

**Alternativ gespleißter humaner Tissue Factor:
Klonierung, Expression und Untersuchung der
prokoagulatorischen Aktivität**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der



vorgelegt von

Anett Bobbe

aus Köthen

Dezember 2007

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie,
Universitätsklinikum Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karsten Schrör
Koreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich
Tag der mündlichen Prüfung: 10.01.2008

<u>1.</u>	<u>Einleitung</u>	1
1.1	<u>Funktionen des humanen <i>tissue factors</i></u>	1
1.2	<u>Struktur des humanen <i>tissue factors</i></u>	5
1.3	<u>Struktur des alternativ gespleißten humanen <i>tissue factors</i> (asHTF)</u>	7
1.4	<u>Funktionen des asHTF</u>	7
1.5	<u>Fragestellung</u>	9
<u>2.</u>	<u>Material und Methoden</u>	10
2.1	<u>Material</u>	10
2.1.1	<u>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</u>	10
2.1.2	<u>Enzyme und Enzymkits</u>	11
2.1.3	<u>Lösungen, Medien und Puffer</u>	12
2.1.4	<u>Zellkulturlinien und Bakterienstämme</u>	14
2.1.5	<u>Vektoren</u>	15
2.1.6	<u>Antikörper</u>	15
2.1.7	<u>Synthetische Oligonukleotide</u>	17
2.2	<u>Zellkultur</u>	18
2.2.1	<u>Isolation und Kultivierung humaner glatter Gefäßmuskelzellen</u>	18
2.2.2	<u>Kultivierung humaner embryonaler Nierenzellen</u>	18
2.2.3	<u>Kultivierung der Insektenzelllinie Sf9</u>	18
2.3	<u>Klonierung von humanem <i>tissue factor</i> und alternativ gespleißtem humanem <i>tissue factor</i> aus SMCs</u>	19
2.3.1	<u>Präparation von Gesamt-RNA aus humanen Zellen</u>	19
2.3.2	<u>Quantifizierung von Nukleinsäuren</u>	19
2.3.3	<u>Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion für Klonierung</u>	19
2.3.4	<u>Semiquantitative RT-PCR für Expressionsnachweis</u>	20
2.3.5	<u>Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel</u>	21
2.3.6	<u>DNA-Isolation aus Agarosegelen</u>	21
2.3.7	<u>TOPO-Ligation</u>	22
2.3.8	<u>Ligation mittels T4-DNA-Ligase</u>	22
2.3.9	<u>Plasmid-DNA-Minipräparation</u>	22
2.3.10	<u>Plasmid-DNA-Midipräparation</u>	23
2.3.11	<u>Sequenzierung</u>	24
2.3.12	<u>Praktische Durchführung der Klonierung von <i>hTF</i> und <i>ashTF</i></u>	24
2.4	<u>FLAG-Markierung von <i>hTF</i> und <i>ashTF</i></u>	25
2.4.1	<u>PCR</u>	25
2.4.2	<u>Phosphorylierung von DNA</u>	25
2.4.3	<u>DNA-Isolation direkt aus Reaktionsansätzen</u>	25
2.4.4	<u>Praktische Durchführung der FLAG-Markierung von <i>hTF</i> und <i>ashTF</i></u>	25
2.5	<u>Expression und funktionelle Charakterisierung von HTF und asHTF</u>	29
2.5.1	<u>Transiente Transfektion von HEK293-Zellen</u>	29
2.5.2	<u>Immunfluoreszenzmikroskopie</u>	29
2.5.3	<u>Isolation von Gesamtprotein für Western-Blot</u>	30
2.5.4	<u>Bestimmung der Proteinkonzentration</u>	30
2.5.5	<u>Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Proteintransfer</u>	31
2.5.6	<u>Antikörper-Hybridisierung und Detektion</u>	31

2.5.7	Präparation von zellfreiem Überstand, Mikropartikeln und mikropartikelfreiem Überstand	32
2.5.8	Präparation von Zellysat u. a. für Enzymtests	32
2.5.9	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	33
2.5.10	Immunpräzipitation	33
2.5.11	Deglykosylierung von Proteinen	33
2.6	Enzymatische Charakterisierung von HTF_FLAG und asHTF_FLAG	34
2.6.1	Präparation gewaschener Thrombozyten	34
2.6.2	Herstellung von thrombozytenarmen Plasma (PPP)	34
2.6.3	Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität	34
2.6.4	FX-Aktivierung	36
2.7	Proteinexpression zur Proteingewinnung	37
2.7.1	His₆-Markierung von <i>ashTF</i>	37
2.7.2	Produktion von Baculoviren	38
2.7.3	Erhöhung des Virentiters	38
2.7.4	Virale Transfektion	38
2.7.5	Proteinisolierung aus Insektenzellen	38
2.8	Statistik	39
3.	Ergebnisse	40
3.1	Klonierung von humanem <i>tissue factor</i> und alternativ gespleißtem humanem <i>tissue factor</i> aus SMC	40
3.2	FLAG-Markierung von <i>hTF</i> und <i>ashTF</i>	40
3.3	Expression und Untersuchung der prokoagulatorischen Aktivität von HTF und asHTF	41
3.3.1	Nachweis der heterologen Expression von HTF bzw. asHTF in transfizierten HEK293-Zellen durch semiquantitative RT-PCR	41
3.3.2	Nachweis der heterologen Expression von HTF_FLAG bzw. asHTF_FLAG in transfizierten HEK293-Zellen	42
3.3.3	Detektion von HTF_FLAG und asHTF_FLAG in verschiedenen Fraktionen transfizierter HEK293-Zellen	44
3.3.4	Untersuchung der Glykosylierung von HTF_FLAG und asHTF_FLAG	46
3.3.5	Vergleichende Untersuchung der enzymatischen Aktivität von HTF_FLAG und asHTF_FLAG in Zellen	47
3.3.6	Vergleichende Untersuchung der enzymatischen Aktivität von HTF_FLAG und asHTF_FLAG in zellfreien Überständen	49
3.3.7	Untersuchung der Konkurrenz von asHTF_FLAG mit rHTF	51
3.3.8	Untersuchung des Glykosylierungseinflusses auf die Proteinaktivität von HTF_FLAG	52
3.4	Heterologe Expression in und Aufreinigung von asHTF_His aus Sf9-Zellen	53
4.	Diskussion	55
4.1	Zelluläre Lokalisation von alternativ gespleißtem humanem <i>tissue factor</i>	55
4.2	Prokoagulatorische Aktivität von asHTF	57
4.3	Regulation und Bedeutung der <i>ashTF</i>-Expression	59
4.4	Ausblick	62
5.	Zusammenfassung	63

<u>6.</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	65
<u>7.</u>	<u>Publikationen im Zusammenhang mit dieser Arbeit</u>	74
<u>7.1</u>	<u>Originalarbeiten</u>	74
<u>7.2</u>	<u>Kongressbeiträge</u>	74
<u>8.</u>	<u>Danksagung</u>	75
<u>9.</u>	<u>Eidesstattliche Erklärung</u>	76
<u>10.</u>	<u>Lebenslauf</u>	77

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
ACD	"acidic citrate dextrose"
ad	additiv
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
<i>ashTF</i> /asHTF	alternativ gespleißter humaner <i>tissue factor</i> Gen/Protein
BSA	bovines Serumalbumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemoluminescence, verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
EGTA	Ethylen-glycol-tetraacetat
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
IL-6	Interleukin 6
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
NOG	N-octyl-β-D-Glycopyranosid
p. a.	<i>pro analysi</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
PMSF	Phenylmethylsulphonyl-Fluorid
PRP	platelet rich plasma, thrombozyten-reiches Plasma
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMC	smooth muscle cells, glatte Muskelzellen
spez.	speziell (-e; -er)
TF	<i>tissue factor</i>
TNFα	tumor necrosis factor alpha
U	unit, Einheit der Enzymaktivität
UV	ultraviolettes Licht

1. Einleitung

1.1 Funktionen des humanen *tissue factors*

Die Blutgerinnung ist ein Vitalvorgang zum Schutz vor Blutverlust. Anomalien dieses komplexen, in hohem Maße regulierten Systems können zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen. Der *tissue factor* (TF) ist der Initiator der Blutgerinnung. Er wird konstitutiv, Zelltyp-spezifisch in Organen (z. B. Hirn: Astrozyten; Herz: Myozyten; Haut: Keratinozyten) und der Blutgefäßwand (glatte Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten) exprimiert (Fleck *et al.*, 1990; Drake *et al.*, 1989). *Tissue factor* bildet so eine hämostatische Barriere um Gefäße und Organe, um diese vor Blutverlust zu schützen. Das aktuelle Modell der zellbasierten Blutgerinnung (Hoffman & Monroe 3rd, 2001) präsentiert sich dabei wie folgt:

In der Initiationsphase kommt prokoagulatorisch aktiver TF (z. B. über eine Verletzung des Endothels) in Kontakt mit Blut und bindet, in Anwesenheit negativ geladener Phospholipide (z. B. Phosphatidylserin) und zweiwertiger Kalziumionen, im Plasma befindlichen aktiven Faktor VII (=FVIIa). Der TF-FVIIa-Komplex aktiviert proteolytisch Faktor X bzw. Faktor IX. Es entstehen jedoch nur geringe Mengen FXa, da diese Reaktion sehr schnell durch den ebenfalls im Plasma befindlichen *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) unterbunden wird. FXa bildet mit FVa einen Komplex, welcher proteolytisch Prothrombin zu Thrombin aktiviert. Die in der Initiationsphase entstehenden Thrombinkonzentrationen (pM-Bereich) sind nicht ausreichend für die Bildung eines Thrombus (Butenas *et al.*, 1997), aktivieren jedoch Thrombozyten über Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs). Thrombozyten präsentieren daraufhin Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche und setzen u. a. den Inhalt ihrer α -Granula (z. B. FV) frei. Zusätzlich aktiviert Thrombin FV, FXI und FVIII. Diese Wirkungen der minimalen Thrombinmengen werden „Priming“ genannt und führen zu Thrombozytenaktivierung mit Bildung aktiver Faktoren (FVa, FVIIIa, FXIa) und Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche.

Die aktivierten Thrombozyten bieten damit optimale Rahmenbedingungen für die darauf folgende Phase der Amplifikation und Propagation der Blutgerinnung. Der FIXa

aus der Initiation bildet mit dem FVIIIa einen Komplex, welcher im Vergleich zu TF-FVIIa eine höhere FX-Aktivierungsrate aufweist (Lawson *et al.*, 1994). Zusätzlich trägt der FXIa-FVIIIa-Komplex zur FX-Aktivierung bei, sodass schlagartig eine große Menge FXa entsteht, über den viel Prothrombin aktiviert wird. Die daraus resultierenden hohen Thrombinkonzentrationen bewirken Verschiedenes: Die Aktivierung der Zymogene (FXI, FVIII, FV) führt über eine positive Rückkoppelung zur weiteren Bildung von Thrombin. Zusätzliche Thrombozyten werden aktiviert, interagieren mit bereits vorhandenen aktivierten Thrombozyten und erweitern somit den Thrombus. Innerhalb des Thrombus führt die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin zu dessen Stabilisation. Weitere Stabilität wird über die Quervernetzung der Fibrinstränge untereinander durch die Aktivierung von FXIII erreicht. Außerdem erfolgt zur weiteren Unterstützung die gleichzeitige Unterdrückung der Fibrinolyse über die Aktivierung von TAFI (*thrombin activable fibrinolysis inhibitor*; Bajzar *et al.*, 1995).

Eine übermäßig starke Thrombusbildung wird einerseits durch den Verbrauch aktiver Faktoren (Thrombin, FXa) an der Läsion verhindert, da die Barriere sich anlagernder Thrombozyten zur räumlichen Trennung von den inaktiven Gerinnungsfaktoren im Blut führt (Hathcock & Nemerson, 2004). Andererseits spielen die antikoagulatorischen Eigenschaften des umgebenden intakten Endothels eine wichtige Rolle (z. B. Thrombomodulin, Protein C, Protein S, Ekto-ADPase, Heparansulfat; Dahlbäck, 2004; Gayle 3rd *et al.*, 1998; Kojima *et al.*, 1992). Nach Abheilung der Verletzung wird der Thrombus über Fibrinolyse abgebaut.

Substrate (Huang *et al.*, 1996; Ruf *et al.*, 1992; Kirchhofer *et al.*, 2000a). Auch FVII ist ein Substrat für den TF-FVIIa-Komplex. Die FVII-Autoaktivierung ergibt sich wahrscheinlich durch die laterale Diffusion von TF-FVIIa- und TF-FVII-Komplexen in der Membran (Neuenschwander *et al.*, 1993).

Die normale *in vivo* Expression des TF lässt sich über verschiedene Stimuli (u. a. LPS, TNF α) beeinflussen. Hierüber wird eine TF-Expression in Zelltypen induziert, welche normalerweise keinen TF aufweisen (z. B. Monozyten, Endothelzellen) (Gezcy 1994; Camerer *et al.*, 1996). Entsprechend tragen z. B. in atherosklerotischen Plaques alle beteiligten Zellarten (z. B. Monozyten, Schaumzellen, glatte Muskelzellen, Endothelzellen) durch Entzündungsmediatoren stimuliert zur TF-Produktion bei. Nach einer Ruptur atherosklerotischer Plaques, verursacht der freigesetzte TF (z. B. auf Mikropartikeln) eine Thrombose (Rauch & Nemerson 2000), welche über einen Gefäßverschluss z. B. Hauptursache für einen Herzinfarkt (Bondermann *et al.* 2002) oder Schlaganfall sein kann.

Aufgrund seiner prokoagulatorischen Eigenschaften wurde die Anwesenheit von aktivem TF im Blut gesunder Menschen lange Zeit ausgeschlossen. Trotzdem sind geringe Mengen TF im Blut gesunder Probanden nachweisbar (Koyama *et al.*, 1994), welche sich in verschiedenen pathologischen Zuständen wie z. B. dem akuten Koronarsyndrom (Misumi *et al.*, 1998; Suefuji *et al.*, 1997) erhöhen und oft mit einer Steigerung der TF-Aktivität einhergehen (Key *et al.*, 1998; Aras *et al.*, 2004). Als TF-Quelle wurden vor allem TF-haltige Mikropartikel ermittelt, welche durch stimulierte Monozyten und Thrombozyten abgegeben werden (Brand *et al.*, 1991; Siddiqui *et al.*, 2002). Der Transfer TF-haltiger Mikropartikel zwischen ihnen basiert z. B. auf einer Interaktion von monozytärem CD15 und thrombozytärem P-Selektin (Rauch *et al.*, 2000).

Weiterhin gibt es Hinweise auf Blutgerinnungs-unabhängige TF-Funktionen: Die Generierung von TF-*knockout*-Mäusen scheiterte an der embryonalen Letalität dieser Tiere (Toomey *et al.*, 1996; Carmeliet *et al.*, 1996), welche neben Blutungen auch Fehlentwicklungen aufwiesen (Carmeliet *et al.*, 1997). Erst nach Insertion eines humanen TF-„Minigens“ (1 % Expression des murinen TF-Gens) überlebten die TF-defizienten Tiere, welche sich daraufhin normal entwickelten, aber noch immer

Defizite in der Blutgerinnung aufwiesen (Parry *et al.*, 1998). Dies deutet ebenso auf eine TF-abhängige Signalübertragung hin, wie auch verschiedene intrazelluläre Veränderungen (z. B. Aktivierung einiger MAP-Kinasen), die nach Bindung von katalytisch aktivem FVIIa an TF detektiert wurden (Pendurthi *et al.*, 2000; Poulsen *et al.*, 1998). Die Mechanismen der TF-abhängigen Signalübertragung sind noch nicht vollständig geklärt (Übersicht Mackman 2004; Versteeg & Ruf 2006). Unter anderem über die Signaltransduktion scheint TF eine Rolle bei Tumor-assoziiierter Angiogenese (Contrino *et al.*, 1996), Zellmigration (Hjortoe *et al.*, 2004), Wundheilung (Nakagawa *et al.*, 1998), Zelladhäsion (Randolph *et al.*, 1998) und Entzündungsreaktionen (Taylor *et al.*, 1998) zu spielen.

1.2 Struktur des humanen *tissue factors*

Die Sequenz der TF cDNA wurde 1987 durch mehrere Gruppen voneinander unabhängig veröffentlicht (Fisher *et al.*, 1987; Morrissey *et al.*, 1987; Scarpati *et al.*, 1987; Spicer *et al.*, 1987). Zwei Jahre später publizierten Mackman *et al.* die genomische TF-Sequenz (Mackman *et al.*, 1989). Das Gen des humanen TF liegt auf dem Chromosom 1 im Bereich p21-22 (Scarpati *et al.*, 1987; Kao *et al.*, 1988), ist 12,4 kb lang und besteht aus 6 Exons und 5 Introns (Mackman *et al.*, 1989). Exon 1 umfasst vor allem das Signalpeptid, die Exons 2-5 kodieren für die extrazelluläre Domäne des TF und Exon 6 beinhaltet die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Domäne. Im Promotor befinden sich zwei Regionen für die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren (Mackman, 1997), worüber die TF-Expression durch z. B. Lipopolysaccharid (LPS), proinflammatorische Stimuli (u. a. TNF α , IL-1) oder Scherstress induziert wird. Zusätzlich gibt es dort noch eine *Y-box binding site*, welche indirekt von Thrombin aktiviert wird (Stenina *et al.*, 2000).

Das Translationsprodukt der TF-mRNA umfasst 295 Aminosäuren, woraus nach Abspaltung des Signalpeptides (32 Aminosäuren) ein Protein von 263 Aminosäuren (**Abb. 2**) mit einem Molekulargewicht von 29.593 Da entsteht (Morrissey *et al.*, 1987). TF ist ein Typ I integrales Membranprotein (N-Terminus extrazellulär, C-Terminus intrazellulär) und gehört, basierend auf seiner strukturellen Homologie zum Interferon γ -Rezeptor, zur Klasse 2 der Zytokinrezeptor-Superfamilie (Bazan, 1990). Die ersten 219 Aminosäuren bilden die extrazelluläre Domäne des reifen TF-Proteins in Form von

zwei Fibronectin-Typ-III-Domänen (Ruf & Edgington, 1994). Die extrazelluläre Domäne besitzt zwei Disulfidbrücken (Cys49-Cys57 und Cys186-Cys209; Bach *et al.*, 1988), von welchen letztere wichtig für die prokoagulatorische Aktivität des TF ist (Rehemtulla *et al.*, 1991). Weiterhin gibt es dort drei N-Glykosylierungen (Asn11+124+137; Paborsky & Harris, 1990), die zum Gesamtmolekulargewicht des TF von ca. 47 kDa beitragen, aber selbst keinen Einfluss auf die prokoagulatorische Aktivität des Proteins besitzen (Paborsky *et al.*, 1989; Ruf & Edgington, 1994). Die nächsten 23 Aminosäuren bilden zusammen eine typische hydrophobe Transmembrandomäne gefolgt vom intrazellulären TF-Anteil aus 21 Aminosäuren. Cystein 245 ist mit einer Fettsäure verestert (Bach *et al.*, 1988), was sowohl zu einer verbesserten Membranbindung führt, als auch für die Lokalisation des TF in Lipid-Rafts verantwortlich sein könnte (Eilertsen & Osterud, 2004).

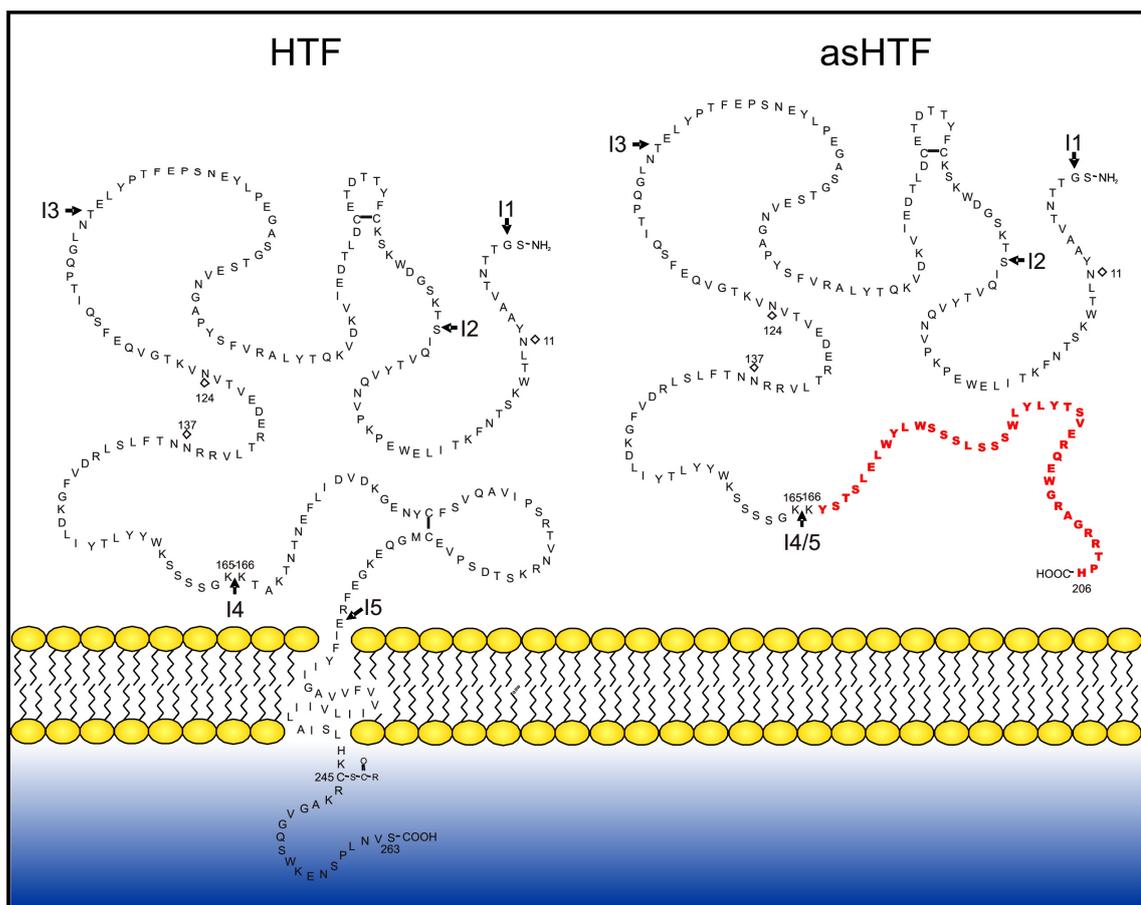


Abb. 2:

Aminosäuresequenz von HTF und asHTF.

