

**Die Bedeutung der Tissue Factor -  
abhängigen Signaltransduktion für die  
zelluläre Funktion der Kardiomyozyten**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
D o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m  
(Dr. rer. nat.)

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

von

**Ulrike Boltzen**  
aus Hamburg

März 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Ursula Rauch-Kröhnert
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation: 05. Mai 2010

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Die Blutgerinnungskaskade	1
1.2.	Tissue Factor (TF)	4
1.2.1.	Die „full-length“ Tissue Factor-Isoform (flTF)	5
1.2.2.	Die lösliche alternativ gespleißte Tissue Factor-Isoform (asTF)	7
1.3.	Signaltransduktionswege und Tissue Factor	9
1.4.	Apoptose im Herzen	10
1.4.1.	Die Apoptose im kardiovaskulären System	14
1.4.2.	Die Apoptose und Tissue	15
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>3.</b>	<b>Material</b>	<b>18</b>
3.1.	Chemikalien und Substanzen	18
3.2.	Kits	20
3.3.	Puffer	20
3.4.	Enzyme	21
3.5.	Vektoren und siRNAs	21
3.6.	Zellen	22
3.7.	Tiere	23
3.8.	Antikörper	23
3.9.	Primer und Bedingungen für die Polymerasekettenreaktion	24
3.10.	Geräte	27
3.11.	Sonstige Materialien	28
<b>4.</b>	<b>Methoden</b>	<b>29</b>
4.1.	Versuchsaufbau	29
4.2.	Zellkulturexperimente	31
4.2.1.	Zellkultur mit HL-1 Zellen	31
4.2.2.	Zellkultur mit primären Zellen	32
4.2.3.	Vitalitätstest und Kontaminationsanalyse	33
4.2.4.	Die Stimulation von Zellen	34

---

<b>4.3. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>35</b>
4.3.1. Extraktion und Quantifizierung von RNA	35
4.3.2. cDNA-Synthese	35
4.3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
4.3.3.1. Semiquantitative PCR	37
4.3.3.2. Kolonie-PCR	38
4.3.4. Auftrennung von DNA-Amplifikaten mittels Gelelektrophorese	38
4.3.5. DNA-Extraktion aus dem Agarosegel	39
4.3.6. Klonierung von DNA-Fragmenten	39
4.3.6.1. Restriktion	41
4.3.6.2. Ligation	41
4.3.6.3. Transformation	42
4.3.6.4. Dauerkulturen	42
4.3.6.5. Plasmidisolation	42
4.3.7. Transfektion	43
4.3.8. TaqMan® RealTime-PCR	44
4.3.9. Genotypisierung von Mäusen/ Mäuseembryos	46
<b>4.4. Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>47</b>
4.4.1. Proteingewinnung aus Zellen	47
4.4.2. Proteinbestimmung	47
4.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
4.4.4. Western- / Immun-Blot	48
<b>4.5. Durchflusszytometrie</b>	<b>50</b>
4.5.1. Fluoreszenzfärbung von Zellen/ Bestimmung der KI-67-Expression	50
4.5.2. CFSE-Proliferationsassay	51
4.5.3. Annexin-V-/ Propidiumiodid-Apoptoseassay	52
4.5.4. Transfektionseffizienz	52
<b>4.6. Fluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie</b>	<b>53</b>
<b>4.7. Angewandte Programme und statistische Auswertung</b>	<b>54</b>

---

<b>5. Ergebnisse</b>	<b>55</b>
5.1. Die Überexpression von murinem asTF in HL-1 Zellen und die Charakterisierung dieser Zellen	55
5.1.1. Die stabile Überexpression von murinem asTF in HL-1 Zellen	56
5.1.2. Das Wachstumsverhalten der asTF-überexprimierenden HL-1 Zellen	58
5.1.3. Das Apoptoseverhalten der asTF-überexprimierenden HL-1 Zellen	59
5.2. Die Bedeutung von asTF für die Signaltransduktion	63
5.2.1. Der Einfluss von asTF auf die Signaltransduktionswege Erk1/2 und PI3K/Akt	63
5.2.2. Die Expression von Bcl-2 Proteinen in HL-1 Zellen	66
5.2.3. Die Beteiligung von Bcl-x <sub>L</sub> an der asTF-vermittelten anti-apoptotischen Wirkung	67
5.3. <i>Ex vivo</i> – Versuche	70
5.3.1. Die Isolation von primären murinen Kardiomyozyten und die Transfektion mit dem asTF-Expressionsplasmid	70
5.3.2. Das Apoptoseverhalten der asTF-überexprimierenden primären murinen Kardiomyozyten	74
5.3.3. Die Genexpression von Bcl-2 Proteinen und Akt in den asTF-überexprimierenden Kardiomyozyten	76
5.3.4. Das Apoptoseverhalten von embryonalen Kardiomyozyten mit TF-Knockout	78
5.4. Der Einfluss von asTF auf die Expression von pro-angiogenen Proteinen	81
<b>6. Diskussion</b>	<b>83</b>
6.1. Der Einfluss der asTF-Expression auf das Proliferationsverhalten und die Vitalität der HL-1 Kardiomyozyten	83
6.1.1. Die stabile Überexpression von asTF in HL-1 Zellen	83
6.1.2. Die Proliferation und das Apoptoseverhalten der asTF-überexprimierenden HL-1 Zellen	85

---

<b>6.2. Die anti-apoptotische Wirkung von asTF</b>	<b>88</b>
6.2.1. Der Einfluss der asTF-Überexpression auf die Signaltransduktionswege Erk1/2 und PI3K/Akt	<b>88</b>
6.2.2. Der Einfluss der asTF-Überexpression auf Bcl-2 Proteine	<b>89</b>
<b>6.3. Die Bedeutung von asTF für das Überleben primärer Kardiomyozyten</b>	<b>92</b>
6.3.1. Die Überexpression von asTF in primären Kardiomyozyten	<b>92</b>
6.3.2. Das Apoptoseverhalten der primären Kardiomyozyten	<b>93</b>
<b>6.4. Die Bedeutung von asTF für die Expression von Angiogenese- assoziierten Proteinen</b>	<b>95</b>
<b>6.5. Ausblick</b>	<b>98</b>
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>99</b>
<b>8. Summary</b>	<b>102</b>
<b>9. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>104</b>
<b>10. Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>11. Publikationen</b>	<b>125</b>
<b>12. Danksagung</b>	<b>128</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Blutgerinnungskaskade

Schon seit der Antike existieren Vorstellungen und Theorien zur Blutgerinnung. Erste konkrete Forschungsergebnisse lieferte Johannes Müller (1801 - 1858), der als erster Fibrin als den Stoff identifizierte, aus dem ein Thrombus besteht. Rudolf Virchow (1821 - 1902) beschrieb wenig später die lösliche Vorform von Fibrin, das Fibrinogen. Alexander Schmidt (1831 - 1894) stellte in seinem Werk „Zur Blutlehre“ dar, dass die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin ein enzymatischer Prozess ist, und nannte das Enzym, welches den Prozess katalysiert, Thrombin (Schmidt, 1892). Zudem definierte er Prothrombin als enzymatisch inaktive Vorläuferform von Thrombin.

Vor etwas mehr als 100 Jahren, im Jahre 1905, stellte Morawitz (1879 - 1936) seine Theorie zur Blutgerinnung auf und prägte den Begriff Thrombokinase für eine gerinnungsfördernde Substanz (Morawitz, 1905). Das Gerinnungssystem nach Morawitz basiert auf vier Komponenten: Thrombokinase, Kalzium, Prothrombin und Fibrinogen. Er postulierte, dass einerseits Thrombozyten und Leukozyten nach Verletzungen oder längerer Blutstockung Thrombokinase ins Blut abgeben und andererseits, dass Thrombokinase bei Gefäßverletzungen ins Blut freigelassen wird. Nach Morawitz kann die im Blut vorhandene Thrombokinase Prothrombin in der Anwesenheit von Kalzium in Thrombin umwandeln, welches dann wiederum Fibrinogen zu Fibrin konvertiert. Der Begriff „Tissue Factor“ (TF) wurde erst 30 Jahre später von Howell (Howell, 1935; Nolf, 1938) für die zuvor als Thrombokinase oder Tissue-Thromboplastin benannte Substanz verwendet. In den nachfolgenden Jahren bis 1962 wurden insgesamt 12 Faktoren (F) beschrieben, die an der Blutgerinnung beteiligt sind. Die Interaktion der verschiedenen Faktoren oder ein komplettes Gerinnungssystem war jedoch bis zum Jahre 1964 nicht bekannt. In diesem Jahr formulierten Davie und MacFarlane unabhängig voneinander die „Wasserfall“- oder „Kaskaden“-Theorie der Blutkoagulation (Davie & Ratnoff, 1964; MacFarlane, 1964). Bei beiden Theorien wurde Faktor XII als Initiator der sogenannten intrinsischen Blutgerinnung definiert. Außerdem postulierten die Autoren, dass jedes Protein als Proenzym/Zymogen vorliegt und nach Induktion in die aktive Form (a) umgewandelt wird, die wiederum das nächste Proenzym in der Kaskade aktiviert. Zudem wurde

zwischen dem intrinsischen und dem durch TF aktivierten extrinsischen Blutgerinnungssystem unterschieden.

1966 beschrieben Nemerson und Williams & Norris (Nemerson, 1966; Williams & Norris, 1966), dass Tissue Factor einen proteolytisch aktiven Komplex mit Faktor VII, Phospholipiden und Kalzium bildet, welcher Faktor X zu Faktor Xa umwandelt. Der genaue proteolytische Mechanismus war jedoch noch nicht geklärt. In den folgenden Jahren gelang es zunächst, das TF-Protein aus Geweben zu isolieren (Bach et al., 1981) und später die mRNA-Sequenz zu entschlüsseln (Fisher et al., 1987; Morrissey et al., 1987; Scarpati et al., 1987; Spicer et al., 1987). Die gesamte genomische Sequenz wurde etwas später von Mackman publiziert (Mackman 1989). TF wurde in unterschiedlichen Geweben und Organen gefunden. Es wurde im Gehirn, im Herzen, in der Lunge, der Leber, der Niere, der Milz und in der Haut nachgewiesen (Fleck et al., 1990), wobei TF besonders in Gefäßwänden lokalisiert ist (Drake et al., 1989). Wenn es in einem Organ zu einer Gefäßverletzung kommt, schützt die Anwesenheit von TF das betreffende Areal durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade vor Einblutungen und Blutverlusten.

Lange wurde noch zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Blutgerinnungssystem unterschieden. Das intrinsische System oder Kontaktaktivierungssystem wird aktiviert, wenn Gerinnungsfaktor XII, der im Blut vorhanden ist (intrinsisch), in Kontakt mit anionischen Oberflächen (z.B. einer Reagenzglaswand) tritt. Über die Aktivierung von FXI und FIX entsteht aktiver FX. Der extrinsische Weg wird durch den Komplex von TF und FVII initiiert und resultiert ebenfalls in der Aktivierung von FX (Abbildung 1). FXa bildet zusammen mit FV und Prothrombin den Prothrombinasekomplex (Nemerson & Bach, 1982; Kalafatis et al., 1994), welcher zur Generierung von Thrombin führt. Thrombin wiederum spaltet Fibrinogen in Fibrin und aktiviert FXIII, welcher als Kofaktor bei der Bildung des quervernetzten Fibrinthrombus agiert.

1977 fanden Osterud und Rapaport heraus, dass der Komplex aus TF und FVII auch FXI und somit den intrinsischen Weg aktiviert (Osterud & Rapaport, 1977). Weiterhin wurde beschrieben, dass die Anwesenheit von Thrombin, selbst in geringen Mengen, zur FXII-unabhängigen Bildung von FXIa führt (Naito & Fujikawa, 1991) und die Kofaktoren V (Esmon, 1979) und VIII (Eaton et al., 1986) aktiviert.

Es besteht folglich ein positiver Rückkopplungsmechanismus, der dazu führt, dass 50 bis 100mal mehr FX gebildet wird als durch den TF/FVIIa-Komplex allein. Diese



Erkenntnisse machen deutlich, dass der intrinsische und der extrinsische Gerinnungsweg Einfluss aufeinander ausüben und sich durch die Quervernetzungen gegenseitig aktivieren. Eine begrifflich strikte Trennung der beiden Wege ist somit nicht mehr zulässig.

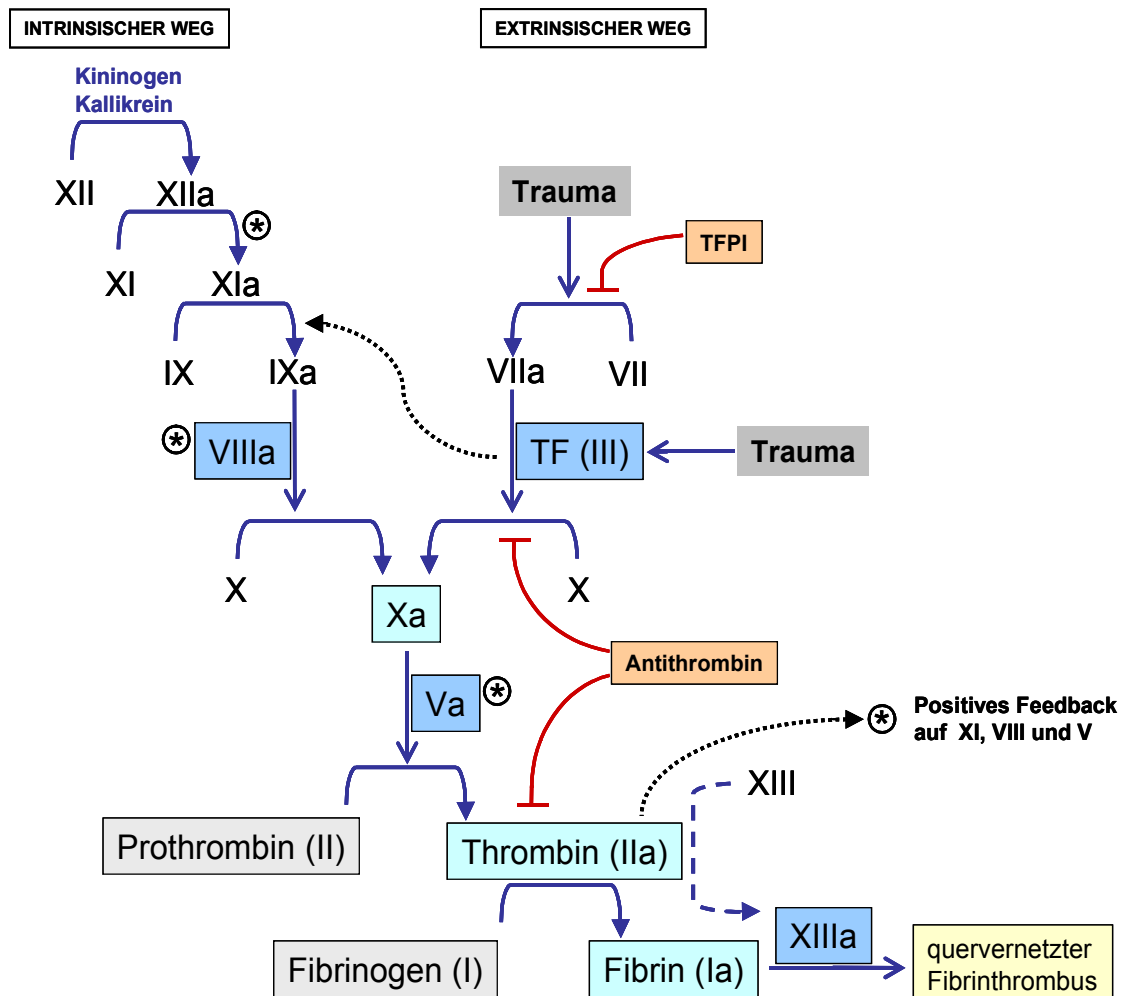


Abbildung 1: Blut-Koagulationskaskade nach dem heutigen Kenntnisstand.

Heute verwendet man den Begriff der intrinsischen Blutgerinnung meist nur, wenn man die durch den Kontakt von Blut mit künstlichen Oberflächen induzierte Gerinnung beschreibt. Patienten mit einem Mangel an Präkallikrein, hochmolekularem Kininogen oder FXII weisen keine erhöhte Blutungsneigung auf (Zeerleder et al., 1999; Blat & Seiffert, 2008), weswegen man dem intrinsischen System kaum noch Bedeutung zumisst. Ein Mangel an Gerinnungsfaktoren, die dem extrinsischen System zugeordnet werden, wie z.B. FVII, FX, FII oder FV, ist hingegen meist letal (Aasrum & Prydz, 2002). Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein

kompletter TF-Knockout die Embryonalentwicklung stark behindert. Schon zwischen Tag E8.5 - 10.5 starben 90% der Embryos an schweren Blutungen (Aasrum & Prydz, 2002; Mackman, 2004).

Tissue Factor (TF), der auch als Faktor III oder CD142 bezeichnet wird, ist aus heutiger Sicht der zentrale Initiator der Blutgerinnung und führt durch die Bindung von FVII zur Aktivierung von FX und FIX und letztendlich zu der Bildung eines unlöslichen Fibrinthrombus (Eilertsen & Osterud, 2004).

## 1.2. Tissue Factor

Tissue Factor (TF, Faktor III, CD142), der Initiator der Blutgerinnungskaskade, fungiert als hochaffiner Rezeptor für FVII/FVIIa und hat auch einen Einfluss auf verschiedene Signaltransduktionswege, wie zum Beispiel MAP-Kinasewege (Mitogen-activated protein) (Ruf & Mueller, 1999; Rao & Pendurthi, 2005).

TF wird in vielen Organen und Zelltypen exprimiert. So wurde TF besonders in gut durchbluteten Organen wie dem Herzen, der Niere und dem Gehirn nachgewiesen (Drake et al., 1993; Mackman, 2005). Ferner ist TF in extravaskulären Zellen, wie zum Beispiel in Kardiomyozyten, Fibroblasten, Perizyten und Astrozyten vorhanden (Fleck et al., 1990; Drake et al., 1989). Unter normalen Umständen findet man weder in Endothelzellen noch in der *Tunica intima* der Gefäße eine bedeutsame TF-Expression. In der *Tunica adventitia* der Blutgefäße wurde jedoch ein hohes TF-Expressionsniveau festgestellt (Wilcox et al., 1989).

Die Vorstellung, dass TF erst nach einer Gefäßverletzung in Kontakt mit dem Blutssystem tritt, wurde 1999 von Giesen widerlegt (Giesen et al., 1999). Giesen und Kollegen zeigten, dass TF auch im Blut von gesunden Menschen zirkuliert. Im Blut konnte TF erfolgreich auf der Oberfläche von Monozyten nachgewiesen werden (Rivers et al., 1975). Monozyten sind zudem die einzigen Blutzellen, die TF nach einer Stimulation synthetisieren (Ott, 2003). Ferner kommt TF im Blut Mikropartikel (MP)-assoziiert vor. Mikropartikel werden von unterschiedlichen Zellen, insbesondere nach Apoptose oder einer Aktivierung der betreffenden Zellen freigesetzt (Mallat et al., 2000; Rauch et al., 2000; Freyssinet, 2003). Bislang wurden MP aus Leukozyten (Rauch et al., 2000), glatten Muskelzellen (Schechter et al., 2000), Endothelzellen (Mallat et al., 2000) und Thrombozyten (Siddiqui et al., 2002) identifiziert, wobei die den Thrombozyten entstammenden MP die anteilig größte Menge bilden (Diamant et

al., 2004). Rauch und Kollegen wiesen nach, dass TF von aktivierten Leukozyten über MP auf Thrombozyten übertragen wird (Rauch et al., 2000). Zudem wurde gezeigt, dass TF in den  $\alpha$ -Granula und dem offenen kanalikulären System der Thrombozyten gespeichert ist (Zillmann et al., 2001; Muller et al., 2003). Erste Hinweise, dass Thrombozyten TF exprimieren, lieferten Schwertz und Kollegen. Sowohl TF-prä-mRNA als auch reife TF-mRNA wurden in Thrombozyten nachgewiesen (Schwertz et al., 2006).

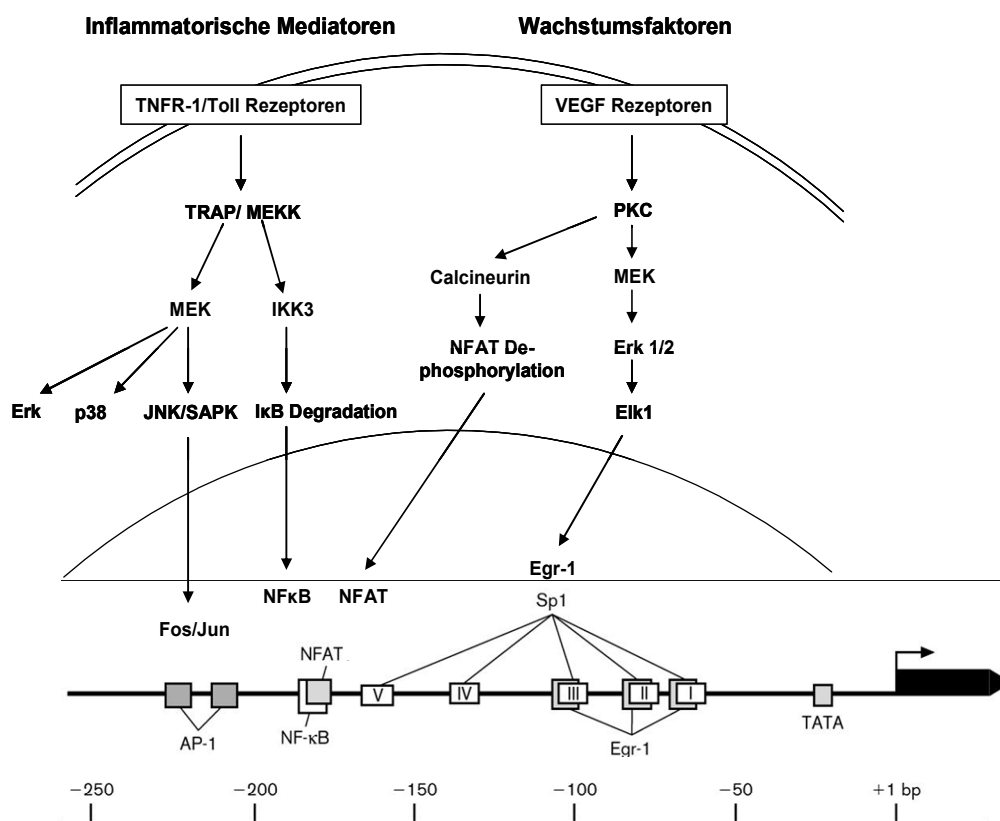
Zusätzlich zu dem MP-assoziierten TF und „dem an Monozyten gebundenen TF“ entdeckten Bogdanov und Kollegen 2003 eine lösliche TF-Isoform, die frei im Blut zirkuliert und pro-koagulativ bei Anwesenheit von Phospholipiden wirkt (Bogdanov et al., 2003).

### **1.2.1. Die „full-length“ Tissue Factor-Isoform (flTF)**

Das TF-Gen ist beim Menschen auf Chromosom 1 1p22 - 23 lokalisiert (Kao et al., 1988). Am Ende der 80er Jahre wurde das TF-Gen kloniert, wodurch umfassende Erkenntnisse über dessen Struktur gewonnen wurden (Carson et al., 1985; Morrissey et al., 1987). Das Gen umfasst 12,4 kbp und besteht aus 6 kodierenden Exons, die durch 5 Introns voneinander getrennt werden (Mackman, 1989). Exon 1 kodiert die Information für die Initiation der Translation sowie Informationen für die posttranslatorische Prozessierung und die Integration des TF-Proteins in die Zellmembran. Exon 2, 3, 4 und 5 kodieren zusammen die extrazelluläre Domäne von TF. Exon 6 beinhaltet den Code für die transmembranäre und die zytosolische Domäne. Die reife mRNA ist 2,2 kbp groß.

Die TF-Expression wird auf Transkriptionsebene geregelt. TF besitzt eine Promotorregion mit verschiedenen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Der Promotor verfügt über zwei Aktivator Protein (AP)-1 Bindungsstellen, eine  $\kappa$ B/NF $\kappa$ B (nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells, cRel/p65) Bindungsstelle, drei Egr-1 (Early growth response factor-1) und fünf Sp1 (Sp1 I bis V) Bindungsmotive (Abbildung 2; Mackman et al., 1992). 1999 wurde von Armesilla und Kollegen eine Bindungssequenz für NFAT (nuclear factor of activated T-cells) beschrieben, die sich mit dem NF $\kappa$ B-Bindungsmotiv überlappt (Armesilla et al., 1999). Für die Basalexpression von TF ist die Besetzung von mindestens zwei Sp1-Bindungsstellen erforderlich. Außerdem sind die an AP-1 bindenden

Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos beteiligt (Mackman, 1995; Oeth et al., 1997). Für die induzierte TF-Expression ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren notwendig. Der TF-Promotorbereich kann in zwei regulative



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Promotor-Region von Tissue Factor** (modifiziert nach Eilertsen & Osterud, 2004 und Ruf & Riewald, 2009).

Regionen unterteilt werden. Dabei wird eine dieser Regionen als „Enhancer Region“ oder „auf LPS reagierende Region“ (-227 bis -172) bezeichnet. Über diese Region, welche die AP-1-, κB- und NFAT-Motive umfasst, induzieren und beeinflussen inflammatorische Mediatoren die TF-Expression. Die andere regulative Region enthält die drei Egr-1 Motive und wird als die „auf Serum reagierende Region“ (-109 bis -59) bezeichnet. Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF (vascular endothelial growth factor), beeinflussen die TF-Expression durch Interaktion mit dieser Region (Mackman, 1995; Oeth et al., 1997; Armesilla et al., 1999; Eilertsen & Osterud, 2004).

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass z.B. LPS sowohl die Enhancer-Region als auch die auf Serum reagierende Region aktiviert (Eilertsen & Osterud, 2004). Die

induzierte TF-Expression ist folglich ein komplexer Prozess, bei dem beide Regionen zusammenwirken.

TF ist ein transmembranäres Glykoprotein in der Zellmembran, welches einzelsträngig vorliegt und ein Molekulargewicht von 47kDa besitzt. Basierend auf seiner strukturellen Homologie zu den Interferon- $\gamma$ -Rezeptoren wird TF der Familie der Klasse-II Zytokinrezeptoren zugeordnet (Bazan, 1990). Das Translationsprodukt besteht zunächst aus 295 Aminosäuren. Nachdem das Signalpeptid abgespalten worden ist, erreicht das reife TF-Protein eine Länge von 263 Aminosäuren. Das TF-Protein kann in die extrazelluläre, die transmembranäre und die zytosolische Domäne unterteilt werden. Die hydrophile extrazelluläre Domäne, die sich über 219 Aminosäuren erstreckt, besitzt drei Glykosylierungsstellen und zwei Disulfidbrückenbindungen (Cys<sup>49</sup>-Cys<sup>57</sup> und Cys<sup>186</sup>-Cys<sup>209</sup>). Ferner enthält sie zwei Fibronektin Typ-III ähnliche Domänen mit  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (Banner, 1997), die im 120°-Winkel zueinander stehen. Die transmembranäre Domäne besteht aus 23 Aminosäuren und ist hydrophob. Die dann folgende zytosolische Domäne ist 21 Aminosäuren lang (Edgington et al., 1991). Die Bindungsregion für FVII umfasst große Bereiche der extrazellulären Domäne. FVII/FVIIa bindet an die  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen. Für diese Bindung sind die Aminosäuren Lysin 20, Aspartat 58 und Phenylalanin 140 essentiell (Ruf et al., 1994). Außerdem sind die Disulfidbrücken der extrazellulären Domäne an der Bindung von FVII/VIIa beteiligt (Ruf & Edgington, 1994).

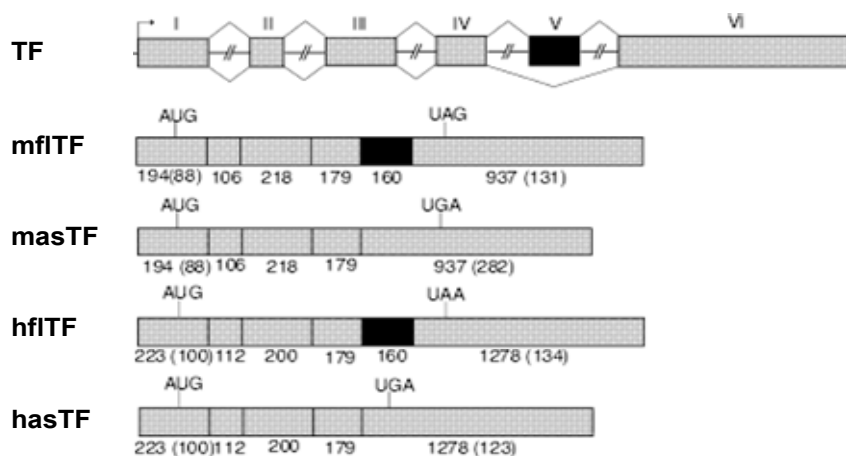
### **1.2.2. Die lösliche alternativ gespleißte Tissue Factor-Isoform (asTF)**

Neben der „full-length“ Tissue Factor-Isoform (flTF) entdeckten Bogdanov und Kollegen 2003 die alternativ gespleißte TF-Isoform (asTF) (Bogdanov et al., 2003). Diese TF-Isoform entsteht durch alternatives Spleißen, bei dem Exon 4 direkt an Exon 6 gebunden wird (Abbildung 3). Durch das alternative Spleißen kommt es zu einer Leserasterverschiebung, die bewirkt, dass die alternativ gespleißte Form einen von der flTF-Form abweichenden C-Terminus besitzt. So verfügt asTF nicht über die transmembranäre und zytosolische Domäne der flTF-Isoform (Bogdanov et al., 2006).

Die asTF-mRNA kommt in manchen Geweben, so z.B. in der Lunge zu einem höheren Anteil als die flTF-mRNA vor. Noch weitere asTF-mRNA Varianten wurden

entdeckt, die aber im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen zwei Formen (fITF und asTF) nicht translatiert werden (Chand et al., 2006).

Bei der Maus ist das TF-Gen auf Chromosom 3 lokalisiert und nur 11kbp groß, besteht aber wie beim Menschen aus 6 Exons und 5 Introns (Mackman et al., 1992). Es existieren große Ähnlichkeiten zu der Struktur des humanen TF-Gens. Ebenso wie beim Menschen gibt es auch eine alternativ gespleißte TF-Form bei der Maus (Bogdanov et al., 2006; siehe Abbildung 3).



**Abbildung 3: Schema der verschiedenen Tissue Factor mRNA-Transkripte, die in Proteine translatiert werden.** (m = murin, h = human) (Bogdanov et al., 2006)

AsTF besitzt einen von der flTF-Isoform abweichenden C-Terminus und besteht aufgrund des Fehlens von Exon 5 beim Menschen nur aus 206 Aminosäuren. Die Aminosäuren 1 bis 166 der asTF-Isoform entsprechen der Sequenz von flTF. Die Aminosäuren 167 bis 206 weichen, bedingt durch die Leserasterverschiebung, von dem C-Terminus der flTF-Isoform ab (Bogdanov et al., 2003). Dennoch besitzt die asTF-Isoform auch die für die Bindung von FVII relevanten Strukturen.

Im murinen System wurde das asTF-Protein ebenfalls nachgewiesen, jedoch besteht muriner asTF aus ähnlich vielen Aminosäuren wie muriner flTF. Im Gegensatz zu humanem asTF ist das durch das andere Leseraster entstandene neue Stop-Codon von murinem asTF erst deutlich nach dem Stop-Codon der flTF-Isoform auf der Gensequenz lokalisiert. Dennoch bestehen zwischen der humanen und der murinen asTF-Isoform große homologe Sequenzabschnitte (Bogdanov et al., 2006; Szotowski et al., 2006).

### 1.3. Signaltransduktionswege und Tissue Factor

Neben seiner zentralen Funktion bei der Hämostase übt Tissue factor (TF) und insbesondere der Komplex aus TF und FVII einen entscheidenden Einfluss auf diverse Signaltransduktionswege und zelluläre Prozesse aus.

Unabhängig von der Induktion der Blutgerinnung verändert TF in Anwesenheit von FVII die Kalziumkonzentration in Zellen (Camerer et al., 1996). Eine durch TF bedingte Aktivierung von MAP-Kinasen und die Induktion von VEGF in Fibroblasten wurde ebenfalls nachgewiesen (Poulsen et al., 1998; Ollivier et al., 1998). Die TF-abhängige Aktivierung der MAP-Kinase Erk1/2 wurde in Fibroblasten, Kreatinozyten und „Baby Hamster Kidney“ (BHK) - Zellen gemessen (Pendurthi et al., 2000; Camerer et al., 2000; Sorensen et al., 1999). Auch die Stimulierung weiterer MAP-Kinasen, wie p38 und JNK, wurde in Kreatinozyten durch den TF/FVIIa-Komplex induziert (Camerer et al., 1999). Versteeg und Kollegen zeigten außerdem, dass der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg von dem TF/FVIIa-Komplex aktiviert wird (Versteeg et al., 2000). Der TF/FVIIa-Komplex beeinflusst die Tumor-Angiogenese (Browder et al., 2000; Hembrough et al., 2003; Kasthuri et al., 2009), die Metastasierung bei verschiedenen Krebstypen (Hamada et al., 1996; Seto et al., 2000), die Migration (Marutsuka et al., 2002; Schaffner & Ruf, 2009), die Inflammation (Taylor et al., 1991), die Wundheilung (Camerer et al., 2000) und das Apoptoseverhalten (Versteeg et al., 2004a; siehe auch Kapitel 1.4).

Über welche Mechanismen die Signaltransduktion von TF erfolgt, ist nicht vollständig geklärt. Der Komplex aus TF und FVII aktiviert den Protease-aktivierten Rezeptor-2 (PAR-2) (Camerer et al., 2000; Riewald & Ruf, 2001; Rao & Pendurthi, 2005). PAR-2 gehört zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Wird PAR-2 aktiviert, so initiieren die an PAR-2 gebundenen G-Proteine ( $G_q$ ,  $G_{12}$ ,  $G_{13}$ ) intrazelluläre Signaltransduktionswege (Versteeg et al., 2006).

Ob bei der durch PAR-2 vermittelten Signaltransduktion die zytoplasmatische Domäne von TF essentiell ist, wird kontrovers diskutiert. Ahamed und Kollegen konstatierten, dass die Funktion dieser Domäne hauptsächlich in der Signalvermittlung liegt und PAR-2 die Phosphorylierung der Serine 253 und 258 des zytoplasmatischen Proteinabschnittes von TF vermittelt und dadurch einen Einfluss auf Signaltransduktionsprozesse ausübt (Ahamed et al., 2004). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die zytoplasmatische Domäne als ein negatives

Regulationselement der PAR-2 abhängigen Signaltransduktion fungiert (Belting et al., 2004).

Im Gegensatz dazu erklärten andere Forscher, dass die von dem TF/FVIIa-Komplex vermittelte Aktivierung von PAR-2 und, damit verbunden, die nachgeschaltete Initiierung von Signaltransduktionswegen unabhängig von der zytoplasmatischen TF-Domäne ist (Camerer et al., 1999; Versteeg et al., 2002; Sorensen et al., 1999). Die Induktion von VEGF, Egr-1 und IL-8 ist ein Resultat der TF/FVIIa vermittelten PAR-2 Aktivierung. Hierfür scheint der zytoplasmatische Proteinabschnitt von TF nicht relevant zu sein (Ollivier et al., 1998; Camerer et al., 1999; Hjortoe et al., 2004).

Versteeg und Ruf konnten zeigen, dass der durch den TF/FVIIa-Komplex aktivierte PAR-2 das zytoplasmatische Ende von TF phosphoryliert und dass dies einen Einfluss auf Integrine ausübt (Versteeg & Ruf, 2006; Versteeg et al., 2008). Abweichend dazu wurde auch eine von PAR-2 unabhängige Interaktion von TF mit Integrinen beschrieben (Ott et al., 1998; Fischer et al., 1999). Die Wechselwirkung von TF und Integrinen wird mit der Zellmigration und der Zellausbreitung in Tumorzellen assoziiert (Ruf & Mueller, 2006). Diese Interaktion wird als abhängig von der extrazellulären TF-Domäne und unabhängig von der transmembranären sowie intrazellulären Domäne beschrieben (Dorfleutner et al., 2004).

Viele der bisherigen Erkenntnisse basieren auf Untersuchungen der flTF-Isoform. Die durch die asTF-Isoform vermittelte Signaltransduktion ist bisher nicht erforscht. Bekannt ist hingegen, dass asTF das Wachstum und die Angiogenese in Tumorzellen fördert (Hobbs et al., 2007; Signaevsky et al., 2008; siehe auch Kapitel 1.4.). Die daran beteiligten Signaltransduktionswege müssen noch untersucht werden.

## **1.4. Apoptose im Herzen**

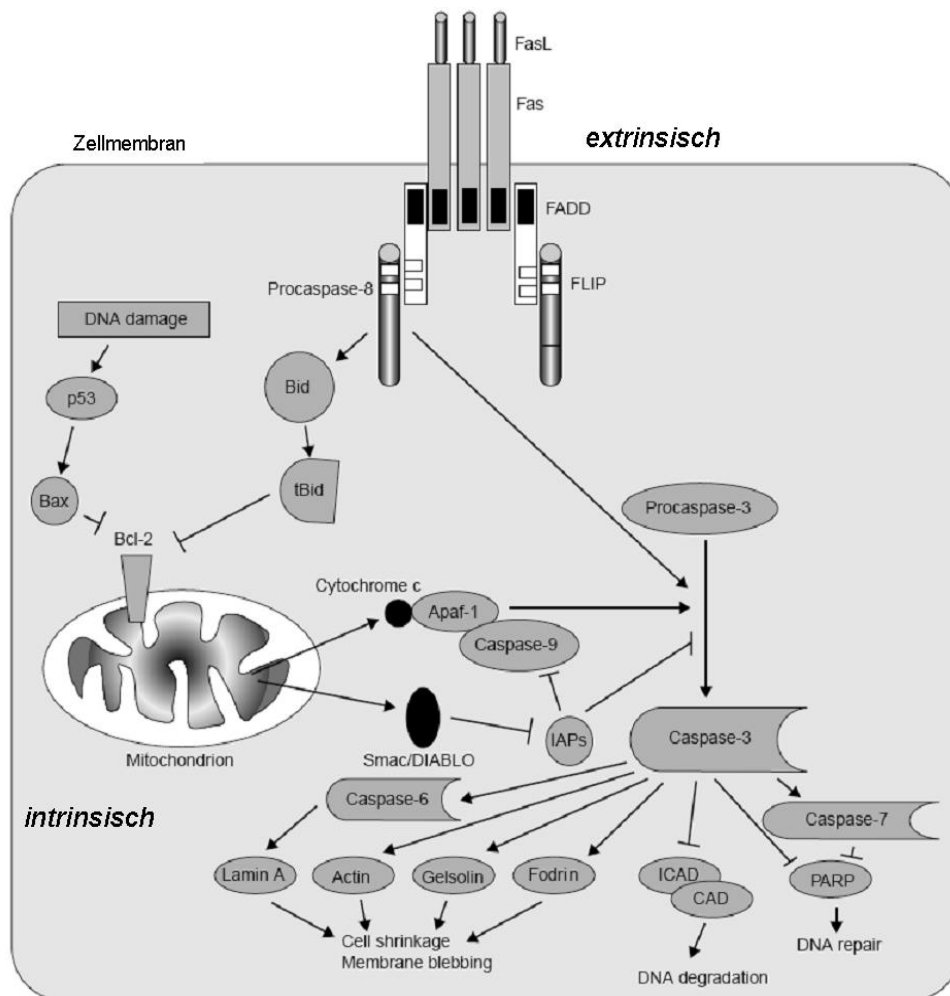
Der Begriff Apoptose bezeichnet den programmierten Tod einer Zelle. Bereits im Jahre 1972 beschrieben Kerr und Kollegen (Kerr et al., 1972) den Vorgang der Apoptose als einen streng regulierten energieabhängigen Prozess, bei dem die Zelle einem bestimmten Programm folgt (Ucker, 1991). Morphologisch charakterisiert wird die Apoptose durch das Schrumpfen der Zelle und des Zytoplasmas sowie durch die Kondensation des Chromatins. Es folgt die Fragmentierung von Nukleus und Zelle



und die Ausbildung von „apoptotic bodies“, Abschnürungen von der Zelle, die von benachbarten Zellen phagozytiert werden (Buja et al., 1993; Majno & Joris, 1995). Die Chromatin-Fragmentierung führt zu der Aktivierung und der *de novo* - Synthese von Endonukleasen (Buja & Entman, 1998). Die Endonukleasen schneiden die DNA und es entstehen 180bp bis 200bp große doppelsträngige Fragmente, die aufgetrennt im Agarosegel, das für die Apoptose typische Bild der sogenannten „DNA-Ladder“ zeigen (Peitsch et al., 1993). Der programmierte Zelltod spielt eine sehr entscheidende Rolle, sowohl bei der normalen Entwicklung als auch bei pathologischen Entwicklungen in verschiedenen Geweben. (Nagata, 1997; Jacobson et al., 1997)

Die Apoptose läuft über zwei zentrale Signaltransduktionswege ab, den extrinsischen Weg oder „death receptor pathway“ und den intrinsischen oder mitochondrialen Signalweg (Danial & Korsmeyer, 2004; Abbildung 4). An beiden Signaltransduktionswegen sind Caspasen entscheidend beteiligt. Caspasen sind eine Unterklasse der Cysteinproteasen, die alle ein aktives Zentrum mit Cystein besitzen und gegen Aspartat (Asp) gerichtet sind, beziehungsweise die Bindung Asp—XXX schneiden. (Thornberry & Lazebnik, 1998; Earnshaw et al., 1999). Sie liegen als inaktive Zymogene vor und werden enzymatisch meist durch andere im Signalweg vorgeschaltete Caspasen aktiviert (Thornberry et al., 1999). Funktionell werden sie in drei verschiedene Gruppen unterteilt: die Initiator-Caspasen (Caspase-8, -9, -10, -2), die Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) und die „Reminder“-Caspasen (Caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13), welche an der Prozessierung und Aktivierung von Zytokinen beteiligt sind (Grütter, 2000). Die Initiator-Caspasen interagieren mit Adapterproteinen, was zu einer Clusterbildung der Caspasen führt und deren Autoproteolyse erleichtert. Die Initiator-Caspasen aktivieren wiederum die Effektor-Caspasen und setzen die proteolytische Kaskade in Gang (Srinivasula et al., 2001).

