

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

Wirkung des Gerinnungsfaktors VIIa auf die Zellmigration

Nicole de Winkel

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

Diese Dissertation wurde am 18.08.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005 angenommen.

Gliederung:

1.	Einleitung und Fragestellung	
1.1.	Einleitung	2
1.2.	Fragestellung	15
2.	Materialien und Methoden	
2.1.	Zellkultur	16
2.2.	Durchflusszytometrie	17
2.3.	Liposomale Zelltransfektion	18
2.4.	Zellmigrationsassays	19
2.5.	Faktor Xa Assay	22
3.	Ergebnisse	
3.1.	Faktor Xa Bildung	23
3.2.	Tissue Faktor Expression im FACS	24
3.3.	Wirkung von FVIIa und FFR-FVIIa auf die Zellmigration	26
3.4.	Rolle der zytoplasmatischen Domäne für Tissue Faktor	27
3.5.	Tissue Faktor Spezifität	28
3.6.	Die Rolle von β -1 Integrinen für die Migration	29
3.7.	Pharmakologische Inhibitoren der MAP-Kinasen p38	31
4.	Diskussion	32
5.	Zusammenfassung	44
6.	Abkürzungsverzeichnis	45
7.	Literaturverzeichnis	46
8.	Abbildungsverzeichnis	53
9.	Danksagungen	54

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Einleitung

Tissue Factor (TF, Gewebsthromboplastin) ist ein transmembranöses, 47 kDa großes, glycosyliertes Membranprotein, das exprimiert wird, wenn die Gefäßwand verletzt wird. Es ist der Hauptinitiator der extrinsischen Blutgerinnungskaskade. TF bindet an Faktor VII (FVII), der in geringen Mengen im Blut zirkuliert, aktiviert diesen zu Faktor VIIa (FVIIa) und bewirkt so die Aktivierung von Faktor IX und Faktor X. Dann wird Prothrombin zu Thrombin konvertiert. Das Thrombin katalysiert in der Folge die Formation von Fibrin aus Fibrinogen und generiert somit einen Thrombus (2, 10).

Die intrinsische Aktivierung des Gerinnungssystems geschieht dadurch, dass Faktor XII in Gegenwart von hochmolekularem Kininogen und Kallikrein, mit negativ geladenen Oberflächen in Berührung kommt. In der Folge werden die Faktoren XI und IX aktiviert. Faktor IXa bildet dann zusammen mit Phospholipiden, Calcium und dem Faktor VIIIa einen Komplex, der Faktor X aktiviert.

Faktor Nr.	Name	Konzentration im Blut mg/l	HWZ im Blut in Stunden	Synthese Vitamin K-abhängig
I	Fibrinogen	2000-4500	110	-
II	Prothrombin	60-100	50	+
III	Gewebsthromboplastin		-	-
IV	Ca ⁺⁺	100-120	15	-
V	Proaccelerin	10	5	+
VII	Proconvertin	0,5	1	+
VIII	V. Willebrand Faktor	0,2	25	+
IX	Christmas Faktor	5-7	30	+
X	Stuart-Power-Faktor	10	15	-
XI	Plasma-Thromboplastin-Antecedent	6	60	-
XII	Hagemann Faktor	15-50	150	-
XIII	Fibrinstabilisierender Faktor			
-	Präkallikrein	40-50	?	-
	HMW (high-molecular-weight) Kininogen	60	-	-

Abbildung 1: Übersicht über die Gerinnungsfaktoren

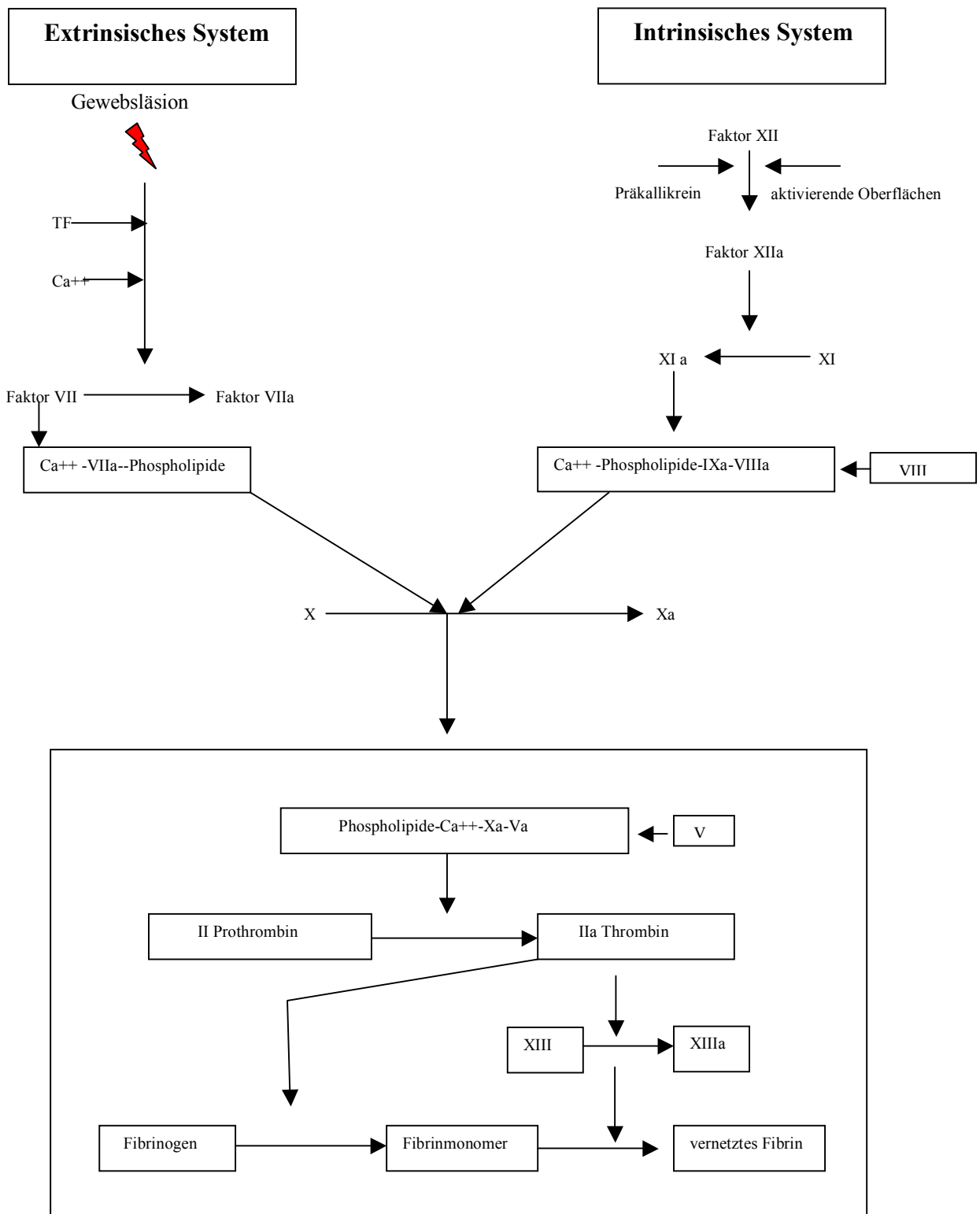


Abbildung 2: Übersicht über das Gerinnungssystem

Neben seiner Rolle in der Gerinnungsphysiologie, erfüllt TF aber auch noch andere Funktionen. In der frühen Phase der Embryogenese findet eine starke TF-Expression, besonders in ekto- und endodermalen Zellen sowie in Geweben mit hoher morphogenetischer Aktivität statt (10). Die Rolle TFs bei nicht hämostatischen Prozessen wird durch verschiedene Studien unterstützt, in denen die gezielte Deletion des TF Gens in Knock out Mäusen zu embryonaler Letalität führte (2). Der Phänotyp dieser Embryonen war durch erhöhte Fragilität der endothelgesäumten Kanäle im Dottersack, die bei Erhöhung des Blutdruckes um den 9. Tag der Embryogenese rupturierten, gekennzeichnet. Die Bildung von Mikroaneurysmen und Blutseen resultierte in abnormer vitelloembryonischer Zirkulation, ausgeprägten Hämorrhagien in den Dottersack, Integritätsverlust extraembryonaler Gewebe und nachfolgend Tod des Embryos.

Die Letalität von TF-defizienten Mäusen unterscheidet sich in ihrem Blutungstyp wesentlich von dem fibrinogendefizienter Mäuse, sodass eine gerinnungs-unabhängige Rolle von TF während der Embryogenese vermutet werden kann. Die Tatsache, dass TF zur Aufrechterhaltung der Struktur des plazentaren Labyrinths und der intrauterinen Hämostase gebraucht wird, könnte ebenfalls mit den nicht hämostatischen Funktionen von TF wie z.B. der Regulation der Aktivierung von Protease aktivierten Rezeptoren (PAR) und dadurch mit einer FVIIa-TF vermittelten Signaltransduktion und Modulation der Zelladhäsion zu tun haben.

Weitere Untersuchungen zu nicht hämostatischen Funktionen von TF betreffen die Diapedese von Monozyten (32) und die Tumorprogression, wobei letzterer Effekt möglicherweise auf die schon eingangs erwähnte angiogenetische Funktion von TF zurückzuführen ist (45,15,16).

Viele Tumore, vor allem solche endothelialen Ursprungs, entstehen als avaskularisierte Masse, deren weiteres Überleben an die Ausbildung einer Gefäßstruktur gekoppelt ist. Klinische Daten suggerieren einen Zusammenhang zwischen TF und Tumorangiogenese. Ein Hinweis auf diesen Zusammenhang ist die Korrelation zwischen TF-Expression und der Dichte von Mikrogefäßen, die ein etablierter Marker für die Tumorangiogenese ist (44). Eine Korrelation zwischen vascular endothelial growth factor (VEGF) und TF ist in verschiedenen Tumoren beschrieben. Eine signifikante Beziehung zwischen VEGF und TF wurde in

Patienten mit nicht kleinzelligem Lungenkarzinom entdeckt und könnte möglicherweise als ein prognostischer Faktor fungieren. Außerdem konnten TF und VEGF in Gefäßendothelzellen und Zellen von Patientinnen mit Brustkrebs kolokalisiert werden. Dies unterstützt die Hypothese, dass Tumorzellen und nahe gelegene Endothelzellen bei der Formation von Gefäßen interagieren.

TF wird entweder konstitutiv, mit zelltypischer Spezifität, oder in vaskulären Zellen nach diversen Stimuli wie z.B. Entzündungsreizen exprimiert. Der effektivste Stimulator ist Endotoxin. Andere potente Aktivatoren sind Interleukin-1 (IL-1), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) und Platelet Derived Growth Factor (PDGF)-BB (13). Akute Phase Proteine so wie das C reaktive Protein induzieren eine TF-Expression in vitro. In Monozyten konnten Lipopolysaccharide und Immunkomplexe eine TF-Expression induzieren (25).

TF besteht aus insgesamt 263 Aminosäureresten. Es setzt sich aus einer extrazellulären Domäne, bestehend aus 219 Aminosäureresten (Aminosäurereste 1-219), einer transmembranösen Domäne aus 23 Aminosäureresten (Aminosäurereste 220-242) und einer zytoplasmatischen Domäne aus 21 Aminosäureresten (Aminosäurereste 243-263) zusammen. Die zytoplasmatische Domäne verfügt über 3 Serinreste, die potenzielle Phosphorylierungsorte darstellen (40).

Die extrazelluläre Domäne ist der Rezeptor für den Gerinnungsfaktor VII/VIIa. Dadurch wird TF zum Initiator der Blutgerinnungskaskade. Der Faktor VII/VIIa aktiviert Faktor X und Faktor IX, was wiederum zur Bildung von Thrombin führt. Die zytoplasmatische Domäne ist für die koagulatorische Aktivität nicht erforderlich. Tissue factor wird auf extravaskulären Zellen als hämostatische Barriere exprimiert, um die vaskuläre Integrität zu gewährleisten. Zu diesen Zellen zählen die Adventitia der Blutgefäße und die fibrösen Kapseln der Leber, Niere und Milz (8). Auch in embryonalen Zellen, Epithelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen findet eine Expression von TF statt (8). TF wird nicht konstitutiv von zirkulierenden Zellen exprimiert; es lässt sich aber eine Gentranskription in Monozyten und Endothelzellen induzieren. Die Induktion auf Transkriptionslevel erfolgt rasch nach der Aktivierung, was TF als ein wachstumsbezogenes „immediate early gene“ identifiziert.

Dabei haben sich Endotoxine in Form von Lipopolysacchariden als effektivste Stimulanzen erwiesen. Andere Aktivatoren sind Immunkomplexe und eine ganze

Reihe inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 und TNF, ebenso MCP-1 und PDGF-BB (12). Andere Akute-Phase-Proteine wie das C-reaktive-Protein zeigen eine Induktion in vitro. In Monozyten stimulierten diese Agenzien die TF-Expression (25). Die Besetzung und das Vernetzen der Counter-Rezeptoren für eine Reihe von Adhäsionsmolekülen - wie z.B. E-Selektin, Interzelluläres-Adhäsions-Molekül-1(ICAM-1), Vaskuläres-Adhäsions-Molekül-1(VCAM-1), P-Selektin und CD-40-Ligand - resultiert ebenfalls in der Transkription des TF Gens und nachfolgender Expression des Proteins (8, 46,31).

In zwei verschiedenen Ansätzen wurde die Rolle von TF bei Sepsis und Entzündung untersucht: In Sepsis-Modellen und durch experimentell hervorgerufene Endotoxämie.

In den Sepsis-Modellen wurden Tieren Lipopolysaccharide oder Bakterien injiziert. Besonders gut untersucht sind in diesem Zusammenhang Affen. Zum Beispiel führte die Injektion von 500µg/kg anti-TF-Immunglobulin G bzw. anti-TF-Fab Fragmenten zu einer Attenuierung einer Koagulopathie. Auch gegen Infusionen mit einer letalen Dosis E.coli zeigten diese Injektionen einen protektiven Effekt. Einen ebensolchen Effekt zeigte die Infusion von Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) bei mit E.coli in Letaldosis behandelten Affen. Insgesamt zeigten die mit E.coli behandelten Versuchstiere eine mittlere Überlebenszeit von 39,9 Stunden. Wurden sie allerdings gleichzeitig auch mit TFPI behandelt, verlängerte sich die Überlebenszeit auf die Gesamtdauer des Experiments, nämlich 7 Tage. Die Serummarker für Hypoxie, Azidose und Zellschädigung waren unter TFPI Behandlung ebenfalls vermindert. Organschäden blieben aus. Interessanterweise konnte durch die Zugabe von TFPI auch die IL-6 Produktion vermindert werden. Die TNF-Produktion war allerdings konstant. Die Administration von proteolytisch inaktivem FVIIa (FFR-FVIIa) konnte die Produktion von IL-6 sowie von IL-8 senken. Die TNF Konzentration blieb auch hier konstant. Somit erwies sich auch die Injektion von FFR-FVIIa als protektiv für die mit E.coli infizierten Affen.