Die Lage der Introns ist durch Pfeile gekennzeichnet. Rauten zeigen potenzielle Glykosylierungsstellen. Der neue, verkürzte C-Terminus ist ab der asHTF-Introngrenze 4/5 in fett gedruckten Buchstaben gekennzeichnet. R = Palmitin- oder Stearinsäure. Angepasst aus Censarek *et al.* (2007).

1.3 Struktur des alternativ gespleißten humanen *tissue factors* (asHTF)

Im Jahr 2003 identifizierte die Arbeitsgruppe um Bogdanov eine Exon-5-defiziente TF-Form in HL-60-Zellen und einer Reihe von Geweben (Bogdanov *et al.*, 2003). Aufgrund der Tatsache, dass diese TF-Form durch alternatives Spleißen der *hTF*-prä-mRNA entsteht, wurde sie als alternativ gespleißter humaner TF (*ashTF*) bezeichnet.

Während des alternativen Spleißens kommt es zur Entfernung von Exon 5 mit nachfolgender direkter Nachbarschaft der *hTF*-Exone 4 und 6. Dies führt zu einer, im Vergleich zu *hTF*, verkürzten mRNA. Außerdem beginnt Exon 6 nicht mit einem vollständigen Triplet, weshalb es zu einer Verschiebung des Leserasters und gleichzeitig einem neuen, vorgelagerten Stop-Codon kommt.

Unreifes asHTF-Protein besteht aus 238 Aminosäuren (HTF unreif: 295 Aminosäuren). Analog zum HTF handelt es sich bei den ersten 32 Aminosäuren um ein Signalpeptid, welches der Translation in das endoplasmatische Retikulum dient und anschließend abgespalten wird. Somit besteht reifer asHTF aus 206 Aminosäuren und ist deutlich kürzer als HTF (263 Aminosäuren). Beide Proteine stimmen in den Aminosäuren 1-166 in ihrer Sequenz überein, während die Verschiebung des Leserasters im letzten Exon zur Generation eines komplett neuen C-Terminus (Aminosäuren 167-206) im asHTF führt (**Abb. 2**). Der damit verbundene Wegfall der TF-Transmembrandomäne resultiert in einem löslichen asHTF-Protein (Bogdanov *et al.*, 2003; Szotowski *et al.*, 2005), dessen Kristallstruktur allerdings noch ungeklärt ist.

1.4 Funktionen des asHTF

Alternativ gespleißter humaner *tissue factor* wurde unter anderem in Lunge, Plazenta, Monozyten, Endothelzellen, Herzmuskelzellen und verschiedenen Krebszellen nachgewiesen (Bogdanov *et al.*, 2003; Szotowski *et al.*, 2005; Szotowski *et al.*, 2005b; Guo *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2005; Rauch *et al.*, 2005), wobei sein Expressionsniveau geringer als das des HTF war. Unterschiedliche *ashTF-hTF*-mRNA-Verhältnisse in verschiedenen Geweben deuten ebenso auf eine Regulation des alternativen Spleißens hin, wie auch die unterschiedlichen Expressionskinetiken von *hTF* und *ashTF* bei TNF α -Stimulation von Endothelzellen (Bogdanov *et al.*, 2003; Szotowski *et al.*, 2005).

Diese Regulation des alternativen Spleißens ist ein Indiz dafür, dass es sich bei asHTF möglicherweise um mehr als nur ein reines Nebenprodukt der TF-Expression handelt. Die Anwesenheit von asHTF im Blut wurde über seine Detektion in humanem Plasma und Thromben nachgewiesen (Bogdanov *et al.*, 2003). Teilweise wurden 10-20 % des TF-Proteins im Blut dem asHTF zugeordnet (Hathcock, 2004). Analog zum TF wäre also eine Rolle des asHTF in der Blutgerinnung denkbar, weshalb seine prokoagulatorische Aktivität Gegenstand aktueller kontroverser wissenschaftlicher Diskussion ist. So zeigten z. B. Bogdanov *et al.* (2003) eine geringe prokoagulatorische Aktivität des asHTF, welche u. a. aufgrund der eingesetzten hohen asHTF-Konzentrationen durch Butenas & Mann (2004) angezweifelt wurde. Szotowski *et al.* konnten zwar eine Aktivität nachweisen, welche aber den Zusatz von negativen Phospholipiden erforderte und deshalb eventuell *in vivo* nicht die Thrombuspropagation unterstützen könnte (Szotowski *et al.*, 2005). Insgesamt sind noch viele Fragen über den asHTF offen, weshalb – in Anbetracht der vielfältigen TF-Funktionen – die Erforschung dieser löslichen TF-Form von besonderem Interesse ist.

1.5 Fragestellung

In Anbetracht der vielfältigen (patho-) physiologischen Aufgaben des TF ist die nähere Charakterisierung seiner alternativ gespleißten, löslichen Form (asHTF) von großem Interesse. Dazu sollten in einem heterologen Säugerzell-Expressionssystem die folgenden Fragen im Vergleich zu HTF geklärt werden:

1. Wo befindet sich asHTF in der Zelle und in welcher Form wird er an das Kulturmedium abgegeben?
2. Besitzt asHTF eine prokoagulatorische Aktivität oder kann er mit HTF um Gerinnungsfaktoren konkurrieren?
3. Welchen Einfluss hat der Glykosylierungszustand auf die prokoagulatorischen Eigenschaften des asHTF?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in der höchsten verfügbaren Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Bezeichnung	Quelle
Coomassie Brilliant-Blau R250	BioRad, München
Dade [®] Innovin [®]	Dade Behring Holding GmbH, Eschborn
Dulbecco's modified Eagle Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
GFX PCR DNA and Gel Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoechst 33342	Sigma, München
Hybond [™] -C Extra	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hyperfilm [™] ECL [™]	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Iloprost (Ilomedin [®] Infusionskonzentrat)	Schering, Berlin
Immobilon-P	Millipore, Bedford, USA
Lipofectamine [™] 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Molecular Weight Marker (M.W. 14,000 - 66,000)	Sigma, München
Molecular Weight Marker (M.W. 30,000 - 200,000)	Sigma, München
Na-EDTA	Calbiochem, USA
PageRuler [™] Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Phosphoramidon	Sigma, München
Protein A-Agarose	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Spektrozyme [®] FXa	American Diagnostica GmbH, Pfungstadt
TNM-FH Insect Medium-Pulver	Sigma, München
TRI Reagent [®]	Sigma, München
Vectashield mounting medium	Vector Laboratories Inc.; USA
Z-Gly-Gly-Arg-AMC	Bachem, Bubendorf, Schweiz

Tabelle 1:

Übersicht über Quellen verwendeter Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

2.1.2 Enzyme und Enzymkits

Bezeichnung	Quelle
AccuSure™ DNA Polymerase und zugehöriger 10 × Puffer	Bioline GmbH, Luckenwalde
First Strand cDNA Synthesis Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
humaner FVIIa	Enzyme Research Laboratories, South Bend, USA
humaner FX	Enzyme Research Laboratories, South Bend, USA
humaner FXa	Kordia Life Sciences, Leiden, NL
N-Glukosidase F, rekombinant	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Platinum Pfx DNA Polymerase und zugehöriger 10 × Puffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Restriktionsenzym <i>Hind</i> III und zugehöriger 10 × Puffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsenzyme <i>Bam</i> HI, <i>Xho</i> I, <i>Bsh</i> TI und zugehörige 10 × Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
T4-DNA Ligase und zugehöriger 10 × Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Polynukleotidkinase und zugehöriger 10 × Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Polymerase und zugehöriger 10 × Puffer	Qbiogene, MP Biomedicals, Heidelberg
TOPO® TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Tabelle 2:

Übersicht über die Herkunft der verwendeten Enzyme bzw. -Kits.

2.1.3 Lösungen, Medien und Puffer

ACD:

85 mM Trisnatriumzitat; 65 mM Zitronensäure; 111 mM Glukose

Amido-Schwarz-Färbelösung:

25 % Isopropanol; 10 % Essigsäure; 0,1 % Amido-Schwarz

Blaumarker (5 ×):

15 % Glycerol, 0,02 % Bromphenolblau

ECL Advance-Blocklösung:

TBST + 2 % ECL Advance-Blockpulver

EDTA-Puffer:

50 mM Tris/HCl pH 8,5; 150 mM NaCl; 25 mM EDTA; 1 g/l BSA

Fluo-Puffer:

20 mM Hepes pH 7,35; 60 g/l proteasefreies BSA

HEB-Puffer:

25 mM Hepes pH 7,5; 10 % Glycerol; 5 mM EDTA; 5 mM EGTA; 150 mM NaCl;

1 % Triton X-100; 1 % PMSF frisch zugeben

Lämmli-Puffer (4 ×):

25 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer pH 7,0; 40 % Glycerin; 8 % SDS;

0,02 % Bromphenolblau; immer frisch zugeben 100 mM DTT (Endkonz. in 1× Lämmli)

LB-Agar:

LB-Medium mit 1,5 % Agarose

LB-Medium:

10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; ad 1 l Millipore-H₂O pH 7,5

Lösung I (LiCl-DNA-Präparation):

25 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA

Lösung II (LiCl-DNA-Präparation):

0,2 M NaOH; 1 % SDS

Lösung III (LiCl-DNA-Präparation):

3 M Kaliumacetat; 1,9 M Essigsäure; pH 4,8

N-Glukosidase-F-Puffer (denaturierend):

200 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer pH 7,2; 10 mM EDTA; 0,2 % SDS; frisch zugeben:

1 % 2-Mercaptoethanol

N-Glukosidase-F-Puffer (nativ):

200 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer pH 7,2; 10 mM EDTA

Paraformaldehydlösung (3,7 %ig):

PBS + 3,7 % p-Formaldehyd

PBS:

2,7 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 8,3 mM Na₂HPO₄; pH 7,4

Permeabilisierungsbloklösung (Immunfluoreszenz):

PBS + 3 % BSA; 0,3 % Triton X-100

Sammelgelpuffer (8 ×):

1 M Tris/HCl pH 6,8; 0,8 % SDS

TBE-Puffer (10 ×):

1 mM Tris/HCl pH 7,4; 83 mM Borsäure; 10 mM EDTA

TBS:

10 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl

TBST:

TBS + 0,1 % Tween 20

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA

TF-Aktivitätspuffer:

10 mM Hepes pH 7,5; 5 mM CaCl₂; 1 g/l BSA

TNM-FH Insect Medium:

253 g TNM-FH Insect Medium-Pulver, 1,75 g Na₂CO₃ ad 5 l Millipore-H₂O pH 6,0-6,2;
sterilfiltrieren

Transferpuffer:

24,7 mM Tris/HCl; 192 mM Glyzin; 20 % Methanol

Trenngelpuffer (4 ×):

1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4 % SDS

2.1.4 Zellkulturlinien und Bakterienstämme

Es wurde sowohl mit immortalisierten Zellkulturlinien, als auch mit präparierten glatten Muskelzellen gearbeitet.

Zelllinie	ATTC-Nr.	Organismus	Gewebe/ Zelltyp	Medium
HEK293	CRL-1573	<i>Homo sapiens</i>	embryonale Niere	DMEM mit Glutamax I, Natriumpyruvat, 4,5 g/l Glucose, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
Sf9	CRL-1711	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Ovar	TNM-FH Insect Medium, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin
VD	in house-Präparation	<i>Homo sapiens</i>	<i>Vena saphena</i> / glatte Muskelzellen	DMEM mit Glutamax I, Natriumpyruvat, 4,5 g/l Glucose, 15 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin

Tabelle 3:
Charakteristika der verwendeten Zelllinien.

Die verwendeten chemisch kompetenten Bakterienstämme sind in **Tabelle 4** aufgeführt.

Bezeichnung	Quelle	Genotyp
One Shot [®] MAX Efficiency [®] DH5 α TM -T1 [®] Competent Cells	Invitrogen, Karlsruhe	F- Φ 80lac Z Δ M15 Δ (lac ZYA-arg F)U169 rec A1 end A1 hsd R17(r _k ⁻ , m _k ⁺) pho A sup E44 thi -1 gyr A96 rel A1 ton A
DH5 α F'	Invitrogen, Karlsruhe	F' / end A1 hsd R17(r _k ⁻ , m _k ⁺) gln V44 thi -1 rec A1 gyr A (Nal ^r) rel A1 Δ (lac ZYA-arg F) U169 deo R (Φ 80dlac Δ (lac Z)M15)
GM48	ATCC	F' thr leu thi lacY galK galT ara fhu A tsx dam dcm glnV44

Tabelle 4:
Charakteristika der verwendeten chemisch kompetenten Bakterienstämme.

2.1.5 Vektoren

Die folgenden Plasmide kamen zum Einsatz:

pCR[®]4-TOPO[®] TA (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

pCR[®]4 Blunt-TOPO[®] (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

pcDNA3 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

pDRIVE (QIAGEN GmbH, Hilden)

pVL1393 (Becton Dickinson Biosciences GmbH, Heidelberg)

BD BaculoGold[™] Linearized Baculovirus DNA (BD Biosciences GmbH, Heidelberg)

2.1.6 Antikörper

Für Immundetektion von Western-Blots (siehe **2.5.6**), zur Immunfluoreszenzmikroskopie (siehe **2.5.8**) bzw. zur Immunpräzipitation (siehe **2.5.13**) wurden die in **Tabelle 5** aufgeführten Antikörper verwendet:

Antikörper	Wirt	Hersteller	Kat.-Nr.	Verwendung	Verdünnung/ Endkonz.
anti-human TF 1	Ziege polyklonal	American Diagnostica GmbH, Pfungstadt	4501	Western-Blot	1:2000
				Immun- präzipitation	1 mg/ml
				TF-Inhibition in ETP-Test	3 µg/ml
anti-human TF 2	Maus, monoklonal	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen	Mab TFE 280	Western-Blot	1:2000
anti-human TF FITC	Maus, monoklonal	American Diagnostica GmbH, Pfungstadt	4508CJ	Immun- fluoreszenz	1:10
anti-FLAG M2 [®]	Maus, monoklonal	Stratagene Europe, Amsterdam, NL	200471	Western-Blot	1:2000
				Immun- präzipitation	3 µg/ml
anti-FLAG M2 [®] FITC	Maus, monoklonal	Sigma, München	F4049	Immun- fluoreszenz	1:200
anti-Ziege IgG HRP	Esel, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	sc-2020	Western-Blot	1:20.000
				TF-Inhibition in ETP-Test	10 µg/ml
anti-Maus IgG HRP	Ziege, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	sc-2005	Western-Blot	1:30.000

Tabelle 5:
Verwendete Antikörper.

2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Alle genutzten synthetischen Oligonukleotide aus **Tabelle 7** wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

Ziel	Primerbezeichnung (sense/antisense)	Primersequenz	Fragmentgrösse des PCR-Produktes (bp)	Verwendung	Annealing-Temp. theoretisch (°C)	Annealing-Temp. praktisch (°C)	Zykluszahl
hTF	5': hTF_-22_-2	TAG GAT CCA TCT CGC CGC CAA CTG GTA GA	953	Klonierung	66	61	35
	3': hTF_+889_+909	ATC TCG AGA AGC TTG TAG CTC CAA CAG TGC TTC C			62		
	5': TF1up	GAA GGA TGT GAA GCA GAC GTA C	509	Expressionsnachweis	66	63,3	35
	3': TF1dn	GGA TGA TGA CCA CAA ATA CCA C			64		
	5': hTF_-22_-2	TAG GAT CCA TCT CGC CGC CAA CTG GTA GA	150	FLAG-Markierung	66	56,5	35
	3': hTF_+80_+96_FLAG	CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC AGC GCC GGC CAC CTG GG			62		
	5': hTF_+97_+117	TCA GGC ACT ACA AAT ACT GTG	263	FLAG-Markierung	60	56,5	35
	3': hTF_+339_+357	TAA CCG GTG CTC TCC ACA TTC			60		
5': hTF_-22_-2	TAG GAT CCA TCT CGC CGC CAA CTG GTA GA	389 (original) 413 (FLAG)	FLAG-Markierung	66	56,5	35	
3': hTF_+339_+357	TAA CCG GTG CTC TCC ACA TTC			60			
ashTF	5': hTF_-22_-2	TAG GAT CCA TCT CGC CGC CAA CTG GTA GA	793	Klonierung	66	61	35
	3': hTF_+889_+909	ATC TCG AGA AGC TTG TAG CTC CAA CAG TGC TTC C			62		
	5': TF1up	GAA GGA TGT GAA GCA GAC GTA C	349	Expressionsnachweis	66	63,3	35
	3': TF1dn	GGA TGA TGA CCA CAA ATA CCA C			64		
	5': hTF_-22_-2	TAG GAT CCA TCT CGC CGC CAA CTG GTA GA	809	FLAG-Markierung	66	64,3	35
	3': ashTF 3'FLAG	TA CTC GAG AAG CTT TTA CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC GTG GGG AGT TCT CCT			48		
	5': hTF For	TAT ATA GGA TCC ATC TCG CCG CCA ACT GGT AGA	789	HIS-Markierung	66	40,1	30
3': ashTF3'HisTag	TAT ATA GCG GCC GCG AAT TCT TAC ACC ACC ACC ACC ACC ACG TGG GGA GTT CTC CT	48					
GAPDH	5': GAPDHsense	TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA	220	Expressionsnachweis-	68	63,3	35
	3': GAPDHantisense	TCC TTG GAG GCC ATG TAG GCC AT			72		

Tabelle 7:
Verwendete Oligonukleotide.

2.2 Zellkultur

Die verwendeten Zellkulturmedien wurden von Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe), Zellkulturgefäße von den Firmen Becton-Dickinson (Heidelberg) und Greiner (Solingen) bezogen.

2.2.1 Isolation und Kultivierung humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Die mittels der Explant-Technik (Fallier-Becker & Rupp, 1990) aus der humanen *Vena saphena* isolierten glatten Muskelzellen (SMC) wurden in supplementiertem Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert (siehe **2.1.4, Tab. 3**). Zellkulturschalen mit den adhären Zellen wurden bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und unter Begasung mit 5 % CO₂ (Heraeus CO₂-Auto-Zero, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) inkubiert. Im Abstand von 2-4 Tagen wurden Konfluenz und Morphologie der Zellen im Inversmikroskop (Olympus CK2) kontrolliert, konfluente Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS mittels Trypsin/EDTA abgelöst (0,05 % / 0,5 mM) und passagiert.

2.2.2 Kultivierung humaner embryonaler Nierenzellen

Adhären HEK293-Zellen (CRL-1573, ATCC, LGC Promochem, Wesel) wurden in supplementiertem DMEM (siehe **2.1.4, Tab. 3**) kultiviert. Die Inkubationsbedingungen sowie die Subkultivierung der Zellen stimmten mit denen der glatten Gefäßmuskelzellen (siehe **2.2.1**) überein. Zu transfizierende Zellen wurden in Medium ohne Antibiotikazusatz ausgesät.

2.2.3 Kultivierung der Insektenzelllinie Sf9

Die Kultivierung der adhären Sf9-Zellen (CRL-1711, ATCC) fand in supplementiertem TNM-FH-Medium (siehe **2.1.4, Tab. 3**) bei 27 °C und 95 % relativer

Luftfeuchtigkeit statt. Konfluenz und Morphologie der Zellen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch überprüft und konfluente Zellen subkultiviert.

2.3 Klonierung von humanem *tissue factor* und alternativ gespleißtem humanem *tissue factor* aus SMCs

2.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus humanen Zellen

Gesamt-RNA wurde aus konfluent wachsenden, adhären Zellen mittels der Trizol-Methode (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) unter Verwendung eines gebrauchsfertigen Phenol-Isothiozyanat-Gemischs (TRI Reagent[®]) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Es folgte eine Quantifizierung der RNA (siehe 2.3.2) sowie die Lagerung bei -20 °C.

2.3.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm mit einem Genequant II DNA/RNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt. Der Quotient aus beiden Absorbtionswerten (ratio 280 nm/260 nm) bietet eine Abschätzung der Nukleinsäure-Reinheit und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen (1 OD_{260 nm} = 40 µg/ml RNA; 1 OD_{260 nm} = 50 µg/ml DNA).

2.3.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) für Klonierung

Die RT-PCR wurde in einem Zwei-Schritt-Verfahren durchgeführt. Hierbei erfolgte zuerst das Umschreiben von 2 µg Gesamt-RNA (siehe 2.3.1) in cDNA gemäß dem Herstellerprotokoll (First Strand cDNA Synthesis Kit, Amersham Pharmacia Biotech).

Als zweites wurde eine PCR unter Verwendung dieser cDNA, Oligonukleotidprimer (siehe **2.1.7, Tab. 7**) und der Taq-Polymerase (Qbiogene) zur Amplifikation der spezifischen Produkte im Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt:

RT-PCR-Ansatz 1: 300 ng cDNA
 0,4 mM dNTP-Mix
 1 × Taq-Puffer mit Mg₂Cl₂
 30 μM Primer sense (hTF_{-22_-2})
 30 μM Primer antisense (hTF_{+889_+909})
 5 U Taq-DNA-Polymerase
 RNase-freies Wasser ad 25 μl

RT-PCR-Bedingungen 1:

Phase	Dauer (min)	T (°C)	Wiederholung
Denaturierung	10	95	
Denaturierung	0,5	95	35 ×
Annealing	0,5	61	
Synthese	1,5	72	
Synthese	7	72	
Lagerung	bis Ende	8	

2.3.4 Semiquantitative RT-PCR für Expressionsnachweis

Eine RT-PCR unter Verwendung des QIAGEN[®] OneStep RT-PCR Kit diente dem Expressionsnachweis. Als interner Standard wurde die Expression des Enzymes GAPDH verwendet.

RT-PCR-Ansatz 2: 250 ng Gesamt-RNA (siehe 2.3.1)
 1 × QIAGEN OneStep RT-PCR Puffer
 1 × Q-Solution
 0,4 mM dNTP-Mix
 je 0,32-0,45 µM genspez. Primer (TF oder GAPDH)
 1 µl QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix
 RNase-freies Wasser ad 25 µl

RT-PCR-Bedingungen 2:

Phase	Dauer (min)	T (°C)	Wiederholung
Doppelstrangsynthese	30	50	
Denaturierung	15	95	
Denaturierung	0,5	94	30 ×
Annealing	0,5	63,3	
Synthese	1	72	
Synthese	15	72	
Lagerung	bis Ende	8	

2.3.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Zur Visualisierung wurden Nukleinsäureproben (siehe 2.3.3+4; siehe 2.4.1) mit ¼ ihres Volumens an 5 × Blaumarker versetzt und in horizontalen 1 × TBE-Agarose-Gelen (1-2 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach ca. 20-minütiger Inkubation der Gele in ethidiumbromidhaltigem 1 × TBE-Puffer (0,5 µg/ml) erfolgte die Visualisierung der Nukleinsäurebanden mittels UV-Bestrahlung.

