

# **Differenzielle Regulation des Zytokin- induzierten alternativen Spleißens des TF Gens in humanen Endothelzellen**

D i s s e r t a t i o n

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.)

Im Fach: Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biol. Andreas Eisenreich

(09.01.1980, Berlin)

Präsident/Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan/Dekanin der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter/innen: 1) Frau Prof. Dr. Ursula Rauch-Kröhnert  
2) Herr Prof. Dr. Thomas Börner  
3) Herr Prof. Dr. Wolfgang Dubiel

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Die Bedeutung alternativer Spleißprozesse	7
1.2	Das Endothel und seine Funktionen	9
1.3	Die biologische Bedeutung von Tissue Factor	10
1.4	Die Struktur und Expression von Tissue Factor	13
1.5	Die Generierung und Bedeutung alternativ gespleißter Formen von Tissue Factor	15
1.6	Die Struktur und physiologische Bedeutung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase	17
1.7	Die Beeinflussung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase unter pathophysiologischen Bedingungen	18
1.8	Das alternative Spleißen der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase	19
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
3.1	Material	22
3.1.1	Chemikalien und Substanzen	22
3.1.2	Kits	23
3.1.3	Nukleotide, Primer und Sonden	24
3.1.4	siRNAs	25
3.1.5	Enzyme	25
3.1.6	Antikörper	26
3.1.6.1	Primärantikörper	26
3.1.6.2	Sekundärantikörper	26
3.1.7	Zellen	27
3.1.8	Medien und Zusätze für die Zellkultur	27
3.1.9	Größenmarker	27
3.1.10	Puffer und Lösungen	27
3.1.11	Geräte	28
3.1.12	Sonstige Materialien	29

<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>30</b>
3.2.1	Versuchsaufbau	30
3.2.2	Die Experimente an humanen Endothelzellen	31
3.2.2.1	Die Zellkultur von HUVEC	31
3.2.2.2	Der Nachweis von Endotoxinen	32
3.2.2.3	Der Nachweis von Mykoplasmen	32
3.2.2.4	Die Inhibition und Stimulation der Endothelzellen im statischen System	33
3.2.2.5	Inhibitions- und Stimulationsversuche im dynamischen Flusskammermodell	33
3.2.2.6	Die Transfektion von Endothelzellen mit siRNAs	34
3.2.3	Molekularbiologische Methoden zum Umgang mit RNA und DNA	34
3.2.3.1	Die RNA-Isolation	34
3.2.3.2	Methoden zur RNA-Quantifizierung und -Qualitätskontrolle	35
3.2.3.3	Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	36
3.2.3.4	Die Amplifikation von DNA mittels PCR und die Auftrennung der Amplifikate mit Hilfe der Gelelektrophorese	37
3.2.3.5	Die DNA-Extraktion aus dem Elektrophoresegel für die nachfolgende Identifizierung von PCR-Produkten mittels DNA-Sequenzierung	38
3.2.3.6	Die Berechnung der DNA-Standards für die Real-Time-PCR	38
3.2.3.7	Die Durchführung der Real-Time-PCR mit sequenz-spezifischen Fluoreszenzsonden	39
3.2.4	Methoden zur Analyse der prokoagulativen Aktivität von Tissue Factor	41
3.2.4.1	Die Bestimmung der zellulären Tissue Factor-Proteinaktivität im statischen Zellkulturmodell	41
3.2.4.2	Die Bestimmung der FXa-Bildung unter dynamischen Flussbedingungen	42
3.2.5	Proteinbiochemische Untersuchungsmethoden	43
3.2.5.1	Die Isolation und Quantifizierung von Proteinen	43
3.2.5.2	Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44

3.2.5.3	Western Blots	45
3.2.6	Methoden zur Analyse der NO-Synthese und eNOS-Aktivität	46
3.2.6.1	Der Griess-Assay zur Bestimmung der Nitrat/Nitrit-Konzentration	46
3.2.6.2	Durchflusszytometrische Analysen der intrazellulären Stickstoffmonoxid-Konzentration	47
3.3	Statistische Auswertung	49
4.	<b>Ergebnisse</b>	50
4.1	Die Charakterisierung des Expressionsmusters der Clk-Familie und der DNA topo I in HUVEC	50
4.2	Die Bedeutung der Regulation alternativer Spleißprozesse für die Expression und die prokoagulatorische Aktivität von TF	52
4.2.1	Der Einfluss der Clk-Familie und der DNA topo I auf die differenzielle TF-Isoform-Expression auf mRNA-Ebene	52
4.2.2	Analysen zum Einfluss der SR-Proteinkinasen auf die Proteinexpression von fITF und asHTF	58
4.2.3	Die Wirkung der Clk- und DNA topo I-Inhibition auf die Prokoagulabilität endothelialer Zellen	59
4.2.3.1	Der Einfluss der Inhibition der SR-Proteinkinasen auf die zelluläre Prokoagulabilität von HUVEC	59
4.2.3.2	Die Bedeutung der Clk-Familie und der DNA topo I für die TF-abhängige Generierung von FXa unter Flussbedingungen	60
4.2.4	Die Auswirkungen der Clk- und DNA topo I-Inhibition auf das Phosphorylierungsmuster der SR-Proteine	61
4.2.5	Die Bedeutung von SR-Proteinen für die Expression und Aktivität der TF-Isoformen	64
4.3	Die Bedeutung und Kontrolle des alternativen Spleißens von Exon 13 der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase	68
4.3.1	Regulationsmechanismen der differenziellen eNOS-Isoform-Expression	68
4.3.2	Die Bedeutung der SR-Proteinkinasen für die eNOS-Aktivität in HUVEC	72

4.3.2.1	Die Bestimmung der extrazellulären NO <sub>2</sub> -Konzentration im Zellüberstand	73
4.3.2.2	Der Einfluss der Inhibition der Clk-Familie und der DNA topo I auf die intrazelluläre NO-Konzentration	74
5.	<b>Diskussion</b>	75
5.1	Das endotheliale Expressionsmuster der Clk-Familie und DNA topo I unter normalen sowie proinflammatorischen Bedingungen	75
5.2	Der Einfluss des alternativen Spleißens von TF auf die Thrombogenität humaner Endothelzellen	76
5.2.1	Die Regulation des alternativen Spleißens der TF-prä-mRNA in TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC	77
5.2.1.1	Die Bedeutung der Clk-Familie und der DNA topo I für die mRNA-Expression der TF-Isoformen	77
5.2.1.2	Die Steuerung des Phosphorylierungsmusters der SR-Proteine durch die Clks und die DNA topo I	79
5.2.1.3	Der Einfluss der SR-Proteine auf die differentielle Expression der mRNA-Spleißvarianten von TF	80
5.2.2	Die Bedeutung der differentiellen TF-Isoform-Expression für die endotheliale Thrombogenität unter proinflammatorischen Bedingungen	81
5.2.2.1	Der Einfluss des alternativen Spleißens von TF auf die endotheliale Thrombogenität im statischen Zellkultursystem	81
5.2.2.2	Die Auswirkungen der Inhibition der Clks und der DNA topo I auf die prothrombogene Aktivität des Endothels unter dynamischen Bedingungen	84
5.3	Die Regulation des alternativen Spleißens und der Aktivität von eNOS in TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC	85
5.3.1	Die Beeinflussung des alternativen Spleißens von eNOS-Exon 13 durch die Clk-Familie und die DNA topo I in humanen Endothelzellen	85
5.3.2	Einfluss der SR-Proteinkinasen auf die eNOS-Aktivität in TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC	86
5.4	<b>Ausblick</b>	87

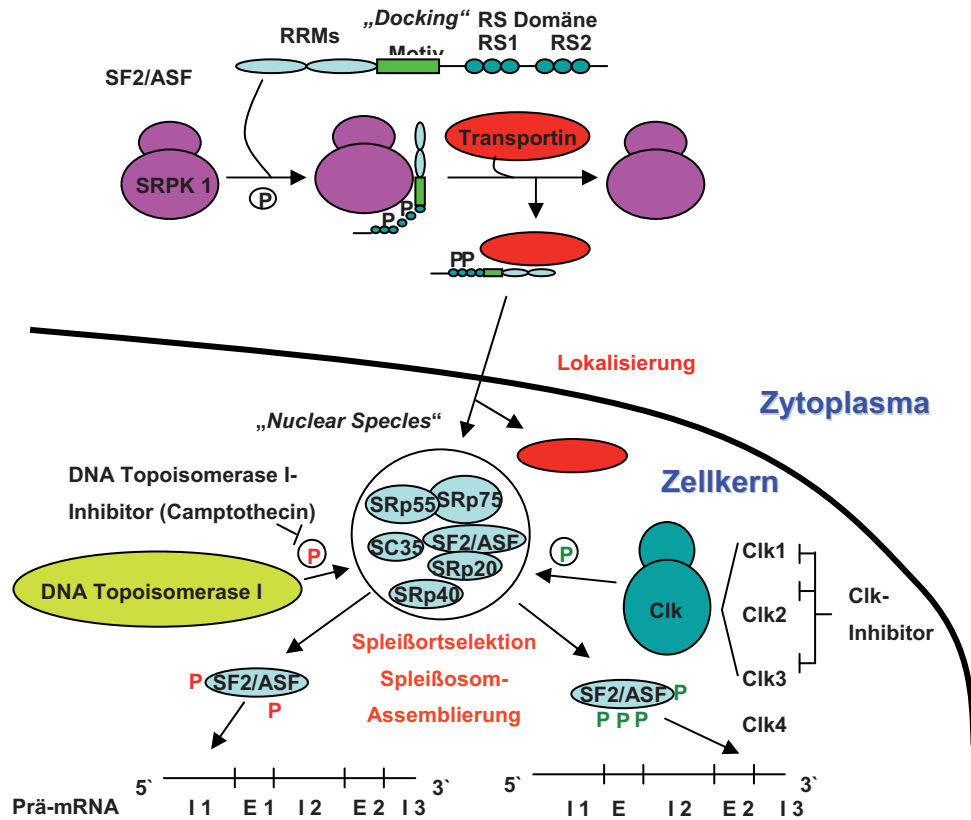
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>94</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>10.</b>	<b>Publikationen</b>	<b>111</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung alternativer Spleißprozesse

Das menschliche Genom besteht aus ca. 30.000 Genen, welche eine Proteinzahl kodieren, die um mindestens eine Größenordnung höher ist (Ladomery et al., 2007). Der Hauptgrund für diese Diskrepanz sind alternative Spleißprozesse an der Prä-messenger RNA (Prä-mRNA) (Stamm et al., 2005). Man nimmt heute an, dass ca. 75 % der Gene des Menschen alternativ gespleißt werden (Johnson et al., 2003; Clark et al., 2007). Aus einer Prä-mRNA können dadurch verschiedene Translationsprodukte mit unterschiedlichen Eigenschaften im Hinblick auf die Lokalisierung, Aktivität und Funktion entstehen (Stamm, 2002; Bogdanov, 2006). Alternatives Spleißen von Prä-mRNA ist daher ein essenzieller regulatorischer Mechanismus zur Kontrolle der Proteindiversität und funktionellen Vielfalt des Proteoms, besonders auch in Reaktion auf Umweltveränderungen (Black, 2003; Ladomery et al., 2007).

Serin/Arginin-reiche (SR) Proteine stellen eine Familie von hochkonservierten Faktoren dar, welche der Regulation des konstitutiven und alternativen Spleißens von Prä-mRNA dienen (Bourgeois et al., 2004). Die Aktivität von SR-Proteinen wird über ihren Phosphorylierungszustand reguliert (Stamm et al., 2008; Prasad et al., 1999). SR-Proteinkinasen, wie die Cdc2-like Kinase (Clk)-Familie, welche aus vier Mitgliedern besteht (Clk1/Sty und Clk2–4) (Muraki et al., 2004), die DNA Topoisomerase I (DNA topo I) (Rossi et al., 1996), die Proteinkinase B/Akt (Blaustein et al., 2005) sowie die SR-Proteinkinasen (SRPK) 1 und 2 (Stamm, 2002) regulieren die Phosphorylierung von SR-Proteinen und damit auch deren intrazelluläre Lokalisierung und Aktivität während alternativer Spleißprozesse (Abbildung 1).



**Abbildung 1.** Regulation des alternativen Spleißens.

Darstellung der Regulation der Lokalisierung und der Spleißaktivität des SR-Proteins SF2/ASF sowie dessen Struktur. Die zytosomatischen SR-Proteinkinasen (SRPK 1 und 2) regulieren den Transfer von SF2/ASF in spezielle Speicherorte (*nuclear Speckles*), welche im Zellkern lokalisiert sind. Die nukleären SR-Proteinkinasen DNA Topoisomerase I und die Clk-Familie regulieren über spezifische Phosphorylierungen der SR-Proteine deren Aktivität beim alternativen Spleißen, die Auswahl der Spleißorte, die Zusammenlagerung der Spleißapparatur (Spleißosom) und somit die Bildung unterschiedlicher Spleißprodukte. Camptothecin und TG003 sind pharmakologische Inhibitoren der nukleären SR-Proteinkinasen (DNA Topoisomerase I und Clk1, 2 und 4).

Alternative Spleißprozesse sind sowohl unter normalen Bedingungen als auch bei verschiedenen Krankheitsbildern und deren Entwicklung von großer Bedeutung (Faustino et al., 2003; Stamm et al., 2005). Die Prozesse des alternativen Spleißens spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese verschiedener kardiovaskulärer Krankheiten (Giordano et al., 2007), wobei die Funktion des Endothels bzw. dessen Veränderung unter pathogenen Bedingungen entscheidend ist (Holmes, 2005; Bogdanov, 2006). In diesem Zusammenhang spielt das alternative Spleißen von Tissue Factor (TF) und der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) eine bedeutende Rolle (Bogdanov et al., 2003; Lorenz et al., 2007). Diese beiden

Faktoren sind maßgeblich an der Regulation endothelialer Funktionen, wie der Zellproliferation und Migration, der Apoptose, der Adhäsion sowie der Angiogenese und Thrombogenität unter normalen und pathophysiologischen Bedingungen beteiligt (Hobbs et al., 2007; Szotowski et al., 2007; Rauch et al., 2000; Desjardins et al., 2006; Jagadeesha et al., 2009; Cui et al., 2009).

## **1.2 Das Endothel und seine Funktionen**

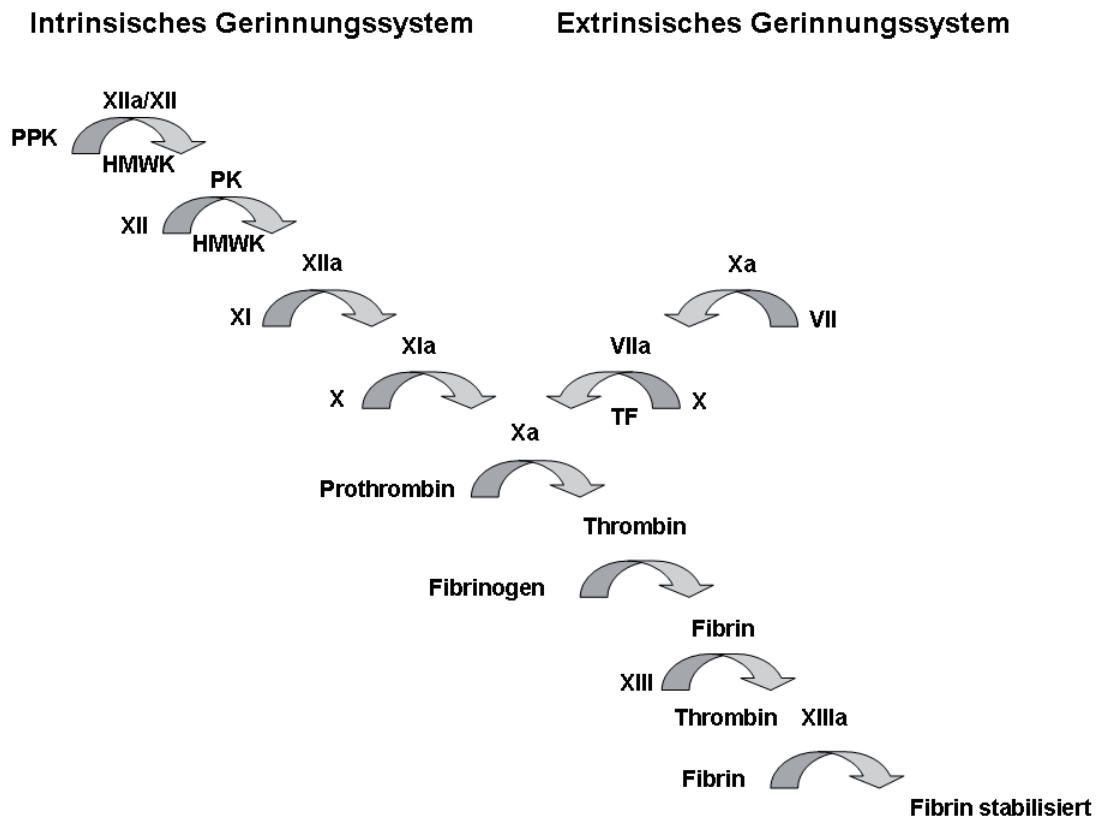
Das Endothel stellt eine einschichtige Barriere zwischen Blut und Gewebe dar, welche aus annähernd  $1 \times 10^{12}$  Einzelzellen besteht (Jaffe, 1997). Das Endothel ist von großer Bedeutung für die Regulation der Gefäßwandhomöostase und der Thrombogenität des Blutes (Rauch et al., 2000; Morel et al., 2006). Dabei sind die Endothelzellen in entscheidendem Maße an der Kontrolle wichtiger Funktionen, wie der Regulation des Blutdrucks über die Vasodilatation und die Vasokonstriktion (Stangl et al. 2004, Dschietzig et al., 2003), der Adhäsion und Migration von Leukozyten (Ley et al., 2007; Zakrzewicz et al., 1997), der intrazellulären Signaltransduktion (Riewald et al., 2005), der Blutgerinnung und Wundheilung (Szotowski et al., 2005; Santiago-Delpin, 2004) oder der Angiogenese (Ahmad et al., 2006) beteiligt. Des Weiteren spielen sie sowohl unter normalen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen, wie bei Vorliegen atherosklerotischer Erkrankungen (Busse et al., 1996), bei der Sepsis (van Eijk et al., 2008) oder unter inflammatorischen Bedingungen (Nold-Petry et al., 2009) eine wichtige Rolle. Endothelzellen exprimieren eine Vielzahl von löslichen und zelloberflächen-gebundenen Proteinen, welche an den zuvor genannten Mechanismen und Pathomechanismen beteiligt sind (Bruneel et al., 2003; Roesli et al., 2008). Neben verschiedenen Chemokinen und Adhäsionsmolekülen sind auch Faktoren wie beispielweise Tissue Factor (TF) oder die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) unter diesen Proteinen vertreten (Poerber et al., 1990; Lin et al., 2005). TF ist dabei besonders wegen seiner Rolle bei der Regulation der Thrombogenität von großer Bedeutung (Mackman, 2004), während eNOS über die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) in entscheidendem Maße an der Kontrolle des Gefäßtonus und der Gewebespertusion beteiligt ist (Li et al., 2007). Sowohl das Muster als auch die Expressionsrate der verschiedenen endothelial gebildeten Faktoren kann sich beim Übergang von physiologischen zu pathologischen Bedingungen ändern (Minagar et al., 2008; Kadl et al., 2002). Im aktivierten inflammatorischen Zustand

der Endothelzellen wird das Expressionsmuster einer Vielzahl dieser Proteine modifiziert (Schouten et al., 2007), was das klinische Bild der inflammatorischen Reaktion bestimmt (Kadl et al., 2002). Dabei verändert sich unter inflammatorischen Bedingungen auch die Expression sowie die Aktivität von TF und eNOS, wodurch die Endothelfunktion unter diesen Umständen maßgeblich beeinflusst wird (Napoleone et al., 2002; Szotowski et al., 2005; Ying et al., 2007; Tai et al., 2004).