Gegenspieler der Aktivierung der Caspasen und daher der Induktion der Apoptose-Signalkaskade sind die Proteine der IAP-Familie (inhibitors of apoptosis protein family). Das bekannteste Protein dieser Familie ist das XIAP (X-Chromosom gebundenes IAP), welches sowohl die Aktivierung von Initiator-Caspasen (Caspase-9) als auch die Aktivierung von Effektor-Caspasen (Caspase-3) verhindert (Srinivasula et al., 2001).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Apoptose-signaltransduktionswegs.** (Budd, 2001)

Beim extrinsischen Signalweg wird die Apoptose durch transmembranäre Rezeptoren (z.B. Apo-1/Fas, TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2) vermittelt. An diese Rezeptoren muss der jeweilige Ligand binden (z.B. Fas-L, TNF $\alpha$ , TRAIL), um den Signalweg zu induzieren (Suda et al., 1993; Pitti et al., 1996; Masters et al., 1998). Die Bindung des Liganden führt zur Ausbildung eines Clusters und letztendlich zur Formierung des DISC- („death-inducing signaling complex“) Multiproteinkomplexes (Kischkel et al., 1995; Muzio, 1998). Dieser Komplex fördert die Aktivierung von Caspase-8 und -10, wodurch Procaspase-3 geschnitten und aktiviert wird (Boatright & Salvesen, 2003). Auch auf pro-apoptisches Bid, ein Protein der Bcl-2 Proteinfamilie (siehe Tabelle 1), übt aktivierte Caspase-8 einen Einfluss aus und vernetzt somit den extrinsischen mit dem intrinsischen Signalweg (Li et al., 1998; Luo et al., 1998).

Der intrinsische Apoptoseweg, an dem die Proteine der Bcl-2 Familie entscheidend beteiligt sind, läuft über die Mitochondrien ab. Die meisten pro-apoptotischen Mitglieder dieser Familie, wie z.B. Bid und Bad, liegen in der vitalen Zelle frei im Zytosol vor und werden erst nach ihrer Aktivierung (z.B. durch DNA-Schäden) an die Mitochondrienmembran gebunden. An der Mitochondrienmembran hemmen sie die protektive Funktion der dort fortwährend verankerten anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine. Die Mitochondrienmembran wird infolgedessen permeabel für die Apoptosemediatoren Cytochrom C und smac/DIABLO (Budd, 2001). Auch eine Kalzium-Überlastung in den Mitochondrien, die durch pro-apoptotische Bcl-2 Proteine gefördert wird, führt zur Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und zur Freisetzung der Apoptosemediatoren (Pinton et al., 2008). Das freigesetzte Cytochrom C bindet an Apaf-1 und Procaspase-9. Dieser Komplex bildet das Apoptosom und resultiert in der Aktivierung von Caspase-9 (Li et al., 1997). Caspase-9 schneidet Procaspase-3, -6 und -7. Durch Bax und Bak wird die Freisetzung des mitochondrialen Proteins smac/DIABLO stimuliert, welches im Zytosol mit IAPs interagiert und deren anti-apoptotische Wirkung aufhebt (Srinivasula et al., 2001).

**Tabelle 1: Bcl-2 Proteinfamilie**

<b>Name</b>	<b>Gendomanen</b>	<b>Wirkung</b>
<b>Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1</b>	<b>BH 1-4 Domänen</b>	<b>anti-apoptotisch</b>
<b>Bad, Bid, Bik, Bmf, Bim, Hrk, Noxa, PUMA</b>	<b>nur eine BH 3 Domäne</b>	<b>pro-apoptotisch</b>
<b>Bax, Bak, Box</b>	<b>mehrere BH 3 Domänen</b>	<b>pro-apoptotisch</b>

Durch verschiedene Faktoren können die Bcl-2 Proteine beeinflusst werden. Ist z.B. der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg aktiviert, führt dies zur Phosphorylierung von Bad, welches im phosphorylierten Zustand an das zytosolische Protein 14-3-3 bindet und sich in diesem Zustand nicht an die Mitochondrienmembran anlagern kann (Datta et al., 1997; Dudek et al., 1997). Ebenfalls übt der MAP-Kinaseweg Erk1/2 einen Einfluss auf die Bcl-2 Proteine aus. Erk1/2 beeinflusst die Bindung von Bax an die Mitochondrienmembran (Zhang et al., 2003) und die Phosphorylierung von Bim (Ewings et al., 2007; Ley et al., 2003). Zudem fördern durch p53 vermittelte DNA-

Schäden die Bindung von pro-apoptotischen Proteinen an die Mitochondrienmembran (Schuler & Green, 2001).

Der extrinsische und der intrinsische Apoptoseweg vereinigen sich in der Prozessierung der Effektor-Caspasen-3, -6 und -7. Den Effektor-Caspasen folgt die Induktion der ROCK1 (Rho-assoziierte Kinase), die verantwortlich für das Schrumpfen der Zelle und die Vesikelabschnürung, das so genannte „membrane blebbing“ ist (Fackler & Grosse, 2008; Chang et al., 2006). Zudem werden Caspase-aktivierte DNAsen (CAD/ICAD bzw. DFF45) aktiv und fragmentieren die chromosomale DNA (Enari et al., 1998).

#### **1.4.1. Die Apoptose im kardiovaskulären System**

Früher wurde angenommen, dass Kardiomyozyten nur in Folge von Nekrose absterben und demzufolge zur Pathogenese von Herzkrankheiten beitragen. Seit mehr als 10 Jahren ist es bekannt, dass auch der programmierte Zelltod, die Apoptose, einen wesentlichen Anteil am Verlust von intakten Kardiomyozyten besitzt und eine wichtige Rolle bei pathologischen Veränderungen im Herzen und bei kardiovaskulären Krankheiten spielt (Umansky & Tomei, 1997; Krijnen et al., 2002). In den letzten Jahren wurden apoptotische Vorgänge bei verschiedenen Herzkrankheiten sowie nach dem Auftreten eines Myokardinfarkts als ein entscheidender Faktor identifiziert (Baldi et al., 2002; Olivetti et al., 1996). Apoptose wurde bei Hypoxie, myokardialer Hypertrophie (Narula et al., 1994) und ebenso bei Herzversagen im Endstadium nachgewiesen. Bei Herzversagen im Endstadium konnten Narula und Kollegen zeigen, dass der durch die Apoptose bedingte Verlust an Kardiomyozyten zur Ausbildung einer kardialen Dysfunktion beiträgt. Auch bei arteriosklerotischen Läsionen innerhalb des Gefäßsystems (Isner et al., 1995) sowie bei Ischämie und Reperfusion (Gottlieb & Engler, 1999) wurden apoptotische Abläufe entdeckt.

Entscheidende Erkenntnisse über die Rolle der Apoptose beim akuten Myokardinfarkt lieferte 1996 die Gruppe um Kajstura, die beschrieb, dass das geschädigte Myokardgewebe bei Ratten nach einem Koronararterienverschluss apoptotisch wird (Kajstura et al., 1996). Die Forscher maßen dreißigmal mehr Apoptose als Nekrose zu den Zeitpunkten 2 und 4,5 Stunden sowie 1 und 2 Tage

nach Intervention und verdeutlichten die Präsenz und bedeutende Rolle, die die Apoptose nach einem Myokardinfarkt spielt.

Tong und Kollegen fanden heraus, dass die Aktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges Kardiomyozyten vor Apoptose schützt, indem die Integrität der Mitochondrien bewahrt wird (Tong et al., 2000). Ferner wurde ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Akt und der Reduktion der Ausdehnung von Infarktgewebe nachgewiesen (Matsui et al., 2001). Die kardiale Überexpression von Bcl-2 führt ebenfalls zu einem geringeren Anteil an apoptotischen Herzzellen (Chen et al., 2001) und verhindert die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran, indem die Aktivierung von Bak und Bax gehemmt wird (Gustafsson & Gottlieb, 2007). Außerdem wird mittels einer Bcl-2-Hochregulation die durch p53 induzierte Apoptose blockiert (Kirshenbaum & de Moissac, 1997). Eine erhöhte Bcl-x<sub>L</sub>-Expression hemmt im Herzen die pro-apoptotische Translokation von Bax (Huang et al., 2005). Trotz dieser Erkenntnisse gibt es noch zahlreiche offene Fragen bezüglich des genauen Ablaufes der Apoptose im Herzen (Elsässer et al., 2000). Oft wird in Frage gestellt, inwieweit man apoptotische von nekrotischen Prozessen im Herzen trennen kann, ob es für die verschiedenen Arten des Zelltodes jeweils eindeutige Nachweismethoden gibt (Saraste & Pulkki, 2000; Krijnen et al., 2002, Elsässer et al., 2000) und ob die Caspase-Aktivierung für die Apoptose im Herzen die gleiche Relevanz besitzt wie in anderen Organen (Czerski & Nunez, 2004). Im adulten Herzen wurden andere apoptotische Abläufe beobachtet als im neonatalen Herzen. In neonatalen Kardiomyozyten führt die Induktion von Apoptose nicht unbedingt zum endgültigen Zelltod. Sanchis und Kollegen zeigten, dass stimulierte neonatale Kardiomyozyten trotz einer Zytochrom C - Ausschüttung nicht apoptotisch werden (Sanchis et al., 2003). Konform dazu wurden Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten und Mäusen einer Zytochrom C - Injektion gegenüber als resistent beschrieben (Potts et al., 2005).

#### **1.4.2. Die Apoptose und Tissue Factor**

Tissue Factor besitzt neben der Hämostase auch einen Einfluss auf andere zelluläre Prozesse, wie z.B. auf apoptotische Vorgänge. Bei Untersuchungen zur Lokalisierung von TF in kardialem Muskelgewebe wurde gezeigt, dass TF besonders in Actinfilament-reichen Membranarealen vorkommt (Müller et al., 1999) und mit dem

Actin-bindenden Protein 280 interagiert (Ott et al., 1998). TF ist zudem bei der Zelladhäsion und -migration wichtig und wurde in Ko-Lokalisation mit Desmin und Vinculin im Myokard detektiert (Luther et al., 2000). Desmin und Vinculin gehören zu den Strukturproteinen des Zytoskeletts, weshalb naheliegend ist, dass TF für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und Kontraktilität des Herzmuskels entscheidend ist.

Neben dieser für die Zellstruktur wichtigen Bedeutung wurde konstatiert, dass TF einen anti-apoptotischen und pro-metastatischen Einfluss auf verschiedene Tumorzelllinien ausübt. So beschrieben beispielsweise Jiang und Kollegen, dass die Bildung des Komplexes aus TF, FVIIa und FXa Apoptose in Brustkrebszellen verhindert (Jiang et al., 2006). Dies wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass die Herunterregulation von TF mittels siRNA die Apoptose in Tumorzellen fördert (Österholm et al., 2008).

Sorensen und Kollegen stellten zudem fest, dass die TF-Überexpression in BHK (Baby Hamster Kidney)- Zellen darin resultiert, dass die Zellen vor Apoptose geschützt werden. Diese Wirkung korrelierte mit der Herunterregulation von aktiver Caspase-3 sowie mit einer gesteigerten Aktivität des PI3K/Akt-Signalweges (Sorensen et al., 2003). Nicht nur Akt, sondern auch der MAP-Kinaseweg Erk1/2 wird durch den TF/FVIIa-Komplex aktiviert und trägt zum Überleben der Zellen bei (Versteeg et al., 2004a). Versteeg und Kollegen beschrieben, dass der TF/FVIIa-Komplex den G<sub>12/13</sub>-abhängigen Jak/STAT-Signalweg aktiviert, die Bcl-x<sub>L</sub>-Produktion hochreguliert und dadurch einen anti-apoptotischen Effekt erzielt (Versteeg et al., 2004b). Auch die protektive Induktion der Bcl-2-Expression in Doxorubicin-stimulierten Neuroblastomazellen wurde über den Komplex aus TF und FVII iniiert und erfolgte über den Jak/STAT-Signaltransduktionsweg (Fang et al., 2008).

Der genaue Mechanismus des durch TF vermittelten anti-apoptotischen Effektes ist unbekannt. Welche Proteindomänen von TF einen Einfluss auf die verschiedenen Signaltransduktionswege ausüben, muss noch erforscht werden. Ebenso ist es nicht geklärt, ob TF auf andere Zellen als Tumorzellen oder gentechnisch veränderte Zellen einen protektiven Einfluss ausübt. Die Funktion der asTF-Isoform ist in diesem Zusammenhang nahezu unbekannt.

## 2. Zielsetzung

Neben seiner zentralen Bedeutung bei der Hämostase besitzt Tissue Factor (TF) einen wichtigen Einfluss auf zelluläre Signaltransduktionswege. Bildet „full-length“ TF einen Komplex mit FVIIa wird neben der Blutgerinnung auch der Protease-aktivierte-Rezeptor-2 (PAR-2) aktiviert. „Full-length“ TF fördert, vermittelt durch die Aktivierung von PAR-2, die Proliferation und die Migration verschiedener Zellen.

Bei dilatativer Kardiomyopathie wurde im Herzgewebe weniger „full-length“ TF sowie weniger alternativ gespleißter TF nachgewiesen als in gesundem Herzgewebe. Daher ist zu vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen dem TF-Gehalt und der Vitalität des Herzen besteht.

Welche Funktion die alternativ gespleißte TF-Isoform in Kardiomyozyten einnimmt und ob die alternativ gespleißte Isoform eine Bedeutung für das Überleben von Kardiomyozyten besitzt, ist bisher nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit werden daher nachstehende Ziele verfolgt:

Es wird untersucht,

- welche Auswirkung, die kardiomyozytäre Überexpression von asTF auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten von Kardiomyozyten besitzt.
- welche Signaltransduktionswege durch die Überexpression von asTF aktiviert werden und über welche Mediatoren der durch asTF bedingte Einfluss vermittelt wird.
- inwiefern primäre embryonale Kardiomyozyten, welche einen kardiomyozytenspezifischen TF-Knockout aufweisen, vermehrt Zytokin-induzierte Apoptose zeigen.
- ob die asTF-Überexpression das Expressionsmuster von Angiogenese-assoziierten Proteinen verändert.

### 3. Material

#### 3.1. Chemikalien und Substanzen

Aceton	VWR (Darmstadt,D)
Acrylamid	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (München, D)
Biozym LE Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (München, D)
BrdU	BD Pharmingen (Heidelberg, D)
Camptothecin	Calbiochem (Darmstadt, D)
Claycomb-Medium	Sigma-Aldrich (München, D)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	AnaSpec (San José, CA, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (München, D)
Dithiothreitol (DTT)	Calbiochem (Darmstadt, D)
DMEM	PAA Laboratories (Pasching, A)
DMEM without L-Glutamin	PAA Laboratories (Pasching, A)
dNTP Mix	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, D)
Ethanol	VWR (Darmstadt,D)
Ethidiumbromid	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (München, D)
FACS-Flow	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
FACS-Hypochlorid	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
FACS-RINSE	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Fötale Kälberserum (FBS-Gold)	PAA Laboratories (Pasching, A)
Fibronektin	TEBU Bio (Offenbach, D)
G-418 (Geneticin®)	PAA Laboratories (Pasching, A)
Gelatine	Sigma-Aldrich (München, D)
L-Glutamin	PAA Laboratories (Pasching, A)
Glyzerin	Sigma-Aldrich (München, D)
Igepal-CA-630	Sigma-Aldrich (München, D)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (München, D)
LB Agar	Sigma-Aldrich (München, D)



---

LB Broth	Sigma-Aldrich (München, D)
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
Methanol	VWR (Darmstadt, D)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (München, D)
Norepinephrine	Sigma-Aldrich (München, D)
Oligo dT-Primer	Promega (Mannheim, D)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (München, D)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories (Pasching, A)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories (Pasching, A)
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich (München, D)
Potassiumchlorid (KCl)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (München, D)
Proteinmarker V	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, D)
Proteinase K	Roche Applied Science (Mannheim, D)
RANDOM-Primer	Promega (Mannheim, D)
Ready-Load 100 bp DNA ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ready-Load 1 Kb DNA ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)
SYBR® Green I	Invitrogen (Karlsruhe, D)
TCA	Roth (Karlsruhe, D)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
Muriner Tumor Nekrose Faktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )	PreproTec (Umkirch, D)
TrackIT 100bp ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Triciribine	Calbiochem (Darmstadt, D)
Tris	Sigma-Aldrich (München, D)
Triton X	Sigma-Aldrich (München, D)
Trypanblau	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories (Pasching, A)
Tween 20	Sigma-Aldrich (München, D)
Wasser (bidest.)	Promega (Mannheim, D)

### 3.2. Kits

Apoptose Assay (Annexin-V-FITC)	MoBiTec (Göttingen, D)
BCA Protein Assay Kit	Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA)
CFSE Cell trace Kit	Invitrogen (Karlsruhe, D)
ECL plus Detection Kit	GE Healthcare Bioscience (Little Chalfont, UK)
E.Z:N:A. Gel Extraction Kit	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, D)
High Capacity Archive Kit	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
Mycoplasma Detection Kit 1296744	Roche Applied Science (Mannheim, D)
NucleoSpin® RNA II	Macherey Nagel (Düren, D)
Omniscript cDNA	Qiagen (Hilden, D)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, D)
peqGOLD Plasmid Midi Kit (Endofree)	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, D)
QCL-1000® Chromogenic Endpoint LAL Kit	BioWhittaker Molecular Application (Rockland, ME, USA)
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen (Karlsruhe, D)

### 3.3. Puffer

#### Antikörperpuffer

1x TBS-T Puffer (s.u.), BSA 1% (w/v),  $\text{NaN}_3$  0,02% (w/v)

#### Proteinase K- Puffer

10 mM Tris-HCL, 50 mM KCl, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  % (w/v), Gelatine 0,01% (w/v), Igepal 0,45% (v/v), Tween 20 0,45% (v/v), pH=8,3

#### 1x PBS

115 mM NaCl, 27 mM KCl, 16 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH= 7,4

#### Probenpuffer (SDS-PAGE)

100 mM Tris,  $\beta$ -Mercaptoethanol 1% (v/v), Bromphenolblau, pH= 7,6

**Proteinlysepuffer**

100 mM Tris, SDS 1% (w/v), Glycerol 1% (v/v), pH= 7,6

**1x SDS PAGE Laufpuffer**

192 mM Glycin, 25 mM Tris, SDS 0,1% (w/v)

**50x TAE-(Tris-Acetat-EDTA)-Puffer**

40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH= 8,0

**10x TBS-(Tris-Borat-Natrium)-Puffer**

100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH= 7,5

**10x TBS-T-(Tris-Borat-Natrium-Tween20)-Puffer**

100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Tween 20 0,1% (v/v), pH= 7,5

**3.4. Enzyme**

AMV Reverse Transkriptase	Roche Applied Science (Mannheim, D)
<i>EcoRI</i>	Roche Applied Science (Mannheim, D)
Gentherm DNA-Polymerase	Rapidozym (Berlin, D)
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Rapidozym (Berlin, D)
RNAse (DNase-frei)	Sigma-Aldrich (München, D)
T4 DNA Ligase	ABgene (Hamburg, D)
<i>XhoI</i>	Roche Applied Science (Mannheim, D)

**3.5. Vektoren und siRNAs**

pCR4-TOPO	Invitrogen (Karlsruhe, D)
pEGFP-N1	BD Bioscience (Heidelberg, D)
Fluoreszenzmarkierte Kontroll- siRNA (non-silencing labeled control siRNA)	Quiagen (Hilden, D)
mouse Bcl2l1 - siRNA	Dharmacon (Lafayette, USA)
Nonsense- Kontroll- siRNA (siGENOME Non-Targeting siRNA)	Dharmacon (Lafayette, USA)

### 3.6. Zellen

#### HL-1-Zellen

Prof. Dr. W. C. Claycomb (Louisiana State University Medical Center, New Orleans, Louisiana, USA)

##### Komplettmedium

Claycomb-Medium, FBS Gold 10% (v/v), 2 mM L-Glutamine; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 0,03 mM Ascorbinsäure; 10 µM Norepinephrine

##### Basalmedium

Claycomb-Medium, 2 mM L-Glutamine; 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin

#### Embryonale murine Kardiomyozyten

##### Komplettmedium

DMEM, ohne L-Glutamin, FBS Gold 10% (v/v), 100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin, 0,1mmol/l BrdU BrdU

#### TOP 10 (*E. coli*)

Invitrogen (Karlsruhe, D)

##### Flüssigmedium

LB-Medium

##### LB-Agar-Platten

LB-Medium in A.dest mit 100 µg/ml Ampicillin oder 30µg/ml Kanamycin

### 3.7. Tiere

**C57-BL/6** Tierhaltung der Forschungseinrichtung für experimentelle Tiermedizin (FEM) am Campus Benjamin Franklin / Charité

**C57-BL/6** Die Tiere wurden von Professor Mackman generiert und uns  
**TFfloxed/MLC2vCre** freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Bei den transgenen Tieren wurde das Flox-Cre System verwendet. Das TF-Gen wird von zwei *loxP*-Stellen flankiert (floxed), die durch die Cre-Rekombinase erkannt werden. Cre bindet an die *loxP*- Stellen und schneidet den flankierten Gen-Abschnitt heraus. Das Ableasen des Cre-Gens wurde unter die Kontrolle des Kardiomyozyten-spezifischen Promotors MLC2v gestellt. Bei dem TF-Knockout wird weder flTF noch asTF transkribiert (Pawlinski et al., 2007).

### 3.8. Antikörper

#### Primärantikörper

Anti- Sarkomeres Myosin (MF-20)	monoklonal	Developmental Studies Hybridoma Bank, (Iowa City, Iowa, USA)
Anti-Ki-67	monoklonal	BD Bioscience (Heidelberg, D)
Anti- $\beta$ -Aktin	monoklonal	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Anti-aktive Caspase 3	polyklonal	Cell Signaling Technology (Frankfurt a. M., D)
Anti-(Maus) TF (C-Term)	polyklonal	Pineda Antikörper-Service (Berlin, D)
Anti-(Maus) TF (1-274)	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Anti-(Maus) p-Akt (473)	polyklonal	Cell Signaling Technology (Frankfurt a. M., D)
Anti-(Maus) p-Erk1/2	polyklonal	Cell Signaling Technology (Frankfurt a. M., D)
Anti-(Maus) Bcl-x	polyklonal	BD Bioscience (Heidelberg, D)
Anti-(Maus) p-Bad	polyklonal	Cell Signaling Technology (Frankfurt a. M., D)
Anti-(Maus) Bax	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Anti-(Maus) Bcl-2	polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Anti-(Maus) asTF	polyklonal	Prof. Dr. V. Bogdanov (Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA)

## Sekundärantikörper

Ziege Anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert (Klon DAK-GO1, IgG1)	DakoCytomation (Glostrup, DK)
Kaninchen Anti-Maus IgG HRP-konjugiert (Klon DAK-RA1, IgG1)	DakoCytomation (Glostrup, DK)
Ziege Anti-Maus IgG MFP488-konjugiert (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)
Ziege Anti-Kaninchen IgG MFP488-konjugiert (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)
Ziege Anti-Maus IgG MFP555-konjugiert (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)
Ziege Anti-Kaninchen IgG MFP555-konjugiert (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)

### 3.9. Primer und Bedingungen für die Polymerasekettenreaktion

Alle Primer wurden von der Firma TIB-Molbiol GmbH (Berlin, D) oder der Firma Invitrogen (Karlsruhe, D) synthetisiert. Mit Hilfe der BLAST-Software ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) wurden sie auf die Amplifikation von unerwünschten Fragmenten hin überprüft.

In den nachfolgenden Tabellen sind die sequenzspezifischen Primerpaare für die Semiquantitative PCR (Tabelle 2), für die Klonierung (Tabelle 3) für die SYBRGreen TagMan® PCR (Tabelle 4), die vorgefertigten Assays für die TagMan® PCR (Tabelle 5) und des selbst erstellten asTF-Assays (Tabelle 6) aufgelistet.

Tabelle 2: Oligonukleotide für die semiquantitative PCR

Zielgen Fragmentlänge	Forwärtsprimer (5'→ 3')	Rückwärtsprimer (5'→ 3')	Tm (°C)
Bax 470bp	ATCGAGCAGGGAGGATGGCT	CTTCCAGATGGTGAGCGAGG	52
Bcl-2 331bp	GTCGCTACCGTCGTGACTTC	AC AGC CAG GAG AAA TCA AAC	52
Bcl-x Bcl-xL: 517bp Bcl-xS: 328bp	ACAGCAGCAGTTTGGATGC	ACTGACCGTCCACTCACCTC	52
Bad 495bp	GAGGAAGTCCGATCCCGGAA	CG GCG CTT TGT CGC ATC TGT	52
β-Aktin 450bp	AGG GAA ATC GTG CGT GAC AT	TG TCC ACC TTC CAG CAG ATG	52
Caspase-3 502bp	ATGGGAGCAAGTCAGTGGAC	ACCGGTATCTTCTGGCAAGCC	52
TF flTF: 578bp asTF: 418bp	CAAGTGCTTCTCGACCACAGACACC	AGA TGG TGG CCA GGA GCA	52
Cre 570bp	GACGGAAATCCATCGCTCGACCAG	GACATGTTCAGGGATCGCCAGGCG	60
Flox WT: 559bp TF-ko: 611bp	ATGAGGAGCTGTGTTAAAGGG TCGCAGA	TGCAGTAAATGCACGTGTCTGCCAT	58

Tabelle 3: Oligonukleotide für die Klonierung von murinen asTF in Expressionsvektoren

Name	Sequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
TF <sub>ganz</sub> -For	CCC TTG GAC ATG GCG ATC CTC	62
TF <sub>ganz</sub> -Rev	CTA ACG TGA CAA ATG CTA GTG TTG GAA TC	62
N1 <sub>XhoI</sub> -For	CCC CTC GAG GAC ATG GCG ATC CTC GTG	74
N1 <sub>EcoRI</sub> -Rev	TA AAA GAA TTC AGC GG AAG CGT TAG CTG GAG TAA CAG GCC	74

Tabelle 4: Oligonukleotide zur Quantifizierung von murinen Genen mittels SYBR® Green I  
TaqMan® PCR

Zielgen	Forwärtsprimer (5' → 3')	Rückwärtsprimer (5' → 3')
Nkx2.5	CAGTGGAGCTGGACAAAGCC	TAGCGACGGTTCTGGAACCA
GATA-4	GGG CCA ACC CTG GAA GAC	GCC CCA CAA TTG ACA CAC TCT
αMHC	TCA TTC CCA ACG AGC GAA A	GCC GGA AGT CCC CAT AGA GA
fITF	GGA AAG GCT CAA GCA CAG GAA A	CAG GAA ACT CTT CCA TTG CTC TGT G
asTF (Exon 4- 6 übergreifend)	GCA CGG GAA AGA AAC ACT CAT CAT TG	CTC CGC AAC AGT GCC GTG CAG GCA G
GAPDH	CCTGCACCACCAACTGCTTA	TCATGAGC CCTTCCACAATG

Tabelle 5: TaqMan® Assays für murine Zellen

Zielgen	Bestellnummer bei Applied Biosystems (Darmstadt, D)
18S-rRNA	Hs99999901_s1
GAPDH	Mm99999915_g1
fITF	Mm00438856_m1
TF (fITF und asTF)	Mm00438855_m1
Akt-1	Mm00437443_m1
Bax	Mm00432050_m1
Bcl-2	Mm00477631_m1
Bcl-xL	Mm00437783_m1
VEGFa	Mm01281447_m1
Cyr61	Mm00487498_m1
FGF2	Mm00433287_m1



Tabelle 6: asTF-Primer und asTF-Sonde für die TaqMan® PCR

Name	Sequenz (5' → 3')
masTF <sub>TAQ</sub> -Vorwärtsprimer	CTT ATC GGA AAG GCT CAA GCA
masTF <sub>TAQ</sub> -Rückwärtsprimer	GGA CAG GAG GAT GAT AAA GAT GGT
masTF <sub>TAQ</sub> -Sonde (6-FAM markiert) (Exon 4-6 übergreifend)	AAA GAA ACA CTC ATC ATT G

### 3.10. Geräte

ABI 7900 Sequence Detection System	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Binokular	Vision Engineering (Emmering, D)
BioDoc Analyze	Biometra (Göttingen, D)
CO <sub>2</sub> -Inkubator C200	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH (Göttingen, D)
Durchlichtmikroskop DMIL	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D)
Durchflusszytometer FACScan™	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Fastblot B44	Biometra (Göttingen, D)
Fluoreszenzmikroskop DMI 4000B	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D)
Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Mini SUBCELL GT	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	Kisker (Steinfurt, D)
PowerPac 1000	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Sterilbank	Gelaire Flow Laboratories (Melbourne, AU)
Thermozykler: Peltier Thermal Cyclers PTC-200	MJ Research Inc. (South San Francisco, CA, USA)
Versamax Microplate Reader	Molecular Devices GmbH (Ismaning, D)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, D)
Zentrifuge: Centrifuge 5415R	Eppendorf AG (Wessling-Berzdorf, D)
Zentrifuge: Laborfuge 400R	Heraeus Holding GmbH (Hanau, D)

### 3.11. Sonstige Materialien

Culture Slides™

Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)

Hybond-P PVDF-Membran

GE Healthcare Bioscience  
(Little Chalfont, UK)

Hyperfilm ECL

GE Healthcare Bioscience  
(Little Chalfont, UK)

## 4. Methoden

### 4.1. Versuchsaufbau

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellkulturexperimente an murinen immortalisierten Kardiomyozyten, den HL-1 Zellen und an primären murinen embryonalen Kardiomyozyten durchgeführt.

Zunächst wurde ein asTF-Expressionsplasmid generiert. HL-1 Zellen wurden stabil mit dem asTF-Plasmid transfiziert und anschließend in Hinblick auf ihr Proliferations- und Apoptoseverhalten charakterisiert. Der Ablauf der anhand der überexprimierenden HL-1 Zellen durchgeführten Untersuchungen ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Die dabei angewandten Methoden werden in den folgenden Abschnitten ausführlich beschrieben.

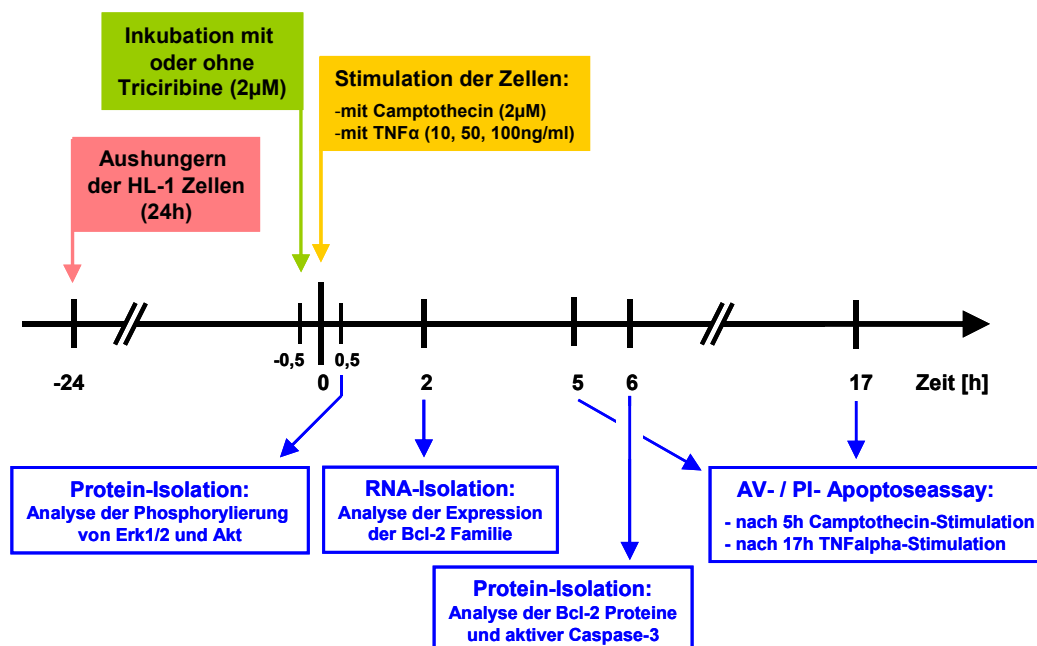
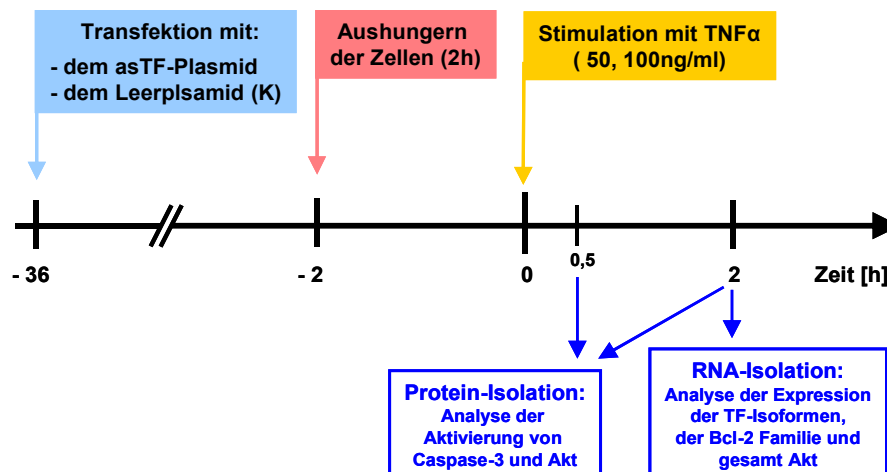


Abbildung 5: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Bedeutung von asTF in HL-1 Zellen.

Des Weiteren erfolgten Experimente an primären Zellen. Embryonale murine Kardiomyozyten wurden isoliert und mit dem asTF-Expressionsplasmid transient transfiziert. Anschließend wurde das Verhalten der Zellen bei Induktion von Apoptose analysiert. Der bei den Untersuchungen zu Grunde liegende Versuchsaufbau ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6: Versuchsaufbau zur Untersuchung der Bedeutung von asTF in embryonalen Kardiomyozyten.**

Der Einfluss von TF auf zelluläre Prozesse wurde zudem an isolierten primären Kardiomyozyten aus transgenen Mäusen untersucht, die einen herzspezifischen TF-Knockout besitzen.

## 4.2. Zellkulturexperimente

### 4.2.1. Zellkultur mit HL-1 Zellen

HL-1 Zellen sind murine immortalisierte Kardiomyozyten. Sie wurden aus der AT-1 Zelllinie entwickelt, die einem Atriumtumor einer transgenen Maus (C57-BL/6J Hintergrund) entstammt (Steinhilber et al., 1990; Delcarpio et al., 1991; Claycomb et al., 1998). Die HL-1 Zelllinie zeichnet sich durch diverse kardiomyozytenspezifische Charakteristika aus (Abbildung 7) (Claycomb et al., 1998; White et al., 2004;). Die Zellen, die adulten Kardiomyozyten auch phänotypisch sehr ähnlich sind, wurden von Doktor W. C. Claycomb (Louisiana State University, Medical Center, New Orleans, Louisiana, USA) für die Versuche zur Verfügung gestellt.

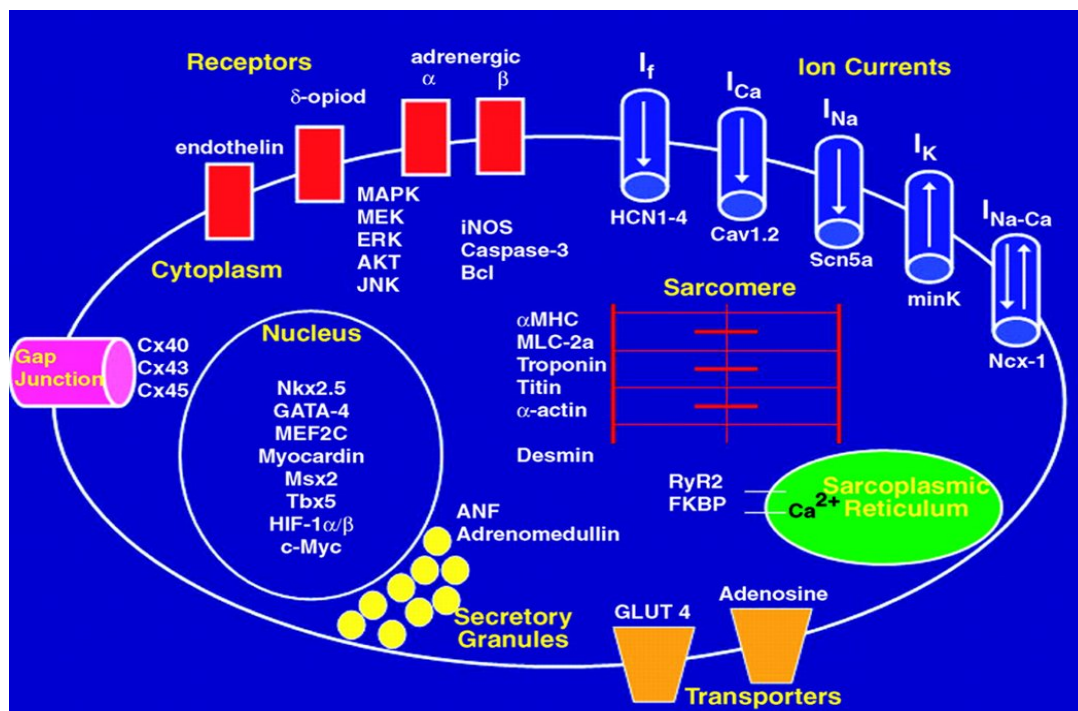


Abbildung 7: Schematische Darstellung der charakteristischen Eigenschaften der murinen immortalisierten HL-1 Kardiomyozyten (White et al., 2004).