2.3.6 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung (siehe 2.3.5) wurden die gewünschten DNA-Banden unter langwelligem UV-Licht aus dem TBE-Agarosegel ausgeschnitten, das

Gewicht der Agarosestücke ermittelt und die DNA-Fragmente mittels des GFX PCR DNA and Gel Purification Kits laut Herstellerangaben isoliert.

2.3.7 TOPO-Ligation

Viele thermostabile DNA-Polymerasen (z. B. Taq) erzeugen während einer PCR einen Desoxyadenosin-Überhang anstatt glatter Enden, womit eine Kompatibilität zu den Desoxythymidin-Überhängen der Vektoren (u. a. pCR[®]4-TOPO) des TOPO[®] TA Klonierungssystems (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) entsteht. Dies ermöglichte eine direkte Klonierung der aufgereinigten (siehe 2.3.5+6) RT-/PCR-Produkte (siehe 2.3.3+2.4.1) nach Herstellerangaben (TOPO[®] TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen). Der Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) ist zur Klonierung von DNA-Fragmenten mit glatten Enden (blunt ends) geeignet. Der einzige Unterschied zum TOPO[®] TA-Klonierungssystem besteht im Vektor pCR[®]4Blunt-TOPO[®], in welchen die RT-/PCR-Produkte ligiert werden.

2.3.8 Ligation mittels T4-DNA-Ligase

Die Ligation verschiedener DNA-Moleküle mit der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) wurde laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Grundsätzlich setzte sich ein 20 µl Ligationsansatz aus den zwei zu ligierenden DNA-Stücken und 1 U T4-DNA-Ligase in einfach konzentriertem Reaktionspuffer zusammen.

2.3.9 Plasmid-DNA-Minipräparation

Die Isolation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse wurde laut der Methode von Birnboim & Doly (1979) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente eine am Vortag angeimpfte und über Nacht bei 37 °C und 80 rpm inkubierte *E. coli*-Vorkultur in antibiotikahaltigem LB-Medium.

2.3.10 Plasmid-DNA-Midipräparation

Zur Präparation größerer DNA-Mengen wurde die LiCl-Präparation genutzt. Die per Zentrifugation (8.000 rpm 15 min 4 °C; Beckman J2-HS, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) aus 30 ml Vorkultur sedimentierten Bakterien wurden in 2 ml Lösung I resuspendiert, durch Zugabe von 2,4 ml Lösung II lysiert und die Zelltrümmer durch 3 ml Lösung III ausgefällt und per Zentrifugation (12.000 rpm, 30 min, RT; Beckman J2-HS) sedimentiert. Eine Filtration durch einen angefeuchteten Faltenfilter befreite den wässrigen Überstand von etwaigen Präzipitatresten bevor, durch Zugabe des gleichen Volumens an kaltem 100%igem Ethanol und anschließender Zentrifugation (10.000 rpm 30 min 4 °C, Beckman J2-HS, Beckman Coulter GmbH, Krefeld), die darin gelösten Nukleinsäuren (RNA und Plasmid-DNA) präzipitiert wurden.

Nach Rücklösen des Pellets in 200 µl Millipore-H₂O erfolgte die Fällung der enthaltenen RNA durch folgende Schritte: Zugabe von 345 µl eiskaltem 4 M Lithiumchlorid sowie 7 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 und 30 min Zentrifugation bei 13.000 rpm 4 °C (Biofuge 13, Heraeus Sepatech, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold). Die Plasmid-DNA wurde aus dem wässrigen Überstand durch Zugabe des dreifachen Volumens kalten 100%igen Ethanols gefällt und mittels Zentrifugation (13.000 rpm 30 min 4 °C; Biofuge 13, Heraeus Sepatech, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) pelletiert. Resuspendieren des Pellets in RNase A-haltigem (100 mg/l) TE-Puffer und Inkubation für 15 min bei 37 °C im Heizblock (Thermostat 5320 Eppendorf, Hamburg) diente der Entfernung noch verbliebener RNA-Reste. Durch zweifaches Ausschütteln der Probe mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch(25:24:1) gefolgt von einfachem Ausschütteln mit Chloroform wurden RNase A- und Phenolreste aus der Probe eliminiert. Die Zugabe von 1/10 des Probenvolumens an 3 M Natriumazetat und des 2-fachen Volumen kalten 100%igen Ethanols führte zusammen mit der anschließenden Zentrifugation (13.000 rpm 20 min 4 °C; Biofuge 13, Heraeus Sepatech, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) zur Fällung und Pelletierung der Plasmid-DNA. Nach einmaligem Waschen des Pellets mit 70%igem Ethanol wurde die DNA in Millipore-H₂O rückgelöst und bei -20 °C gelagert.

2.3.11 Sequenzierung

Die DNA wurde zur Sequenzierung an die Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) geschickt und über die Primer M13 rev und M13 uni sequenziert.

2.3.12 Praktische Durchführung der Klonierung von *hTF* und *ashTF*

Aus unstimulierten *Vena saphena* (siehe 2.2.1) wurde Gesamt-RNA präpariert (siehe 2.3.1), welche das Ausgangsmaterial für die Klonierungs-RT-PCR (siehe 2.3.3) von *hTF* darstellte. Alternativ gespleißter *tissue factor* (asTF) entsteht allgemein durch alternatives Spleißen der TF-prä-mRNA (Bogdanov *et al.*, 2003), sodass die RT-PCR zur Klonierung (siehe 2.3.3) von *hTF* (953 bp) auch *ashTF* (793 bp) vervielfältigte. Beide RT-PCR-Produkte wurden aufgereinigt (siehe 2.3.5+6), mit dem Klonierungsvektor pCR[®]4-TOPO ligiert (siehe 2.3.7) und *E. coli* DH5 α TM-T1[®] mit den Ligationsproduktion transformiert.

Nach Isolation der Plasmid-DNA (siehe 2.3.9) aus einigen der auf ampicillinhaltigen LB-Agar-Platten gewachsenen Bakterienkolonien erfolgte die Identifizierung der korrekten pCR4 hTF/asHTF-Klone über eine *Bam*HI-*Hind*III-Testrestriktion. Von je drei der korrekten Klone wurde eine größere Menge Plasmid-DNA (siehe 2.3.10) isoliert und sequenziert (siehe 2.3.11).

Je ein mutationsfreier Klon diente als Ausgangsmaterial für alle weiteren Arbeiten und wurde hierfür über die mittels der RT-PCR-Primer eingeführten Restriktionssequenzen der Enzyme *Bam*HI und *Xho*I in den Expressionsvektor pcDNA3 umkloniert.

2.4 FLAG-Markierung von *hTF* und *ashTF*

2.4.1 PCR

Der selektiven Vervielfältigung einer gewünschten DNA-Sequenz diente die PCR (Saiki *et al.*, 1988) im Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg), wobei gezielte Modifikationen der Sequenz über den Einsatz entsprechend konstruierter Primer (siehe **2.1.7, Tab. 7**) erreicht wurden (siehe **2.4.4 + 2.7.1**).

2.4.2 Phosphorylierung von DNA

Zur Phosphorylierung der 5'-Enden eines aufgereinigten (siehe **2.3.5+6**) Restriktionsproduktes wurde die T4-Polynukleotidkinase laut Herstellerprotokoll (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet und die DNA anschließend direkt aus dem Reaktionsansatz aufgereinigt (siehe **2.4.3**).

2.4.3 DNA-Isolation direkt aus Reaktionsansätzen

Um DNA direkt aus Reaktionsansätzen zu isolieren, wurde sie analog zur Plasmid-DNA-Midipräparation (siehe **2.3.11**) durch zusetzen von Natriumazetat und Ethanol ausgefällt.

2.4.4 Praktische Durchführung der FLAG-Markierung von *hTF* und *ashTF*

Bei der FLAG-Markierung des *hTF* musste beachtet werden, dass es sich bei HTF um ein membranständiges Protein mit einer Transmembrandomäne handelt. Der HTF-N-Terminus befindet sich extrazellulär, während der C-Terminus intrazellulär lokalisiert ist. Um später den FLAG-Tag an der für AK zugänglichen Zelloberfläche zu erhalten, war deshalb die entsprechende Tag-DNA-Sequenz direkt hinter der Signalsequenz des *hTF*-Gens zu platzieren. **Abbildung 3** fasst schematisch die Arbeitsschritte zusammen:

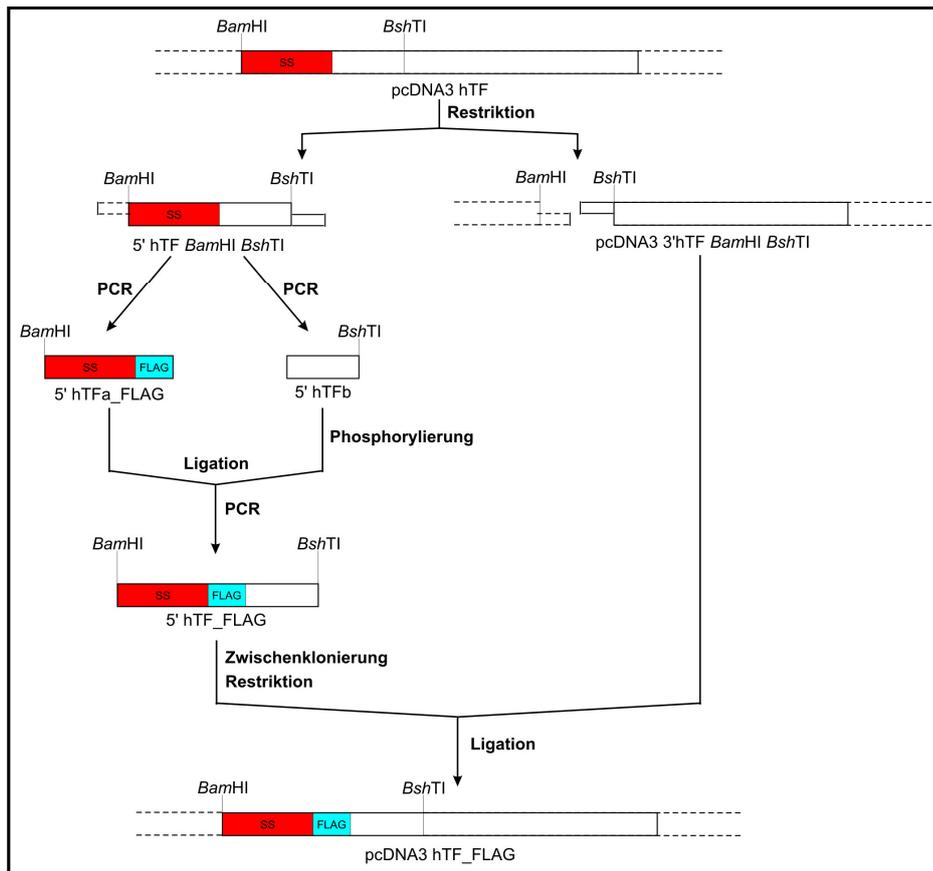


Abb. 3:

Schematische Darstellung der FLAG-Markierung des hTF.

Grundlegendes Prinzip der Einführung einer FLAG-Markierung zwischen der Signalsequenz und der Sequenz des reifen HTF auf DNA-Ebene.

Aus dem Konstrukt pcDNA3 hTF (siehe 2.3.12) wurde über eine *BshTI*-*BamHI*-Restriktion die *hTF*-Sequenz von ihrem Anfang (*BamHI*) bis zur ersten einzigartigen Schnittstelle nach der *hTF*-Signalsequenz (*BshTI*, sowohl im Gen, als auch im Plasmid) herausgeschnitten. Mit diesem DNA-Abschnitt erfolgten 2 PCRs (siehe 2.4.1), während der restliche Plasmidteil bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert wurde:

PCR-Ansatz 5' hTFa_FLAG:

5 ng 5' hTF *BamHI* *BshTI*

0,4 mM dNTP-Mix

0,6 µM Primer sense (hTF_-22_-2)

0,6 µM Primer antisense (hTF_+80_+96_FLAG)

1 × Q-Solution

1 × AccuBuffer

2,5 U AccuSure™ DNA Polymerase

PCR-Ansatz 5' hTFb:

5 ng 5' hTF *Bam*HI *Bsh*TI
0,4 mM dNTP-Mix
0,6 µM Primer sense (hTF_+97_+117)
0,6 µM Primer antisense (hTF_+339_+357)
1 × AccuBuffer
2,5 U AccuSure™ DNA Polymerase

PCR-Programm 5' hTFa_FLAG bzw. 5' hTFb:

Phase	Dauer (min)	T (°C)	Wiederholung
Denaturierung	10	95	
Denaturierung	0,5	95	35 ×
Annealing	0,5	56,5	
Synthese	1	72	
Synthese	8	72	
Lagerung	bis Ende	4	

Die erste PCR führte zum Anhängen der FLAG-Sequenz an die *hTF*-Signalsequenz während die zweite PCR den DNA-Abschnitt hinter der Signalsequenz bis zur *Bsh*TI-Schnittstelle vervielfältigte. Das Ligationsprodukt aus beiden Abschnitten diente als Matrizen-DNA für die PCR (siehe 2.4.1) zur Synthese des vollständigen FLAG-markierten *hTF*-DNA-Stückes inkl. der *Bsh*TI-Schnittstelle (5' hTF_FLAG):

PCR-Ansatz 5' hTF_FLAG:

1 µl Ligation 5' hTFa_FLAG+5' hTFb phospho
0,4 mM dNTP-Mix
0,6 µM Primer sense (hTF_-22_-2)
0,6 µM Primer antisense (hTF_+339_+357)
1 × Q-Solution
1 × AccuBuffer
2,5 U AccuSure™ DNA Polymerase

PCR-Programm 5' hTF_FLAG:

Phase	Dauer (min)	T (°C)	Wiederholung
Denaturierung	10	95	
Denaturierung	0,5	95	35 ×
Annealing	0,5	56,5	
Synthese	1	72	
Synthese	8	72	
Lagerung	bis Ende	4	

Das PCR-Produkt wurde zwischenkloniert und vier der potenziell korrekten Klone sequenziert (siehe 2.3.11). Über eine *Bsh*TI-*Bam*HI-Restriktion konnte nun der FLAG-markierte 5'-hTF-Anteil (5' hTF_FLAG) aus dem Plasmid restringiert und nachfolgend mit der restlichen 3'hTF-DNA in pcDNA3 (pcDNA3 3'hTF *Bam*HI *Bsh*TI) ligiert (siehe 2.3.8) werden.

Im Vergleich zur FLAG-Markierung des *hTF* gestaltete sich diese beim *ashTF* wesentlich einfacher. Die folgende PCR (siehe 2.4.1) führte zum Anfügen der FLAG-Markierung an das 3'-Ende des *ashTF*:

PCR-Ansatz ashTF_3'FLAG:

- 20 ng pcDNA3 ashTF
- 0,7 mM dNTP-Mix
- 0,6 µM Primer sense (hTF_-22_-2)
- 0,6 µM Primer antisense (ashTF 3'FLAG)
- 1 × AccuBuffer
- 5 U AccuSure™ DNA Polymerase

PCR-Programm ashTF_3'FLAG:

Phase	Dauer (min)	T (°C)	Wiederholung
Denaturierung	10	95	
Denaturierung	0,5	95	35 ×
Annealing	0,5	64,3	
Synthese	2	72	
Synthese	15	72	
Lagerung	bis Ende	4	

Das PCR-Produkt wurde zwischenkloniert und vier der potenziell korrekten Klone sequenziert (siehe 2.3.11). Ein mutationsfreier ashTF_FLAG-Klon wurde anschließend über die *Bam*HI- und *Xho*I-Schnittstellen in pcDNA3 umkloniert.

2.5 Expression und funktionelle Charakterisierung von HTF und asHTF

2.5.1 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Um Proteine heterolog in HEK293-Zellen zu exprimieren, wurden entsprechende Plasmide (siehe 2.3.10) mittels LipofectamineTM 2000 nach Angaben des Herstellers unter sterilen Bedingungen in die Zellen eingebracht.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen unter den üblichen Bedingungen (37 °C, 95 % relative Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂) inkubiert. Sollten die Zellüberstände für enzymatische Tests (siehe 2.6.3+4) verwendet werden, erfolgte 36 h nach der Transfektion (bzw. spätestens 12 h vor der Verwendung) ein Wechsel auf serumfreies Kulturmedium.

2.5.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Auf sterilen Deckgläschen gewachsene, transfizierte HEK293-Zellen (siehe 2.5.1) wurden 1 × mit PBS gewaschen, für 20 min mit 3,7 %iger Paraformaldehydlösung

fixiert, anschließend $3 \times$ je 5 min mit PBS gewaschen und für 15 min in Permeabilisierungsblocklösung inkubiert. Es folgte eine Inkubation der Deckgläschen für 3 h bei RT unter Lichtausschluss in feuchter Umgebung mit je 120 μ l Antikörperlösung (siehe **2.1.6, Tab. 5**). Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellkerne mit einem Kernfarbstoff (Hoechst 33342 1:1000 verdünnt in PBS) angefärbt, die Zellen erneut gewaschen und die Präparate mit „Vectashield mounting medium“ eingedeckt. Die Fluoreszenz der Antikörper bzw. des Kernfarbstoffs (Filter NIBA für FLAG-FITC, Filter WU für Hoechst 33342) wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 50, Hamburg) detektiert und Bilder mit der angeschlossenen Colorview II-Kamera (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) aufgenommen.

2.5.3 Isolation von Gesamtprotein für Western-Blot

Nach 2-fachem Waschen mit PBS wurden *Vena saphena*-SMCs in HEB-Puffer lysiert und anschließend mit 1/3 Volumen $4 \times$ Lämmli-Puffer versetzt, während HEK293-Zellen 48 h nach der Transfektion (siehe **2.5.1**) direkt in $1 \times$ Lämmli-Puffer lysiert wurden. Proben für den Western-Blot, welche ein Eigenvolumen (siehe **2.5.7+8+10+11**) besaßen, wurden ebenfalls mit 1/3 des Probenvolumens an $4 \times$ Lämmli versetzt. Einer Denaturierung von 5 min bei 95 °C folgte eine kurze Sonifizierung der Proben vor ihrer Lagerung bei -20 °C.

2.5.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration aus $1 \times$ Lämmli-Puffer basierte auf der Methode von Dieckmann-Schuppert & Schnittler (1997). Die Proteinproben (siehe **2.5.3**) wurden auf separate quadratische Felder einer Nitrozellulosemembran (HybondTM-C Extra) aufgetragen und mit Amido-Schwarz-Färbelösung angefärbt. Nach Entfernung überschüssigen Farbstoffs wurde die Membran getrocknet, die Felder ausgeschnitten und die Nitrozellulose aufgelöst, wobei die gefärbten Proteine in die Lösung übergingen. Die mit der Konzentration des Farbstoffs korrelierende Proteinkonzentration wurde anschließend durch die photometrische Bestimmung der Absorption bei 630 nm der Lösung im Vergleich zur Standardkurve (BSA-Lösungen

0-15 mg/ml) bestimmt (Microplate Reader Model 550 und Microplate Manager PC 4.0 Build 23, BioRad, München).

2.5.5 Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Proteintransfer

Nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) wurden die denaturierten Proteine (siehe **2.5.3**) aufgetrennt. Das Sammelgel beinhaltete 4 % Acrylamid, während dessen Konzentration im Trenngel je nach Größe der zu untersuchenden Proteine zwischen 8 % und 15 % variierte. An die verwendete Elektrophoresekammer (Mini-Protean 3 Cell, BioRad, München) wurde für ca. 90 min eine Spannung von 200 V angelegt, was zur Auftrennung der Proteine sowie des aufgetragenen Proteinstandards (PageRulerTM Prestained Protein Ladder) führte.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mittels einer „Semi Dry“ Blotting-Apparatur (Bio-Rad, München) auf eine, zuvor kurz in 100 % Methanol aktivierte und mit Transferpuffer equilibrierte, PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Immobilon-P) übertragen (10 V, 50-60 min).

2.5.6 Antikörper-Hybridisierung und Detektion

Zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran je nach Protokoll für 4-5 h bei RT in ECL Advance-Blocklösung prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Erstantikörper (siehe **2.1.6, Tab. 5**) bei 4 °C unter Rotation über Nacht. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min in TBST) folgte die Hybridisierung des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers (siehe **2.1.6, Tab. 5**) in ECL Advance-Blocklösung für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran erneut gewaschen und die Proteine mit dem „ECL Advance Western Blotting Detection Kit“ (siehe **2.1.1, Tab. 1**) laut Angaben des Herstellers detektiert.

Im Anschluss wurde die gleichmäßige Proteinbeladung der Membran über eine Anfärbung der Proteine mit Amido-Schwarz-Färbelösung verifiziert.

2.5.7 Präparation von zellfreiem Überstand, Mikropartikeln und mikropartikelfreiem Überstand

Der Überstand von HEK293-Zellen wurde mind. 48 h nach deren Transfektion (siehe **2.5.1**) mittels Zentrifugation (10 min, $3.000 \times g$, RT, Centrifuge 5415c, Eppendorf, Hamburg bzw. Minifuge GL, Heraeus Sepatech, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) von Zelltrümmern befreit und dieser zellfreie Überstand wie folgt ultrazentrifugiert:

Bei Pelletierung der Mikropartikel aus Überstandsvolumina größer 1,2 ml erfolgte der erste Ultrazentrifugationsschritt im SW41Ti-Rotor ($100.000 \times g$, 1 h, 12 °C, Beckman L8-60M Ultracentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld), wonach der mikropartikelfreie (MP-freie) Überstand auf ein Maximalvolumen von 1,2 ml abgesaugt, die Mikropartikel (MP) darin resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wurden. Anschließend wurden diese, sowie Proben kleinerer Überstandsvolumina, im Festwinkelrotor 70Ti ultrazentrifugiert ($100.000 \times g$, 1 h, 12 °C, Beckman L8-60M Ultracentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld). Anschließend konnte der mikropartikelfreie Überstand abgenommen und analog der Mikropartikel für weitere Versuche genutzt werden. Sollten die Fraktionen (zellfreier Überstand, MP, MP-freier Überstand) in Enzymtests (siehe **2.6.3+4**) eingesetzt werden, erfolgte mind. 12 h zuvor bei den Zellen ein Wechsel auf serumfreies Medium.