### **1.3 Die biologische Bedeutung von Tissue Factor**

Im Jahre 1892 wurde erstmalig im Rahmen der Blutgerinnung von einer unbekanntem Substanz gesprochen, welche in der Lage sei, Prothrombin zu Thrombin umzuwandeln und dadurch die Gerinnung des Blutes zu induzieren (Schmidt, 1892). Morawitz bestätigte diese Aussage und benutzte in diesem Zusammenhang erstmalig den Begriff „Thrombokinase“ für den Faktor, welcher die Blutgerinnung beeinflusst (Morawitz, 1905). Im Laufe der Zeit wurden weitere Begriffe für dieses Protein geprägt, wie 1938 durch Nolf die Bezeichnung „Thromboplastin“ oder „Tissue Factor“ durch Howel im Jahre 1935 (Howel, 1935; Nolf 1938). Die Isolierung und genauere Charakterisierung dieses Proteins gelang allerdings erst in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts (Bach et al., 1981; Broze Jr. et al., 1985). Im Hinblick auf eine einheitliche Nomenklatur spricht man heute nur noch von Tissue Factor (TF, Faktor III, CD 142). Dieser Begriff begründet sich auf der Vorstellung, dass TF im Gewebe vorliegt, erst nach der Verletzung der Gefäßwand mit dem zirkulierenden Blut in Kontakt tritt und mit den darin enthaltenen Gerinnungsfaktoren wechselwirken kann. Die Grundlage zum heutigen Verständnis der Abläufe während der Blutgerinnung stellt die 1964 aufgestellte „Wasserfall-“ bzw. „Kaskaden-Theorie“ (Davie et al., 1964; Mac Farlane, 1964) dar. Im Rahmen dieser Theorie wird davon gesprochen, dass die Zymogene, inaktive Vorläufer der Gerinnungsfaktoren, im Laufe eines kaskadenartigen Ablaufes durch Serinproteasen und Ko-Faktoren in die aktiven Enzymformen überführt werden und ihrerseits nachfolgende Proenzyme spalten können. TF wurde extravaskulär in diversen menschlichen Geweben, wie der Lunge, den Nieren, der Leber oder dem Gehirn, nachgewiesen (Drake et al., 1989; Fleck et al., 1990). Dort soll die Expression von TF vor spontanen Blutverlusten schützen. Im Rahmen der Blutgerinnung unterscheidet man zwischen zwei Systemen der sogenannten extrinsischen (TF-aktivierten) und der intrinsischen (kontaktaktivierten) Gerinnungskaskade (Abbildung 2). Das extrinsische

Gerinnungssystem wird auf exogenem Wege durch TF gestartet. Das intrinsische System wird nach dem Kontakt mit anionischen Oberflächen, wie der Wand eines Reagenzglases, durch die Aktivierung des Gerinnungsfaktors (F)XII ausgelöst, der intrinsisch, d.h. im Blut zirkulierend, vorhanden ist. Über beide Systeme kommt es zur Bildung von FXa, welcher Prothrombin proteolytisch spaltet und so aktiviert, was schließlich zur Fibrinbildung führt.



**Abbildung 2.** Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade nach Davie und Mac Farlane, 1964.

(HMWK) hochmolekulares Kininogen; (PPK) Plasma-Präkallikrein; (TF) Tissue Factor.

Es wurde jedoch aus den Arbeiten anderer Gruppen ersichtlich, dass der intrinsische FIX ebenfalls durch den TF/FVIIa-Komplex aktiviert wird, was einer strikten Trennung zwischen intrinsischem und extrinsischem System widerspricht (Osterud et al., 1977; Bauer et al., 1990). Des Weiteren aktiviert Thrombin FXI ohne Beteiligung von FVII (Gailani et al., 1993; Naito et al., 1991).

Nach dem aktuellen Kenntnisstand spielt das intrinsische System hauptsächlich beim Kontakt von Blut mit künstlichen, negativ geladenen Oberflächen eine Rolle in der Blutgerinnung und nicht als physiologischer Hauptaktivator der Fibrinbildung (Courtney et al., 1994). Dies zeigte sich aus der Beobachtung, dass ein Mangel an



FVIIIa mit FIXa komplexieren, was zur Bildung von einer 50- bis 100-fach größeren Menge an FXa im Vergleich zum TF/FVIIIa-Komplex führt, wird die Blutgerinnung verstärkt. Ferner führt die Bildung des sogenannten Prothrombinase-Komplexes aus FXa, FVa und Prothrombin zu einer 25-fachen Erhöhung der Thrombinbildung und schließlich zur Bildung eines stabilen Fibringerinnsels (Nemerson et al., 1982; Kalafatis et al., 1994). Dieses Modell zeigt, dass bereits geringe Mengen an TF genügen, um ein Gefäß zu verschließen.

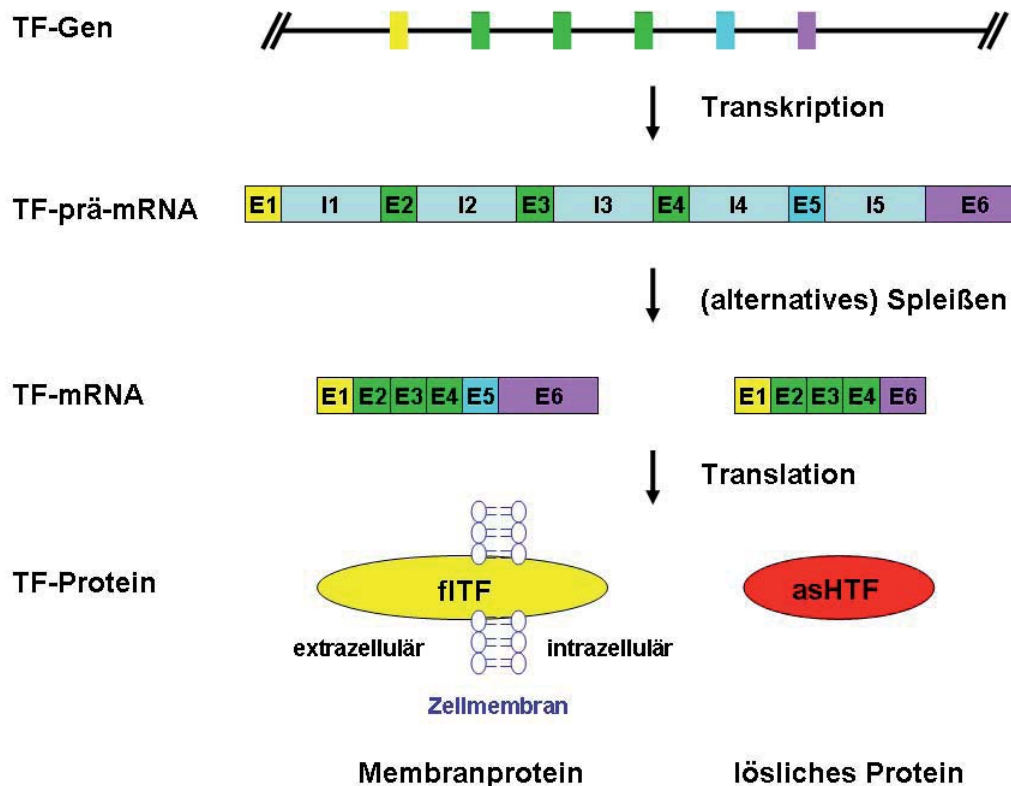
Über seine Bedeutung als primärer Initiator der physiologischen Blutgerinnung hinaus spielt TF auch unter pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle. Dazu zählen unter anderem die Entstehung von Thrombosen (Osterud, 1998; Rauch et al., 2000), die Pathogenese der Atherosklerose (Marutsuka et al., 2005; Rauch et al., 2001) und die Verstärkung inflammatorischer Reaktionen (Schouten et al., 2008). Des Weiteren ist TF an einer Vielzahl weiterer Prozesse, wie der Angiogenese während der Embryonalentwicklung (Carmeliet et al., 1996), der Migration bzw. Transmigration von monozytären Zellen durch das Endothel (Muller et al., 1999), der Wundheilung (Chen et al., 2005), der Tumorangio-genese, -progression und -metastasierung (Milsom et al., 2007; Rauch et al., 2005) und der Signaltransduktion über sogenannte Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) beteiligt (Schouten et al., 2008).

#### **1.4 Die Struktur und Expression von Tissue Factor**

TF ist ein transmembranäres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 47 kD und gehört zur Familie der Klasse-II-Zytokinrezeptoren (Bazan, 1990). Das Polypeptid besteht aus 295 Aminosäuren (AS), aus dem nach Abspaltung eines Signalpeptides ein 263 AS langes reifes Protein gebildet wird. TF wird in drei Domänen unterteilt: a) die extrazelluläre Domäne, welche aus 219 AS besteht, b) eine 23 AS lange Transmembrandomäne und c) die zytoplasmatische Domäne mit 21 AS (Edgington et al., 1991). Über die extrazelluläre Domäne erfolgt die Bindung von FVII/VIIa (Banner et al., 1996), was eine Aktivierung von FVIIa bewirkt und die hydrolytische Umsetzung von FX um den Faktor  $2 \times 10^7$ , verglichen mit FVIIa allein, verstärkt (Edgington et al., 1997). Die transmembranäre Domäne verankert das TF-Protein in der Zellmembran. Diese Domäne ist für die funktionelle Aktivität des TF/FVIIa-Komplexes nicht essenziell, erhöht aber dessen Affinität zur Bindung von FX und FIX. Allerdings ist die Assoziierung von TF mit Phospholipiden entscheidend

für die Aktivität (Paborsky et al., 1991). Die Komplexbildung von TF mit FVIIa führt zur Aktivierung einer Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase und zur Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium, was über die zytoplasmatische Domäne vermittelt wird (Rottingen et al., 1995). Ferner führt diese Komplexbildung zur Bindung der zytoplasmatischen Domäne an das Aktin-bindende Protein 280 (ABP280) sowie zur Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) (Ott et al., 1998).

Das humane *TF*-Gen umfasst 12,4 kb und ist auf dem Chromosom 1 p21-p22 lokalisiert (Carson et al., 1985). Es besteht aus 6 Exons, welche durch 5 Introns voneinander getrennt sind (Mackman et al., 1989). Exon 1 beinhaltet die genetische Information für die Translationsinitiation, die posttranslationale Prozessierung und den Einbau von TF in die Zellmembran. In den Exons 2 bis 5 ist die extrazelluläre Domäne von TF kodiert, während Exon 6 die Transmembrandomäne sowie den zytoplasmatischen Bereich von TF abbildet (Bogdanov et al., 2003). Das *TF*-Gen wird in eine 2,2 kb große mRNA transkribiert, welche in das *TF*-Protein translatiert wird (Abbildung 4).



**Abbildung 4.** Schematische Darstellung des *TF*-Gens, dessen Transkription, mRNA-Spleißen und Translation.

asHTF: alternativ gespleißter humaner TF, TF: Tissue Factor, E: Exon, I: Intron.

Zellen, die keinen direkten Kontakt zum zirkulierenden Blut besitzen, wie perivaskuläre Zellen (Fibroblasten oder Perizyten) und extravaskuläre Zellen (Keratinocyten), exprimieren TF konstitutiv (Drake et al., 1989; Wilcox et al., 1989). Im Gegensatz dazu exprimieren Zellen wie Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen, die mit dem Blutstrom in Berührung kommen, unter physiologischen Bedingungen kein TF. In diesen Zellen ist die TF-Expression durch die Stimulation mit Entzündungsmediatoren, wie Interleukinen, Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) Lipopolysacchariden, Wachstumsfaktoren, oder durch andere Reize, wie ionisierende Strahlung, induzierbar (Szotowski et al., 2005; Schwartz et al., 1981; Goldin-Lang et al., 2007; Ahamed et al., 2007). Die transkriptionelle Regulation ist für die TF-Expression von entscheidender Bedeutung (Edgington et al., 1991), wobei die Transkriptionsfaktoren, AP-1, NF- $\kappa$ B, SP-1 und EGR-1 eine wichtige Rolle spielen (Mackman et al., 1990).

### **1.5 Die Generierung und Bedeutung alternativ gespleißter Formen von Tissue Factor**

Über alternative Spleißprozesse an der TF-prä-mRNA kommt es zur Bildung verschiedener Spleißvarianten von TF. Auf mRNA-Ebene führt die Insertion von Intron 1 zur Generierung zweier mRNA-Spleißvarianten. Durch ein Stopp-Kodon, welches in Intron 1 auftritt, kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation, sodass kein reifes TF-Protein aus diesen Transkripten gebildet wird (van der Logt et al., 1992). Chand et al. zeigten 2006, dass in verschiedenen Typen von Tumorzellen eine weitere Spleißvariante synthetisiert wird. Diese beinhaltet ein 495 bp großes Teilstück von Intron 1, welches durch alternatives Spleißen der TF-prä-mRNA in der reifen mRNA inseriert bleibt (Chand et al., 2006). Bei dieser mRNA-Isoform kommt es ebenfalls zu einem verfrühten Abbruch der Translation, der auf ein zusätzliches Stopp-Kodon innerhalb des intronischen Fragmentes zurückzuführen ist. In gesunden Zellen stellt diese Spleißvariante nur ca. 1 % aller TF-Transkripte dar, während dieser Anteil in verschiedenen Tumorzellen auf bis zu 10 % ansteigt. Die Bedeutung dieser TF-mRNA-Isoform ist bislang unklar, aber es wird derzeit geprüft, ob dieses Transkript als diagnostischer Marker zur Detektion solider Tumoren geeignet ist.

Neben der Bildung reiner mRNA-Spleißvarianten kommt es durch alternatives Spleißen der TF-prä-mRNA auch zur Bildung von TF-Isoformen auf Proteinebene.

Bogdanov et al. wiesen 2003 eine humane TF-Isoform nach, die durch das Herausspleißen von Exon 5 aus der prä-mRNA von TF generiert wird (Bogdanov et al., 2003) (Abbildung 4). Exon 4, welches mit einem kompletten Kodon endet, wird direkt an Exon 6 gefügt, welches mit einem unvollständigen Kodon beginnt. Dies führt zu einer Leserasterverschiebung („*frameshift*“) des offenen Leserahmens („*open reading frame*“) der gespleißten mRNA. Die mRNA-Expression dieser alternativ gespleißten TF-Variante konnte in verschiedenen humanen Geweben, wie dem Gehirn, der Lunge, dem Herzen oder der Niere, nachgewiesen werden. Das Verhältnis von alternativ gespleißtem (asH)TF zu „*full length*“ (fl)TF liegt im Lungengewebe deutlich höher als in anderen Geweben, was darauf hindeutet, dass diese Spleißvorgänge reguliert werden. Faktoren, welche an der Regulation der differenziellen TF-Isoform-Expression beteiligt sein könnten, sind sowohl die schon zuvor beschriebenen SR-Proteine als auch deren SR-Proteinkinasen, wie die Clk-Familie oder die DNA topo I (Abbildung 1). Beide Kinasen regulieren alternative Spleißprozesse über die Phosphorylierung verschiedener SR-Proteine wie SF2/ASF oder SRp55 (Prasad et al., 1999; Rossi et al., 1996). Ob diese Faktoren tatsächlich an der Regulation der differenziellen TF-Isoform-Expression beteiligt sind, ist allerdings bislang nicht bekannt.

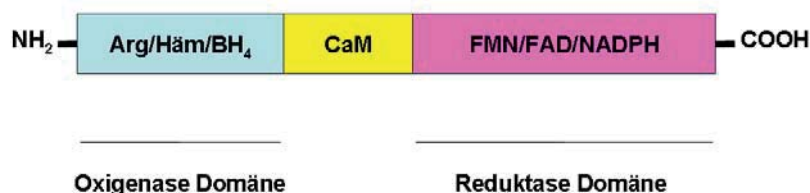
Die Translation dieser alternativ gespleißten TF-mRNA führt zur Bildung einer nur 206 AS langen TF-Isoform, während membrangebundener flTF 263 AS lang ist. Aufgrund der zuvor beschriebenen Verschiebung des offenen Leserahmens fehlt der humanen alternativ gespleißten TF-Isoform die Transmembrandomäne, wodurch dieses Protein löslich ist. AsHTF beinhaltet die vollständige, 166 AS lange, extrazelluläre Domäne, wie sie auch in flTF vorhanden ist. An den Positionen 165 und 166 ist damit auch das L-Lysin-Doppel in beiden TF-Isoformen vorhanden, welches für die Bindung von FVIIa an TF bedeutsam ist (Rao et al., 1995). Im Gegensatz zu flTF schließt sich daran aber eine 40 AS lange und nur für asHTF typische C-terminale Abschlussequenz an, anstelle der flTF-typischen transmembranären und C-terminalen Domäne (Bogdanov et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass flTF mit asHTF unter pathologischen und prothrombogenen Bedingungen kolokalisiert (Bogdanov et al., 2003; Rauch et al., 2005). Des Weiteren wurden beide TF-Isoformen in *ex vivo* generierten Thromben, die durch Perfusion von Blut über Kollagen beschichtete Oberflächen bzw. über arterielle Tunica media entstanden sind, nachgewiesen (Giesen et al., 1999), was auf das Vorhandensein

von asHTF im Plasma und damit auf dessen Löslichkeit hindeutet (Bogdanov et al., 2003). Die lösliche TF-Isoform stellt einen wesentlichen Teil (10-30 %) des im Plasma zirkulierenden TF dar (Hathcock, 2004).