#### Kultivierung:

Die HL-1 Kardiomyozyten sind adhärenente Zellen mit einem polygonalen Habitus. Sie wurden in zuvor mit Fibronectin-Gelatine-Lösung (5 mg/L Fibronectin, 0,02% (w/v) Gelatine) beschichteten Zellkulturflaschen unter Zellkulturbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 98% relative Luftfeuchtigkeit) gehalten. Zur Kultivierung der Zellen wurde

Claycomb-Komplettmedium (siehe 3.6.) verwendet, welches alle 2-3 Tage gewechselt wurde. Wenn die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden sie durch die Zugabe von PBS gewaschen und im Anschluss mit warmer Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)-Lösung überschichtet und für 5 bis 8min in den Zellinkubator gestellt. Die Serinproteaseaktivität des Trypsins und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug durch das EDTA führen dazu, dass sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen und abgerundet in Suspension vorliegen. Nachdem die Trypsinaktivität mit der Zugabe von FBS-haltigem Medium inhibiert wurde, konnten die Zellen abzentrifugiert werden (300xg, 10min). Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in einer Dichte von ca.  $3 \times 10^4$  Zellen/  $\text{cm}^2$  ausgesät. Stets wurde darauf geachtet, dass sich die HL-1 Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

#### Einfrieren & Auftauen:

Zum Einfrieren der HL-1 Zellen wurde, wie im Abschnitt zuvor beschrieben, das hergestellte Zellpellet in kaltem Einfriermedium (95% FBS, 5% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Zur Abkühlung auf  $-80^\circ\text{C}$  wurden die Kryoröhrchen über Nacht in das Isopropanol enthaltende Einfriergefäß „Mr. Frosty“ gestellt und in den  $-80^\circ\text{C}$  Gefrierschrank gelegt. Dadurch ist ein langsames Einfrieren mit einer Geschwindigkeit von  $1^\circ\text{C}$  pro Minute gewährleistet. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff ( $-196^\circ\text{C}$ ) umgelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen kurz im  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad angetaut und die Zellsuspension wurde in ein Röhrchen mit 10ml PBS überführt und zentrifugiert (300xg, 10min). Das Zellpellet wurde in frischem Claycomb-Komplettmedium aufgenommen, resuspendiert und in eine mit Fibronectin-Gelantine-Lösung beschichtete Zellkulturflasche pipettiert.

#### **4.2.2. Zellkultur mit primären Zellen**

##### Isolation von murinen embryonalen Kardiomyozyten

Es wurden Embryos im Alter zwischen E13.5 bis E14.5 verwendet. Die tragende Mäuse wurden durch Genickbruch getötet, auf den Rücken gelegt und mit 70%igem Ethanol benetzt. Mit einer Pinzette wurde die Haut über dem unteren Bauchraum angehoben und mit einer Schere durchtrennt. Der untere Bauchraum wurde

freigelegt und der Uterus entnommen. Die einzelnen Embryos wurden abgetrennt und in einer Petrischale mit kaltem PBS auf Eis gelagert. Die Präparation der Embryos erfolgte unter dem Binokular in einer mit eiskaltem PBS gefüllten Petrischale.

Mit einer feinen Pinzette wurden Fruchtblase und Plazenta abgetrennt und aus der Schale entfernt. Anschließend wurde der Embryo mit einem Skalpell dekapitiert, das Herz wurde entnommen und in ein mit 30µl Trypsin/EDTA-Lösung gefülltes 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Herz muss vollständig mit der Lösung bedeckt sein. Der Verdau des Herzens lief über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Zum weiteren Verdau wurden die Gefäße mit den Herzen am nächsten Tag 15min bei 37°C inkubiert. Direkt im Anschluss wurde 1ml DMEM (ohne L-Glutamin, mit 10% FBS, mit 1% Penicillin/Streptomycin) zu jedem Herzen gegeben. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Herzzellen weiter vereinzelt. Die Herzzell-Suspension wurde vereinigt und in eine T75-Flasche pipettiert. Nach einer Stunde unter Kulturbedingungen werden die Fibroblasten adhärent. Der die Kardiomyozyten enthaltende Überstand wurde abgenommen und in eine zuvor mit Fibronektin-Gelatine-Lösung beschichtete 12er-Lochplatte gegeben. Dabei wurde pro Loch etwas mehr als ein verdautes Herz ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 16h. Danach wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt. Am dritten Tag nach Aussaat der Zellen wurde das Kulturmedium mit 0,1mmol/l BrdU versetzt.

Bei den TF Knockout-Tieren wurden die Embryos einzeln in kleinen Petrischalen präpariert, um eine Kontamination mit fremdem Gewebe auszuschließen. Parallel zum weiteren Vorgehen wurde der Genotyp jedes Embryos bestimmt (siehe 4.3.9.). Im späteren Verlauf wurden nur die Zellen bzw. verdauten Herzen vereinigt, die den Knockout besaßen. Genotypisch nicht passende Embryos wurden ebenfalls vereinigt und als Kontrollen verwendet.

#### **4.2.3. Vitalitätstest und Kontaminationsanalyse**

Zur Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde zunächst eine wie unter Punkt 4.2.1. beschriebene Zellsuspension erzeugt. Der Suspension wurde das 4-fache Volumen an Trypanblau-Lösung hinzugegeben. In einer Neubauer-Zählkammer konnte anschließend unter dem Lichtmikroskop der Prozentsatz toter Zellen bestimmt werden. Trypanblau färbt nur tote Zellen an, da der Farbstoff nicht durch die intakte

Zellmembrane lebender Zellen aufgenommen werden kann. Dies ermöglicht die Differenzierung zwischen lebenden Zellen und toten Zellen.

Zum Ausschluss einer Kontamination wurden regelmäßig Tests zum Nachweis von Endotoxinen sowie zum Nachweis von Mykoplasmen durchgeführt. Eine Endotoxinverunreinigung der Zellen und Zellmedien wurde anhand des Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests ausgeschlossen. Die Quantifizierung erfolgte mit dem QCL-1000®Test entsprechend den Angaben des Herstellers.

Zudem konnte die Kontamination der Zellen mit Mykoplasmen mittels eines Mykoplasma-Detection Kits, der per ELISA erfolgte ausgeschlossen werden. Der Test wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### **4.2.4. Stimulation von Zellen**

Zur erfolgreichen Stimulation der Zellen, wurden diese zunächst bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen durch die Zugabe von PBS gewaschen und mit Basalmedium (Kulturmedium ohne FBS und Norepinephrine) überschichtet. Der Serumentzug erfolgte über einen Zeitraum von 24h. Das Basalmedium wurde abgenommen und gegen DMEM ausgetauscht, in dem zuvor das Stimulans angesetzt wurde. Die Stimulation wurde unter Zellkulturbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 98% relative Luftfeuchtigkeit) über den im Ergebnissteil angegebenen Zeitraum durchgeführt. Bei Inhibitionsversuchen wurde der Inhibitor 30min vor der Stimulation auf die Zellen gegeben.

Bei primären embryonalen murinen Kardiomyozyten wurde sowohl der Zeitraum, über den der Serumentzug erfolgte, als auch der Stimulationszeitraum gekürzt. Das Aushungern sowie die Stimulation erfolgten nur über 2h.

Im Anschluss an die Stimulation wurden alle Zellen mit PBS gewaschen und lysiert (zur RNA-Gewinnung siehe 4.3.1. oder Proteingewinnung siehe 4.4.1.) oder durch Inkubation in Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und zur Messung im Durchflusszytometer, wie unter Punkt 4.5. beschrieben weiter behandelt.



## 4.3. Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1. Extraktion und Quantifizierung von RNA

Zur Isolation von RNA aus Zellen wurde das RNA-Isolations-Kit NucleoSpin® RNAII von Macherey Nagel verwendet. Die Aufreinigung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Zunächst wurden die Zellen lysiert und darauf folgend wurde das Lysat in einer QIASHredder-Säule homogenisiert. Durch einen speziellen Puffer, der stark denaturierende Eigenschaften aufweist und Guanidinisothiocyanat-haltig ist, konnte eine RNase-Aktivität ausgeschlossen werden. Nach der Fällung der RNA durch Ethanol wurde die RNA an eine Silicagelmembran gebunden, DNA und Proteine wurden mit Waschpuffer ausgewaschen. Zusätzlich erfolgte ein DNA-Verdau mit DNase über 15min.

Die aufgereinigte RNA wurde abschließend mit 30µl Nuklease-freiem Wasser von der Silicagelmembran eluiert und eingefroren (-80°C) bzw. direkt weiterverarbeitet.

Die Quantifizierung der isolierten RNA-Konzentration erfolgte photometrisch am Nanodrop® bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260\text{nm}$ . Als Maß für die Reinheit der RNA wurde der Absorptionsquotient  $A_{260} / A_{280}$  (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Der Quotient sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen. Wenn die Probe mit Proteinen oder Salzrückständen verunreinigt ist, weist sie einen kleineren Quotienten auf. In dieser Arbeit wurden nur Proben verwendet, die einen Quotienten aufwiesen, der größer als 1,6 war.

### 4.3.2. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese dient dazu, die instabile mRNA in stabile und abbauresistentere cDNA umzuschreiben, welche als Template für die Amplifikation mittels der PCR dient. Dazu wurde die wie unter Punkt 4.3.1. beschrieben isolierte und quantifizierte RNA zunächst 5min lang bei 65°C denaturiert, um die Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurde die RNA auf Eis gelagert. Die reverse Transkription erfolgte mit dem Omniscript-cDNA-Synthesis Kit oder dem AMV-Kit nach Protokoll der Hersteller.

Als Primer dienten RANDOM-Primer sowie Oligo(dT)-Primer, die im Bereich des Poly(A)-Schwanzes mit der eukaryotischen mRNA hybridieren. Grundsätzlich wurde 1µg RNA umgeschrieben, die hergestellte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

## Reaktionsansatz Omniscript:

Reaktionspuffer (10x)	2µl
dNTP-Mix (je 5mM)	2µl
Oligo(dT)-Primer (10µM) oder RANDOM-Primer	2µl
RNAse Inhibitor (10U/µl)	1µl
Omniscrypt Reverse Transkriptase	1µl
<b>+ 1 µg RNA</b>	
ddH <sub>2</sub> O	ad 20µl

Der Reaktionsansatz wurde für 1h in den PCR-Thermozykler gestellt. Die Transkription erfolgte bei einer Temperatur von 37°C. Im Anschluss wurde die cDNA eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

## Reaktionsansatz AMV:

Reaktionspuffer (5x)	4µl
dNTP-Mix (je 10mM)	2µl
Oligo(dT)-Primer (10µM) oder RANDOM-Primer	1µl
RNAse Inhibitor (10U/µl)	1µl
AMV Reverse Transkriptase	0,8µl
<b>+ 1 µg RNA</b>	
ddH <sub>2</sub> O	ad 20µl

Der Reaktionsansatz wurde in den PCR-Thermozykler gestellt. Folgendes Programm wurde eingestellt: 25°C für 10min, 42°C für 1h, 99°C für 5min.

Im Anschluss wurde die cDNA eingefroren oder direkt weiter verarbeitet.

**4.3.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mullis und Kollegen etablierten 1986 eine Methode, mit der es möglich ist, spezifische Nukleinsäuresequenzen *in vitro* zu vervielfältigen, die Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis et al., 1986). Bei der PCR dient doppelsträngige DNA als Vorlage.

Die Reaktion erfolgt in drei Schritten, der Denaturierung, dem Annealing und der Amplifikation. Im ersten Schritt wird die DNA bei 94°C denaturiert, der Doppelstrang wird getrennt. Beim nächsten Schritt binden die Primer bei einer für sie optimalen Schmelztemperatur an den komplementären Strang. Die thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase bindet an die DNA und synthetisiert, beginnend bei den Primern, einen neuen DNA-Strang durch den Einbau von freien dNTPs: die DNA wird amplifiziert. Nach diesem Schritt beginnt der Temperaturzyklus von vorn, wodurch in 30 Zyklen die Synthese von  $10^9$  Strängen möglich wird.

#### 4.3.3.1. Semiquantitative PCR

Bei der semiquantitativen PCR wird eine definierte Anzahl an Reaktionszyklen durchlaufen. Im Anschluss daran wird die Probe im Agarosegel aufgetragen. Unterschiede bei Quantität der Amplifikation, welche auf unterschiedliche Ausgangsmengen schließen lassen, sind nur relativ ungenau zu bestimmen, da es sich um eine Endpunktmessung handelt.

Zwei verschiedene Polymerasen wurden in dieser Arbeit verwendet, die GenTherm-Polymerase und die „Proofreading“-Polymerase. Letztere wurde immer dann eingesetzt, wenn das Amplifikat für Klonierungsexperimente verwendet wurde, da sie im Gegensatz zur GenTherm-Polymerase deutlich weniger Fehlbasenpaarungen einbaut da sie eine 3'→5' Exonuklease Korrekturlese-Aktivität besitzt.

#### Reaktionsansatz GenTherm-Polymerase:

Reaktionspuffer (10x)	2µl
inklusive 5mM MgCl <sub>2</sub>	
GenTherm DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2µl
dNTP-Mix (je 10mM)	2µl
Vorwärts-Primer (10µM)	1µl
Rückwärts-Primer (10µM)	1µl
<b>cDNA-Template (ca. 100ng)</b>	
ddH <sub>2</sub> O	ad 20µl

Die Messung erfolgte im Thermozykler mit folgendem Programm: 2min 95°C, 30sec 95°C, 25sec AT\*, 2min 72°C, Zyklen je nach untersuchtem Gen (siehe Ergebnisteil).

Reaktionsansatz *PFU* (Proofreading)-Polymerase:

Reaktionspuffer (10x)	5µl
dNTP-Mix (je 10mM)	1µl
Vorwärts-Primer (10µM)	2µl
Rückwärts-Primer (10µM)	2µl
Band doctor	10µl
<i>PFU</i> -Polymerase (2,5U/µl)	0,5µl
<b>cDNA-Template (ca. 100ng)</b>	
ddH <sub>2</sub> O	ad 50µl

Die Reaktion erfolgte im Thermozykler mit folgendem Programm: 2min 95°C, 30sec 95°C, 25sec Anneling-Temperaturen, 2min 72°C, Zyklen je nach untersuchtem Gen (siehe Ergebnisteil), anschließend 7min 72°C.

Die eingesetzten Primer sowie die jeweiligen Anneling-Temperaturen sind aus der Tabelle unter Punkt 3.9. ersichtlich.

**4.3.3.2. Kolonie-PCR**

Bei der Kolonie-PCR dient Bakterien-DNA als Template. In den Reaktionsansatz (siehe 4.3.3.1.) wurden 2µl der Bakteriensuspension gegeben bzw. eine Bakterienkolonie wurde von einer Platte in den Ansatz überführt. Mit der zuvor verwendeten Bakterien tragenden Pipettenspitze wurde eine neue Kolonie auf einer LB-Platte (inkl. Selektionsantibiotikum) angeimpft. So wurde gewährleistet, dass nur Klone mit dem gewünschten Insert weiter kultiviert werden konnten.

**4.3.4. Auftrennung von DNA-Amplifikaten mittels Gelelektrophorese**

In dieser Arbeit wurden 1,5%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach kurzer Abkühlung mit Ethidiumbromid (0,2µg/ml Gel) versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die Auftrennung erfolgte in einer horizontalen Gelkammer bei einer Spannung von ca. 60V. Zur Charakterisierung der DNA-Fragmente wurde stets ein Marker (TrackIt 100bp DNA ladder) aufgetragen. Durch das Ethidiumbromid waren die aufgetrennten Fragmente auf einem Durchlichtschirm mit ultraviolettem Licht sichtbar.

#### 4.3.5. DNA-Extraktion aus dem Agarosegel

DNA-Amplifikate, die, wie unter Punkt 4.3.4. beschrieben, im Agarosegel aufgetrennt wurden, können aus dem Gel extrahiert werden. Dazu wird das Gel auf einen UV-Durchlichtschirm gelegt und die DNA-Bande der richtigen Größe mit einem Skalpell ausgeschnitten.

In dieser Arbeit wurde das E.Z.N.A. Gel Extraction Kit verwendet. Die Aufarbeitung der ausgeschnittenen Banden erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Nanodrop® bestimmt.

#### 4.3.6. Klonierung von DNA-Fragmenten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Plasmid konstruiert, in welches die rekombinante DNA von der alternativ gespleißten TF Isoform eingebaut wurde.

Im Folgenden ist der grobe Ablauf der Plasmid-Generierung beschrieben, die einzelnen Schritte werden dann in den Unterpunkten genauer erläutert.

##### Generierung von asTF-pEGFP-N1:

Um die komplette asTF-Sequenz zu erhalten, wurde eine semiquantitative GenTherm-PCR (siehe 4.3.3.1.) mit cDNA aus HL-1 Zellen durchgeführt. Als Primer wurden TF<sub>ganz</sub>-For und TF<sub>ganz</sub>-Rev (siehe 3.9. Tabelle 3) eingesetzt, die die komplette kodierende Sequenz von TF umspannen. Die Amplifikate wurden in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt (siehe 4.3.4.). Die asTF-Bande wurde ausgeschnitten und die DNA wurde extrahiert (siehe 4.3.5.). Mittels des TOPO TA Cloning® Kits wurde die DNA zunächst in den Vektor pCR®4-TOPO ligiert (siehe 4.3.6.2.), der dann mittels Hitzeschock (siehe 4.3.6.3.) in *E.coli*-TOP10-Zellen eingebracht wurde. Die Bakterien wurden auf LB-Platten (mit Selektionsantibiotika: 30 µg/ml Kanamycin) ausplattiert. Am nächsten Tag wurde mit den Kolonien eine Kolonie-PCR (siehe 4.3.3.2.) durchgeführt, um zu überprüfen, welche der Kolonien das gewünschte Plasmid mit der asTF-Sequenz enthalten. Diese Kolonien wurden weiter kultiviert, das Plasmid wurde isoliert (siehe 4.3.6.5.) und zum Sequenzieren zur Firma GATC Biotech geschickt. Nachdem die korrekte asTF-Sequenz im Plasmid nachgewiesen worden war, wurden Primer generiert, die die asTF-Sequenz flankieren und zudem Restriktionsenzymchnittstellen (Vorwärts-Primer mit XhoI-Schnittstelle, Rückwärts-Primer mit EcoRI-Schnittstelle) und die Kodaksequenz enthalten. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass es keine Leserasterverschiebung gab. Mit diesen Primern (N1<sub>XhoI</sub>-For und N1<sub>EcoRI</sub>-Rev, siehe 3.9. Tabelle 3) wurde zunächst eine GenTherm-

PCR durchgeführt, bei der mit Hilfe eines Temperaturgradienten im Annealing-Schritt die optimale Schmelztemperatur  $T_m$  für die Primer bestimmt wurde. Anschließend wurde die PCR mit der PFU-Polymerase (siehe 4.3.3.1.) und optimaler  $T_m$  wiederholt. Das Produkt wurde im Agarosegel aufgetragen, die Bande ausgeschnitten und extrahiert. Danach wurde die extrahierte DNA sowie der Plasmidvektor pEGFP-N1 (Abbildung 8) mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI geschnitten (siehe 4.3.6.1.). Durch die Behandlung mit zwei verschiedenen Enzymen wurde gewährleistet, dass das Fragment in der richtigen Richtung in das Plasmid eingebaut wurde. Die nachfolgende Ligation wurde mit T4-Ligase durchgeführt (siehe 4.3.6.2.), die Transfektion in *E.coli*-TOP10 erfolgte mittels Hitzeschock. Die transfizierten Bakterien

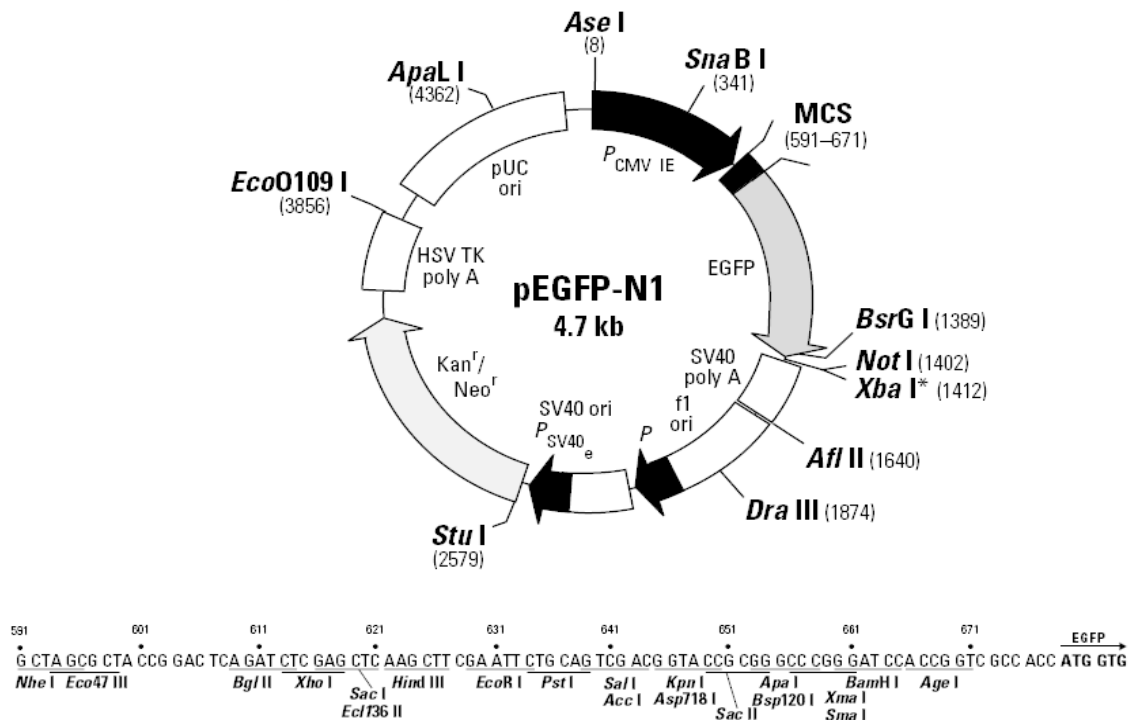


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Plasmidvektors pEGFP-N1

wurden auf einer LB-Platte mit Selektionsantibiotikum (30µg/ml Kanamycin) ausgestrichen. Am nächsten Tag wurde mit den Kolonien eine Kolonie-PCR durchgeführt, um das Vorhandensein der asTF-Sequenz zu überprüfen. Die Kolonien mit der Sequenz wurden in 5ml LB-Flüssigmedium gezüchtet, die Plasmide isoliert (siehe 4.3.6.5.) und zum Sequenzieren zu der Firma GATC Biotech geschickt. Die Bakterien mit dem Plasmid und der fehlerlosen Sequenz wurden im großen Ansatz angezüchtet (100ml-Kultur) (siehe 4.3.6.5.). Das asTF-pEGFP-N1 Plasmid wurde

isoliert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Als Kontrollvektor für nachfolgende Versuche wurde ein leeres N1-pEGFP-Plasmid in Bakterien transfiziert, gezüchtet und isoliert.

#### 4.3.6.1. Restriktion

Um DNA zu schneiden, setzt man Restriktionsendonukleasen ein. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA-spezifisch an meist pallindromen Sequenzen schneiden. Sie schneiden entweder versetzt, so dass überhängende Enden entstehen oder gerade, so dass glatte DNA-Enden entstehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Restriktionsendonukleasen benutzt:



Die zu schneidende DNA wurde mit  $2,5\mu\text{l}$  Puffer H (10-fach) und je 1unit Restriktionsenzym pro  $\mu\text{g}$  DNA, mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Volumen von  $25\mu\text{l}$  aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1h lang bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme nach Herstellerangaben inaktiviert.

#### 4.3.6.2. Ligation

##### Ligation ohne Ligase:

Bei der Ligation ohne Ligase wurde das TOPO TA Cloning® Kit angewandt. Der in diesem Kit verwendete linearisierte Plasmidvektor pCR®4-TOPO verfügt über Thymidin-Überhänge am 5'-Ende. Ferner ist er konvalent an Topoisomerase I gebunden. Da viele *Taq*-Polymerasen Desoxyadenosine an das 3'-End anhängen, ist es der Topoisomerase I möglich, die Ligation der beiden Enden ohne Ligase vorzunehmen.

Es wurde folgender Ansatz verwendet:  $4\mu\text{l}$  PCR-Produkt,  $1\mu\text{l}$  Reaktionspuffer und  $1\mu\text{l}$  pCR®4-TOPO Vektor. Der Ansatz wurde 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Transformation (siehe 4.3.6.3.)

##### Ligation mit T4-Ligase:

In dieser Arbeit wurde T4-Ligase verwendet, um das wie zuvor beschrieben isolierte asTF-Fragment in den Vektor pEGFP-N1 einzubauen. Die asTF-DNA sowie die

Vektor-DNA wurden mit Restriktionsenzymen geschnitten (siehe 4.3.6.1.). Gleiche Mengen an asTF-Fragment und Vektor wurden anschließend zusammengegeben (je 15µl) mit 10µl 5-fach Ligasepuffer, 1µl T4-Ligase und 9µl H<sub>2</sub>O versetzt (50µl Ansatz) und zunächst 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ligationsansatz 16h bei 4°C in den Kühlschrank gestellt. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Vektor in Bakterien transformiert (siehe 4.3.6.3.).

#### **4.3.6.3. Transformation**

Für den Versuch wurden zunächst LB-Agaroseplatten mit 100µl/ml Ampicillin vorbereitet (siehe 3.6.).

Die Transformation von Plasmiden in *E.coli* TOP10 erfolgte mit dem TOPO TA Cloning® Kit nach Herstellerangaben. Ein Vial *E. coli* TOP10 wurde (pro Ansatz) auf Eis aufgetaut. 4µl des Ligationsansatzes (siehe 4.3.6.2.) wurden zu den Bakterien gegeben, vorsichtig verrührt (nicht auf- und abpipettiert) und für 30min auf Eis gestellt. Im Anschluss daran erfolgte ein Hitzeschock über 30sec in einem 42°C warmen Wasserbad. Die Bakterien wurden wieder auf Eis gestellt, mit 250µl S.O.C.-Medium versorgt und 1h bei 37°C im Schüttler (200rpm) inkubiert. Die LB-Agaroseplatten wurden in der Zeit auf 37°C vorgewärmt. Pro Platte wurden 50-100µl der Bakteriensuspension ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

#### **4.3.6.4. Dauerkulturen**

Um Bakterien dauerhaft zu lagern, wurden 100µl der gewünschten Bakterienkultur zu einer 30%igen Glycerinlösung gegeben und bei -80°C gelagert. Von allen transformierten Bakterien mit den gewünschten Plasmiden wurden Dauerkulturen angelegt.

#### **4.3.6.5. Plasmidisolation**

Die Plasmidisolation aus Bakterien erfolgte mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit. Es wurde eine 5ml Flüssigkultur angesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und die Plasmidisolation nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Im größeren Maßstab erfolgte die Isolation mit dem peqGOLD Plasmid Midi Kit - Endofree. Es wurde zunächst eine Vorkultur angesetzt, mit der anschließend 100ml Medium angeimpft wurden. Die Extraktion der Plasmide wurde nach



Herstellerangaben durchgeführt. Die Aufreinigung mit diesem Kit enthält einen Schritt, bei dem Endotoxine aus der Plasmidsuspension entfernt werden, wodurch eine endotoxinfreie Plasmidlösung hergestellt wird, mit der man eukaryotische Zellen transfizieren kann (siehe 4.3.7.), ohne dass es zu unerwünschten Nebeneffekten kommt.

#### **4.3.7. Transfektion**

##### Stabile Transfektion von HL-1 Zellen mit dem asTF-Plasmid

In dieser Arbeit wurden HL-1 Zellen stabil mit dem asTF-Vektor (siehe 4.3.6.) transfiziert, die Transfektion erfolgte mit Lipofectamine 2000 nach Angaben des Herstellers. HL-1 Zellen wurden zunächst in einer 24er Lochplatte in einer Dichte von 0,5 bis  $2 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät und in 500µl Antibiotika freiem Medium pro Well kultiviert. Am nächsten Tag wurde eine Lipofectamine- Plasmid- Lösung angesetzt. Dazu wurden zunächst 50µl DMEM mit 1,2µl Lipofectamine versetzt (pro Well) und 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 50µl DMEM mit 0,5µg Plasmid- DNA vermengt (pro Well) und zu dem Lipofectamine- Ansatz gegeben. Nach 20-minütiger Inkubationszeit wurden in jedes Well 100µl des Transfektionsansatzes tropfenweise pipettiert. Nach 24h Inkubation unter Zellkulturbedingungen wurde das Medium gewechselt. Weitere 24h später wurde erneut das Medium gewechselt und gegen Selektionsmedium, Claycomb-Komplettmedium mit 800µl/ml (G418), ausgetauscht. (Die zur Selektion optimale G418-Konzentration wurde zuvor bestimmt.)

Bei der weiteren Kultivierung der Zellen wurde darauf geachtet, dass die Zellen jede zweite Woche mit Selektionsmedium gefüttert wurden.

##### Transfektion von murinen embryonalen Kardiomyozyten mit dem asTF-Plasmid

Zur Transfektion von embryonalen Kardiomyozyten (Isolation siehe 4.2.2.) wurde wie bei HL-1 Zellen verfahren. Als Medium wurde jedoch DMEM ohne L-Glutamin verwendet. Die Zellen wurden in einer 12er-Lochplatte ausgesät und mit Lipofectamine nach Herstellerangaben transfiziert. Der Mediumwechsel erfolgte 5h nach der Transfektion. Da es sich nur um eine transiente Transfektion handelte, wurde auf Selektionsmedium verzichtet. Die Versuche erfolgten 36h nach dem Mediumwechsel.

### Transfektion mit siRNA:

Die Transfektion mit siRNA erfolgte mit Lipofectamine nach Protokoll des Herstellers. 1 Tag vor der Transfektion wurden die HL-1 Zellen in einer 12er Lochplatte in der Dichte von  $3 \times 10^4$  Zellen/  $\text{cm}^2$  ausgesät. Am nächsten Tag wurde zunächst die Lipofectamine-Lösung angesetzt (1,5  $\mu\text{l}$  in 50  $\mu\text{l}$  DMEM pro Well) und 5min bei RT inkubiert. 1  $\mu\text{l}$  der siRNA-Stocklösung (20  $\mu\text{M}$ , siehe 3.5.) wurde ebenfalls in 50  $\mu\text{l}$  DMEM (je Well) angesetzt, mit der Lipofectamine-Lösung gemischt und 20min inkubiert. In jedes Well wurden 100  $\mu\text{l}$  des Transfektionsansatzes gegeben. Nach 5h unter Zellkulturbedingungen wurde das Medium gewechselt und frisches Claycomb-Komplettmedium auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 48h wurde mit den Versuchen begonnen.

### **4.3.8. TaqMan® RealTime-PCR**

Durch die quantitative PCR ist es möglich die genaue Quantität eines Genes in einer Probe zu bestimmen. Als Ausgangsmaterial diente cDNA (4.3.2.).

Die quantitative PCR läuft ähnlich wie die semiquantitative PCR ab, sie durchläuft auch die Schritte der Denaturierung, des Annealing und der Amplifikation. Jedoch bindet sich während des Annealings zusätzlich zu den Primern auch eine sequenzspezifische Sonde. Diese Sonde ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM), dem Reporter, und einem sogenannten Quencher (TAMRA) markiert. Der Quencher unterdrückt die Fluoreszenzemission des Reporters, solange sich dieser in der Nähe des Reporters befindet. Fängt nun die Polymerase an den Strang zu synthetisieren, sorgt ihre 5'  $\rightarrow$  3'-Exonukleaseaktivität dafür, dass die Sonde gespalten wird. Reporter und Quencher werden getrennt. Nun emittiert der Reporter Licht, wenn er angeregt wird. Dabei ist die gemessene Fluoreszenz direkt proportional zu der Anzahl der neu synthetisierten DNA-Stränge und damit proportional zur DNA-Ausgangsmenge.

In dieser Arbeit wurden spezifische vorgefertigte Assays (siehe 3.9. Tabelle 5) sowie der TaqMan® Universal Mastermix, der Firma ABI verwendet. Die Sonde und die Primer für asTF (siehe 3.9.) wurden mit Hilfe der Primer Express 2.0-Software der Firma ABI erstellt.

Reaktionsansatz:

TaqMan® Universal Mastermix	6,250 µl
ddH <sub>2</sub> O	4,625 µl
Genexpression-Assaymix	0,625 µl
cDNA	1 µl

Jede Probe wurde dreifach gemessen/quantifiziert. Pro Well wurden 12,5µl eingesetzt.

Die Reaktion erfolgte im TaqMan®-PCR ABI 7000 Sequencing Detection System mit folgendem Standard- Zyklusprogramm:

1.	2min	50°C	40 Zyklen
2.	10min	95°C	
3.	15sec	95°C	
4.	1min	60°C	

Die Expression des untersuchten Gens wurde stets auf die ebenfalls gemessene Expression eines stabil exprimierten Haushalts-Gens (18s oder GAPDH) bezogen. Auf diese Weise wurden eventuell auftretende Abweichungen an Template- cDNA-Mengen mit berücksichtigt.

Die Auswertung erfolgte mit der SDS-Software Version 2.2.2.

#### TaqMan® RealTime PCR mit SYBR® Green I

Die TagMan®-PCR mit SYBR® Green ist eine Alternative zur zuvor beschriebenen PCR bei der vorgefertigte Genexpressionsassays mit spezifischen Sonden eingesetzt werden. Zur Detektion der amplifizierten Fragmente wird der Farbstoff SYBR® Green I verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und gibt ein Fluoreszenzsignal im grünen Bereich ab. Die Detektion ist somit nicht spezifisch.

Für jede eingesetzte cDNA wurde zugleich auch ein Ansatz mit dem stabil exprimierten Haushalts-Gen GAPDH gemacht, auf dessen Expression die des untersuchten Gens bezogen wurde. Um Fehlbindungen der Primer auszuschließen, wurde nach jedem Versuch die Schmelzkurve betrachtet, da jedes Produkt eine unterschiedliche Schmelztemperatur hat. Zusätzlich wurden die Amplifikate im Agarosegel aufgetragen (siehe 4.3.4.).

Reaktionsansatz:

TaqMan® Universal Mastermix	7,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	4,2 µl
SYBRGreen (1:1000)	1,5 µl
Vorwärts-Primer (20µM)	0,15 µl
Rückwärts-Primer (20µM)	0,15 µl
cDNA	1,5 µl

Jede Probe wurde dreifach gemessen/quantifiziert. Pro Well wurden 15µl eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Messung erfolgte im TaqMan®-PCR ABI 7000 Sequencing Detection System mit dem Standard-Zyklerprogramm (s.o.).

#### **4.3.9. Genotypisierung von Mäusen/ Mäuseembryos**

Zur Genotypisierung der TF-Knockout Mäuse wird ein kleines Gewebestück des Tieres in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 125µl Proteinase K (3,85% (v/v) Proteinase K Stock-Lösung (10mg/ml) in Proteinase-K Puffer) versetzt und kräftig gemischt. Anschließend wird die Probe bei 55°C über mehrere Stunden/ über Nacht im Thermoblock inkubiert. Die verdaute Probe wird dann bei 13000g 10min lang zentrifugiert um Zellschrott zu entfernen. Durch ein 10-minütiges Erhitzen auf 95°C wird Proteinase K inaktiviert. Im Anschluss wurden eine Flox und eine Cre- PCR durchgeführt um den Genotyp zu bestimmen. Die Amplifikate wurden im 1,5%igen Agarosegel aufgetragen.

## 4.4. Proteinbiochemische Methoden

### 4.4.1. Proteingewinnung aus Zellen

Zur Gewinnung von Protein aus Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend wurde Proteinlysepuffer (siehe 3.3.) auf die Zellen gegeben, der zuvor mit Protease-Inhibitorcocktail und Phosphatase-Inhibitorcocktail versetzt wurde. Das Zelllysate wurde einmal eingefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurde das aufgetaute Lysat dreimal durch eine Hamiltonspritze gezogen, wodurch die DNA in der Probe zerstört wurde. Im Anschluss wurden Zellreste bei 13000g und 4°C 10min lang abzentrifugiert. Die Proteinprobe wurde bei -20°C gelagert.

### 4.4.2. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes einer Probe erfolgte mittels des BCA (Bicinchoninsäure)-Protein Assay Kits.

Bei diesem Kit werden die Proteinproben zu einer mit Kupfersulfat versetzten Bicinchoninsäure gegeben. Die Aminosäuren Serin, Cystein oder Threonin reduzieren die Cu-Ionen im Natriumsalz der Bicinchoninsäure von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{+}$ , wodurch in alkalischer Lösung ein farbiger Komplex gebildet wird. Die Komplexbildung kann bei einer Wellenlänge von 562nm photometrisch gemessen werden. Zur Erstellung einer Standardkurve wurden definierte Proteinkonzentrationen einer Extinktion zugeordnet. Anhand der Standardkurve und den gemessenen Extinktionen der Proben, konnte deren Proteingehalt bestimmt werden. Die Durchführung des Assays erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

### 4.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient zur Trennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse. Die Voraussetzung dafür, dass die Migrationsgeschwindigkeit der Proteine allein von ihrer molaren Masse abhängt, ist, dass andere Einflüsse wie Proteinladung und Tertiärstruktur, soweit wie möglich, eliminiert werden. Um dies zu erreichen, wird ein Überschuss an SDS (Natriumdodecylsulfat) zum Probenansatz gegeben. Zusätzlich werden die Proben vor dem Auftragen auf 95°C erhitzt. SDS überdeckt die Eigenladung der einzelnen Aminosäuren und sorgt für eine einheitlich negative Ladung der Proteine. Durch das Erhitzen der Proteine wird deren Sekundärstruktur und Tertiärstruktur aufgelöst, die Proteine liegen nun denaturiert vor.

Bei der SDS-Gelelektrophorese wurde ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen, dem Trenngel (unten) und dem Sammelgel (oben) angewandt. Diese beiden Gele unterscheiden sich im Hinblick auf ihren pH-Wert, ihre Ionenstärke und ihre Porengröße, wodurch die Proben zunächst im Sammelgel konzentriert werden, bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden. Es entstehen schärfere Protein-Banden, als bei einem kontinuierlichen System.

Je nachdem, wie groß die zu detektierenden Proteine waren, wurde ein Trenngel mit einem Acrylamidanteil von 10% (für Proteine mit einem Molekulargewicht von 40-60 kDa) oder von 12% (für Proteine mit einem Molekulargewicht von 20-50 kDa) verwendet. Der Acrylamidanteil des Sammelgel betrug 4%. Bei jedem Versuch wurde ein Proteinmarker mit Proteinbanden definierter Größe (Proteinmarker V) aufgetragen. Die Auftrennung in der Biorad-Apparatur erfolgte gekühlt bei zunächst 35mM. Nachdem die Proben das Sammelgel passiert hatten, wurde bei einer Stromstärke von 55mA aufgetrennt.

Im Anschluss wurden die Gele aus der Kammer entnommen und für den folgenden Western Blot (siehe 4.4.5.) in Transferpuffer überführt.

#### **4.4.4. Western-/ Immun- Blot**

Der Western Blot dient sowohl der Identifikation einzelner Proteine in einem Proteingemisch als auch ihrer qualitativen und quantitativen Bestimmung. Diese Methode wird nach der elektrophoretischen Trennung von Proteinen eingesetzt, um die aufgetrennten Proteine aus einem Gel auf eine geeignete Trägermembran, z.B. PVDF-Membran, zu transferieren.

Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen (siehe 4.4.3.) sowie die Filterpapiere wurden 10min in Transferpuffer inkubiert. Die hydrophobe PVDF-Membran wurde erst 30sec in Methanol gewaschen und anschließend ebenfalls in Transferpuffer überführt. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte mit der Semi-dry-Methode 45min bei 5W. Nach erfolgtem Transfer wurde die PVDF-Membran mit den transferierten Proteinen in Magermilch-Lösung (5% in TBS-Tween) gelegt, um spätere unspezifische Bindungen der Antikörper zu blockieren. Die Blockade erfolgte über einen Zeitraum von 60min. Im Anschluss wurde die Membran dreimal 5min in TBS-Tween gewaschen. Die darauffolgende Inkubation mit dem ersten Antikörper (siehe 3.8.) erfolgte über Nacht bei 4°C auf. Am nächsten Tag wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-Tween (je 5min) entfernt.

Die Inkubation des zweiten Antikörpers (siehe 3.8.) wurde bei Raumtemperatur über 60min durchgeführt. Die verwendeten zweiten Antikörper waren Peroxidase-konjugiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem ECL plus Kit nach Protokoll des Herstellers. Anschließend wurde ein Film auf die Membran gelegt, der anschließend in dem automatischen Filmentwicklungsgerät (Kodak) entwickelt wurde.