Das andere Modell der experimentell hervorgerufenen Endotoxämie wurde mit Schimpansen und menschlichen Freiwilligen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stehen allerdings im direkten Gegensatz zu den im Sepsismodell an Affen gewonnenen Ergebnissen. IL-6 Serumlevel veränderten sich unter Zugabe von

TFPI zu einem Schimpansenorganismus, der mit letalen E.coli Infusionen vorbehandelt war, nicht. Auch andere Entzündungsmarker blieben unverändert.

Menschliche Probanden denen Danaproid, ein selektiver Inhibitor von Faktor Xa, injiziert wurde, zeigten keine Änderung der Endotoxin-induzierten Alterationen im fibrinolytischen System bei der Aktivierung von Leukozyten oder Zytokinen oder der TF-Expression auf Monozyten. Allerdings war die Thrombinbildung stark vermindert.

Die wahrscheinlichste Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Untersuchungsmodelle, liegt im Umfang der TF-abhängigen Aktivierung von Gerinnungsfaktoren. Die Signaltransduktion via FVIIa benötigt einen relativ hohen Grad der TF-FVII Komplexierung. Obwohl dieser Grad bei einer schweren Sepsis wahrscheinlich erreicht wird, ist es in einem Versuchsaufbau mit einem menschlichen Probanden, dem Endotoxine injiziert werden, wohl nicht erreichbar.

Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass TF-FVIIa wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei schweren septischen Zuständen einnimmt, aber wohl keine signifikante Rolle bei mildereren septischen Krankheitsbildern spielt.

Die aberrierende Expression von TF scheint eine zentrale Rolle bei der Atherosklerose, bei Krebs und Metastasierung, bei der Septikämie mit disseminierter intravasaler Gerinnung, sowie bei der Entwicklung von Thrombose und Inflammation zu spielen. Bei Atherosklerose findet sich in Schaumzellen, Monozyten/Makrophagen und atherosklerotischen Plaques glatter Muskelzellen, die besonders lipidreich sind, eine vermehrte TF-Expression. Bei der Ruptur solcher Plaques spielt dies eine der Hauptrollen der Thrombusformation (17).

In myelomonozytotischen Zellen und in hämatopoetischen Zellen, die in einer frühen Phase der Differenzierung stehengeblieben sind, ist eine konstitutive TF-Produktion vorhanden, die zu thrombotischen Komplikationen führen kann. Die monoblastische U-937-Zelllinie und die promyelozytische Leukämie NB4 Zelllinie, exprimieren beide TF in großer Menge (22, 14, 42). Diese Zellen können durch all-trans Retinoic acid (ATRA) differenziert werden. U-937 Zellen können auch durch Vitamin D3 differenziert werden. Die Induktion terminaler Zelldifferenzierung, bewiesen durch das Vorhandensein von Differenzierungs- und Zellzyklusstillstand-assoziiierter Antigene, zeigt eine inverse Korrelation zur Expression von TF in U-937 und NB4 Zellen (42). Dies könnte ein weiterer Hinweis auf eine gerinnungsunabhängige Rolle von TF sein.

Viele Tumorzellen exprimieren TF. Dazu gehören kolorektale Karzinome, Pankreaskarzinome, Mammakarzinome, maligne Gliome, maligne Melanome, Fibrosarkome und Blasenkarzinome. Die Expression von TF trägt wesentlich zur prokoagulatorischen Aktivität bei malignen Erkrankungen und der bekannten klinischen Assoziation von maligner Neoplasie und Thrombose, wie z.B. beim Trousseau Syndrom, bei. Diese prokoagulatorische Aktivität eines sich entwickelnden Tumors, kann die Aktivierung der Gerinnung, der Fibrinbildung und die Formation von Tumorstroma induzieren (12). Dies kann zum Einbau von Tumorzellen in einen thrombozyten- und fibrinreichen Thrombus führen, was wiederum zu einem Stillstand der Mikrozirkulation führen kann (33). Eine lokale Bildung von Thromben kann durch Hochregulierung verschiedener Adhäsionsmoleküle zu einer Adhäsion von Tumorzellen an die Gefäßwand führen. Aufgrund dieser Erkenntnisse konnte ein Zusammenhang zwischen prokoagulatorischer Aktivität und hämatogener Metastasierung aufgezeigt werden (3, 24). Der Mechanismus der Zellaktivierung durch TF ist dabei noch unklar. Im Gegensatz dazu ist die Rolle von TF für die Gerinnung weitgehend verstanden.

Viele klinische Studien haben den Zusammenhang zwischen TF-Expression, Tumorprogression und Malignitätsgrad in entstehenden Tumoren in den Mittelpunkt gestellt (18). In Gliomen korrelierten die Höhe der Expression von TF und der Grad der Malignität miteinander. Beim Mammakarzinom konnte sogar gezeigt werden, dass der Progression von Tumorzellen, eine TF-Expression in den dem Tumor benachbarten Endothelzellen vorausging (44). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression von TF in Tumorzellen beim kolorektalen Karzinom einen eigenständigen Risikofaktor für die Metastasierung in Leberzellen darstellt (38). Das Überleben von Patienten mit TF-Expression war signifikant schlechter als das von Patienten ohne TF-Expression. Ähnliches scheint auch für das Mammakarzinom zuzutreffen (21). Abgesehen von der prokoagulatorischen Aktivität wird die These von der Rolle TFs in der Angiogenese und der hämatogenen Metastasierung durch verschiedene experimentelle Systeme unterstützt. Zhang et al. (45) konnten zeigen, dass die TF-Expression die Transkription von EGF vermehren kann, die Expression von Thrombospondin, einem Suppressor der Angiogenese, jedoch vermindert. Damit konnte wiederum die enge Verzahnung der Expression von TF mit der Angiogenese

gezeigt werden. Die Überexpression von TF in Melanomzellen und in Zellen chinesischer Hamsterovarien (CHO) beschleunigte die hämatogene Metastasierung. Die zytoplasmatische Domäne von TF ist für diesen Effekt essenziell (3, 23, 24). Die Rolle der zytoplasmatischen und der extrazellulären Domäne wurde mit Hilfe von transfizierten Melanomzelllinien untersucht (4). In einer Mutante wurden die 3' Serinreste der zytoplasmatischen Domäne durch Alanin ersetzt, um eine Phosphorylierung zu unterbinden. In der anderen Mutante ersetzte Alanin die 4 Reste der extrazellulären Domäne, die zur Bindung von Faktor VII und damit zur Initiierung der Gerinnungskaskade notwendig sind, um die prokoagulatorische Aktivität zu unterbinden (4). Die so transfizierten Zellen wurden nun in immundefiziente Mäuse injiziert. Die Inzidenz von Metastasen war beim Wildtyp TF mit 75% sehr hoch, in den transfizierten Mutanten wesentlich niedriger. Das legt den Schluss nahe, dass sowohl die zytoplasmatische Domäne und damit die Serinphosphorylierung, als auch die extrazelluläre Domäne mit ihrer prokoagulatorischen Aktivität für die volle metastatische Funktion nötig sind (4). Da die TF-Expression weder die Expression von VEGF erhöht, noch das Tumorstadium und die Vaskularisierung des Tumors beeinflussen konnte, muss sich die Wirkungsweise von TF bei der Tumormetastasierung auf einer anderen Ebene abspielen. Allerdings gibt es aber auch gegenteilige Ergebnisse, die eine Regulierung der VEGF-Produktion und der Angiogenese durch die zytoplasmatische Domäne dokumentieren (1).

Viele Studienergebnisse ergeben Hinweise darauf, dass FVIIa eine Signaltransduktion unabhängig von der Aktivierung der Blutgerinnungskaskade induzieren kann. Die Bindung von FVIIa an TF triggert die Mobilisation von intrazellulärem Kalzium durch die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C in verschiedenen Zellen, wie z.B. Human Umbilical Cord Cells (HUVECs) oder Madin-Darby Nierenzellen (33, 7). Beschrieben wird auch eine Phosphorylierung der p42/44 Mitogen-Aktivierten-Kinase (MAP Kinase) durch die Bindung von FVIIa an TF in transfizierten Nierenzellen vom Baby Hamster (30). Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch die p38 MAP Kinase und die JNK Kinase durch Bildung dieses Komplexes phosphoryliert werden (5).

Wie bereits in verschiedenen Publikationen gezeigt wurde, scheinen die MAP Kinasen eine wichtige Rolle bei der Transduktion extrazellulärer Signale in intrazelluläre Antworten zu spielen (19). Spezifische Signalkaskaden von MAP

Kinasen werden von einer Reihe Wachstumsfaktoren, Zytokinen, UV-Licht und anderen stressinduzierenden Agenzien stimuliert. Außerdem scheinen MAP Kinasen auch eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Apoptose, der Zelldifferenzierung, dem Remodeling des Zytoskeletts und der Regulierung des Zellzyklus zu spielen.

Die MAP Kinasen lassen sich durch die Art der Aktivierung an ihrem Phosphorylierungsort kategorisieren. Zur Zeit geht man davon aus, dass menschliche Zellen mindestens drei verschiedene Gruppen von MAP Kinasen exprimieren:

Extrazellulär regulierende Kinasen (ERK), p38 MAP Kinasen und c-Jun N-Terminal Kinasen. In Monozyten konnte zum ersten Mal demonstriert werden, dass die p38 MAP Kinase durch Lipopolysaccharide, IL-1 β und TNF aktiviert wird. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass auch andere Zytokine und Wachstumsfaktoren und autonome Neurotransmitter p38 aktivieren können. Es konnten bisher mindestens vier Isoformen der p38 MAP Kinasen Familie identifiziert werden.

P38 befindet sich in der Signaltransduktionskaskade unterhalb der Ras verwandten GTP bindenden Proteine RAC und Cdc 42. Es wird direkt durch die Kinasen MKK3, MKK4 und MKK6 aktiviert. Die p38 MAP Kinase phosphoryliert und aktiviert verschiedene Transkriptionsfaktoren, darunter ATF-2, CHOP, ELK-1, SAP1a und MEF 2C. Außerdem aktiviert p38 auch MAPKAP Kinase-2, MAPKAP Kinase-3 und die p38 regulierte Protein Kinase. Verschiedene Experimente weisen darauf hin, dass das Hitze-Schock-Protein -27 (HSP 27) ein physiologisches Substrat dieser Kinasen ist. Die Phosphorylierung von 3 Serin Resten von HSP 27 scheint die Polymerisierung von Aktin zu modulieren und überdies eine Rolle bei der Remodellierung des Zytoskelettes unter zellulärem Stress und Wachstum zu spielen (19).

Vorläufige Daten suggerieren, dass die MAP-Kinasen an der zytoplasmatischen Signaltransduktion beteiligt sind, da zwar der MAP Kinase Inhibitor PD98059, nicht aber PKC Inhibitoren wie z.B. Staurosporin die VEGF Induktion in Melanom Zellen, die TF überexprimieren, vermindern.

Die Interaktion von FVIIa und TF führt auch zu Veränderungen in der Genexpression im Sinne einer Hochregulierung der Poly(A) Polymerase und VEGF in Fibroblasten (29). In einigen Tumorzellen sind die Effekte von TF unabhängig von exogenen Liganden und der proteolytischen Funktion von TF. Studien mit Meth-A Sarkomen und Melanomzelllinien zeigen, dass die Überexpression von TF das Tumorwachstum und die Angiogenese induziert. Dies sogar in Gegenwart von Warfarin und dem Thrombin-Inhibitor Hirudin. Obwohl bisher nicht bekannt ist, ob die Tumorzellen andere TF-Liganden sezernieren, oder ob diese Tumorzellen in der Lage sind auch ohne einen Liganden als Mediator für die Signaltransduktion über TF zu agieren, weisen die Daten darauf hin, dass für die Signaltransduktion die zytoplasmatische Domäne notwendig ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Melanomzellen, die mit verschiedenen Mutanten von TF transfiziert wurden und naturgemäß sehr kleine Mengen von TF und VEGF produzieren, ohne zytoplasmatische Domäne signifikant weniger VEGF, aber unverändert viel TF produzierten.

Im Gegensatz dazu behielten Zellen, deren prokoagulatorische Aktivität defekt war, ihre normale VEGF Produktion bei. Auch FVIIa, FFR-VIIa oder Hirudin hatten keinen Effekt auf die VEGF Produktion. Dies deutet daraufhin, dass die zytoplasmatische Domäne von Bedeutung für die VEGF Produktion sein muss.

Lemoine und Mitarbeiter (41) konnten zeigen, dass auch ein urokinaseartiger Plasminogenaktivator (uPAR) in humanen Pankreaskarzinomzellen expremiert wird (41). Dieser Plasminogenaktivator spielt eine wichtige Rolle bei der Tumordinvasion durch Matrixdegradation. Mit Hilfe von cDNA Mikroarray Technologien wurden Veränderungen im Transkriptionsprogramm in menschlichen Fibroblasten und Keratinozyten, die durch den FVIIa/TF Komplex induziert wurden, untersucht (5, 6, 27). In Keratinozyten konnten 24 Gene gefunden werden, die hochreguliert worden waren (6). Darunter waren Transkriptionsregulatorgene wie Egr-1, Wachstumsfaktoren, proinflammatorische Zytokine, sowie Proteine, die eine Rolle in der zellulären Reorganisation und Migration spielen. Die Nutzung von spezifischen Inhibitoren der p38 MAP Kinase und der p42/44 MAP Kinase zeigte eine Induktion verschiedener „early genes“ durch die verschiedenen Kinasen (6). In humanen Fibroblasten konnten durch diese Technik Cyr 61 und Connective Tissue Growth Factor induziert werden (27). Diese Genprodukte sind für die Zellmigration und

Zelladhäsion verantwortlich. Dieses Muster der hochregulierten Gene in beiden Zelllinien deutet auf eine aktive Rolle von TF bei der Wundheilung und der Gewebsreparatur hin. Für all diese möglichen Wirkungen scheint die katalytische Aktivität von TF unabdingbar, da inaktivierter FVIIa und anti-TF Antikörper die beschriebenen Wirkungen verhindern. Die zytoplasmatische Domäne ist nicht notwendig für die Genexpression (6). Damit ist zwar klar, dass TF als ein zellulärer Rezeptor für FVII/VIIa agiert, die molekularen Mechanismen und die subsequenten biologischen Funktionen bleiben aber vorerst unklar.

Die Zellmigration ist für Prozesse wie die Atherosklerose, die embryonale Entwicklung, die Immunantwort, für inflammatorische Reaktionen, für Gewebsreparaturmechanismen und invasive Charakteristika maligner Zellen inklusive Angiogenese und Metastasierung von zentraler Bedeutung. In bezug auf die Metastasierung hat TF prometastatische Funktionen. Dabei scheint der zytoplasmatische 21er-Rest eine zentrale Rolle zu spielen. Die Ligation von TF durch Antikörper und Liganden unterstützt die Zellmigration und Adhäsion über noch nicht vollständig verstandene intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen (26).