2.5.8 Präparation von Zelllysate u. a. für Enzymtests

Zwei Tage nach ihrer Transfektion (siehe **2.5.1**) wurden HEK293-Zellen vom Boden der D60-Zellkulturschale in PBS abgeschabt, ein Anteil für die Western-Blot-Proteingewinnung (siehe **2.5.3**) verwandt und die restlichen Zellen nach Zusatz von N-octyl- β -D-Glycopyranosid (NOG, Endkonz. 15 mM) bei 37 °C für 15 min unter leichtem Schütteln (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) lysiert.

Versuchsabhängig folgte der Pelletierung unlysierter Zellrückstände eine Gesamtproteinbestimmung (siehe **2.5.9**) mit anschließender Einstellung auf die gewünschte Proteinkonzentration durch Zugabe von 15 mM NOG (in PBS).

2.5.9 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent“ nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Eine BSA-Lösungsreihe aufsteigender Konzentration (0-10 µg/ml) diente der Erstellung einer Standardkurve, anhand welcher die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden konnten.

2.5.10 Immunpräzipitation

Bei HEK293-Zellen folgte 24 h nach ihrer Transfektion (siehe **2.5.1**) ein Wechsel auf serumfreies Medium und anschließend eine weitere Kultivierung für 24 h. Danach wurde der Überstand abgenommen und zur Präparation von Mikropartikeln und MP-freiem Überstand (siehe **2.5.7**) verwendet. Die Immunpräzipitation von HTF bzw. asHTF_FLAG aus Zelllysate, Mikropartikeln und mikropartikelfreien Überständen erfolgte laut Censaret *et al.* (2007) unter Verwendung der Antikörper aus **Tabelle 5** (siehe **2.1.6**).

2.5.11 Deglykosylierung von Proteinen

Analog zu **2.5.8**, jedoch bereits 24 h nach ihrer Transfektion, wurden Zelllysate aus transfizierten HEK293-Zellen (siehe **2.5.1**) hergestellt und mit 0,05 U/µl N-Glukosidase-F in einfach konzentriertem nativem oder denaturierendem N-Glukosidase-F-Puffer für 24 h bei 37 °C inkubiert (Gerhardt Thermoshake, C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter).

2.6 Enzymatische Charakterisierung von HTF_FLAG und asHTF_FLAG

2.6.1 Präparation gewaschener Thrombozyten

Frisch aus Spenderblut gewonnenes Buffy-Coat-Blut (Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Heinrich-Heine-Universität) diente als Quelle zur Isolation von Thrombozyten laut Stampfuss (2006). Die gewonnene Thrombozytensuspension wurde aliquotiert bei -20 °C gelagert, was zur Zerstörung der Thrombozytenmembranen unter gleichzeitiger Zunahme der negativ geladenen Oberflächen führte.

2.6.2 Herstellung von thrombozytenarmen Plasma (PPP)

Vollblut gesunder Spender wurde 1:10 mit ACD versetzt und durch Zentrifugation (3000 × g, 10 min, RT, Minifuge GL, Heraeus Sepatech, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) in zelluläre Bestandteile und plättchenarmes Plasma (PPP) aufgetrennt. Nach Sterilfiltration zur Entfernung von Mikropartikeln lagerte das PPP aliquotiert bei -80 °C.

2.6.3 Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität

Hemker *et al.* (2002) etablierten eine Methode zur quantitativen Messung der Thrombinbildung. Hierbei besteht der Reaktionsansatz aus einer TF-Quelle, negativ geladenen Phospholipiden und dem fluorogenen Thrombin-Substrat Z-Gly-Gly-Arg-AMC in einem Rekalzifizierungspuffer (FluCa). Dort kommt es durch Zusatz von plättchenarmen Plasma und den darin enthaltenen Gerinnungsfaktoren zur Bildung von Thrombin. Die sehr langsame proteolytische Spaltung des Substrats durch Thrombin ermöglicht eine kontinuierliche Aufzeichnung der pro Zeit gebildeten Thrombinmenge durch Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs AMC (7-amino-4-methylcumarin), welcher bei einer Wellenlänge von 390 nm angeregt wird und Licht mit einem Maximum von 460 nm emittiert. Die Umrechnung der Fluoreszenzmenge in die entsprechende Thrombinkonzentration mittels einer Software erfolgt durch den Vergleich mit der Fluoreszenz einer Kalibratorprobe. Hierbei wird die TF-Quelle durch einen, gegen

antikoagulatorische Plasmaproteine inerten, α_2 -Macroglobulin-Thrombin-Komplex ersetzt, der das Substrat mit einer stabilen, definierten Geschwindigkeit spaltet.

Das Standardprotokoll wurde dahingehend angepasst, dass die Thrombin-Bildung in Abhängigkeit von verschiedenen TF-Konzentrationen bestimmt werden konnte (Stampfuss, 2006). Durch Nutzung von PPP (siehe 2.6.2) bzw. Thrombozytensuspensionen (siehe 2.6.1) gleicher Präparationen über einen längeren Zeitraum, konnte das Gerät spezifisch für die Reaktionsbedingungen bzw. spezifisch für die PPP-Präparation kalibriert werden. Die Verwendung probenspezifischer Kalibratorproben bei jeder weiteren analogen Messung konnte somit entfallen.

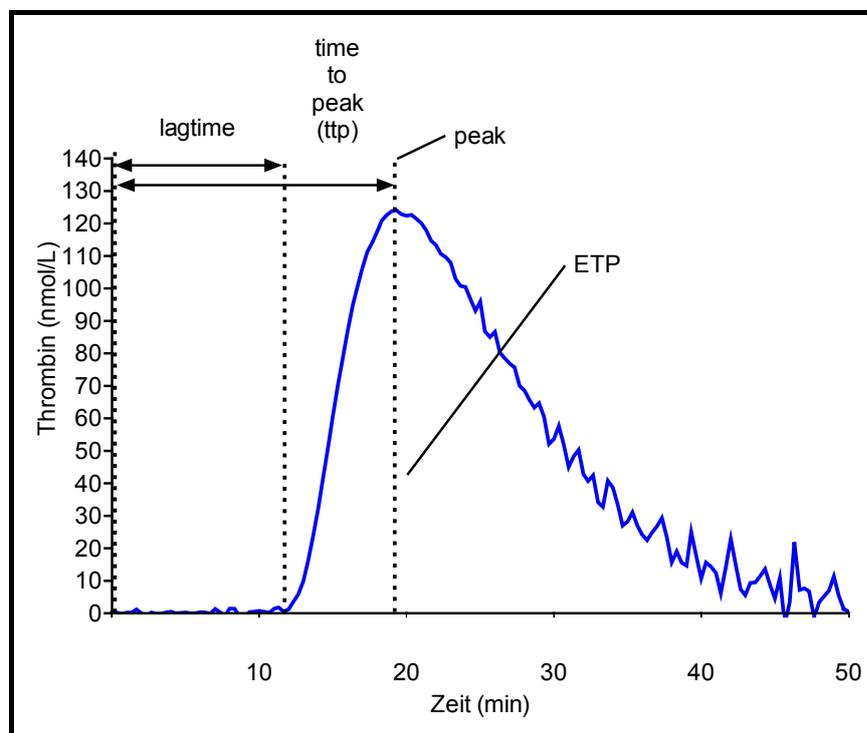


Abb. 4: Messung des endogenen Thrombinpotentials (ETP). Originalkurve mit Analyseparametern.

Abbildung 4 zeigt den typischen Verlauf einer ETP-Kurve, aus welcher die vier Parameter „lag time“, „time to peak“ (ttpeak), „peak“ und ETP ableitbar sind. Je größer der Wert für den Parameter ETP, desto höher ist die Thrombinbildung. Am sensibelsten reagieren erwartungsgemäß die anderen drei Parameter auf die Variationen der TF-Konzentration.

2.6.4 FX-Aktivierung

Im Vergleich zur Bestimmung des endogenen Thrombinpotenzials (siehe 2.6.3) macht sich die FX-Aktivierung nach Szotowski *et al.* (2005) nur eine frühere Phase der Gerinnungskaskade zu Nutze: Eine TF-Quelle wird in kalziumhaltigem Reaktionspuffer mit reinem FVIIa (Endkonz. 2,7 nM) versetzt. Diese bilden gemeinsam während einer 10 min Inkubation bei 37 °C TF-FVIIa-Komplexe und aktivieren den anschließend im Überschuss (Endkonz. 150 nM) zugesetzten FX zu FXa. Die FXa-Bildung wird in einem EDTA-haltigen Puffer abgestoppt, in welchem FXa das anschließend zugesetzte chromogene FXa-Substrat (Spektrozyme[®] FXa, Endkonz. 0,5 mM) spaltet. Über die Absorption bei 405 nm wird dann im ELISA-Reader (Microplate Reader, Modell 550, BioRad, München) die FXa-abhängige, zunehmende Gelbfärbung der Lösung gemessen. Ein Vergleich mit einer, auf FXa-Lösungen aufsteigender Konzentration beruhenden, Standardkurve ermöglicht die Bestimmung der in den Proben gebildeten FXa-Menge.

Die Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit im Labor etabliert und durch Verwendung eines alternativen EDTA-Puffers (Pendurthi *et al.*, 1997) modifiziert. Nach mind. 3 min wurde die Aktivierung von FX abgestoppt und die Substratspaltung alle 5 min über einen Zeitraum von 40 min bei 415 nm im ELISA-Reader (Microplate Reader, Modell 550, BioRad, München) gemessen. Die Messproben wurden als Dreifach-, die Standardproben (0-30 nM FXa in TF-Aktivitätspuffer) als Zweifachbestimmungen gemessen.

Wenn transfizierte Zellen als TF-Quelle dienten, wurde TF-Aktivitätspuffer mit 20 % Thrombozytenmembranen zur Volumenkompensation genutzt. Alle restlichen TF-Proben brachten ein Eigenvolumen mit und wurden aufgrund der unterschiedlichen Probenpräparation (siehe 2.5.7+8+11) auf eine Endkonzentration von 5 mM-Kalzium ergänzt. Um auch hier eine Vergleichbarkeit mit dem ETP-Test (siehe 2.6.3) zu gewährleisten, erfolgte der Zusatz von 20 % Thrombozytenmembranen (siehe 2.6.1), welcher letztlich zu einen ETP-Test-analogen Anteil von 10 % am vollständigen Reaktionsansatz führte.

2.7 Proteinexpression zur Proteingewinnung

2.7.1 His₆-Markierung von *ashTF*

Eine weit verbreitete Methode zur Aufreinigung heterolog exprimierter Proteine funktioniert über die Nickel-Metall-Affinitäts-Chromatografie. Hierfür muss an das gewünschte Protein eine Sequenz von mind. sechs Histidinen angehängt werden, über welche es sich später spezifisch an die nickelhaltige Matrix bindet und somit von den restlichen zellulären Proteinen getrennt wird.

Die His₆-Markierung des *ashTF* erfolgte analog der FLAG-Markierung. Zuerst wurde über die folgende PCR (siehe 2.4.1) ein His₆-Tag an das 3'-Ende des *ashTF* angefügt:

PCR-Ansatz *ashTF*_3'His:

- 100 ng pcDNA3 *ashTF*
- 300 nM dNTP-Mix
- 0,6 pM Primer sense (hTF For)
- 0,6 pM Primer antisense (*ashTF*3'HisTag)
- 1 mM MgSO₄
- 1 × Pfx Amplification Buffer
- 1 U Platinum[®] Pfx DNA Polymerase

PCR-Programm *ashTF*_3'His:

Phase	Dauer (min)	T (°C)	Wiederholung
Denaturierung	5	94	
Denaturierung	0,25	94	30 ×
Annealing	0,5	40,1	
Synthese	1,5	68	
Synthese	3,5	68	
Lagerung	bis Ende	4	

Die Vermehrung des His₆-markierten *ashTF*-Stückes erfolgte über eine Klonierung in den Vektor pDrive (QIAGEN GmbH, Hilden).

In Vorbereitung der baculoviralen Transfektion wurde ashTF_3'His in den Baculovirustransfervektor pVL1393 (Becton Dickinson Biosciences GmbH, Heidelberg) über die Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI inkloniert.

2.7.2 Produktion von Baculoviren

Das System BD BaculoGold™ (Becton Dickinson Biosciences GmbH, Heidelberg) wurde laut Herstellerangaben angewendet. Am dritten Tag nach der Kotransfektion der Sf9-Zellen wurde der virenhaltige Überstand abgenommen und zur Erhöhung des Virentiters (siehe 2.7.3) eingesetzt.

2.7.3 Erhöhung des Virentiters

Um eine Mutation der Viren während der Virenanreicherung zu vermeiden, wurde der Überstand kotransfizierter Zellen (siehe 2.7.1) 1:100 bzw. 1:1000 mit frischem Kulturmedium verdünnt auf neue Sf9-Zellen gegeben. Am dritten Tag nach der Infektion wurde der virenhaltige Überstand abgenommen und dieser Anreicherungszyklus unter Verwendung des Überstands noch zweimal wiederholt.

2.7.4 Virale Transfektion

Nach 1:5 Verdünnung von virenhaltigem Überstand mit frischem Kulturmedium nach dem 3. Anreicherungszyklus (siehe 2.7.3) wurde die Lösung auf neue Sf9-Zellen gegeben und am 3. Tag die Zellen pelletiert. Das Zellpellet konnte entweder direkt für die Proteinpräparation genutzt (siehe 2.7.5) oder bei -80 °C gelagert werden.

2.7.5 Proteinisolierung aus Insektenzellen

Die Proteinisolation aus infizierten Sf9-Zellen wurde laut Herstellerangaben (Protokoll für Säugerzellen, Qiagen) durchgeführt und wie folgt modifiziert:

Das Zellpellet (siehe 2.7.3) wurde in 2 ml Lysispuffer pro 1×10^7 -Zellen resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Die Entfernung von Zellresten aus dem Lysat erfolgte durch Zentrifugation für 50 min bei $24.000 \times g$.

Eine Probe jeder Fraktion (Pellet, Lysat, Eluat) wurde mit Lämmli versetzt, für 5 min bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ denaturiert und auf ihren spezifischen Proteingehalt hin analysiert (siehe 2.5.5-7). Die Lagerung der restlichen Fraktionen erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.8 Statistik

Die Messdaten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Das Signifikanzniveau P für α wurde mit 0,05 festgelegt. Signifikante Unterschiede zwischen mehreren Versuchsgruppen (≥ 3) wurden mittels One-Way Analysis of Variance (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche überprüft. Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit GraphPad Prism-Software (Version 4.00, GraphPad Software, San Diego, USA).

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung von humanem *tissue factor* und alternativ gespleißtem humanem *tissue factor* aus SMC

Der humane TF (*hTF*) und der alternativ gespleißte humane TF (*ashTF*) wurden aus humanen glatten Muskelzellen kloniert (siehe 2.3.13). Sie stimmten in ihren Sequenzen mit den Originalpublikationen (*hTF* Accession-Nr.: NM_001193; *ashTF* Accession-Nr.: AF487337 bzw. AF497570) überein.

3.2 FLAG-Markierung von *hTF* und *ashTF*

Abbildung 5 zeigt die Plasmide mit den FLAG-markierten *hTF*- und *ashTF*-Sequenzen (siehe 2.4.4), welche für die vergleichende Charakterisierung beider Proteine verwendet wurden.

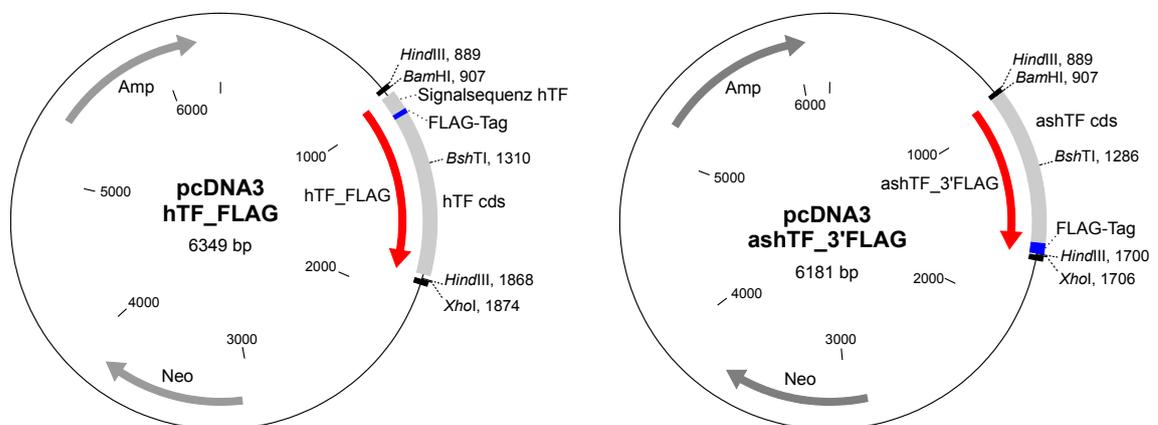


Abb. 5:
Vektorkarten des pcDNA3-Plasmids mit hTF_FLAG bzw. ashTF_3'FLAG.

3.3 Expression und Untersuchung der prokoagulatorischen Aktivität von hTF und ashTF

3.3.1 Nachweis der heterologen Expression von hTF bzw. ashTF in transfizierten HEK293-Zellen durch semiquantitative RT-PCR

Um sicherzustellen, dass bereits die unmarkierten Konstrukte (pcDNA3 hTF/ashTF, siehe 2.3.13, 3.1) zu einer heterologen Expression führen, wurden HEK293-Zellen ohne DNA (= mock) bzw. mit pcDNA3 hTF/ashTF transfiziert (siehe 2.5.1) und Gesamt-RNA daraus präpariert (siehe 2.3.1). Eine semiquantitative RT-PCR (siehe 2.3.4) mit getrennten Ansätzen für TF (Primer: je 0,45 μ M TF1up/dn; siehe 2.1.7, Tab. 7) und GAPDH (Primer: je 0,32 μ M GAPDH sense/antisense; siehe 2.1.7, Tab. 7) für jede RNA-Probe diente anschließend dem Nachweis von hTF bzw. ashTF (Abb. 6 rechts). **Abbildung 6 links** zeigt zum Vergleich eine analoge RT-PCR unter Verwendung von *Vena saphena*-SMC-Gesamt-RNA.

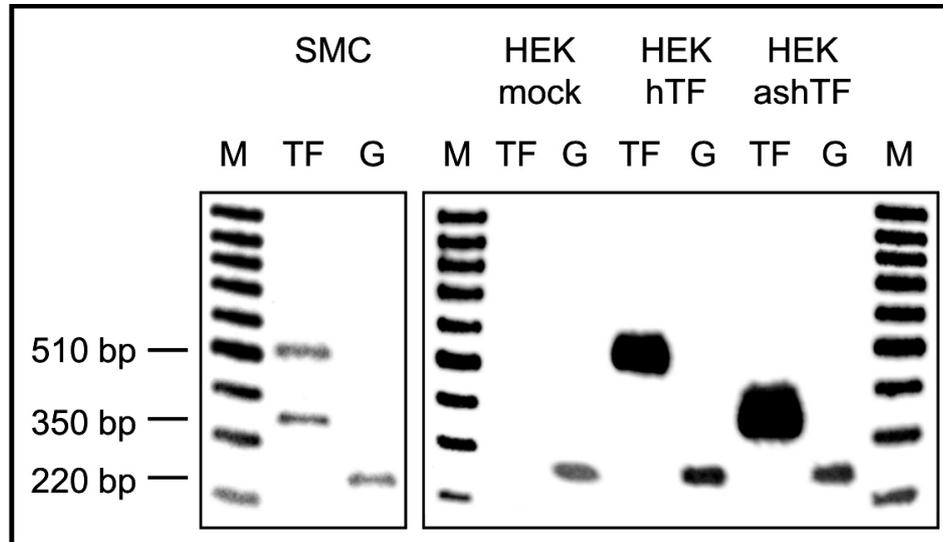


Abb. 6:

Nachweis der (heterologen) hTF-/ashTF- und GAPDH-Expression durch RT-PCR (exemplarisch für n = 2).

Zur Überprüfung von glatten Muskelzellen (SMC) und mock-/hTF-/ashTF-transfizierten HEK293-Zellen (HEK) auf Expression von hTF bzw. ashTF (TF) und GAPDH (G) wurden jeweils zwei getrennte RT-PCR-Ansätze verwendet.

Wie zu erwarten, wurden zusätzlich zu GAPDH (220 bp), hTF (510 bp) bzw. ashTF (350 bp) zusammen in den glatten Muskelzellen und jeweils einzeln in den

entsprechenden transfizierten HEK293-Zellen nachgewiesen. Unter mock-Transfektion rief nur die konstitutiv exprimierte GAPDH (Kontrolle) eine Bande im Agarosegel hervor. Dies zeigt, dass diese Zelllinie (im Gegensatz zu SMCs) keinen endogenen TF konstitutiv exprimiert.

3.3.2 Nachweis der heterologen Expression von HTF_FLAG bzw. asHTF_FLAG in transfizierten HEK293-Zellen

Nachdem sichergestellt war, dass die ursprünglichen hTF-/ashTF-Konstrukte funktionierten (siehe 3.3.1), wurden sie mit mind. einem FLAG-Tag markiert (siehe 2.4.4, 3.2) und anschließend HEK293-Zellen damit transfiziert (siehe 2.5.1). Durch Immunfluoreszenzmikroskopie (siehe 2.5.2) konnte gezeigt werden, dass sich HTF_FLAG und asHTF_FLAG sowohl über einen TF-spezifischen, als auch über einen FLAG-spezifischen Antikörper nur bei entsprechender Transfektion nachweisen ließen (Abb. 6).