## 4.5. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie können verschiedene Parameter einzelner Zellen bzw. Zellpartikel simultan analysiert werden.

Zellen/ Zellpartikel werden in einer Trägerflüssigkeit (FACS-Flow) von dem Durchflusszytometer angesaugt und so beschleunigt, dass sie aneinandergereiht einzeln an einem Laserstrahl vorbeitransportiert werden (hydrodynamische Fokussierung). Während die Zellen den Laserstrahl passieren, emittieren diese Streulicht, und zudem, wenn sie mit fluoreszenzmarkierten Antikörper markiert sind, Fluoreszenzsignale spezifischer Wellenlänge. Dadurch ist die simultane Bestimmung verschiedener Parameter möglich. Das Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht SSC (Sideward Scatter) wird durch die Brechung des Lichtes im rechten Winkel hervorgerufen und ist ein Maß für die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns und der Menge an Vesikeln) der Zelle. Werden die Zellen vor der Messung mit Fluorochromen inkubiert (z.B. fluoreszenzmarkierte Antikörper) können zusätzlich zu Größe und Granularität noch spezielle Charakteristika der Zelle detektiert werden, wie z.B. das Vorhandensein bestimmter Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Durch den Einsatz verschiedener Laser kann die Anzahl der detektierbaren Farbstoffe erhöht werden, wodurch die Zellen bezüglich noch weiterer Merkmale untersucht werden können.

In dieser Arbeit wurde das FACScan<sup>TM</sup> verwendet, welches über einen luftgekühlten Argonlaser ( $\lambda=488\text{nm}$ ) verfügt. Die Auswertung erfolgte mit der CellQuest®-Software.

### 4.5.1. Fluoreszenzfärbung von Zellen/ Bestimmung der KI-67-Expression

Zellen, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert wurden, können anschließend im Durchflusszytometer auf das Vorhandensein des speziellen Antigens untersucht werden.

In dieser Arbeit wurden HL-1 Zellen auf die Expression des Proliferationsmarkers KI-67 untersucht. Bei KI-67 handelt es sich um ein Protein, welches von proliferierenden Zellen im Zellzyklus während der G1, S, G2 und M-Phase exprimiert wird. In ruhenden Zellen/ Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, wird es nicht exprimiert.



Um das KI-67-Expressionsniveau der HL-1 Zellen zu bestimmen, wurde diese zunächst, wie in Punkt 4.2.1. beschrieben, pelletiert und zur Fixierung (bei 4°C über Nacht) in PFA (2% in PBS) resuspendiert. Am nächsten Tag wurden die nun fixierten Zellen abzentrifugiert (10min, 300g, 4°C) und in Triton-X (0,1% in PBS) resuspendiert. Die Permeabilisierung erfolgte bei Raumtemperatur über 5min. Anschließend wurde PBS hinzugegeben und zentrifugiert. Die Zellen wurden zur Blockade von unspezifischen Bindungsstellen in 100µl PBS-G (PBS mit 2% BSA und 5% Ziegenserum) aufgenommen und 20min (RT) inkubiert. Danach wurde der primäre Antikörper mouse-anti-KI-67 (Endkonzentration 1:50) hinzugegeben. Nach einer Stunde wurde der sekundäre fluoreszenzmarkierte Antikörper (anti-mouse-M488, Endkonzentration 1:100) in die Probe pipettiert. Nun erfolgte eine Inkubation über 45 Minuten im Dunkeln. Bevor die Messung im Durchflusszytometer erfolgte, wurden die Zellen (10min, 300g, RT) abzentrifugiert und in 300µl FACS-Flow resuspendiert.

#### **4.5.2. CFSE-Proliferationsassay**

CFSE (Carboxyfluoresceindiacetat Succinimidyl Ester) ist ein farbloser, nicht fluoreszierender Stoff, der passiv in Zellen diffundiert. In lebenden Zellen schneiden die intrazellulär vorhandenen Esterasen die Acetatgruppen des CFSE wodurch ein hochfluoreszierender Carboxyfluorescein-Succinimidylester entsteht. Die Succinimidylester-Gruppe reagiert mit intrazellulären Aminen und es entstehen sehr stabile, fluoreszierende Konjugate. Die Stärke der Fluoreszenz kann im Durchflusszytometer bestimmt werden und halbiert sich bei jeder Zellteilung.

Um Zellen mit CFSE zu färben, wurden sie gewaschen, pelletiert (siehe 4.2.1), in 1ml CFSE-Lösung (5µM in PBS) resuspendiert und 5min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 5ml kaltes FBS-haltiges Komplettmedium zu dem Ansatz gegeben, welcher dann für 5min auf Eis gestellt wurde. Durch die Zugabe von weiteren 5ml Komplettmedium und eine Zentrifugation bei 300g wurden die Zellen gewaschen. Das entstandene Zellpellet wurde in 6ml warmen Komplettmedium resuspendiert. 1ml der Suspension wurde pro Loch einer 12er-Loch-Platte ausgesät. 24 Stunden später, sowie 2 Tage, 3 Tage und 4 Tage später erfolgte die Detektion der Fluoreszenzintensität im FL-1-Kanal (530nm) des Durchflusszytometers. Anhand der Fluoreszenzabnahme kann die Teilungsgeschwindigkeit der Zellen ermittelt werden.

#### 4.5.3. Annexin-V-/ Propidiumiodit-Apoptoseassay

Die Phosphatidylserinexposition ist ein Marker für das frühe Stadium der Apoptose. Bei einer vitalen Zelle ist Phosphatidylserin auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert. Erst während der Apoptose wird Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran exponiert. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin, wodurch es möglich ist mit FITC-markiertem Annexin-V apoptotische Zellen im Durchflusszytometer zu bestimmen. Bei dem in dieser Arbeit angewendeten Assay wurde eine zusätzliche Färbung mit Propidiumiodit durchgeführt. Propidiumiodit kann nur durch die schon poröse Zellmembran toter Zellen diffundieren. Es werden folglich Zellen angefärbt, die sich im späten Stadium der Apoptose befinden. Mit dem Annexin-V-/ Propidiumiodit-Assay ist es möglich, genau zu bestimmen, ob die Zelle apoptotisch ist und ob sie sich im frühen (nur Annexin-V-positiv) oder schon im späten Stadium der Apoptose (Annexin-V- und Propidiumiodit-positiv) befindet.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einer 12er-Loch-Platte ausgesät ( $3 \times 10^4$  /  $\text{cm}^2$ ) und in Kompletmedium kultiviert. Nachdem die Zellen 24h lang durch den Entzug von Serum im Medium ausgehungert worden waren, erfolgte die Stimulation mit den Apoptoseinduktoren (Zeiten und Substanzen siehe 4.1.) in serumfreiem DMEM. Bei Inhibitionsversuchen wurden die Zellen zuvor mit dem spezifischen Akt-Inhibitor Triciribine behandelt ( $2\mu\text{M}$ , 30min lang), der die Phosphorylierung von Akt an Thr308 und Ser473 verhindert (Dieterle et al., 2009; Gao et al., 2007). Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen durch die Verwendung von Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst, zentrifugiert und pelletiert (10min,  $300 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ). Die Färbung der Zellen erfolgte mit dem Annexin-V-/ Propidiumiodit-Assay Kit nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurde der Prozentsatz an apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer bestimmt.

#### 4.5.4. Transfektionseffizienz

Um die Transfektionseffizienz der siRNA-Transfektion mit Lipofectamine zu bestimmen, wurden die Zellen, wie in Punkt 4.3.7. beschrieben, transfiziert. Für die Messung wurde fluoreszenzmarkierte siRNA verwendet (# 301698, Quiagen). 24h nach der Transfektion wurden die Zellen pelletiert, in  $300\mu\text{l}$  FACS-Flow aufgenommen im Durchflusszytometer im FL-1-Kanal (530nm) gemessen. Um ausschließen zu können, dass sich siRNA außen an Zellen lagert und falsch-positive Signale verursacht, wurde als Kontrolle siRNA ohne Lipofectamine in einem Transfektionsansatz verwendet.

## 4.6. Fluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Zellen wurden diese auf Objektträgern ausgesät und anschließend transfiziert und stimuliert. Die Zellen wurden dann einer Fluoreszenzfärbung unterzogen und im Fluoreszenzmikroskop DM IRBE der Firma Leica ausgewertet.

Präparate, die mit fluoreszierenden Stoffen/ fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Fluorochrome) gefärbt wurden, werden mit einer spezifischen Wellenlänge angeregt. Die angeregten Fluorochrome emittieren Licht, welches von Detektoren gemessen wird. Zur Ko-Lokalisation verschiedener Fluoreszenzmarker wird das Fluoreszenzlicht in verschiedene spektrale Bereiche zerlegt, die gleichzeitig mit verschiedenen Detektoren verarbeitet werden können. Die digitalisierten Fluoreszenzsignale von jedem Detektor werden als getrennte Kanäle im Computer gespeichert und können mittels der speziellen Software überlagert werden.

Bei der Fluoreszenzfärbung wurden zunächst HL-1 Kardiomyozyten oder primäre embryonale Kardiomyozyten ca. 80% konfluent in Culture Slides™ ausgesät. Die Zellen wurden je nach Versuch teilweise transfiziert (siehe 4.3.7.). Zur Fixierung der Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und dann mit 4%igem PFA (15min bei RT) fixiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS gewaschen, die Kammeraufsätze wurden entfernt und es folgte die Permeabilisierung der Zellen mit Triton-X (0,25%ig in PBS) 5min lang in der feuchten Kammer. Nachdem die Objektträger zweimal 5min mit PBS (auf dem Schüttler) gewaschen worden waren, folgte die 30-minütige Blockade mit PBS-G-Lösung (PBS mit 2% BSA und 5% Ziegenserum) bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Liste mit den Antikörpern unter 3.8.) erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Negativkontrollen wurden nur mit PBS-G inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger dann zunächst zweimal 5min mit PBS gewaschen. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde in der Verdünnung von 1:200 in PBS-G angesetzt und auf die verschiedenen Zellfelder (inklusive der Negativkontrollen) pipettiert. Nach 60min im Dunkeln wurden die Objektträger erneut zweimal über 5min mit PBS gewaschen. Mit DAPI (1µg/ml in PBS, 5min) oder TO-PRO3 (Verdünnung: 1:1000 in PBS, 5min) wurden die Kerne angefärbt. Die Präparate wurden mit Kaisers Gelatine eingedeckelt.

## 4.7. Angewandte Programme und statistische Auswertung

Zum Vergleich von homologen Sequenzen wurde das Programm AlignIR (Corpet, 1988) verwendet. Mit dem BLAST Programm (Altschul et al., 1990) wurden zu analysierende Sequenzen mit den im Internet ([www.pubmed.de](http://www.pubmed.de)) veröffentlichten ähnlichen oder gleichen Sequenzen verglichen.

Alle Daten sind, soweit nicht anders gekennzeichnet, als arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt und stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Zur Prüfung, ob zwischen den Mittelwerten signifikante Unterschiede vorlagen, wurden bei normal verteilten Daten ungepaarte t-Tests durchgeführt. In den Experimenten, die mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurden Einweg-ANOVA-Tests mit anschließender Bonferroni-Korrektur verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 4.0.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Für alle Ergebnisse wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  als minimales Signifikanzniveau angenommen.

## 5. Ergebnisse

Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit vorgelegt werden, stammen aus *in vitro* und *ex vivo* - Versuchen und werden in vier Unterabschnitten dargestellt.

Im ersten Abschnitt wird die Bedeutung der asTF-Expression für das Proliferations- und Apoptoseverhalten von HL-1 Zellen untersucht.

Im zweiten Abschnitt wird erläutert, welche Signaltransduktionswege an dem schützenden Einfluss von asTF auf die HL-1 Zellen beteiligt sind. Ferner wird geklärt, welche weiteren Proteine in Abhängigkeit der asTF-Expression reguliert werden und folglich in den asTF-assoziierten Effekt involviert sind.

Im dritten Abschnitt werden *ex vivo* - Versuche an primären murinen Kardiomyozyten durchgeführt, um die Bedeutung der asTF-Expression in primären Zellen zu untersuchen. Die Auswirkung von TF auf das Überleben der Zellen wird zudem an primären Zellen verdeutlicht, die transgenen Mäusen mit einem herzspezifischen TF-Knockout entstammen.

Der vierte Abschnitt behandelt den Einfluss von asTF auf die Expression von Angiogenese-assoziierten Proteinen.

### 5.1. Die Überexpression von murinem asTF in HL-1 Zellen und die Charakterisierung dieser Zellen

Im folgenden Kapitel wird die Funktion der Expression der asTF-Isoform in Kardiomyozyten untersucht.

AsTF-überexprimierende HL-1 Zellen wurde generiert, an denen zunächst die Bedeutung von asTF für die Proliferation und Vitalität der Zellen dargestellt wurde.

### 5.1.1. Die stabile Überexpression von murinem asTF in HL-1 Zellen

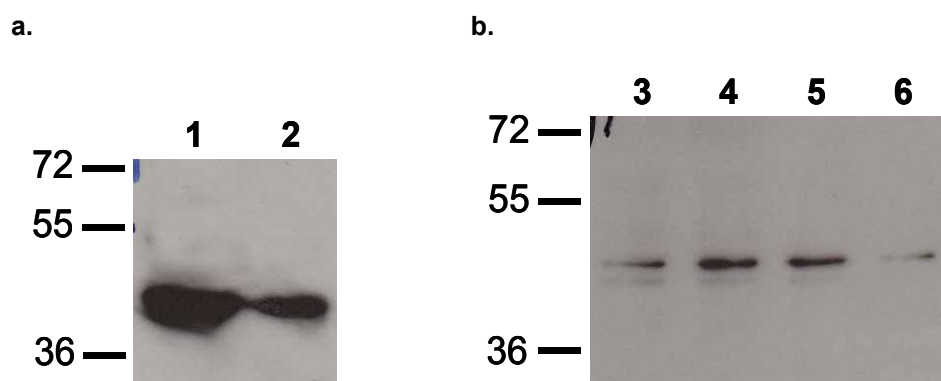
HL-1 Zellen wurden mit einem zuvor generierten asTF-Expressionsplasmid transfiziert (asTF $\uparrow$ -Zellen). Als Kontrolle dienten HL-1 Zellen, die mit dem leeren Plasmid (mock) transfiziert wurden (Kontrollzellen). Die erfolgreiche und stabile Überexpression von asTF in den HL-1 Kardiomyozyten wurde auf mRNA-Ebene sowie auf Proteinebene nachgewiesen (Abbildung 9). Das ermittelte Molekulargewicht für asTF lag bei ca. 42kDa.



**Abbildung 9: Gen- und Proteinexpression von asTF in asTF $\uparrow$ -Zellen und in Kontrollzellen.**

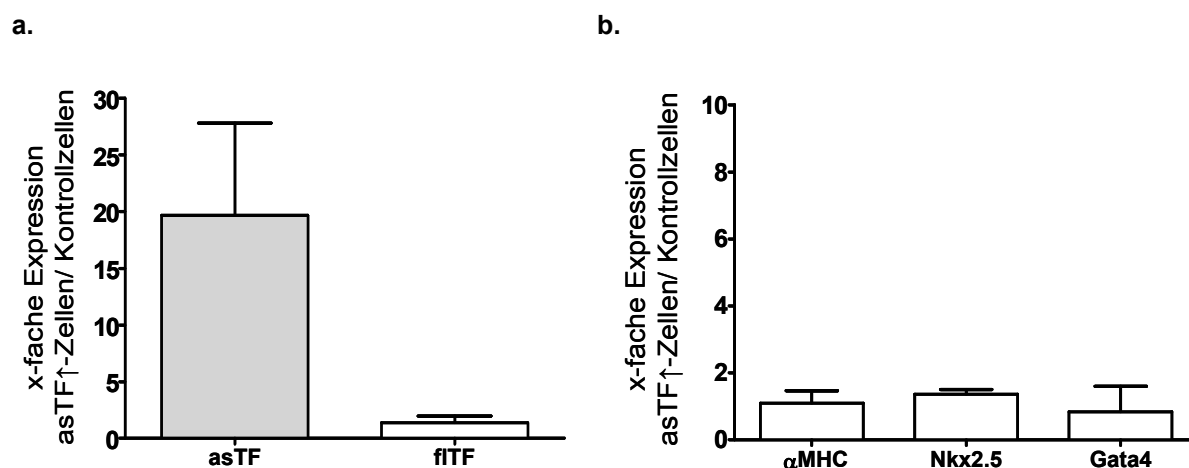
**a.** TF-Genexpression in untransfizierten HL-1 Zellen (Spalte 1), in mock-transfizierten Kontrollzellen (Spalte 2) und in asTF $\uparrow$ -Zellen (Spalte 3). **b.** Proteinexpression von asTF (asTF= asTF $\uparrow$ -Zellen; mock= Kontrollzellen). Benutzt wurde ein spezifisch gegen die murine asTF-Isoform gerichteter Antikörper. Es wurden jeweils 30 $\mu$ g Protein aufgetragen.

Ebenso wie in den HL-1 Zellen betrug das Molekulargewicht von asTF auch in Herzen von adulten sowie embryonalen (E13.5) C57-BL/6 Mäusen ca. 42kDa (Abbildung 10a & b).



**Abbildung 10: Die asTF-Isoform im Herzlysat von adulten C57-BL/6-Mäusen (a) und von C57-BL/6-Mäuseembryonen (E13.5) (b).** 60 $\mu$ g Herzlysate wurden im Western Blot aufgetragen. Es wurde ein spezifischer asTF-Antikörper verwendet (Spalten 1 & 2: Herzlysate von adulten Herzen, Spalten 3 - 6: Herzlysate von embryonalen Herzen (E13.5)).

HL-1 Zellen zeigten diverse kardiomyozytenspezifische Charakteristika. Dass diese auch nach der Transfektion und der Überexpression von asTF erhalten blieben, wurde exemplarisch anhand der Expression der kardialen Gene  $\alpha$ MHC, Nkx2.5 und GATA-4 überprüft.



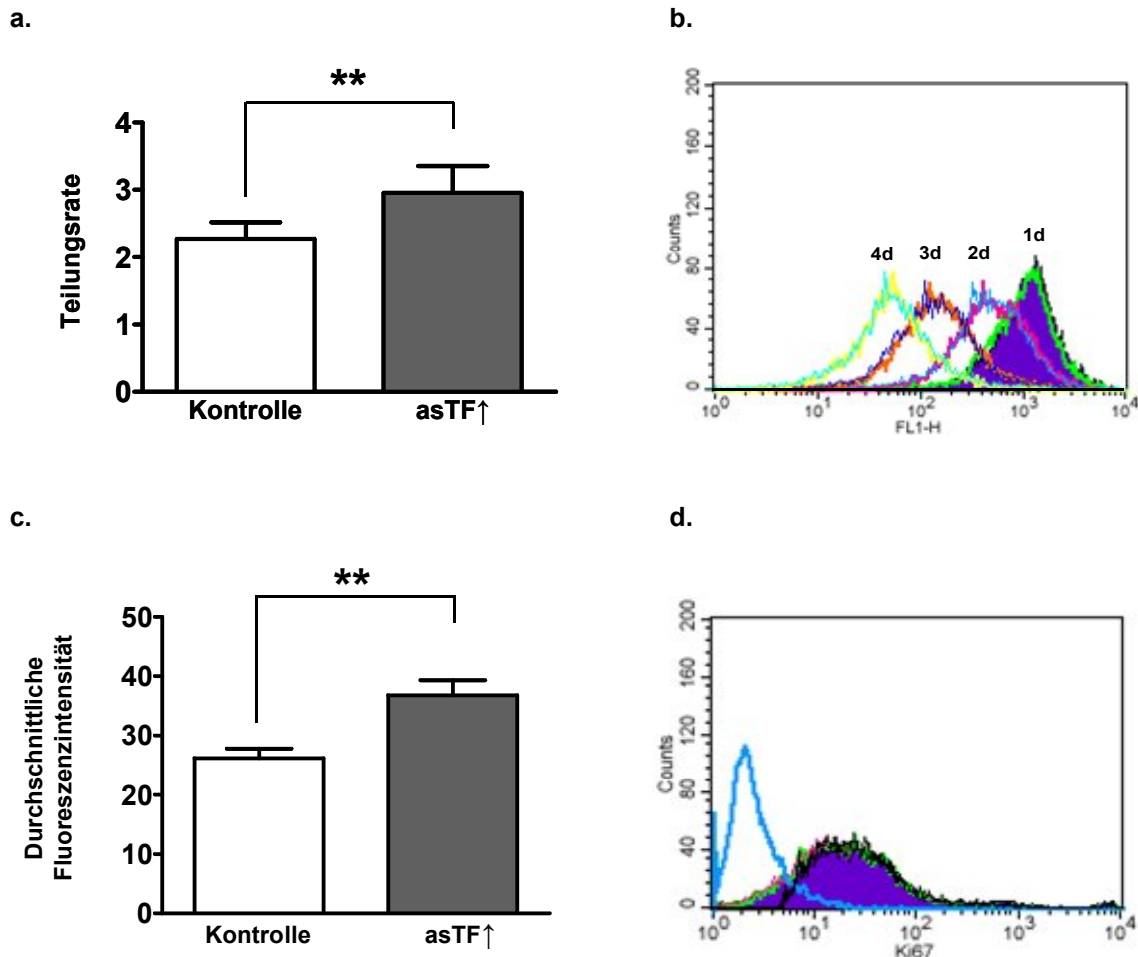
**Abbildung 11: Relative Genexpression von asTF, fitF (a) und kardialen Markergenen (b) in asTF↑-Zellen bezogen auf Kontrollzellen.** Die Expression wurde durch TaqMan® RealTime PCR mit SYBR® Green bestimmt. (Primer siehe 3.9., Tabelle 3). Die Genexpression wurde jeweils auf die Expression von GAPDH bezogen. (n=4)

Das Expressionsniveau von kardialem  $\alpha$ MHC, Nkx2.5 und GATA-4 veränderte sich nicht bzw. nur in sehr geringem Ausmaß (Abbildung 11b).

Die erfolgreiche Überexpression von asTF wurde erneut bestätigt. Die Expression von fitF blieb unverändert (Abbildung 11a).

### 5.1.2. Das Wachstumsverhalten der asTF-überexprimierenden HL-1 Zellen

Anhand einer Analyse der Ki-67-Expression und der Teilungsrate der verschiedenen HL-1 Zelllinien wurde ermittelt, ob die asTF-Expression einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der HL-1 Kardiomyozyten besitzt.



**Abbildung 12: Das Wachstumsverhalten von HL-1 Zellen in Abhängigkeit von der asTF-Expression.** a. Teilungsrate (Teilungen pro Tag) der unterschiedlichen HL-1 Zelllinien (n=6; \*\*p<0,01). b. Repräsentative CFSE-Auswertung von asTF↑-Zellen; dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten an Tag 1 - 4 nach der Färbung. c. Im Durchflusszytometer quantifizierte Ki-67-Expression in asTF↑-Zellen und Kontrollzellen (n=8; \*\*p<0,01). d. Repräsentative Detektion von Ki-67 (hellblau= Hintergrundfluoreszenz, violett gefärbt= Ki-67-positive Zellen).

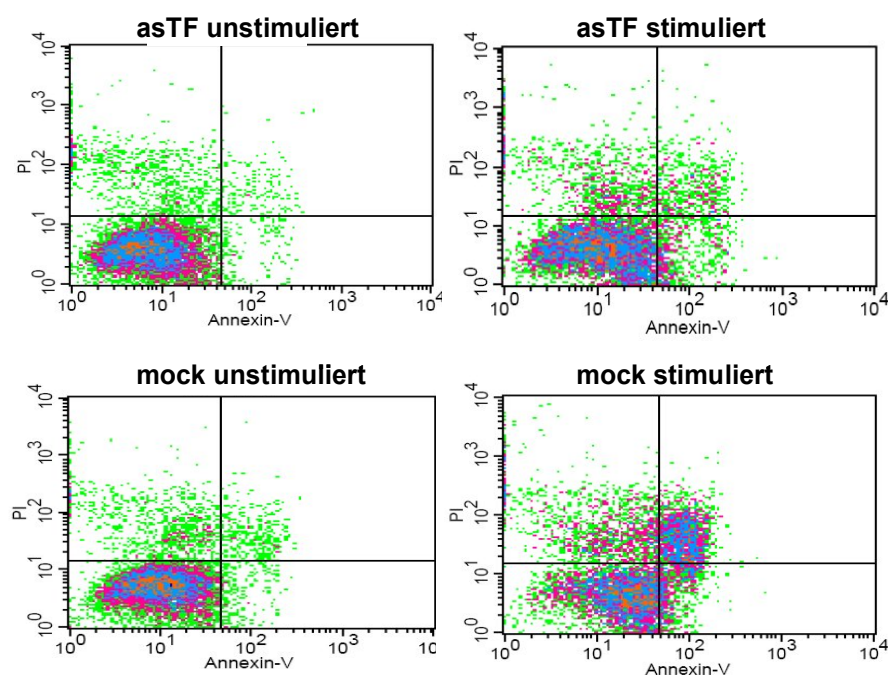
Die asTF↑-Zellen wiesen eine höhere Teilungsrate als die Kontrollzellen auf ( $2,96 \pm 0,40$  vs.  $2,27 \pm 0,25$  Teilungen pro Tag; Abbildung 12a). Auch die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 war bei den asTF↑-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant erhöht (Abbildung 12c).



Die asTF $\uparrow$ -Zellen befanden sich somit zu einem höheren Anteil im Zellteilungszyklus und zeichneten sich gegenüber den Kontrollzellen durch eine höhere Teilungsgeschwindigkeit aus.

### 5.1.3. Das Apoptoseverhalten der asTF-überexprimierenden HL-1 Zellen

Im Folgenden wurde untersucht, ob die asTF-Überexpression die Vitalität der Zellen beeinflusst. Dazu wurde, zunächst mithilfe der Phosphatidylserin-Exposition (Abbildung 12) gemessen, ob die asTF-überexprimierenden Zellen auf die Induktion von Apoptose abweichend von den Kontrollzellen reagieren.

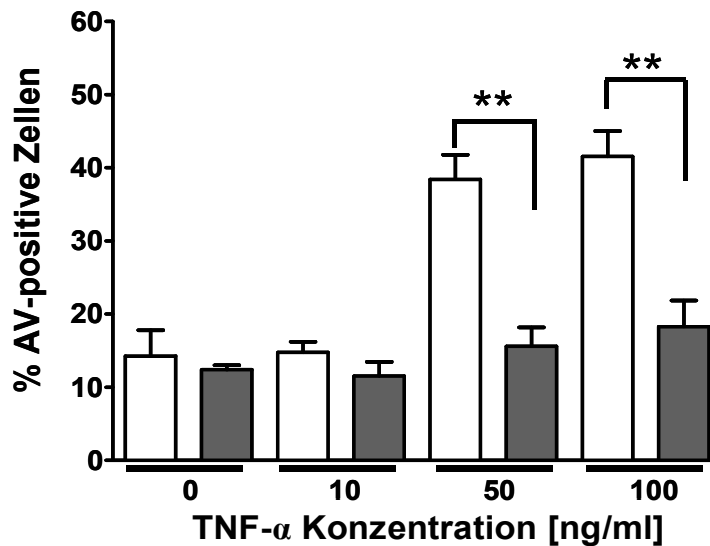


**Abbildung 13: Exemplarische Durchflusszytometermessung von Annexin-V (AV)- und Propidiumiodid (PI)-markierten HL-1 Zellen.** Stimulierte Kontrollzellen (mock) (hier mit 100ng/ml TNF $\alpha$ , 17h lang stimuliert) wurden apoptotisch und zeigten sich positiv für AV und PI. Die stimulierten asTF $\uparrow$ -Zellen (asTF) wiesen einen geringeren Anteil an AV- oder PI-positiven Zellen auf.

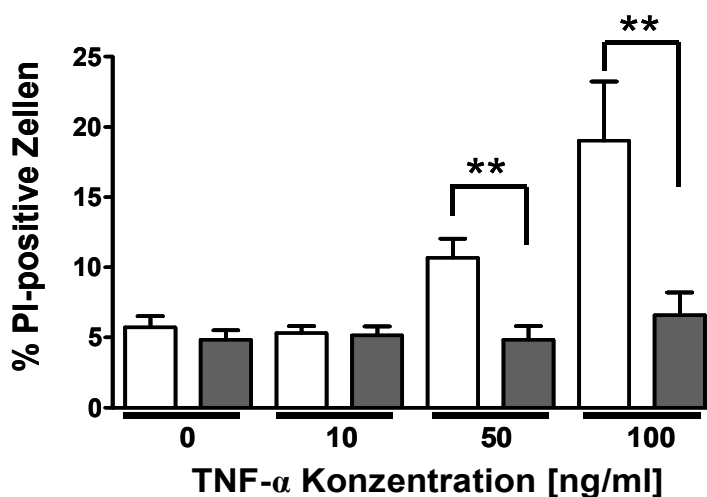
Nach der Stimulation mit TNF $\alpha$  zeigte sich anhand des Annexin-V-/Propidiumiodid (AV-/PI)-Assays ein signifikanter Unterschied in der Reaktion der verschiedenen HL-1 Zellen. Die TNF $\alpha$ -Stimulation mit einer Konzentration von über 50ng/ml rief bei den Kontrollzellen einen signifikanter Anstieg der AV-positiven und PI-positiven

Zellen hervor (Abbildung 14a & b). Als signifikant weniger apoptotisch erwiesen sich die asTF $\uparrow$ -Zellen (Abbildung 14).

a.



b.



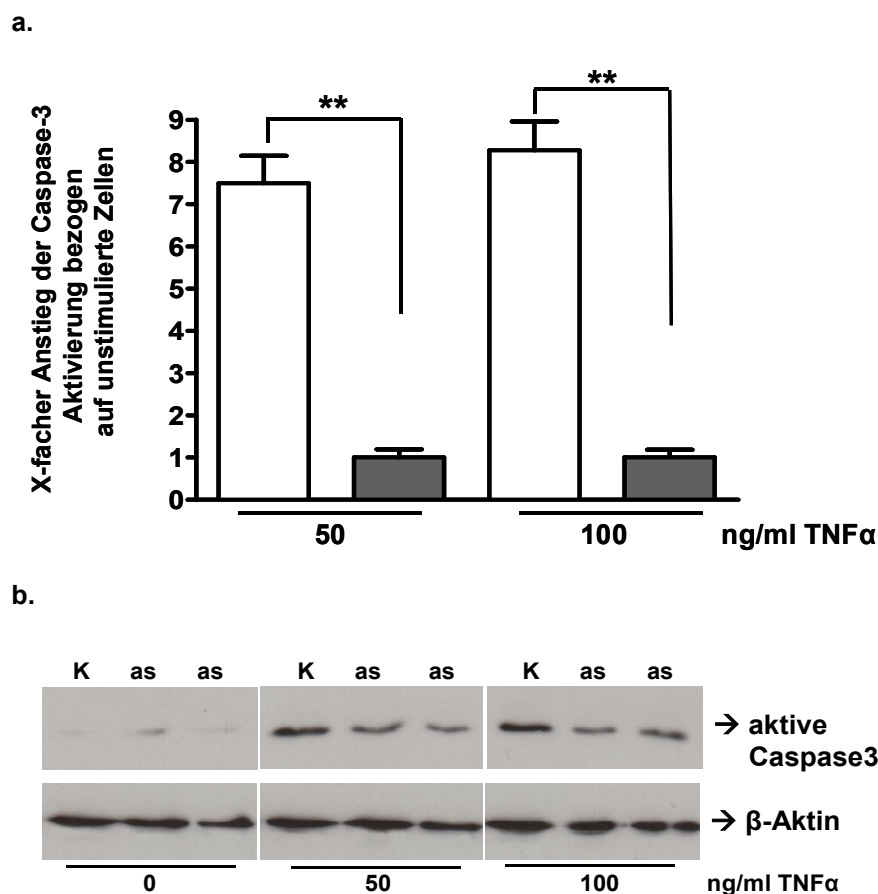
**Abbildung 14: AV-/PI-Apoptoseassay mit asTF $\uparrow$ -Zellen und Kontrollzellen.** Die asTF $\uparrow$ -Zellen (graue Balken) und die Kontrollzellen (weiße Balken) wurden über Nacht ausgehungert und über 17h mit TNF $\alpha$  stimuliert. Anschließend wurde das Ausmaß an induzierter Apoptose mittels des AV-/PI-Assays im Durchflusszytometer bestimmt. Getrennt dargestellt werden hier AV-positive Zellen (a.) und PI-positive Zellen (b.). (n = 8; \*\*p<0,01)

Nach Stimulation mit 50ng/ml TNF $\alpha$  waren  $38,41 \pm 3,37$  % der Kontrollzellen AV- und  $10,67 \pm 1,37$  % PI-positiv. Im Gegensatz dazu zeigten sich die asTF $\uparrow$ -Zellen nur zu  $15,58 \pm 2,60$  % AV-positiv und nur zu  $4,84 \pm 0,97$  % PI-positiv. Die Stimulation mit 100ng/ml TNF $\alpha$  führten zu vergleichbaren Ergebnissen. In den Kontrollzellen war die TNF $\alpha$ -induzierte Apoptose sehr stark ausgeprägt.  $41,55 \pm 3,46$  % der Zellen befanden sich im frühen Stadium und  $19,01 \pm 4,24$  % im späten Stadium der

Apoptose. In den asTF $\uparrow$ -Zellen wurde Apoptose in signifikant geringerem Ausmaß induziert. Nur bei  $18,28 \pm 3,58$  % der asTF $\uparrow$ -Zellen konnte Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche detektiert werden. Nur  $6,60 \pm 1,61$  % der Zellen erwiesen sich zudem als PI-positiv.

Durch die Stimulation mit 10ng/ml TNF $\alpha$  wurde bei keiner Zelllinie ein signifikantes Maß an Apoptose hervorgerufen.

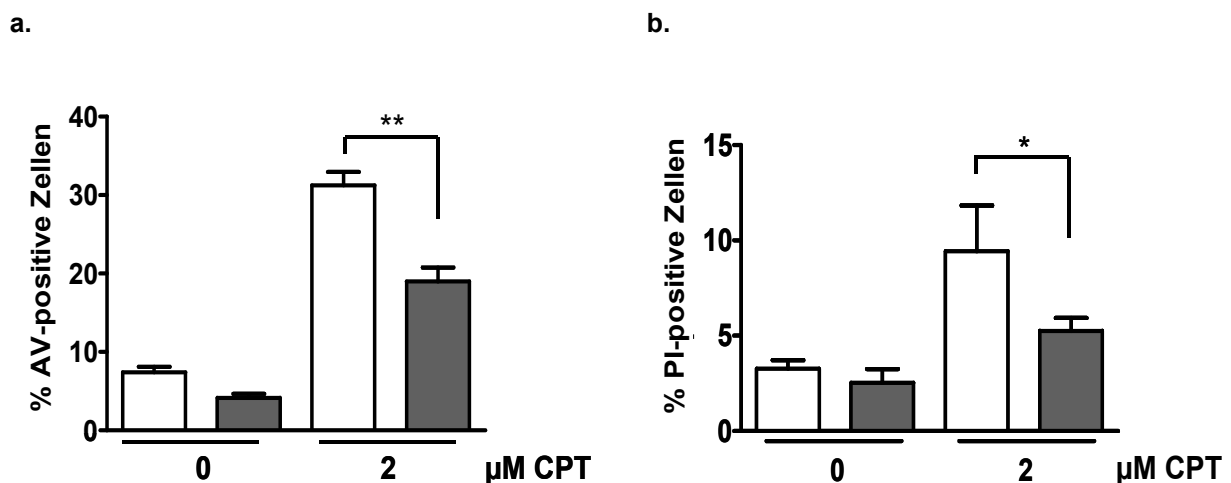
Das signifikant unterschiedliche Verhalten der Zelllinien nach TNF $\alpha$ -Stimulation wurde zusätzlich anhand der Proteinexpression von aktiver Caspase-3 ermittelt. Es zeigte sich, dass die TNF $\alpha$ -Stimulation der Kontrollzellen zu einer deutlich stärkeren Aktivierung von Caspase-3 führte als die der asTF $\uparrow$ -Zellen (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Aktive Caspase-3 in stimulierten HL-1 Zellen.** Die asTF $\uparrow$ -Zellen sowie die Kontrollzellen wurden, nachdem sie über Nacht ausgehungert worden waren, 6h mit TNF $\alpha$  stimuliert. Aus den Zellen wurde Protein gewonnen und Western Blots durchgeführt. **a.** Anstieg an aktiver Caspase-3 in den Kontrollzellen (weiße Balken) und in den asTF $\uparrow$ -Zellen (graue Balken) nach TNF $\alpha$ -Stimulation, jeweils bezogen auf die unstimulierten Zellen. (n=4; \*\*p<0,01) **b.** Repräsentativer Western Blot: K = Kontrollzellen; as = asTF $\uparrow$ -Zellen

Caspase-3 war bei den asTF $\uparrow$ -Zellen lediglich um das  $1,00 \pm 0,19$  fache (50ng/ml TNF $\alpha$ ) bzw. das  $1,00 \pm 0,17$  fache (100ng/ml TNF $\alpha$ ) phosphoryliert. Im Gegensatz dazu stieg die Aktivierung von Caspase-3 in den mock-transfizierten Zellen stark an. Bezogen auf die unstimulierten Zellen wiesen sie das  $7,50 \pm 0,65$  fache (50ng/ml TNF $\alpha$ ) bzw. das  $8,27 \pm 0,70$  fache (100ng/ml TNF $\alpha$ ) an aktiver Caspase-3 auf. Gemessen an der Aktivierung der Effektor-Caspase-3 wurde deutlich, dass asTF-überexprimierende HL-1 Zellen auf die TNF $\alpha$ -Stimulation mit einer im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant reduzierten Induktion von Apoptose reagieren.

Neben der Apoptoseinduktion durch TNF $\alpha$  wurden auch Versuche mit Camptothecin (CPT) als Stimulans durchgeführt. Erneut wiesen die asTF-überexprimierenden Zellen ein von den Kontrollzellen divergentes Verhalten auf (Abbildung 16).



**Abbildung 16: AV-/PI-Apoptoseassay mit asTF $\uparrow$ -Zellen und Kontrollzellen.** Die asTF $\uparrow$ -Zellen (graue Balken) und die Kontrollzellen (weiße Balken) wurden über Nacht ausgehungert und über 5h mit Camptothecin (CPT) stimuliert. Anschließend wurde das Ausmaß an induzierter Apoptose mittels des AV-/PI-Assays im Durchflusszytometer bestimmt. Getrennt dargestellt werden hier AV-positive Zellen (a) und PI-positive Zellen (b). (n= 6; \*p<0,05; \*\*p<0,01)

Der Prozentsatz an AV-positiven Zellen war bei den stimulierten Kontrollzellen mit  $31,25 \pm 1,70$  % signifikant höher als bei den asTF $\uparrow$ -Zellen, welche nur zu  $18,98 \pm 1,78$  % AV-positiv waren. Auch der Anteil an PI-positiven Zellen war bei den Kontrollzellen höher als bei den asTF $\uparrow$ -Zellen ( $13,29 \pm 2,88$  % vs.  $5,25 \pm 0,68$  %).

Die asTF-Überexpression in HL-1 Zellen resultierte folglich in einer höheren Wachstumsrate sowie in einer erhöhten Resistenz der Zellen gegenüber der Induktion von Apoptose.

## 5.2. Die Bedeutung von asTF für die Signaltransduktion

Die Überexpression von asTF in den HL-1 Zellen hat, wie im vorherigen Kapitel gezeigt wurde, einen Einfluss auf das Proliferations- sowie auf das Apoptoseverhalten nach Stimulation mit TNF $\alpha$  oder Camptothecin.