Durch den Gebrauch eines Chimärenmodells, bestehend aus dem transmembranösen und dem extrazellulären Teil des IL-2 Rezeptors, sowie aus der zytoplasmatischen Domäne des Wildtyp TF, konnte bei mit diesem Modell transfizierten J82-Zellen die Phosphorylierung von Ser 253 und Ser 258 als notwendig für die Interaktion und damit ABP 280 als essenziell für die normale Zellmigration identifiziert werden. Durch die Signaltransduktion via TF gelang es, eine molekulare Verbindung zwischen TF und dem Zytoskelett herzustellen. Auch die Phosphorylierung des sogenannten Focal Adhesion Protein (FAK), einer nicht-rezeptor Protein Tyrosinkinase, die bei der Zelladhäsion mitwirkt, scheint der TF-abhängigen Aktin-Filament Organisation zu folgen. Diese Erkenntnisse und die Daten zur Geninduktion zeigen, dass die Zellmigration durch die Signaltransduktion via TF induziert werden könnte. Andere Studien haben ebenfalls ergeben, dass der lösliche FVII/TF Komplex einen starken Effekt auf die Migration von glatten aortalen Muskelzellen hat (34). In diesen Experimenten diente das gesamte TF Molekül und die lösliche Form von TF, die der extrazellulären Domäne entspricht, in einem Komplex mit FVIIa als chemotaktische

Substanz. Beide Formen von TF hatten eine chemotaktische Wirkung auf glatte Muskelzellen. Im Gegensatz zu den obigen Daten schließt dies eine Signaltransduktion durch die zytoplasmatische Domäne aus. Es konnte gezeigt werden, dass FVIIa gebunden an TF auf humanen Fibroblasten die Konzentration von PDGF-BB, die zur Induktion zielgerichteter Migration notwendig ist, um das 100-fache vermindert (39). Durch den Gebrauch von spezifischen Inhibitoren der Phospholipase C und der Phosphatidylinositol-3'-kinase konnte gezeigt werden, dass der oben genannte Zusammenhang abhängig von der Phospholipase C, aber unabhängig von der Phosphatidylinositol-3'-kinase ist (39). In diesen Studien war die katalytische Aktivität von FVIIa unabdingbar für diese Ergebnisse. Die durch FVIIa/TF erzeugte Signaltransduktion benötigt also die proteolytische Aktivität von FVIIa, ist aber unabhängig von der Thrombinbildung. Es kann sogar unabhängig von der zytoplasmatischen Domäne sein. Deshalb wurde postuliert, dass die Signaltransduktion durch FVIIa/TF einen zusätzlichen Rezeptor involvieren muss, z.B. einen proteaseaktivierten Rezeptor (PAR).

Bisher konnten 4 solcher Rezeptoren identifiziert werden. PAR 1, 3 und 4 werden alle durch Thrombin aktiviert. Im Moment ist nur Trypsin als Ligand für PAR2 bekannt. Ob PAR2 auch als Ligand für FVII/TF fungiert, ist noch unklar. Camerer und Kollegen (9) haben gefunden, dass PAR2 möglicherweise direkt durch FVIIa/TF und indirekt durch FVII/TF generierten FXa aktiviert wird. Im Gegensatz zu diesen Daten gibt es eine andere Studie, die keinerlei Beteiligung der PARs an den genannten Effekten beschreibt (29).

In einer weiteren Arbeit wird eine über PAR-2 vermittelte, vermehrte Zellmigration über eine TF-FVIIa spezifische Hochregulierung von IL-8 beschrieben (20).

IL-8 ist wie TF an Prozessen der Gewebsreparatur, Entzündung, Angiogenese und Tumormetastasierung beteiligt. Ähnlich wie für die TF-Expression, scheint auch für die IL-8 Expression eine Korrelation zum metastatischen Potential einer Tumorzelle zu existieren. IL-8 ist ein Mitglied der Chemokinfamilie und fungiert als chemotaktisches Agens für Neutrophile und Lymphozyten.

Neuere Studien belegen aber auch eine Funktion in der Induktion von Tumorwachstum und Metastasierung. Als ein autokriner Faktor ist IL-8 in der Lage die Tumorzellinvasion und die Chemotaxis von Tumorzellen zu stimulieren. Außerdem kann durch die Tumorzellsekretion von IL-8 die Überlebensdauer, die

Matrixmetalloproteinasenproduktion, sowie die endotheliale Zellproliferation und damit die Vaskularisation von entstehenden Tumoren stimuliert werden.

Brustkrebszellen exprimieren TF konstitutiv. In Untersuchungen führte die Zugabe von FVII zu diesen Zellen zu einer deutlichen Hochregulierung von IL-8. Dies resultierte in einer deutlichen Vermehrung von Zellmigration und -invasion. Dieser Effekt konnte durch gezielte Blockade der Bindung von FVII an TF deutlich geschwächt werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis führte die Zugabe von SLIGKV, einem spezifischen Agonisten von PAR-2. Auch unter dieser Maßnahme konnte die Expression von IL-8 deutlich gesteigert werden. Diese Beobachtungen suggerieren, dass die FVIIa induzierte IL-8 Expression via PAR-2 vermittelt wird.

1.2. Fragestellung:

Das Aktin-bindende Protein 280 assoziiert mit der zytoplasmatischen TF-Domäne und konnte als essenziell für die normale Zellmigration identifiziert werden. Durch die Signaltransduktion über TF gelang es, eine molekulare Verbindung zwischen TF und dem Zytoskelett herzustellen. Auch die Phosphorylierung des sogenannten Focal Adhesion Protein (FAK), einer nicht-rezeptor Protein Tyrosinkinase, die bei der Zelladhäsion mitwirkt, scheint der TF-abhängigen Aktin-Filament Organisation zu folgen. FVIIa könnte durch Bindung an TF über diesen Mechanismus Migrationsprozesse steigern. In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung von proteolytisch inaktivem FFR-FVIIa auf die Migration von J82 Tumorzellen untersucht werden, um TF vermittelte Effekte weitergehend zu analysieren.

2. Methoden und Materialien

2.1. Zellkultur

HUVEC-Zellen (Promocell, Heidelberg, Deutschland) wurden in Endothelial growth medium mit 10% FCS (Promocell, Heidelberg, Deutschland) in T 175 Flaschen (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) bei 5% CO₂ und 37°C in Brutschränken (Hera Cell, Heräus, Hanau, Deutschland) kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 Stunden. Bei mikroskopisch dokumentierter Konfluenz der Zellen, erfolgte eine Zellsplittung im Verhältnis 1:3. Dabei wurden die Zellen zunächst einmal mit 5 ml Hepes buffer (Promocell, Heidelberg, Deutschland) gespült. Die Ablösung der Zellen erfolgte durch das Aufbringen von 5 ml Trypsin-EDTA (Promocell, Heidelberg, Deutschland). Die Neutralisierung des Trypsins erfolgte durch 5 ml Trypsin neutralising Solution (Promocell, Heidelberg, Deutschland). Danach wurde die Zell-Trypsin Suspension bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 2 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Am Ende des Zentrifugiervorganges wurde der Überstand abgenommen und die Pellets in insgesamt je 2 ml endothelial growth medium mit 10% FCS (Promocell, Heidelberg, Deutschland) pro neu zu beschickender Flasche resuspendiert und auf neue T 175 Flaschen (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) im Verhältnis 1:3 verteilt. Die Zellkulturflaschen wurden dann mit jeweils 8 ml Endothelial growth medium 10% (Promocell, Heidelberg, Deutschland) auf 10 ml aufgefüllt. Verwendet für die Weiterverarbeitung wurden die Zellpassagen 2 und 5. Die Expression von TF wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie gesichert.

J82 Zellen wurden in DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, USA) versetzt mit 1% L-Glutamin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1% Penicillin-Streptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (Gibco, Carlsbad, CA, USA) in T 175 Flaschen (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) bei 5% CO₂ und 37° C in Hera Cell Brutschränken (Heräus, Hanau, Deutschland) kultiviert.

Bei mikroskopisch dokumentierter Konfluenz der Zellen erfolgte eine Zellsplittung. Dabei gelang nach Abnahme des Mediums die Ablösung der Zellen durch Aufbringen von 3 ml Trypsin-EDTA (Clonetics, San Diego, CA, USA). Die Neutralisierung des Trypsins erfolgte durch 3 ml Trypsin neutralisierende Lösung (Clonetics, San Diego, CA, USA). Danach wurde die Zell-Trypsin Suspension bei

1000 Umdrehungen pro Minute für 2 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Am Ende des Zentrifugiervorganges wurde der Überstand abgenommen. Die Pellets wurden in insgesamt je 2 ml serumhaltigem DMEM (Promocell, Heidelberg, Deutschland) pro neu zu beschickender Flasche resuspendiert und auf neue T 175 Flaschen (Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) im Verhältnis 1:2 verteilt. Die Zellkulturflaschen wurden dann mit jeweils 8 ml DMEM (Promocell, Heidelberg, Deutschland) auf 10ml aufgefüllt.

Zur Weiterverarbeitung wurden konfluente Zellen in Medium ohne FBS-Zusatz für 12 Stunden kultiviert.

Dann erfolgte eine Resuspension der Zellen durch Aufbringen von 3 ml Trypsin-EDTA (Clonetics, San Diego, CA, USA) für 2 Minuten. Die Neutralisierung des Trypsins erfolgte durch 3 ml TNS (Clonetics, San Diego, USA). Danach wurden die Zell-Trypsin Suspension in ein 50 ml Falcon (Becton and Dickinson, Palo Alto, USA) überführt und bei 1000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Nach Ende des Zentrifugiervorganges wurde der Überstand abgenommen und die Zellen zweimal mit HBS [0,8g NaCl (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,037g KCl, (Sigma, St. Louis, MO, USA) 0,0135 Na₂HPO₄ (Sigma, St. Louis, MO, USA) H₂O, 0,1g Dextrose (Sigma, St. Louis, MO, USA), 0,5g HEPES (Sigma St. Louis, MO, USA) versetzt mit 5 mmol CaCl (Sigma St. Louis, MO, USA)] gewaschen. Darauf wurden die Zellen in HBS resuspendiert.

2.2. FACS Analyse:

Die Expression von Tissue factor wurde vor Weiterverarbeitung der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) gemessen. Dazu wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt: Es wurden zweimal jeweils ca 5000 Zellen in Suspension in ein Röhrchen überführt. Die Zellsuspensionen wurden bei 1600 Umdrehungen und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt und die verbliebenen Pellets in je 45 µl PBS (Sigma St. Louis, MO, USA,) resuspendiert. Zu den Proben wurde dann 5µl Tissue Factor Antikörper 6B4 (W. Ruf, La Jolla, CA, USA), anti-PAR-2 (SAM11, Santa Cruz Biotechnologies, USA) oder anti-PAR-1 (WEDE, Immunotech, Deutschland) oder Isotyp Kontrolle hinzugegeben. Die Proben wurden dann für 30 Minuten im dunklen Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 3 ml PBS dazugegeben.

Die Proben wurden dann abermals bei 1600 Umdrehungen und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets wurden jeweils in 100µl PBS aufgenommen.

Konnten die Proben nicht sofort verarbeitet werden, wurden sie durch Zugabe von je 200µl 1-prozentigem Paraformaldehyd (Sigma, St. Louis, MO, USA) fixiert und innerhalb der nächsten 24 Stunden analysiert.

Die FACS-Analyse wurde mit Hilfe eines FACS-Calibur Gerätes der Firma Becton and Dickinson mit einem 488 nm Argon Laser bei 500 mW durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit wurde durch Kalibration sichergestellt (CaliBRITE, Becton-Dickinson, Palo Alto, CA, USA). Die Fluoreszenzintensität wurde als Mittelwert für die logarithmische Skala von 1 bis 1026 Kanälen ermittelt. Die Daten wurden registriert und gespeichert. Zur Analyse der Daten wurde das Softwareprogramm Cellquest (Becton-Dickinson, Palo Alto, CA, USA) auf einem Macintosh Betriebssystem verwendet.

2.3. Liposomale Zelltransfektion

HUVEC-Zellen, die nach oben beschriebener Methode kultiviert wurden, wurden am Vortag der Transfektion im Verhältnis 1:2 auf mit Gelatine beschichteten T 175 Flaschen (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) ausgelegt. Das Beschichten der Flaschen erfolgte mit 0,2% Gelatine (Gelatin G-9391, Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline D-8537, Sigma, St. Louis, MO, USA). Jeweils 5 ml Gelatine in PBS wurde auf je eine T 175 Flasche (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) verteilt. Diese Lösung inkubierte für 2 Stunden bei 37°C und wurde nach Ablauf dieser Zeitspanne wieder abgenommen. Der Ansatz für die Transfektion selbst bestand in 2µg Plasmid pEGFP-TF, oder pEGFP-c1, oder pEGFP-TFΔcyt , 1500 µl EC Buffer (Qiagen, Valencia, CA, USA), gemischt mit 48µl Enhancer (Qiagen, Valencia, CA, USA). Diese Suspension ruhte dann 5 Minuten bei 37° Raumtemperatur. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 150µl Effectene (Qiagen, Valencia, CA, USA) zugegeben. Diese Suspension ruhte dann für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit wurden 24 ml M199 Medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) plus 20%-igem FCS auf den Zellrasen in den T 175 (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) vorgelegt. Zu dem Komplex Plasmid, Buffer,

Enhancer und Effectene wurden dann 9 ml M199 Medium gegeben (Sigma, St. Louis, MO, USA). Diese Mischung wurde dann ebenfalls auf dem Zellrasen verteilt. Die so bearbeiteten Zellen wurden nun für 18 Stunden im Brutschrank bei 37° und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit Detach Kit (Promocell, Heidelberg, Deutschland) abgelöst und verarbeitet. Die Tranfektionsrate wurde mikroskopisch bestimmt.

2.4. Zellmigrationsassays

Für die Migrationsassays wurden serumfrei inkubierte J82-Zellen verwendet. Zum Zeitpunkt der Assays lag eine Zellkonfluenz von etwa 80% vor. Die Zellen wurden für 18 Stunden mit serumfreiem Medium (DMEM, Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) inkubiert. Unmittelbar vor Beginn des Migrationsassays (QCM Chemicon, Tenecula, CA, USA) wurden die Zellmorphologie und die ungefähre Zellzahl lichtmikroskopisch ermittelt. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem Waschvorgang erfolgte die Zugabe von 5 ml Trysin EDTA (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), das für 10 Minuten bei 37° C inkubiert wurde. Die Zellen wurden vorsichtig abpipettiert und mit DMEM Vollmedium (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurde das Trypsin EDTA (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) neutralisiert. Die Zellen wurden dann bei 1500 Umdrehungen pro Minute für insgesamt 10 Minuten zu einem Pellet zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml DMEM ohne FCS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) resuspendiert und die Zellen mittels einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und so verdünnt, dass sich je 1 Mio Zellen in 1 ml DMEM (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) befanden. Die Fibronektin beschichteten Platten für das Assay (QCM Chemicon, Tenecula, CA, USA) wurden vor Benutzung auf eine Temperatur von 25° C erwärmt.

