

**Die Bedeutung der Expression von Tissue Factor und seiner  
Isoform für die zelluläre Thrombogenität:  
Untersuchung an humanen Endothelzellen nach Stimulation mit  
inflammatorischen Zytokinen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Björn Henning Szotowski  
aus Berlin

März 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Mathias F. Melzig
2. Gutachter: Prof. Dr. Ursula Rauch-Kröhnert

Disputation am 29.08.2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Die Bedeutung des Proteins „Tissue Factor“ in der Blutgerinnung</i>	1
1.2	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor und seine Bedeutung für die Blutgerinnung</i>	5
1.3	<i>Die Struktur und Lokalisation des Proteins „Tissue Factor“</i>	6
1.4	<i>Die Genstruktur von Tissue Factor</i>	8
1.5	<i>Das alternative Spleißen des Tissue Factor-Gens</i>	10
1.6	<i>Die Bedeutung von im Blut zirkulierenden „Tissue Factor“</i>	11
1.7	<i>Entzündung und Tissue Factor</i>	13
1.8	<i>Ionisierende Bestrahlung und Tissue Factor</i>	14
1.9	<i>Antioxidantien und Tissue Factor</i>	15
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>18</b>
3.1.1	Chemikalien und Substanzen	18
3.1.2	Kits	19
3.1.3	Nukleotide, Primer und Sonden	20
3.1.4	Enzyme	20
3.1.5	Antikörper	21
3.1.6	Zelllinie	21
3.1.7	Medien und Zusätze für die Zellkultur	22
3.1.8	Größenmarker	22
3.1.9	Puffer und Lösungen	22
3.1.10	Geräte	23
3.1.11	Sonstige Materialien	24
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>25</b>
3.2.1	Versuchsaufbau	25
3.2.2	Die Experimente an humanen Endothelzellen	27

3.2.2.1	<i>Die Zellkultur von HUVECs</i>	27
3.2.2.2	<i>Methoden zum Nachweis von Endotoxinen und Mykoplasmen</i>	28
3.2.2.3	<i>Die Stimulation der Zellen mit inflammatorischen Zytokinen</i>	28
3.2.2.4	<i>Die Bestrahlung der Zellen</i>	29
3.2.3	Molekularbiologische Methoden zum Umgang mit RNA und DNA	30
3.2.3.1	<i>Methoden zur Quantifizierung der RNA und ihrer Qualitätskontrolle</i>	30
3.2.3.2	<i>Die Durchführung der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)</i>	31
3.2.3.3	<i>Die Amplifikation von DNA mittels PCR und ihre Auftrennung mittels Gelelektrophorese</i>	32
3.2.3.4	<i>Die Extraktion von DNA aus dem Elektrophorese-Gel und Berechnung der DNA-Standards für die Realtime-PCR</i>	33
3.2.3.5	<i>Die Durchführung der Realtime-PCR mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden</i>	33
3.2.4	Die Bestimmung der prokoagulatorischen Aktivität von Tissue Factor	36
3.2.4.1	<i>Die Bestimmung der zellulären und Mikropartikel-assoziierten Tissue Factor-Aktivität</i>	36
3.2.4.2	<i>Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Tissue Factor im zellfreien Überstand</i>	37
3.2.5	Proteinbiochemische Methoden	39
3.2.5.1	<i>Die Isolation und quantitative Bestimmung von Proteinen</i>	39
3.2.5.2	<i>Die Immunpräzipitation der Tissue Factor-Isoform</i>	39
3.2.5.3	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	40
3.2.5.4	<i>Western Blot</i>	40
3.2.5.5	<i>Die Quantifizierung des Tissue Factor-Proteins per ELISA</i>	41
3.2.6	Die Durchflusszytometrie zur Detektion von Mikropartikeln und Apoptose	43
3.2.7	Die Methode der Fluoreszenzfärbung und der Konfokalmikroskopie	45
3.2.8	Die Chemilumineszenz- Messung der Superoxidradikal-Bildung	47
<b>3.3</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>48</b>