Nicht nur die Inkorporation von asHTF in eine Phospholipidmembran, sondern schon eine einfache Verbindung mit Phospholipiden führt zur Induktion einer prokoagulatorischen Aktivität der löslichen TF-Isoform (Szotowski et al., 2005; Bogdanov et al., 2003), welche allerdings im Vergleich zu fITF eher eine untergeordnete Rolle spielt (Yu et al., 2004). Welche biologische Bedeutung asHTF darüber hinaus aufweist, ist aber bislang unklar. Erste Arbeiten einer anderen Gruppe weisen darauf hin, dass asHTF eine Bedeutung für die Zellproliferation und Angiogenese in Geweben besitzt (Hobbs et al., 2007).

## 1.6 Die Struktur und physiologische Bedeutung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase

Stickstoffmonoxid (NO), das im Endothel von der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) gebildet wird, ist essenziell für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase und hat darüber hinaus auch eine große Bedeutung unter pathophysiologischen Bedingungen (Ying et al., 2007; Heitzer et al., 2001). NO beeinflusst unter anderem den Gefäßtonus, die Thrombozytenaggregation und die Proliferation von glatten Muskelzellen (Lefroy et al., 1993; Azuma et al., 1986; Garg et al., 1989). Das 135 kD große eNOS-Protein setzt sich aus drei wichtigen Domänen zusammen (Abbildung 5).



**Abbildung 5.** Darstellung der linearen Struktur von eNOS.

Eingetragen sind die Bindeorte für: Arg: L-Arginin, BH<sub>4</sub>: Tetrahydrobiopterin, CaM: Calmodulin, FMN und FAD: Flavine und NADPH: Nicotinamidadeninukleotidphosphat in der Domänenstruktur des Proteins.

Die Carboxy (C)-terminale Reduktasedomäne ist für die Bindung von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und Flavinen verantwortlich und ist über eine regulatorische Calmodulin (CaM)-Domäne mit der Amino (N)-terminalen Oxigenasedomäne verbunden. Die Oxigenasedomäne beinhaltet eine prosthetische Häm-Gruppe und bindet (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), molekularen Sauerstoff und das Substrat L-Arginin. Sowohl die N-terminale Oxigenasedomäne als auch die C-terminale Reduktasedomäne sind entscheidend für die enzymatische Funktion von eNOS bei der Bildung von NO aus dem N-terminal gebundenen Substrat L-Arginin. Elektronen werden, vermittelt über Flavine, von NADPH zur Häm-Gruppe transportiert und dienen dort der Reduktion von molekularem Sauerstoff, welcher dann in die Guanidin-Gruppe des L-Arginins integriert wird. Bei dieser ersten Reaktion entsteht Hydroxy-L-Arginin. Im zweiten katalytischen Schritt wird das Stickstoffmolekül der Guanidin-Gruppe weiter oxidiert, was zur Bildung von L-Citrullin und NO führt (Maarsingh et al., 2008). Die NO-Bildung durch eNOS wird im vaskulären System unter physiologischen Bedingungen sowohl transkriptionell als auch post-transkriptionell, zum Beispiel über die reversible Phosphorylierung oder Acetylierung reguliert (Li et al., 2002; Dudzinski et al., 2006). Der wichtigste regulatorische Mechanismus der eNOS-vermittelten NO-Synthese ist die Bildung von Homodimeren, was notwendig für die Aktivierung von eNOS ist und über die N-terminale Oxigenasedomäne vermittelt wird (Albrecht et al., 2003).

## **1.7 Die Beeinflussung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthese unter pathophysiologischen Bedingungen**

Unter pathophysiologischen Bedingungen kann es zur endothelialen Dysfunktion kommen. Dieser Begriff bezeichnet sehr allgemein den Verlust der normalen homöostatischen Funktionen des Endothels, wie der Vasodilatation, der Inhibition der Thrombozytenaggregation und der Leukozytenadhäsion (Busse et al., 1996). Eine endotheliale Dysfunktion tritt oft in frühen Stadien vaskulärer Erkrankungen wie der Atherosklerose, Diabetes mellitus oder der Hypertonie auf (Kawashima, 2004; Vanhoutte, 2009) und wird durch erhöhten oxidativen Stress im vaskulären System bewirkt (Tumur et al., 2009). Dieser oxidative Stress entsteht durch die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid unter pathophysiologischen Bedingungen (Münzel et al., 2008). Die endotheliale

Dysfunktion ist durch eine verringerte NO-Bioaktivität gekennzeichnet, was neben einer verringerten Bildung von NO durch die zusätzliche oxidative Inaktivierung von vorhandenem NO durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hervorgerufen wird (Potenza et al., 2009).

Verschiedene Arbeiten zeigten, dass die Expression und Aktivität von eNOS unter inflammatorischen Bedingungen von großer Bedeutung ist (Ying et al., 2007; Eum et al., 2007). So führte die chronische Inhibition von eNOS zu vaskulärer Inflammation und zur Atherosklerose im Rattenmodell (Ni et al., 2001). In einem Mausmodell bewirkte der „*knock-out*“ von eNOS Bluthochdruck und eine verschlechterte Reaktion auf Verletzungen (Huang et al., 1995; Huang et al., 1996). Ferner wurde in mehreren Arbeiten dargestellt, dass die Stimulation endothelialer Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- $\alpha$  zu einer Reduktion der Expression sowie der Aktivität von eNOS führt (Goodwin et al., 2007; Li et al., 2002). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eNOS eine wichtige Rolle während der Inflammation spielt.

## **1.8 Das alternative Spleißen der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase**

Das Gen, welches für humanes eNOS kodiert, ist auf Chromosom 7 lokalisiert und umfasst eine Region von 22 kb. Dieses *eNOS*-Gen beinhaltet 26 Exons, die durch 25 Introns unterbrochen sind, wobei Intron 13 das größte ist (Nadaud et al., 1994). Innerhalb des Introns 13 liegen polymorphe CA-Wiederholungssequenzen („*CA-repeats*“), deren Anzahl von 14 bis 44 variieren kann. Die Länge dieser CA-Sequenzen korreliert mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten der Koronaren Herzkrankheit (Stangl et al., 2000). Ferner wurde gezeigt, dass diese CA-Wiederholungssequenzen als intronische Spleißverstärker („*intrinsic splice enhancer*“; ISE) fungieren können, wobei die Länge dieser Sequenz die Spleißaktivität bestimmt (Hui et al., 2003). Lorenz et al. gelang es, neben eNOS drei weitere Isoformen, eNOS13A, B und C, zu identifizieren. Die Expression dieser eNOS-Isoformen wurde sowohl in humanen Endothelzellen als auch in verschiedenen humanen Geweben, wie dem Herzen, der Plazenta oder der Niere, nachgewiesen. Diese mRNA-Spleißvarianten beinhalten die vollständigen Exons 1-13, wie diese auch in eNOS zu finden sind. Durch alternative Spleißprozesse am Übergang von Exon 13 zu Intron 13 kommt es zur Insertion

dreier verschieden langer Fragmente von Intron 13, welche die neuen alternativen Exons 13A, B und C in der reifen mRNA bilden. Die Translation dieser Spleißvarianten führt zur Bildung verkürzter eNOS-Isoformen, in denen die Reduktasedomäne fehlt, wodurch diese Isoformen keine eNOS-Aktivität mehr aufweisen (Lorenz et al., 2007). Für die Aktivität von eNOS ist die Bildung von eNOS-Homodimeren notwendig (Albrecht et al., 2003). Die verkürzten eNOS-Isoformen sind in der Lage, Heterodimere mit eNOS zu bilden. Die Heterodimerisierung der inaktiven eNOS-Isoformen mit eNOS führt über einen dominant-negativen Effekt dieser Spleißvarianten zu einer Reduktion der eNOS-Aktivität (Lorenz et al., 2007). Diese Daten deuten darauf hin, dass das alternative Spleißen von eNOS möglicherweise einen post-transkriptionellen Regulationsmechanismus der eNOS-Aktivität unter pathologischen Bedingungen darstellen könnte (Lorenz et al., 2007). Wie die differenzielle eNOS-Isoform-Expression reguliert wird, ist bislang allerdings weitgehend unerforscht.

## 2. Zielsetzung

Das alternative Spleißen ist ein entscheidender regulatorischer Mechanismus zur Kontrolle der Proteindiversität und funktionellen Vielfalt eukaryotischer Zellen, wobei ausgehend von einer Prä-mRNA über diese Prozesse verschiedene Translationsprodukte mit unterschiedlichen Eigenschaften im Hinblick auf die Lokalisierung, Aktivität und Funktion entstehen können. Die Clk-Familie und die DNA topo I regulieren alternative Spleißprozesse über die Phosphorylierung und damit die Steuerung der Aktivität von SR-Proteinen. Das Endothel ist von großer Bedeutung für die Kontrolle der Gefäßwandhomöostase und der Thrombogenität sowohl unter normalen als auch unter pathologischen Bedingungen. TF und eNOS kommt in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle bei der Regulation dieser endothelialen Funktion zu. Über alternative Spleißprozesse werden verschiedene Isoformen von TF sowie von eNOS gebildet. Wie das alternative Spleißen dieser beiden Faktoren reguliert wird, ist allerdings bislang unbekannt, ebenso wie die Bedeutung der Regulation der differentiellen Isoform-Expression von TF bzw. eNOS für die Funktion des Endothels.

In der vorliegenden Arbeit werden daher folgende Ziele verfolgt:

- Der Einfluss der Clk-Familie und DNA topo I auf die Regulation des alternativen Spleißens von TF und eNOS in endothelialen Zellen unter dem Einfluss des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$ .
- Die Bedeutung der SR-Proteine bzw. deren Phosphorylierungsmusters für die Regulation der differentiellen Isoform-Expression von TF und eNOS.
- Diese Untersuchungen werden im Hinblick auf den Einfluss der TF- bzw. eNOS-Isoformen auf die Funktionen des Endothels (Thrombogenität bzw. NO-Bildung) unter inflammatorischen Bedingungen durchgeführt.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Substanzen

Es wurden Chemikalien des höchsten Reinheitsgrades verwendet.

Acrylamid	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories (München, D)
3-[(4-Methylphenyl)sulfonyl]-2-Propenetril (BAY 11-7082)	Calbiochem (Darmstadt, D)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (München, D)
Camptothecin	Calbiochem (Darmstadt, D)
Corn-Trypsin-Inhibitor	Calbiochem (Darmstadt, D)
Cdc2-like Kinase-Inhibitor (TG003)	Calbiochem (Darmstadt, D)
Diaminofluorescein-2-Diacetat (DAF-2DA)	BACHEM (San Carlos, CA, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (München, D)
Dithiothreitol (DTT)	Calbiochem (Darmstadt, D)
Ethidiumbromid	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (München, D)
Rekombinantes Hirudin	Fluka (Basel, CH)
Humaner Faktor X	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Humaner Faktor Xa	Haematologic Technologies, Inc. (Essex Junction, VT, USA)
Humaner rekombinanter Tissue Factor (lipidiert)	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (München, D)
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich (München, D)
N,N-Bis (2-hydroxyethyl)-glycin (Bicin)	Sigma-Aldrich (München, D)
N,N'-(1,2-Dihydroxyethylen)-bisacrylamid	Bio-Rad Laboratories (München, D)
N,N'-Dimethyl-9,9'-bisacridiniumdinitrat (Lucigenin)	Fluka (Basel, CH)
n-Octyl- $\beta$ -D-Glycopyranosid	Calbiochem (Darmstadt, D)

NovoSeven <sup>®</sup> (rekombinanter Faktor VIIa)	NovoNordisk (Kopenhagen, DK)
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich (München, D)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (München, D)
Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC)	Sigma-Aldrich (München, D)
SeaKem LE Agarose	BioWhittaker Molecular Application (Rockland, ME, USA)
Spectrozyme <sup>®</sup> FXa	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ )	Sigma-Aldrich (München, D)
Wasser, nukleasefrei	Promega (Mannheim, D)

### 3.1.2 Kits

BCA Protein Assay Kit	Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA)
ECL plus Detection Kit	GE Healthcare Bioscience (Little Chalfont, UK)
First Strand cDNA Synthesis Kit for RT- PCR (AMV)	Roche Applied Science (Mannheim, D)
Griess Reagent Kit for Nitrite Determination	Invitrogen (Karlsruhe, D)
HUVEC Nucleofector <sup>®</sup> Kit	Lonza Cologne AG (Köln, D)
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, D)
Mycoplasma Detection Kit 1296744	Roche Applied Science (Mannheim, D)
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA II Extraction Kit	Macherey-Nagel (Düren, D)
QCL-1000 <sup>®</sup> Chromogenic Endpoint LAL Kit	BioWhittaker Molecular Application (Rockland, ME, USA)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, D)
QIAshredder Columns	Qiagen (Hilden, D)

### 3.1.3 Nukleotide, Primer und Sonden

Alle Primer und Sonden wurden von der Firma TIB-MOLBIOL GmbH (Berlin, 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. Als Nukleotide wurde ein dNTP Mix (10 mM, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D) verwendet.

In der nachfolgenden Tabelle sind die sequenzspezifischen Primerpaare sowie die Sondensequenzen für die konventionelle PCR bzw. für die quantitative Real-Time-PCR aufgeführt. Alle Sonden wurden mit 5'-FAM als Farbstoff und 3'-TAMRA als Quencher markiert.

**Tabelle 1.** Verzeichnis der verwendeten Primer und Sonden.

Zielsequenz	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Sonde 5'-3'
asHTF (real)	GGG ATG TTT TTG GCA AGG ACT TA	CCA GGA TGA TGA CAA GGA TGA TG	AAT CTT CAA GTT CAG GAA AGA AAT ATT CTA CAT CAT TGG A
TF (real)	GCG GTT CAC GCA CTA CAA AT	CCA CAA ATA CCA CAG CTC CA	TTC AAG CAG TGA TTC CCT CCC GAA CA
GAPDH (real)	CCA CCC ATG GCA AAT TCC	TCG CTC CTG GAA GAT GGT G	CAC CGT CAA GGC TGA GAA CGT
TF+asHTF	CGC CGC CAA CTG GTA GAC	TGC AGT AGC TCC AAC AGT GC	
TF-A	CTG CTC GGC TGG GTC TTC	GTG TAG ACT TGA TTG ACG GGT TTG	
eNOS	GTC CCT CGA ACA CGA GAC	AGA TCC GCT TCA ACA GCA TC	
eNOS13 A,B,C	GTC CCT CGA ACA CGA GAC	GTT TCG CCT GCT CTA GAA CG	
DNA topo I	CTC CAC AAC GAT TCC CAG AT	TAT TTT TGC ATC CCC AGA GG	
Clk1	GAA CAA GCG CTG CAA ATA CA	TAC CTC CCG CTT TAT GAT CG	
Clk2	AAT ATC AGC GGG AGA ACA GC	ATG ATC TTC AGG GCA ACT CG	
Clk3	TTC ACG TTC TCG TCA TCG TC	TTC AGG GCA ACC TGA GAC TT	
Clk4	AAG TCA CAA GCG GAA GAG GA	CAC GGT AAC GGC CTA CAT TT	
SF2/ASF	CAC TGG TGT CGT	GGC TTC TGC TAC	

	GGA GTT TG	GAC TAC GG	
SRp75	GCT CTC GAA GCA GAC ATT CC	GAC TCC TGC TCC GAC TTT TG	
GAPDH	AGT ATG ATG ACA TCA AGA AGG	ATG GTA TTC AAG AGA GTA GGG	
GAPDH Standard	GCC ACA TCG CTC AGA CAC CAT	GGT TGA GCA CAG GGT ACT TTA TTG ATG	
TF+asHTF Standard	CGC CGC CAA CTG GTA GAC	TGC AGT AGC TCC AAC AGT GC	

### 3.1.4 siRNAs

siSFRS1 On-Target plus smart pool (SF2/ASF)	Dharmacon (Chicago, IL, USA)
siSFRS4 On-Target plus smart pool (SRp75)	Dharmacon (Chicago, IL, USA)
siControl® Non-Target siRNA #1	Dharmacon (Chicago, IL, USA)
siClk1 pre-designed siRNA-pool	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
siClk4 pre-designed siRNA-pool	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
siTop1 pre-designed siRNA-pool	Applied Biosystems (Darmstadt, D)

### 3.1.5 Enzyme

GenTherm-DNA-Polymerase	Rapidozym (Berlin, D)
Pfu-DNA-Polymerase	Rapidozym (Berlin, D)
Platinum® Pfx-DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe, D)
TaqMan Universal PCR Master Mix No	Applied Biosystems (Darmstadt, D)
AmpErase® UNG	

### 3.1.6 Antikörper

#### 3.1.6.1 Primärantikörper

##### Monoklonale Antikörper

Anti-GAPDH (Klon 6C5)	Calbiochem (Darmstadt, D)
Anti-human Tissue Factor (#4508)	American Diagnostica GmbH (Pfungstadt, D)
Anti-human Tissue Factor (Klon TFE280)	Enzyme Reasearch Laboratories Ltd (Swansea, UK)
Anti-SC35 (Klon SC-35 )	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-SF2/ASF (Klon 16H3E8)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Anti-SR-Protein (Klon 1H4) (phosphorylierungsabhängig)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Anti-SR-Protein (Klon 16H3E8) (phosphorylierungsunabhängig)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, D)
Anti-Top1 (Klon 1A1)	Abnova GmbH (Heidelberg, D)

##### 3.1.6.1.1 Polyklonale Antikörper

Anti-asHTF (C30)	Pineda Antikörper-Service (Berlin, D)
Anti-Clk1 (N-Term)	ABGENT (San Diego, CA, USA)
Anti-Clk2 (N-Term)	ABGENT (San Diego, CA, USA)
Anti-Clk3 (N-Term)	ABGENT (San Diego, CA, USA)
Anti-Clk4 (N-Term)	ABGENT (San Diego, CA, USA)

##### 3.1.6.2 Sekundärantikörper

Goat anti-rabbit immunoglobulins-HRP- konjugiert (Klon DAK-GO1, IgG1)	DakoCytomation (Glostrup, DK)
Rabbit anti-mouse immunoglobulins- HRP-konjugiert (Klon DAK-RA1, IgG1)	DakoCytomation (Glostrup, DK)
MFP488 goat anti-mouse IgG (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)

MFP488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)
MFP555 goat anti-mouse IgG (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)
MFP555 goat anti-rabbit IgG (H+L)	MoBiTec (Göttingen, D)

### 3.1.7 Zellen

Humane Nabelschnurvenen- Endothelzellen (HUVEC, kryokonserviert)	PromoCell (Heidelberg, D)
---	---------------------------

### 3.1.8 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Endothelial Cell Growth Medium (Low Serum)	PromoCell GmbH (Heidelberg, D)
Endothelial Cell Basal Medium (phenolrotfrei)	PromoCell GmbH (Heidelberg, D)
Fibronectin	TEBU Bio (Offenbach, D)
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories (Pasching, A)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories (Pasching, A)
Trypanblau	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories (Pasching, A)