Die Abdeckung der Testplatte (Migrationsassay QCM Chemicon, Tenecula, CA, USA) wurde entfernt und die oberste Reihe der Näpfe unterhalb der Boyden Kammern mit 300µl DMEM ohne FCS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) gefüllt. In dieses Medium wurden in verschiedenen Experimenten jeweils 20µM PD 98059, 20µM SB 203580, 20µM anti-β1 (Chemicon, Tenecula, CA, USA) und 20µM anti-TF 6B4 (W. Ruf, La Jolla, USA) zugegeben. In einem weiteren Versuch

wurde in das Medium in verschiedenen Versuchsansätzen jeweils 100, 200, 300, 400 und 500µM FFR-FVIIa (Novo Nordisk, Dänemark) zugegeben.

In den verschiedenen Versuchen wurde dann 1300µl DMEM ohne FCS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) auch in die zweite Reihe der Kontrollplatte unterhalb der Boyden Kammern gefüllt. Die zuvor präparierten Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und eine Zellsuspension mit jeweils 60000 Zellen in 300µl DMEM ohne FCS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurde in eine fibronectinüberzogene Boyden Kammer der Testplatte gegeben. Dann wurde die Abdeckung der Kontrollplatte entfernt und dieselbe Anzahl Zellen in den fibronectinüberzogenen Kontrollnapf der Kontrollplatte gefüllt. Dieses diente als Adhäsionskontrolle für die vorher beschriebene, zu testende Probe. Genauso wurde mit derselben Anzahl Zellen verfahren, die in die BSA-überzogene Boydenkammer der Kontrollplatte gegeben wurden. Diese Zellen dienten als Migrationskontrolle für die oben beschriebene, zu testende Probe.

Für die Migrationsassays wurden die mit den verschiedenen Plasmiden transfizierten HUVEC-Zellen der 2. und 5. Passage verwendet. Zum Zeitpunkt der Assays lag eine lichtmikroskopisch gesicherte Zellkonfluenz von etwa 80% vor. Die Transfektionsrate betrug ca. 33%. Die Zellen wurden für 18 Stunden mit serumfreiem Medium (Endothelial growth Medium, Promocell, Heidelberg Deutschland) inkubiert. Unmittelbar vor Beginn des Migrationsassays (QCM Chemicon, Tenecula, CA, USA) konnte die Zellmorphologie und die ungefähre Zellzahl lichtmikroskopisch ermittelt werden. Dann erfolgte ein einmaliger Waschvorgang der Zellen mit 5 ml HEPES Puffer (Promocell, Heidelberg, Deutschland). Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von 5 ml Trypsin/EDTA (Promocell, Heidelberg, Deutschland) für 5 Minuten bei 37°, dann wurden 5 ml Trypsin neutralisierende Lösung (Promocell, Heidelberg, Deutschland) zugegeben. Die Zellen wurden dann vorsichtig abpipettiert und bei 1500 Umdrehungen pro Minute für insgesamt 10 Minuten zu einem Pellet zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml endotheliales Wachstumsmedium ohne FCS (Promocell, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert und die Zellen mittels einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und so verdünnt, dass sich je 1 Mio Zellen in 1 ml endotheliales Wachstumsmedium ohne FCS (Promocell, Heidelberg, Deutschland) befanden. Die

Fibronectin beschichteten Platten für den Assay (QCM Chemicon, Tenecula, CA, USA) wurden vor Benutzung auf eine Temperatur von 25° C erwärmt.

Die Abdeckung der Testplatte (Migrationsassay QCM Chemicon, Tenecula, CA, USA) wurde entfernt und die oberste Reihe der Näpfe unterhalb der Boyden Kammern mit 300 µl endotheliales Wachstumsmedium ohne FCS (Promocell, Heidelberg, Deutschland) gefüllt. In dieses Medium wurde in den verschiedenen Versuchsansätzen jeweils 500µM FFR-FVIIa zugegeben. 300 µl DMEM ohne FCS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) wurde dann auch in die zweite Reihe der Kontrollplatte unterhalb der Boyden Kammern gefüllt. Die zuvor präparierten Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und eine Zellsuspension mit jeweils 60000 Zellen in 300 µl endotheliales Wachstumsmedium ohne FCS (Promocell, Heidelberg, Deutschland) in eine mit Fibronectin beschichtete Boyden Kammer der Testplatte gegeben. Dann wurde die Abdeckung der Kontrollplatte entfernt und die selbe Anzahl Zellen in unbeschichtete Kontrollnäpfe der Kontrollplatte gefüllt. Sowohl die HUVEC-Zellen, wie auch die J82 Zellen wurden dann bei jedem Versuchsansatz für 18 Stunden bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert.

Dann wurden 500 µl der Färbelösung (QCM Chemicon, Tenecula, CA, USA) in leere Näpfe gegeben. Von den Fibronectin überzogenen Näpfen der Kontrollplatte wurde dann mit jeweils einer sterilen Einmalpipette das Medium entfernt. Danach wurde in jeden dieser Näpfe 500 µl der Färbelösung (QCM Chemicon, Tenecula, CA, USA) gegeben. Dann wurden die Zellen in 4 Gesichtsfelder in einer 2-fachen Vergrößerung ausgezählt.

Mit einer Pipette wurde vorsichtig das Medium aus den mit Fibronectin beschichteten Boydenkammern der Testplatte entfernt, danach wurden die Boydenkammern mit Hilfe einer Pinzette aus der Testplatte herausgenommen. Noch darin befindliches Medium und am Boden haftende Zellen, wurden mit einem Wattestäbchen sorgfältig entfernt, ohne die Membran der Kammer zu verletzen und ohne die Unterseite der Kammer zu berühren. Nach Abschluss dieser Prozedur wurde die Kammer in einen Färbelösung enthaltenden Napf in der zweiten Reihe der Testplatte eingesetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. So wurde mit allen Boydenkammern der Testplatte verfahren. Ebenso mit den unbeschichteten Testkammern der Kontrollplatte. Nach Ende der Inkubationsphase wurde die Färbelösung (QCM Chemicon, Tenecula, CA, USA) der mit Fibronectin beschichteten Kontrollnäpfe mit einer Pipette abgenommen. Die Näpfe wurden mit je

1 ml PBS dreimal gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurden 300 µl PBS in jeden mit Fibronectin überzogenen Napf gegeben. Unter dem Mikroskop wurde dann die Zellmorphologie kontrolliert und die Zellen gezählt. In die Näpfe der dritten Reihe der Test- und der vierten Reihe der Kontrollplatte wurden genau 300 µl Extraktionspuffer (QCM Chemicon, Tenecula, CA, USA) gegeben. Ein Waschreservoir wurde mit destilliertem Wasser gefüllt. In dieses Reservoir wurden nun die Boydenkammern der Testplatte eingetaucht und unter vorsichtigem Hin- und Herbewegen von der Färbelösung gesäubert. Danach wurde die Innenseite der Kammer mit einem Wattestäbchen vorsichtig gereinigt, um nicht migrierte und abgestorbene Zellen zu entfernen. Durch Drehen der Kammer auf die Unterseite wurden dann die mit der Färbelösung gefärbten Zellen angeschaut. Die gereinigte Kammer wurde in den vorher vorbereiteten Extraktionspuffer gestellt. Diese hier beschriebenen Reinigungsschritte nach Beendigung der Inkubationsphase wurden so auch für alle anderen Test- und Kontrollkammern durchgeführt. Dann wurden Test- und Kontrollplatten für 5 Minuten auf einem Schüttler plaziert, um die gefärbten migrierten Zellen (QCM Chemicon, Tenecula, CA, USA) zu eluieren. Nach Abschluss dieses Vorgangs wurden jeweils 100 µl der gefärbten Lösung aus den Eluierungsnäpfen auf eine saubere Mikrotiterplatte übertragen.

Bei einer Wellenlänge von 540-570 nm wurde dann die optische Dichte bestimmt.

Dabei dienten die Proben der Kontrollplatte als Nullwert.

2.5. Faktor Xa Assay

1000 J82 Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet und auf 96-Napf Platten aufgebracht und für 24 Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 100 µl Zellpuffer (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,75 mM Na₂HPO₄, 5,5 mM Glucose, 2 mM CaCl₂, pH 7,4) gewaschen, resuspendiert und dann mit FVIIa (5 nM) und Faktor X (500 nM, American Diagnostica, Pfungstadt, Deutschland) inkubiert. Nach 30 Minuten wurden 50 µl-Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 150 µl 0,1 M EDTA gestoppt. Nach Zugabe von 50 µl Spektrozym Xa wurde die Faktor Xa-Bildung 30 Minuten später bei 405 nm photometrisch gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. Faktor Xa Bildung

Um die Aktivität von TF in J82 und HUVEC-Zellen zu messen, wurden Faktor Xa Assays durchgeführt. Wie in der Abbildung zu sehen ist, konnte mittels optischer Densitometrie in 3 unabhängigen Untersuchungen eine deutliche FXa Bildung in J82-, nicht aber in HUVEC-Zellen beobachtet werden. Dies unterstützt die Aussage, dass HUVEC-Zellen TF nur in minimalen Mengen exprimieren, da durch die Bindung von FVII an TF und die subsequente Aktivierung der Gerinnungskaskade FX zu FXa aktiviert, also generiert wird.

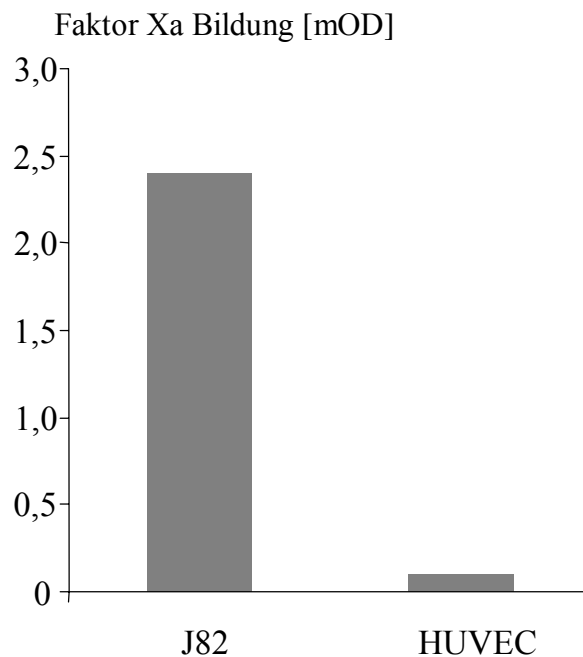


Abbildung 3:
TF Aktivität von J82 Zellen und HUVEC

3.2. TF-Expression im FACS

Es wurden verschiedene Migrationsassays durchgeführt. Die dabei benutzten Zelllinien waren J82 und HUVEC-Zellen. J82 Zellen sind Blasenkarzinomzellen, die konstitutiv große Mengen von TF, aber kein PAR-2 und nur wenig PAR-1 exprimieren. Der Nachweis der Expression von TF und PAR-1 bzw. PAR-2 wurde durch die Durchführung einer FACS Analyse erbracht (Abb. 4). Der linke Teil der Abbildung zeigt eine deutliche Expression von TF, jedoch nur eine geringe Expression von PAR-1 und eine völlig fehlende Expression von PAR-2.

Im rechten Teil der Abbildung ist zu sehen, dass HUVEC-Zellen, humane Nabelschnurepithelzellen, eine geringe Menge PAR-2, aber eine große Menge PAR-1 exprimieren. Allerdings ist nur eine marginale Expression von TF in diesen Zellen nachweisbar.

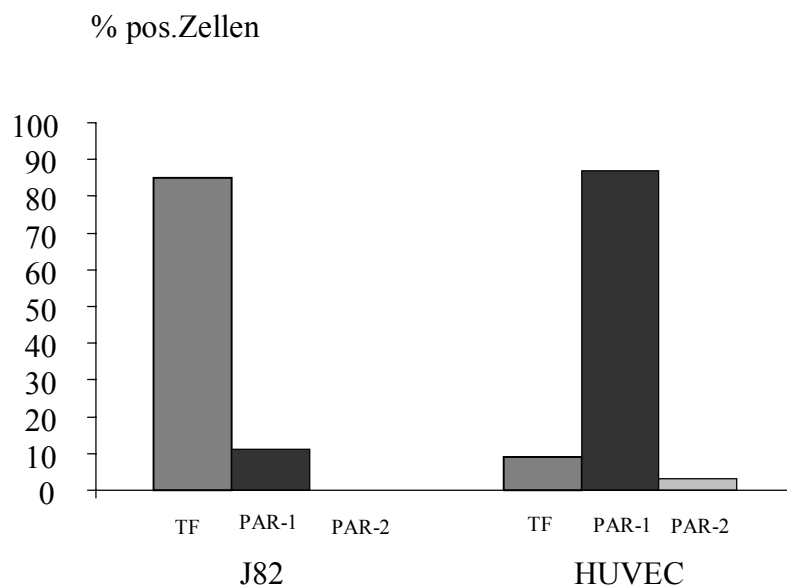


Abbildung 4
Oberflächenexpression von TF, PAR-1 und PAR-2 in J82
und HUVEC

Da wir in dieser Arbeit die Bedeutung von TF für die FVIIa induzierte Zellmigration ohne Aktivierung von PAR-2 untersuchen wollen, haben wir J82 Zellen als Modell ausgewählt. Um eine Aktivierung von PARs durch FVIIa auszuschließen, verwandten wir proteolytisch inaktiven FVIIa, nämlich FFR-FVIIa (Novo Nordisk, Dänemark).

HUVEC-Zellen dienen in dieser Arbeit als Modell für die Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne, da sie nur marginale Mengen TF konstitutiv exprimieren und so geeignet sind als Transfektionsmodell für TF und eine TF-Mutante, der die zytoplasmatische Domäne fehlt.

3.3. Wirkung von FVIIa und FFR-VIIa auf die Zellmigration

Zur Untersuchung der Wirkung von FVIIa und FFR-FVIIa auf die Zellmigration führten wir Boydenkammer Migrationsassays durch. J82-Zellen wurden auf eine Fibronectinmatrix gegen ein Medium, das mit proteolytisch inaktivem FVIIa (FFR-FVIIa) in aufsteigender Konzentration versetzt war, aufgebracht. Die Zellen wurden auf eine Migrationsmatrix aufgetragen, die im wesentlichen aus Fibronectin bestand. Somit wurde also eine Chemotaxis und gleichzeitig ein Gradient erzeugt. Die Ergebnisse dieses Versuch sind in der Abbildung 4 veranschaulicht. Im rechten Teil der Abbildung sind Bilder der migrierten Zellen exemplarisch zu sehen, die einen ersten, unquantifizierten optischen Eindruck über das Ausmaß der Migration bei einer Konzentration ohne Zusätze, mit 500nM FFR-FVIIa und mit FVIIa geben. Insgesamt führten wir 3 solcher Experimente durch.