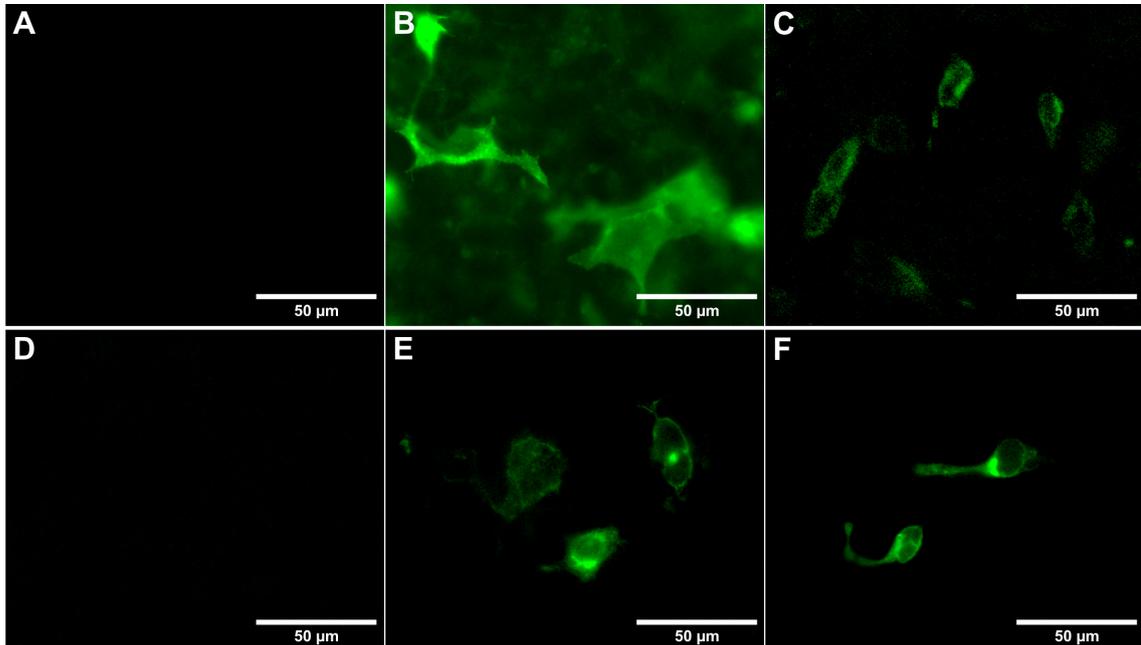


Abb. 6:

Qualitativer Nachweis der heterologen HTF_FLAG-/asHTF_FLAG-Expression durch Immunfluoreszenzmikroskopie.

Mittels Antikörperfärbung sollte die Expression von HTF_FLAG/asHTF_FLAG in mock-/hTF_FLAG-/asHTF_FLAG-transfizierten HEK293 qualitativ sowohl über einen anti-TF- als auch einen anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen werden.

A-C = anti-TF-AK; D-F = anti-FLAG-AK, A/D = mock-transfiziert, B/E = hTF_FLAG-transfiziert, C/F = asHTF_FLAG-transfiziert.

Des Weiteren wurde Gesamtprotein aus transfizierten Zellen gewonnen (siehe 2.5.3) und im Western-Blot analysiert (siehe 2.5.5+6). Analog zur Immunfluoreszenzmikroskopie konnten die heterolog exprimierten Proteine HTF_FLAG und asHTF_FLAG mit TF- und FLAG-Antikörpern nachgewiesen werden (Abb. 7), was erneut die korrekte Expression sowohl der ursprünglichen Proteine an sich, als auch der daran angehängten FLAG-Tags zeigt. In beiden Fällen bildet asHTF_FLAG eine Doppelbande (42 kDa + 44 kDa), während HTF_FLAG nur eine Einzelbande (~52 kDa) hervorruft.

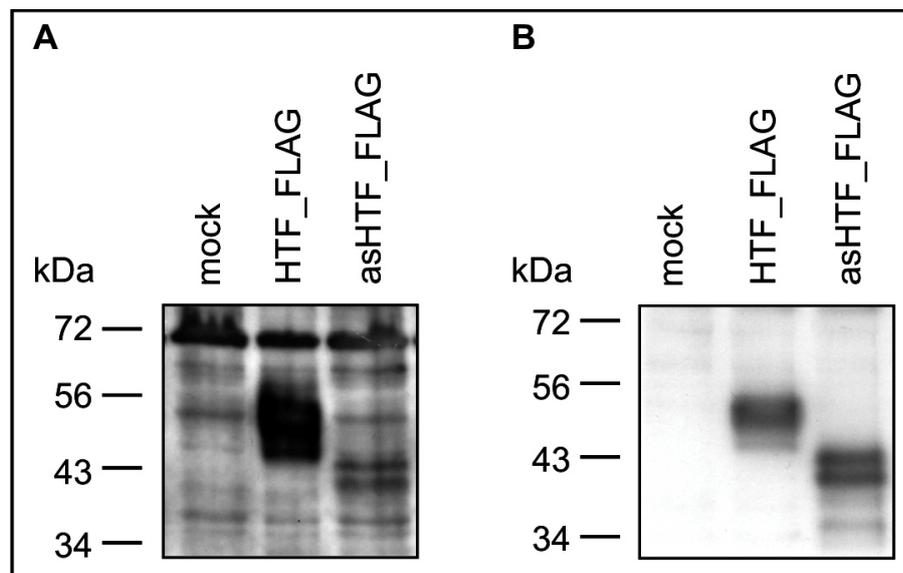


Abb. 7:

Qualitativer Nachweis der heterologen HTF_FLAG-/asHTF_FLAG-Expression durch Western-Blot (exemplarisch für $n = 4$).

In Zelllysaten mock-/hTF_FLAG-/ashTF_FLAG-transfizierter HEK293 wurden die Proteine sowohl über einen anti-TF- (A) als auch einen anti-FLAG-Antikörper (B) nachgewiesen.

HTF_FLAG ~52 kDa; asHTF_FLAG ~42 kDa + 44 kDa.

Beim Vergleich der Western-Blots hinsichtlich ihrer Signalintensitäten fällt auf, dass bei gleicher Probenauftragsmenge laut TF-AK (siehe Abb. 7A) HTF_FLAG und asHTF_FLAG offensichtlich unterschiedlich stark exprimiert werden, während der FLAG-AK (siehe Abb. 7B) vergleichbare Expressionsstärken für beide Proteine zeigt. Die nicht 100%ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von HTF und asHTF resultiert wahrscheinlich in der geringeren Erkennung des asHTF durch den auf HTF-erzeugten polyklonalen Antikörper. Im Gegensatz dazu richtet sich der monoklonale FLAG-AK gegen die nicht natürlich vorkommende Aminosäuresequenz

des FLAG-Tags, weshalb dieser wahrscheinlich realistischer die natürliche Expressionsstärken beider Proteine zeigt.

Um (analog zur Expressionsdetektion über RT-PCR, siehe 3.3.1) auch hier einen Vergleich von HEK zu glatten, venösen Gefäßmuskelzellen zu haben, wurde auch aus ihnen Gesamtprotein präpariert und im Western-Blot analysiert. **Abbildung 8** zeigt deutlich, dass in allen Proben HTF (~51 kDa) nachgewiesen werden konnte, während keine Bande für asHTF auftrat.

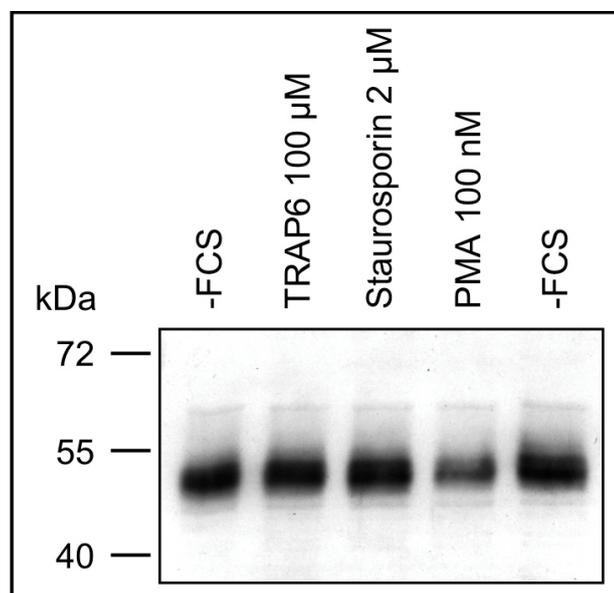


Abb. 8:

Qualitativer Nachweis der TF-Expression durch Western-Blot in *Vena saphena* (exemplarisch für n = 2).

In Zelllysat glatter Muskelzellen, welche für 12 h unterschiedlich stimuliert wurden, konnte HTF (~51 kDa) nachgewiesen werden.

3.3.3 Detektion von HTF_FLAG und asHTF_FLAG in verschiedenen Fraktionen transfizierter HEK293-Zellen

Nach dem Nachweis der korrekten heterologen Expression von HTF_FLAG und asHTF_FLAG war deren genauere Lokalisation von Interesse, denn aufgrund ihrer fehlenden Transmembrandomäne könnte die alternativ gespleißte TF-Form potenziell löslich vorliegen. Aus unterschiedlichen Fraktionen transfizierter Zellen (Zelllysat,

MP-freier Überstand, Mikropartikel) erfolgte hierfür die Immunpräzipitation von HTF durch einen anti-TF-AK, während asHTF_FLAG durch einen FLAG-AK präzipitiert wurde (siehe 2.5.10). Das Ergebnis der darauf folgenden Analyse mittels SDS-PAGE und Western-Blot (siehe 2.5.5+6) zeigt **Abbildung 9**.

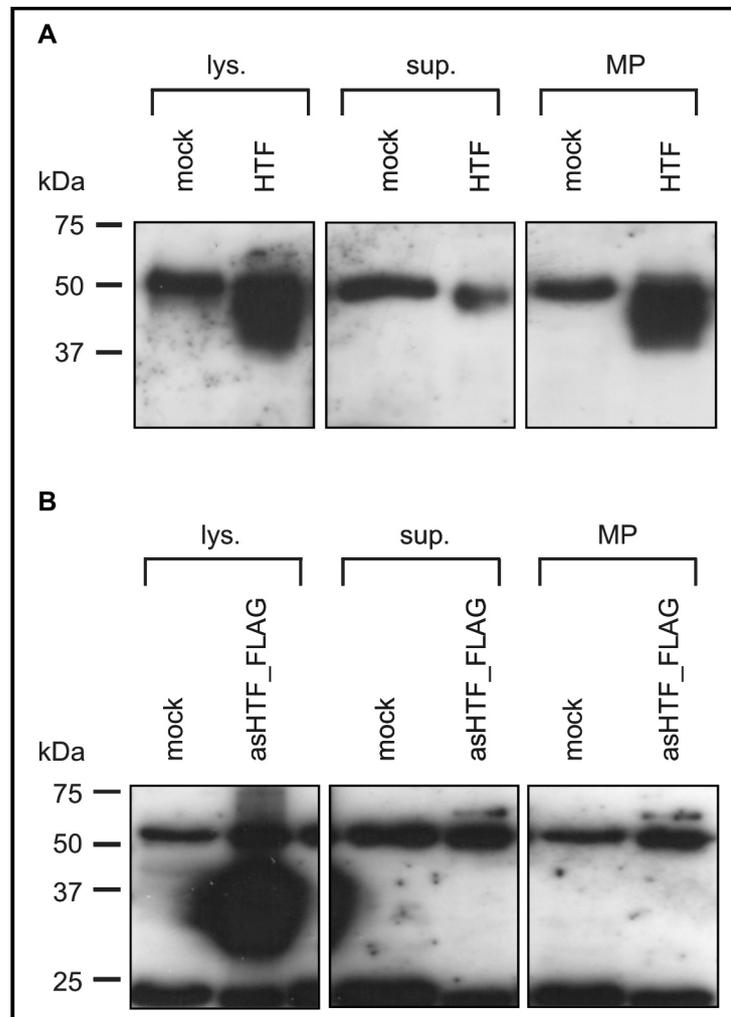


Abb. 9:

Lokalisation der heterologen Proteine HTF und asHTF_FLAG mittels Immunpräzipitation (exemplarisch für n = 5).

Aus Zelllysate, mikropartikelfreiem Überstand und Mikropartikeln mock-/HTF-/asHTF_FLAG-transfizierter HEK293-Zellen wurden HTF (A) und asHTF_FLAG (B) immunpräzipitiert und im Western-Blot nachgewiesen.

lys. = Zelllysate; sup. = MP-freier Überstand; MP = Mikropartikel

Aufgrund seiner Transmembrandomäne ist der HTF in der Zellmembran verankert, weshalb er, wie erwartet, in Zelllysate und Mikropartikeln, nicht jedoch im MP-freien Überstand nachweisbar war. Im Gegensatz dazu befand sich asHTF_FLAG allein im Zelllysate, während Mikropartikel oder MP-freier Überstand keine entsprechenden Banden zeigten.

3.3.4 Untersuchung der Glykosylierung von HTF_FLAG und asHTF_FLAG

Um zu überprüfen, ob HTF_FLAG und asHTF_FLAG eine Glykosylierung aufwiesen, wurden Lysate entsprechend transfizierter Zellen (siehe 2.5.1) bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen mit N-Glukosidase-F inkubiert (siehe 2.5.11). Im entsprechenden Western-Blot (Abb. 10) zeigte sich unter Anwesenheit des Enzyms (im Vergleich zur Inkubation in reinem Puffer) eine Verschiebung der Proteinbanden zu geringeren Proteingrößen (HTF_FLAG: 52 kDa → 49 kDa → 43 kDa; asHTF_FLAG: 42/44 kDa → 38 kDa → 35 kDa), was auf eine Abspaltung der vorhandenen Glykosylierung zurückzuführen ist.

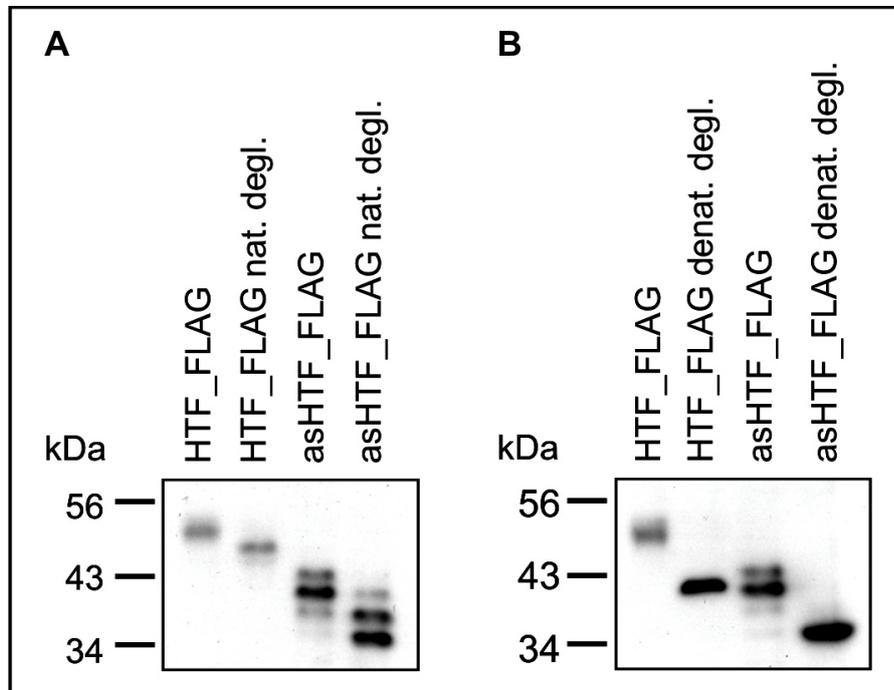


Abb. 10:

Nachweis der Glykosylierung von HTF_FLAG bzw. asHTF_FLAG im Western-Blot (exemplarisch für $n = 3$).

Zelllysate hTF_FLAG-/ashTF_FLAG-transfizierter HEK293 wurden für 24 h unter nativen (A) bzw. denaturierenden (B) Reaktionsbedingungen ohne und mit Enzym inkubiert.

nat. degl. = native Deglykosylierung; denat. degl. = denaturierende Deglykosylierung.

Die Deglykosylierung unter denaturierenden Bedingungen führte einerseits zu einer stärkeren Verschiebung der Proteinbanden als unter nativen Reaktionsbedingungen, andererseits wurde nur hierdurch die Doppelbande des asHTF_FLAG auf eine Einzelbande reduziert.

3.3.5 Vergleichende Untersuchung der enzymatischen Aktivität von hTF_FLAG und ashTF_FLAG in Zellen

Neben der prinzipiellen Charakterisierung und Identifizierung von hTF_FLAG und ashTF_FLAG war die Bestimmung der jeweiligen enzymatischen Aktivität von Interesse. Einerseits würde die enzymatische Aktivität von hTF_FLAG das Bild vervollständigen, dass die heterologe Expression zu einem (bis auf den FLAG-Tag) nativen, funktionalen Protein führt. Andererseits ist die Funktionalität von ashTF noch nicht eindeutig geklärt und Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussion (Sturk-Marquelin *et al.*, 2003; Szotowski *et al.*, 2005; Butenas & Mann, 2004).

HEK293-Zellen wurden mock bzw. mit pcDNA3 hTF_FLAG/ashTF_FLAG transfiziert (siehe 2.5.1) und das endogene Thrombinpotenzial in Zellen und zellfreien Überständen (siehe 2.6.3) sowie die FX-Aktivierung (siehe 2.6.4) gemessen. **Abbildung 11** zeigt die übereinstimmenden Ergebnisse beider Enzymtests.

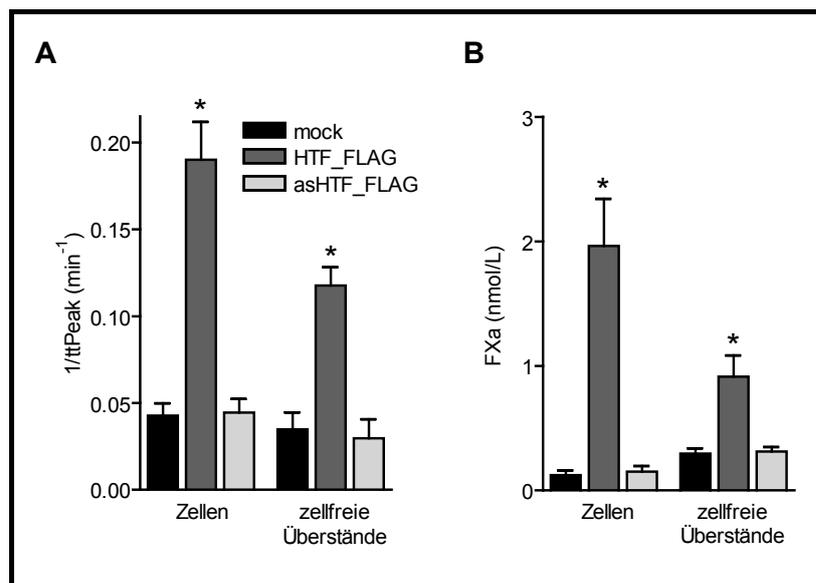


Abb. 11:

Enzymtests mit Zellen und zellfreien Überständen transfizierter Zellen.

Nachweis der TF-Aktivität von Zellen und in zellfreien Überständen mock-/hTF_FLAG-/ashTF_FLAG-transfizierter HEK293-Zellen durch ETP-Test (A) und FX-Aktivierung (B).

Unter hTF_FLAG-Transfektion wiesen sowohl die Zellen, als auch die entsprechenden zellfreien Überstände Aktivitäten auf, welche signifikant größer waren als die Aktivität der mock-transfizierten Proben. Im Gegensatz dazu verursachte die heterologe ashTF_FLAG-Expression keine Aktivitätszunahme.

Um zu klären, ob die fehlende asHTF_FLAG-Aktivität eventuell auf einer rein intrazellulären Lokalisation des Proteins beruhte, wurden anschließend Zelllysate (siehe 2.5.8) analog enzymatisch untersucht (Abb. 12).

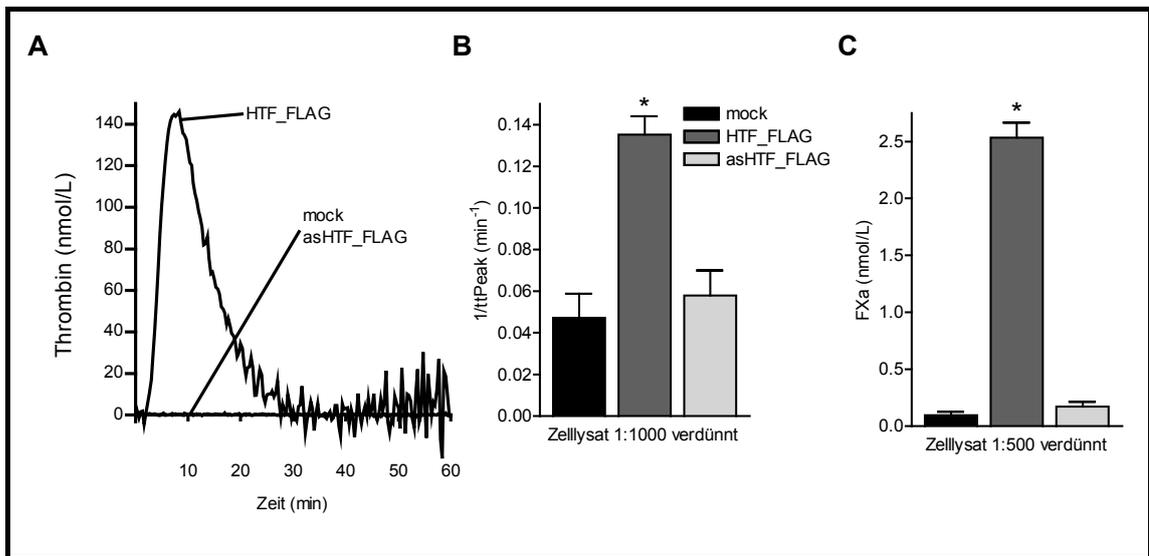


Abb. 12:

Untersuchung der enzymatischen Aktivität der Zelllysate transfizierter Zellen
Nachweis der TF-Aktivität in verdünnten Zelllysaten mock-/hTF_FLAG-/ashTF_FLAG-transfizierter HEK293-Zellen durch Bestimmung des ETP (A+B) und der FX-Aktivierung (C).

A = ETP-Test Originalkurven; B = quantitative Auswertung von A;

C = FX- Aktivierung

Auch hier zeigte sich das gleiche Bild wie bei den Zellen bzw. zellfreien Überständen: Die Aktivität von HTF_FLAG-Zelllysate war signifikant größer als die von mock- bzw. asHTF_FLAG-Proben. Dabei war die Verwendung verdünnter Zelllysate nötig, um die Aktivität von HTF_FLAG korrekt quantifizieren zu können, denn unverdünntes Lysat HTF_FLAG-transfizierter Zellen besaß eine durch beide Enzymtests nicht bestimmbar hohe Aktivität (exemplarisch Abb. 13A).