### 3.1.9 Größenmarker

- DNA-Größenmarker

Ready-Load 100 bp DNA ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ready-Load 1 Kb DNA ladder	Invitrogen (Karlsruhe, D)

- Protein-Größenmarker

Dual Color Protein Standard	Bio-Rad Laboratories (München, D)
-----------------------------	-----------------------------------

### 3.1.10 Puffer und Lösungen

- 30 % (w/v) Acryl-Bisacrylamid-Lösung  
29 % (w/v) Acrylamid, 1 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

- Puffer für die TF-Aktivitätsmessung  
10 mM HEPES, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 % (w/v) BSA, pH 7,5
- EDTA-Puffer  
50 mM Bicin, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,1 % (w/v) BSA, pH 8,5
- HEPES/Ca<sup>2+</sup>-Puffer  
20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4
- 1x PBS  
115 mM NaCl, 27 mM KCl, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- RIPA-Puffer  
50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Igepal CA-630, 0,5 % Na-Desoxycholat,  
0,1 % (w/v) SDS, pH 8,0
- 1x SDS PAGE-Laufpuffer  
192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS
- 50x TAE  
40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0
- 10x TBS  
100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
- 10x TBS-T  
100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Tween 20, pH 7,5

### 3.1.11 Geräte

ABI 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
BioDoc Analyzer	Biometra (Göttingen, D)
BioPhotometer	Eppendorf AG (Wesseling-Berzdorf, D)

Centrifuge 5415R	Eppendorf AG (Wessling-Berzdorf, D)
CO <sub>2</sub> -Inkubator C-200	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH (Göttingen, D)
Durchlichtmikroskop DMIL	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D)
Durchflusszytometer FACScan	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, D)
Fastblot B44 (Semi-dry Blotting Device)	Biometra (Göttingen, D)
Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRBE	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, D)
Harvard Spritzenpumpe	Harvard Apparatus Co. Inc. (Dover, MA, USA)
Minifuge GL	Heraeus Holding GmbH (Hanau, D)
Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad (München, D)
MINI-Rocker (Schwenkschüttler)	G.Kisker GbR(Steinfurt, D)
Mini SUBCELL GT	Bio-Rad Laboratories (München, D)
NanoDrop ND-1000	PaqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, D)
Nucleofector <sup>®</sup> Device	Lonza Cologne AG (Köln, D)
Objektträger (76 mm x 26 mm x 1 mm)	Carl Roth (Karlsruhe; D)
Orion I Mikroplatten Luminometer	Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, D)
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research Inc. (South San Francisco, CA, USA)
PowerPac 1000	Bio-Rad Laboratories (München, D)
Ultraschall-Bad Bandelin Sonorex RK31	Bandelin electronic GmbH (Berlin, D)
Versamax Microplate Reader	Molecular Devices GmbH (Ismaning, D)

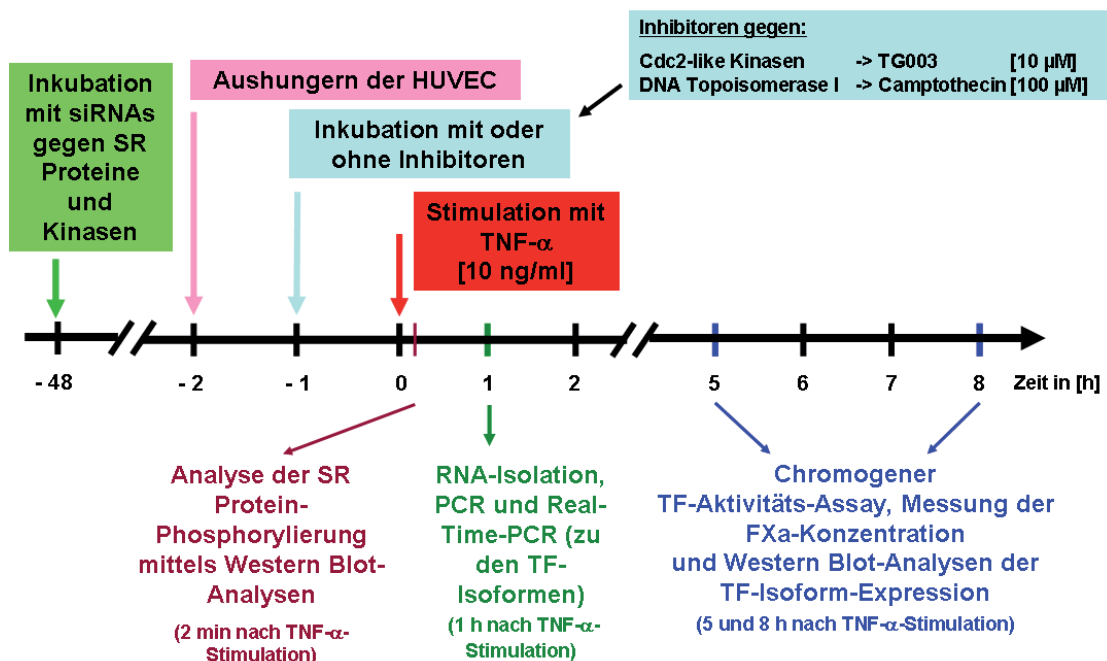
### 3.1.12 Sonstige Materialien

Hybond-P PVDF-Membran	GE Healthcare Bioscience (Little Chalfont, UK)
Hyperfilm ECL	GE Healthcare Bioscience (Little Chalfont, UK)
Sterilfilter 0,22 µm	Schleicher & Schüll (Nürnberg, D)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Versuchsaufbau

Die Untersuchungen zum Einfluss der SR-Proteinkinasen (DNA topo I und Clk-Familie) auf die TF-Isoform-Expression sowie auf die endotheliale Thrombogenität nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) wurden wie in Abbildung 6 schematisch dargestellt durchgeführt. Die dazu angewandten Methoden sind in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben. Mit Hilfe der semiquantitativen Polymerasekettenreaktion (PCR) und Real-Time-PCR erfolgte die Quantifizierung der mRNA-Expression zu den in der Abbildung angegebenen Zeitpunkten. TF-Protein und die SR-Protein-Phosphorylierung wurden per Western Blot detektiert. Die Aktivität der TF-Isoformen wurde mit einem chromogenen Aktivitäts-Assay bzw. über die Bildung von Faktor (F)Xa bestimmt.



**Abbildung 6.** Der Versuchsaufbau zur Untersuchung der TF-Expression und prokoagulatorischen Aktivität.

Der Versuchsaufbau zum Einfluss des DNA topo I- sowie des Clk-Inhibitors auf die Zytokin-induzierte mRNA-Expression der Isoformen von eNOS in Exon 13, bzw. die eNOS-Aktivität sind in Abbildung 7 dargestellt. Die Analyse der mRNA-Expression wurde mittels semiquantitativer PCR-Verfahren durchgeführt. Die eNOS-Aktivität

wurde mittels eines Griess-Assays und durchflusszytometrischer Messungen über die Konzentration an NO bestimmt.

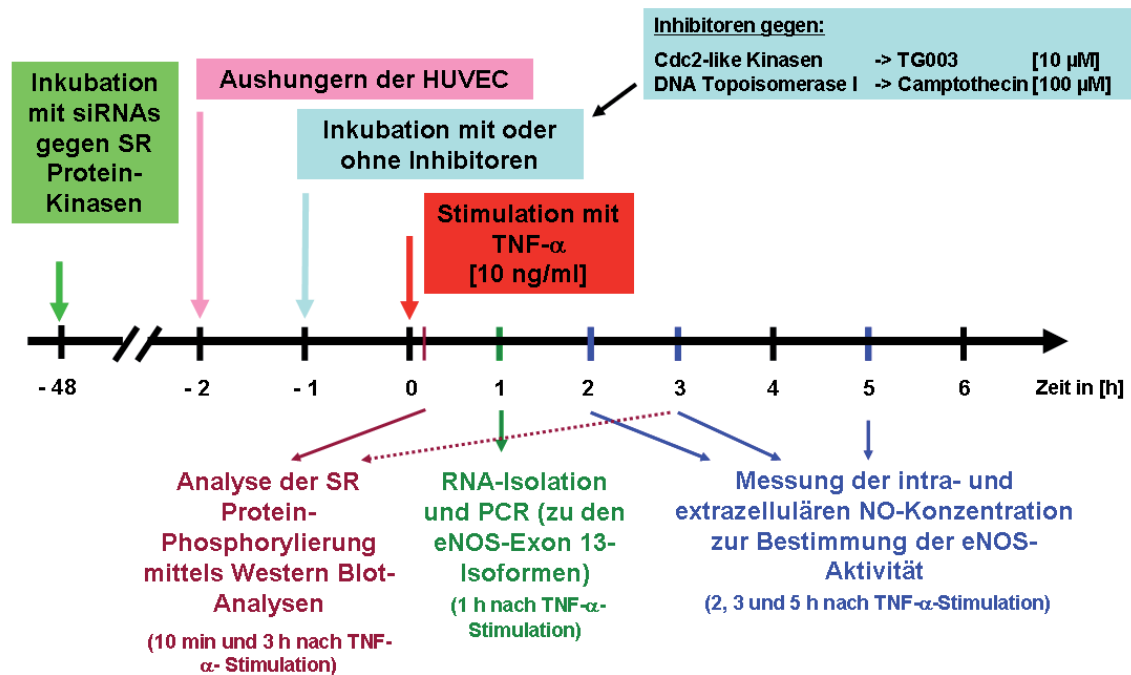


Abbildung 7. Der Versuchsaufbau zur Untersuchung der eNOS-Expression und -Aktivität.

### 3.2.2 Die Experimente an humanen Endothelzellen

#### 3.2.2.1 Die Zellkultur von HUVEC

Die Kultivierung der humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 98 % relativer Luftfeuchtigkeit. Der Mediumwechsel wurde im Abstand von 2-3 Tagen durchgeführt. Die konfluente Einzelschicht zeigte im Phasenkontrastauflicht-Mikroskop das für Endothelzellen typische Erscheinungsbild polygonaler, pflastersteinartiger Zellen. Die Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml PBS gewaschen und die Zellen durch Zugabe von 6 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Der Trypsinabverbau wurde durch Zugabe des gleichen Volumens von FCS-haltigem Kulturmedium gestoppt, die Zellen in ein 15-ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert (150 x g, 5 min, RT). Das erhaltene Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 in neuen Kulturgefäßen ausgesät. Die Kultivierung der HUVEC erfolgte in Endothelial Cell Growth Medium

(Low Serum), dem 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt wurden.

Die Konservierung und Lagerung der Endothelzellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. HUVEC wurden bis zur Konfluenz in 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert, mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (150 x g, 5 min, RT), nochmals mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in eiskaltem Kryokonservierungsmedium (95 % FCS, 5 % DMSO) resuspendiert und die Zellsuspension in Kryoröhrchen aliquotiert, um danach mit Hilfe eines Einfriergerätes („Mr. Frosty“, Nalgene Nunc) langsam (1 °C/min) auf -80 °C eingefroren zu werden. Im letzten Schritt wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung in flüssigen Stickstoff gegeben und gelagert.

Zur erneuten Kultivierung wurden die Endothelzellen in einem 37 °C-Wasserbad aufgetaut, in ein 15-ml-Röhrchen überführt und das DMSO-haltige Einfriermedium durch Zugabe von 10 ml PBS verdünnt. Diese Zellsuspension wurde dann zentrifugiert (150 x g, 5 min, RT), die Zellen in vorgewärmtes Kulturmedium aufgenommen und in eine 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ausgesät.

Die Zellvitalität wurde mittels einer Trypanblau-Ausschlussfärbung bestimmt. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau-Lösung (0,4 %) angefärbt und anschließend lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Blau gefärbte Zellen wurden als tot definiert.

### **3.2.2.2 Der Nachweis von Endotoxinen**

Endotoxine induzieren die TF-Expression und -Aktivität in einer Vielzahl von Zellen. Daher wurden regelmäßig die Endotoxin-Konzentrationen mittels des Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests überprüft, um sicherzustellen, dass die in dieser Arbeit gemessene Expression und Aktivität von TF nicht auf eine Induktion durch Endotoxine zurückzuführen war. Die Quantifizierungen erfolgten mit dem QCL-1000<sup>®</sup>-Test anhand eines vom Hersteller vorgelegten Protokolls.

### **3.2.2.3 Der Nachweis von Mykoplasmen**

Da Mykoplasmen die Expression von verschiedenen Proteinen und verschiedene Stoffwechselfvorgänge in den Zellen beeinflussen und so zu einer Verfälschung der

Versuchsergebnisse führen können, wurde eine mögliche Kontamination der HUVEC mit Mykoplasmen mittels eines ELISA (Mycoplasma Detection Kit) geprüft und diese ausgeschlossen. Die Durchführung des ELISA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### **3.2.2.4 Die Inhibition und Stimulation der Endothelzellen im statischen System**

Für die Inhibitions- und Stimulationsexperimente im statischen Zellkultursystem wurden HUVEC zunächst in 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert und zur Konfluenz gebracht. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für mindestens 1 h in Basalmedium ohne Serum gehalten. Die Vorinkubation der Zellen mit bzw. ohne die Inhibitoren der Clk-Familie oder der DNA topo I erfolgte für 1 h in frischem Basalmedium. Anschließend wurden diese Zellen mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert und bei 37 °C inkubiert. Die Charakterisierung des SR-Protein-Phosphorylierungsmusters erfolgte 2 min nach der Induktion mit TNF- $\alpha$ . Die mRNA-Expression wurde nach 1 h analysiert und die Proteinexpression bzw. die Bestimmung der Aktivität von TF bzw. eNOS erfolgte 3, 5 und 8 h nach der TNF- $\alpha$ -Stimulation. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen, welche für denselben Zeitraum in Basalmedium gehalten wurden. Nach der Stimulation wurden die Zellen auf Eis gestellt, der Überstand abgenommen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen bzw. die Zellkulturüberstände wurden sofort für die entsprechenden Versuche verwendet (Abbildungen 6 und 7).

#### **3.2.2.5 Inhibitions- und Stimulationsversuche im dynamischen Flusskammermodell**

Die Durchführung dieser Versuche folgte dem Protokoll von Zakrzewicz et al. (Zakrzewicz et al., 1997). Die HUVEC wurden auf Fibronectin-beschichteten Objektträgern ausgesät und bis zur Ausbildung einer konfluenten Endothelzell-Einzelschicht kultiviert. Wie im Punkt 3.2.2.4 beschrieben folgte eine einstündige Vorinkubation mit den Inhibitoren der entsprechenden SR-Proteinkinasen und eine daran anschließende Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  für einen Zeitraum von 8 h. Danach wurde der Objektträger mit der Endothelzell-Einzelschicht in eine parallele Flusskammer überführt und die Zellen darin einer definierten laminaren Strömung ausgesetzt. In der Kammer wurden mit einer Harvard-Spritzenpumpe physiologische

Strömungsbedingungen bei einer Flussrate von 116  $\mu\text{l}/\text{min}$  eingestellt, was einem Schergrad von  $366 \text{ s}^{-1}$  entsprach. Die Perfusion der Endothelzell-Einzelschicht erfolgte mit einem HEPES/ $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Dem Puffer wurden physiologische Konzentrationen der Blutgerinnungsfaktoren FVIIa (0,1 nM) und FX (170 nM) beigefügt. Die Zugabe von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Corn-Trypsin-Inhibitor diente dazu, mögliche Einflüsse des intrinsischen (Kontaktaktivierungs-) Signalweges auf die FXa-Bildung auszuschließen. Die maximale Perfusionsdauer in diesen Versuchen betrug 15 min. Nach 10 bzw. 15 min wurden Aliquots von 100  $\mu\text{l}$  aufgefangen und durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  EDTA (25 mM) die FXa-Bildung in den Proben gestoppt. Die Bestimmung der FXa-Konzentration im Perfusions-Puffer/EDTA-Gemisch erfolgte direkt im Anschluss an die Probenentnahme.

### **3.2.2.6 Die Transfektion von Endothelzellen mit siRNAs**

Für die siRNA-vermittelte Inhibition („*knock-down*“) der Expression und damit der Aktivität von Clk1, Clk4, DNA topo I, SF2/ASF und SRp75 wurden  $1 \times 10^6$  HUVEC, mit Hilfe eines Nucleofector<sup>®</sup>-Gerätes und eines optimierten HUVEC-Nucleofector<sup>®</sup> Kits transient transfiziert. Die Transfektion erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Zellen wurden mit 75 pmol der entsprechenden siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion schloss sich die Stimulation der Zellen mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  für 1 h bzw. 8 h an. Als Kontrollen dienten nichtstimulierte HUVEC bzw. die Zellen, die mit Kontroll-siRNAs ohne inhibitorische Effekte (Non-Target siRNA) transfiziert wurden. Die weiteren Schritte erfolgten wie in Punkt 3.2.2.4 beschrieben.

## **3.2.3 Molekularbiologische Methoden zum Umgang mit RNA und DNA**

### **3.2.3.1 Die RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation erfolgte mittels des NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II Extraction Kit der Firma Macherey-Nagel. Nach der Zellyse wurde die Probe zunächst mit Hilfe einer NucleoSpin<sup>®</sup>-Filtersäule homogenisiert. Der Zellaufschluss und die RNA-Freisetzung erfolgten in einem stark denaturierenden, RNase-inaktivierenden Puffer. Durch Zugabe von Ethanol wurden optimale Bedingungen hergestellt, sodass die Gesamt-RNA spezifisch an die Silicagel-Membran in der NucleoSpin<sup>®</sup> RNA II-Säule binden konnte. Andere im Lysat enthaltene Substanzen wie Proteine oder DNA konnten so

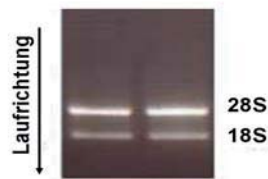
effizient herausgewaschen werden. Im Anschluss wurde die reine RNA mit 21  $\mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser von der Membran eluiert und entweder sofort für weitere Versuche verwendet oder bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **3.2.3.2 Methoden zur RNA-Quantifizierung und -Qualitätskontrolle**

Die Konzentration und Reinheit der eluierten RNA wurde mittels eines Nanodrop-Spektralphotometers bestimmt. Dieser Messmethode liegt zugrunde, dass zyklisch konjugierte  $\pi$ -Elektronen der Pyrimidin- und Purinbasen sich durch UV-Licht anregen lassen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum, bei dem der Absorptionswert ( $A_{260}$ ) einer Probe gemessen wird und als Grundlage für die weitere Berechnung der Konzentration dient. Dieser Absorptionswert wird mit der Gerätekonstanten, welche von der Schichtdicke abhängig ist, und der Verdünnung multipliziert. So beträgt die Gerätekonstante, zum Beispiel bei einer Schichtdicke von 1 cm den Wert 40. Im Ergebnis erhält man die Nukleinsäurekonzentration in  $\mu\text{g/ml}$ . Der Absorptionswert sollte bei der Messung zwischen 0,1 und 1 liegen, da nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz nur in diesem Bereich Absorption und Konzentration proportional zueinander sind.