Die durch optische Densitometrie ermittelten, quantifizierten Ergebnisse sind im linken Anteil der Abbildung zu erkennen. Es zeigt sich ein vergleichbares Ergebnis für FFR-FVIIa und FVIIa., sowie eine verminderte Migration der Kontrolle. Die Migrationsrate wurde dosisabhängig mit einer Sättigung bei 500 nMol FVIIa und FFR-FVIIa gesteigert. Die Kontrolle bestand bei diesem Versuch aus J82 Zellen, die gegen eine Medium ohne Zugaben migrierten. Wurden unbeschichtete Kammern verwendet, fand sich kein Effekt von FFR-FVIIa oder FVIIa auf die Zellmigration.

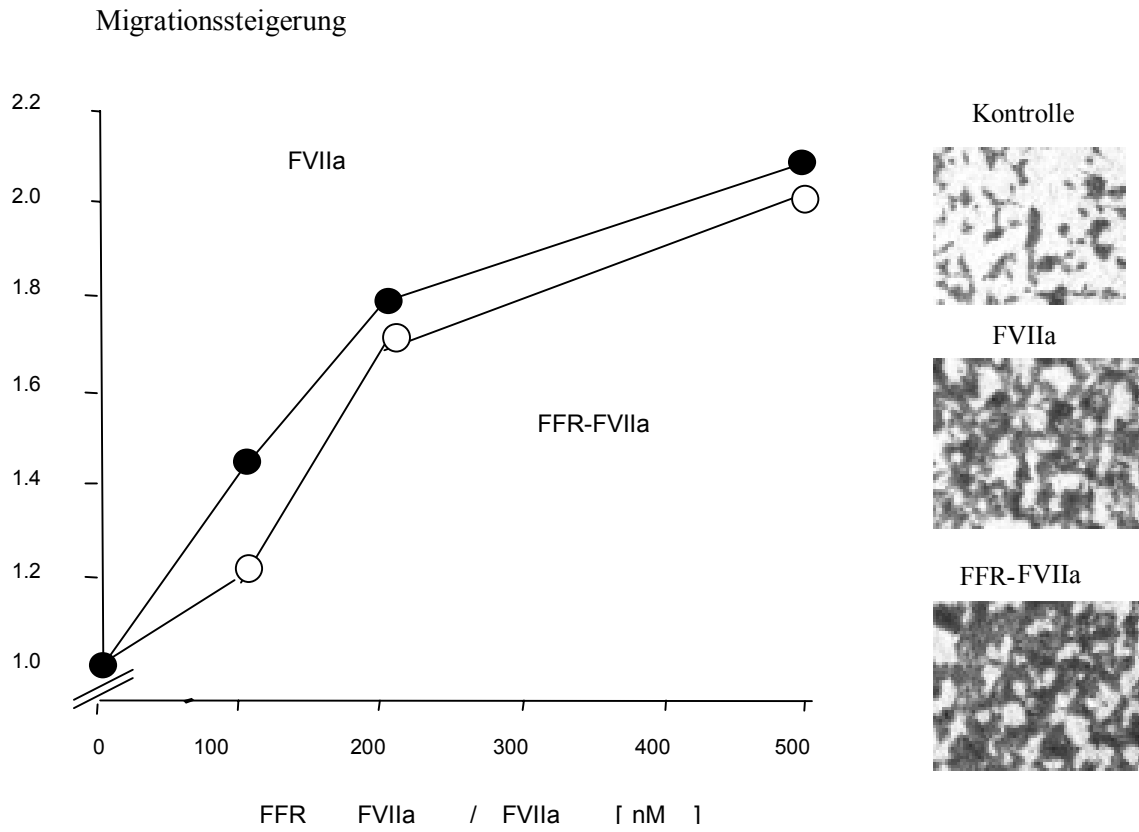


Abbildung 5
Steigerung der Migration von J82 Zellen durch FVIIa und FFR-FVIIa

3.4. Rolle der zytoplasmatischen Domäne von TF

Durch FACS Untersuchungen wurde gezeigt, dass HUVEC unter serumfreien Bedingungen nur minimale Mengen TF exprimieren. Deshalb wurden HUVEC zunächst mit einem Plasmid, das für TF kodiert, transfiziert. Der eine Teil der Zellen wurde mit einem Plasmid, das für Tissue factor inklusive der zytoplasmatischen Domäne (TF Wildtyp), der andere Teil der Zellen mit einem Plasmid, das für TF ohne zytoplasmatische Domäne kodiert, transfiziert. Die Transfektionsrate betrug im Durchschnitt 33%. In einem Boyden Chamber Migrationsassay wurde dann die Migration dieser Zellen auf einer Fibronectinmatrix gegen FFR-FVIIa beobachtet. In der Abbildung ist bei den mit dem Wildtyp TF transfizierten HUVEC eine 1,7-fache Migrationssteigerung zu erkennen. Die Zellen, die die zytoplasmatische Domäne nicht enthalten, in der Abbildung die rechte Säule, zeigen ein ähnliches Migrationsverhalten wie untransfizierte HUVEC, die, hier als ganz linke Säule zu erkennen, als Kontrolle dienen (Abb. 6).

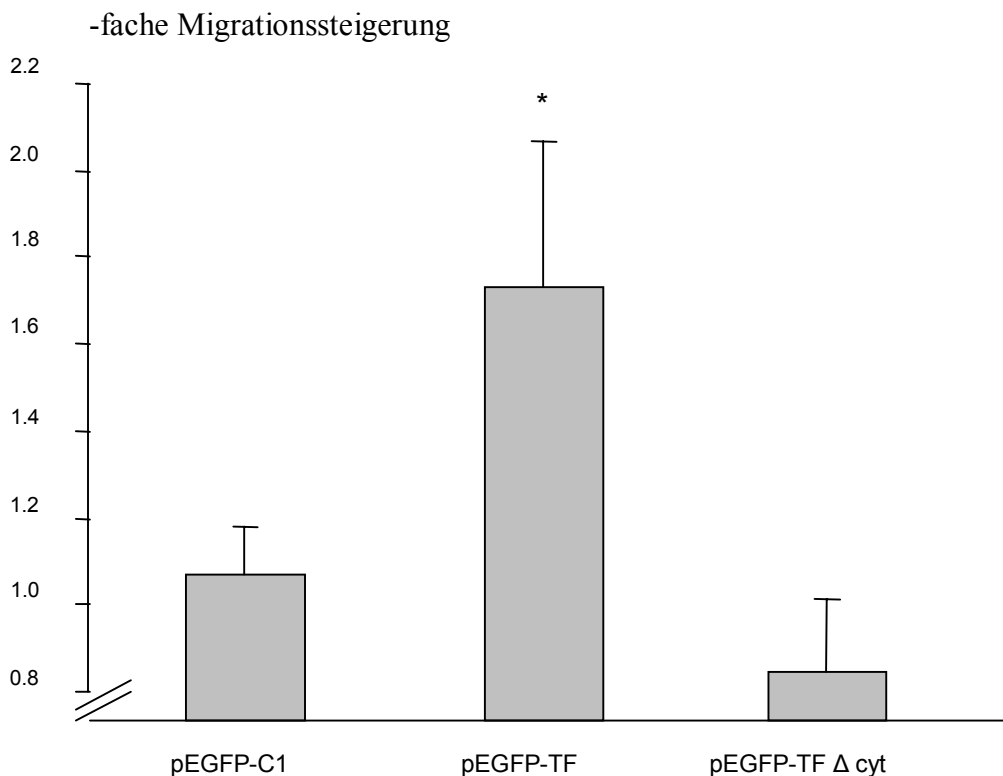


Abbildung 6
Migrationsassay von HUVEC gegen FFR-FVIIa nach Transfektion von pEGFP-C1, pEGFP-TF oder pEGFP-TF Δ cyt

3.5. Tissue Faktor Spezifität

Um zu untersuchen, ob die Migration gegen FVIIa durch eine Inaktivierung von TF verändert wird, wurde der Migrationsassay in Gegenwart eines inhibitorischen anti-TF Antikörper durchgeführt. In Vorbereitung auf diesen Versuch wurde zunächst die Expression von TF mittels einer FACS Analyse überprüft. Die Zellen wurden dann auf eine Migrationsmatrix aus Fibronectin aufgebracht und die Migration gegen 500 nM FFR-FVIIa gemessen. Bei einem Teil der Zellen wurde bereits 60 Minuten vor Zugabe von FFR-FVIIa anti-TF Antikörper zugegeben, um TF zu blockieren. Wie im rechten Teil der Abbildung zu sehen ist, vermindert sich die Migration der J82 Zellen bei Zugabe von anti-TF um 53%. Als Kontrolle, links in der Abbildung zu sehen, dienten J82 Zellen, die gegen ein Medium ohne Zugabe von anti-TF, bei ansonsten gleichem Versuchsaufbau, migrierten.

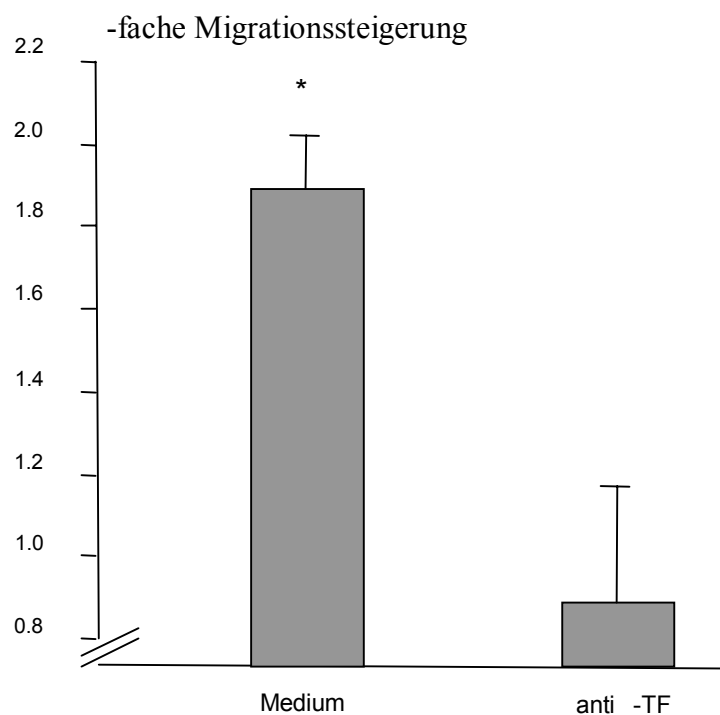


Abbildung 7
Hemmung der Migrationssteigerung durch FFR-FVIIa
in Gegenwart von inhibitorischem anti-TF Antikörper

3.6. Die Rolle von $\beta 1$ Integrinen bei der Migration

In einem weiteren Versuch wurden J82 Zellen, nachdem ihre TF-Expression durch eine FACS Analyse gesichert war, auf eine mit Fibronectin beschichtete Migrationsmatrix aufgetragen. Das Medium enthielt in einem Teil der Proben anti- $\beta 1$. Die Zellen wurden für 60 Minuten mit inhibitorischem Antikörper für $\beta 1$ inkubiert, bevor 500 nM FFR-FVIIa in die untere und die Zellen in die obere Boydenkammer gegeben wurden.

In Gegenwart von $\beta 1$ Antikörper, war eine Reduktion der Migration um 40% zu beobachten (Abbildung 8).

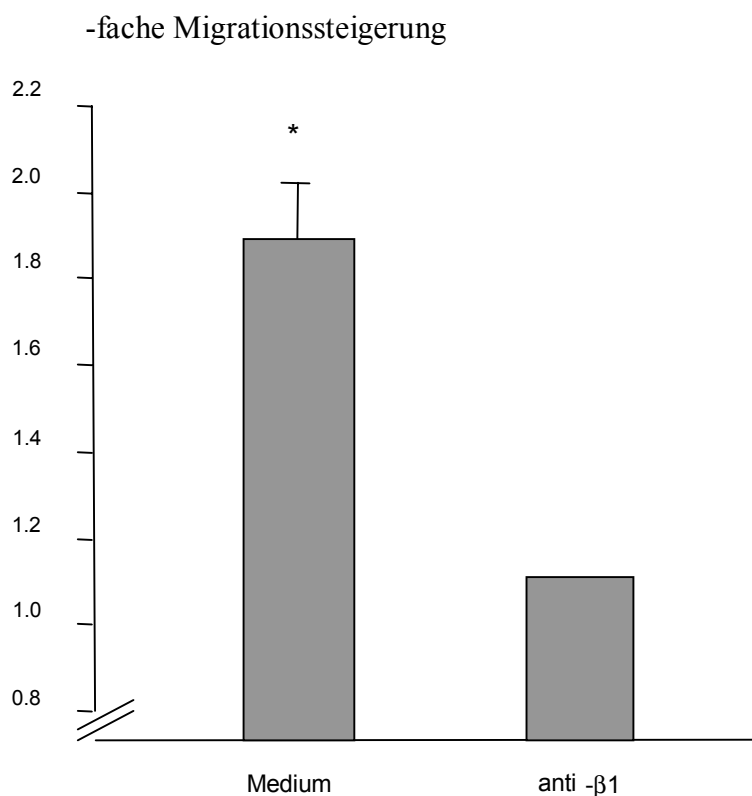


Abbildung 8
Hemmung der Migration unter Zugabe von anti- $\beta 1$
Antikörper

Um die Mechanismen der Effekte von FFR-FVIIa auf die Migration besser zu verstehen, wurde die Oberflächenexpression von TF und $\beta 1$ auf J82-Zellen in An- und Abwesenheit von FFR-FVIIa untersucht. Dabei konnten keine wesentlichen Unterschiede in beiden Versuchsanordnungen festgestellt werden.

Die Expression sowohl von TF, als auch von $\beta 1$ unterschieden sich nicht signifikant in An- und Abwesenheit von FFR-FVIIa (Abbildung 9).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Steigerung der Migration durch FFR-FVIIa nicht durch die $\beta 1$ Expression zu erklären ist.

