptotic effect of coagulation factor VIIa. *Blood*. 102 (2003) 1708-1715
- Sugden, P. H., Clerk, A., Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal*. 9 (1997) 337-351
- Surapisitchat, J., Hoefen, R. J., Pi, X., Yoshizumi, M., Yan, C., Berk, B. C., Fluid shear stress inhibits TNF-alpha activation of JNK but not ERK1/2 or p38 in human umbilical vein endothelial cells: Inhibitory crosstalk among MAPK family members. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98 (2001) 6476-6481
- Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T., Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 81 (2001) 153-208
- Taniguchi, T., Kakkar, A. K., Tuddenham, E. G., Williamson, R. C., Lemoine, N. R., Enhanced expression of urokinase receptor induced through the tissue factor-factor VIIa pathway in human pancreatic cancer. *Cancer Res*. 58 (1998) 4461-4467
- Taubman, M. B., Fallon, J. T., Schechter, A. D., Giesen, P., Mendlowitz, M., Fyfe, B. S., Marmur, J. D., Nemerson, Y., Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 78 (1997) 200-204
- Versteeg, H. H., Bresser, H. L., Spek, C. A., Richel, D. J., Van Deventer, S. J., Peppelenbosch, M. P., Regulation of the p21Ras-MAP kinase pathway by factor VIIa. *J Thromb Haemost*. 1 (2003) 1012-1018
- Versteeg, H. H., Hoedemaeker, I., Diks, S. H., Stam, J. C., Spaargaren, M., van Bergen En Henegouwen, P. M., van Deventer, S. J., Peppelenbosch, M. P., Factor VIIa/tissue factor-induced signaling via activation of Src-like kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac. *J Biol Chem*. 275 (2000) 28750-28756
- Versteeg, H. H., Sorensen, B. B., Slofstra, S. H., Van den Brande, J. H., Stam, J. C., van Bergen en Henegouwen, P. M., Richel, D. J., Petersen, L. C., Peppelenbosch, M. P., VIIa/tissue factor interaction results in a tissue factor cytoplasmic domain-independent activation of protein synthesis, p70, and p90 S6 kinase phosphorylation. *J Biol Chem*. 277 (2002) 27065-27072
- Versteeg, H. H., Spek, C. A., Richel, D. J., Peppelenbosch, M. P., Coagulation factors VIIa and Xa inhibit apoptosis and anoikis. *Oncogene*. 23 (2004) 410-417
- Versteeg, H. H., Spek, C. A., Slofstra, S. H., Diks, S. H., Richel, D. J., Peppelenbosch, M. P., FVIIa:TF induces cell survival via G12/G13-dependent Jak/STAT activation and BclXL production. *Circ Res*. 94 (2004) 1032-1040
- Wang, X., Gjernes, E., Prydz, H., Factor VIIa induces tissue factor-dependent up-regulation of interleukin-8 in a human keratinocyte line. *J Biol Chem*. 277 (2002) 23620-23626
- Waxman, E., Ross, J. B., Laue, T. M., Guha, A., Thiruvikraman, S. V., Lin, T. C., Konigsberg, W. H., Nemerson, Y., Tissue factor and its extracellular soluble domain: the relationship between intermolecular association with factor VIIa and enzymatic activity of the complex. *Biochemistry*. 31 (1992) 3998-4003
- Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., Davis, R. J., A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science*. 281 (1998) 1671-1674
- Wiiger, M. T., Prydz, H., The epidermal growth factor receptor (EGFR) and proline rich tyrosine kinase 2 (PYK2) are involved in tissue factor dependent factor VIIa signalling in HaCaT cells. *Thromb Haemost*. 92 (2004) 13-22

- Wilcox, J. N., Noguchi, S., Casanova, J., Extrahepatic synthesis of factor VII in human atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23 (2003) 136-141
- Wilcox, J. N., Smith, K. M., Schwartz, S. M., Gordon, D., Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86 (1989) 2839-2843
- Wolberg, A. S., Monroe, D. M., Roberts, H. R., Hoffman, M. R., Tissue factor de-encryption: ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 10 (1999) 201-210
- Yamboliev, I. A., Chen, J., Gerthoffer, W. T., PI 3-kinases and Src kinases regulate spreading and migration of cultured VSMCs. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281 (2001) C709-718
- Zhang, S., Han, J., Sells, M. A., Chernoff, J., Knaus, U. G., Ulevitch, R. J., Bokoch, G. M., Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem.* 270 (1995) 23934-23936
- Zhang, Y., Deng, Y., Luther, T., Muller, M., Ziegler, R., Waldherr, R., Stern, D. M., Nawroth, P. P., Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest.* 94 (1994) 1320-1327
- Zioncheck, T. F., Roy, S., Vehar, G. A., The cytoplasmic domain of tissue factor is phosphorylated by a protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 267 (1992) 3561-3564

## **Danksagung**

Danken möchte ich Frau Priv. Doz. Dr. Ilka Ott für die Möglichkeit der Mitarbeit in ihrer Forschungsgruppe und die Unterstützung bei der Erhebung und Auswertung der Daten für diese Dissertationsschrift. Durch ihre eigene Begeisterung an der Forschung hatte sie für wissenschaftliche und praktische Fragen jederzeit und an jedem Ort ein offenes Ohr.

Mein weiterer Dank gilt allen mitwirkenden medizinisch-technischen Assistentinnen, insbesondere Frau Birgit Campbell und Frau Corinna Huber, die mich geduldig eingearbeitet haben und mir stets unterstützend zur Seite standen. Die praktische Hilfestellung bei den verschiedenen Methoden hat die Arbeit sehr erleichtert.

Sehr geschätzt habe ich die gute Zusammenarbeit und den kollegialen Austausch mit meiner Mitdoktorandin Ruth Michl. Dafür möchte ich mich bei ihr bedanken.

# Lebenslauf

## Angaben zur Person

Name Berthold Weigand

Anschrift Steinheilstr.3  
80333 München  
Tel.: 089/52314613  
bertholdweigand@web.de

Geburtsdatum 08.08.1976  
Geburtsort Nürnberg  
Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit deutsch

## Schulbildung

13.09.1983-28.06.1996 Rudolf Steiner- Schule Nürnberg  
28.06.1996 Abitur

## Zivildienst

02.09.1996-30.09.1997 Waldkrankenhaus St.Marien in Erlangen

## Studium

WS 1997/98-SS 1999 Vorklinisches Studium an der LMU München  
26.08.1999 Physikum  
SS 2000-WS 2003/04 Klinisches Studium an der TU München

22.03.2001 1. Staatsexamen  
02.04.2003 2. Staatsexamen  
27.04.2004 Abschluß der Ärztlichen Prüfung

## Praktisches Jahr

21.04.2003 Chirurgie: Klinikum Passau  
bis Dermatologie: Klinik u. Poliklinik für Dermatologie  
und Allergologie am Biederstein  
19.03.2004 Innere Medizin: I. und II. Med. Klinik am MRI