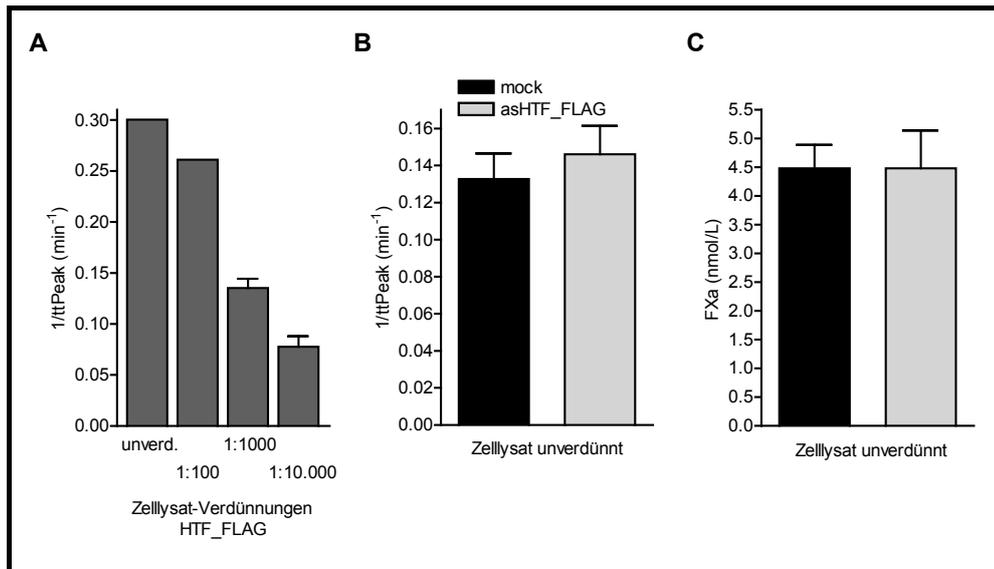


Abb. 13:

Verdünnungstitration und Enzymtests mit unverdünnten Zellysaten.

A = Ermittlung der optimalen ZL-Verdünnung hTF_FLAG-transf. HEK293-Zellen für ETP-Test durch Titration; B + C = Nachweis der TF-Aktivität in unverdünnten Zellysaten mock-/ashTF_FLAG-transfizierter HEK293-Zellen in ETP-Test (B) und FX-Aktivierung (C).

Um sicher zu gehen, dass eine, im Vergleich zu HTF wesentlich geringere, eventuell vorhandene Aktivität von asHTF (Bogdanov *et al.*, 2003) nicht aufgrund der Verdünnungen undetektiert blieb, erfolgte auch die Bestimmung unverdünnter Zellysate von mock- bzw. ashTF_FLAG-transfizierter Zellen (Abb. 13B+C). Doch auch dies führte zu keinem Nachweis einer asHTF_FLAG-Aktivität.

3.3.6 Vergleichende Untersuchung der enzymatischen Aktivität von HTF_FLAG und asHTF_FLAG in zellfreien Überständen

Zur genaueren Lokalisation der im zellfreien Überstand detektierten Aktivität des HTF_FLAG (Abb. 11), wurde der Überstand mittels Ultrazentrifugation in Mikropartikel und MP-freien Überstand aufgetrennt (siehe 2.5.7) und von beiden Fraktionen die TF-Aktivitäten bestimmt. **Abbildung 14** zeigt die Ergebnisse dieser Tests:

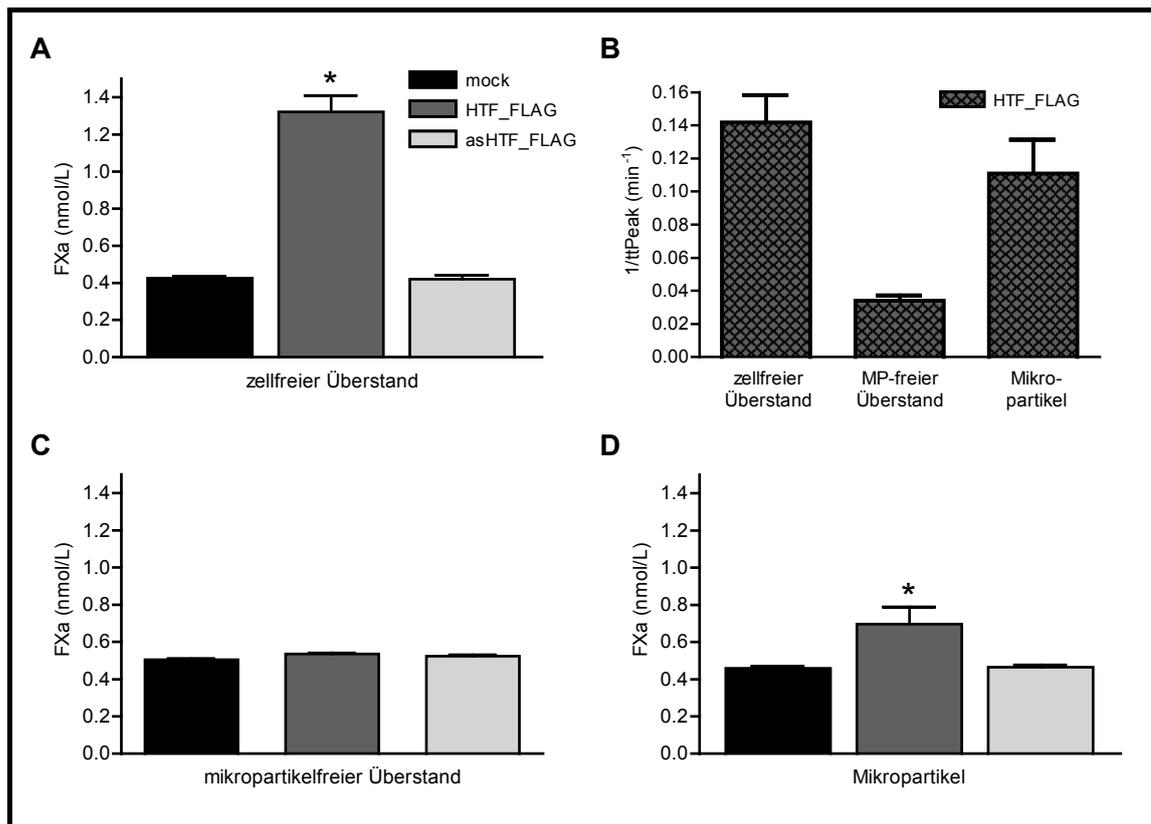


Abb. 14:

Detektion der TF-Aktivität in Fraktionen des zellfreien Überstands.

Nachweis der TF-Aktivität in zellfreiem Überstand (A), MP-freiem Überstand (C) und Mikropartikeln (D) mock-/hTF_FLAG-/ashTF_FLAG-transfizierter HEK293-Zellen über FX-Aktivierung.

Exemplarisch analoger Nachweis für hTF_FLAG-transfizierte Zellen im ETP-Test (B).

Die Aktivität des HTF_FLAG-zellfreien Überstandes fand sich nach der Ultrazentrifugation in den Mikropartikeln wieder, während sich der MP-freie Überstand nicht in seiner Aktivität von den mock- oder ashTF_FLAG-transfizierten analogen Proben unterschied. Dabei stimmt die Aktivität des HTF_FLAG mit dessen zuvor detektierter, membrangebundener Lokalisation (siehe 3.3.3, Abb. 9) überein.

Um nochmals zu prüfen, ob die in den HTF_FLAG-Proben (Zellen, Zellysat, zellfreier Überstand, Mikropartikel) detektierte Aktivität wirklich durch dieses Protein vermittelt ist, wurden exemplarisch Mikropartikel von hTF_FLAG-transfizierten Zellen mit einem unspezifischen oder einem TF-spezifischen Antikörper (je 10 µg/ml) für 1 h inkubiert (siehe 2.1.6, Tab. 5) und anschließend enzymatisch vermessen (siehe 2.6.3+4). **Abbildung 15A** zeigt eine deutliche Verminderung der ursprünglichen Aktivität durch den TF-spezifischen AK, während sich diese in Anwesenheit des unspezifischen Antikörpers nicht verändert.

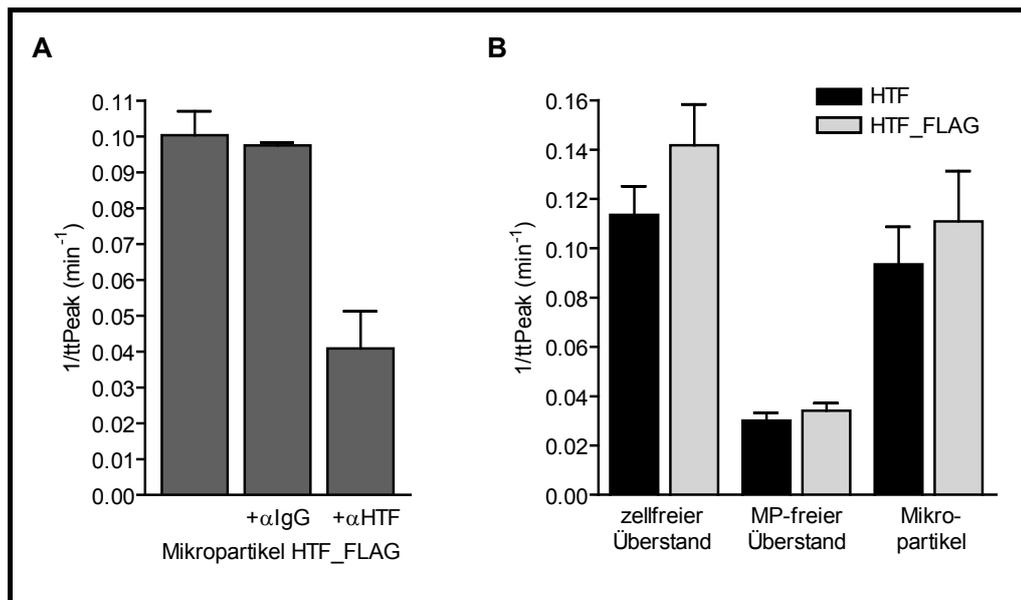


Abb. 15:

Nachweis der HTF-abhängigen TF-Aktivität und des Einflusses der FLAG-Markierung auf TF-Aktivität.

Mikropartikel hTF_FLAG-transfizierter HEK293-Zellen wurden für 1 h mit unspezifischem (+αIgG) oder TF-spezifischem (+αHTF) Antikörper inkubiert und die TF-Aktivität im ETP-Test ermittelt (A). Verschiedene Fraktionen hTF-/hTF_FLAG-transfizierter HEK293-Zellen wurden im ETP-Test auf ihre TF-Aktivität hin untersucht (B).

Auch der eventuelle Einfluss der FLAG-Markierung auf die Aktivität der Proteine wurde anhand des HTF untersucht, indem ein enzymatischer Vergleich zwischen Proben hTF- und hTF_FLAG-transfizierter Zellen stattfand (Abb. 15B). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Aktivitäten von HTF und HTF_FLAG detektiert werden.

3.3.7 Untersuchung der Konkurrenz von asHTF_FLAG mit rHTF

In einem weiteren Experiment sollte die Möglichkeit untersucht werden, ob evtl. asHTF_FLAG mit rekombinantem HTF (rHTF) um die Gerinnungsfaktoren kompetetiert. Hierzu wurden verdünnte Lysate von mock- und asHTF_FLAG-transfizierten Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen rHTF versetzt und die Aktivitäten der daraus resultierenden Gemische ermittelt (Abb. 16). Sollte eine solche Konkurrenz zwischen beiden Proteinen stattfinden, hätte sich dies in einer verminderten Aktivität der asHTF_FLAG-rHTF-Proben im Vergleich zu den entsprechenden mock-rHTF-Gemischen niederschlagen müssen:

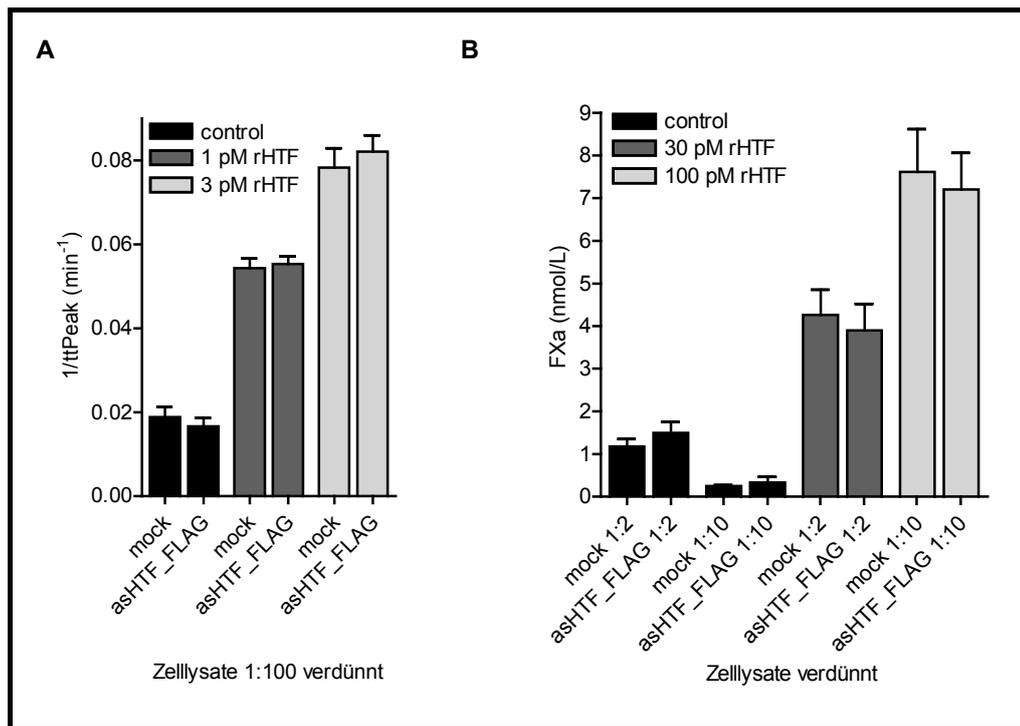


Abb. 16:

Untersuchung der Konkurrenz zwischen asHTF_FLAG und rHTF.

Verdünte Zellysate mock-/asHTF_FLAG-transfizierter HEK293-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen rHTF versetzt und anschließend auf ihre TF-Aktivität hin untersucht.

(A) ETP-Test; (B) FX-Aktivierung

Wie in **Abbildung 16** zu sehen, traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen mock- und asHTF_FLAG-Proben auf.

3.3.8 Untersuchung des Glykosylierungseinflusses auf die Proteinaktivität von HTF_FLAG

Schließlich wurde ein etwaiger Einfluss der Glykosylierung auf die Proteinaktivität untersucht. Lysate transfizierter Zellen wurden 24 h unter nativen Reaktionsbedingungen mit oder ohne Zusatz einer Glukosidase (siehe **2.5.11**) inkubiert und danach das endogene Thrombinpotenzial (siehe **2.6.3**) bestimmt.

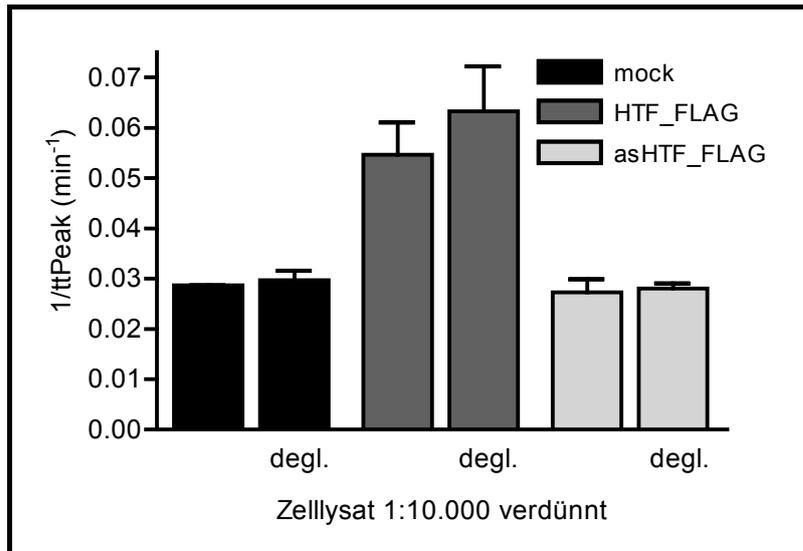


Abb. 17:

TF-Aktivität de-/glykosylierter Zellysate.

TF-Aktivität der verd. Zellysate mock-/ hTF_FLAG-/ashTF_FLAG-transfizierter HEK293-Zellen wurden nach 24 h Inkubation ohne bzw. mit (degl.) Enzym im ETP-Test bestimmt.

Die **Abbildung 17** zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den vollständig glykosylierten Proben und den entsprechenden mit Glukosidase inkubierten Vergleichsproben.

3.4 Heterologe Expression in und Aufreinigung von asHTF_His aus Sf9-Zellen

Für eine heterologe Expression von ashTF_3'His in der Insektenzelllinie Sf-9 wurden diese mit ashTF_3'His-tragenden Baculoviren (siehe 2.7.2+3) infiziert (siehe 2.7.4) und das heterologe Protein über Nickel-Metall-Affinitätschromatographie aus den Zellen isoliert (siehe 2.7.5). Die Analyse der einzelnen Fraktionen aus der Aufreinigung erfolgte durch SDS-PAGE und Western-Blot (siehe 2.5.5+6).

Da sich bei der Coomassie-Färbung der SDS-Gele mehrere Proteinbanden nur gering vom Hintergrund abhoben (**Abb. 18A**), wurden die Fraktionen im Western-Blot mittels Antikörperdetektion untersucht.

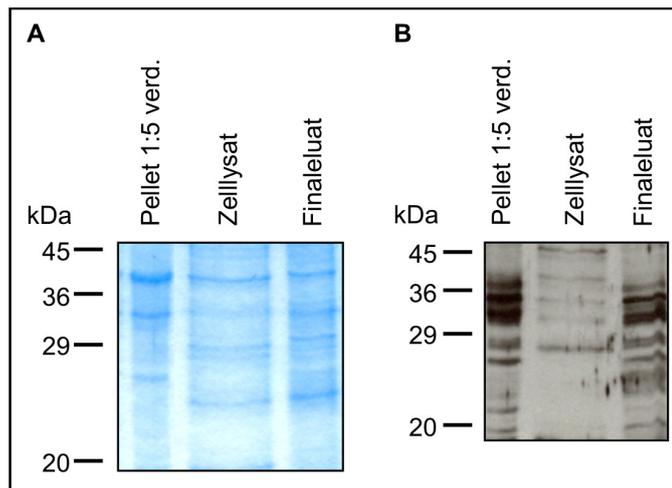


Abb. 18:

Nachweis der asHTF_His-Aufreinigung (exemplarisch für n = 3).

AsHTF_His wurde in verschiedenen Fraktionen der Proteinisolation durch

(A) Coomassie-Blau-Färbung des SDS-Gels; (B) den anti-TF-Antikörper im Western-Blot detektiert.

Abbildung 18B zeigt die Detektion von asHTF_His in verschiedenen Aufreinigungsfraktionen durch den polyklonalen anti-TF-Antikörper. Im Pellet sind mehrere, teilweise breite Banden (38/35/31/28/26 kDa) zu sehen. Diese finden sich im Finaleluat wieder, wobei bei 2 Banden eine weitere Separation zu Doppelbanden (31 kDa zu 32+31 kDa; 28 kDa zu 27,5/28,5 kDa) zu beobachten ist. Die Banden der Größe 35/31/27,5 kDa sind auch im Zellysat nachweisbar, fallen aber wesentlich geringer aus. Ursache hierfür war eine schlechtere Proteinübertragung aus dem Gel auf die Membran, denn dort wurde weniger Protein als z. B. in der Eluatspur angefärbt. Leider ergab die Detektion über einen His-spezifischen Antikörper keinerlei spezifische Banden (nicht gezeigt), da dieser allgemein sehr unspezifische Hintergrundsignale verursacht. Insgesamt zeigt **Abbildung 18B** die erfolgreiche Aufreinigung von asHTF_His aus Sf9-Zellen, welche die Voraussetzung für weitere Untersuchungen dieses Proteins war:

Vom HTF ist bekannt, dass er unabhängig von der Blutgerinnung z. B. zur Aktivierung der Zellmigration fähig ist (Hjortoe *et al.*, 2004). Um potenziell ähnliche Wirkungen des asHTF zu untersuchen, sollte das aufgereinigte Protein zu humanen kultivierten Zellen gegeben und potenzielle intrazelluläre Veränderungen beobachtet werden. Da asHTF keine membranäre Verankerung besitzt, wäre auch die Detektion von Zielstrukturen interessant, welche zur Interaktion mit asHTF fähig sind. Weiterhin wären Untersuchungen zur Kristallstruktur von asHTF möglich gewesen, welche jedoch zu umfangreich und komplex waren, um sie im Rahmen dieser Arbeit durchzuführen.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der humane *tissue factor* (HTF) und der alternativ gespleißte humane *tissue factor* (asHTF) aus glatten Muskelzellen kloniert, in HEK293-Zellen heterolog exprimiert und funktionell charakterisiert, sowie miteinander verglichen.

Neben grundlegenden Eigenschaften, wie etwa zellulärer Lokalisation und Glykosylierung, war vor allem die Untersuchung der etwaigen prokoagulatorischen Aktivität von asHTF interessant.

4.1 Zelluläre Lokalisation von alternativ gespleißtem humanem *tissue factor*

Bogdanov *et al.* (2003) schlussfolgerten aus der Abwesenheit einer Transmembrandomäne, dass es sich bei asHTF um ein lösliches Protein handeln müsse. Obwohl der hier aus SMC klonierte asHTF mit der laut Bogdanov *et al.* (2003) veröffentlichten Sequenz (Accession-Nr.: AF497570) übereinstimmt, wurde er nicht durch die HEK293-Zellen in den Zellüberstand abgegeben (siehe **3.3.3; Abb. 9B**), wie es für ein lösliches Protein, welches ohne spezifisches Lokalisierungssignal in das Endoplasmatische Retikulum translatiert wird, zu erwarten gewesen wäre.

Die bisher einzige Detektion von löslichem asHTF im Zellüberstand wurde von Szotowski *et al.* (2005) gezeigt. Diese Autoren vertreten die These, dass asHTF als lösliches Protein ständig sekretiert wird. Entsprechend detektiert er HTF- und asHTF-Banden in Zellysat und Überständen von Endothelzellen sowohl vor als auch nach Zytokin-Stimulation (Szotowski *et al.*, 2005; Szotowski, 2007). Er begründet die Abweichungen in der asHTF-Sekretion zwischen unseren (Censarek *et al.*, 2006) und seinen Ergebnissen mit der Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme.