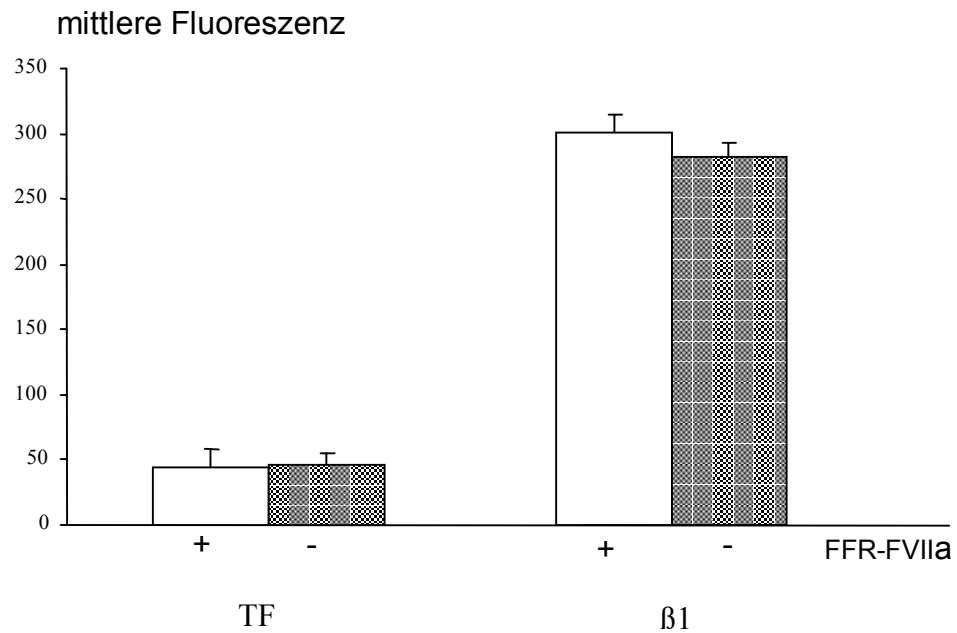


Abbildung 9
Oberflächenexpression von TF und $\beta 1$ Integrinen auf J82 in An- und Abwesenheit von FFR-FVIIa

3.7. Pharmakologische Inhibitoren der MAP Kinasen p38

Ähnliche Ergebnisse wie unter dem Punkt 3.2. subsumiert zeigt die Zugabe von Inhibitoren gegen die MAP Kinasen p38 zum Migrationsmedium bei J82 Zellen in einem Boydenchamber Migrationsassay.

Als Kontrolle bei diesem Versuchsaufbau dienten Zellen, die gegen FFR-VIIa ohne Zusätze migrierten.

Um zu untersuchen welche mögliche Signaltransduktionsvorgänge über TF-Ligandeninteraktion alteriert werden könnten, wurden pharmakologische Inhibitoren für die MAPK p38 verwendet.

Die FFR-FVIIa induzierte Steigerung der Migration gegenüber Fibronectin wurde aufgehoben in Gegenwart des p38 Inhibitor SB203580 (Abbildung 10). Dies könnte ein möglicher Hinweis für die Bedeutung einer p38 induzierte Signaltransduktion, die ebenfalls zu einer Steigerung der Migration führt, sein. Die Anzahl der migrierten Zellen ist in der Abbildung als Mittelwert aus insgesamt 8 Versuchen angegeben.

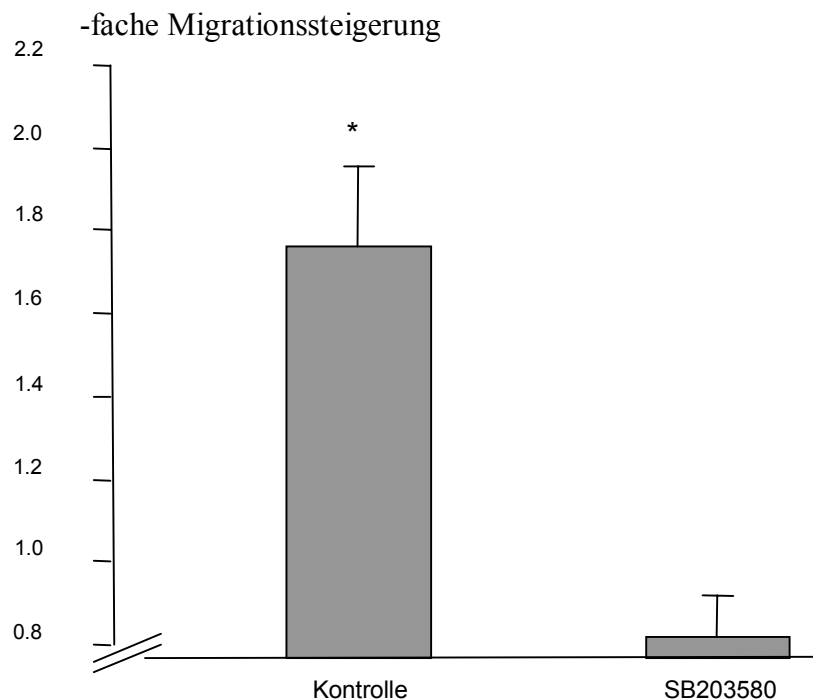


Abbildung 10
Hemmung der p38 MAP-Kinase reduziert die Migration durch FFR-FVIIA

Diskussion:

Zusammenfassend kommt TF eine zweifache Rolle zu. Auf der einen Seite fungiert TF als ein transmembranöser Rezeptor, auf der anderen Seite könnte TF als Kofaktor für die Stimulation protease-aktivierter Rezeptoren dienen. Der Nettoeffekt ist möglicherweise abhängig von der Zahl der zur Verfügung stehenden Rezeptoren.

In unseren Versuchen konnte PAR-2 nicht und PAR-1 nur in geringen Mengen in J82-Zellen nachgewiesen werden. Außerdem konnte PAR-2 auch nach Transfektion in HUVEC nicht nachgewiesen werden.

Da PAR-2 wahrscheinlich durch FVIIa aktiviert wird und die Inhibierung von TF die Migrationsteigerung und/oder die Aktivierung von p38 aufgehoben hat, könnten FVIIa und FFR-FVIIa durch TF an der Signaltransduktion beteiligt sein.

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass zwar die zytoplasmatische Domäne, nicht aber die proteolytische Aktivität für das unterschiedliche Migrationsverhalten verantwortlich zu sein scheint.

Ein Hinweis für eine Rolle der zytoplasmatischen TF-Domäne bei Signaltransduktionsvorgängen ist, dass die zytoplasmatische Domäne von TF in Endothelzellen (HUVEC) primär nicht phosphoryliert ist.

Es wurde gefunden, dass die Palmitoylierung von TF eine Phosphorylierung desselben verhindert. Möglicherweise wird durch diesen Prozess die zytoplasmatische Domäne von TF näher an die Membran gebracht und als Folge dessen der Zugang relevanter Kinasen an die Domäne beschränkt (11). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Migration nicht durch die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne, sondern möglicherweise durch andere Mechanismen bedingt ist.

Die Tatsache, dass das Aktin-bindende Protein 280 mit der zytoplasmatischen TF-Domäne assoziiert und als essenziell für die normale Zellmigration identifiziert werden konnte, ist ein weiterer Hinweis für eine signaltransduktorische Funktion von TF. Durch Untersuchungen zur Signaltransduktion via TF gelang es, eine molekulare Verbindung zwischen TF und dem Zytoskelett herzustellen. Auch die Phosphorylierung des sogenannten Focal Adhesion Protein (FAK), einer nicht-Rezeptor Protein Tyrosinkinase, die bei der Zelladhäsion mitwirkt, scheint der TF abhängigen Aktin-Filament Organisation zu folgen. Diese Erkenntnisse und die

Daten zur Geninduktion zeigen, dass die Zellmigration eine Zellfunktion ist, die durch die Signaltransduktion via TF modifiziert werden könnte.

FVIIa aktiviert PAR-2 und könnte so die Migrationsantwort in einigen Zellen modulieren. Um andere TF-abhängige Signalwege zu untersuchen, haben wir FVIIa und proteolytisch inaktiven FFR-FVIIa verglichen. Die Behandlung mit D-Phe-L-Phe-L-Arg-Chlormethylketon macht FFR-FVIIa proteolytisch inaktiv, erhält aber dessen Affinität für TF. Für unsere Untersuchungen haben wir die menschliche Blasenkarzinomzelllinie J82, die hohe Mengen von TF, aber nur geringe Mengen von PAR-1 und kein PAR-2 exprimiert, verwendet.

In den beschriebenen Versuchen veränderte FFR-FVIIa nicht die Migrationsantwort gegen unbeschichtete Membranen, die Migration von J82 Zellen gegen immobilisiertes Fibronectin war allerdings dosisabhängig durch einen chemotaktischen Gradient von FFR-FVIIa oder FVIIa in einem Boyden Chamber Assay gesteigert. Bei diesen dosisabhängigen Versuchen, wurde bei 500nM FFR-FVIIa eine Sättigung erreicht. Höhere Konzentrationen von FFR-FVIIa führten zu keiner weiteren Steigerung der Migration. Die Zugabe von FFR-FVIIa allein in die obere Kammer oder aber in beide Kammern der Migrationsassays führte, ebenso wie Migrationsversuche ohne Zugabe von FFR-FVIIa, zu keiner Veränderung der Migration. Die Chemokinese also ist unverändert und steigert die Migration über eine chemotaktische Aktivierung.

In Migrationsassays, in denen eine Migration gegen FVIIa erfolgte, konnte eine ähnliche Steigerung der Migration beobachtet werden, wie in den Versuchen mit FFR-FVIIa. Dies lässt vermuten, dass die proteolytische Funktion von TF für die Migration nicht benötigt wird.

Die Bindung von FFR-FVIIa und FVIIa an TF zeigte sich notwendig für eine Migrationssteigerung, da inhibitorische anti-TF Antikörper eine Steigerung der Migration verhinderten. Die Migrationssteigerung durch FFR-FVIIa benötigte Fibronectin, den Hauptliganden von $\beta 1$, da FFR-FVIIa allein die Migrationsantwort nicht modulieren konnte, $\beta 1$ Antikörper hingegen die Migrationssteigerung verhinderten.

Um die Mechanismen der durch FFR-FVIIa vermittelten Migrationssteigerung weiter zu untersuchen, überexprimierten wir Fusionsproteine von TF mittels liposomaler Zelltransfektion in HUVEC, die konstitutiv keine signifikanten Mengen an TF exprimieren. Bei den mit dem Wild-Typ-TF transfizierten Zellen konnte eine

deutliche Migrationssteigerung in Gegenwart von FFR-FVIIa beobachtet werden. Bei Zellen, die mit einer TF-Mutante, der die zytoplasmatische TF-Domäne durch Mutation des Lys 244 Kodons zu einem Terminationskodon fehlte, transfiziert wurden, erfolgte keine Migrationssteigerung.

Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung der zytoplasmatische TF-Domäne für die Stimulation der Zellmigration durch FFR-FVIIa.

Verschiedene Mechanismen tragen zu den Effekten von FFR-FVIIa in bezug auf die Migrationsantwort bei. Dazu gehören die Steigerung der Oberflächenexpression von Adhäsionsrezeptoren oder die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege.

Um diese Mechanismen genauer zu untersuchen, untersuchten wir die Expression von TF und $\beta 1$ in Anwesenheit von FFR-FVIIa in J82 Zellen.

Dabei fanden wir keine signifikante Änderung der Expression von TF und $\beta 1$, so dass die TF induzierte Migrationssteigerung unabhängig von der Oberflächenexpression von $\beta 1$ sein muß.

Ausgehend von den bisher beschriebenen Versuchen kommen wir zu folgender Aussage:

Der TF Ligand FFR-FVIIa führt unabhängig von der proteolytischen Aktivität, aber abhängig von der zytoplasmatischen Domäne zu einer Migrationssteigerung in J82 Zellen.

In weiteren Versuchen konnten wir zeigen, dass eine Inhibition der p38 MAP-Kinase durch den spezifischen p38 Inhibitor SB 20358, die durch TF induzierte Migrationssteigerung verhindert. Deshalb könnte die Aktivierung von p38 involviert sein, um eine Migrationssteigerung gegen Fibronectin zu induzieren.

Fibronectin scheint dabei als ein zusätzlicher Stimulus notwendig zu sein, da gegen FFR-FVIIa allein keine Migrationssteigerung beobachtet werden konnte.

FFR-FVIIa kann somit selbst nicht als ein chemotaktisches Agens betrachtet werden, sondern fungiert am ehesten als ein Kofaktor für eine Integrin- vermittelte Migration.

Die Vermutung, dass eine Signaltransduktion über die zytoplasmatische TF-Domäne existiert, wird durch die Beobachtungen zur Sequenzhomologie von TF einerseits und Zytokinrezeptoren andererseits, durch Phorbol-ester -induzierte Phosphorylierung (19) des zytoplasmatischen Anteils, durch die Phosphorylierung des Peptids durch Zelllysate identisch mit der zytoplasmatischen Domäne und die Interaktion der zytoplasmatischen Domäne mit dem aktin-bindenden Protein 280 (34), unterstützt.

Eine Rolle für die zytoplasmatische Domäne von TF auf zellulärer Ebene wurde in der Regulation der VEGF Expression in Krebszelllinien beschrieben (40).

Obwohl weitere Studien nötig sind, um die beschriebenen Signaltransduktionsmechanismen vollkommen zu verstehen, konnten wir in unseren Versuchen eine potentielle Rolle der zytoplasmatische TF-Domäne für eine verstärkte Zellmotilität *in vitro* identifizieren.

Der lösliche FVII/TF Komplex hat einen starken Effekt auf die Migration von glatten aortalen Muskelzellen (34). Das gesamte TF Molekül und die lösliche Form von TF, die der extrazellulären Domäne entspricht, in einem Komplex mit FVIIa, dienen als chemotaktische Substanz. Beide Formen von TF haben eine chemotaktische Wirkung auf glatte Muskelzellen. Dies spricht für einen Liganden, der TF/FVIIa bindet.

FVIIa und FFR-FVIIa binden mit verschiedener Affinität den inaktiven TF Pool, aber mit gleicher Affinität den aktiven TF-Pool (4). Dies mag eine Voraussetzung für die gesteigerte Zellmigration sein und würde auch die ähnlichen Effekte beider Agenzien erklären.

Der beobachtete Migrationseffekt bei hohen Konzentrationen von FVIIa und FFR-FVIIa könnte in den bisher nur sehr ungenau definierten Änderungen der quaternären TF Struktur bzw. der subzellulären Lokalisation von TF begründet sein.

Da verschiedene TF-Pools beteiligt sein könnten, wäre es möglich, dass die signaltransduktorische Funktion von TF höhere FVIIa Konzentrationen benötigt, als die Initiation der Gerinnungskaskade. Trotzdem ist es vorstellbar, dass in einem bereits formierten Thrombus ausreichend hohe Konzentrationen von TF erreicht werden können. An der Stelle einer Ruptur, eines thrombosierten Plaques oder in einer Wunde, könnten die beschriebenen Mechanismen zur Erhöhung der Migrationskapazität der umgebenden Zellen, zu vaskulärem Umbau und zur Wundheilung beitragen.

Die Tatsache, dass FVIIa und FFR-FVIIa nur in Gegenwart von Fibronektin die Zellmigration steigern, nicht aber gegen unbeschichtete Membranen, könnte durch einen Koэффекt erklärt werden.

Es wäre denkbar, dass es mehr als einen Signaltransduktionsweg gibt, der an verschiedenen Stellen moduliert werden kann.