Des Weiteren wird der Absorptionsquotient, also das Verhältnis  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  (Absorptionsmaximum von Proteinen), bestimmt, um die Qualität und Reinheit der isolierten RNA zu überprüfen. Dieser Wert sollte zwischen 1,5 und 2 liegen. Verunreinigungen mit Proteinen bzw. Salzrückständen, welche bei nachfolgenden Untersuchungen an diesen RNA-Proben zu Störungen oder Ungenauigkeiten führen können, werden durch einen geringen Absorptionsquotienten ( $< 1,6$ ) angezeigt. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Proben mit einem Zahlenwert größer als 1,6 verwendet.

Eine weitere Methode der Qualitätskontrolle ist die elektrophoretische Auftrennung von 1  $\mu\text{g}$  RNA auf einem 1 %igem Formamid-Agarosegel. Dabei werden die Banden der mitochondrialen 18S- und 28S-Untereinheiten durch die Einlagerung von Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht (Abbildung 8). DNA-Verunreinigungen bzw. die Degradation der RNA lassen sich auf diese Weise visuell nachweisen.



**Abbildung 8.** RNA-Qualitätskontrolle anhand eines TAE-Agarosegels.

### 3.2.3.3 Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

RNA ist als Matrize für die Amplifikation eines Genproduktes mittels einer PCR ungeeignet. Daher wurde zunächst die RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (Abbildung 9). Dazu wurde die RNA für 5 min bei 65 °C denaturiert. Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese gemäß Herstellerangaben mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV), in dem die Avian-Myeloblastosis-Virus-Reverse-Transkriptase (AMV-RT) verwendet wird. Oligo (dT)-Primer wurden als Nukleotide verwendet. Diese hybridisieren im Bereich des Poly(A)-Schwanzes eukaryotischer mRNA, wodurch selektiv nur mRNA-Moleküle in cDNA umgeschrieben werden. Dieser Reaktionsansatz wurde dann bei -20 °C eingefroren oder sofort auf Eis für die Analyse der cDNA weiterverarbeitet.

Standardprotokoll für die Reverse Transkription		Einstellungen des Thermocyclers	
10 x Reaktionspuffer	2 µl	65 °C	5 min
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl	25 °C	10 min
Desoxynukleotid-Mix (je 10 mM)	2 µl	42 °C	60 min
Oligo-p(dT) <sub>15</sub> -Primer (0,8 µg/µl)	2 µl	99 °C	5 min
RNase-Inhibitor (50 U/µl)	1 µl	4 °C	5 min
AMV-RT	0,8 µl	Anschließende Lagerung bei -20 °C möglich	
RNA	1 µg		
Nuklease-freies Wasser	Ad 20 µl		

**Abbildung 9.** Standardprotokoll zur Reversen Transkription mit den dazugehörigen Thermocycler-Einstellungen.

### 3.2.3.4 Die Amplifikation von DNA mittels PCR und die Auftrennung der Amplifikate mit Hilfe der Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist es möglich, definierte lineare DNA-Abschnitte enzymatisch zu amplifizieren. Oligonukleotide (Primer) werden dabei zur Bestimmung der zu amplifizierenden Abschnitte verwendet. Über zyklisch wiederholte Sequenzen aus Denaturieren, Hybridisieren und Elongieren wird die Amplifikation der DNA erreicht. Die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes bestimmt dabei die Synthesedauer und die Komplementarität. Die Länge der Primer bestimmt die Hybridisierungstemperatur der Reaktion. Alle DNA-Polymerasen wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet. Zur Amplifikation der DNA-Standards für die Real-Time-PCR wurde das folgende Protokoll verwendet (Abbildung 10).

Standardprotokoll für die PCR		Einstellungen des Thermocyclers		
10 x Pfx Amplification Buffer	5 µl	1	94 °C	2 min
50 mM MgSO <sub>4</sub>	1 µl	2	94 °C	15 s
Desoxynukleotid-Mix (je 10 mM)	1,5 µl	3	57 °C	30 s
Sequenzspezifische Primer (0,8 µg/µl)	1,5 µl	4	68 °C	90 s
Platinum Pfx DNA Polymerase	0,4 µl	5	4 °C	5 min
DNA Matrize (10 pg - 200 ng)	> 1 µl	33 Zyklen für Schritt 2 - 4		
Nuklease-freies Wasser	Ad 50 µl	Anschließende Lagerung bei -20 °C möglich		

**Abbildung 10.** Standardprotokoll zur Polymerasekettenreaktion mit dazugehöriger Thermocycler-Einstellung.

Für alle weiteren konventionellen PCR-Ansätze wurde die GenTherm-DNA-Polymerase, bzw. die Pfu-DNA-Polymerase zur Amplifikation von zu sequenzierenden DNA-Fragmenten mit den dazugehörigen Puffern gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Der Amplifikation der doppelsträngigen DNA-Moleküle folgte deren Auftrennung in 1,5 %igen Agarosegelen per Gelelektrophorese. Dazu wurden vier Teile des PCR-Produktes mit einem Teil 5 x DNA-Ladepuffer versetzt und in vorbereitete Probenaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte standardmäßig bei 65 Volt. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die Visualisierung der DNA-Fragmente im Gel erfolgte mittels Ethidiumbromid (0,2 µg/ml Gelvolumen). Dadurch konnten die damit

angefärbten DNA-Banden nach der Gelelektrophorese unter UV-Licht sichtbar gemacht und festgehalten werden.

### 3.2.3.5 Die DNA-Extraktion aus dem Elektrophoresegel für die nachfolgende Identifizierung von PCR-Produkten mittels DNA-Sequenzierung

DNA-Moleküle, die zur Identifizierung bestimmter PCR-Produkte oder für die Herstellung der DNA-Standards für die Real-Time-PCR dienen, wurden nach der Elektrophorese aus dem Gel extrahiert. Dazu wurden die Gelbereiche, welche die DNA-Banden einer gewünschten Größe enthielten, auf einem UV-Durchlichtschirm sichtbar gemacht und mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit erfolgte die Isolation und Aufarbeitung der DNA entsprechend der Herstellerangaben. Die extrahierten PCR-Produkte wurden zur standardisierten DNA-Sequenzierung an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) versendet. Durch Vergleiche der erhaltenen Sequenzen mit Hilfe der BLAST-Software ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) erfolgte die Verifizierung der Identität der PCR-Produkte.

### 3.2.3.6 Die Berechnung der DNA-Standards für die Real-Time-PCR

Nach der Amplifikation und Identifikation der DNA-Standards für die Real-Time-PCR von flTF, asHTF und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden die DNA-Konzentrationen anschließend spektralphotometrisch bestimmt. Anhand folgender Formel erfolgte die Berechnung der Anzahl der DNA-Kopien in den Eluaten:

$$\frac{\text{DNA-Konzentration [g/}\mu\text{L]}}{\text{Amplikongröße} \times 660} \times 6,022 \times 10^{23} = \text{Kopienzahl/}\mu\text{L}$$

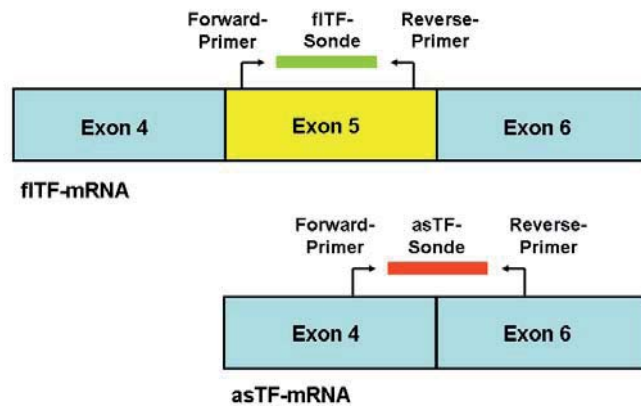
Amplikongröße	
TF:	931 bp
asTF:	842 bp
GAPDH:	1227 bp

Die Lösungen wurden auf eine bestimmte Kopienzahl eingestellt, aus denen für jedes Gen eine Standardverdünnungsreihe (Verdünnungsverhältnis 1:10) erstellt wurde.

### **3.2.3.7 Die Durchführung der Real-Time-PCR mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden**

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR kann, über die Bestimmung der Menge an PCR-Produkten, auf die eingesetzte Menge an RNA bzw. cDNA und damit die Transkriptionshäufigkeit eines Zielgens geschlossen werden. Während des Hybridisierungsschrittes binden neben sequenzspezifischen Primern auch sequenzspezifische Fluoreszenzsonden an die entsprechende Zielsequenz. Diese Sonden sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM) als Reporter und einem Quencher-Molekül (TAMRA) markiert. Der Quencher dient dazu, das Fluoreszenzsignal des Reporters zu unterdrücken. Daher erhält man am Anfang der Reaktion kein Messsignal. Erreicht die Taq-DNA-Polymerase die Sonde während der Zweitstrangsynthese, so wird diese durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase hydrolytisch gespalten. Auf diese Weise wird der Reporter vom Quencher getrennt und dessen Fluoreszenzemission kann nach Anregung mit einem Laser detektiert werden. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz direkt proportional zur Menge an neu amplifizierten DNA-Fragmenten. Damit sind Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge an DNA möglich. Die Messungen wurden mit Hilfe eines „ABI 7000 Sequence Detection“-Systems durchgeführt und die daraus erhaltenen Daten mit der firmeneigenen SDS-Software Version 2.0 ausgewertet.

Die Positionen der TF-Isoform-spezifischen Primer in der cDNA-Matrize (Exon-Strukturen) wurden so gewählt, dass nur eine der beiden TF-Isoformen amplifiziert und detektiert wird. So war es möglich, unabhängige Aussagen über die differenzielle mRNA-Expression der beiden TF-Isoformen zu treffen. In Abbildung 11 ist die Lage der verwendeten Primer und Sonden schematisch dargestellt.



**Abbildung 11.** Schematische Lage der Real-Time-PCR-Primer zur Quantifizierung der TF-Isoformen.

Der Zyklus, an dem die Fluoreszenzzunahme den Schwellenwert (Threshold) zur Schwankungsbreite der Basisfluoreszenz überschreitet und ab dort über mehrere Zyklen stabil messbar bleibt, wird als  $C_t$ -Wert (Threshold Cyclus) der jeweiligen Probe bezeichnet. Alle Vergleiche zwischen verschiedenen Proben werden auf diesen  $C_t$ -Wert bezogen. Zur Quantifizierung der Proben wurden DNA-Standards mit bekannter Kopienzahl eingesetzt (siehe oben). Mittels der  $C_t$ -Werte für diese Standards lässt sich eine Korrelationsgerade (Standardkurve) für die jeweiligen Zielgene ableiten.

Die amplifizierten Produkte wurden nach der Real-Time-PCR auf die richtige Größe hin kontrolliert. Die Quantifizierung der Ziel-mRNA erfolgte für jede gemessene Probe als Dreifachbestimmung und wurde danach auf die Expression eines stabil exprimierten „*Houskeeping*“-Gens bezogen (normalisiert), wozu in diesen Versuchen GAPDH verwendet wurde.

Das nachfolgende Protokoll zeigt das Temperaturprogramm des Real-Time-PCR-Thermocyclers auf (Abbildung 12).

Standardprotokoll für die Real-Time-PCR		Einstellungen des Thermocyclers		
2 x TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5 µl	1	50 °C	2 min
Primer-Mix (20 µM)	0,5 µl	2	95 °C	10 min
Sonde (10 µM)	0,3 µl	3	95 °C	15 s
cDNA Matritze (10 ng - 1 µg)	3 µl	4	60 °C	1 min
Nuklease-freies Wasser	Ad 25 µl	39 Zyklen für Schritt 3 - 4		
		Anschließende Kontrolle der Amplifikat-Länge möglich		

**Abbildung 12.** Standardprotokoll zur Real-Time-PCR.

### 3.2.4 Methoden zur Analyse der prokoagulativen Aktivität von Tissue Factor

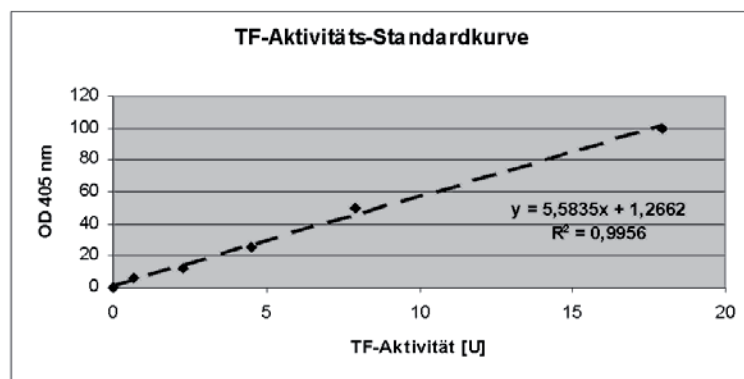
#### 3.2.4.1 Die Bestimmung der zellulären Tissue Factor-Proteinaktivität im statischen Zellkulturmodell

Der TF/FVIIa-Komplex spaltet FX entweder direkt oder indirekt über eine FIX-Aktivierung (siehe Abbildung 2). Dabei entsteht proteolytisch aktiver FXa. Die Bestimmung der funktionellen Aktivität von TF erfolgte über den hier verwendeten TF-Aktivitätstest. Dieser Aktivitätstest beruht auf der direkten Aktivierung von FX durch den TF/FVIIa-Komplex. Der dabei entstandene FXa setzt ein chromogenes FXa-Substrat (Spectrozyme FXa) unter Abspaltung des Farbstoffes p-Nitroanilid um. Die spezifische Extinktion dieses Farbstoffes wird dann bei 405 nm photometrisch bestimmt. FXa entsteht dabei direkt proportional zur TF-Aktivität in der Probe. Bei dieser Methode werden die Blutgerinnungsfaktoren FVIIa (NovoSeven®) und FX, nicht aber die antikoagulatorischen Proteasen Antithrombin und Protein C, die unter physiologischen Bedingungen vorzufinden sind, zugegeben. Da also nur prokoagulatorische, aber nicht antikoagulatorische Faktoren berücksichtigt wurden, handelt es sich hierbei um eine Methode zur Bestimmung der TF-Aktivität unter nichtphysiologischen Versuchsbedingungen.

Zur Durchführung dieses Aktivitätstests wurden die adhärennten Zellen (HUVEC) nach erfolgter Inhibition bzw. Stimulation mit eiskaltem PBS gewaschen, danach mittels Trypsin/EDTA von der Oberfläche der Kulturgefäße gelöst und anschließend zentrifugiert (150 x g, 5 min), um den restlichen Überstand von den Zellen zu trennen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach der Aufnahme der HUVEC in TF-Aktivitätspuffer lichtmikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Im nächsten Schritt wurden  $5 \times 10^4$  Zellen in 200 µl Aktivitätspuffer aufgenommen und

mit Hilfe von 0,1 M n-Octyl- $\beta$ -D-Glycopyranosid 15 min bei 37 °C lysiert. Die weiteren Schritte erfolgten in einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Zu 100  $\mu$ l der Zellsuspension wurden in 50  $\mu$ l FVIIa-Lösung (Endkonzentration 2 nM) pipettiert und dieser Ansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von weiteren 50  $\mu$ l einer FX-Lösung (Endkonzentration 150 nM) zur Probe. Über einen Zeitraum von 4 min wurden dann jede Minute 40  $\mu$ l des Ansatzes abgenommen und in 100  $\mu$ l 25 mM EDTA-Lösung überführt. Dies diente dazu, durch die Komplexbildung des Kalziums die FXa-Bildung in der Probe zu stoppen. Zu diesem Ansatz wurden 25  $\mu$ l Spectrozyme<sup>®</sup> FXa (0,5 mM Endkonzentration) pipettiert und der Anstieg der optischen Dichte (OD) danach für 30 min mit Hilfe eines ELISA-Readers photometrisch bei 37 °C gemessen.

Die Berechnung der TF-Aktivität in Units (U), als Maß für die Umsetzung von FX zu FXa, erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve. Diese TF-Aktivitäts-Standardkurve ergab sich aus der Bestimmung der TF-Aktivität definierter Konzentrationsreihen von lipidisiertem, rekombinant hergestelltem TF. Eine Aktivitäts-Unit entspricht dabei einem Absolutwert von 5,6 pg lipidisiertem, rekombinantem TF (Abbildung 13).

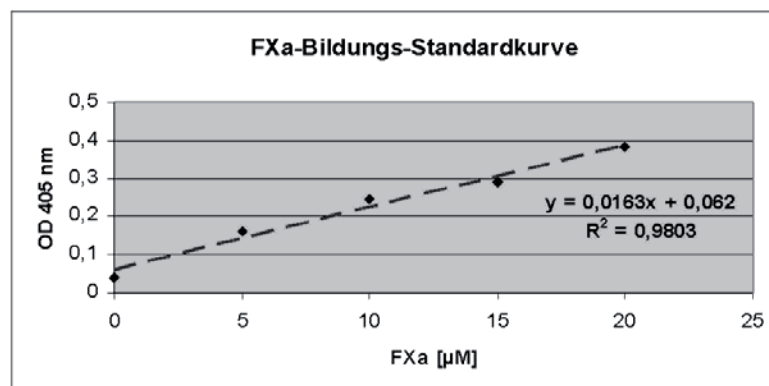


**Abbildung 13.** Standardkurve zur Berechnung der TF-Aktivität in Units (U) aus der optischen Dichte bei 405 nm ( $OD_{405nm}$ ).

### 3.2.4.2 Die Bestimmung der FXa-Bildung unter dynamischen Flussbedingungen

Aus den zuvor beschriebenen Flusskammerversuchen mit den entsprechend präparierten Endothelzell-Einzelschichten wurden nach 10 min bzw. 15 min Aliquots des Perfusionspuffers aufgefangen und mit demselben Volumen an EDTA gemischt. Die photometrische Messung der FXa-Konzentration in den jeweiligen Proben

erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten unter Verwendung eines FXa-Bildungs-Assays. Dazu wurden den Ansätzen jeweils 2,5 U/ml rekombinantes Hirudin zugesetzt, um mögliche Einflüsse durch Thrombin auf die Umsetzung des FXa-Substrates (Spectrozyme<sup>®</sup> FXa) in der darauf folgenden Reaktion auszuschließen. Anschließend wurden 0,4 mM des Substrates Spectrozyme<sup>®</sup> FXa zu den Proben gegeben und diese danach für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Spaltung des Substrates durch den in den Proben enthaltenen FXa führte zur Bildung eines gelblichen Farbstoffes. Die Konzentration des Farbstoffes wurde über die OD photometrisch in einem ELISA-Reader bei 405 nm in einer Endpunktmessung bestimmt. Die Berechnung der FXa-Konzentration in den jeweiligen Proben erfolgte mittels einer Standardkurve (Abbildung 14). Diese FXa-Bildungs-Standardkurve wurde mit Hilfe von reinem humanem Faktor Xa erstellt. Über die Menge an gebildetem FXa erhöht sich das prokoagulante Potenzial auf der Oberfläche einer Endothelzell-Einzelschicht unter proinflammatorischen und dynamischen Bedingungen.