Die fehlende Freisetzung von asHTF_FLAG aus den HEK293-Zellen ist insofern verwunderlich, als dass asHTF grundlegend alle Eigenschaften für eine Sekretion über den konstitutiven Sekretionsweg eukaryotischer Zellen besitzt: Die Signalsequenz sollte zum kotranslationalen Transport in das endoplasmatische Retikulum (ER) führen. Hier sollte asHTF, aufgrund seiner fehlenden Transmembrandomäne, nicht wie HTF in der Membran zurückgehalten, sondern komplett in das Lumen translatiert werden. Mit

Abspaltung der Signalsequenz sollte für asHTF keine membranäre Verankerung mehr bestehen. Transmembranproteine werden über bestimmte Sequenzen in ihrer zytoplasmatischen Domäne nach korrekter Faltung und Glykosylierung aus dem ER über den Golgi-Apparat gezielt in ihre Zielorganellen transportiert. Zum Beispiel ist ein angehängter Mannose-6-Phosphat-Rest, welcher durch einen spezifischen Rezeptor im Golgi-Apparat erkannt wird, ein Signal für lysosomale lösliche Proteine. Ohne spezifisches Signal gelangen Membranproteine (z. B. HTF) in die Zellmembran bzw. werden lösliche Proteine konstitutiv sekretiert. Deshalb müsste asHTF theoretisch sekretiert werden.

Dem ist entgegen zu halten, dass in dieser Arbeit die transient transfizierten HEK293-Zellen nie Stimulantien ausgesetzt worden waren. Unter gleichen Bedingungen (= ohne Stimulation) ähneln sich wahrscheinlich die Ergebnisse beider Arbeiten bezüglich der Proteinlokalisierung:

asHTF bzw. asHTF_FLAG ist nur in den Zelllysaten, nicht aber im (mikropartikelfreien) Zellüberstand nachweisbar. Die Detektion erfolgte bei Szotowski sowohl mit einem HTF-spezifischen, als auch mit einem asHTF-spezifischen Antikörper. Vor allem in den Zellüberständen unter Stimulation lieferte der Nachweis über den asHTF-spezifischen Antikörper intensivere asHTF-Banden, als bei Verwendung des HTF-spezifischen Antikörpers. Dies trifft auf die asHTF-Bande der unstimulierten Zellüberstände nicht zu. Beide Antikörper führten zu etwa vergleichbaren Signalintensitäten, welche sich kaum vom unspezifischen Hintergrundsignal unterschieden. Analog zu den hier vorgestellten Ergebnissen wird asHTF daher nicht ohne Stimulus aus den Endothelzellen freigesetzt. Eine anteilige Erklärung für den löslichen asHTF nach TNF α -Stimulation (Szotowski *et al.*, 2005; Szotowski, 2007) könnte zum Beispiel auch dessen Freisetzung aus dem Zytosol apoptotischer Zellen sein (Dimmeler *et al.*, 1999; Messmer *et al.*, 1999).

Die von Szotowski präsentierten Ergebnisse lassen die Interpretation zu, dass asHTF über den konstitutiven Sekretionsweg sekretiert wird. Entsprechend würde die, über Zytokin-Stimulation verstärkte, Expression automatisch eine stärkere Sekretion nach sich ziehen, womit sich auch der asHTF-Anstieg im Überstand der stimulierten Endothelzellen erklären ließe (Szotowski *et al.*, 2005; Szotowski, 2007). Dagegen sprechen jedoch sowohl die Ergebnisse dieser Arbeit (siehe **3.3.3, Abb. 9B**), als auch der zweifelhafte asHTF-Nachweis im Zellüberstand unstimulierter Endothelzellen (Szotowski *et al.*, 2005; Szotowski, 2007).

Eine alternative Erklärung könnte eine vesikuläre Speicherung von asHTF/_FLAG sein. Die Signale für die vesikuläre Lokalisation von Proteinen sind noch weitgehend unverstanden. Ein auftretendes Schema besteht beispielsweise in der Aggregation der Proteine im Golgi-Apparat. Nach dieser Theorie könnte die Überexpression des asHTF/_FLAG in den HEK293-Zellen zu seiner Aggregation und vesikulären Speicherung führen. Endothelzellen setzen nach Stimulation mit TNF α und IL-6 sowohl TFPI (vesikulär gespeichert) als auch asHTF frei (Szotowski *et al.*, 2005; Szotowski, 2007). Sie geben die *in vivo*-Situation besser wieder, als das künstliche System der *ashTF*-Überexpression in HEK293-Zellen. Zusammen könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass asHTF (analog zu TFPI) auch unter natürlichen Bedingungen vesikulär gespeichert wird. Abschließend ist hinzuzufügen, dass bei der Western-Blot-Detektion von Szotowski die Größe der detektierten Proteine nicht genannt wird. Einerseits ist die Detektion mit HTF- bzw. asHTF-spezifischen Antikörpern ein gutes Indiz für die Identität der detektierten Banden. Andererseits wäre auch ein Vergleich der detektierten asHTF-Proteine in punkto Proteingrößen wünschenswert und könnte weitere Rückschlüsse über eventuelle Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede der verwendeten Systeme ermöglichen.

4.2 Prokoagulatorische Aktivität von asHTF

In keinem Aktivitätstest dieser Arbeit wurde eine prokoagulatorische Aktivität für asHTF/_FLAG festgestellt. Welche Ursachen könnten dafür in Frage kommen?

Eine Betrachtung der Aminosäuresequenzen zeigt, dass der überwiegende Teil der extrazellulären HTF-Domäne (Aminosäuren 1-219) im asHTF (Aminosäuren 1-166) erhalten ist. Die rekombinant in *E. coli* exprimierte extrazelluläre HTF-Domäne ist löslich und weist in Anwesenheit negativ geladener Phospholipide ca. 4 % der HTF-Aktivität auf (Waxman *et al.*, 1992). Zu diesen Befunden würde die durch Bogdanov *et al.* (2003) beschriebene, geringe prokoagulatorische Aktivität des asHTF passen. Zudem besitzt asHTF einige Aminosäuren, welche im HTF wichtig für die Enzymaktivität sind. Hierzu gehören z. B. die Lysine 165 und 166 zur Erkennung makromolekularer Substrate (Ruf *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1996) und das dritte WKS-Motiv (Trp158-Lys159-Ser160; Rehemtulla *et al.*, 1992; Chen & Hogg, 2006). Andererseits befinden sich auch unter den HTF-Aminosäuren 167-219 Reste, welche

ebenfalls maßgeblich zur Proteinaktivität beitragen und bei asHTF fehlen: Als erstes fallen darunter die Cysteine 186 und 209, die miteinander eine für die TF-Aktivität wichtige Disulfidbrücke bilden (Rehemtulla *et al.*, 1991). Eine Reduktion der Disulfidbrücke führt bei HTF zum Verlust der prokoagulatorischen Aktivität und ist ein kontrovers diskutierter Mechanismus zur Enkryption von TF (Chen *et al.*, 2006; Pendurthi *et al.*, 2007). Außerdem stabilisiert diese zweite Disulfidbrücke einen anderen TF-Molekülteil, welcher wichtige Reste für die FX-Bindung durch den TF-FVIIa-Komplex beinhaltet (Norledge *et al.*, 2003). Zusätzlich fehlen asHTF weitere wichtige Aminosäuren für die Substratbindung im Komplex mit FVIIa (Lys169, Asn199, Arg200, Lys201; Huang *et al.*, 1998; Kirchhofer *et al.*, 2000; Otho *et al.*, 2004), sodass asHTF bereits Defizite in grundlegenden Resten für Substratbindung und prokoagulatorische Aktivität aufweist. Weiterhin fehlt asHTF die Verankerung in der Membran. Ein chimäres HTF-Molekül, welches über einen GPI-Anker an die Membran gebunden ist, zeigte enzymatische Aktivität (Paborsky *et al.*, 1991). Dafür ist wahrscheinlich die Vermittlung der Nähe zu negativ geladenen Phospholipiden verantwortlich, welche zur Rekrutierung der Gerinnungsfaktoren beiträgt. Insgesamt fehlt asHTF ein überwiegender Anteil der Aminosäuren, die im HTF wichtig für die Substratbindung und/oder prokoagulatorische Aktivität sind. Damit finden sich bereits auf Aminosäuresequenzebene gute Gründe sowohl für die fehlende prokoagulatorische Aktivität von asHTF_FLAG (siehe **3.3.5+6**, **Abb. 11-14**) als auch für dessen nicht vorhandene antikoagulatorische Wirkung (siehe **3.3.7**, **Abb. 16**). Letztere hätte auf einer konkurrierenden Bindung von Gerinnungsfaktoren beruhen können, muss aber aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse sowie der fehlenden, für die Substratbindung wichtigen, Aminosäuren ausgeschlossen werden.

Die bisherigen Ausführungen beruhen allein auf dem Vergleich der Aminosäuresequenzen von HTF und asHTF ohne Berücksichtigung der Proteinfaltung, welche jedoch ebenfalls essenziell für die Eigenschaften der Proteine ist. So sind zum Beispiel beide Fibronectin-Typ III-Domänen bei der Komplexbildung zwischen TF und FVII/a involviert. Der asHTF stimmt zwar in 166 Aminosäuren mit der extrazellulären HTF-Domäne überein, jedoch summieren sich die fehlenden Reste auf ca. 25 % der extrazellulären HTF-Domäne, woraus sich eine potenziell andere Proteinfaltung ergibt. Außerdem bilden der stark abweichende C-Terminus (verkürzt und von anderer Sequenz) und die fehlende Transmembrandomäne zusätzliche Gründe für eine, im Vergleich zur extrazellulären HTF-Domäne, andere Interaktion des asHTF mit

Chaperonen im Endoplasmatischen Retikulum. Dies könnte in einer unterschiedlichen räumliche Anordnung wichtiger Aminosäuren resultieren. Insgesamt ist es also eher unwahrscheinlich, dass diese Reste im asHTF eine HTF-ähnliche räumliche Struktur annehmen, was eine enzymatische Aktivität des asHTF fraglich erscheinen lässt. Zur Klärung dieser Frage ist die Bestimmung der Kristallstruktur von asHTF essenziell, welche jedoch bis dato nicht vorliegt. Anhand der Kristallstruktur von asHTF ließe sich eventuell auch klären, ob es sich bei ihm wirklich um ein lösliches Protein handelt.

Im Gegensatz zu den bisherigen Betrachtungen stehen die Ergebnisse von Szotowski *et al.* (2005; Szotowski, 2007), welcher im mikropartikelfreien Zellüberstand inflammatorisch stimulierter Endothelzellen eine deutliche, asHTF-abhängige prokoagulatorische Aktivität detektierte. Hierfür war jedoch der Zusatz von 10 μ M Phospholipidvesikeln (mit Verhältnis Phosphatidylcholin:Phosphatidylserin = 80:20) nötig. In den hier verwendeten Aktivitätstests dienten Membranfragmente geplatzter Thrombozyten der Bereitstellung negativ geladener Phospholipide, weshalb die unterschiedliche Struktur und Menge der verwendeten Phospholipidquellen eine Ursache der voneinander abweichenden Ergebnisse zur asHTF/_FLAG-Aktivität sein könnten. Außerdem war die prokoagulatorische Aktivität des asHTF unter Zusatz von Phospholipiden nie größer als die Aktivität HTF-tragender Mikropartikel ohne Zusätze, sodass selbst Szotowski (2007) asHTF nur eine untergeordnete prokoagulatorische Rolle *in vivo* zuschreibt und ihn als frühen Entzündungsmarker einstuft.

4.3 Regulation und Bedeutung der *ashTF*-Expression

Warum kommt es in Endothelzellen nach inflammatorischem Stimulus anfänglich zu einer Hochregulation des inaktiven Proteins asHTF (Szotowski *et al.*, 2005)? Auf den ersten Blick könnte z. B. die Vermeidung eines unnatürlichen prokoagulatorischen Phänotyps eine mögliche Erklärung sein. Alternatives Spleißen ist u. a. ein Mechanismus zur Expressionkontrolle (z. B. Abbau unvollständiger mRNAs) und kann durch extrazelluläre Signale reguliert werden (Lewis *et al.*, 2003; Xie & Black, 2001). Nach TNF α -Stimulation wird in den ersten 10 min die größte Menge *ashTF*-mRNA gebildet, während das Maximum an *hTF*-mRNA nach 60 min erreicht wird. Man könnte also annehmen, dass durch die Produktion eines inaktiven Proteins die Wirkung eines kurzzeitigen inflammatorischen Stimulus inhibiert wird, um den nativen

antikoagulatorischen Phänotyp nicht zu verändern. Jedoch war das Expressionsniveau von *ashTF* stets geringer als das von *hTF*, sodass in den ersten 10 min nur ca. 20 % der *hTF*-prä-mRNA alternativ gespleißt wurden. Aus den restlichen 80 % entsteht *hTF*-mRNA, woraus sukzessive prokoagulatorisch aktiver HTF entsteht und zum Verlust des nativen, antikoagulatorischen Endothelzell-Phänotyps führt. Trotzdem ist die Produktion eines alternativen, inaktiven Produktes zur Verminderung der Menge an aktivem Protein eine Form der Expressionskontrolle durch alternatives Spleißen (Hillman *et al.*, 2004). Zum Beispiel bestehen Parallelen zur Cyclooxygenase-2 – einem anderen induzierbaren Enzym in Thrombozyten. Durch alternatives Spleißen entsteht deren Variante COX-2a, welche keine enzymatische Aktivität besitzt (Censarek *et al.*, 2007b).

Da inflammatorisch stimulierte Endothelzellen asHTF sekretieren, wäre für dieses prokoagulatorisch inaktive Protein auch eine Wirkung als Entzündungs-Signal bzw. -Marker vorstellbar. Gleichzeitig könnte asHTF auch aus apoptotischen Zellen freigesetzt werden. Entsprechend verursacht der stärkere Entzündungsstimulus TNF α ein früheres und ausgeprägteres alternatives Spleißen der *hTF*-prä-mRNA (ca. 20 % nach 10 min) mit folgender asHTF-Bildung, als der schwächere IL-6-Stimulus (6 % nach 40 min). Um die Theorie der asHTF-vermittelten Signalübertragung zu belegen, müssten zukünftig Zielstrukturen nachgewiesen werden, welche bei Interaktion mit asHTF intrazelluläre Veränderungen auslösen. Sollten sich keine Rezeptoren für asHTF finden, könnte es potenziell auch als diagnostischer früher Entzündungsmarker dienen.

An der Regulation des (alternativen) Spleißens der *hTF*-prä-mRNA ist möglicherweise die CDC-ähnliche Kinase Clk1 beteiligt. Eine Inhibition von Clk1 unterbindet die TNF α -induzierte *ashTF*-Expression in Endothelzellen vollständig, während dies auf *hTF* nur partiell zutrifft (Szotowski, 2007). Einen noch größeren Einfluss hat Clk1 in Thrombozyten. Nach Aktivierung der Thrombozyten wird die vorhandene *hTF*-prä-mRNA zu *hTF*-mRNA gespleißt, was sich durch Clk1-Inhibition fast vollständig unterdrücken lässt (Schwertz *et al.*, 2006). Auch wenn bisher kein asHTF-Nachweis in Thrombozyten möglich war, könnte dies sowohl auf die unterschiedlichen Zelltypen als auch auf die unterschiedlichen Stimuli (Endothelzellen: TNF α ; Thrombozyten: Thrombin) zurückzuführen sein. Grundsätzlich sind aktivierte Thrombozyten in der Lage *hTF*-prä-mRNA zu spleißen, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass über alternatives Spleißen auch asHTF entstehen könnte.

Nach heutigem Wissensstand dient alternatives Spleißen der Erhöhung der Proteinvielfältigkeit ohne genomische Veränderungen (Bogdanov, 2006). Aus einem intronhaltigen Gen können darüber strukturell und funktionell unterschiedliche mRNAs und Proteine entstehen. Bis zu 60 % der ca. 30.000 humanen Gene werden alternativ gespleißt, wobei das bei *ashTF* auftretende Exon-Auslassen (*exon skipping*) zur häufigsten Art des alternativen Spleißens bei Säugetieren zählt (Modrek & Lee, 2002; Venter *et al.*, 2001; Bogdanov *et al.*, 2003; Sugnet *et al.*, 2004). Der Kassetten-Typ des alternativen Spleißens (Austausch bzw. Wegfall ganzer Exons) ist nur zu 10-20 % zwischen Mensch und Maus konserviert (Blencowe, 2006), weshalb das Auftreten alternativ gespleißter TF-Formen in beiden Spezies (Bogdanov *et al.*, 2003; Bogdanov *et al.*, 2006) ein weiterer Hinweis auf deren potenzielle funktionelle Bedeutung ist. Die TF-Gene beider Spezies basieren auf dem gleichen Ursprungsgen (= orthologe Gene), woraus eine analoge Genstruktur (6 Exons, 5 Introns) und konservierte, ähnliche Funktionen resultieren. Sowohl die Form des alternativen Spleißens, als auch das Verhältnis zwischen Haupt- und Nebenprodukten sind stark zwischen orthologen Genen von Mensch und Maus konserviert (Modrek & Lee, 2003). Entsprechend fehlt Exon 5 in der *asTF*-mRNA der Maus (*asmTF*-mRNA), was einen Wegfall der Transmembrandomäne zur Folge hat und zu einer löslichen MTF-Variante (asMTF) mit neuem C-Terminus führt. Analog liegt das *asmTF*-Expressionsniveau unter dem des *mTF*. Im Gegensatz zum asHTF verschiebt sich beim alternativen Spleißen das ursprüngliche Stop-Codon nach hinten, sodass der neue C-Terminus des asMTF größer ist im Vergleich zum asHTF. Dies liegt in der nicht vollkommenen Sequenzübereinstimmung der orthologen TF-Gene in Mensch und Maus begründet. Entsprechend weichen sowohl die Länge der Signalsequenz der unreifen Proteine (HTF: 32 Aminosäuren; MTF: 28 Aminosäuren) als auch die Zahl der identischen Aminosäuren zwischen normalem und alternativem reifen Protein (Mensch: 1-166; Maus: 1-170) leicht ab. Außerdem beinhaltet der neue C-Terminus des asMTF im Gegensatz zum asHTF Cysteine. Dies ermöglicht die Bildung neuer Disulfidbrücken im asMTF, dessen Proteinfaltung somit sehr wahrscheinlich vom asHTF abweicht. Insgesamt ist über asMTF noch deutlich weniger bekannt als über asHTF. Für die Embryonalentwicklung der Maus gibt es bereits erste Hinweise auf eine Regulation des alternativen TF-Spleißens (Bogdanov *et al.*, 2006), nicht aber für adulte Tiere. Besonders interessant könnte ein Vergleich der bis dato unbekannteren Kristallstrukturen

beider asTF-Formen sein. Trotz ihrer Gemeinsamkeiten weisen asHTF und asMTF potenziell unterschiedliche Faltungen auf. Deshalb ist abzuwarten, in wie weit sie in ihrer prokoagulatorischen Aktivität und ihren etwaigen weiteren Funktionen übereinstimmen.

4.4 Ausblick

Um in zukünftigen Versuchen reines asHTF-Protein einsetzen zu können, wurde es heterolog in Insektenzellen exprimiert und über Metall-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Es wäre interessant Mäusen asHTF zu injizieren und dessen Einfluss auf die Blutgerinnung *in vivo* zu untersuchen. Ebenso wäre die Suche nach Zielstrukturen des asHTF auf kultivierten Zellen möglich, um das Protein als Entzündungssignal und/oder inflammatorischen Marker definieren zu können. Durch Generierung einer Maus, in welcher kein alternatives Spleißen des TF-Gens möglich ist, könnte ein etwaiger Einfluss des asMTF auf die murine Embryonalentwicklung untersucht werden, bei der Hinweise für eine Regulation des alternativen Spleißens bestehen. Nicht zuletzt sind seine genaue zelluläre Lokalisation, Kristallstruktur und der Einfluss verschiedener Stimuli auf das alternative Spleißen neben seiner Relevanz *in vivo* nur einige Punkte, welche für den asHTF zukünftig zu klären sind.

5. Zusammenfassung

Der humane *tissue factor* (HTF) ist der Initiator der Blutgerinnung. Er wird konstitutiv in Organen (z. B. Herz, Hirn, Haut) und der Blutgefäßwand (glatte Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten) exprimiert. Geringe TF-Mengen sind im Blut gesunder Probanden nachweisbar, welche in verschiedenen pathologischen Zuständen (z. B. akutes Koronarsyndrom) ansteigen und oft mit einer Steigerung des prothrombotischen Status einhergehen. Im Jahr 2003 wurde eine alternativ gespleißte TF-Form (asHTF) entdeckt, welche löslich ist und deren Aktivität kontrovers diskutiert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HTF und asHTF erstmals aus venösen glatten Muskelzellen kloniert, heterolog in HEK293-Zellen exprimiert und vergleichend charakterisiert. HTF ist membranär lokalisiert und ließ sich erwartungsgemäß in Zelllysats und Mikropartikeln, nicht aber im mikropartikelfreien Überstand nachweisen. Im Gegensatz dazu fand sich asHTF nur im Zelllysats, was auf eine rein intrazelluläre Lokalisation schließen lässt. Beide Proteine wiesen Glykosylierungen auf, welche sich enzymatisch entfernen ließen.

Zwei verschiedene Aktivitätstests (ETP-Test, FX-Aktivierung) wurden für die Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität von HTF und asHTF eingesetzt. HTF zeigte in den entsprechenden Zellfraktionen (intakte Zellen, Zelllysats, Mikropartikel) eine glykosylierungsunabhängige prokoagulatorische Aktivität, welche sich signifikant von den Aktivitäten der Kontrollen unterschied. Für asHTF ließ sich ebenfalls unabhängig vom Glykosylierungsstatus selbst unter Verwendung unverdünnten Zelllysats keine prokoagulatorische Aktivität detektieren. Eine Konkurrenz von asHTF mit rekombinanten HTF um Gerinnungsfaktoren konnte nicht nachgewiesen werden. Eine antikoagulatorische Wirkung durch Konkurrenz um Gerinnungsfaktoren kann somit ausgeschlossen werden.

Bei asHTF handelt es sich um ein neues interessantes Protein, welches sich vom Initiator der Blutgerinnung ableitet jedoch selbst nicht prokoagulatorisch aktiv ist. Ob asHTF eventuell zur Signaltransduktion fähig ist oder wie seine Kristallstruktur aussieht, gehört zu den Fragestellungen, welche noch zu untersuchen sind.

Summary

The human tissue factor (HTF) is the initiator of blood coagulation. It is constitutively expressed in organs (e. g. heart, brain, skin) and on cells of the vascular wall (smooth muscle cells, fibroblasts). Low levels of HTF are also detected in the blood of healthy volunteers. Pathological conditions (e. g. acute coronary syndrome) are frequently associated with an increase in TF protein and an enhanced prothrombotic potential. In 2003 an alternatively spliced soluble form of human tissue factor (asHTF) was discovered, the pro-coagulant activity of which is controversially discussed.