Möglicherweise bindet ein anderer Rezeptor den FVIIa-TF-Komplex. Eine Aktivierung in Abhängigkeit von der proteolytischen Aktivität könnte die PAR Bildung aktivieren.

Bisher konnten vier solcher Rezeptoren identifiziert werden. PAR 1,3 und 4 werden alle durch Thrombin aktiviert. Im Moment ist nur Trypsin als Ligand für PAR-2 bekannt. Ob PAR2- auch als Ligand für FVII/TF fungiert, ist noch unklar. Camerer und Kollegen (9) haben gefunden, dass PAR-2 möglicherweise direkt durch FVIIa/TF und indirekt durch FVII/TF-generierten FXa aktiviert wird. Im Gegensatz zu diesen Daten, gibt es eine andere Studie, die keinerlei Beteiligung der PARs an den erwähnten Effekten beschreibt (29). Unsere Ergebnisse an J82 Zellen, die PAR-2 nicht exprimieren, schließen PAR-Rezeptoren als ursächlich beteiligt aus. Die im Ergebnisteil besprochenen Effekte von FVIIa und FFR-FVIIa bei Versuchen mit J82 Zellen müssen somit PAR-2 unabhängig sein. Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass die Zellmigration auch ohne Modulation durch PAR-2 über TF vermittelt werden könnte. Die Steigerung der Migration könnte auch indirekt über eine Bindung von Mediatoren vermittelt werden.

Untersuchungen an Brustkrebszellen beschreiben eine über PAR-2 vermittelte, vermehrte Zellmigration über eine TF-FVIIa spezifische Hochregulierung von IL-8 (20).

IL-8 ist, wie TF, an Prozessen der Gewebsreparatur, Entzündung, Angiogenese und Tumormetastasierung beteiligt. Ähnlich wie für die TF-Expression, scheint auch für die IL-8 Expression eine Korrelation zum metastatischen Potenzial einer Tumorzelle zu existieren. IL-8 ist ein Mitglied der Chemokinfamilie und fungiert als chemotaktisches Agens für Neutrophile und Lymphozyten. Neuere Studien belegen aber auch eine Funktion in der Induktion von Tumorwachstum und Metastasierung.

Als ein autokriner Faktor ist IL-8 in der Lage die Tumorzellinvasion und die Chemotaxis von Tumorzellen zu stimulieren. Außerdem kann durch die Tumorzellsekretion von IL-8 die Überlebensdauer, die Matrixmetalloproteinaseproduktion, sowie die endotheliale Zellproliferation und damit die Vaskularisation von entstehenden Tumoren stimuliert werden.

Brustkrebszellen exprimieren TF konstitutiv. In Untersuchungen führte die Zugabe von FVII zu diesen Zellen zu einer deutlichen Hochregulierung von IL-8. Dies resultierte in einer deutlichen Vermehrung von Zellmigration und -invasion. Dieser

Effekt konnte durch gezielte Blockade der Bindung von FVII an TF deutlich geschwächt werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis führte die Zugabe von SLIGKV, einem spezifischen Agonisten von PAR-2. Auch unter dieser Maßnahme konnte die Expression von IL-8 deutlich gesteigert werden. Diese Beobachtungen suggerieren, dass die FVIIa induzierte IL-8 Expression über PAR-2 vermittelt wird.

Die vermehrte Zellmigration könnte sowohl durch IL-8, als auch durch ein Produkt einer über TF modulierten Signaltransduktionskaskade bedingt sein. Möglicherweise agieren beide Substanzen als Kofaktoren. Allerdings ist dabei noch unklar, ob zur Generierung von IL-8, oder auch anderen chemotaktischen Substanzen, eine PAR-2 Aktivierung zwangsläufig ist. Die Erkenntnisse der oben erwähnten Studie unterstützen die Ergebnisse anderer Untersuchungen, die einen Migrationseffekt beschreiben, der zwar durch TF/FVIIa moduliert wird, jedoch unabdingbar an das Vorhandensein von PAR-2 gebunden ist (9).

In unseren Ergebnissen aus Versuchen mit Blasenkarzinomzellen, die kein PAR-2 exprimieren, konnte ein Migrationseffekt beobachtet werden, der unabhängig von PAR-2 zu sein scheint. TF scheint somit auch unabhängig die Migration zu steigern. In glatten Muskelzellen konnten unabhängig von PAR-2 auch migratorische Effekte beobachtet werden, die sowohl bei Zugabe von proteolytisch inaktivem FVIIa und bei Zugabe von proteolytisch aktivem FVIIa beobachtet werden konnten. Auch die Zugabe von Vollplasma, das auch geringe Mengen von FVIIa enthält, führte ebenso wie proteolytisch inaktiver FVIIa zu einer Migrationssteigerung (36).

Eine weitere Möglichkeit unsere Ergebnisse zu interpretieren, könnte ein alternativer Transduktionsweg sein, der über die Aktivierung z.B. von MAP Kinasen ebenfalls zu einer Steigerung der Zellmigration führt, ohne eine PAR-2 Aktivierung zu benötigen. Ebenfalls denkbar wäre das Vorhandensein von unabhängigen Kofaktoren, die sich in den Zellpopulationen unterscheiden und somit eine PAR-2 unabhängige Signaltransduktion via TF/VIIa ermöglichen könnte.

Auch ein kooperativer Effekt von TF und PAR-2 in einem Zellkulturmodell ist vorstellbar. Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der zelltypischen Rezeptorverteilung und könnte die unterschiedlichen Ergebnisse in bezug auf andere Zelllinien erklären.

Einen wichtigen Faktor der Zellmigration stellen Integrine dar. $\beta 1$ gehört zu der Familie der Integrine und ist als multifunktionaler Adhäsionsrezeptor zu betrachten. Integrine spielen bei der Migration, Proliferation, Invasion und Apoptose eine große Rolle. Ihre Hauptfunktion besteht in der Fähigkeit eine Anbindung an die extrazelluläre Matrix zu vermitteln, also eine Stabilisierung und Verankerung der Zelle zu schaffen. Allerdings können sie auch Zell-Zell Kontakte eingehen und so die Signaltransduktion alterieren. Koeffekte könnten dabei z.B. auch durch die Phosphorylierung der zyttoplasmatischen TF-Domäne entstehen.

Da Fibronektin der Hauptligand für $\beta 1$ ist, führten wir auch Migrationsversuche mit $\beta 1$ durch, bei denen primär J82 Zellen verwendet wurden.

In einem dieser Versuche wurde anti- $\beta 1$ zum Migrationsmedium gegeben. Dies hatte eine Verminderung der Migration um 40% zur Folge. Bei Zugabe von anti-TF vermindert sich die Migration sogar um 53% (Abb. 8).

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass sowohl TF, wie auch $\beta 1$ notwendig für die Migration ist. Dabei könnte man postulieren, dass es sich dabei um einen Koeffekt beider Faktoren handelt, der vor allem auf einer Modulation der Signaltransduktion beruht.

Da es neben $\beta 1$ noch eine Vielzahl anderer Integrine gibt, die möglicherweise eine Rolle bei der Zellmigration spielen, scheinen weitere Versuche, z.B. auch in Form von Inhibitorversuchen auf Basis eines Migrationsassays, sinnvoll zu sein.

Wie bereits in verschiedenen Publikationen gezeigt wurde, scheinen die MAP Kinasen eine wichtige Rolle bei der Transduktion extrazellulärer Signale in intrazelluläre Antworten, zu spielen. Spezifische Signalkaskaden von MAP Kinasen werden von einer Reihe Wachstumsfaktoren, Zytokinen, UV Licht, und anderen Stress induzierenden Agenzien stimuliert. Außerdem scheinen MAP Kinasen auch eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Apoptose, der Zelldifferenzierung, dem Remodeling des Zytoskeletts und der Regulierung des Zellzyklus zu spielen.

Es konnten bisher mindestens vier Isoformen der p38 MAP Kinasen Familie identifiziert werden.

P38 befindet sich in der Signaltransduktionskaskade unterhalb der Ras-verwandten GTP bindenden Proteine Rac und Cdc 42. Es wird direkt durch die Kinasen MKK3, MKK4 und MKK6 aktiviert. Die p38 MAP Kinase phosphoryliert und aktiviert verschiedene Transkriptionsfaktoren. Außerdem aktiviert p38 auch verschiedene

andere Kinasen, darunter MAPKAP Kinase-2, MAPKAP Kinase-3 und die p38 regulierte Protein Kinase. HSP 27, das Hitze-Schock-Protein-27, scheint ein physiologisches Substrat dieser Kinasen zu sein.

Multiple Proteinsysteme sowie Aktin, Myosin und Mikrotubuli sind in die Remodulierung des Zytoskeletts und die Zellmigration involviert. Obwohl es viele Erkenntnisse über die Regulation des Myosins in glatten Muskelzellen mittels Phosphorylierung gibt, weiß man wenig über das Remodeling des Aktins in glatten Muskelzellen. Es ist wahrscheinlich, dass viele der extrazellulären Signale, die das Remodeling des Aktins in nicht-Muskelzellen stimulieren, dasselbe auch in Muskelzellen tun. Trotzdem gibt es bisher wenige Hinweise darauf, wie die Signaltransduktionswege Zytokine und Wachstumsfaktoren an Proteine, die das Aktin-Remodeling in glatten Muskelzellen steuern, koppeln.

In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass PDGF, proinflammatorische Zytokine und IL-1 β den p38 MAP Kinase Signaltransduktionsweg aktivieren und die Zellmigration in glatten Muskelzellen mediiieren können (19).

In Zellmigrationsassays, für die zum Teil das Aktin-Remodeling notwendig ist, konnte gezeigt werden, dass in Monozyten auf Stimuli durch PDGF, IL-1 β und TGF- β hin eine Migration dieser Zellen ausgelöst werden konnte. PDGF und IL-1 β stimulierten konzentrationsabhängig die Migration.

Ebenso konnte in verschiedenen Arbeiten eine Aktivierung von p38 MAP durch VEGF und eine dadurch mediierte Zellmigration und Aktinreorganisation in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden (19).

Daraus abgeleitet ergibt sich die Vermutung, dass die Aktivierung der p38 MAP Kinase die Zellmigration stimuliert, möglicherweise durch eine Regulation des Aktin-Zytoskeletts (19).

Weitere Experimente haben gezeigt, dass die Behandlung glatter Muskelzellen mit PDGF, IL-1 β und TGF- β zu einer maximalen Migration führte. Alle diese Wachstumsfaktoren induzierten dabei eine vermehrte Threonin- und Thyrosinphosphorylierung von p38. Der Mechanismus, über den p38 die Zellmigration und die Aktinreorganisation beeinflusst, ist allerdings noch unklar. In vielen Zelltypen ist MAPKAP-2/3 ein identifiziertes p38 MAP Kinase Substrat.

In den beschriebenen Versuchen konnte auch eine erhöhte Kinaseaktivität für HSP 27 beobachtet werden. Diese Aktivität folgte derselben Kinetik wie die der p38 MAP Kinase.

Außerdem war in Zellen, in denen die p38 Kinase Aktivität durch den selektiven p38 Inhibitor SB 203580 blockiert war, auch eine Blockierung der HSP 27 Aktivierung zu sehen.

Dies zeigt, dass die Aktivierung von HSP 27 durch PDF, IL-1 β und TGF- β in glatten Muskelzellen, durch eine Aktivierung der p38 MAP Kinase zustande gekommen sein könnte (19).

HSP 27 ist ein Aktin bindendes Protein, das von glatten Muskelzellen in hohen Mengen konstitutiv exprimiert wird. In vitro soll HSP 27 als ein F-Aktin kappendes Protein fungieren und durch die Phosphorylierung durch MAPKAP-2/3 reguliert sein. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Überexpression des Wildtyp HSP 27 die F-Aktin Stabilität erhöht und darüber hinaus für die Modulation des Aktin-Zytoskellets mitverantwortlich zu sein scheint (19).

Diese Mechanismen könnten eine Rolle bei der Migrationssteigerung durch FFR-FVIIa besitzen, da sie durch pharmakologische Inhibition von p38 verringert wird.

In unseren Boyden Chamber Assays zur Rolle der MAP Kinasen bei der Signaltransduktion, bewirkte die Zugabe eines selektiven p38 MAP Kinase Inhibitors zum Migrationsmedium ebenfalls eine wesentliche Modulation der Migration. Die Zugabe des p38 Inhibitors SB 203580 zeigte eine signifikante Migrationsminderung. Diese Ergebnisse weisen, wie auch die Daten aus den vorher beschriebenen Versuchen, darauf hin, dass die Migration außer β 1 als Kofaktor auch noch andere Kofaktoren, wie z.B. p38, benötigt. Die Tatsache, dass bei Zugabe eines selektiven p38 Inhibitors eine signifikante Reduktion der Migration zu verzeichnen war, könnte für eine Beteiligung von p38 an der signaltransduktorischen Kaskade sprechen.

Diese Ergebnisse unterstützen die bereits bekannte These, dass p38 eine modulierende Funktion bei der Zellmigration einnehmen könnte. Möglicherweise ist auch dabei die Aktivierung von HSP 27 von Bedeutung, da die Daten zu ABP-280 den Schluss nahe legen, dass auch TF das Aktin-Remodeling beeinflusst.

HSP 27 und p38 könnten damit eventuell eine modulierende Rolle bei der über TF vermittelten Zellmigration einnehmen.

Weitere Daten, die suggerieren, dass die MAP-Kinasen an der TF vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind, zeigen, dass zwar der MAP Kinase Inhibitor PD98059, nicht aber PKC Inhibitoren wie z.B. Staurosporin die VEGF Induktion in Melanom Zellen, die TF überexprimieren, vermindern (40).

Die Ergebnisse unserer Versuche deuten auf eine Rolle für die Aktivierung der p 38 MAP Kinase, möglicherweise in Form einer Modulation der Signaltransduktion in Bezug auf die Zellmigration. Legt man die oben beschriebenen Erkenntnisse zugrunde, gibt es mehrere Interpretationsansätze. Sowohl ein Effekt über eine Aktivierung von p38 über TF, als auch eine Geninduktion durch FVII mit nachfolgender Aktivierung von PARs wäre denkbar. Über die Aktivierung von p38 könnte das HSP 27 in die Modulation der Zellmigration involviert sein.

Da auch über Aktivierung von PARs durch FVIIa eine Phosphorylierung von p38 und ebenso p42/44 gezeigt wurde, könnte dies zusätzliche Zellmigrationsprozesse in Zellen, die PAR-2 exprimieren, z.B. HUVECs, begünstigen.

Die Bindung von FVIIa an TF triggert die Mobilisation von intrazellulärem Kalzium durch die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C in verschiedenen Zellen, wie z.B. HUVECs oder Madin-Darby Nierenzellen, um dann TF auf Stimulation von IL-1 hin zu exprimieren (33,7). Beschrieben wird auch eine Phosphorylierung der p42/44 mitogen-aktivierten-Kinase (MAP Kinase) durch die Bindung von FVIIa an TF in transfizierten Nierenzellen vom Baby-Hamster über die Aktivierung von PARs (30). Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch die p38 MAP Kinase und die JNK-Kinase durch Bildung dieses Komplexes phosphoryliert werden (5).