**Abbildung 14.** Standardkurve zur Berechnung der Konzentration an gebildetem FXa in µM aus der optischen Dichte bei 405 nm (OD<sub>405nm</sub>).

### 3.2.5 Proteinbiochemische Untersuchungsmethoden

#### 3.2.5.1 Die Isolation und Quantifizierung von Proteinen

Den zuvor beschriebenen Inhibitions- und Stimulationsversuchen folgend wurden Proteinproben aus den HUVEC isoliert. Dazu wurden die Zellen zuerst mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die HUVEC mit Hilfe eines Zellschabers von der Oberfläche der jeweiligen Zellkulturgefäße abgelöst, in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (500 x g, 5 min, 4 °C). Der dabei entstandene zellfreie Überstand wurde entfernt und das Pellet in eiskaltem Proteinisolationspuffer (RIPA-

Puffer), welcher zusätzlich je 1 % Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail enthielt, resuspendiert. Nach der anschließenden Inkubation dieser Suspension für 30 min bei 4 °C folgte ein Zentrifugationsschritt (12.000 x g, 30 min, 4 °C). Der dabei gewonnene proteinhaltige Überstand wurde vom Pellet, welches Zellfragmente und andere Verunreinigungen enthielt, getrennt und in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben wurden diese bei -80 °C gelagert. Die Quantifizierung des Gesamtproteingehalts der Proben erfolgte mit Hilfe des BCA-Protein Assay Kits. Das Prinzip der dabei angewandten Quantifizierungsmethode beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen in Anwesenheit von Aminosäuren wie Serin, Cystein oder Threonin. Diese  $\text{Cu}^+$ -Ionen verbinden sich in der Lösung mit dem Natriumsalz der darin ebenfalls enthaltenen Bicinchoninsäure zu einem farbigen Komplex, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert werden kann. Die Quantifizierung der Proteinkonzentration in der jeweiligen Probe erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve. Die Durchführung der Methode erfolgte nach den Herstellerangaben.

### **3.2.5.2 Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist es möglich, Proteine aus einer Lösung nach ihrer Größe bzw. dem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen aufzutrennen. Die Bewegungsgeschwindigkeit eines Proteins in einem elektrischen Feld hängt dabei von seinem Molekulargewicht und seiner Ladung ab. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein Detergenz, welches die Proteine während der SDS-PAGE denaturiert. Dieses anionische Tensid überdeckt die Eigenladung der Proteine und bindet in einem Verhältnis von 1,4 g SDS je 1 g Protein, wodurch denaturierte Proteine eine konstante Ladungsverteilung erhalten und so ihrer Größe entsprechend im SDS-Gel aufgetrennt werden. Zusätzlich wird eine schärfere Bandentrennung erreicht, indem über dem Trenngel ein Sammelgel gegossen wird, in dem die Proteine am Übergang zum Trenngel fokussiert werden. Die Spannbreite der Molekulargewichte der hier untersuchten Proteine, wie beispielsweise SR-Proteine, fITF oder asHTF, reichte von 30 kD bis 75 kD. Deshalb wurden Trenngele mit einem Acrylamid-Anteil von 12 % eingesetzt, um diese Spannbreite möglichst optimal abzudecken. 20-30 µg Protein je Probe wurden mit Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben in die entsprechenden Taschen des Sammelgels (Acrylamid-Gehalt 4 %)

pipettiert. Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Proteinbanden im SDS-Gel wurde ein mehrfarbiger Proteinmarker verwendet. Die Fokussierung der Proben am Übergang vom Sammelgel zum Trenngel erfolgte bei 35 mA. Die Auftrennung selbst wurde bei einer Stromstärke von 60 mA im Trenngel durchgeführt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Versuche zu erreichen, wurde die Auftrennung einheitlich beendet, sobald die Bromphenolblaubanden das Ende des Trenngels erreichten.

### 3.2.5.3 Western Blots

Beim Western Blot-Verfahren werden Proteine aus einem SDS-Gel auf eine Membran übertragen und darauf immobilisiert. Im Anschluss daran kann man die transferierten Proteine in den komplexen Proteingemischen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern identifizieren.

Nach der Auftrennung der Proteinproben mittels der SDS-PAGE erfolgte die Äquilibration des Gels und der Filterpapiere für ca. 15 min im Transferpuffer. Eine hydrophobe PVDF-Membran wurde zunächst für 30 s in Methanol aktiviert und ebenfalls für 15 min in Transferpuffer gegeben. Der Transfer der Proteine erfolgte nach der Äquilibration aller Bestandteile mit Hilfe der „Fastblot B44 - Semi-dry Blotting“-Apparatur (Abbildung 15).



**Abbildung 15.** Aufbau der „Semi-Dry Western Blot“-Apparatur.

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran wurde bei einer Leistung von 7 W für 45 min durchgeführt. Die Überprüfung der Effizienz des Proteintransfers erfolgte mittels einer Färbung mit Ponceau-S-Lösung. Nach dem Entfärben mit TBS-T wurde die Membran für 60 min in 5 % Magermilchlösung auf einem Schwenkschüttler inkubiert. Dies diente dazu, unspezifische Bindungen auf der Membran zu blockieren. Zwischen allen nachstehenden Schritten erfolgte ein

dreimaliger Waschschrift für jeweils 10 min mit TBS-T. Anschließend wurde die Membran über Nacht (für ca. 16 h) bei 4 °C mit dem jeweiligen Primärantikörper (Tabelle 2) inkubiert. Nach dem Entfernen unspezifisch gebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS-T-Puffer folgte die Inkubation der PVDF-Membran mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (1:5000 verdünnt in 5 % Magermilchlösung) für 60 min bei RT. Nach einem letzten Waschschrift mit TBS-T wurde die Membran in eine Plastikfolie überführt und mit Hilfe des ECL plus Kits, den Angaben des Herstellers folgend, die spezifischen Proteinbanden visualisiert. In einer Dunkelkammer erfolgte die Inkubation der Röntgenfilme mit der so präparierten Membran für 30 s bis 10 min. Nach der Entwicklung der belichteten Filme waren die sichtbar gewordenen Proteinbanden für die visuelle Auswertung zugänglich.

**Tabelle 2.** Primärantikörper-Verdünnungen für Western Blot; (m) monoklonal, (p) polyklonal.

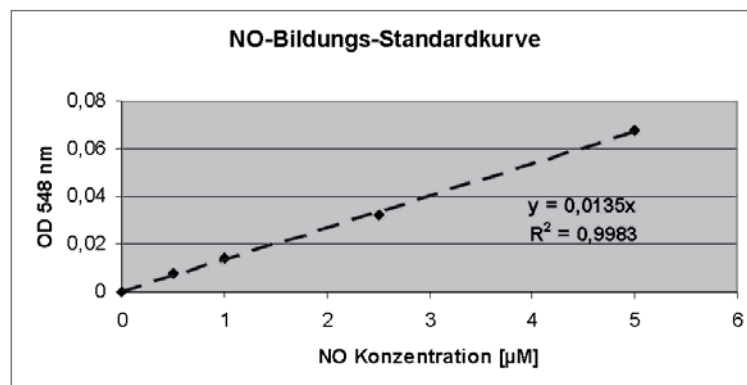
Primärantikörper	Verdünnung
anti-asHTF (p)	1:100
anti-human TF (m)	1:300
anti-Clk1 (p)	1:500
anti-Clk2 (p)	1:500
anti-Clk3 (p)	1:500
anti-Clk4 (p)	1:500
anti-GAPDH (m)	1:5000
anti-SC35 (m)	1:300
anti-SF2/ASF (m)	1:300
anti-SR-Protein (Klon 1H4) (m)	1:300
anti-SR-Protein (Klon 16H3E8) (m)	1:300
anti-Top1 (m)	1:500

### 3.2.6 Methoden zur Analyse der NO-Synthese und eNOS-Aktivität

#### 3.2.6.1 Der Griess-Assay zur Bestimmung der Nitrat/Nitrit-Konzentration

Nitrat ( $\text{NO}_3$ ) und Nitrit ( $\text{NO}_2$ ) sind die stabilen Oxidationsprodukte von Stickstoffmonoxid (NO). Sie dienen als Indikatoren der endogenen Synthese von NO. Mit Hilfe der Griess-Reaktion können diese Indikatoren gemessen werden. Analysiert wurden die Überstände zuvor inhibierter bzw. stimulierter HUVEC im Vergleich zu TNF- $\alpha$ -stimulierten Zellen (Positivkontrollen) und unbehandelten Kontrollzellen (Negativkontrollen). Wie im Abschnitt 3.2.1 beschrieben, wurden  $1 \times 10^6$  HUVEC

vorbehandelt (Abbildung 7). Die Abnahme der Zellüberstände erfolgte 2 h, 3 h bzw. 5 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$ . Daran schloss sich ein Zentrifugationsschritt (12.000 x g, 10 min, 4 °C) an. Dem folgte die Bestimmung der Nitrit-Konzentration im Überstand mit Hilfe des Griess Reagent Kit nach den Angaben des Herstellers. Jeder Probe wurde das Griess-Reagenz hinzugefügt. Diesem Schritt folgte eine Inkubation der Ansätze für 30 min unter Lichtabschluss und bei RT. Anschließend wurde ein Aliquot von 100  $\mu$ l jeder Probe in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Bestimmung der Menge des entstandenen farbigen Substratprodukts erfolgte photometrisch mit Hilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 548 nm. Die Bestimmung des NO-Gehaltes in den Zellüberständen erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve, welche sich aus der Messung der OD bei definierten Natriumnitrit-Konzentrationsreihen ergab (Abbildung 16). Über die Konzentration an NO waren Rückschlüsse auf die Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) in den HUVEC möglich.

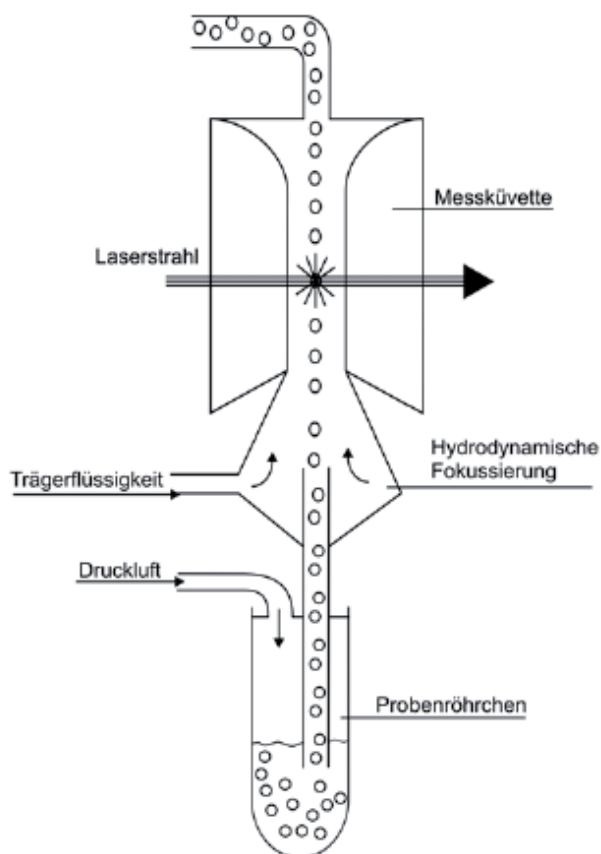


**Abbildung 16.** Standardkurve zur Berechnung der Konzentration an gebildetem NO in  $\mu$ M aus der optischen Dichte bei 548 nm ( $OD_{548nm}$ ).

### 3.2.6.2 Durchflusszytometrische Analysen der intrazellulären Stickstoffmonoxid-Konzentration

Die Durchflusszytometrie dient der fluoreszenzabhängigen und multiparametrischen Erfassung und Analyse von Zellen in Suspension. Das Funktionsprinzip beruht auf der simultanen Messung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Zellsuspensionen, die mit Fluoreszenzfarbstoffen behandelt wurden. Es sind parallel Untersuchungen zur Größe und Granularität der Zellen über die Lichtstreuung sowie zu anderen Zelleigenschaften durch Assoziation von Fluoreszenzfarbstoffen durchführbar.

Mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellen werden in einer Suspension über hydrodynamische Fokussierung an einem Laserstrahl vorbeitransportiert (Abbildung 17). Nach Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben, um direkt nach dem Laserpuls unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) wieder auf ihr Ursprungsniveau zurückzufallen. Die emittierten Photonen werden von einem Photodetektor registriert. Die Photonenkonzentration verhält sich dabei proportional zur Menge an Fluoreszenzfarbstoff je Zelle. Durch die Lichtbeugung und -streuung können zusätzlich Informationen über die Zellgröße und die Größe des Zellkerns sowie die Granularität des Zytoplasmas gewonnen werden. In den hier durchgeführten Versuchen wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Diaminofluorescein-2-Diacetat (DAF-2DA) die intrazelluläre Konzentration an NO, einem wichtigen Regulator der Gefäßhomöostase in lebenden Zellen bestimmt. DAF-2DA ist ein nichtfluoreszierendes zellpermeables Reagenz, dessen Diacetat-Gruppen nach der Aufnahme in die Zelle durch zytosolische Esterasen hydrolysiert werden. Dabei entsteht DAF2, das irreversibel innerhalb der Zelle gebunden bleibt und in Gegenwart von NO zu dem fluoreszierenden Triazol-Derivat DAF-2T umgewandelt wird. Die Menge an DAF-2T lässt sich über die Messung der Extinktion bei 488 nm und Emission bei 515 nm bestimmen, wodurch Rückschlüsse auf die NO-Menge und damit auf die Aktivität von eNOS innerhalb der Zelle möglich sind. Die Auswertung der Versuche wurde mit Hilfe der CellQuest<sup>®</sup>-Software (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D) durchgeführt.



**Abbildung 17.** Prinzip der Durchflusszytometrie (hydrodynamische Fokussierung), entnommen aus der Gebrauchsinformation des FACScan.

### 3.3 Statistische Auswertung

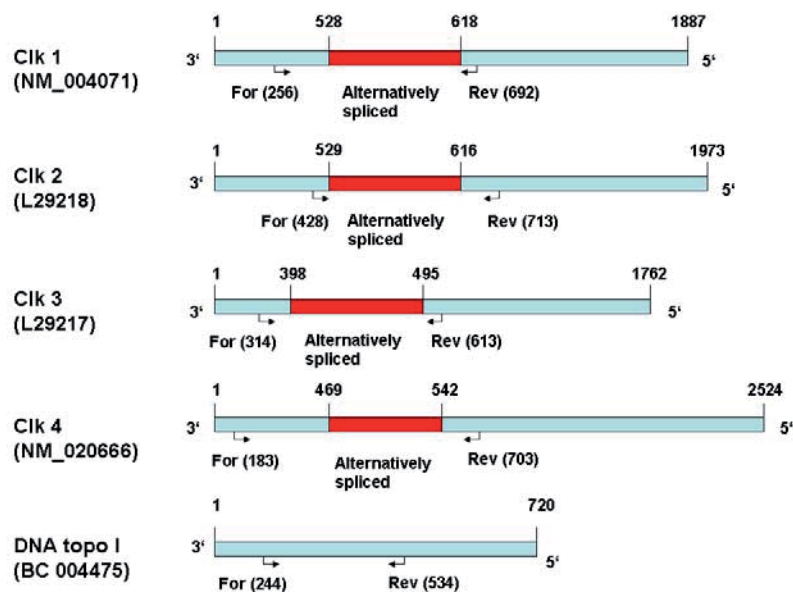
Die in dieser Arbeit erhobenen Daten sind, soweit nicht anders gekennzeichnet, als arithmetische Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt und stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Entscheidung, ob Unterschiede zwischen den Ergebnissen der einzelnen Versuchsgruppen signifikant waren, wurde für normalverteilte Daten unter Durchführung eines ungepaarten „t-Tests“ getroffen. In Versuchen, bei denen mehr als zwei verschiedene Gruppen miteinander verglichen wurden, erfolgte die statistische Analyse mittels eines „One Way“-ANOVA (Analysen zur Varianz)-Tests mit anschließender Bonferroni-Korrektur. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 4 Version 4.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde für alle erhobenen Daten als minimales Signifikanzniveau angenommen.

## 4. Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten stammen aus Zellkultur-Versuchen an humanen Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC). Dieser Zelltyp stellt ein geeignetes und gut beschriebenes Modell für *in vitro*-Analysen zur Endothelfunktion dar.

### 4.1 Die Charakterisierung des Expressionsmusters der Clk-Familie und der DNA topo I in HUVEC

Literaturrecherchen und Sequenzvergleiche mittels der BLAST-Software ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) ergaben, dass in humanen Zellen die Primärtranskripte aller vier Mitglieder der Clk-Familie, nicht aber der DNA topo I alternativ gespleißt werden. Dadurch kommt es auf mRNA-Ebene zur Bildung von Clk-Spleißvarianten (Abbildung 18).

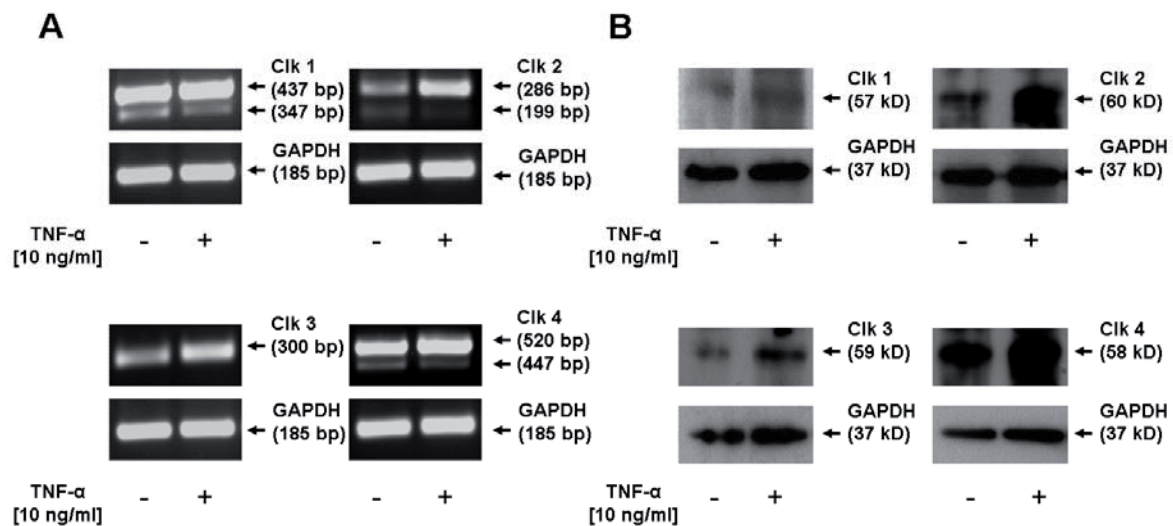


**Abbildung 18.** Schematische Darstellung der mRNA-Spleißvarianten von Clk1, 2, 3, 4 und der mRNA der DNA topo I.

Angegeben sind die Bezeichnungen der jeweiligen Originalsequenzen (Akzessionsnummer), die Sequenzlänge, die Positionen der spezifischen Primer und die alternativ gespleißten Regionen in der Sequenz der Primärtranskripte. Die Darstellung der mRNA-Spleißvarianten erfolgt in 3'-5'-Ausrichtung.