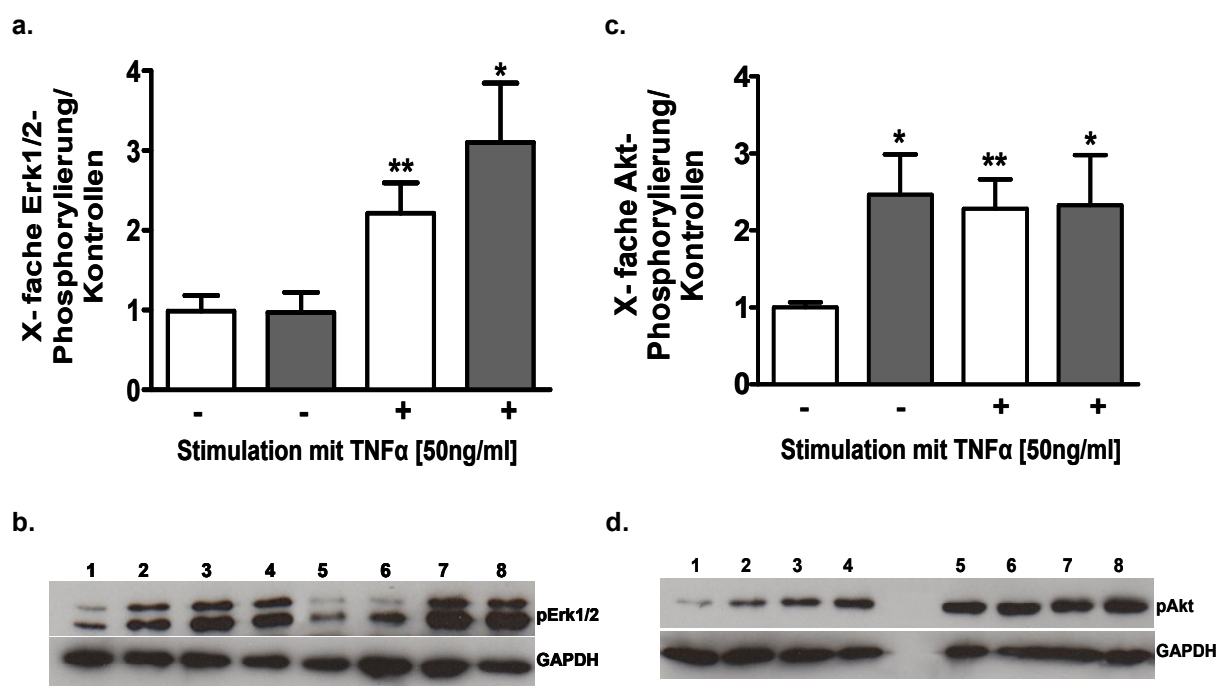
Dementsprechend wurde nun untersucht, über welche Signaltransduktionswege die asTF-Expression einen Einfluss auf die Vitalität der Zellen ausüben. Ferner wurde analysiert, ob die Expression der Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie in Abhängigkeit der asTF-Expression reguliert wurden.

### 5.2.1. Der Einfluss von asTF auf die Signaltransduktionswege Erk1/2 und PI3K/Akt

Im Folgenden wurde geklärt, ob an der durch asTF beeinflussten Proliferation und höheren Vitalität der Zellen die Aktivierung der Signaltransduktionswege Erk1/2 oder PI3K/Akt beteiligt waren.

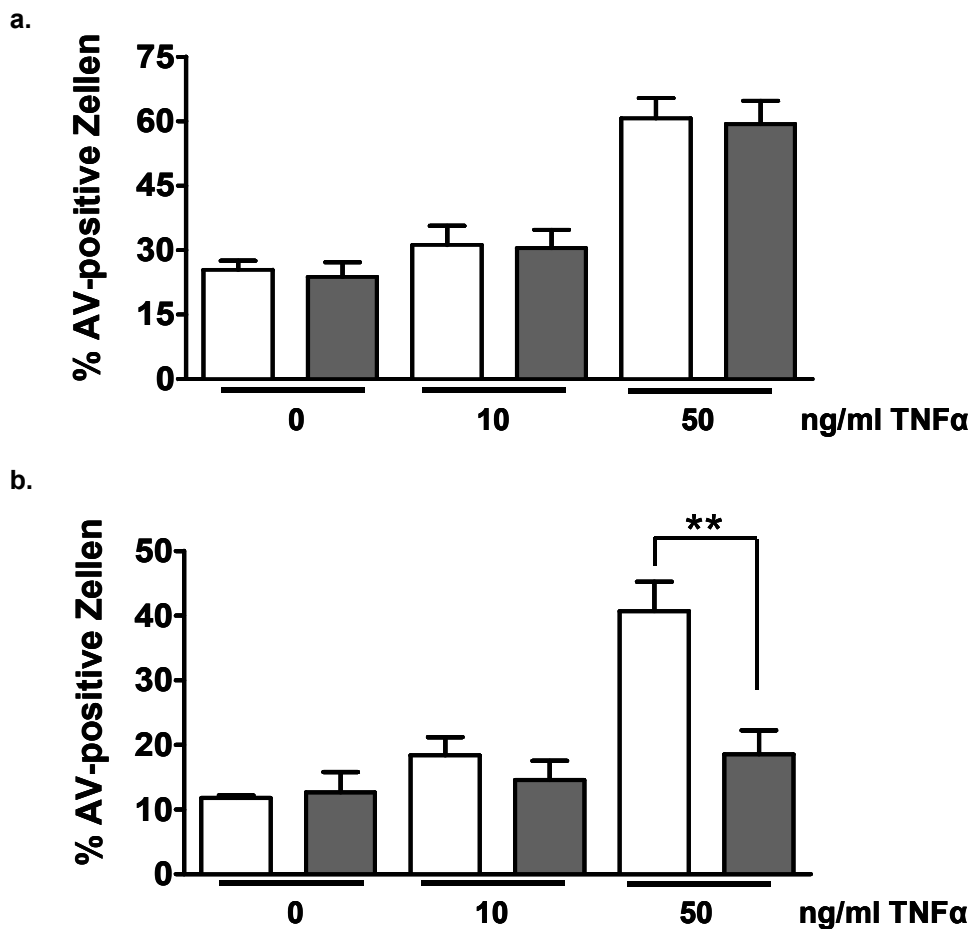
Nach der Stimulation mit TNF $\alpha$  zeigte sich sowohl in den asTF $\uparrow$ -Zellen als auch in den Kontrollzellen eine deutliche Zunahme an phosphoryliertem Erk1/2 (Abbildung 17a & b). Das Aktivierungsmuster des Akt-Signaltransduktionsweges war hingegen in den asTF $\uparrow$ -Zellen und Kontrollzellen unterschiedlich. Bei den Kontrollzellen kam es erst nach der TNF $\alpha$ -Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der Akt-Phosphorylierung. Die asTF $\uparrow$ -Zellen wiesen hingegen - stimuliert sowie unstimuliert - ein konstant hohes Phosphorylierungsniveau von Akt auf (Abbildung 17c & d).

Dies lässt vermuten, dass die kontinuierliche Aktivierung von Akt mit der asTF-Expression und möglicherweise mit dem durch asTF vermittelten Schutz vor Apoptose zusammenhängt.



**Abbildung 17: Erk1/2- und Akt-Phosphorylierung in TNF $\alpha$  stimulierten HL-1 Zellen.** **a:** Erk1/2-Phosphorylierung in den Kontrollzellen (weiße Balken) und in den asTF $\uparrow$ -Zellen (graue Balken). Die gemittelte optische Dichte der Proteinbanden (bestimmt mit der Gel-Pro Software) von unstimulierten Kontrollzellen wurde auf 1 gesetzt. (n=8; \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. Kontrolle) **b.** Repräsentativer Western Blot für die pErk1/2- und GAPDH-Expression (Spalten 1 & 2: unstimulierte Kontrollzellen; Spalten 3 & 4: TNF $\alpha$  (50ng/ml) stimulierte Kontrollzellen; Spalten 5 & 6: unstimulierte asTF $\uparrow$ -Zellen; Spalten 7 & 8: TNF $\alpha$  (50ng/ml) stimulierte asTF $\uparrow$ -Zellen). **c:** Akt-Phosphorylierung in den Kontrollzellen (weiße Balken) und asTF $\uparrow$ -Zellen (graue Balken). Die gemittelte optische Dichte der Proteinbanden von unstimulierten Kontrollzellen wurde auf 1 gesetzt. (n=6; \*p<0,05; \*\*p<0,01 vs. Kontrolle) **d.** Repräsentativer Western Blot für die pAkt- und GAPDH-Expression (Spalten siehe b).

Die Bestätigung, dass die Aktivierung des Akt-Signaltransduktionsweges in Zusammenhang mit dem an den asTF $\uparrow$ -Zellen beobachteten anti-apoptotischen Verhalten steht, wurde anhand des spezifischen Akt-Inhibitors Triciribine überprüft. Die mit Triciribine vorbehandelten asTF $\uparrow$ -Zellen wiesen kein von den Kontrollzellen abweichendes Verhalten auf (AV-positive asTF $\uparrow$ -Zellen vs. Kontrollzellen:  $59,34 \pm 5,44$  % vs.  $60,67 \pm 5,44$  %, Abbildung 18a). Bei den mit Triciribine behandelten HL-1 Zellen zeigte sich ein höherer Anteil an Phosphatidylserin-exponierenden Zellen. Schon ohne Stimulans stieg der Prozentsatz an AV-positive Zellen auf über  $25,62 \pm 1,84$  % an.



**Abbildung 18: AV-Apoptoseassay mit Triciribine vorbehandelten HL-1 Zellen.** Die asTF $\uparrow$ -Zellen (graue Balken) und die Kontrollzellen (weiße Balken) wurden vor der TNF $\alpha$ -Stimulation mit 2 $\mu$ M Triciribine inkubiert (30min). Anschließend wurde der AV-Apoptoseassay durchgeführt (a). Parallel dazu wurden ebenfalls Zellen ohne Triciribine-Vorinkubation stimuliert (b). (n=6; \*\*p<0,01)

AsTF $\uparrow$ -Zellen, die nicht mit Triciribine behandelt wurden, zeigten sich, wie bereits zuvor nachgewiesen, nahezu resistent gegenüber der Induktion von Apoptose (Abbildung 18b & 14a).

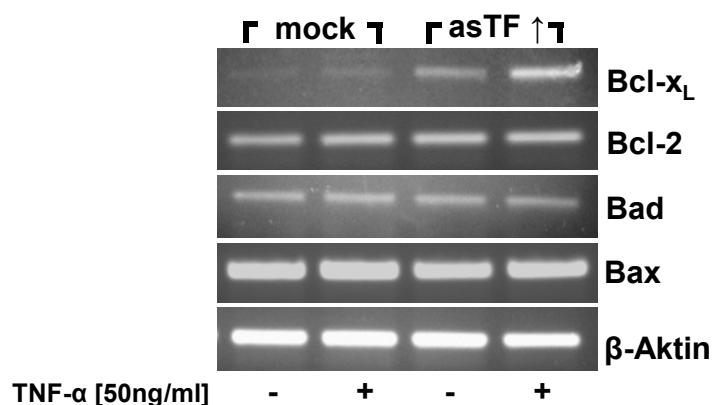
Durch die Versuche mit Triciribine wurde bestätigt, dass die Aktivierung von Akt an dem asTF-vermittelten Schutz der Zellen vor TNF $\alpha$ - und vor Camptothecin-induzierter Apoptose beteiligt ist.

### 5.2.2. Die Expression von Bcl-2 Proteinen in HL-1 Zellen

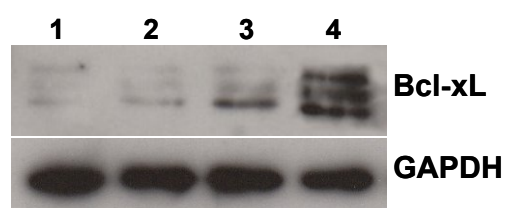
Um zu klären, in welchem Ausmaß das Expressionsgleichgewicht in der Bcl-2 Proteinfamilie verändert war, wurde das Expressionsniveau von verschiedenen Bcl-2 Proteinen gemessen. Zunächst wurde die Genexpression von anti-apoptotischem Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 sowie von pro-apoptotischem Bad und Bax bestimmt.

Nach TNF $\alpha$ -Stimulation wurde in den asTF $\uparrow$ -Zellen ein Expressionsanstieg des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x<sub>L</sub> nachgewiesen (Abbildung 19a). Die Expression von Bcl-2, Bad und Bax blieb hingegen unverändert. In den Kontrollzellen hatte die Stimulation mit TNF $\alpha$  keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten Bcl-2 Proteine.

a.



b.



**Abbildung 19: Gen- und Protein-Expression von Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilie.**

**a.** Repräsentative Genexpression von Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, Bad, Bax und  $\beta$ -Aktin in den Kontrollzellen (mock) und asTF $\uparrow$ -Zellen (asTF $\uparrow$ ) vor und nach TNF $\alpha$ -Stimulation (50ng/ml, 6h). **b.** Proteinexpression von Bcl-x<sub>L</sub> und GAPDH in Kontrollzellen (1 = unstimuliert; 2 = TNF $\alpha$ -stimuliert) und in asTF $\uparrow$ -Zellen (3 = unstimuliert; 4 = TNF $\alpha$ -stimuliert).

Die auf Genebene ermittelte Hochregulation von Bcl-x<sub>L</sub> war ebenso auf Proteinebene zu detektieren, wie anhand des in Abbildung 19b dargestellten repräsentativen Western Blots ersichtlich wird.



Die Bcl-x<sub>L</sub>-Spleißvariante Bcl-x<sub>S</sub>, die im Gegensatz zu Bcl-x<sub>L</sub> pro-apoptotisch ist, konnte weder auf Gen- noch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

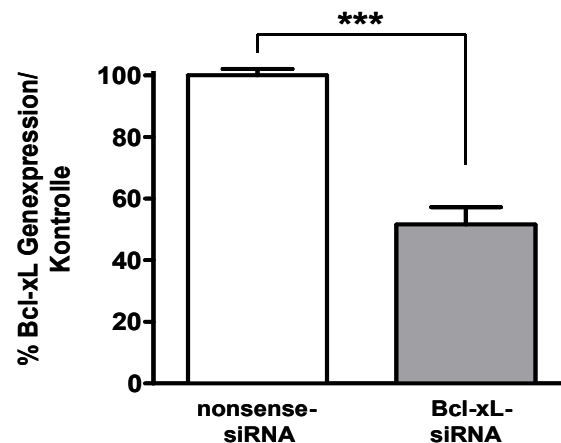
Da bezüglich der Expression von Bad nicht nur die mRNA-Expression entscheidend ist, sondern der Phosphorylierungszustand des Proteins, wurden mit TNF $\alpha$ -stimulierten HL-1 Zellen (asTF $\uparrow$ -Zellen sowie Kontrollzellen) Western Blots durchgeführt. Phosphoryliertes Bad war nicht detektierbar.

Die Untersuchung zu den Bcl-2 Proteine ergab, dass die Hochregulation von Bcl-x<sub>L</sub> in Kombination mit dem ansonsten gleichbleibenden Expressionsniveau der pro-apoptotischen Mitglieder das Gleichgewicht in der Bcl-2-Familie veränderte. Die Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der Expression der anti-apoptotischen Mitglieder scheint ein durch die Überexpression von asTF beeinflusster Effekt zu sein.

### **5.2.3. Die Beteiligung von Bcl-x<sub>L</sub> an der asTF vermittelten anti-apoptotischen Wirkung**

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, übt die Überexpression von asTF einen Einfluss auf die Transkription und Translation von Bcl-x<sub>L</sub> aus. Um diesen kausalen Zusammenhang zu verifizieren, wurde die Bcl-x<sub>L</sub>-Expression in den HL-1 Zellen mit einer Bcl-x<sub>L</sub> spezifischen siRNA herunterreguliert.

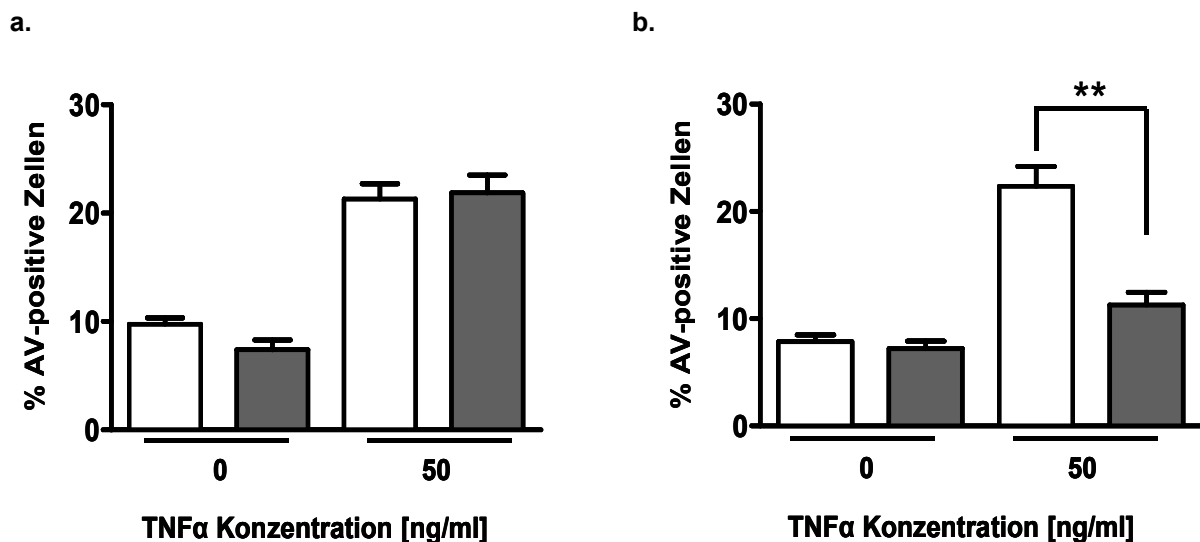
Die mittels einer fluoreszenzmarkierten nonsense-siRNA ermittelte Transfektions-effizienz betrug  $81,22 \pm 6,96$  % (n=6; p<0,05). Zudem wurde die Effektivität der siRNA mittels der quantitativen Messung der Bcl-x<sub>L</sub> Genexpression bestimmt. Diese konnte auf  $51,5 \pm 5,67$  % (n=4, p<0,001) der normalen Expression herunterreguliert werden (Abbildung 20). Das Bcl-x<sub>L</sub> Expressionsniveau von den mit der nonsense-siRNA transfizierten Zellen entsprach demjenigen der untransfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 20: Herunterregulation der Bcl-x<sub>L</sub>-Expression.** HL-1 Zellen wurden mit nonsense-siRNA oder mit Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA transfiziert. Die Bcl-x<sub>L</sub>-Expression wurde durch TaqMan® RealTime PCR, bei der ein spezifischer Genexpressionsassay verwendet wurde, bestimmt und auf die 18s-Expression bezogen. Die gemittelte Expression von Bcl-x<sub>L</sub> in den Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt. (n=4; \*\*\*p<0,001)

Mit den Zellen, in denen die Bcl-x<sub>L</sub>-Expression herunterreguliert war, wurde ein Annexin-V-Apoptoseassay durchgeführt.

Die als Kontrolle verwendete nonsense-siRNA hatte keinen Einfluss auf den durch asTF-vermittelten Schutz vor Apoptose.



**Abbildung 21: AV-Apoptoseassay von HL-1 Zellen, die zuvor mit siRNA transfiziert wurden.** Die asTF<sup>↑</sup>-Zellen (graue Balken) und die Kontrollzellen (weiße Balken) wurden mit Bcl-x<sub>L</sub>-siRNA (a) und als Negativkontrolle mit nonsense-siRNA (b) transfiziert. Anschließend erfolgten eine Stimulation mit 50ng/ml TNFα (17h lang) sowie ein AV-Apoptoseassay. (n=8; \*\*p<0,01)

Nach TNF $\alpha$ -Stimulation waren signifikant weniger asTF $\uparrow$ -Zellen AV-positiv als Kontrollzellen ( $11,26 \pm 1,20$  % vs.  $22,35 \pm 1,83$  %;  $p < 0,01$ ; Abbildung 21b).

Abweichend verhielten sich die asTF $\uparrow$ -Zellen, in denen Bcl-x $_L$  herunterreguliert worden war. Resultierend aus der niedrigeren Bcl-x $_L$ -Expression wiesen stimulierte asTF $\uparrow$ -Zellen einen sehr ähnlichen Prozentsatz an AV-positiv Zellen auf wie stimulierte Kontrollzellen ( $21,28 \pm 1,42$  % vs.  $21,85 \pm 1,65$  %). Apoptose war somit nach erfolgter Bcl-x $_L$ -Herunterregulation in den asTF $\uparrow$ -Zellen genau im gleichen Ausmaß induzierbar wie in den Kontrollzellen (Abbildung 21a).

### 5.3. *Ex vivo* - Versuche

Im nachfolgenden Kapitel wurden die bereits anhand der HL-1 Zelllinie gewonnenen Erkenntnisse an murinen embryonalen Kardiomyozyten *ex vivo* nachvollzogen.

Zunächst wurde das Protokoll für die Isolation von embryonalen Kardiomyozyten optimiert und der Prozentsatz an Kardiomyozyten in der Primärkultur bestimmt.

Um den Einfluss von asTF in primären Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden die primären Zellen mit dem asTF-Expressionsplasmid transfiziert. Anschließend wurde das Verhalten der transfizierten Zellen bei Induktion von Apoptose analysiert. Dabei wurde das Ausmaß an induzierter Apoptose in den primären Zellen gemessen und die Genexpression von Akt und verschiedener Bcl-2 Proteinen bestimmt.

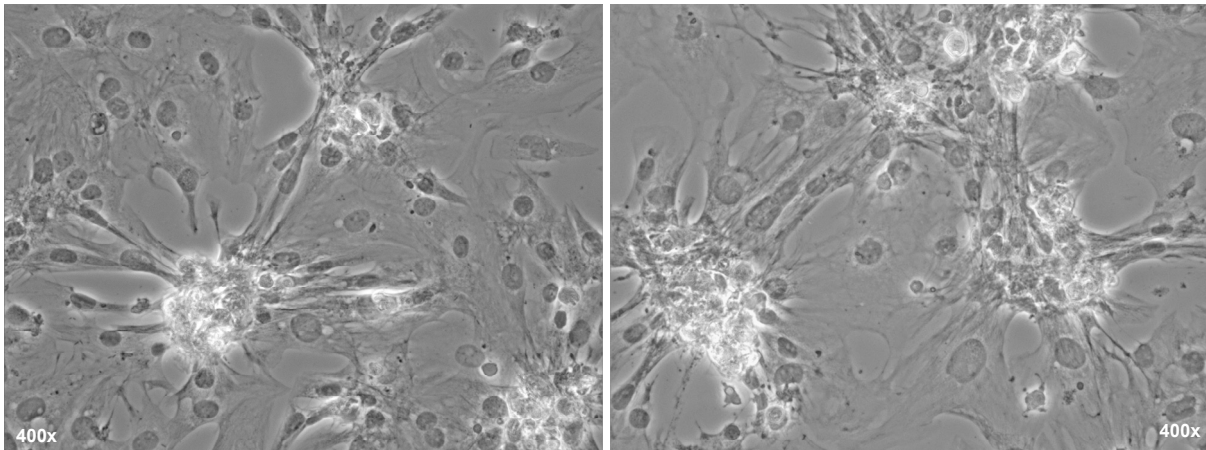
Die Bedeutung von TF für Herzmuskelzellen wurde zusätzlich an embryonalen Kardiomyozyten aus transgenen Mäusen dargestellt, die einen kardiomyozytenspezifischen TF Knockout besaßen.

#### 5.3.1. Die Isolation von primären murinen Kardiomyozyten und die Transfektion mit dem asTF-Expressionsplasmid

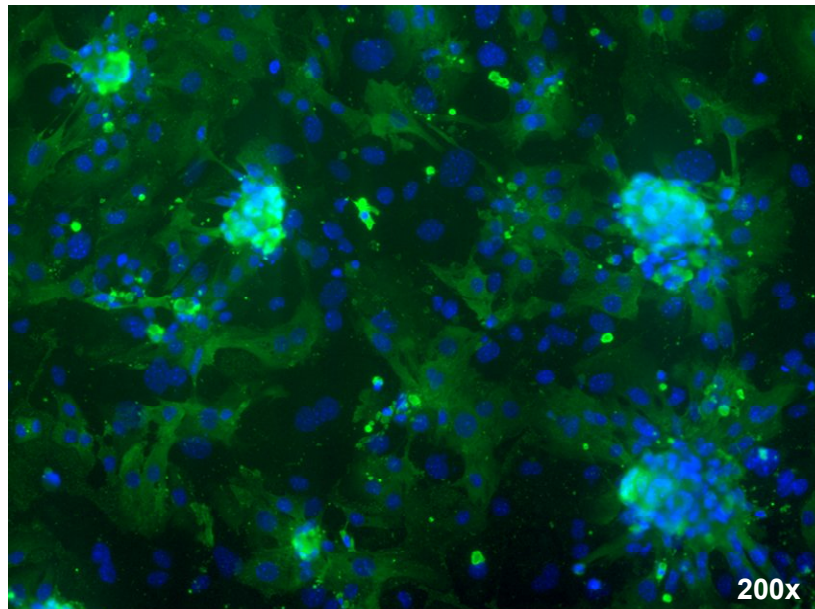
Die isolierten Kardiomyozyten fingen ca. 3 Tage nach erfolgter Isolation an, sich zu kontrahieren. Der Tonus variierte auch bei Zellen, die im selben Loch einer 12er-Lochplatte ausgesät worden waren. Bei sämtlichen Untersuchungen blieb die Kontraktionstätigkeit der Zellen erhalten.

In Abbildung 22a sind Phasenkontrastaufnahmen von den isolierten Zellen dargestellt. Unter Verwendung eines kardiomyozytenspezifischen Antikörpers wurde der Anteil an Kardiomyozyten in der Primärkultur bestimmt. Die Kultur bestand zu  $63,6 \pm 1,55$  % (n=7) aus Kardiomyozyten (Abbildung 22b).

a.

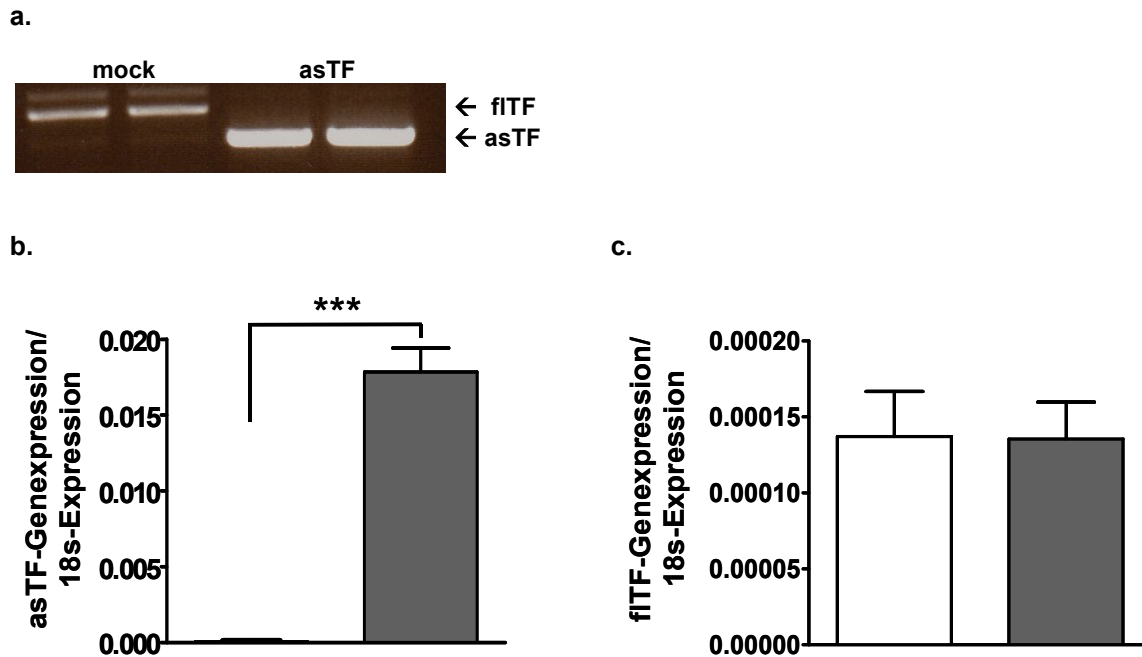


b.



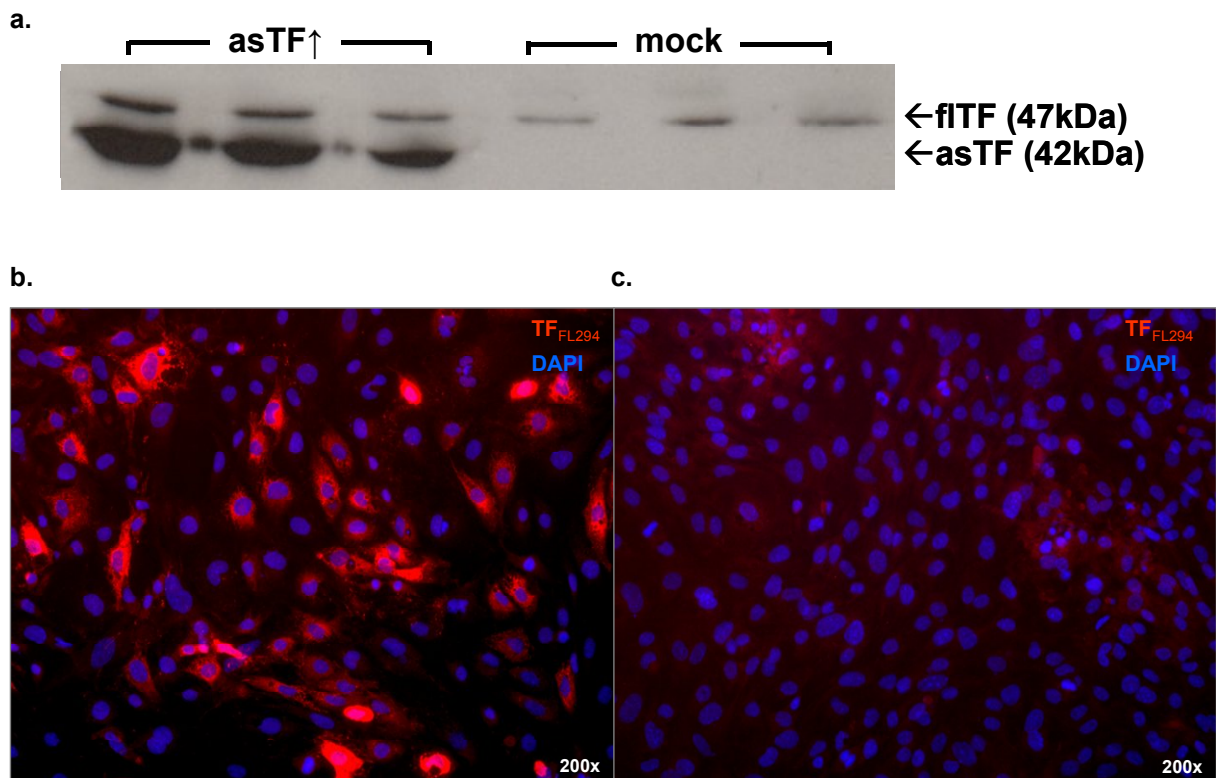
**Abbildung 22: Isolierte murine embryonale Kardiomyozyten.** a. Phasenkontrastaufnahme von primären murinen Kardiomyozyten, 400-fach vergrößert. b. Immunfluoreszenzfärbung von primären murinen Kardiomyozyten, bei welcher der gegen kardiales Myosin gerichtete Antikörper MF20 verwendet wurde (1:20, 2. Antikörper: MFP488-markiert (grün)) und DAPI-Kernfärbung (blau), 200-fach vergrößert.

Die semiquantitative sowie quantitative Messung der asTF-Expression bestätigte die erfolgreiche Überexpression in den primären Zellen (Abbildung 23a & b.) Die asTF-transfizierten Zellen zeigten eine mehr als 500-fache Überexpression auf mRNA-Ebene ( $n=3$ ,  $p<0,001$ ). In den asTF-überexprimierenden Zellen betrug die mRNA-Expression von asTF das ca. 130-fache der flTF-Expression ( $0,018 \pm 0,002$  vs.  $0,00014 \pm 0,00002$  relative Genexpression bezogen auf 18s).



**Abbildung 23: Überexpression von asTF in primären murinen embryonalen Kardiomyozyten auf mRNA-Ebene.** a. Aufgetrennte PCR-Amplifikate, bei deren Generierung Primer benutzt wurden (TF-For und TF-Rev, Tabelle 2), die der Darstellung beider Isoformen dienen. Die fITF-Amplifikate haben eine Länge von 578bp, die asTF-Amplifikate von 418bp. Ferner wurde die Expression von asTF (b.) und fITF (c.) bei den asTF-überexprimierenden Zellen (graue Balken) und den mock-transfizierten Kontrollzellen (weiße Balken) anhand von TaqMan® RealTime PCR mit jeweils spezifischen Assays bestimmt (n=3, \*\*\*p<0,001).

Die asTF-Überexpression wurde auf Proteinebene bestätigt. Im Western Blot wurde die 47kDa große Proteinbande der fITF-Isoform sichtbar. Bei den asTF-transfizierten Zellen wurde zusätzlich die Bande der asTF-Isoform auf der Höhe von 42kDa detektiert, die bei den mock-transfizierten Zellen nicht nachzuweisen war (Abbildung 24a).



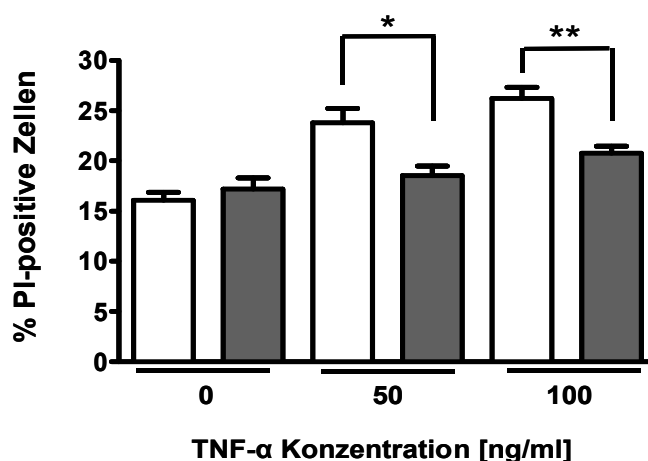
**Abbildung 24: Überexpression von asTF in primären murinen embryonalen Kardiomyozyten auf Proteinebene.** Western Blot mit asTF-transfizierten Zellen (asTF↑) und mock-transfizierten Zellen (mock) (a). Die flTF-Bande liegt bei 47kDa, die asTF-Bande bei 42kDa. Immunfluoreszenzfärbungen von asTF-transfizierten Zellen (b) und mock-transfizierten Zellen (c). Verwendet wurde ein gegen beide TF-Isoformen gerichtete Antikörper (TF<sub>FL294</sub>, 1:20, 2. Antikörper: MFP555-markiert) und eine DAPI-Kernfärbung (blau).

Anhand der Immunfluoreszenzfärbungen ist ersichtlich, dass TF auch in den mock-transfizierten Zellen exprimiert war (Abbildung 24c). In den asTF-transfizierten Zellen waren die Zellen deutlich stärker angefärbt. Dies verifiziert erneut, dass asTF erfolgreich in den primären Zellen überexprimiert wurde. Die Transfektionseffizienz des asTF-Plasmids in den primären Zellen betrug  $61,9 \pm 5,39 \%$  (n=5).

### 5.3.2. Das Apoptoseverhalten der asTF-überexprimierenden primären murinen Kardiomyozyten

Im folgenden Kapitel wird das Apoptoseverhalten der mit dem asTF-Plasmid transfizierten embryonalen Kardiomyozyten entsprechend der Versuchen mit HL-1 Zellen dargestellt.

Gemessen am AV-/PI-Apoptoseassays wurde kein Unterschied zwischen asTF-überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen detektiert. Die Zellen wiesen bereits unstimuliert einen sehr hohen Prozentsatz an AV-positiven Zellen auf (ca. 40 %, Daten nicht gezeigt). Lediglich bei der PI-Färbung wurde ein Unterschied zwischen den asTF $\uparrow$ -Zellen und den Kontrollzellen deutlich (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Propidiumiodid (PI)-Assay mit asTF-überexprimierenden und mock-transfizierten primären Kardiomyozyten.** Die asTF-überexprimierenden Zellen (graue Balken) und die mock-transfizierten Zellen (weiße Balken) wurden 2h ausgehungert und über 4h mit TNF $\alpha$  stimuliert. Anschließend wurde das Ausmaß an PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. (n= 4; \*p<0,05; \*\*p<0,01)

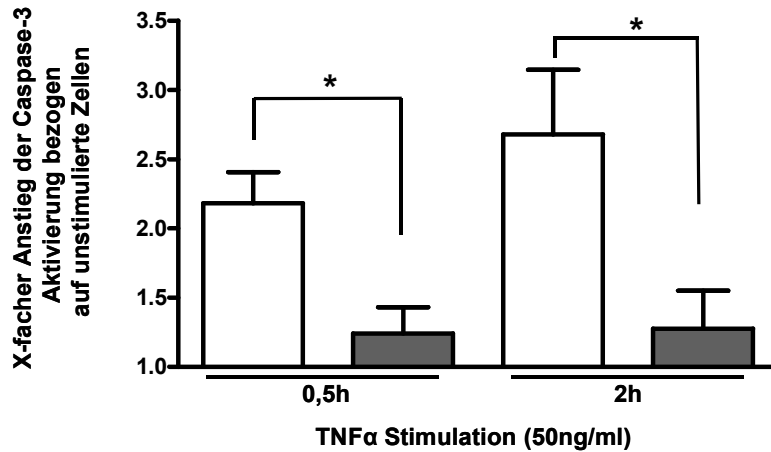
Die asTF-überexprimierenden Zellen waren in einem geringeren Prozentsatz PI-positiv als die Kontrollzellen (Abbildung 25). Dies zeigte sich bei der Stimulation mit 50ng/ml TNF $\alpha$  (18,52  $\pm$  0,96 % vs. 23,78  $\pm$  1,42 % PI-positive Zellen), sowie auch bei Stimulation mit 100ng/ml TNF $\alpha$  (20,73  $\pm$  0,73 % vs. 26,21  $\pm$  1,11 % PI-positive Zellen).

Dass bereits ein hoher Prozentsatz der Kardiomyozyten nach der Isolation Phosphatidylserin und PI aufwies verdeutlicht, dass dieser Assay nicht für die Messung von Apoptose in primären Kardiomyozyten geeignet war. Die Untersuchung

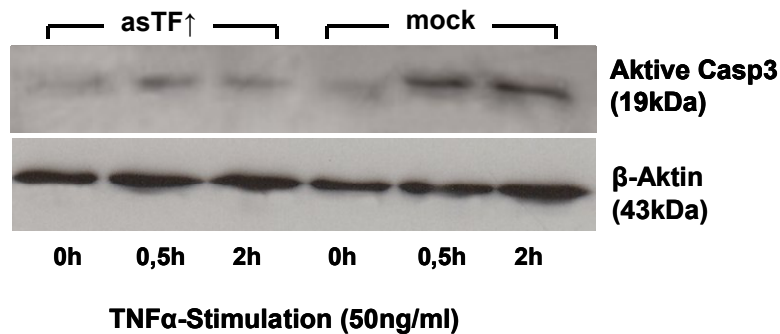


der Aktivierung von Caspase-3 erwies sich hingegen als adäquate Methode zur Bestimmung des Apoptoseverhaltens von primären Zellen (Abbildung 26).

a.



b.



**Abbildung 26: Apoptoseinduktion in primären Kardiomyozyten.** a. Dargestellt ist die Caspase-3-Aktivierung in den Kontrollzellen (weiße Balken) und in den asTF-überexprimierenden Zellen (graue Balken). Die gemittelte optische Dichte der Proteinbanden von unstimulierten Zellen wurde auf 1 gesetzt. (n=5; \*p<0,05) b. Repräsentativer Western Blot für die aktive Caspase-3-Expression (Aktive Casp3). (mock= mock-transfizierte Zellen, asTF↑= asTF-überexprimierende Zellen)

Der Anstieg der Aktivierung von Caspase-3 betrug bei den asTF↑-Zellen das  $1,24 \pm 0,19$  fache (30min Stimulation) bzw. das  $1,28 \pm 0,27$  fache (2h Stimulation). Im Gegensatz dazu stieg die Aktivierung von Caspase-3 in den mock-transfizierten Zellen signifikant an. Bezogen auf die unstimulierten Zellen wiesen sie das  $2,2 \pm 0,23$  fache (30min Stimulation) bzw. das  $2,7 \pm 0,47$  fache (2h Stimulation) an aktiver Caspase-3 auf.