Die Nutzung von spezifischen Initiatorern der p38 MAP Kinase zeigte eine Induktion verschiedener „early genes“ durch die verschiedenen Kinasen (6). In humanen Fibroblasten konnten durch diese Technik Cyr 61 und connective-tissue growth factor induziert werden (27). Diese Genprodukte könnten für die Zellmigrationsprozesse von Bedeutung sein.

Die von uns erhobenen Daten beziehen sich auf bestimmte Zellpopulationen (J82, HUVEC). HUVEC-Zellen exprimieren TF konstitutiv nur in sehr geringen Mengen. Deshalb wurden diese Zellen als Modell zur Transfektion mit den verschiedenen TF-Domänen gewählt. J82 Zellen sind Tumorzellen, die konstitutiv sehr große Mengen TF und kein PAR-2 exprimieren. Sie eignen sich deshalb sehr gut für Zellmigrationsexperimente, mit dem Ziel die Signaltransduktion via TF zu untersuchen.

Da nicht klar ist, inwiefern sich die erhobenen Daten auch auf andere Zellpopulationen, z.B. koronare glatten Muskelzellen, übertragen lassen, sind weitere Experimente notwendig.

Um eine Aussage darüber zu bekommen, in welcher Konstellation eine über TF vermittelte Zellmigration entsteht, sind Tiermodelle z.B. in Form von TF knock-out Mäusen notwendig. Mit einem solchen Modell könnte auch die zytoplasmatische TF-Domäne und deren Funktion näher untersucht werden.

Eine weitere wichtige Fragestellung, die mit Hilfe eines solchen Tiermodells näher erläutert werden könnte, ist die Beziehung von TF und PAR-2. Handelt es sich um einen kooperativen Effekt beider Rezeptoren oder eine Interaktion, die verschiedene Signalkaskaden induzieren kann?

Gibt es unabhängige Effekte von TF und PAR-2, die über die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege pathophysiologisch von Bedeutung sind?

Eine Hemmung der TF-induzierten Gerinnungsaktivierung durch FFR-FVIIa, das gleichzeitig Migrationsprozesse steigert, könnte bei ischämischen Erkrankungen von Bedeutung sein.

5. Zusammenfassung:

Zahlreiche Studien belegen eine Rolle für nicht hämostatische Funktionen von TF. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von TF bei Zellmigrationsprozessen mittels Boyden-Chamber Migrationsassays untersucht.

Besonderes Augenmerk galt der Frage, inwieweit erstens die proteolytische Funktion von TF und zweitens die zytoplasmatische TF-Domäne für die Migration notwendig ist. Eine weitere Fragestellung galt der Funktion von Integrinen und MAP Kinasen bei der Steigerung der Zellmigration. Die Ergebnisse zeigen, dass die zytoplasmatische Domäne notwendig für die Steigerung der Zellmigration ist. Die proteolytische Aktivität von FVIIa ist jedoch nicht notwendig, da diese gleichermaßen gegenüber FFR-FVIIa zu beobachten war.

Außerdem ergaben sich Hinweise, dass auch Integrine, im speziellen $\beta 1$ Integrin, eine Rolle bei der Steigerung der Zellmigration durch FFR-FVIIa spielen. Inhibitoren der MAP Kinase p38 verringerten die Migrationsrate. Eine Aktivierung der MAPK p38 könnte also bei den durch FFR-FVIIa-induzierten Signaltransduktionsmechanismen von Bedeutung sein.

6. Abkürzungsverzeichnis:

Abb.:	Abbildung
ABP:	aktin binding protein
ATRA:	all trans retinoic acid
cDNA:	Desoxyribonucleinsäure
CrP:	C reaktives Protein
EGF:	epidermal growth factor
ERK:	extracellular signal regulated kinase
FAK:	focal adhesion protein
FFR-FVIIa:	proteolytisch inaktiver Faktor 7a
FN:	Fibronektin
FVIIa:	aktivierter Faktor 7a
HUVEC:	human umbilical vein endothelial cells
HSP-27:	heat-shock-protein-27
ICAM-1:	intracellular adhesion molecule-1
IL1- β :	interleukin 1- β
IL-2:	Interleukin-2
Integ.:	Integrin
J82:	humane Blasenkarzinomzellen
JNK:	Jun-n-terminal-kinase
MAPKAP:	mitogen activated protein kinase
MAP-Kinase:	mitogen activated protein kinase
μ M:	mikro Mol
MCP:	monocyte chemoattractant protein
PAR:	protease-activated G protein-coupled receptors
PDGF:	platelet derived growth factor
Ser:	Serin
TF:	tissue factor
TGF- β :	transforming growth factor- β
TNF:	Tumor Nekrose Faktor
VCAM-1:	vascular adhesion molecule-1

7. Literaturverzeichnis:

1. Abe K, Shoji M, Chen H, Bierhaus A, Danave J, Micko C, Casper K, Dillehey D., Nawroth PP, Rickels F

Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jul 20;96(15):8663-8.

2. Bach, RR

Initiation of coagulation by tissue factor. CRC Crit. Rev. Biochem. 23, 339-368, 1988

3. Bromberg M.E, Konigsberg BH., Madison JF, Pawashe A, Garen A

Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 29;92(18):8205-9.

4. Bromberg ME, Sundaram R, Homer RJ, Garen A, Konigsberg WH

Role of tissue factor in metastasis: functions of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule. Thromb Haemost. 1999 Jul;82(1):88-92.

5. Camerer E, Rottingen JA, Gjernes E, Larsen K, Skartlien AH, 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. 1999 Nov 5;274(45):32225-33.

6. 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. 2000 Mar 3;275(9):6580-5.

7. Camerer E, Rottingen JA, Iversen J-G, Prydz H

Coagulation factors VII and X induce Ca²⁺ oscillations in Madin-Darby canine kidney cells only when proteolytically active. J Biol Chem. 1996 Nov 15;271(46):29034-42.

8. Camerer E, Kolsto A-B, Prydz H
Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res.* 1996 Jan 1;81(1):1-41. Review.
9. Camerer E, Huang W, Coughlin SR,
Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 9;97(10):5255-60.
10. Carmeliet, P, Mackman, N, Moons, L, Luther, T, Gressens, P, Van Vlaenderen, I, Demunck, H, Kasper, M, Breier, G, Evrard, P, Muller, M, Risau, Edgington, T, and Collen, D
Tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature.* 1996 Sep 5;383(6595):73-5.
11. Dorfleutner A, Ruf W
Regulation of tissue factor cytoplasmic domain phosphorylation by palmitoylation. *Blood.* 2003 Dec 1;102(12):3998-4005. Epub 2003 Aug 14.
12. Dvorac H.F, Nagy JA, Bertse B, Brown LF, Yeo K-T, Yeo T-K, Dvorac AM, van de Vater L, Sioussat TM, Senger DR
Vascular permeability factor, fibrin, and the pathogenesis of tumor stroma formation. *Ann N Y Acad Sci.* 1992 Dec 4;667:101-11. Review.
13. Ernoffsson M, Siegbahn A
A Platelet-derived growth factor-BB and monocyte chemoattractant protein-1 induce human peripheral blood monocytes to express tissue factor. *Thromb Res.* 1996 Aug 15;83(4):307-20.
14. Falanga A, Consonni R, Marchetti M, Locatelli G, Garattini E, Passerini CG, Gordon SG, Barbui T
Cancer procoagulant and tissue factor are differently modulated by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood.* 1998 Jul 1;92(1):143-51.

15. Folkman, J
Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.
Nat Med. 1995 Jan;1(1):27-31. Review.
16. Folkman, J, and D'Amore, PA.
Blood vessel formation: what is its molecular basis? Cell. 1996 Dec 27;87(7):1153-5.
Review
17. Fuster V, Fallon JT, Nemerson Y
Coronary thrombosis. Lancet. 1996 Nov;348 Suppl 1:s7-10. Review
18. Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, Takeshima H, Nishi T, Ushio Y
Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma.
Cancer. 1996 May 1;77(9):1877-83.
19. Hedges JC, Dechert MA, Yamboliev IA, Martin JL, Hickey E, Weber LA,
Gerthoffer WT
A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration.
J Biol Chem. 1999 Aug 20;274(34):24211-9.
20. Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T, Sorensen BB, Norby PL, Mandal SK,
Pendurthi UR, Rao LV
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. 2004 Apr 15;103(8):3029-37. Epub 2004 Jan 08.
21. Kakkar AK, Ellis IO, Blamey BW, Williamson RC
Tissue factor: A new independent prognostic marker in breast cancer (abstract),
Proc.ANN. Meet Am Assoc Cancer Res 1996;37:1373
22. Koyama T, Shibakura M, Ohsawa M, Kamiyama R, Hirosawa S
Anticoagulant effects of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 on human myelogenous
leukemia cells and monocytes. Blood. 1998 Jul 1;92(1):160-7.

23. Mueller BM, Reisfeld RA, Edginton TS, Ruf W
Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec 15;89(24):11832-6.
24. Mueller BM, Ruf W
Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest*. 1998 Apr 1;101(7):1372-8.
25. Osterud B
Cellular interactions in tissue factor expression by blood monocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1995 Jun;6 Suppl 1:S20-5. Review
26. Ott I, Fischer EG, Miyagi Y, Mueller BM, Ruf W
A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J Cell Biol*. 1998 Mar 9;140(5):1241-53.
27. Pendurthi UH, Allen KE, Ezban M, Rao LVM
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*. 2000 May 12;275(19):14632-41.
28. Pendhurti UR, Alok D, Rao LVM
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*. 1997 Nov 11;94(23):12598-603.
29. Petersen LC, Thastrup O, Hagel G, Sørensen BB, Freskgard O-O, Rao LVM, Ezban M
Exclusion of known protease-activated receptors in factor VIIa-induced signal transduction. *Thromb Haemost*. 2000 Apr;83(4):571-6.

30. Poulsen, LK, Jacobsen, N, Sorensen, BB, Bergenheim, NC, Kelly, JD, Foster, DC, Thastrup, O, Ezban, M, and Petersen, LC
Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor. *J Biol Chem.* 1998 Mar 13;273(11):6228-32.
31. Pradier O., Willems F., Abramowicz D., Schandene L., de Boer M., Thielemans K., Capel P., Goldman M.
CD40 engagement induces monocyte procoagulant activity through an interleukin-10 resistant pathway. *Eur J Immunol.* 1996 Dec;26(12):3048-54.
32. Randolph, GJ, Luther, T, Albrecht, S, Magdolen, V, and Muller, WA,
Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. *Blood.* 1998 Dec 1;92(11):4167-77.
33. Rottingen JA, Endens T, Camerer E, Iversen J-G, Prydz H
Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca²⁺ 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.* 1995 Mar 3;270(9):4650-60.
34. Ruf W, Dorfleutner A, Riewald M
Specificity of coagulation factor signaling.
J Thromb Haemost. 2003 Jul;1(7):1495-503. Review.
35. Ruf W, Mueller BM
Tissue factor in cancer angiogenesis and metastasis.
Curr Opin Hematol. 1996 Sep;3(5):379-84. Review.
36. Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Sumiyoshi A
Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells.
Thromb Haemost. 1996 Mar;75(3):389-92.

37. Servinsky, JR, Rao, LVM, and 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.* 1996 Apr;133(2):293-304.
38. Seto S, Onodera H, Kaido T, Yoshikawa A, Ishigami S, Arii S, Imamura M
Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer.* 2000 Jan 15;88(2):295-301.
39. Siegbahn A, Johnell M, Rorsman L, Heldin C-H, Rönstrand L
Binding of factor VIIa to tissue factor on human fibroblasts leads to activation of phospholipase C and enhanced PDGF-BB-stimulated chemotaxis. *Blood.* 2000 Nov 15;96(10):3452-8.
40. Siegbahn A
Cellular consequences upon factor VIIa binding to tissue factor. *Haemostasis.* 2000;30 Suppl 2:41-7. Review.
41. Taniguchi H, Kakkar AK, Tuddenham EGD, Williamson RCN, Lemoine NR
Enhanced expression of urokinase receptor induced through the tissue factor-factor VIIa pathway in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 1998 Oct 1;58(19):4461-7.
42. Tenno T, Öberg F, Nilsson K, Siegbahn A
Induction of differentiation in U-937 and NB4 cells is associated with inhibition of tissue factor production. *Eur J Haematol.* 1999 Aug;63(2):112-9.
43. Versteeg HH
Tissue factor as an evolutionary conserved cytokine receptor: Implications for inflammation and signal transduction. *Semin Hematol.* 2004 Jan;41(1 Suppl 1):168-72.

44. Vrana JA, Stang MT, Grande JP, Getz MJ

Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer: paracrine regulation by carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor beta family. *Cancer Res.* 1996 Nov 1;56(21):5063-70.

45. Zhang Y, Deng Y, Luther T, Muller M, Ziegler R, Waldherr R, Stern DM, Nawroth PP

Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest.* 1994 Sep;94(3):1320-7.

46. Zhou L, Stordeur P, de Lavarelle A, Thielemanns K, Chapel P, Goldman M, Pradier O

CD40 engagement on endothelial cells promotes tissue factor-dependent procoagulant activity. *Thromb Haemost.* 1998 May;79(5):1025-8.

Abbildungsverzeichnis:

- Abbildung 1: Übersicht über die Gerinnungsfaktoren
- Abbildung 2: Übersicht über das Gerinnungssystem
- Abbildung 3: TF-Aktivität in J82-Zellen und HUVEC
- Abbildung 4: Oberflächenexpression von TF, PAR-1, PAR-2 in J82 Zellen und HUVEC
- Abbildung 5: Steigerung der Migration von J82 Zellen durch FFR-VIIa und FVIIa
- Abbildung 6: Migrationsassay mit transfizierten und untransfizierten HUVEC gegen FFRVIIa
- Abbildung 7: Hemmung der Migrationssteigerung durch FFR-VIIa in Gegenwart von inhibierendem anti-TF Antikörper
- Abbildung 8: Hemmung der Migration unter Zugabe von anti- β -1 Antikörper
- Abbildung 9: Oberflächenexpression von TF und β -1 auf J82 Zellen in An- und Abwesenheit von FFR-VIIa
- Abbildung 10: Hemmung der p38 MAP-Kinase reduziert die Migration durch FFR-VIIa

Danksagungen

Herrn Professor Dr. F.J. Neumann und Frau PD Dr. Ilka Ott danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas und die kontinuierliche Unterstützung während der Arbeit daran.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie mein Studium möglich gemacht und mich dabei immer unterstützt haben. Widmen möchte ich diese Arbeit meinem Großvater.

Meiner Freundin Viola danke ich für die vielen gemeinsam verbrachten Stunden im Labor.

Meinem Lebensgefährten Christian danke ich für seine Geduld und seine liebevolle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.