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Die Zytokin-induzierte Expression der Tissue Factor-Isoformen und ihre Auswirkung auf die Thrombogenität</i></b>	<b>49</b>
4.1.1	Die endotheliale Expression von Tissue Factor-Isoformen	49
4.1.2	Der Einfluss von TNF- $\alpha$ und IL-6 auf die mRNA-Expression der Tissue Factor-Isoformen	50
4.1.3	Die Detektion der Tissue Factor Proteine in Zytokin-stimulierten HUVECs	53
4.1.4	Der Nachweis von löslichem asTF im Zellkultur-Überstand	55
4.1.5	Die Redistribution von zellulärem TFPI in den Zellkultur-Überstand nach Zytokin-Stimulation	56
4.1.6	Die Wirkung von TNF- $\alpha$ und IL-6 auf die zelluläre Prokoagulabilität endothelialer Zellen	58
4.1.7	Die prokoagulatorische Aktivität im Zellkultur-Überstand	60
4.1.7.1	<i>Der Nachweis des erfolgreichen Entfernens von Mikropartikeln aus dem Zellkultur-Überstand</i>	60
4.1.7.2	<i>Die Bedeutung von Phospholipiden für die prokoagulatorische Aktivität von asTF</i>	61
4.1.7.3	<i>Der Einfluss von extrazellulärem TFPI auf die Aktivitätsmessung im Zellkultur-Überstand</i>	61
4.1.7.4	<i>Die prokoagulatorische Aktivität im Zellkultur-Überstand nach Zytokin-Stimulation</i>	62
4.1.7.5	<i>Die Mikropartikel-assoziierte prokoagulatorische Aktivität im Zellkultur-Überstand nach Stimulation mit TNF-<math>\alpha</math></i>	64
<b>4.2</b>	<b><i>Auswirkungen von Inhibitoren der intrazellulären Signaltransduktion auf das Zytokin-induzierte Spleißverhalten des Tissue Factor-Gens</i></b>	<b>66</b>
4.2.1	Der Einfluss von Inhibitoren des NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweges auf die mRNA-Expression der TF-Isoformen	66
4.2.2	Die Auswirkung des CLK-Inhibitors TG003 auf die Expression der Tissue Factor-Isoformen	68

<b>4.3</b>	<b><i>Die endotheliale Expression der Tissue Factor-Isoformen nach ionisierender Bestrahlung</i></b>	<b>70</b>
4.3.1	Der Einfluss ionisierender Bestrahlung auf die endotheliale mRNA-Expression der Tissue Factor-Isoformen	70
4.3.2	Die zelluläre Protein-Expression und Aktivität von TF nach Bestrahlung	72
4.3.3	Der Effekt von TNF- $\alpha$ auf die strahlungsinduzierte Sekretion von asTF	73
4.3.4	Die Auswirkung von TNF- $\alpha$ auf die Mikropartikel-assoziierte prokoagulatorische Aktivität bestrahlter HUVECs	74
4.3.5	Der Zusammenhang zwischen strahlungsinduzierter Apoptose und Freisetzung prokoagulatorischer Mikropartikel	75
<b>4.4</b>	<b><i>Der Einfluss von Antioxidantien auf die strahlungs- und Zytokin-induzierte Tissue Factor-Expression</i></b>	<b>79</b>
4.4.1	Die Wirkung der Antioxidantien PDTC und NAC auf die zelluläre Tissue Factor-Aktivität, die strahlungs- und Zytokin-induzierte Apoptose und die Freisetzung von prokoagulatorischen Mikropartikeln	79
4.4.2	Die Beteiligung von reaktiven Sauerstoff-Spezies an der Entstehung von prokoagulatorischen Mikropartikeln	82
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>84</b>
<b>5.1</b>	<b><i>Die endotheliale Expression von Tissue Factor unter inflammatorischen Bedingungen</i></b>	<b>84</b>
<b>5.2</b>	<b><i>Die Bedeutung der Tissue Factor-Isoformen für die Thrombogenität</i></b>	<b>87</b>
<b>5.3</b>	<b><i>Das Zytokin-induzierte Spleißen des Tissue Factor-Gens und seine Modulierung</i></b>	<b>91</b>
<b>5.4</b>	<b><i>Der Einfluss ionisierender Strahlung auf die Tissue Factor-Expression und Mikropartikel-Freisetzung</i></b>	<b>93</b>
<b>5.5</b>	<b><i>Die Wirkung der Antioxidantien PDTC und NAC auf die strahlungsinduzierte Tissue Factor-Expression und Mikropartikel-Entstehung</i></b>	<b>96</b>
<b>5.6</b>	<b><i>Ausblick</i></b>	<b>97</b>

<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>101</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>103</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>10.</b>	<b>Publikationen</b>	<b>128</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>130</b>
<b>12.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>131</b>