Die asTF-überexprimierenden Zellen zeigten folglich auch in den primären Kardiomyozyten eine erhöhte Resistenz gegenüber der Induktion von Apoptose.

### 5.3.3. Die Genexpression von Bcl-2 Proteinen und Akt in den asTF-überexprimierenden Kardiomyozyten

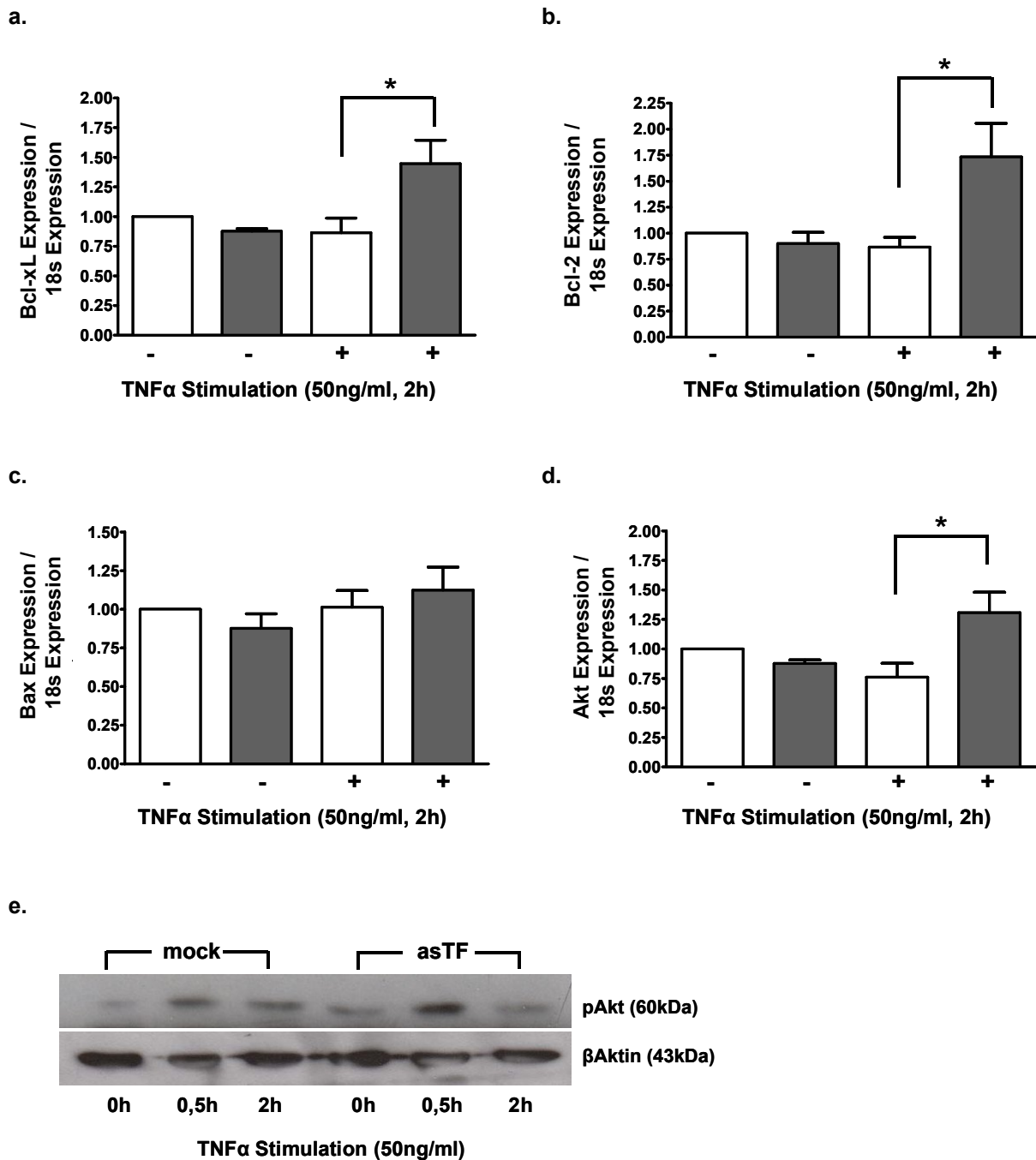
Die asTF-Überexpression resultierte auch in primären Kardiomyozyten in einem stärkeren Schutz dieser Zellen vor TNF $\alpha$ -induzierter Apoptose.

Im Weiteren wurde nun untersucht, ob an dem Schutz der primären Kardiomyozyten gegen die Induktion von Apoptose die gleichen Signaltransduktionswege und Proteine beteiligt sind wie in HL-1 Zellen. Daher wurde die Aktivierung des Akt-Signaltransduktionswegs analysiert und die Genexpression verschiedener Bcl-2 Proteine bestimmt.

Die Expression der Bcl-2 Proteine Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2 und Bax blieb in den mock-transfizierten Kontrollzellen nach der TNF $\alpha$ -Stimulation unverändert (Abbildung 27a-c). Bei den asTF-überexprimierenden embryonalen Kardiomyozyten hingegen führte die TNF $\alpha$ -Stimulation zu einer gesteigerten Expression von anti-apoptotischem Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 ( $1,45 \pm 0,20$  fache und  $1,73 \pm 0,32$  fache Expression, Abbildung 27a & b).

Auch die Expression von Gesamt-Akt stieg signifikant um das  $1,31 \pm 0,17$  fache an (Abbildung 27d). Anhand von Western Blots zeigte sich zudem, dass Akt in den stimulierten asTF-überexprimierenden Zellen eine stärkere Phosphorylierung aufwies und damit stärker aktiviert war (Abbildung 27e).

Demzufolge scheinen der Akt-Signaltransduktionsweg sowie das veränderte Expressionsniveau von Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 auch *ex vivo* mit der asTF vermittelten Wirkung assoziiert zu sein. In den primären Zellen beeinflusste die asTF-Überexpression die Expression von mindestens zwei anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen.



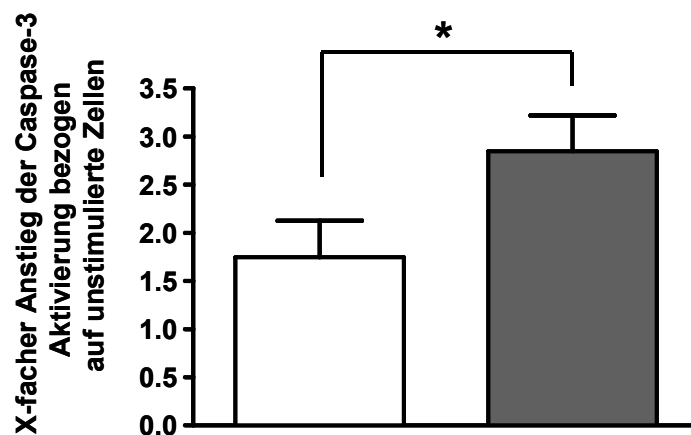
**Abbildung 27: Expression von Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, Bax und Gesamt-Akt in stimulierten asTF-überexprimierenden primären Kardiomyozyten.** Isolierte primäre Kardiomyozyten wurden transient mit dem asTF-Plasmid transfiziert (graue Balken); als Kontrolle dienten mit dem mock-Plasmid transfizierte Zellen (weiße Balken). Nach 2h Stimulation mit TNF $\alpha$  (50ng/ml) wurde die Genexpression von Bcl-x<sub>L</sub> (a.), Bcl-2 (b.), Bax (c.) und Akt (d.) anhand spezifischer Assays durch TaqMan® RealTime PCR bestimmt (n=6; \*p<0,05). Außerdem wurde die Phosphorylierung von Akt exemplarisch mittels eines Western Blots bestimmt. Dabei wurde ein Antikörper verwendet, der nur die phosphorylierte Form von Akt detektiert (e.) (mock= mock-transfizierte Zellen, asTF= asTF-überexprimierende Zellen).

### 5.3.4. Das Apoptoseverhalten von embryonalen Kardiomyozyten mit TF-Knockout

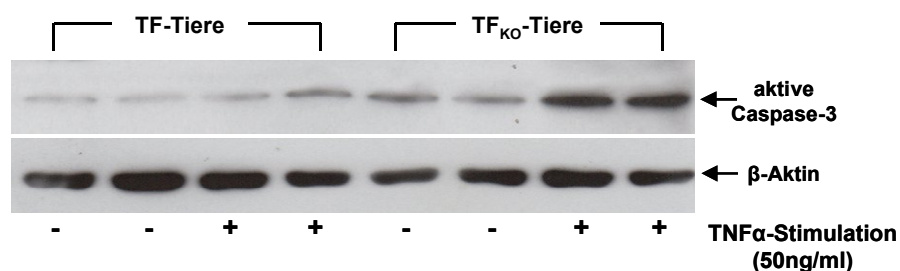
In den vorherigen Kapiteln wurden die Auswirkungen der asTF-Überexpression auf die Vitalität von Kardiomyozyten untersucht. Im Folgenden wird anhand von transgenen Mäusen mit kardiomyozytenspezifischem Knockout geklärt, ob ein kardiomyozytärer TF-Knockout das Überleben der Zellen beeinträchtigt.

Die Isolation der embryonalen Kardiomyozyten mit dem TF-Knockout erfolgte analog zu der Kardiomyozyten-Isolation aus Wildtyp-Tieren. Als Kontrollen dienten Geschwister-Embryonen, in denen TF normal abgelesen und exprimiert wurde.

a.



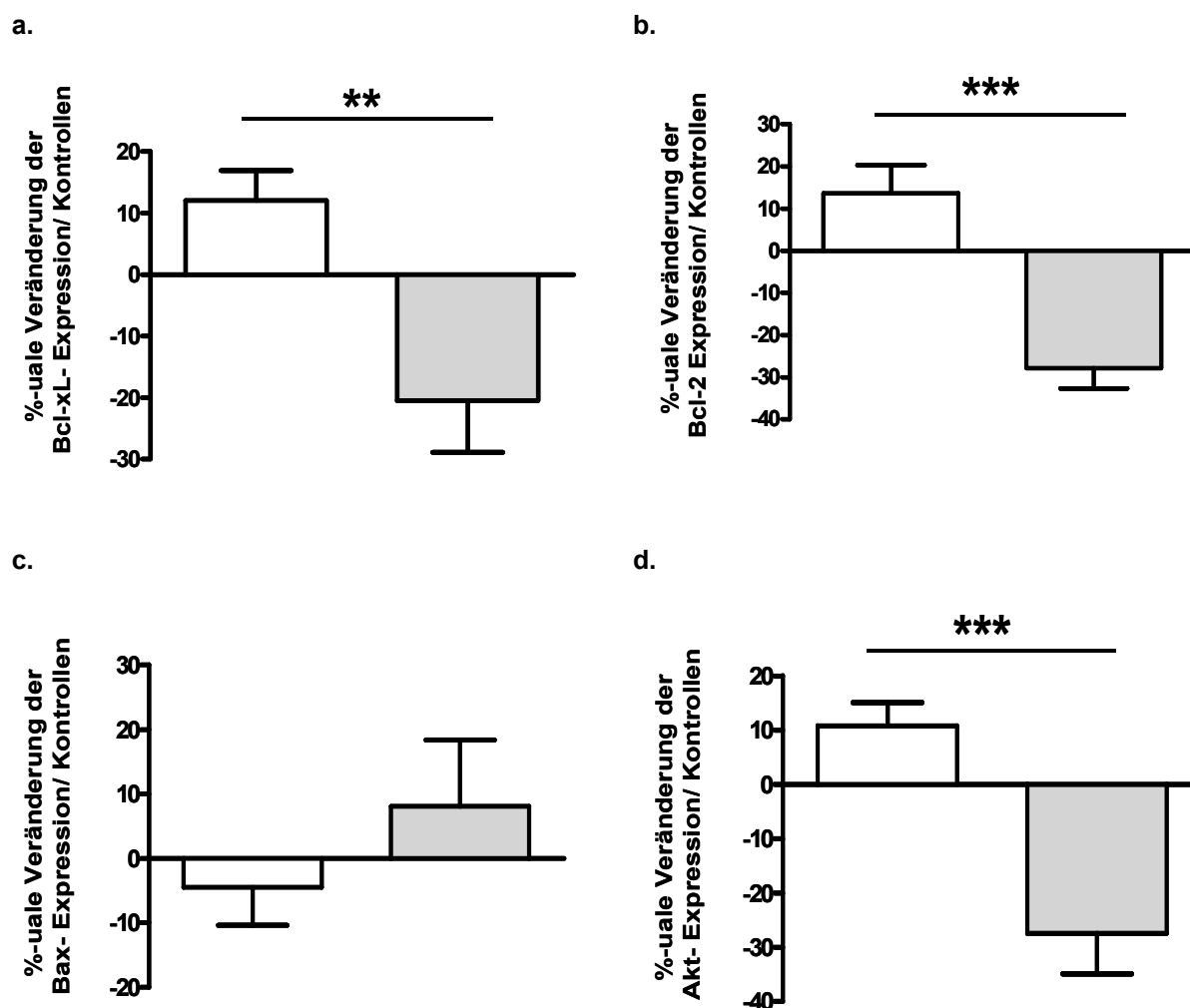
b.



**Abbildung 28: Apoptoseinduktion in primären Kardiomyozyten mit TF-Knockout.** a. Dargestellt ist die Caspase-3-Aktivierung in den Kontrollzellen (weißer Balken) und in den TF-Knockout Zellen (grauer Balken) nach TNF $\alpha$ -Stimulation. Die gemittelte optische Dichte der Proteinbanden von unstimulierten Zellen wurde auf 1 gesetzt. (n=4; \*p<0,05) b. Repräsentativer Western Blot für die aktive Caspase-3-Expression.

Analog zu den vorherigen Versuchen an primären Kardiomyozyten wurde die Genexpression von Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, Bax und Gesamt-Akt bestimmt (Abbildung 29).

In den Kardiomyozyten mit TF Knockout sank die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 infolge der TNF $\alpha$ -Stimulation signifikant ab (Abbildung 29a & b). Auch Gesamt-Akt wurde nach der Stimulation in TF-Knockout-Zellen auf deutlich geringerem Niveau exprimiert (Abbildung 29d). Die Expression von Bax änderte sich hingegen nicht signifikant.



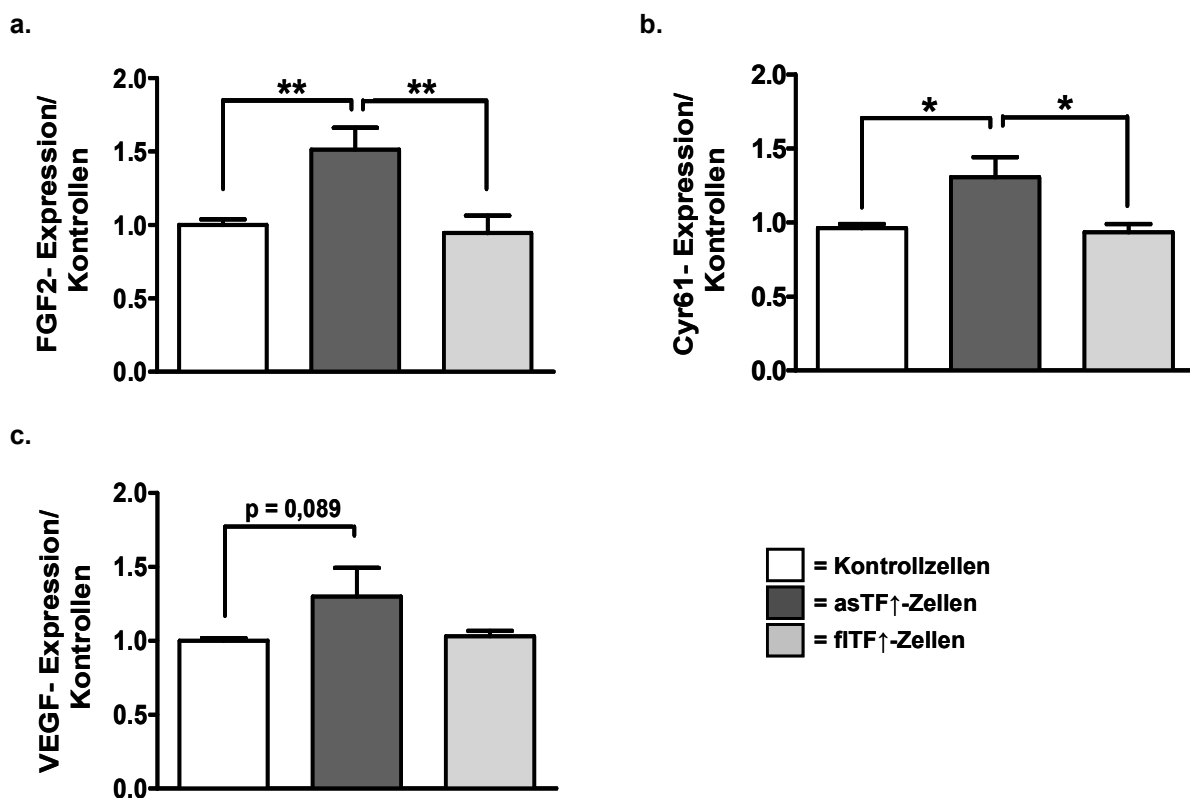
**Abbildung 29: Expression von Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-2, Bax und Gesamt-Akt in stimulierten primären Kardiomyozyten mit TF-Knockout.** Isolierte primäre Kardiomyozyten mit TF-Knockout (hellgraue Balken), sowie Kontrollzellen ohne Knockout (weiße Balken) wurden 2h mit TNF $\alpha$  (50ng/ml) stimuliert. Die Genexpression von Bcl-x<sub>L</sub> (a.), Bcl-2 (b.), Bax (c.) und Akt (d.) wurde anhand spezifischer Assays durch TaqMan® RealTime PCR bestimmt und jeweils auf die Expression der unstimulierten Zellen bezogen. (n=8; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001)

Anhand der Experimente mit primären Kardiomyozyten, die einen TF-Knockout aufwiesen, wurde erneut deutlich, dass die TF-Expression mit der Expression von anti-apoptotischen Proteinen korrelierte. Die Zellen mit dem TF-Knockout reagierten auf die TNF $\alpha$ -Stimulation sensibler und wurden zu einem höheren Anteil apoptotisch als die Kontrollzellen.

## 5.4. Der Einfluss von asTF auf die Expression von pro-angiogenen Proteinen

In diesem Kapitel wird beschrieben, inwieweit die Expression von asTF bzw. flTF die Expression von Angiogenese-assoziierten Proteinen beeinflusste.

Die Genexpression von FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2), Cyr61 und von VEGF (vascular endothelial growth factor) wurde in asTF-überexprimierende und in flTF-überexprimierenden HL-1 Zellen gemessen und auf die Expression der mit dem Leerplasmid transfizierten HL-1 Kontrollzellen bezogen.



**Abbildung 30: Expression von Angiogenese-assoziierten Proteinen in HL-1 Zellen.** AsTF-überexprimierende HL-1 Zellen (asTF $\uparrow$ -Zellen), flTF-überexprimierende Zellen (flTF $\uparrow$ -Zellen) und Kontrollzellen wurden verglichen. Die Expression von FGF-2 (a), Cyr61 (b) und VEGF (c) wurde durch TaqMan $\text{\textcircled{R}}$  RealTime PCR mit einem spezifischen Genexpressions-Assay bestimmt und auf die 18s-Expression bezogen. Die gemittelte Expression in den Kontrollzellen wurde auf 1 gesetzt. (n=8; \*p<0,05; \*\*p<0,01)

Die asTF-überexprimierenden HL-1 Zellen zeigten im Vergleich mit den Kontrollzellen eine signifikant erhöhte Expression von FGF-2 und Cyr61. Die FGF-2-Expression stieg bei erhöhter asTF-Expression um das  $1,5 \pm 0,2$  fache, die Cyr61-um das  $1,3 \pm 0,1$  fache an. Der mRNA-Level von VEGF zeigte sich in den asTF-überexprimierenden Zellen tendenziell nach erhöht ( $p=0,089$ ).

Im Gegensatz zu der asTF-Expression hatte eine gesteigerte flTF-Expression keinen Einfluss auf die Transkription von FGF-2, Cyr61 und VEGF.

Das mRNA-Expressionsniveau von FGF-2 und Cyr61 korrelierte mit dem von asTF. Zwischen der Wirkung von asTF und derjenigen von flTF auf die Genexpression der hier untersuchten Angiogenese-assoziierten Proteine bestand ein signifikanter Unterschied.

Folglich könnte asTF neben seinem Einfluss auf das Überleben der Kardiomyozyten auch eine wichtige Bedeutung für die Angiogenese haben.



## 6. Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass asTF eine wichtige Bedeutung für Kardiomyozyten sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* besitzt. Die asTF-Überexpression führt zu einer erhöhten Resistenz der Kardiomyozyten gegenüber der Induktion von Apoptose. Beteiligt an der Wirkung von asTF sind der Akt-Signaltransduktionsweg und die Veränderung des Gleichgewichts der pro- und anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie. In kardiomyozytären Zellen scheint die Hochregulation von Bcl-x<sub>L</sub> relevant für die asTF-vermittelte höhere Vitalität der Kardiomyozyten zu sein. In primären embryonalen Kardiomyozyten ist zusätzlich zu Bcl-x<sub>L</sub> auch Bcl-2 in den asTF-induzierten Schutz der Zellen vor Apoptose involviert.

Weiterhin scheint asTF nicht nur an der Regulierung von apoptotischen Abläufen beteiligt zu sein, sondern auch einen Einfluss auf Angiogenese-assoziierte Proteine auszuüben.

### 6.1. Der Einfluss der asTF-Expression auf die Proliferation und die Vitalität der HL-1 Kardiomyozyten

#### 6.1.1. Die stabile Überexpression von asTF in HL-1 Zellen

TF wird zusätzlich zu seiner zentralen Rolle bei der Blutkoagulation und Hämostase mit verschiedenen physiologischen und zellulären Vorgängen in Verbindung gebracht (Eilertsen & Osterud 2004; Mackman, 2009; Pawlinski et al., 2004). Bisherige Forschungserkenntnisse basieren fast ausschließlich auf Untersuchungen der fTF-Isoform. Über die Bedeutung und Funktion der 2003 erstmals beschriebenen asTF-Isoform (Bogdanov et al., 2003) ist wenig bekannt. Erste Arbeiten und Veröffentlichungen beschäftigten sich mit der pro-koagulativen Eigenschaft von asTF, die kontrovers diskutiert wurde (Butenas & Mann, 2004; Mackman, 2007). Mittlerweile wird eine pro-koagulative Wirkung von asTF angenommen, die jedoch nicht so ausgeprägt wie die von fTF ist (Szotowski et al., 2005b; Bogdanov et al., 2003). In neueren Untersuchungen zur physiologischen Funktion von asTF wird dessen proliferativer und pro-angiogener Einfluss auf Tumorzellen beschrieben (He et al., 2008; Hobbs et al., 2007; Signaevsky et al., 2008).

Die in Tumorzellen unerwünschte Eigenschaft von asTF könnte in anderen Zellpopulationen von großem Nutzen sein. Daher ist es von großem Interesse zu klären, ob asTF im Herzen ebenfalls die Angiogenese, das Wachstum und die Vitalität der Zellen beeinflusst.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, um diese Wirkung von asTF zu untersuchen, eine asTF-überexprimierende kardiomyozytäre HL-1 Zelllinie konstruiert. HL-1 Zellen zeigen bei konfluentem Wachstum die Fähigkeit der Kontraktion. Im Vergleich zu anderen immortalisierten Zellen weisen HL-1 Zellen wichtige Vorteile auf. Durch das Passagieren der Zellen gehen deren phänotypische und kardiomyozytenspezifische Charakteristika nicht verloren (Claycomb et al., 1998). Aufgrund dieser Eigenschaften sind HL-1 Zellen hervorragend für die Erforschung von Kardiomyozyten *in vitro* geeignet.

Die erfolgreiche Überexpression von asTF in den HL-1 Zellen wurde auf Protein- und auf Genebene nachgewiesen (Abbildung 9). Die Gen- und Aminosäuresequenz entsprach den im Internet bei NCBI veröffentlichten Sequenzen. Das Molekulargewicht der überexprimierten asTF-Isoform lag bei 42kDa. AsTF war nur in überexprimierenden HL-1 Zellen zu detektieren. Auch im Herzlysat von adulten und embryonalen Mäusen wies asTF ebenfalls ein Molekulargewicht von 42kDa auf (Abbildung 10). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass das überexprimierte asTF-Protein dem natürlich vorkommenden asTF-Protein auch im Hinblick auf die post-translationale Modifikation entspricht.

Die transfizierten Zellen wurden zusätzlich auch auf kardiomyozytenspezifische Charakteristika untersucht. Dazu wurde die Expression von GATA-4, Nkx2.5 und dem herzspezifischen  $\alpha$ -MHC untersucht (Molkentin et al., 1996). GATA-4 und Nkx2.5 sind essentielle Transkriptionsfaktoren bei der Herzentwicklung und werden auch im adulten Herzen exprimiert. In adulten Herzen beeinflussen sie die Regulierung verschiedener weiterer Transkriptionsfaktoren (Durocher et al., 1997; Peterkin et al., 2005; Pikkarainen et al., 2004). Da die Genexpression von GATA-4, Nkx2.5 und  $\alpha$ -MHC nach erfolgter Transfektion kaum Veränderungen aufwies und nur geringste Abweichungen von der Expression in nativen Zellen zeigte, wird deutlich, dass die ca. 20-fache asTF-Überexpression keine Auswirkung auf die Differenzierung und die Charakteristika der Zellen hatte (Abbildung 11).

### 6.1.2. Die Proliferation und das Apoptoseverhalten der asTF-überexprimierenden HL-1 Zellen

Um zu untersuchen, welche Bedeutung asTF für HL-1 Kardiomyozyten besitzt, wurde das Proliferations- und Apoptoseverhalten der überexprimierenden Zellen analysiert. fITF fördert über die Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptors-2 (PAR-2) das Wachstum, die Proliferation und die Angiogenese von Zellen (Versteeg & Ruf, 2006). Eingehend wurde dies in verschiedenen Tumorzellen untersucht, bei denen auch pro-metastatische Einflüsse von fITF identifiziert wurden (Gessler et al., 2009; Rak et al., 2008). Ebenso wurde eine die Proliferation fördernde Wirkung in embryonalen humanen Nierenzellen nachgewiesen (Fan et al., 2005). Ferner ist TF ein „*immediate early gene*“ (Carmeliet & Collen, 1998), weshalb zu vermuten ist, dass TF auch durch diese Eigenschaft die Zellzyklusregulation beeinflusst.

Das Proliferationsverhalten von asTF-überexprimierenden Zellen wurde mittels des CFSE-Assays und der Ki-67-Färbung untersucht. Bei diesen Techniken handelt es sich um gängige Methoden zur Bestimmung der Proliferationsrate von Zellen (Lyons, 2000; Scholzen & Gerdes, 2000).

Die asTF-überexprimierenden Zellen zeigten eine deutlich höhere Teilungsrate im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 12). Folglich konnte der pro-proliferative Einfluss von asTF, der bereits in Tumorzellen nachgewiesen wurde (Hobbs et al., 2007; Signaevsky et al., 2008), im Rahmen dieser Arbeit auch in kardiomyozytären Zellen bestätigt werden. Limitierend bei der Interpretation dieser Beobachtungen ist jedoch, dass HL-1 Zellen immortalisierte Zellen sind und deren Wachstumsverhalten möglicherweise von dem Verhalten von Kardiomyozyten *in vivo* abweichen kann. Dennoch ist aufgrund dieser Ergebnisse anzunehmen, dass asTF, ebenso wie fITF, das Wachstum von Kardiomyozyten beschleunigt.

fITF war im Gegensatz zu asTF auch Gegenstand verschiedener Studien, in denen die Bedeutung von fITF für die Vitalität von Zellen untersucht wurde. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der Komplex aus fITF und FVIIa PAR-2 aktiviert und dadurch Apoptose in Tumorzelllinien, Mammakarzinomzellen und „Baby Hamster Kidney“- Zellen verhindert (Jiang et al., 2006; Versteeg et al., 2004a; Österholm et al., 2008; Sorensen et al., 2003). Ob asTF eine ähnlich schützende Wirkung auf Kardiomyozyten hat, ist nicht bekannt.

Um nun die Bedeutung von asTF für Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden die überexprimierenden Zellen sowie die Kontrollzellen mit den Apoptoseinduktoren

TNF $\alpha$  und Camptothecin (CPT) stimuliert. Die erhöhte Präsenz des pro-inflammatorischen Zytokins TNF $\alpha$  wurde bei verschiedenen Herzkrankheiten beobachtet. Beispielsweise wurden bereits bei Patienten mit kongestiver und chronischer Herzinsuffizienz (Dutka et al., 1993; Ferrari et al., 1995; Levine et al., 1990) oder mit Erkrankung der Koronararterien (Testa et al., 1996) hohe TNF $\alpha$ -Konzentrationen im Herzen gemessen.

TNF $\alpha$  induziert Apoptose, und zwar durch die Bindung an den TNF $\alpha$ -Rezeptor (TNFR1) und durch die daraus resultierende Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-10 sowie letztendlich von Caspase-3. Folglich aktiviert TNF $\alpha$  den extrinsischen Apoptoseweg. Li und Kollegen sowie weitere Forscher wiesen nach, dass auch der intrinsische Weg durch TNF $\alpha$  aktiviert wird. (Li et al., 1998; Luo et al., 1998; Wei et al., 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Vitalität der asTF-überexprimierenden Zellen durch die TNF $\alpha$ -Stimulation kaum beeinträchtigt wurde. Die für Apoptose charakteristische Phosphatidylexposition auf der Zelloberfläche, die durch Annexin-V detektierbar ist, wurde bei den überexprimierenden Zellen nicht nachgewiesen. Im Vergleich dazu waren die Kontrollzellen nach TNF $\alpha$ -Stimulation (mit 50ng/ml und 100ng/ml TNF $\alpha$ ) zu einem hohen Prozentsatz Annexin-V-positiv (Abbildung 14). Ferner waren in der Kontrollzellpopulation im Vergleich zu der asTF-überexprimierenden Population mehr Zellen tot, was anhand der PI-Färbung dargestellt wurde. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Überexpression von asTF zu dem Schutz der kardiomyozytären Zellen vor TNF $\alpha$ -induzierter Apoptose führt.

Annexin-V ist ein etablierter Marker apoptotischer Zellen (Reutelingsperger & van Heerde, 1997; van Heerde et al., 2000; van Engeland et al., 1998). Dennoch wurde zusätzlich auch die Aktivierung der Effektor-Caspase-3 gemessen, in deren Prozessierung sich der intrinsische und der extrinsische Apoptoseweg vereinen. Die in asTF-überexprimierenden Zellen verglichen mit den Kontrollzellen signifikant geringere Aktivierung von Caspase-3 (Abbildung 15) verdeutlicht erneut, dass asTF einen anti-apoptotischen Wirkung auf die Kardiomyozyten hat.

Zusätzlich zu den Experimenten, bei denen TNF $\alpha$  als Stimulans eingesetzt wurde, wurden auch Versuche mit CPT als Apoptoseinduktor durchgeführt. Camptothecin (CPT) ist ein Topoisomerase I - Inhibitor, der verhindert, dass sich das Enzym wieder von der DNA löst. Hierdurch werden Brüche in der DNA hervorgerufen, die zur

Initiation von Apoptose führen (Kang et al., 2004; Lamparska-Przybysz et al., 2005; Albiñ et al., 2007). DNA-Schäden wurden schon mehrfach mit Herzkrankheiten assoziiert. Eine chronische Herzinsuffizienz, oxidativer Stress durch Ischämie und Reperfusion oder durch chronische Herzinsuffizienz führten zu DNA-Schäden (Botto et al., 2001; Botto et al., 2002; Kono et al., 2006, Tsutsui et al., 2008). Auch eine kardiomyozytäre Apoptose ist mit DNA-Schäden verbunden (Barouch et al., 2006; Kong & Rabkin, 1999).

Die mit CPT stimulierten asTF-überexprimierenden Zellen zeigten signifikant weniger Apoptose als die Kontrollzellen (Abbildung 16). Diese Resultate belegen, dass asTF auch vor Apoptose schützt, wenn ein anderes Stimulans verwendet wird. CPT wirkt hauptsächlich über den intrinsischen Apoptoseweg, TNF $\alpha$  hauptsächlich über den extrinsischen. Die Aktivierung beider Wege scheint durch asTF beeinflussbar zu sein.

Unsere Arbeitsgruppe zeigte bereits, dass myokardialer asTF bei dilatativer Kardiomyopathie in geringerem Ausmaß im Herzgewebe vorhanden ist als in gesundem Herzgewebe (Szotowski et al., 2005a). Daher war die Vermutung naheliegend, dass die Reduktion von asTF zur Progression von myokardialer Dysfunktion führt und dass asTF die Vitalität des Myokards stärkt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass asTF tatsächlich eine protektive Wirkung auf kardiomyozytäre Zellen hat. Die Überexpression von asTF führte nicht nur zu einem schnelleren Wachstum der Zellen, sondern auch zu einer erhöhten Resistenz der HL-1 Zellen gegenüber der Induktion von Apoptose.

Über welche Signaltransduktionswege diese Einflüsse vermittelt werden und ob sie *ex vivo* ebenso zu beobachten sind, wird in den folgenden Kapiteln behandelt.

## 6.2. Die anti-apoptotische Wirkung von asTF

### 6.2.1. Der Einfluss der asTF-Überexpression auf die Signaltransduktionswege Erk1/2 und PI3K/Akt

Bei der flTF-vermittelten Signaltransduktion nimmt der Protease-aktivierte Rezeptor-2 (PAR-2) eine zentrale Rolle ein (Riewald & Ruf, 2002; Riewald & Ruf, 2001; Camerer et al., 2000; Petersen et al., 2000). PAR-2 wird durch den Komplex aus flTF und FVIIa aktiviert (Barnes et al., 2004; Steinhoff et al., 2005) und beeinflusst die PAR-2 nachgeschalteten Signaltransduktionswege, wie z.B. den MAP-Kinaseweg über Erk1/2 (Sorensen et al., 1999; Poulsen et al., 1998; Barnes et al., 2004). Auch die Aktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges wird durch den TF/FVIIa-Komplex initiiert (Aberg et al., 2007; Jiang et al., 2006; Sorensen et al., 2003).

HL-1 Zellen besitzen kein PAR-2. Auf die Frage, wie TF bzw. asTF unabhängig von PAR-2 Signaltransduktionswege aktivieren, wird in Kapitel 6.4. näher eingegangen. Bekannt ist jedoch, dass flTF auch mit Integrinen interagiert. (Ott et al., 1998; Fischer et al., 1999).

Die Funktion von PI3K/Akt im Zusammenhang mit apoptotischen Vorgängen im Herzen und in Kardiomyozyten wurde bereits eingehend untersucht (Fujio et al., 2000; Miao et al., 2000; Matsui et al., 1999; Ricci et al., 2008). Die Aktivierung von Akt beeinflusst das Überleben der Kardiomyozyten, die Kontraktilität (Condorelli et al., 2002) und die myokardiale Proliferation in positiver Weise (Gude et al., 2006; Shiraishi et al., 2004; Miyamoto et al., 2009a).

Die Signaltransduktion über den MAP-Kinaseweg Erk1/2 ist maßgeblich an der Regulierung des Zellwachstums und der Differenzierung von Zellen beteiligt (Leppä et al., 1998; Mansour et al., 1994; Cowley et al., 1994). Auch wurde gezeigt, dass Erk1/2 bei apoptotischen Vorgängen in Kardiomyozyten aktiviert wird (Yue et al., 2000).

Auf der Grundlage der bisherigen Forschungsergebnisse wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Wirkung von asTF über die Aktivierung von Erk1/2 oder PI3K/Akt erfolgt. Die Simulation mit TNF $\alpha$  führte zur Phosphorylierung von Erk1/2 sowohl in den Kontrollzellen als auch in asTF-überexprimierenden Zellen (Abbildung 17a & b). Da zellulärer Stress und Zytokine die Prozessierung von MAP-Kinasen wie Erk1/2 hervorrufen können (Clerk et al., 1999; Yndestad et al., 2009), resultiert die Erk-1/2-Aktivierung offenbar aus der Stimulation mit TNF $\alpha$ .

Im Gegensatz dazu wiesen die asTF-überexprimierenden Zellen eine kontinuierliche Aktivierung von Akt auf, die durch die TNF $\alpha$ -Stimulation nicht verändert wurde. In den Kontrollzellen wurde Akt erst nach der Stimulation mit TNF $\alpha$  phosphoryliert (Abbildung 17c & d).

Die asTF-überexprimierenden Zellen zeigten folglich ein von den Kontrollzellen divergentes Aktivierungsmuster des Akt-Signalweges. Um die Verbindung zwischen der asTF-Expression und dem Akt-Signaltransduktionsweg zu bestätigen, wurde der Akt-spezifische Inhibitor Triciribine verwendet.

Triciribine hob den anti-apoptotischen Effekt der asTF-überexprimierenden Zellen vollständig auf. Folglich besitzt Akt eine zentrale Rolle bei der asTF-vermittelten Signaltransduktion (Abbildung 18).

### **6.2.2. Der Einfluss der asTF-Überexpression auf Bcl-2 Proteine**

Die PI3K/Akt-Signaltransduktion nimmt vorrangig über den intrinsischen Weg Einfluss auf apoptotische Vorgänge. Aktiviertes Akt phosphoryliert seinerseits das Bcl-2 Protein Bad und verhindert dadurch dessen Bindung an die Mitochondrienmembran (Datta et al., 1997), was bereits auch im Herzgewebe nachgewiesen wurde (Downward 2004; Miyamoto et al., 2009b). Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht möglich, phosphoryliertes Bad anhand von Western Blots zu detektieren, weshalb über dessen Aktivität keine Aussage gemacht werden kann. Hingegen zeigte die Untersuchung der durch Bad direkt beeinflussten Bcl-2 Proteine, Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 (Chao & Korsmeyer, 1998; Gustafsson & Gottlieb, 2007), dass Bcl-x<sub>L</sub> in den stimulierten asTF-überexprimierenden Zellen stark hochreguliert war. Die höhere Expression war ausschließlich in den asTF-überexprimierenden Zellen festzustellen und dies auf mRNA- und auf Proteinebene (Abbildung 19). Andere hier untersuchte Bcl-2 Proteine wiesen kein durch die TNF $\alpha$ -Stimulation oder den asTF-Level verändertes Expressionsmuster auf. Aufgrund dieser Ergebnisse ist darauf zu schließen, dass die Hochregulation von Bcl-x<sub>L</sub> an der durch asTF vermittelten anti-apoptotischen Wirkung beteiligt ist.