The work described here reports for the first time the cloning of both HTF and asHTF from vascular smooth muscle cells. Both proteins were overexpressed in HEK239 cells and characterized in parallel. HTF is located within the cell membrane and could therefore be detected in cell lysate and microparticles but not in microparticle-free supernatant. AsHTF by contrast was found exclusively in cell lysate. This fact suggests that asHTF exhibits intracellular localization only. Glycosylation of HTF and asHTF was demonstrated by a shift to smaller protein bands after incubation with glucosidase.

Two different activity assays (ETP-test, FX-activation) were used to determine the pro-coagulant activity of HTF and asHTF. Only membrane-containing cell fractions of HTF-expressing cells (whole cells, cell lysate, microparticles) exhibited significantly higher pro-coagulant activities than controls, which was independent of its glycosylation status. No procoagulant activity of asHTF could be detected, even in undiluted cell lysates and irrespective of glycosylation status. No competition between asHTF and rHTF for binding to clotting factors was observed, thus asHTF cannot exert anti-coagulatory effects.

In conclusion, the newly describe protein asHTF derives from the initiator of blood coagulation (tissue factor) but does not exhibit pro-coagulant activity. The crystal structure of asHTF or its potential to elicit cellular signaling are questions to be explored in future studies.

6. Literaturverzeichnis

1. Andoh K, Kubota T, Takada M, Tanaka H, Kobayashi N, Maekawa T. Tissue factor activity in leukemia cells. Special reference to disseminated intravascular coagulation. *Cancer* 1987; 59:748-54
2. Aras O, Shet A, Bach RR, Hysjulien JL, Slungaard A, Hebbel RP, Escolar G, Jilma B, Key NS. Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 2004; 103:4545-53
3. Bach R, Konigsberg WH, Nemerson Y. Human tissue factor contains thioester-linked palmitate and stearate on the cytoplasmic half-cystine. *Biochemistry* 1988; 27:4227-31
4. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995; 270:14477-84
5. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:6934-38
6. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7:1513-23
7. Blencowe BJ. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* 2006; 26:37-47
8. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 2003; 9:458-62
9. Bogdanov VY, Kirk RI, Miller C, Hathcock JJ, Vele S, Gazdoui M, Nemerson Y, Taubman MB. Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. *J Thromb Haemost* 2006; 4:158-67
10. Bogdanov VY. Blood coagulation and alternative pre-mRNA splicing: an overview. *Curr Mol Med* 2006; 6:859-69
11. Bonderman D, Teml A, Jakowitsch J, Adlbrecht C, Gyöngyösi M, Sperker W, Lass H, Mosgoeller W, Glogar DH, Probst P, Maurer G, Nemerson Y, Lang IM. Coronary no-reflow is caused by shedding of active tissue factor from dissected atherosclerotic plaque. *Blood* 2002; 99:2794-800
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54

13. Brand K, Fowler BJ, Edgington TS, Mackman N. Tissue factor mRNA in THP-1 monocytic cells is regulated at both transcriptional and posttranscriptional levels in response to lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol* 1991; 11:4732-38
14. Butenas S, Mann KG. Active tissue factor in blood? *Nat Med* 2004; 10:1155-56
15. Butenas S, van 't Veer C, Mann KG. Evaluation of the initiation phase of blood coagulation using ultrasensitive assays for serine proteases. *J Biol Chem* 1997; 272:21527-33
16. Camerer E, Kolstø AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 1996; 81:1-41
17. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Müller M, Risau W, Edgington T, Collen D. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996; 383:73-75
18. Carmeliet P, Moons L, Dewerchin M, Mackman N, Luther T, Breier G, Ploplis V, Müller M, Nagy A, Plow E, Gerard R, Edgington T, Risau W, Collen D. Insights in vessel development and vascular disorders using targeted inactivation and transfer of vascular endothelial growth factor, the tissue factor receptor, and the plasminogen system. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 811:191-206
19. Censarek P, Bobbe A, Grandoch M, Schrör K, Weber AA. Alternatively spliced human tissue factor (asHTF) is not pro-coagulant. *Thromb Haemost* 2007; 97:11-14
20. Censarek P, Steger G, Paolini C, Hohlfeld T, Grosser T, Zimmermann N, Fleckenstein D, Schrör K, Weber A-A. Alternative splicing of platelet cyclooxygenase-2 mRNA in patients after coronary artery bypass grafting. *Thromb Haemost* 2007b; 98:1309-15
21. Chen VM, Ahamed J, Versteeg HH, Berndt MC, Ruf W, Hogg PJ. Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond. *Biochemistry* 2006; 45:12020-28
22. Chen VM, Hogg PJ. Allosteric disulfide bonds in thrombosis and thrombolysis. *J Thromb Haemost* 2006; 4:2533-41
23. Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med* 1996; 2:209-15
24. Dahlbäck B. Progress in the understanding of the protein C anticoagulant pathway. *Int J Hematol* 2004; 79:109-16

25. Dieckmann-Schuppert A, Schnittler HJ. A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell Tissue Res* 1997; 288:119-26
26. Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med* 1999; 189:1815-22
27. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues: implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; 134:1087-97
28. Eilertsen KE, Østerud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15:521-38
29. Fallier-Becker P, Rupp J. Smooth muscle cells from rabbit aorta. In: Cell culture techniques in heart and vessel research. 1990; Piper HM, ed. New York: Springer-Verlag:247-270
30. Fisher KL, Gorman CM, Vehar GA, O'Brien DP, Lawn RM. Cloning and expression of human tissue factor cDNA. *Thromb Res* 1987; 48:89-99
31. Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI, Varki N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res* 1990; 59:421-37
32. Gayle RB 3rd, Maliszewski CR, Gimpel SD, Schoenborn MA, Caspary RG, Richards C, Brasel K, Price V, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Broekman MJ, Marcus AJ. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *J Clin Invest* 1998; 101:1851-59
33. Geczy CL. Cellular mechanisms for the activation of blood coagulation. *Int Rev Cytol* 1994; 152:49-108
34. Guo W, Wang H, Zhao W, Zhu J, Ju B, Wang X. Effect of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide on tissue factor expression in acute promyelocytic leukemia cells. *Chin Med J (Engl)* 2001; 114:30-34
35. Hathcock J. Vascular biology-the role of tissue factor. *Semin Hematol* 2004; 41(1 Suppl 1):30-34
36. Hathcock JJ, Nemerson Y. Platelet deposition inhibits tissue factor activity: in vitro clots are impermeable to factor Xa. *Blood* 2004; 104:123-27
37. Hemker HC, Giesen P, AlDieri R, Regnault V, de Smed E, Wagenvoerd R, Lecompte T, Béguin S. The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; 32:249-53

38. Hillman RT, Green RE, Brenner SE. An unappreciated role for RNA surveillance. *Genome Biol* 2004; 5, R8
39. 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; 103:3029-37
40. Hoffman M, Monroe DM 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001; 85:958-65
41. Huang M, Syed R, Stura EA, Stone MJ, Stefanko RS, Ruf W, Edgington TS, Wilson IA. The mechanism of an inhibitory antibody on TF-initiated blood coagulation revealed by the crystal structures of human tissue factor, Fab 5G9 and TF.G9 complex. *J Mol Biol* 1998; 275:873-94
42. Huang Q, Neuenschwander PF, Rezaie AR, Morrissey JH. Substrate recognition by tissue factor-factor VIIa. Evidence for interaction of residues Lys165 and Lys166 of tissue factor with the 4-carboxyglutamate-rich domain of factor X. *J Biol Chem* 1996; 271:21752-57
43. Kao FT, Hartz J, Horton R, Nemerson Y, Carson SD. Regional assignment of human tissue factor gene (F3) to chromosome 1p21-p22. *Somat Cell Mol Genet* 1988; 14:407-10
44. Key NS, Slungaard A, Dandele L, Nelson SC, Moertel C, Styles LA, Kuypers FA, Bach RR. Whole blood tissue factor procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell disease. *Blood* 1998; 91:4216-23
45. Kirchhofer D, Lipari MT, Moran P, Eigenbrot C, Kelley RF. The tissue factor region that interacts with substrates factor IX and Factor X. *Biochemistry* 2000; 39:7380-87
46. Kirchhofer D, Moran P, Chiang N, Kim J, Riederer MA, Eigenbrot C, Kelley RF. Epitope location on tissue factor determines the anticoagulant potency of monoclonal anti-tissue factor antibodies. *Thromb Haemost* 2000; 84:1072-81
47. Kojima T, Leone CW, Marchildon GA, Marcum JA, Rosenberg RD. Isolation and characterization of heparan sulfate proteoglycans produced by cloned rat microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267:4859-69
48. Koyama T, Nishida K, Ohdama S, Sawada M, Murakami N, Hirosawa S, Kuriyama R, Matsuzawa K, Hasegawa R, Aoki N. Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. *Br J Haematol* 1994; 87:343-47
49. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-85

50. Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J Biol Chem* 1994; 269:23357-66
51. Lewis BP, Green RE, Brenner SE. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:189-92
52. Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* 1989; 28:1755-62
53. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:1687-93
54. Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *Thromb Haemost* 1997; 78:747-54
55. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24:1015-22
56. McCallum CD, Hapak RC, Neuenschwander PF, Morrissey JH, Johnson AE. The location of the active site of blood coagulation factor VIIa above the membrane surface and its reorientation upon association with tissue factor. A fluorescence energy transfer study. *J Biol Chem* 1996; 271:28168-75
57. McCallum CD, Su B, Neuenschwander PF, Morrissey JH, Johnson AE. Tissue factor positions and maintains the factor VIIa active site far above the membrane surface even in the absence of the factor VIIa Gla domain. A fluorescence resonance energy transfer study. *J Biol Chem* 1997; 272:30160-66
58. Messmer UK, Winkel G, Briner VA, Pfeilschifter J. Glucocorticoids potently block tumour necrosis factor- α - and lipopolysaccharide-induced apoptotic cell death in bovine glomerular endothelial cells upstream of caspase 3 activation. *Br J Pharmacol* 1999; 127:1633-40
59. Misumi K, Ogawa H, Yasue H, Soejima H, Suefuji H, Nishiyama K, Takazoe K, Kugiyama K, Tsuji I, Kumeda K, Nakamura S. Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1998; 81:22-26
60. Modrek B, Lee C. A genomic view of alternative splicing. *Nat Genet* 2002; 30:13-9
61. Modrek B, Lee CJ. Alternative splicing in the human, mouse and rat genomes is associated with an increased frequency of exon creation and/or loss. *Nat Genet* 2003; 34:177-80

62. Morrissey JH, Fakhrai H, Edgington TS. Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell* 1987; 50:129-35
63. Nakagawa K, Zhang Y, Tsuji H, Yoshizumi M, Kasahara T, Nishimura H, Nawroth PP, Nakagawa M. The angiogenic effect of tissue factor on tumors and wounds. *Semin Thromb Hemost* 1998; 24:207-10
64. Neuenschwander PF, Fiore MM, Morrissey JH. Factor VII autoactivation proceed via interaction of distinct protease-cofactor and zymogen-cofactor complexes. *J Biol Chem* 1993; 268:21489-92
65. Norledge BV, Petrovan RJ, Ruf W, Olson AJ. The tissue factor/factor VIIa/factor Xa complex: a model built by docking and site-directed mutagenesis. *Proteins* 2003; 53:640-48
66. Ohto U, Mizutani R, Nakamura M, Adachi H, Satow Y. Crystal structure of a humanized Fab fragment of anti-tissue-factor antibody in complex with tissue factor. *J Synchrotron Radiat* 2004; 11:105-8
67. Paborsky LR, Caras IW, Fisher KL, Gorman CM. Lipid association, but not the transmembrane domain, is required for tissue factor activity. Substitution of the transmembrane domain with a phosphatidylinositol anchor. *J Biol Chem* 1991; 266:21911-16
68. Paborsky LR, Harris RJ. Post-translational modifications of recombinant human tissue factor. *Thromb Res* 1990; 60:367-76
69. Paborsky LR, Tate KM, Harris RJ, Yansura DG, Band L, McCray G, Gorman CM, O'Brien DP, Chang JY, Swartz JR, Fung VP, Thomas JN, Vehar GA. Purification of recombinant human tissue factor. *Biochemistry* 1989; 28:8072-77
70. Parry GC, Erlich JH, Carmeliet P, Luther T, Mackman N. Low levels of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice. *J Clin Invest* 1998; 101:560-69
71. Payne MA, Neuenschwander PF, Johnson AE, Morrissey JH. Effect of soluble tissue factor on the kinetic mechanism of factor VIIa: enhancement of p-guanidinobenzoate substrate hydrolysis. *Biochemistry* 1996; 35:7100-6
72. Pendurthi UR, Allen KE, Ezban M, Rao LV. 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; 275:14632-41
73. Pendurthi UR, Ghosh S, Mandal SK, Rao LV. Tissue factor activation: is disulfide bond switching a regulatory mechanism? *Blood* 2007; 110:3900-08

74. Pendurthi UR, Williams JT, Rao LV. Acidic and basic fibroblast growth factors suppress transcriptional activation of tissue factor and other inflammatory genes in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:940-46
75. Petersen LC, Albrektsen T, Hjortø GM, Kjalke M, Bjørn SE, Sørensen BB. Factor VIIa/tissue factor-dependent gene regulation and pro-coagulant activity: Effect of factor VIIa concentration. *Thrombosis and Haemostasis* 2007; 980:909-11
76. Poulsen LK, Jacobsen N, Sørensen BB, Bergenheim NC, Kelly JD, Foster DC, Thastrup O, Ezban M, 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; 273:6228-32
77. Randolph GJ, Luther T, Albrecht S, Magdolen V, Muller WA. Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. *Blood* 1998; 92:4167-77
78. Rauch U, Antoniak S, Boots M, Schulze K, Goldin-Lang P, Stein H, Schultheiss HP, Coupland SE. Association of tissue-factor upregulation in squamous-cell carcinoma of the lung with increased tissue factor in circulating blood. *Lancet Oncol* 2005; 6:254
79. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 2000; 96:170-75
80. Rauch U, Nemerson Y. Tissue factor, the blood, and the arterial wall. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10:139-43
81. Rehemtulla A, Ruf W, Edgington TS. The integrity of the cysteine 186-cysteine 209 bond of the second disulfide loop of tissue factor is required for binding of factor VII. *J Biol Chem* 1991; 266:10294-99
82. Rehemtulla A, Ruf W, Miles DJ, Edgington TS. The third Trp-Lys-Ser (WKS) tripeptide motif in tissue factor is associated with a function site. *Biochem J* 1992; 282:737-40
83. Ruf W, Edgington TS. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J* 1994; 8:385-90
84. Ruf W, Kalnik MW, Lund-Hansen T, Edgington TS. Characterization of factor VII association with tissue factor in solution. High and low affinity calcium binding sites in factor VII contribute to functionally distinct interactions. *J Biol Chem* 1991; 266:15719-25

85. Ruf W, Miles DJ, Rehemtulla A, Edgington TS. Cofactor residues lysine 165 and 166 are critical for protein substrate recognition by the tissue factor-factor VIIa protease complex. *J Biol Chem* 1992; 267:6375-81
86. Ruf W, Miles DJ, Rehemtulla A, Edgington TS. Tissue factor residues 157-167 are required for efficient proteolytic activation of factor X and factor VII. *J Biol Chem* 1992; 267:22206-10
87. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-91
88. Scarpati EM, Wen D, Broze GJ Jr, Miletich JP, Flandermeyer RR, Siegel NR, Sadler JE. Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry* 1987; 26:5234-38
89. Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med* 2006; 203:2433-40
90. Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets* 2002; 13:247-53
91. Spicer EK, Horton R, Bloem L, Bach R, Williams KR, Guha A, Kraus J, Lin TC, Nemerson Y, Konigsberg WH. Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:5148-52
92. Stampfuss JJ: Zirkulierender Tissue Factor: Zelluläre Quellen und Regulation. Inaugural-Dissertation, Düsseldorf 2006
93. Stenina OI, Poptic EJ, DiCorleto PE. Thrombin activates a Y box-binding protein (DNA-binding protein B) in endothelial cells. *J Clin Invest* 2000; 106:579-87
94. Sturk-Maquelin KN, Nieuwland R, Romijn FP, Eijssman L, Hack CE, Sturk A. Pro- and non-coagulant forms of non-cell-bound tissue factor in vivo. *J Thromb Haemost* 2003; 1:1920-26
95. Suefuji H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Soejima H, Motoyama T, Mizuno Y, Oshima S, Saito T, Tsuji I, Kumeda K, Kamikubo Y, Nakamura S. Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1997; 134:253-59
96. Sugnet CW, Kent WJ, Ares M Jr, Haussler D. Transcriptome and genome conservation of alternative splicing events in humans and mice. *Pac Symp Biocomput* 2004; 9:66-77

97. Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ Res* 2005; 96:1233-39
98. Szotowski B, Goldin-Lang P, Antoniak S, Bogdanov VY, Pathirana D, Pauschinger M, Dörner A, Kuehl U, Coupland S, Nemerson Y, Hummel M, Poller W, Hetzer R, Schultheiss HP, Rauch U. Alterations in myocardial tissue factor expression and cellular localization in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005b; 45:1081-89
99. Szotowski BH. Die Bedeutung der Expression von Tissue Factor und seiner Isoform für die zelluläre Thrombogenität: Untersuchung an humanen Endothelzellen nach Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen. Inaugural-Dissertation, Berlin 2007
100. Taylor FB, Chang AC, Peer G, Li A, Ezban M, Hedner U. Active site inhibited factor VIIa (DEGR VIIa) attenuates the coagulant and interleukin-6 and -8, but not tumor necrosis factor, responses of the baboon to LD100 Escherichia coli. *Blood* 1998; 91:1609-15
101. Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ Jr. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* 1996; 88:1583-87
102. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, *et al*. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291:1304-51
103. Versteeg HH, Ruf W. Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32:24-32
104. Waxman E, Ross JB, Laue TM, Guha A, Thiruvikraman SV, Lin TC, Konigsberg WH, Nemerson Y. Tissue factor and its extracellular soluble domain: the relationship between intermolecular association with factor VIIa and enzymatic activity of the complex. *Biochemistry* 1992; 31:3998-4003
105. Weber AA, Hohlfeld T, Schrör K. Pharmakologie der Blutgerinnung 2006. *Biospektrum* 2006; 12:35-38
106. Xie J, Black DL. A CaMK IV responsive RNA element mediates depolarization-induced alternative splicing of ion channels. *Nature* 2001; 410:936-39
107. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, Coomber BL, Mackman N, Rak JW. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; 105:1734-41

7. Publikationen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

7.1 Originalarbeiten

1. Censarek P*, Bobbe A*, Grandoch M, Schrör K, Weber AA. Alternatively spliced human tissue factor (asHTF) is not pro-coagulant. *Thromb Haemost* 2007; 97:11-14. (Rapid and Short Communication) *contributed equally

7.2 Kongressbeiträge

1. Censarek P*, Bobbe A*, Schrör K, Weber AA. Alternatively spliced human tissue factor (asHTF) is not pro-coagulant. *XII. Kardiologisch-Hämostaseologischer Workshop*, Solingen 2006 *contributed equally
2. Bobbe A, Schrör K, Weber AA, Censarek P. The fully glycosylated alternatively spliced human tissue factor (asHTF) has no pro-coagulant activity. *Hämostaseologie* 2007; 27:P203
3. Bobbe A, Treml M, Schrör K, Weber AA, Censarek P. PSGL-1-independent transfer of tissue factor from monocytes to platelets. *XXIst European Platelet Meeting, Lutherstadt Wittenberg* 12-14.10.2006

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich für die Überlassung des Themas und für die Betreuung dieser Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich für die Möglichkeit, an verschiedenen wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen zu können und die damit verbundene großzügige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Artur-Aron Weber danke ich für die Betreuung der Arbeit. Hilfreiche Ratschläge und Anregungen haben zur Lösung so manchen Problems beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich möchte ich für die freundliche Übernahme des Koreferates danken.

Weiterer besonderer Dank gilt Dr. Petra Censarek für ihre kompetente Betreuung, die netten Gespräche sowohl über biologische als auch nichtbiologische Themen sowie ihr Engagement bei der Durchsicht meines Manuskriptes.

Dr. Jan Stampfuss danke ich für seine hilfreiche methodische Unterstützung und seiner Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen.

Mein Dank gilt auch Kerstin Freidel für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die netten Gespräche während des Laboralltags. Beate Weyrauther danke ich für die Unterstützung in der Zellkultur. Petra Kuger und Frau Reupert danke ich für die methodische Unterstützung und die sehr nette Hilfsbereitschaft.

Erika Lohmann und Karin Montag danke ich herzlich für die Organisation des Institutslebens.

Allen Kollegen der Pharmakologie möchte ich für das äußerst angenehme, freundliche Arbeitsklima und Anregungen nicht nur in Bezug auf den Laboralltag danken. Vielen Dank an Dr. Anke Rosenkranz für die Durchsicht meines englischen Manuskriptteils.

Auch möchte ich Dr. Maria Grandoch danken, welche mir nicht nur in punkto Proteinisolation stets eine große Hilfe war.

Ebenfalls großer Dank gebührt meinem Freund Marcel Treml. Er hat mich auch über konstruktive Kritik in jeder Hinsicht unterstützt. Auch seinen Eltern danke ich dafür, dass sie uns mit Rat und Tat stets zur Seite standen.

Weiterhin möchte ich ganz besonders meinen Eltern danken. Ohne ihren Rückhalt und ihre Unterstützung wäre mir das Erreichen der Promotion nicht möglich gewesen.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Doktorschrift selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommen Stellen als solche kenntlich gemacht habe, und dass diese Doktorschrift an keiner anderen Fakultät eingereicht worden ist.

Düsseldorf, den

(Anett Bobbe)

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anett Bobbe
Geburtsdatum: 30.10.1980
Geburtsort: 06366 Köthen

Schulausbildung

1987 – 1989 POS
(Kastanienschule 06366 Köthen)
1989 – 1991 POS
(Schule am Hühnerkropf)
1991 – 1999 Gymnasium
(Ludwigsgymnasium 06366 Köthen)
Abschluss: Abitur 1,3

Studium und Promotion

10/1999 – 04/2005 Biologiestudium an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Abschluss: Diplom 1,46
seit 05/2005 Promotion am Institut für Pharmakologie und Klinische
Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
Titel: Alternativ gespleißter humaner Tissue Factor: Klonierung,
Expression und Untersuchung der prokoagulatorischen Aktivität