Auf mRNA-Ebene exprimierten HUVEC alle vier „full length“-Formen der Clk-Familie konstitutiv, ebenso wie die alternativ gespleißten mRNA-Varianten der Clks1, 2 und 4

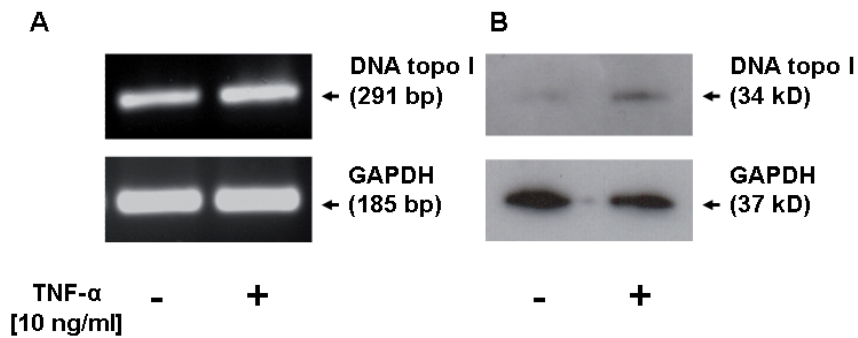
(Abbildung 19A). Die alternative mRNA-Spleißvariante von Clk3 konnte in HUVEC nicht detektiert werden (Abbildung 19A). 1 h nach der Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  war die Expression aller „full length“-Formen erhöht (Abbildung 19A). Die Expression der funktionslosen alternativ gespleißten mRNA-Varianten erwies sich als supprimiert unter diesen Bedingungen (Abbildung 19A). Verglichen mit den nichtstimulierten Kontrollen war die Proteinexpression aller vier Mitglieder der Clk-Familie 5 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  ebenfalls erhöht (Abbildung 19B).



**Abbildung 19.** Expression der Mitglieder der Clk-Familie in HUVEC.

Dargestellt sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse auf Ebene der mRNA-Bildung, 1 h nach der Stimulation (A) und die der Proteinsynthese, 5 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  (B). Verglichen werden Zellen, die mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert wurden (+), und nichtstimulierte Kontrollen (-). Angegeben sind die Größen der detektierten PCR-Produkte in Basenpaaren (bp) und der Proteine in Kilodalton (kD). GAPDH dient als Ladekontrolle.

Unstimulierte HUVEC exprimieren konstitutiv DNA topo I sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (Abbildung 20). Die Stimulation mit TNF- $\alpha$  führte nach 1 h zu einer vermehrten mRNA-Expression der DNA topo I (Abbildung 20A). Auch auf Proteinebene führte die TNF- $\alpha$ -Induktion nach 5 h zu einer deutlichen Erhöhung der DNA topo I-Expression (Abbildung 20B).



**Abbildung 20.** Expression der DNA topo I in HUVEC.

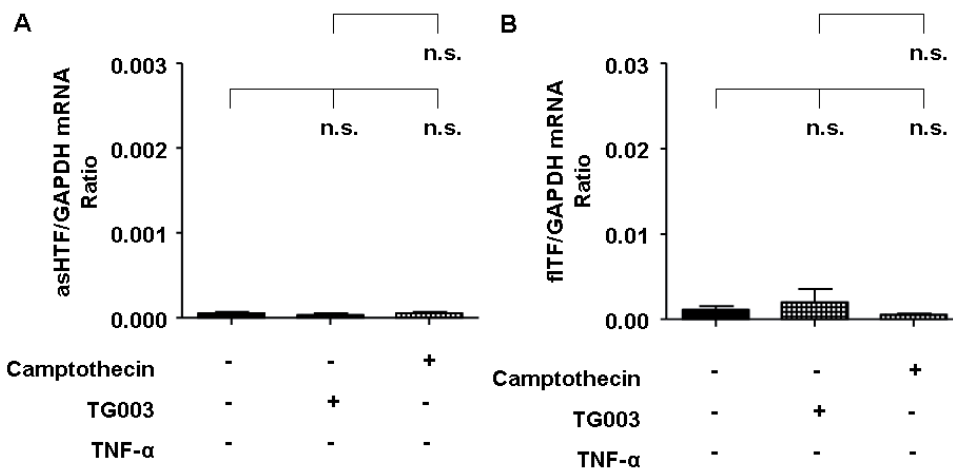
(A) Darstellung der mRNA-Expression 1 h nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  und (B) der Proteinexpression von DNA topo I 5 h nach der Induktion. Darstellt sind die Größen der detektierten PCR-Produkte in Basenpaaren (bp) und der Proteine in Kilodalton (kD) im Vergleich von TNF- $\alpha$ -stimulierten (+) zu nichtstimulierten Zellen (-).

## 4.2 Die Bedeutung der Regulation alternativer Spleißprozesse für die Expression und die prokoagulatorische Aktivität von TF

### 4.2.1 Der Einfluss der Clk-Familie und der DNA topo I auf die differenzielle TF-Isoform-Expression auf mRNA-Ebene

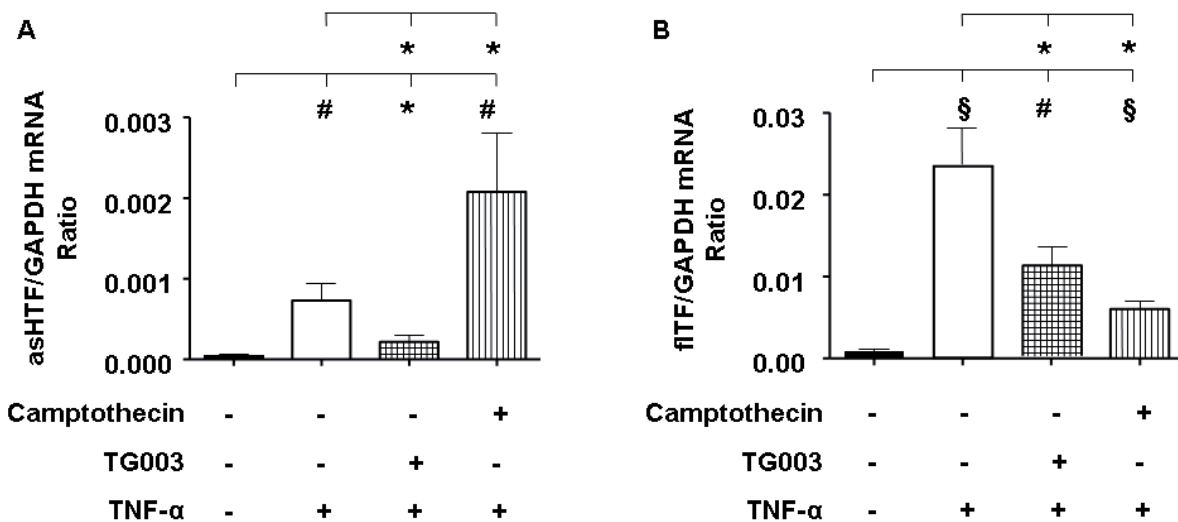
Um den Einfluss der SR-Proteinkinasen auf das alternative Spleißen von TF und damit die differenzielle TF-Isoform-Expression zu untersuchen, wurden die spezifischen pharmakologischen Inhibitoren TG003, ein Inhibitor für Clk1, 2 und 4, und Camptothecin, ein Inhibitor der DNA topo I, verwendet.

Die Basalexpression beider TF-Isoformen in nichtstimulierten HUVEC erwies sich als sehr gering ausgeprägt (Abbildung 21). Die pharmakologische Inhibition der Clk-Familie wie auch die Hemmung der DNA topo I besaß keinen signifikanten Einfluss auf die mRNA-Expression von asHTF (Abbildung 21A) oder flTF (Abbildung 21B) in ruhenden HUVEC.



**Abbildung 21.** Der Einfluss der Clk- und DNA topo I-Inhibitoren auf die mRNA-Expression von asHTF (A) und flTF (B) in nichtstimulierten HUVEC. Dabei werden unbehandelte HUVEC mit Zellen verglichen, die für 1 h mit TG003 oder Camptothecin vorinkubiert wurden. (n.s.) nicht signifikant unterschiedlich.

Eine einstündige Stimulation der humanen Endothelzellen mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- $\alpha$  führte zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression der löslichen TF-Isoform asHTF verglichen mit nichtstimulierten HUVEC (Abbildung 22A). In den TNF- $\alpha$ -induzierten Zellen bewirkte die vorhergehende Inhibition der Clk-Familie eine vollständige Reduktion der asHTF-mRNA-Expression bis auf das Basalniveau (Abbildung 22A). Im Gegensatz dazu führte die DNA topo I-Inhibition in den proinflammatorisch stimulierten HUVEC zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von asHTF (Abbildung 22A). Die Stimulation mit TNF- $\alpha$  induzierte ebenfalls die mRNA-Expression von flTF (Abbildung 22B). Die Inhibition der Clk-Familie führte zu einer signifikanten Reduktion der TNF- $\alpha$ -induzierten flTF-mRNA-Expression um ca. 50 % (Abbildung 22 B). Die pharmakologische Hemmung der DNA topo I verringerte die flTF-Expression um ca. 75 % unter diesen Bedingungen (Abbildung 22 B).

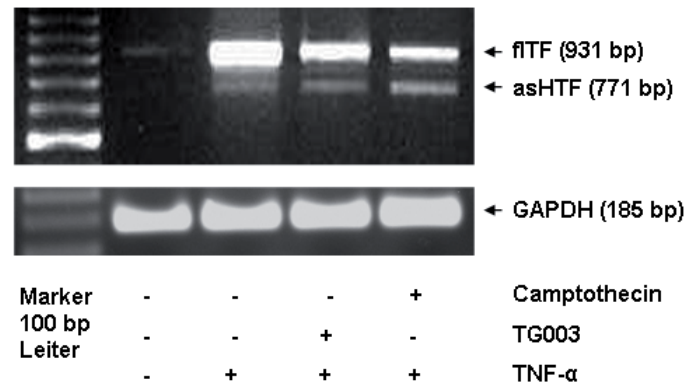


**Abbildung 22.** Die mRNA-Expression der TF-Isoformen:

asHTF (A) und flTF (B), normalisiert gegen GAPDH, 1 h nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ . Verglichen werden nichtstimulierte Kontrollen, Zellen, die mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurden, und Zellen, die vor der Stimulation mit Camptothecin bzw. TG003 vorbehandelt wurden. (\*) p<0,05; (#) p<0,01; (\$) p<0,0001.

Zusätzlich nutzten wir herkömmliche PCR-Verfahren zur Darstellung und semiquantitativen Auswertung der Einflüsse der oben genannten pharmakologischen Inhibitoren in HUVEC unter proinflammatorischen Bedingungen (Abbildung 23). Die Identität der PCR-Produkte wurde mittels DNA-Sequenzierung verifiziert.

Die Ergebnisse der semiquantitativen PCR zeigen übereinstimmend mit den Daten der Real-Time-PCR, dass das Niveau der basalen Expression beider TF-Isoformen in unbehandelten HUVEC sehr gering ist (Abbildung 23). Die einstündige Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  führte zu einer deutlichen Induktion der mRNA-Expression beider TF-Isoformen (Abbildung 23). Die pharmakologische Inhibition der Clk-Familie reduzierte die Expression beider TF-Isoformen in den TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC (Abbildung 23). Die Inhibition der DNA topo I hingegen resultierte in einer Erhöhung von asHTF, während die mRNA-Expression von flTF deutlich verringert wurde 1 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  (Abbildung 23).

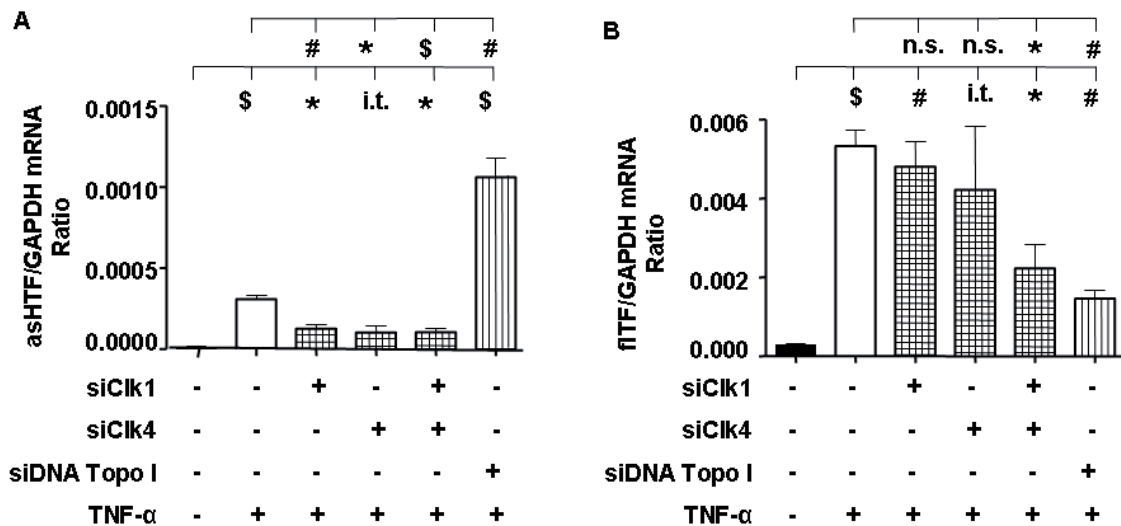


**Abbildung 23.** Die mRNA-Expression von flTF und asHTF in HUVEC 1 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$ .

Dargestellt ist der Vergleich von unbehandelten Kontrollen, Zellen, die mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert wurden, und Zellen, die vor der Stimulation mit Camptothecin (DNA topo I-Inhibitor) bzw. 10  $\mu$ M TG003 (Clk-Inhibitor) vorbehandelt wurden. Als Ladekontrolle diente GAPDH, und als Marker wurde eine 100-Basenpaar (bp)-Leiter eingesetzt. Die PCR-Produkte waren flTF (931 bp), asHTF (771 bp) und GAPDH (185 bp).

Um zu bestätigen, dass der Einfluss der pharmakologischen Inhibitoren auf die spezifische Hemmung der oben genannten SR-Proteinkinasen zurückzuführen war, wurden exemplarisch die DNA topo I, die Clk1 sowie die Clk4 mit Hilfe spezifischer siRNAs herunterreguliert („*knock-down*“).

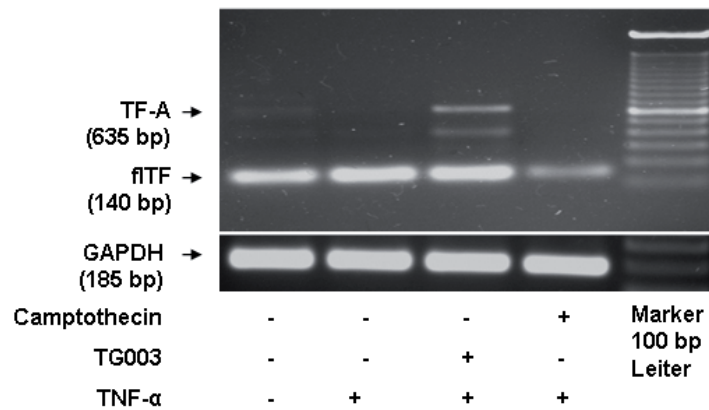
Eine einstündige Stimulation der humanen Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  führte zu einer signifikanten Erhöhung von asHTF (Abbildung 24A) und flTF (Abbildung 24B) gegenüber den unbehandelten Kontrollen, deren TF-Basalexpression, wie schon zuvor gezeigt, sehr gering ausgeprägt war (Abbildung 24). Die siRNA-vermittelte Inhibition von Clk1 und Clk4, allein oder in Kombination, verringerte die asHTF-Expression gegenüber den TNF- $\alpha$ -stimulierten Kontrollen in signifikantem Maße (Abbildung 24A). Im Gegensatz dazu resultierte der DNA topo I-„*knock-down*“ in einer deutlichen Erhöhung der mRNA-Expression von asHTF (Abbildung 24 A). Die siRNA-vermittelte Herunterregulation von Clk1 oder Clk4 allein beeinflusste die TNF- $\alpha$ -induzierte flTF-mRNA-Expression nicht (Abbildung 24 B). Die Inhibition beider Clks hingegen verminderte die flTF-Expression um ca. 50 %. Die siRNA-vermittelte Hemmung der DNA topo I reduzierte ebenfalls signifikant die mRNA-Expression von flTF. Diese Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse der pharmakologischen Inhibition der SR-Proteinkinasen.



**Abbildung 24.** Darstellung der mRNA-Expression von asHTF (A) und flTF(B) in HUVEC 48 h nach der Transfektion mit spezifischen siRNAs und 1 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$ . Verglichen werden unbehandelte Kontrollen, TNF- $\alpha$ -stimulierte HUVEC und Zellen, die 48 h vor der Stimulation mit spezifischen siRNAs gegen Clk1, Clk4, Clk1 und 4 sowie DNA topo I transfiziert wurden. (\*)  $p < 0,05$ ; (#)  $p < 0,01$ ; (\$)  $p < 0,001$ ; (i.t.)  $p < 0,15$  (im Trend); (n.s.) nicht signifikant unterschiedlich.

In zusätzlichen semiquantitativen PCR-Analysen wurde gezeigt, dass in TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC die vorhergehende Inhibition der Clk-Familie die Expression einer dritten TF-mRNA-Spleißvariante induziert (Abbildung 25). Die Identität der PCR-Produkte wurde mittels DNA-Sequenzierung belegt.

Wie schon in den vorhergehenden Versuchen dargestellt wurde, induzierte die TNF- $\alpha$ -Stimulation der humanen Endothelzellen die Expression von flTF (140 bp-Fragment; Abbildung 25). Die pharmakologische Inhibition der Clk-Familie verringerte die flTF-Expression in den TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC nur in geringem Maße, während die Hemmung der DNA topo I zu einer deutlichen Reduktion der mRNA-Expression von flTF führte (Abbildung 25). Ferner führte die Inhibition der Clk-Familie in den TNF- $\alpha$ -induzierten Endothelzellen zur Expression eines weiteren PCR-Produktes bei 635 bp, welches in den anders behandelten Proben nicht nachgewiesen wurde (Abbildung 25).