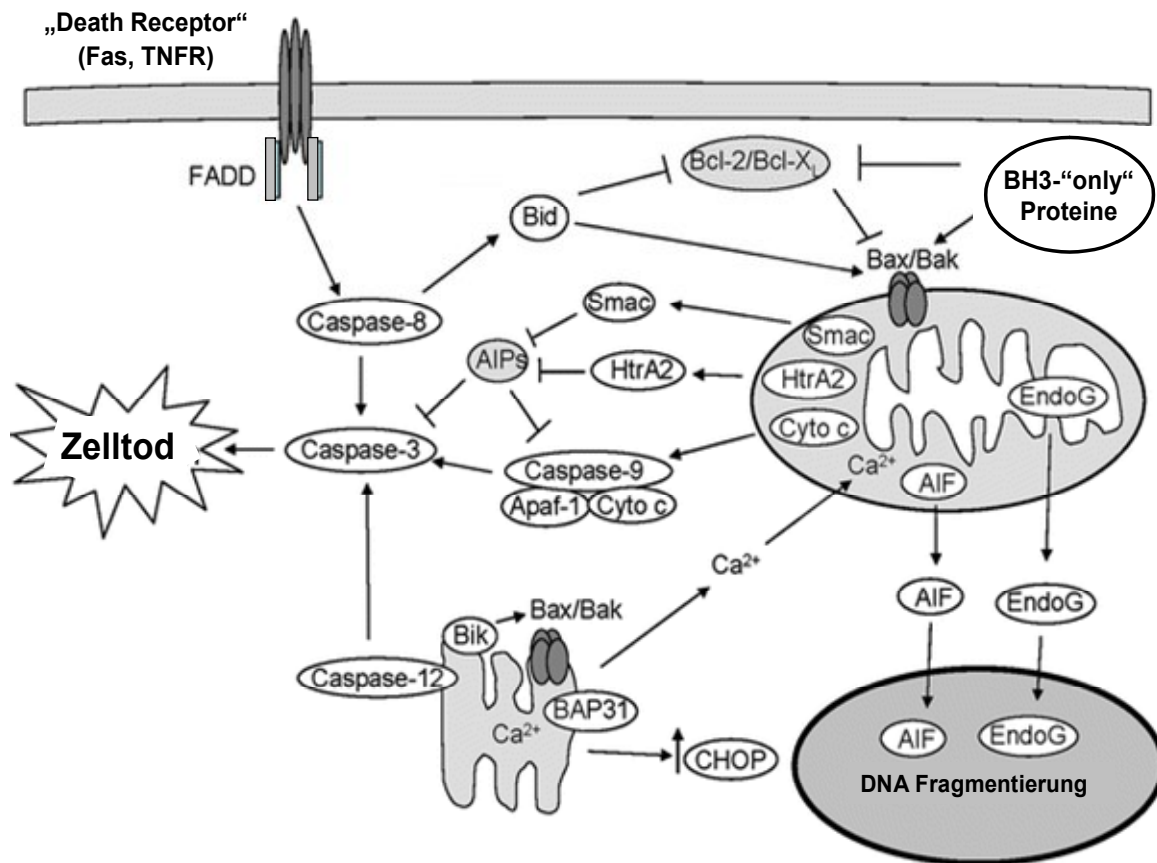
Diese Beteiligung wurde endgültig durch weitere Experimente bestätigt, bei denen eine spezifisch gegen Bcl-x<sub>L</sub> gerichtete siRNA den Bcl-x<sub>L</sub>-Level in den HL-1 Zellen um ca. 52% reduzierte (Abbildung 20). Nachdem das Bcl-x<sub>L</sub>-Expressionsniveau abgesenkt worden war, zeigten die stimulierten asTF-überexprimierenden Zellen ein den Kontrollzellen äquivalentes Apoptoseverhalten. Die anti-apoptotische Wirkung

war nämlich nicht mehr zu detektieren (Abbildung 21a). Bcl-x<sub>L</sub> ist jedoch nur eine der Bcl-x-Isoformen (Boise et al., 1993). In dieser Arbeit wurden Primer und Antikörper verwendet, die neben Bcl-x<sub>L</sub> auch die pro-apoptotische Bcl-x-Isoform Bcl-x<sub>S</sub> detektieren können. Bcl-x<sub>S</sub> konnte jedoch weder auf Gen- noch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Ohne eine Veränderung des Expressionsniveaus pro-apoptotischer Bcl-2 Proteine verschiebt eine höhere Bcl-x<sub>L</sub>-Expression das Gleichgewicht innerhalb der Familie zu Gunsten der Mitglieder, die die Apoptose verhindern.

Das bedeutet, dass asTF die Expression von Bcl-x<sub>L</sub> beeinflusst und vermutlich ein wichtiger Faktor des asTF-vermittelten anti-apoptotischen Effektes ist. Diese Erkenntnisse werden durch die Forschungsergebnisse von Deng und Kollegen gestützt. Sie zeigten, dass die Hochregulation von Bcl-x<sub>L</sub> in murinen embryonalen Fibroblasten und HeLa-Zellen zu einer Reduktion der TNF $\alpha$ -induzierten Apoptose führt (Deng et al., 2003). Des Weiteren wurden anti-apoptotische Bcl-2 Proteine sowie Bcl-x<sub>L</sub> als wichtige Steuerelemente bei der Blockierung einer Doxorubicin-induzierten Apoptose in Kardiomyozyten beschrieben (Zhang et al., 2005; Reeve et al., 2007). Auch *in vivo* wurde nachgewiesen, dass die Bcl-2 Proteine an der Regulation der Apoptose im Herzen beteiligt sind (Clerk et al., 2003; Gustafsson & Gottlieb, 2007 und 2008; Lee & Gustafsson 2009, Abbildung 31).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die asTF-Überexpression in kardiomyozytären Zellen zu einer höheren Expression von Bcl-x<sub>L</sub> führt und dass diese Hochregulation an der anti-apoptotischen Wirkung von asTF beteiligt ist.





**Abbildung 31: Apoptose-Signaltransduktionswege im Herzen.** (modifiziert nach Lee & Gustafsson, 2009)

Zu der Proteinfamilie der Bcl-2 Proteine gehören neben denen in dieser Arbeit untersuchten Mitgliedern auch viele weitere Proteine (Tabelle 1), die hier nicht untersucht wurden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg und die Hochregulation von Bcl-x<sub>L</sub> an der asTF-vermittelten anti-apoptotischen Wirkung in kardiomyozytären Zellen beteiligt sind.

## 6.3. Die Bedeutung von asTF für das Überleben primärer Kardiomyozyten

### 6.3.1. Die Überexpression von asTF in primären Kardiomyozyten

Bei HL-1 Zellen handelt es sich um kardiomyozytäre Zellen, die primären Zellen in ihren Charakteristika und ihrem Phänotyp sehr ähneln (Claycomb et al., 1998). Allerdings sind HL-1 Zellen auch immortalisierte Zellen. Biologische und biochemische Abläufe könnten *in vivo* von denen in HL-1 Zellen beobachteten abweichen. Deshalb wurden, den Experimenten an HL-1 Zellen entsprechend, Versuche an primären Kardiomyozyten durchgeführt.

Die Transfektion der murinen embryonalen Zellen erfolgte transient, wodurch eine deutlich stärkere asTF-Überexpression zu messen war als bei der stabilen Transfektion in den HL-1 Zellen (ca. 500-fach vs. 20-fach, Abbildung 23). Aufgrund der 500fachen Überexpression zeigte sich ein deutlicher asTF-abhängiger Effekt in der primären Zellpopulation.

Bei der Fluoreszenzfärbung konnte auch in den mit dem mock-Plasmid transfizierten Kontrollzellen TF detektiert werden. Da bei der Färbung ein Antikörper verwendet wurde, der beide TF-Isoformen erkennt und die flTF-Expression in den Kontrollzellen höher als die asTF-Expression ist, handelt es sich bei dem in Kontrollzellen detektierten TF daher wahrscheinlich um flTF.

Das Molekulargewicht der asTF-Isoform lag, wie zuvor in den HL-1 Zellen sowie in murinem embryonalem und adultem Herzgewebe festgestellt wurde (Abbildung 9b & 10), bei ca. 42kDa (Abbildung 24a). Dies bedeutet, dass das asTF-Protein dem natürlich vorkommenden asTF-Protein entspricht.

### 6.3.2. Das Apoptoseverhalten der primären Kardiomyozyten

Mit den transfizierten primären Zellen wurde ein Annexin-V-/ Propidiumiodid-Apoptoseassay durchgeführt. Schon die unstimulierten Zellen zeigten einen extrem hohen Prozentsatz an AV-positiven Zellen, was bedeutet, dass die primären Zellen bereits auf die Ablöseprozedur und Färbung mit der Induktion von Apoptose reagieren. Der AV-/PI-Assay war folglich nicht zur Messung von Apoptose in primären Zellen geeignet.

Die Messung von aktivierter Caspase-3 ergab, dass die Überexpression von asTF auch *ex vivo* zu einem anti-apoptotischen Verhalten der Zellen führt (Abbildung 26).

Der Ablauf der Apoptose in Kardiomyozyten, insbesondere in embryonalen oder neonatalen, wird kontrovers diskutiert. Sanchis und Kollegen zeigten, dass in neonatalen Kardiomyozyten kein Apaf-1 oder nur in physiologisch irrelevant kleinen Mengen zu detektieren ist (Sanchis et al., 2003). Auch von Potts und Kollegen wurde dokumentiert, dass die Zytochrom-C-Freisetzung nicht notwendigerweise zum Zelltod führte (Potts et al., 2005). Demzufolge wurde vermutet, dass der intrinsische Apoptoseweg kaum eine Rolle in neonatalen Kardiomyozyten spielt. Konträr dazu wiesen Yue und Kollegen sowie Ing und Shiraishi nach, dass das Gleichgewicht der Bcl-2-Proteine eine zentrale Rolle bei der Apoptose von neonatalen Kardiomyozyten spielt und die Aktivierung von Caspase-3 beeinflusst (Yue et al., 1998; Ing et al., 1999; Shiraishi et al., 2001). Bialik und Kollegen zeigten des Weiteren, dass neonatale Kardiomyozyten auf induzierte Apoptose mit der Freisetzung von Zytochrom-C reagieren und Caspase-9 und Caspase-3 aktiviert werden (Bialik et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mit der TNF $\alpha$ -Stimulation assoziierte Regulation der Bcl-2-Expression nachgewiesen, die darauf hinweist, dass der intrinsische Apoptoseweg auch in embryonalen Kardiomyozyten an der Regulation des Zelltods beteiligt ist. In den asTF-überexprimierenden Zellen war nach TNF $\alpha$ -Stimulation ein Anstieg der Genexpression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 zu detektieren (Abbildung 27 a & b). Die Expression von pro-apoptotischem Bax blieb konstant (Abbildung 27c). Anders als in HL-1 Zellen waren folglich zwei anti-apoptotische Bcl-2 Proteine hochreguliert. Entsprechend zu den HL-1 Zellen wurde eine erhöhte Expression von Gesamt-Akt (Akt-1) und

exemplarisch auch eine erhöhte Aktivierung des Akt-Signalweges festgestellt (Abbildung 27d & e).

In asTF-überexprimierende embryonalen Kardiomyozyten wurde durch die TNF $\alpha$ -Stimulation kaum Apoptose induziert. Dies und die Hochregulation der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 deuten darauf hin, dass asTF auch in embryonalen Kardiomyozyten eine protektive Wirkung auf die Zellen ausübt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Hypothese gestützt, dass die Apoptose in neonatalen Kardiomyozyten auch über den intrinsischen Weg und unter Beteiligung der Bcl-2 Proteine erfolgt. Weitere Studien sind dennoch nötig, um den Einfluss der Bcl-2 Proteine und des Akt-Signaltransduktionsweges endgültig zu verifizieren.

Bisher wurde gezeigt, dass die Überexpression von asTF das Überleben der primären Kardiomyozyten stärkt. Daher ist die Vermutung naheliegend, dass ein TF-Knockout zu der konträren Wirkung, nämlich einem geschwächten Überleben der Zellen führt. Im nächsten Schritt wurden deswegen das Apoptoseverhalten sowie die Expression von Bcl-2 Proteinen in Kardiomyozyten mit spezifischem TF-Knockout untersucht. Die bei diesem Versuch verwendeten transgenen Tiere besaßen einen kardiomyozytenspezifischen TF-Knockout, der beide TF-Isoformen betraf (Pawlinski et al., 2007). Da flTF ebenso wie asTF eine wichtige Bedeutung für das Überleben von HL-1 Zellen hat (Antoniak, 2008), war es nicht möglich zwischen der Wirkung des flTF-Defizits und des asTF-Defizits zu unterscheiden.

In den TNF $\alpha$ -stimulierten Kardiomyozyten mit TF-Knockout wurde, verglichen mit stimulierten Kontrollzellen, eine höhere Aktivierung von Caspase-3 festgestellt (Abbildung 28). Ferner war die Expression von Gesamt-Akt und die der anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine Bcl-x<sub>L</sub> und Bcl-2 in den stimulierten TF-Knockout Zellen signifikant herunterreguliert (Abbildung 29).

Im Vergleich zu den Zellen, in denen asTF überexprimiert wurde, bewirkte der TF-Knockout in den primären Zellen die diametralen Effekte. Die Beobachtung, dass das TF-Expressionsniveau in primären Kardiomyozyten mit dem Schutz der Zellen vor TNF $\alpha$ -induzierter Apoptose zusammenhängt, wurde erneut bestätigt.

## 6.4. Die Bedeutung von asTF für die Expression von Angiogenese-assoziierten Proteinen

Die asTF-Expression in Kardiomyozyten korreliert, wie in Kapitel 6.2. erläutert, positiv mit der Aktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges. Über welche Rezeptoren die asTF-vermittelte Aktivierung von PI3K abläuft und welche weiteren Faktoren daran beteiligt sind, ist nicht bekannt.

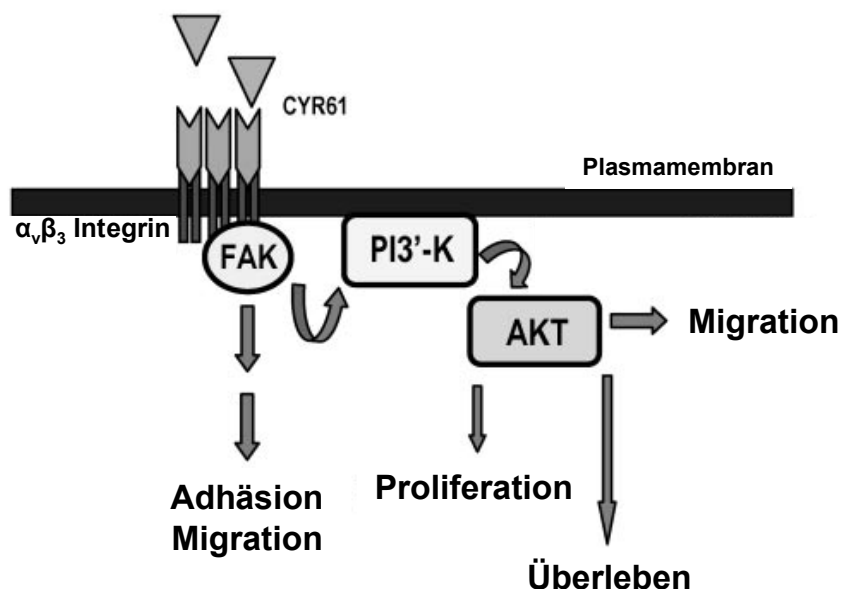
Der PI3K/Akt-Signalweg wird durch verschiedene Rezeptoren aktiviert. Werden Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Zytokin-Rezeptoren oder Integrine durch Wachstumsfaktoren (z.B. FGF-2, VEGF), Hormone oder andere spezifische Stimuli (z.B. Cyr61) aktiviert, sind sie in der Lage, den PI3K/Akt-Signalweg durch Phosphorylierung zu induzieren (Oudit et al., 2004; Oudit & Penninger, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Genexpression von Cyr61 und FGF-2 der asTF-überexprimierenden Zellen höher war, als die der Kontrollzellen oder der flTF-überexprimierenden Zellen (Abbildung 30). Dies bedeutet, dass die Cyr61- und die FGF-2-Expression offensichtlich auch durch die asTF-Expression beeinflusst werden. Die flTF-Überexpression in den HL-1 Zellen besaß hingegen keine Relevanz für die Expression der untersuchten Faktoren.

Cyr61 interagiert mit Integrinen, beeinflusst zelluläre Abläufe wie Angiogenese, Proliferation und Differenzierung und ist für die Herzentwicklung essentiell (Mo & Lau, 2006). FGF-2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese und fungiert als Schlüsselprotein bei der Proliferation und Differenzierung (Powers et al., 2000). In Endothelzellen sind verschiedene Signaltransduktionswege an der FGF-2 stimulierten Proliferation beteiligt, der MAP-Weg über Erk1/2 und der PI3K/Akt-Signalweg, wobei letzterer besonders bei der FGF-2 induzierten Proliferation bedeutsam ist (Wang et al., 2009; Zubilewicz et al., 2001). VEGF beeinflusst ebenso wie FGF-2 die Proliferation, Migration und die Differenzierung von Endothelzellen (Cross & Claesson-Welsh, 2001). Darüber hinaus schützt VEGF Endothelzellen vor Apoptose, indem der PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg durch die Anwesenheit von VEGF aktiviert wird (Gerber et al., 1998).

Bereits bekannt ist, dass u.a. über Cyr61 und FGF-2 zelluläre Prozesse beeinflusst werden, die über den PI3K/Akt-Signalweg reguliert werden (Yoshida et al., 2007; Menendez et al., 2003). Chen und Du beschrieben, dass Cyr61 je nach Zelltyp das

Überleben oder die Apoptose der Zellen fördert. Die Bindung von Cyr61 wirkt in Fibroblasten pro-apoptotisch (Todorovic et al., 2005), in Endothelzellen hingegen wird durch Cyr61 das Überleben der Zellen unterstützt (Chen & Du, 2007). In Kardiomyozyten hat Cyr61 eine anti-apoptotische Wirkung, die über Integrin  $\beta_1$  vermittelt wird. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen Cyr61 und der Aktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges identifiziert werden (Yoshida et al., 2007). In dieser Arbeit wurde dargestellt, dass asTF eine anti-apoptotische Wirkung auf Kardiomyozyten hat. Außerdem war u.a. die Cyr61-Expression in den asTF-überexprimierenden Zellen hochreguliert und der Akt-Signalweg stärker aktiviert. Ebenso wie die Daten von Yoshida und Kollegen, weisen die vorliegenden Ergebnisse auf einen Zusammenhang der Cyr61-Expression, der Akt-Aktivierung und dem Überleben der HL-1 Kardiomyozyten hin (Yoshida et al., 2007). Menendez und Kollegen stellten dar, dass Cyr61 über die Aktivierung von PI3K/Akt u.a. das Überleben von Mammakarzinomzellen beeinflusst (Menendez et al., 2003). Da asTF die Cyr61-Expression beeinflusst, könnte die Wirkung von asTF auf die Vitalität der Kardiomyozyten auch gemäß dem von Menendez vorgeschlagenen Ablauf erfolgen (Abbildung 32).



**Abbildung 31: Vermuteter Ablauf der Cyr61-induzierten erhöhten Überlebensrate von Mammakarzinomzellen.** Cyr61 bindet an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine und aktiviert den nachgeschalteten PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg. Die Aktivierung von PI3K/Akt beeinflusst u.a. die Proliferation und das Überleben von Brustkrebszellen (modifiziert nach Menendez et al., 2003).

Ein weiterer Aspekt der asTF-induzierten erhöhten Transkription von Cyr61 und FGF-2 ist, dass diese Faktoren Angiogenese induzieren (Mo & Lau, 2006; Powers et al., 2000). Es wurde bereits beschrieben, dass asTF die Proliferation und die Angiogenese in Tumorzellen (He et al., 2008; Hobbs et al., 2007; Signaevsky et al., 2008) sowie die Angiogenese in Endothelzellen fördert (van den Berg et al., 2009). Über welche Signalwege und Rezeptoren asTF die zellulären Prozesse in Tumorzellen bewirkt, wurde jedoch nicht untersucht. Anhand von Untersuchungen an Endothelzellen wurde die Hypothese aufgestellt, dass asTF über die Bindung an Integrine Angiogenese induziert. Ob asTF auch in Kardiomyozyten an Integrine bindet, ist noch zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine erhöhte asTF-Expression eine signifikante Steigerung der FGF-2- und der Cyr61-Transkription zur Folge hat. Daher könnte asTF über die Regulation der Expression von Angiogenese-assoziierten Proteinen nicht nur für das Überleben von Zellen, sondern auch für die Angiogenese in Kardiomyozyten von Bedeutung sein.

## 6.5. Ausblick

AsTF besitzt eine wichtige Bedeutung für die Proliferation und die Vitalität von HL-1 Zellen sowie für die Vitalität von primären Kardiomyozyten. Die erhöhte Expression von asTF führt zur Aktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionsweges, beeinflusst das Expressionsgleichgewicht in der Bcl-2 Proteinfamilie und die Expression von FGF-2 und Cyr61. Über welche Signalwege asTF den Akt-Signalweg aktiviert und welche Rezeptoren dabei von Bedeutung sind, ist nicht bekannt.

Bei dem flTF-vermittelten Einfluss auf Signaltransduktionswege ist der Protease-aktivierte Rezeptor-2 maßgeblich involviert (Hjortoe et al., 2004; Versteeg et al., 2006). Da in HL-1 Zellen kein PAR-2 vorhanden ist und asTF nicht die für die Signaltransduktion von flTF bedeutsame zytoplasmatische Domäne besitzt (Belting et al., 2004; Bluff et al., 2008), scheint sich die durch asTF vermittelte Signaltransduktion von der flTF-vermittelten zu unterscheiden. AsTF bindet in Endothelzellen an  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine und beeinflusst darüber den Ablauf der Angiogenese (van den Berg et al., 2009).

Um herauszufinden, welche Rezeptoren von asTF im Herzen aktiviert werden, wäre zu überprüfen, ob asTF auch in Kardiomyozyten an Integrine bindet oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktivieren kann.

AsTF hat offensichtlich eine wichtige Funktion für den Erhalt der Vitalität von Kardiomyozyten und scheint unter inflammatorischen Bedingungen schützend auf Zellen zu wirken. *In vivo* muss die Funktion von asTF im Herzen noch eingehend untersucht werden, um die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erlangten Erkenntnisse zu bestätigen und um außerdem die Bedeutung der asTF-Expression für die Angiogenese sowie die Proliferation zu untersuchen.

In diesem Zusammenhang wären Versuche an transgenen Tieren mit einem kardiomyozytenspezifischen Knockout der asTF-Isoform sehr aufschlussreich.

Da asTF weniger thrombogen ist als flTF, könnte durch Untersuchungen an den transgenen Tieren weiterhin geklärt werden, ob asTF in Zukunft für therapeutische Zwecke im kardiovaskulären Bereich geeignet wäre.



## 7. Zusammenfassung

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, tritt unter anderem bei verschiedenen Herzkrankheiten wie bei einem Myokardinfarkt, einer Hypertrophie oder einer Hypoxie im Herzgewebe auf. Generell werden pathologische Veränderungen im Herzen auch durch apoptotische, nicht mehr funktionsfähige, Kardiomyozyten hervorgerufen. Es ist daher von großem medizinischen Interesse, solche Proteine oder Signaltransduktionswege zu identifizieren, die die Induktion des Apoptoseprozesses in Kardiomyozyten hemmen bzw. verhindern können und dadurch zum Erhalt der Funktionalität des Herzens beitragen.

Da Tissue Factor (TF), der Initiator der Blutkoagulationskaskade, im Herzgewebe mit Strukturproteinen ko-lokalisiert vorliegt und zudem einen Einfluss auf diverse Signaltransduktionswege besitzt, wurde vermutet, dass TF auch für den Erhalt der Vitalität der Zellen entscheidend ist. Diese Hypothese wurde durch die Feststellung des Sachverhaltes gestützt, dass bei dilatativer Kardiomyopathie weniger TF im Herzgewebe vorliegt als in gesundem Herzgewebe. Beide TF-Isoformen zeigten sich deutlich herunterreguliert. Da auch asTF, die alternativ gespleißte TF-Isoform, im dilatierten Herzen weniger exprimiert war, scheint auch asTF möglicherweise für Kardiomyozyten bedeutsam zu sein. Die Funktion und Bedeutung von asTF in Kardiomyozyten ist bisher gänzlich unbekannt, lediglich in Tumorzellen wurde eine das Wachstum und die Angiogenese fördernde Wirkung von asTF nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von asTF-überexprimierenden murinen kardiomyozytären Zellen gezeigt, dass asTF eine entscheidende Bedeutung sowohl für die Proliferation als auch für das Apoptoseverhalten der Kardiomyozyten besitzt. Die erhöhte asTF-Expression führte zu einem schnelleren Zellwachstum und zum Schutz der Zellen vor dem programmierten Zelltod. Unabhängig von dem dabei induzierten Apoptoseweg steigerte die asTF-Überexpression das Überleben der Zellen in signifikantem Ausmaß. In den überexprimierenden Zellen war außerdem der PI3K-/Akt-Signaltransduktionsweg kontinuierlich aktiviert. Daher ist anzunehmen, dass das durch die Überexpression von asTF ausgelöste Verhalten der Zellen über die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges reguliert wird. Da anti-apoptotisches Bcl-x<sub>L</sub> in den Zellen stärker transkribiert und translatiert wurde, scheint ebenso das Gleichgewicht in der Bcl-2 Proteinfamilie für die durch asTF vermittelten Effekte

entscheidend zu sein. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten lassen darauf schließen, dass asTF in HL-1 Zellen die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges bewirkt und dass asTF direkt oder über den PI3K-/Akt-Weg vermittelt die Expression von Bcl-2 Proteinen reguliert, was letztendlich zu der höheren Vitalität der Zellen führt.

Diese Zusammenhänge wurden *ex vivo* an primären Kardiomyozyten bestätigt. Auch in den primären Zellen führte die Überexpression von asTF zu einem Schutz der Zellen gegenüber dem durch TNF $\alpha$  induzierten Zelltod. Der PI3K-/Akt-Signaltransduktionsweg erwies sich in den asTF-überexprimierenden Zellen als stärker aktiviert. Die Expression von anti-apoptotischem Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> war nach der TNF $\alpha$ -Stimulation nur in den asTF-überexprimierenden Zellen signifikant erhöht. Diese Ergebnisse weisen erneut darauf hin, dass asTF eine protektive Funktion für Kardiomyozyten aufweist und dass der PI3K-/Akt-Signaltransduktionsweg und die Regulation der Bcl-2 Proteinexpression an dem asTF-abhängigen Schutz der Zellen beteiligt sind. Durch Versuche an transgenen Mäusen, die einen Knockout beider TF-Isoformen aufweisen, wurden diese Erkenntnisse gestützt. Es zeigte sich, dass Kardiomyozyten, welche aus diesen TF-defizienten transgenen Tieren isoliert wurden, das genau konträre Verhalten zu den asTF-überexprimierenden primären Kardiomyozyten aufwiesen. Nach TNF $\alpha$ -Stimulation war Apoptose stärker induziert und Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> sowie Gesamt-Akt waren weniger stark exprimiert als in den Kontrollzellen.

Zusammenfassend ist daher festzustellen, dass asTF eine entscheidende Bedeutung für die Vitalität der Kardiomyozyten besitzt. AsTF schützt die Herzzellen vor TNF $\alpha$ - oder Camptothecin-induzierter Apoptose. An diesem Einfluss sind die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges sowie die verstärkte Expression von anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen anscheinend maßgeblich beteiligt.

Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die asTF-Expression die Transkription von FGF-2 und Cyr61 positiv beeinflusste. Wegen dieser asTF-abhängigen Regulation der Angiogenese-assoziierten Proteine FGF-2 und Cyr61 ist zu hypothetisieren, dass asTF eine wichtige Bedeutung für die Angiogenese zukommt. Zudem sind FGF-2 und Cyr61 Proteine, die Einfluss auf den Akt-Signaltransduktionsweg ausüben. Daher könnte asTF auch über die Regulation dieser Proteine das Verhalten der Zellen gegenüber der Induktion von Apoptose steuern.

Die vorliegende Arbeit eröffnet Einblicke in die wichtige protektive Bedeutung, welche die asTF-Isoform für Kardiomyozyten besitzt. Weitere Studien, idealerweise an transgenen Mäusen mit kardiomyozytenspezifischem asTF-Knockout, könnten die Funktion, die asTF *in vivo* im Herzen erfüllt, bestätigen und klären, ob asTF neben der Vitalität der Zellen auch Prozesse wie die Angiogenese fördert.

## 8. Summary

Apoptosis, programmed cell death, occurs during different pathological developments in the heart. The loss of intact cardiomyocytes results in the progression of cardiac dysfunction. Myocardial infarction, hypoxia and hypertrophy are associated with the incidence of apoptosis as well. Therefore, it is a matter of major importance to investigate which proteins or signalling pathways have a beneficial impact on cardiomyocytes, thereby contributing to maintain the normal function of the heart.

Tissue factor, the initiator of the coagulation cascade, was shown to be co-localized with structure proteins in the human heart. Furthermore, TF has an influence on different signalling pathways and cellular processes. Therefore, it was suggested that TF is associated with the vitality of cardiomyocytes. This presumption was strengthened by the fact that both TF-isoforms, flTF and asTF, were down-regulated in the myocardium of DCM patients. Since there was also a lower expression of asTF, the alternatively spliced TF-isoform, one can assume that asTF is highly relevant to the vitality of cardiomyocytes. In general, little is known about the physiological function of the asTF-isoform. In recently published studies it has been shown that asTF might have a pro-angiogenic effect on tumour cells.

In this thesis asTF was identified as having an important influence on the proliferation rate and on the survival of cardiomyocytes. On the basis of asTF-over-expressing HL-1 cardiomyocytes, asTF was shown to display a distinct anti-apoptotic effect on the cells. Additionally, the over-expression caused a higher proliferation rate of these cardiomyocytes. The anti-apoptotic effect was independent of the aspect which apoptosis pathway – extrinsic or intrinsic – had been induced. Moreover, a continuous activation of Akt was associated with asTF-expression. In contrast, mock-transfected HL-1 cells developed Akt-activation only after TNF $\alpha$ -stimulation. These results indicate a causal connection between the asTF expression level and the activation of Akt. Furthermore, it was demonstrated that Bcl-x<sub>L</sub>-expression was increased in stimulated over-expressing cells, whereas control cells displayed no changes in the expression levels of Bcl-2 proteins. This indicates that, in addition to the Akt-pathway, Bcl-x<sub>L</sub> takes part in the downstream effects on asTF-over-expression and is also involved in the asTF-induced anti-apoptotic impact on the cells.

To confirm the conclusions based on the *in vitro*-experiments, *ex vivo*-investigations were performed. AsTF-over-expressing primary cardiomyocytes displayed the same anti-apoptotic effect as over-expressing HL-1 cells. The Akt-pathway was higher activated in asTF-overexpressing cells under normal conditions. Moreover, upon TNF $\alpha$ -stimulation the expression of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins Bcl-x<sub>L</sub> and Bcl-2 was elevated only in over-expressing cells. These results underpinned the association between asTF-dependent effects and the Akt-pathway on the one hand and the Bcl-2 protein expression on the other hand.

Primary cells, possessing a specific TF-knockout, affirmed these results by the fact that these cells showed the opposite features of asTF-over-expressing cardiomyocytes: In TF-knockout cells, Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> expression levels were decreased, total Akt was transcribed and activated to a lower degree. Thus, this positive correlation between the TF-expression and anti-apoptotic processes was reaffirmed.

It was also a further matter of interest to find out whether asTF had an effect upon angiogenic processes. In this work a positive association was detected between the asTF-protein expression and transcription levels of the angiogenesis-associated proteins FGF-2 and Cyr61. This indicates that asTF might have an influence on angiogenesis. Additionally, in previous studies it has been described, that Cyr61 can activate the PI3K-/Akt-signalling pathway. Thus, it seems to be very likely that elevated FGF-2 and Cyr61-expression are also elements of the asTF-dependent anti-apoptotic impact on cardiomyocytes.

In conclusion, the findings of this work show that asTF impacts on FGF-2 and Cyr61-expression, on the PI3K-/Akt-pathway and on the expression balance between pro- and anti-apoptotic Bcl-2 proteins. In cardiomyocytes these influences are likely to prevent the activation of the caspase cascade and consequential apoptosis. Therefore, asTF is of particular importance for the survival of cardiomyocytes and may contribute to maintain the normal function of the heart. Experiments on the basis of mice possessing a cardiomyocyte-specific asTF-knockout would be a useful tool to confirm the results *in vivo* and to clarify whether asTF, associated with its beneficial effects, could be a valuable target for medical intervention in the future.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

ABP-280	Aktin-bindendes Protein 280 (Filamin A)
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AP-1	Aktivator-Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Aspartat
asTF	alternativ gespleißter Tissue Factor (löslicher TF)
AV	Annexin-V
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
C57 Bl6	C57 <i>black</i> 6-Mäuse
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	zur RNA komplementäre DNA
CFSE	Carboxy-Fluorescein Succinimidyl Ester
CPT	Camptothecin
Cyr61	<i>cysteine-rich angiogenic inducer 61</i>
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCM	dilatative Kardiomyopathie
ddH <sub>2</sub> O	<i>Aqua bidest.</i>
DISC	<i>death inducing signalling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid 5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E13.5	13. Tag der Embryonalentwicklung
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Egr-1	<i>early growth response factor-1</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>

---

Erk	<i>extracellular signal-related kinase</i>
F	Faktor
FAM	Fluorescein
FBS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
FGF-2	<i>fibroblast growth factor 2 (basic)</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
fITF	<i>full-length</i> Tissue Factor (membranständiger TF)
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	grünfluoreszierendes Protein
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IAP	<i>inhibitors of apoptosis protein family</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger-RNA</i> )
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NFκB	Nukleärer Faktor κB
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte (Extinktion)
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
ROCK1	Rho-assoziierte Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	Rhodamin
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs.	<i>versus</i>
XIAP	<i>X-chromosom linked IAP</i>



## 10. Literaturverzeichnis

- Aasrum, M., Prydz, H. (2002) Gene targeting of tissue factor, factor X, and factor VII in mice: their involvement in embryonic development. *Biochemistry (Mosc.)* 67, 25-32
- Aberg, M., Wickstrom, M., Siegbahn, A. (2008) Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells in a NFkappaB-dependent manner and abolishes the anti-apoptotic signaling of TF/FVIIa and TF/FVIIa/FXa. *Thromb.Res.* 122, 191-202
- Ahamed, J., Ruf, W. (2004) Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain. *J.Biol.Chem.* 279, 23038-23044
- Albihn, A., Mo, H., Yang, Y., Henriksson, M. (2007) Camptothecin-induced apoptosis is enhanced by Myc and involves PKCdelta signaling. *Int.J.Cancer* 121, 1821-1829
- Antoniak, S., Szotowski, B., Pauschinger, M., Poller, W., Schultheiss, H. P., Rauch, U. Tissue Factor protects cardiomyocytes against TNF-alpha induced apoptosis. *Clin Res Cardiol* 95[Suppl 5]. 2006.
- Armesilla, A. L., Lorenzo, E., Gomez del, A. P., Martinez-Martinez, S., Alfranca, A., Redondo, J. M. (1999) Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor of activated T cells in human endothelial cells: a role for tissue factor gene expression. *Mol.Cell Biol.* 19, 2032-2043
- Bach, R., Nemerson, Y., Konigsberg, W. (1981) Purification and characterization of bovine tissue factor. *J.Biol.Chem.* 256, 8324-8331
- Baldi, A., Abbate, A., Bussani, R., Patti, G., Melfi, R., Angelini, A., Dobrina, A., Rossiello, R., Silvestri, F., Baldi, F., Di, S. G. (2002) Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling. *J.Mol.Cell Cardiol.* 34, 165-174
- Banner, D. W. (1997) The factor VIIa/tissue factor complex. *Thromb.Haemost.* 78, 512-515
- Barnes, J. A., Singh, S., Gomes, A. V. (2004) Protease activated receptors in cardiovascular function and disease. *Mol.Cell Biochem.* 263, 227-239
- Barouch, L. A., Gao, D., Chen, L., Miller, K. L., Xu, W., Phan, A. C., Kittleson, M. M., Minhas, K. M., Berkowitz, D. E., Wei, C., Hare, J. M. (2006) Cardiac myocyte apoptosis is associated with increased DNA damage and decreased survival in murine models of obesity. *Circ.Res.* 98, 119-124
- Bazan, J. F. (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87, 6934-6938
- Belting, M., Dorrell, M. I., Sandgren, S., Aguilar, E., Ahamed, J., Dorfleutner, A., Carmeliet, P., Mueller, B. M., Friedlander, M., Ruf, W. (2004) Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat.Med.* 10, 502-509

- Bialik, S., Cryns, V. L., Drincic, A., Miyata, S., Wollowick, A. L., Srinivasan, A., Kitsis, R. N. (1999) The mitochondrial apoptotic pathway is activated by serum and glucose deprivation in cardiac myocytes. *Circ.Res.* 85, 403-414
- Blat, Y., Seiffert, D. (2008) A renaissance for the contact system in blood coagulation? *Thromb.Haemost.* 99, 457-460
- Bluff, J. E., Brown, N. J., Reed, M. W., Staton, C. A. (2008) Tissue factor, angiogenesis and tumour progression. *Breast Cancer Res.* 10, 204
- Boatright, K. M., Salvesen, G. S. (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 15, 725-731
- Bogdanov, V. Y., Balasubramanian, V., Hathcock, J., Vele, O., Lieb, M., Nemerson, Y. (2003) Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat.Med.* 9, 458-462
- Bogdanov, V. Y., Kirk, R. I., Miller, C., Hathcock, J. J., Vele, S., Gazdaru, M., Nemerson, Y., Taubman, M. B. (2006) Identification and characterization of murine alternatively spliced tissue factor. *J.Thromb.Haemost.* 4, 158-167
- Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G., Thompson, C. B. (1993) bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608
- Botto, N., Rizza, A., Colombo, M. G., Mazzone, A. M., Manfredi, S., Masetti, S., Clerico, A., Biagini, A., Andreassi, M. G. (2001) Evidence for DNA damage in patients with coronary artery disease. *Mutat.Res.* 493, 23-30
- Botto, N., Masetti, S., Petrozzi, L., Vassalle, C., Manfredi, S., Biagini, A., Andreassi, M. G. (2002) Elevated levels of oxidative DNA damage in patients with coronary artery disease. *Coron.Artery Dis.* 13, 269-274
- Browder, T., Folkman, J., Pirie-Shepherd, S. (2000) The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J.Biol.Chem.* 275, 1521-1524
- Budd, R. C. (2001) Activation-induced cell death. *Curr.Opin.Immunol.* 13, 356-362
- Buja, L. M., Eigenbrodt, M. L., Eigenbrodt, E. H. (1993) Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch.Pathol.Lab Med.* 117, 1208-1214
- Buja, L. M., Entman, M. L. (1998) Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease. *Circulation* 98, 1355-1357
- Butenas, S., Mann, K. G. (2004) Active tissue factor in blood? *Nat.Med.* 10, 1155-1156
- Camerer, E., Rottingen, J. A., Iversen, J. G., Prydz, H. (1996) Coagulation factors VII and X induce Ca<sup>2+</sup> oscillations in Madin-Darby canine kidney cells only when proteolytically active. *J.Biol.Chem.* 271, 29034-29042

- Camerer, E., Rottingen, J. A., Gjernes, E., Larsen, K., Skartlien, A. H., Iversen, J. G., Prydz, H. (1999) Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the egr-1 gene. *J.Biol.Chem.* 274, 32225-32233
- Camerer, E., Gjernes, E., Wiiger, M., Pringle, S., Prydz, H. (2000) Binding of factor VIIa to tissue factor on keratinocytes induces gene expression. *J.Biol.Chem.* 275, 6580-6585
- Carmeliet, P., Collen, D. (1998) Tissue factor. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 30, 661-667
- Carson, S. D., Henry, W. M., Shows, T. B. (1985) Tissue factor gene localized to human chromosome 1 (1pter----1p21). *Science* 229, 991-993
- Chand, H. S., Ness, S. A., Kisiel, W. (2006) Identification of a novel human tissue factor splice variant that is upregulated in tumor cells. *Int.J.Cancer* 118, 1713-1720
- Chang, J., Xie, M., Shah, V. R., Schneider, M. D., Entman, M. L., Wei, L., Schwartz, R. J. (2006) Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103, 14495-14500
- Chao, D. T., Korsmeyer, S. J. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu.Rev.Immunol.* 16, 395-419
- Chen, Y., Du, X. Y. (2007) Functional properties and intracellular signaling of CCN1/Cyr61. *J.Cell Biochem.* 100, 1337-1345
- Chen, Z., Chua, C. C., Ho, Y. S., Hamdy, R. C., Chua, B. H. (2001) Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 280, H2313-H2320
- Claycomb, W. C., Lanson, N. A., Jr., Stallworth, B. S., Egeland, D. B., Delcarpio, J. B., Bahinski, A., Izzo, N. J., Jr. (1998) HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95, 2979-2984
- Clerk, A., Harrison, J. G., Long, C. S., Sugden, P. H. (1999) Pro-inflammatory cytokines stimulate mitogen-activated protein kinase subfamilies, increase phosphorylation of c-Jun and ATF2 and upregulate c-Jun protein in neonatal rat ventricular myocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* 31, 2087-2099
- Clerk, A., Cole, S. M., Cullingford, T. E., Harrison, J. G., Jormakka, M., Valks, D. M. (2003) Regulation of cardiac myocyte cell death. *Pharmacol.Ther.* 97, 223-261
- Condorelli, G., Drusco, A., Stassi, G., Bellacosa, A., Roncarati, R., Iaccarino, G., Russo, M. A., Gu, Y., Dalton, N., Chung, C., Latronico, M. V., Napoli, C., Sadoshima, J., Croce, C. M., Ross, J., Jr. (2002) Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 12333-12338

- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., Marshall, C. J. (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77, 841-852
- Cross, M. J., Claesson-Welsh, L. (2001) FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol.Sci.* 22, 201-207
- Czerski, L., Nunez, G. (2004) Apoptosome formation and caspase activation: is it different in the heart? *J.Mol.Cell Cardiol.* 37, 643-652
- Danial, N. N., Korsmeyer, S. J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M. E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241
- Davie, E. W., Ratnoff, O. D. (1964) WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING. *Science* 145, 1310-1312
- Delcarpio, J. B., Lanson, N. A., Jr., Field, L. J., Claycomb, W. C. (1991) Morphological characterization of cardiomyocytes isolated from a transplantable cardiac tumor derived from transgenic mouse atria (AT-1 cells). *Circ.Res.* 69, 1591-1600
- Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y., Wu, X. (2003) A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* 115, 61-70
- Diamant, M., Tushuizen, M. E., Sturk, A., Nieuwland, R. (2004) Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur.J.Clin.Invest* 34, 392-401
- Dorfleutner, A., Hintermann, E., Tarui, T., Takada, Y., Ruf, W. (2004) Cross-talk of integrin alpha3beta1 and tissue factor in cell migration. *Mol.Biol.Cell* 15, 4416-4425
- Downward, J. (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin.Cell Dev.Biol.* 15, 177-182
- Drake, T. A., Morrissey, J. H., Edgington, T. S. (1989) Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am.J.Pathol.* 134, 1087-1097
- Drake, T. A., Cheng, J., Chang, A., Taylor, F. B., Jr. (1993) Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis. *Am.J.Pathol.* 142, 1458-1470
- Dudek, H., Datta, S. R., Franke, T. F., Birnbaum, M. J., Yao, R., Cooper, G. M., Segal, R. A., Kaplan, D. R., Greenberg, M. E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275, 661-665

- Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R. J., Nemer, M. (1997) The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* 16, 5687-5696
- Dutka, D. P., Elborn, J. S., Delamere, F., Shale, D. J., Morris, G. K. (1993) Tumour necrosis factor alpha in severe congestive cardiac failure. *Br.Heart J.* 70, 141-143
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., Kaufmann, S. H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.* 68, 383-424
- Eaton, D., Rodriguez, H., Vehar, G. A. (1986) Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry* 25, 505-512
- Edgington, T. S., Mackman, N., Brand, K., Ruf, W. (1991) The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb.Haemost.* 66, 67-79
- Eilertsen, K. E., Osterud, B. (2004) Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul.Fibrinolysis* 15, 521-538
- Elsasser, A., Suzuki, K., Schaper, J. (2000) Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure. *J.Mol.Cell Cardiol.* 32, 711-724
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50
- Esmon, C. T. (1979) The subunit structure of thrombin-activated factor V. Isolation of activated factor V, separation of subunits, and reconstitution of biological activity. *J.Biol.Chem.* 254, 964-973
- Ewings, K. E., Wiggins, C. M., Cook, S. J. (2007) Bim and the pro-survival Bcl-2 proteins: opposites attract, ERK repels. *Cell Cycle* 6, 2236-2240
- Fackler, O. T., Grosse, R. (2008) Cell motility through plasma membrane blebbing. *J.Cell Biol.* 181, 879-884
- Fan, L., Yotov, W. V., Zhu, T., Esmailzadeh, L., Joyal, J. S., Sennlaub, F., Heveker, N., Chemtob, S., Rivard, G. E. (2005) Tissue factor enhances protease-activated receptor-2-mediated factor VIIa cell proliferative properties. *J.Thromb.Haemost.* 3, 1056-1063
- Fang, J., Gu, L., Zhu, N., Tang, H., Alvarado, C. S., Zhou, M. (2008) Tissue factor/FVIIa activates Bcl-2 and prevents doxorubicin-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *BMC.Cancer* 8, 69

- Ferrari, R., Bachetti, T., Confortini, R., Opasich, C., Febo, O., Corti, A., Cassani, G., Visioli, O. (1995) Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 92, 1479-1486
- Fischer, E. G., Riewald, M., Huang, H. Y., Miyagi, Y., Kubota, Y., Mueller, B. M., Ruf, W. (1999) Tumor cell adhesion and migration supported by interaction of a receptor-protease complex with its inhibitor. *J.Clin.Invest* 104, 1213-1221
- Fisher, K. L., Gorman, C. M., Vehar, G. A., O'Brien, D. P., Lawn, R. M. (1987) Cloning and expression of human tissue factor cDNA. *Thromb.Res.* 48, 89-99
- Fleck, R. A., Rao, L. V., Rapaport, S. I., Varki, N. (1990) Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb.Res.* 59, 421-437
- Freyssinet, J. M. (2003) Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J.Thromb.Haemost.* 1, 1655-1662
- Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R. N., Walsh, K. (2000) Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 101, 660-667
- Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V., Ferrara, N. (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J.Biol.Chem.* 273, 30336-30343
- Gessler, F., Voss, V., Dutzmann, S., Seifert, V., Gerlach, R., Kogel, D. (2010) Inhibition of tissue factor/protease-activated receptor-2 signaling limits proliferation, migration and invasion of malignant glioma cells. *Neuroscience* 165, 1312-1322
- Giesen, P. L., Rauch, U., Bohrmann, B., Kling, D., Roque, M., Fallon, J. T., Badimon, J. J., Hember, J., Riederer, M. A., Nemerson, Y. (1999) Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 2311-2315
- Gottlieb, R. A., Engler, R. L. (1999) Apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 874, 412-426
- Grutter, M. G. (2000) Caspases: key players in programmed cell death. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 10, 649-655
- Gude, N., Muraski, J., Rubio, M., Kajstura, J., Schaefer, E., Anversa, P., Sussman, M. A. (2006) Akt promotes increased cardiomyocyte cycling and expansion of the cardiac progenitor cell population. *Circ.Res.* 99, 381-388
- Gustafsson, A. B., Gottlieb, R. A. (2007) Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 292, C45-C51
- Gustafsson, A. B., Gottlieb, R. A. (2008) Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc.Res.* 77, 334-343

- Hamada, K., Kuratsu, J., Saitoh, Y., Takeshima, H., Nishi, T., Ushio, Y. (1996) Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer* 77, 1877-1883
- He, Y., Chang, G., Zhan, S., Song, X., Wang, X., Luo, Y. (2008) Soluble tissue factor has unique angiogenic activities that selectively promote migration and differentiation but not proliferation of endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 370, 489-494
- Hembrough, T. A., Swartz, G. M., Papathanassiou, A., Vlasuk, G. P., Rote, W. E., Green, S. J., Pribluda, V. S. (2003) Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res.* 63, 2997-3000
- Hjortoe, G. M., Petersen, L. C., Albrechtsen, T., Sorensen, B. B., Norby, P. L., Mandal, S. K., Pendurthi, U. R., Rao, L. V. (2004) Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood* 103, 3029-3037
- Hobbs, J. E., Zakarija, A., Cundiff, D. L., Doll, J. A., Hymen, E., Cornwell, M., Crawford, S. E., Liu, N., Signaevsky, M., Soff, G. A. (2007) Alternatively spliced human tissue factor promotes tumor growth and angiogenesis in a pancreatic cancer tumor model. *Thromb.Res.* 120 Suppl 2, S13-S21
- Howell WH. (1935) Theories of blood coagulation. *Physiologic Review*, 15: 435-470.
- Huang, J., Nakamura, K., Ito, Y., Uzuka, T., Morikawa, M., Hirai, S., Tomihara, K., Tanaka, T., Masuta, Y., Ishii, K., Kato, K., Hamada, H. (2005) Bcl-xL gene transfer inhibits Bax translocation and prolongs cardiac cold preservation time in rats. *Circulation* 112, 76-83
- Ing, D. J., Zang, J., Dzau, V. J., Webster, K. A., Bishopric, N. H. (1999) Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. *Circ.Res.* 84, 21-33
- Isner, J. M., Kearney, M., Bortman, S., Passeri, J. (1995) Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 91, 2703-2711
- Jacobson, M. D., Weil, M., Raff, M. C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-354
- Jiang, X., Guo, Y. L., Bromberg, M. E. (2006) Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex prevents apoptosis in human breast cancer cells. *Thromb.Haemost.* 96, 196-201
- Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W. A., Sonnenblick, E. H., Krajewski, S., Reed, J. C., Olivetti, G., Anversa, P. (1996) Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 74, 86-107

- Kalafatis, M., Swords, N. A., Rand, M. D., Mann, K. G. (1994) Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochim.Biophys.Acta* 1227, 113-129
- Kang, M. R., Muller, M. T., Chung, I. K. (2004) Telomeric DNA damage by topoisomerase I. A possible mechanism for cell killing by camptothecin. *J.Biol.Chem.* 279, 12535-12541
- Kao, F. T., Hartz, J., Horton, R., Nemerson, Y., Carson, S. D. (1988) Regional assignment of human tissue factor gene (F3) to chromosome 1p21-p22. *Somat.Cell Mol.Genet.* 14, 407-410
- Kasthuri, R. S., Taubman, M. B., Mackman, N. (2009) Role of tissue factor in cancer. *J.Clin.Oncol.* 27, 4834-4838
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer* 26, 239-257
- Kirshenbaum, L. A., De, M. D. (1997) The bcl-2 gene product prevents programmed cell death of ventricular myocytes. *Circulation* 96, 1580-1585
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579-5588
- Kong, J. Y., Rabkin, S. W. (1999) Thapsigargin enhances camptothecin-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Pharmacol.Toxicol.* 85, 212-220
- Kono, Y., Nakamura, K., Kimura, H., Nishii, N., Watanabe, A., Banba, K., Miura, A., Nagase, S., Sakuragi, S., Kusano, K. F., Matsubara, H., Ohe, T. (2006) Elevated levels of oxidative DNA damage in serum and myocardium of patients with heart failure. *Circ.J.* 70, 1001-1005
- Krijnen, P. A., Nijmeijer, R., Meijer, C. J., Visser, C. A., Hack, C. E., Niessen, H. W. (2002) Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J.Clin.Pathol.* 55, 801-811
- Lamparska-Przybysz, M., Gajkowska, B., Motyl, T. (2005) Cathepsins and BID are involved in the molecular switch between apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells exposed to camptothecin. *J.Physiol Pharmacol.* 56 Suppl 3, 159-179
- Lee, Y., Gustafsson, A. B. (2009) Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis.* 14, 536-548
- Leppa, S., Saffrich, R., Ansorge, W., Bohmann, D. (1998) Differential regulation of c-Jun by ERK and JNK during PC12 cell differentiation. *EMBO J.* 17, 4404-4413



- Levine, B., Kalman, J., Mayer, L., Fillit, H. M., Packer, M. (1990) Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N.Engl.J.Med.* 323, 236-241
- Ley, R., Balmanno, K., Hadfield, K., Weston, C., Cook, S. J. (2003) Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim. *J.Biol.Chem.* 278, 18811-18816
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490
- Luther, T., Dittert, D. D., Kotzsch, M., Erlich, J., Albrecht, S., Mackman, N., Muller, M. (2000) Functional implications of tissue factor localization to cell-cell contacts in myocardium. *J.Pathol.* 192, 121-130
- Lyons, A. B. (2000) Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J.Immunol.Methods* 243, 147-154
- MacFarlane RG. (1972) The theory of blood coagulation., in R Biggs ed., Human Blood Coagulation, *Haemostasis and Thrombosis*.: Oxford, Blackwell Scientific Publications: 1-31
- Mackman, N., Morrissey, J. H., Fowler, B., Edgington, T. S. (1989) Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* 28, 1755-1762
- Mackman, N., Imes, S., Maske, W. H., Taylor, B., Lusic, A. J., Drake, T. A. (1992) Structure of the murine tissue factor gene. Chromosome location and conservation of regulatory elements in the promoter. *Arterioscler.Thromb.*12, 474-483
- Mackman, N. (1995) Regulation of the tissue factor gene. *FASEB J.* 9, 883-889
- Mackman, N. (2004) Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 24, 1015-1022
- Mackman, N. (2005) Tissue-specific hemostasis in mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 25, 2273-2281
- Mackman, N. (2007) Alternatively spliced tissue factor - one cut too many? *Thromb.Haemost.* 97, 5-8

- Mackman, N., Tilley, R. E., Key, N. S. (2007) Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 27, 1687-1693
- Mackman, N. (2009) The role of tissue factor and factor VIIa in hemostasis. *Anesth.Analg.* 108, 1447-1452
- Majno, G., Joris, I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am.J.Pathol.* 146, 3-15
- Mallat, Z., Benamer, H., Hugel, B., Benessiano, J., Steg, P. G., Freyssinet, J. M., Tedgui, A. (2000) Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 101, 841-843
- Mansour, S. J., Matten, W. T., Hermann, A. S., Candia, J. M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G. F., Ahn, N. G. (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 265, 966-970
- Marutsuka, K., Hatakeyama, K., Sato, Y., Yamashita, A., Sumiyoshi, A., Asada, Y. (2002) Protease-activated receptor 2 (PAR2) mediates vascular smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex. *Thromb.Res.* 107, 271-276
- Masters, C., Crane, D. (1998) On the role of the peroxisome in cell differentiation and carcinogenesis. *Mol.Cell Biochem.* 187, 85-97
- Matsui, T., Li, L., del, M., Fukui, Y., Franke, T. F., Hajjar, R. J., Rosenzweig, A. (1999) Adenoviral gene transfer of activated phosphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation* 100, 2373-2379
- Matsui, T., Tao, J., del, M. F., Lee, K. H., Li, L., Picard, M., Force, T. L., Franke, T. F., Hajjar, R. J., Rosenzweig, A. (2001) Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation* 104, 330-335
- Menendez, J. A., Mehmi, I., Griggs, D. W., Lupu, R. (2003) The angiogenic factor CYR61 in breast cancer: molecular pathology and therapeutic perspectives. *Endocr.Relat Cancer* 10, 141-152
- Miao, W., Luo, Z., Kitsis, R. N., Walsh, K. (2000) Intracoronary, adenovirus-mediated Akt gene transfer in heart limits infarct size following ischemia-reperfusion injury in vivo. *J.Mol.Cell Cardiol.* 32, 2397-2402
- Miyamoto, S., Rubio, M., Sussman, M. A. (2009a) Nuclear and mitochondrial signalling Akts in cardiomyocytes. *Cardiovasc.Res.* 82, 272-285
- Miyamoto, S., Murphy, A. N., Brown, J. H. (2009b) Akt mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue. *J.Bioenerg.Biomembr.* 41, 169-180
- Mo, F. E., Lau, L. F. (2006) The matricellular protein CCN1 is essential for cardiac development. *Circ.Res.* 99, 961-969

- Molkentin, J. D., Jobe, S. M., Markham, B. E. (1996) Alpha-myosin heavy chain gene regulation: delineation and characterization of the cardiac muscle-specific enhancer and muscle-specific promoter. *J.Mol.Cell Cardiol.* 28, 1211-1225
- Morawitz, P. (1905) Die Chemie der Blutgerinnung. *Ergebn.Physiol* 4, 307-422
- Morrissey, J. H., Fakhrai, H., Edgington, T. S. (1987) Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell* 50, 129-135
- Muller, I., Klocke, A., Alex, M., Kotsch, M., Luther, T., Morgenstern, E., Zieseniss, S., Zahler, S., Preissner, K., Engelmann, B. (2003) Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J.* 17, 476-478
- Muller, M., Albrecht, S., Golfert, F., Hofer, A., Funk, R. H., Magdolen, V., Flossel, C., Luther, T. (1999) Localization of tissue factor in actin-filament-rich membrane areas of epithelial cells. *Exp.Cell Res.* 248, 136-147
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 51 Pt 1, 263-273
- Muzio, M. (1998) Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis. *Int.J.Clin.Lab Res.* 28, 141-147
- Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365
- Naito, K., Fujikawa, K. (1991) Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J.Biol.Chem.* 266, 7353-7358
- Narula, J., Nicol, P. D., Southern, J. F., Pieri, P., O'Donnell, S. M., Guerrerro, J. L., Nossiff, N. D., Newell, J. B., Strauss, H. W., Khaw, B. A. (1994) Evaluation of myocardial infarct size before and after reperfusion: dual-tracer imaging with radiolabeled antimyosin antibody. *J.Nucl.Med.* 35, 1076-1085
- Nemerson, Y. (1966) The reaction between bovine brain tissue factor and factors VII and X. *Biochemistry* 5, 601-608
- Nemerson, Y., Bach, R. (1982) Tissue factor revisited. *Prog.Hemost.Thromb.* 6, 237-261
- Nolf P. (1938) The coagulation of the blood. *Medicine*, 17: 135-165.
- Oeth, P., Parry, G. C., Mackman, N. (1997) Regulation of the tissue factor gene in human monocytic cells. Role of AP-1, NF-kappa B/Rel, and Sp1 proteins in uninduced and lipopolysaccharide-induced expression. *Arterioscler.Thromb. Vasc. Biol.* 17, 365-374
- Olivetti, G., Quaini, F., Sala, R., Lagrasta, C., Corradi, D., Bonacina, E., Gambert, S. R., Cigola, E., Anversa, P. (1996) Acute myocardial infarction in humans is

associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* 28, 2005-2016

Ollivier, V., Bentolila, S., Chabbat, J., Hakim, J., de, P. D. (1998) Tissue factor-dependent vascular endothelial growth factor production by human fibroblasts in response to activated factor VII. *Blood* 91, 2698-2703

Osterholm, C., Li, S., Ekberg, H., Hedner, U., Holgersson, J. (2008) Downregulation of tissue factor (TF) by RNA interference induces apoptosis and impairs cell survival of primary endothelium and tumor cells. *Cell Tissue Res.* 334, 93-102

Osterud, B., Rapaport, S. I. (1977) Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74, 5260-5264

Ott, I., Fischer, E. G., Miyagi, Y., Mueller, B. M., Ruf, W. (1998) A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J.Cell Biol.* 140, 1241-1253

Ott, I. (2003) Tissue factor in acute coronary syndromes. *Semin.Vasc.Med.* 3, 185-192

Oudit, G. Y., Sun, H., Kerfant, B. G., Crackower, M. A., Penninger, J. M., Backx, P. H. (2004) The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J.Mol.Cell Cardiol.* 37, 449-471

Oudit, G. Y., Penninger, J. M. (2009) Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN. *Cardiovasc.Res.* 82, 250-260

Pawlinski, R., Pedersen, B., Erlich, J., Mackman, N. (2004) Role of tissue factor in haemostasis, thrombosis, angiogenesis and inflammation: lessons from low tissue factor mice. *Thromb.Haemost.* 92, 444-450

Pawlinski, R., Tencati, M., Holscher, T., Pedersen, B., Voet, T., Tilley, R. E., Marynen, P., Mackman, N. (2007) Role of cardiac myocyte tissue factor in heart hemostasis. *J.Thromb.Haemost.* 5, 1693-1700

Peitsch, M. C., Muller, C., Tschopp, J. (1993) DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts. *Nucleic Acids Res.* 21, 4206-4209

Pendurthi, U. R., Allen, K. E., Ezban, M., Rao, L. V. (2000) Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. *J.Biol.Chem.* 275, 14632-14641

Peterkin, T., Gibson, A., Loose, M., Patient, R. (2005) The roles of GATA-4, -5 and -6 in vertebrate heart development. *Semin.Cell Dev.Biol.* 16, 83-94

Petersen, L. C., Thastrup, O., Hagel, G., Sorensen, B. B., Freskgard, P. O., Rao, L. V., Ezban, M. (2000) Exclusion of known protease-activated receptors in factor VIIa-induced signal transduction. *Thromb.Haemost.* 83, 571-576

- Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkela, R., Ruskoaho, H. (2004) GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc.Res.* 63, 196-207
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., Rizzuto, R. (2008) Calcium and apoptosis: ER-mitochondria  $Ca^{2+}$  transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 27, 6407-6418
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., Ashkenazi, A. (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J.Biol.Chem.* 271, 12687-12690
- Potts, M. B., Vaughn, A. E., McDonough, H., Patterson, C., Deshmukh, M. (2005) Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP. *J.Cell Biol.* 171, 925-930
- Poulsen, L. K., Jacobsen, N., Sorensen, B. B., Bergenheim, N. C., Kelly, J. D., Foster, D. C., Thastrup, O., Ezban, M., Petersen, L. C. (1998) Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor. *J.Biol.Chem.* 273, 6228-6232
- Powers, C. J., McLeskey, S. W., Wellstein, A. (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr.Relat Cancer* 7, 165-197
- Rak, J., Milsom, C., Yu, J. (2008) Tissue factor in cancer. *Curr.Opin.Hematol.* 15, 522-528
- Rao, L. V., Pendurthi, U. R. (2005) Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 25, 47-56
- Rauch, U., Bonderman, D., Bohrmann, B., Badimon, J. J., Hember, J., Riederer, M. A., Nemerson, Y. (2000) Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 96, 170-175
- Reeve, J. L., Szegezdi, E., Logue, S. E., Chonghaile, T. N., O'Brien, T., Ritter, T., Samali, A. (2007) Distinct mechanisms of cardiomyocyte apoptosis induced by doxorubicin and hypoxia converge on mitochondria and are inhibited by Bcl-xL. *J.Cell Mol.Med.* 11, 509-520
- Reutelingsperger, C. P., van Heerde, W. L. (1997) Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol.Life Sci.* 53, 527-532
- Ricci, C., Jong, C. J., Schaffer, S. W. (2008) Proapoptotic and antiapoptotic effects of hyperglycemia: role of insulin signaling. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 86, 166-172
- Riewald, M., Ruf, W. (2001) Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 7742-7747
- Riewald, M., Ruf, W. (2002) Orchestration of coagulation protease signaling by tissue factor. *Trends Cardiovasc.Med.* 12, 149-154

- Rivers, R. P., Hathaway, W. E., Weston, W. L. (1975) The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes. *Br.J.Haematol.* 30, 311-316
- Ruf, W., Schullek, J. R., Stone, M. J., Edgington, T. S. (1994) Mutational mapping of functional residues in tissue factor: identification of factor VII recognition determinants in both structural modules of the predicted cytokine receptor homology domain. *Biochemistry* 33, 1565-1572
- Ruf, W., Edgington, T. S. (1994) Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J.* 8, 385-390
- Ruf, W., Mueller, B. M. (1999) Tissue factor signaling. *Thromb.Haemost.* 82, 175-182
- Ruf, W., Mueller, B. M. (2006) Thrombin generation and the pathogenesis of cancer. *Semin.Thromb.Hemost.* 32 Suppl 1, 61-68
- Ruf, W., Riewald, M., (2009) Regulation of Tissue Factor Expression. Madame Curie Bioscience Database, NCBI
- Sanchis, D., Mayorga, M., Ballester, M., Comella, J. X. (2003) Lack of Apaf-1 expression confers resistance to cytochrome c-driven apoptosis in cardiomyocytes. *Cell Death.Differ.* 10, 977-986
- Saraste, A., Pulkki, K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc.Res.* 45, 528-537
- Scarpati, E. M., Wen, D., Broze, G. J., Jr., Miletich, J. P., Flandermeyer, R. R., Siegel, N. R., Sadler, J. E. (1987) Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry* 26, 5234-5238
- Schaffner, F., Ruf, W. (2009) Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 29, 1999-2004
- Schechter, A. D., Spirn, B., Rossikhina, M., Giesen, P. L., Bogdanov, V., Fallon, J. T., Fisher, E. A., Schnapp, L. M., Nemerson, Y., Taubman, M. B. (2000) Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ.Res.* 87, 126-132
- Schmidt, A. Zur Blutlehre. Leipzig, FCW Vogel Verlag. 1892.
- Scholzen, T., Gerdes, J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J.Cell Physiol* 182, 311-322
- Schuler, M., Green, D. R. (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem.Soc.Trans.* 29, 684-688
- Schwartz, H., Tolley, N. D., Foulks, J. M., Denis, M. M., Risenmay, B. W., Buerke, M., Tilley, R. E., Rondina, M. T., Harris, E. M., Kraiss, L. W., Mackman, N., Zimmerman, G. A., Weyrich, A. S. (2006) Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J.Exp.Med.* 203, 2433-2440

- Seto, S., Onodera, H., Kaido, T., Yoshikawa, A., Ishigami, S., Arii, S., Imamura, M. (2000) Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer* 88, 295-301
- Shiraishi, I., Melendez, J., Ahn, Y., Skavdahl, M., Murphy, E., Welch, S., Schaefer, E., Walsh, K., Rosenzweig, A., Torella, D., Nurzynska, D., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., Sussman, M. A. (2004) Nuclear targeting of Akt enhances kinase activity and survival of cardiomyocytes. *Circ.Res.* 94, 884-891
- Shiraishi, J., Tatsumi, T., Keira, N., Akashi, K., Mano, A., Yamanaka, S., Matoba, S., Asayama, J., Yaoi, T., Fushiki, S., Fliss, H., Nakagawa, M. (2001) Important role of energy-dependent mitochondrial pathways in cultured rat cardiac myocyte apoptosis. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 281, H1637-H1647
- Siddiqui, F. A., Desai, H., Amirkhosravi, A., Amaya, M., Francis, J. L. (2002) The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets.* 13, 247-253
- Signaevsky, M., Hobbs, J., Doll, J., Liu, N., Soff, G. A. (2008) Role of alternatively spliced tissue factor in pancreatic cancer growth and angiogenesis. *Semin.Thromb.Hemost.* 34, 161-169
- Sorensen, B. B., Freskgard, P. O., Nielsen, L. S., Rao, L. V., Ezban, M., Petersen, L. C. (1999) Factor VIIa-induced p44/42 mitogen-activated protein kinase activation requires the proteolytic activity of factor VIIa and is independent of the tissue factor cytoplasmic domain. *J.Biol.Chem.* 274, 21349-21354
- Sorensen, B. B., Rao, L. V., Tornehave, D., Gammeltoft, S., Petersen, L. C. (2003) Antiapoptotic effect of coagulation factor VIIa. *Blood* 102, 1708-1715
- Spicer, E. K., Horton, R., Bloem, L., Bach, R., Williams, K. R., Guha, A., Kraus, J., Lin, T. C., Nemerson, Y., Konigsberg, W. H. (1987) Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 5148-5152
- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., Alnemri, E. S. (2001) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112-116
- Steinhilber, M. E., Lanson, N. A., Jr., Dresdner, K. P., Delcarpio, J. B., Wit, A. L., Claycomb, W. C., Field, L. J. (1990) Proliferation in vivo and in culture of differentiated adult atrial cardiomyocytes from transgenic mice. *Am.J.Physiol* 259, H1826-H1834
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S. (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178
- Szotowski, B., Goldin-Lang, P., Antoniak, S., Bogdanov, V. Y., Pathirana, D., Pauschinger, M., Dorner, A., Kuehl, U., Coupland, S., Nemerson, Y., Hummel, M., Poller, W., Hetzer, R., Schultheiss, H. P., Rauch, U. (2005a) Alterations in myocardial

tissue factor expression and cellular localization in dilated cardiomyopathy. *J.Am.Coll.Cardiol.* 45, 1081-1089

Szotowski, B., Antoniak, S., Poller, W., Schultheiss, H. P., Rauch, U. (2005b) Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ.Res.* 96, 1233-1239

Szotowski, B., Antoniak, S., Rauch, U. (2006) Alternatively spliced tissue factor: a previously unknown piece in the puzzle of hemostasis. *Trends Cardiovasc.Med.* 16, 177-182

Taylor, F. B., Jr., Chang, A., Ruf, W., Morrissey, J. H., Hinshaw, L., Catlett, R., Blick, K., Edgington, T. S. (1991) Lethal E. coli septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ.Shock* 33, 127-134

Testa, M., Yeh, M., Lee, P., Fanelli, R., Loperfido, F., Berman, J. W., LeJemtel, T. H. (1996) Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* 28, 964-971

Thornberry, N. A., Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316

Thornberry, N. A. (1999) Caspases: a decade of death research. *Cell Death.Differ.* 6, 1023-1027

Todorovic, V., Chen, C. C., Hay, N., Lau, L. F. (2005) The matrix protein CCN1 (CYR61) induces apoptosis in fibroblasts. *J.Cell Biol.* 171, 559-568

Tong, H., Chen, W., Steenbergen, C., Murphy, E. (2000) Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ.Res.* 87, 309-315

Tsutsui, H., Kinugawa, S., Matsushima, S. (2008) Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure. *Circ.J.* 72 Suppl A, A31-A37

Ucker, D. S. (1991) Death by suicide: one way to go in mammalian cellular development? *New Biol.* 3, 103-109

Umansky, S. R., Tomei, L. D. (1997) Apoptosis in the heart. *Adv.Pharmacol.* 41, 383-407

van den Berg, Y. W., van den Hengel, L. G., Myers, H. R., Ayachi, O., Jordanova, E., Ruf, W., Spek, C. A., Reitsma, P. H., Bogdanov, V. Y., Versteeg, H. H. (2009) Alternatively spliced tissue factor induces angiogenesis through integrin ligation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106, 19497-19502

van Heerde, W. L., Robert-Offerman, S., Dumont, E., Hofstra, L., Doevendans, P. A., Smits, J. F., Daemen, M. J., Reutelingsperger, C. P. (2000) Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovasc.Res.* 45, 549-559



- van, E. M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., Reutelingsperger, C. P. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9
- Versteeg, H. H., Hoedemaeker, I., Diks, S. H., Stam, J. C., Spaargaren, M., van Bergen En Henegouwen PM, van Deventer, S. J., Peppelenbosch, M. P. (2000) Factor VIIa/tissue factor-induced signaling via activation of Src-like kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and Rac. *J.Biol.Chem.* 275, 28750-28756
- Versteeg, H. H., Sorensen, B. B., Slofstra, S. H., Van den Brande, J. H., Stam, J. C., van Bergen En Henegouwen PM, Richel, D. J., Petersen, L. C., Peppelenbosch, M. P. (2002) VIIa/tissue factor interaction results in a tissue factor cytoplasmic domain-independent activation of protein synthesis, p70, and p90 S6 kinase phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 277, 27065-27072
- Versteeg, H. H., Spek, C. A., Richel, D. J., Peppelenbosch, M. P. (2004a) Coagulation factors VIIa and Xa inhibit apoptosis and anoikis. *Oncogene* 23, 410-417
- Versteeg, H. H., Spek, C. A., Slofstra, S. H., Diks, S. H., Richel, D. J., Peppelenbosch, M. P. (2004b) FVIIa:TF induces cell survival via G12/G13-dependent Jak/STAT activation and BclXL production. *Circ.Res.* 94, 1032-1040
- Versteeg, H. H., Ruf, W. (2006) Emerging insights in tissue factor-dependent signaling events. *Semin.Thromb.Hemost.* 32, 24-32
- Versteeg, H. H., Schaffner, F., Kerver, M., Petersen, H. H., Ahamed, J., Felding-Habermann, B., Takada, Y., Mueller, B. M., Ruf, W. (2008) Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood* 111, 190-199
- Wang, K., Jiang, Y. Z., Chen, D. B., Zheng, J. (2009) Hypoxia enhances FGF2- and VEGF-stimulated human placental artery endothelial cell proliferation: Roles of MEK1/2 / ERK1/2 and PI3K/AKT1 pathways. *Placenta* 30, 1045-1051
- Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J. (2000) tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 14, 2060-2071
- White, S. M., Constantin, P. E., Claycomb, W. C. (2004) Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 286, H823-H829
- Wilcox, J. N., Smith, K. M., Schwartz, S. M., Gordon, D. (1989) Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86, 2839-2843
- Williams, W. J., Norris, D. G. (1966) Purification of a bovine plasma protein (factor VII) which is required for the activity of lung microsomes in blood coagulation. *J.Biol.Chem.* 241, 1847-1856

- Yndestad, A., Marshall, A. K., Hodgkinson, J. D., Tham, e. L., Sugden, P. H., Clerk, A. (2010) Modulation of interleukin signalling and gene expression in cardiac myocytes by endothelin-1. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 42, 263-272
- Yoshida, Y., Togi, K., Matsumae, H., Nakashima, Y., Kojima, Y., Yamamoto, H., Ono, K., Nakamura, T., Kita, T., Tanaka, M. (2007) CCN1 protects cardiac myocytes from oxidative stress via beta1 integrin-Akt pathway. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 355, 611-618
- Yue, T. L., Wang, C., Romanic, A. M., Kikly, K., Keller, P., DeWolf, W. E., Jr., Hart, T. K., Thomas, H. C., Storer, B., Gu, J. L., Wang, X., Feuerstein, G. Z. (1998) Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3. *J.Mol.Cell Cardiol.* 30, 495-507
- Yue, T. L., Wang, C., Gu, J. L., Ma, X. L., Kumar, S., Lee, J. C., Feuerstein, G. Z., Thomas, H., Maleeff, B., Ohlstein, E. H. (2000) Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ.Res.* 86, 692-699
- Zeerleder, S., Schloesser, M., Redondo, M., Wuillemin, W. A., Engel, W., Furlan, M., Lammle, B. (1999) Reevaluation of the incidence of thromboembolic complications in congenital factor XII deficiency--a study on 73 subjects from 14 Swiss families. *Thromb.Haemost.* 82, 1240-1246
- Zhang, X. D., Borrow, J. M., Zhang, X. Y., Nguyen, T., Hersey, P. (2003) Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria. *Oncogene* 22, 2869-2881
- Zhang, X. M., Chen, J., Xia, Y. G., Xu, Q. (2005) Apoptosis of murine melanoma B16-BL6 cells induced by quercetin targeting mitochondria, inhibiting expression of PKC-alpha and translocating PKC-delta. *Cancer Chemother.Pharmacol.* 55, 251-262
- Zillmann, A., Luther, T., Muller, I., Kotzsch, M., Spannagl, M., Kauke, T., Oelschlagel, U., Zahler, S., Engelmann, B. (2001) Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 281, 603-609
- Zubilewicz, A., Hecquet, C., Jeanny, J. C., Soubrane, G., Courtois, Y., Mascarelli, F. (2001) Two distinct signalling pathways are involved in FGF2-stimulated proliferation of choriocapillary endothelial cells: a comparative study with VEGF. *Oncogene* 20, 1403-1413

## 11. Publikationsliste

### Diese Dissertation wird in Teilen in folgender Publikation veröffentlicht:

**Boltzen U**, Weithaeuser A, Antoniak S, Fechner H, Poller W, Mackman N, Schultheiss HP, Rauch U. Alternatively spliced Tissue Factor protects cardiomyocytes against TNF- $\alpha$  induced apoptosis. -wurde bei *Circulation Research* eingereicht

### Weitere Publikationen:

Antoniak S, **Boltzen U**, Eisenreich A, Stellbaum C, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Regulation of cardiomyocyte full-length Tissue Factor expression and microparticle release under inflammatory conditions in vitro. *J Thromb Haemost.* 2009 May;7(5):871-8. Epub 2009 Feb 18.

Eisenreich A, **Boltzen U**, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Effects of the Cdc2-like kinase-family and DNA topoisomerase I on the alternative splicing of eNOS in TNF- $\alpha$ -stimulated human endothelial cells. *Biol Chem.* 2008 Oct;389(10):1333-8

Antoniak S, **Boltzen U**, Kallwellis-Opara A, Riad A, Dörner A, Poller W, Tschöpe C, Pauschinger M, Schultheiss HP, Rauch U. Viral Myocarditis and Coagulopathy. Increased Tissue Factor expression and plasma thrombogenicity. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 Jul;45(1):118-26. Epub 2008 Mar 29

Liu DY, Maier A, Scholze A, Rauch U, **Boltzen U**, Zhao ZG, Zhu ZM, Tepel M. High glucose enhances transient receptor potential channel canonical type 6-dependent calcium influx in human platelets via phosphatidylinositol3-kinase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Apr;28(4):746-51. Epub 2008 Feb 7.

Stellbaum C, Willich T, **Boltzen U**, Ayrál Y, Szotowski B, Piorkowski M, Schultheiss HP, Rauch U. Clopidogrel-mediated reduction of circulating tissue factor in patients with stable coronary artery disease. *Eur J Haematol*, Apr 2007, 78(4):347-52

**Kongressbeiträge:****75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 2009:**

Alice Weithaeuser, **Ulrike Boltzen**, Heinz-Peter Schultheiss, Ursula Rauch. PAR2 plays an important role for the induction of inflammation in the cardiac muscle in the acute phase coxsackie virus B3 (CVB3) induced myocarditis. Basic Res Cardiol Suppl. 2008

**52nd GTH Congress (Gesellschaft für Thrombose & Hämostase), 2008:**

- **Ulrike Boltzen**, Silvio Antoniak, Ursula Rauch. Soluble Tissue Factor protects Cardiomyocytes against TNF- $\alpha$  and Camptothecin induced Apoptosis via Bcl-x<sub>L</sub>. Hämostasiologie Suppl 2008
- Silvio Antoniak, **Ulrike Boltzen**, Peter Bobbert, Heinz-Peter Schultheiss, Ursula Rauch. Regulation of cardiomyocyte TF expression and cardiomyocytes-endothelium interaction under inflammatory conditions. Hämostasiologie Suppl 2008

**74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 2008:**

- **Ulrike Boltzen**, Silvio Antoniak, Heinz-Peter Schultheiss, Ursula Rauch. Expression of soluble Tissue Factor protects cardiomyocytes against apoptosis induced by camptothecin or TNF- $\alpha$ . Basic Res Cardiol Suppl. 2008
- Silvio Antoniak, Peter Bobbert, **Ulrike Boltzen**, Andreas Eisenreich, Wolfgang Poller, Heinz-Peter Schultheiss, Ursula Rauch. Globular Adiponectin reduced the TNF $\alpha$ - induced thrombogenicity of cardiomyocytes. Basic Res Cardiol Suppl. 2008
- Silvio Antoniak, Michel Noutsias, Maria Rohde, Andrea Block, **Ulrike Boltzen**, Olga Lettau, Matthias Pauschinger, Uwe Kühl, Dirk Lassner, Wolfgang Poller, Hans-Dieter Volk, Heinz-Peter Schultheiss, Ursula Rauch. Myocardial Tissue Factor Expression is down-regulated in Patients presenting with Inflammatory Cardiomyopathy. Basic Res Cardiol Suppl. 2008

European Students Conference 2007:

**Ulrike Boltzen**, Silvio Antoniak, Henry Fechner, Wolfgang Poller, Heinz-Peter Schultheiss and Ursula Rauch. Full-length and soluble Tissue Factor protects Cardiomyocytes against TNF- $\alpha$  induced Apoptosis.

American Heart Association, Scientific Session 2007:

Silvio Antoniak, **Ulrike Boltzen**, Franziska Bleis, Peter Bobbert, Heinz-Peter Schultheiss, and Ursula Rauch. Abstract 161: Cardiomyocytes Release Tissue Factor-positive Microparticle In Response To TNF- $\alpha$ : Increase Of The Extracellular Thrombogenicity By Microparticle Diffusion Through Endothelium. Circulation, Oct 2007; 116: II\_10.

International Society on Thrombosis and Haemostasis 2007

Silvio Antoniak, **Ulrike Boltzen**, Angela Kallwellis-Opara, Peter Bobbert, Alexander Riad, Wolfgang Poller, Matthias Pauschinger, Heinz-Peter Schultheiss and Ursula Rauch. Viral Myocarditis is a hypercoagulative state. Increased Tissue Factor expression and plasma thrombogenicity. Abstract P-T-004 J Thromb Haemost., Jul 2007; 5: S1

## 12. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Ursula Rauch-Kröhnert für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung, die gute Betreuung während der Dissertation und für ein freies wissenschaftliches Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel möchte ich herzlich für seine Bereitschaft danken, die Betreuung der Arbeit im Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin zu übernehmen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich meinen Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die wertvollen Anregungen zur praktischen Arbeit sowie die gegenseitige Unterstützung aussprechen. Besonders bedanke ich mich bei Silvio Antoniak, Alice Weithäuser und Franziska Bleis.

Großer Dank gilt auch meinen Eltern, meiner Schwester Mareike, Jan und meiner Omi, auf deren Unterstützung ich mich während der gesamten Zeit der Promotion immer verlassen konnte.

Danken möchte ich auch Almuth, die mir auch in beruflicher Hinsicht ein Vorbild war.

Für das unermüdliche Korrekturlesen möchte ich meinem Vater und Alice danken.

„Last but not least“ möchte ich meinen Freunden danken - besonders Astrid, Carolin, Miriam, Maria und Caroline - die mich in den teilweise schwierigen Phasen meiner Promotion begleiteten und mir mit ihren Zuspruch halfen, die vorliegende Arbeit letztendlich erfolgreich abzuschließen.

**Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.**

**Berlin, den**