**Abbildung 25.** Darstellung der mRNA-Expression von flTF und der TF-A-Spleißvariante nach einstündiger Stimulation der HUVEC mit TNF-α.

Charakterisiert wurde das Expressionsmuster dieser beiden TF-Spleißvarianten in unbehandelten Kontrollen, TNF-α-stimulierten Endothelzellen und HUVEC, die vor der Stimulation mit Camptothecin (DNA topo I-Inhibitor) bzw. TG003 (Clk-Inhibitor) vorbehandelt wurden. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Als Marker wurde eine 100-Basenpaar (bp)-Leiter verwendet. Die dargestellten Amplikons sind flTF (140 bp), TF-A (635 bp) und GAPDH (185 bp).

Analysen mit Hilfe der BLAST-Software ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) zeigten, dass die Sequenz des Amplikons der nichtkodierenden mRNA-Spleißvariante TF-A entsprach (Abbildung 26). Bei der Bildung dieser humanen TF-Spleißvariante kommt es über alternative Spleißprozesse zur Insertion eines Fragmentes von Intron 1 in die reife mRNA (Abbildung 27).

```

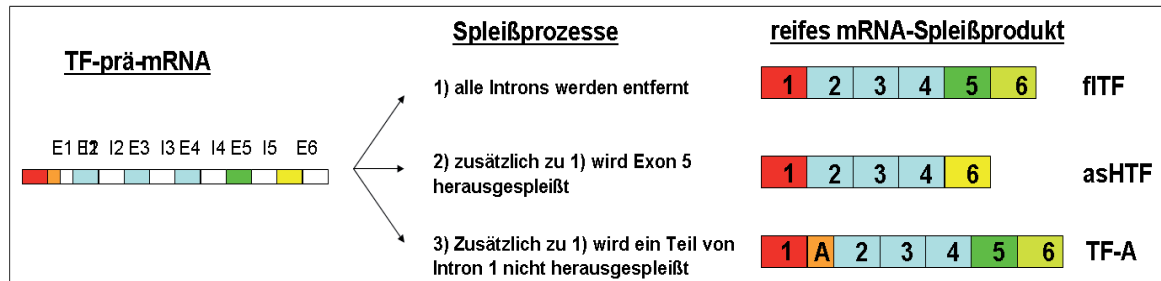
Exon 1  aagactgoga  getoocccga  cccocctogca  ctccctctgg  cgggccccagg  ggcocctcag  cccaacctcc  ccagcccccac  gggcgccacg
          gaaccocgctc  gatotcgcog  ccaactggta  gacatggaga  ccocctgcctg  gccccgggctc  ccggccccc  agaccgccgt  cgctcggacg
          ctccctgctcg  gctgggtctt  cgcccaggtg  gccggcgctt  cag
          TF-E1 for
          gtttggg  tagaggcaat  ccaaaaagggc  tggattgctg  cttagattgg
Exon 1A agcagggtaca  acgttgtgca  tgcccogtat  ttctacgagg  tgttcgggac  ggcgtagaga  ctgggacctg  ctgcgtactg  gcaaagcaga
          ccttcataag  aaataatcct  gatccaatac  agccgacggg  gtgacaggcc  acacgtcccc  gtgggtctct  gtggaagttt  cagtgtagcg
          acatttcaga  taaaagtgga  aaaagtgaag  tttggctttt  ttcatttcta  tgcagtccta  actottgtca  cacgtgtggg  atttatcttt
          ttccataact  tactgaaaac  ccttcctggc  gggctgaacc  tgactcttcc  tgagctgagt  cctggactgg  cacactgatg  gctctgggct
          cttcccggtc  aagttataac  aaggctttgc  ccatgaataa  tttcaaacga  aatgtcaag  atccttgccg  gtgtcctggg  attacaag
          gc
Exon 2  actacaaata  ctgtggcagc  atataattta  acttggaat  caactaat  caagacaatt  ttggagtggg  aacccaaacc  cgtcaatcaa
          gtctacactg  ttcaataag
          TF-E2 rev

```

**Abbildung 26.** Die Ergebnisse der Sequenzanalyse.

Dargestellt ist die Sequenz des TF-A-Amplikons, in Übereinstimmung mit der bekannten Sequenz der TF-A-mRNA (GenBank Akzessionsnummer: AY940729). Die Sequenz ist in 5'-3'-Richtung des „Sense“-Stranges dargestellt. Die Positionen der Primer sind unterstrichen, und die exonischen Sequenzen sind fettgedruckt. Die Sequenz von Exon 1A, die dem vorderen Teil von Intron 1 entspricht, ist kursiv gedruckt.

In Abbildung 27 sind die Vorgänge, welche zur Bildung der drei oben beschriebenen TF-Spleißvarianten führen, ausgehend von der TF-prä-mRNA schematisch dargestellt.



**Abbildung 27.** Schematische Darstellung der TF-prä-mRNA und der Spleißprozesse, welche zur Bildung der drei TF-mRNA-Spleißvarianten führen.

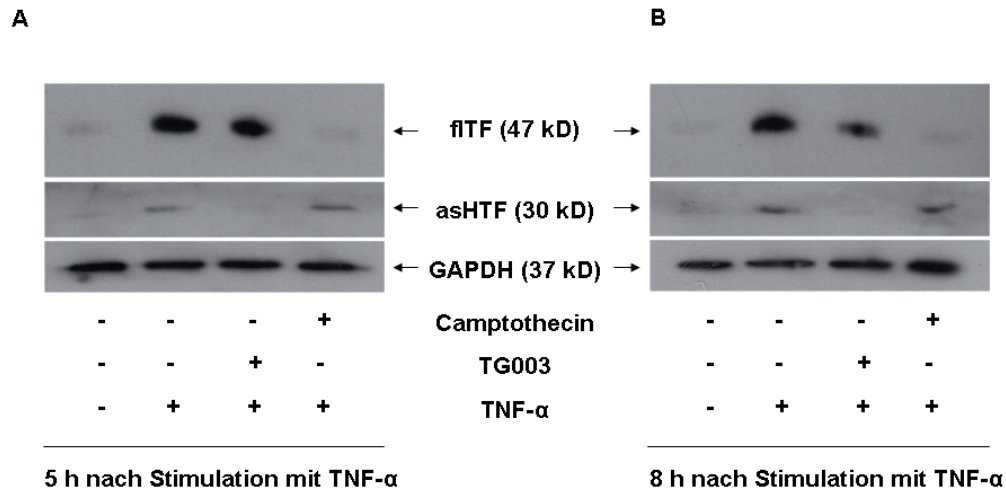
Die Bedeutung der Symbole ist dabei wie folgt definiert: E = Exon; I = Intron.

#### 4.2.2 Analysen zum Einfluss der SR-Proteinkinasen auf die Proteinexpression von fITF und asHTF

Western Blot-Versuche dienen dazu, den Einfluss der Inhibition der Clks und der DNA topoisomerase I auf die Proteinexpression der beiden TF-Isoformen abzuschätzen. Dazu wurden die HUVEC für 5 h und 8 h mit TNF- $\alpha$  stimuliert und danach die Proteine isoliert und untersucht.

Ruhende HUVEC exprimierten beide TF-Isoformen auf Proteinebene nur in sehr geringen Mengen (Abbildung 28). Die Stimulation mit TNF- $\alpha$  führte sowohl nach 5 h als auch nach 8 h zu einem deutlichen Anstieg der Expression beider Isoformen von TF (Abbildung 28). 5 h nach der Stimulation besaß die Inhibition der Clks keinen Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -induzierte Erhöhung von fITF (Abbildung 28A). Im Gegensatz dazu verringerte die Inhibition der DNA topoisomerase I die fITF-Proteinexpression bis auf das Basalniveau (Abbildung 28A). Die asHTF-Expression wurde durch die beiden Inhibitoren gegensätzlich beeinflusst. So führte die Inhibition der Clks zu einer Reduktion von asHTF gegenüber den TNF- $\alpha$ -stimulierten Kontrollen (Abbildung 28A). Die Inhibition der DNA topoisomerase I hingegen erhöhte die asHTF-Expression (Abbildung 28A). 8 h nach der Stimulation erwies sich die Proteinexpression von fITF als reduziert in den Clk-inhibierten HUVEC verglichen mit den TNF- $\alpha$ -stimulierten Kontrollen (Abbildung 28B). Die TNF- $\alpha$ -induzierte Expressionserhöhung von asHTF

wurde unter diesen Bedingungen vollständig aufgehoben (Abbildung 28B). Im Gegensatz zur Clk-Inhibition führte die Inhibition der DNA topo I zu einer drastischen Verringerung von flTF-Protein (Abbildung 28B). Die asHTF-Expression hingegen blieb unter diesen Bedingungen unbeeinflusst (Abbildung 28B).



**Abbildung 28.** Die Proteinexpression der TF-Isoformen in HUVEC nach TNF- $\alpha$ -Stimulation.

In der Abbildung sind Western Blots von Zelllysaten 5 h (A) und 8 h (B) nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  dargestellt. Dabei werden unbehandelte Kontrollen, TNF- $\alpha$ -induzierte Zellen und Zellen, die vor der Stimulation mit Camptothecin bzw. TG003 vorbehandelt wurden, verglichen. Die flTF-Isoform wurde mit einem gegen die extrazelluläre Domäne gerichteten Antikörper und asHTF mit einem spezifischen, gegen den typischen C-Terminus der Isoform gerichteten Antikörper detektiert. GAPDH diente als Ladekontrolle.

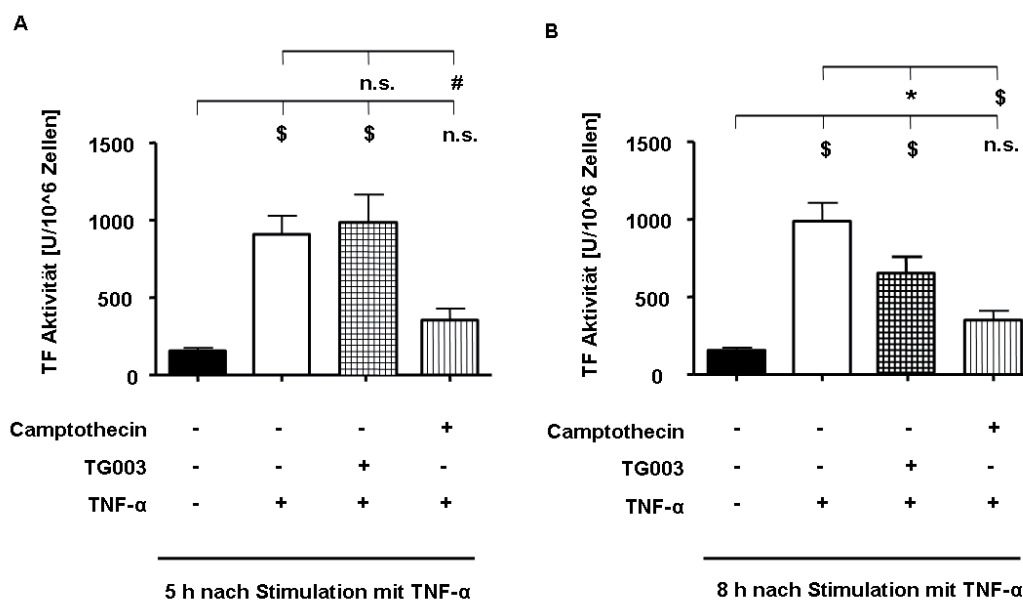
#### 4.2.3 Die Wirkung der Clk- und DNA topo I-Inhibition auf die Prokoagulabilität endothelialer Zellen

Der Bedeutung der SR-Proteinkinasen für die Steuerung der prothrombogenen Aktivität humaner Endothelzellen nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- $\alpha$  wurde im statischen sowie im dynamischen Modell analysiert.

##### 4.2.3.1 Der Einfluss der Inhibition der SR-Proteinkinasen auf die zelluläre Prokoagulabilität von HUVEC

Unter statischen Zellkulturbedingungen erfolgte die Bestimmung des Einflusses der Clk-Familie und der DNA topo I auf die intrazelluläre endotheliale prokoagulatorische Aktivität anhand eines chromogenen TF-Aktivitäts-Assays.

Sowohl 5 h als auch 8 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  erwies sich die TF-Aktivität gegenüber den unbehandelten Kontrollen als signifikant erhöht (Abbildung 29). Übereinstimmend mit den Daten der TF-Proteinexpression (Abbildung 28) besaß die Inhibition der Clk-Familie 5 h nach der TNF- $\alpha$ -Stimulation keinen Einfluss auf die TF-Aktivität (Abbildung 29A). Nach achtstündiger Stimulation mit TNF- $\alpha$  wurde die prokoagulative Aktivität von TF in den Clk-inhibierten Zellen hingegen verringert (Abbildung 29B). Im Gegensatz dazu führte die Inhibition der DNA topo I zu einer signifikanten Reduktion der TNF- $\alpha$ -induzierten Erhöhung der TF-Aktivität sowohl nach 5 h als auch nach 8 h (Abbildung 29).



**Abbildung 29.** Die zelluläre TF-Aktivität 5 h (A) und 8 h (B) nach Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$ .

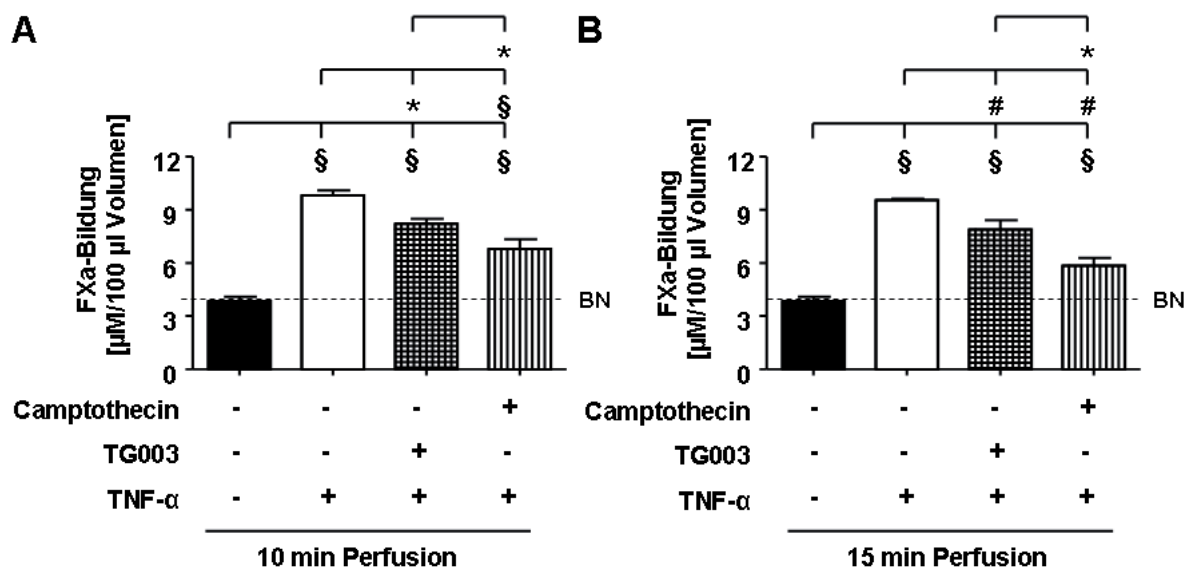
Die TF-Aktivität wird in U (Units) je  $10^6$  HUVEC angegeben. Analysiert wurden unbehandelte Kontrollen und TNF- $\alpha$ -stimulierte Zellen sowie Zellen, die vor der Stimulation mit Camptothecin bzw. TG003 vorinkubiert wurden. (\*)  $p < 0,05$ ; (#)  $p < 0,01$ ; (\$)  $p < 0,001$ ; (n.s.) nicht signifikant unterschiedlich.

#### 4.2.3.2 Die Bedeutung der Clk-Familie und der DNA topo I für die TF-abhängige Generierung von FXa unter Flussbedingungen

Unter dynamischen Strömungsbedingungen wurde der Einfluss der oben genannten SR-Proteinkinasen mittels eines FXa-Bildungs-Assays bestimmt.

Die basale FXa-Bildung unbehandelter HUVEC unter dynamischen Flussbedingungen betrug ca. 4  $\mu$ M FXa in einem Durchflussvolumen von 100  $\mu$ l Perfusionslösung (Abbildung 30). Die Stimulation der HUVEC-Einzelschicht mit

TNF- $\alpha$  führte zu einer 2,5-fachen Erhöhung der FXa-Generierung sowohl 10 min (Abbildung 30A) als auch 15 min nach Perfusionsbeginn (Abbildung 30B). Die Clk-Inhibition verringerte die TNF- $\alpha$ -induzierte Erhöhung von FXa um ca. 30 % zu beiden Messzeiten (Abbildung 30). Die pharmakologische Inhibition der DNA topo I führte ebenfalls zu einer deutlichen Verringerung der FXa-Bildung von ca. 60 % 10 min (Abbildung 30A) und ca. 50 % 15 min nach Beginn der Perfusion (Abbildung 30B). Diese Daten zeigen, dass unter physiologisch relevanten Strömungsbedingungen Clks und die DNA topo I das TF-vermittelte prokoagulative Potenzial auf der Oberfläche TNF- $\alpha$ -stimulierter Endothelzellen reduzieren.



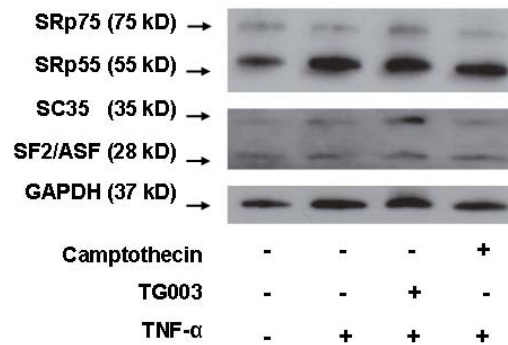
**Abbildung 30.** Die Messung der FXa-Generierung 8 h nach der Stimulation einer HUVEC-Einzelschicht mit TNF- $\alpha$ , 10 min (A) und 15 min (B) nach Beginn der Perfusion.

Es wurden nichtstimulierte Kontrollen, Zellen, die mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  induziert wurden, und Zellen, die vor der Stimulation mit Camptothecin bzw. TG003 vorinkubiert wurden, vergleichend miteinander dargestellt. Angegeben ist die FXa-Bildung ( $\mu$ M) in einem Durchflussvolumen von 100  $\mu$ l. „BN“ ist das zugrunde gelegte Basalniveau der FXa-Bildung. (\*)  $p < 0,05$ ; (#)  $p < 0,01$ ; (§)  $p < 0,0001$ .

#### 4.2.4 Die Auswirkungen der Clk- und DNA topo I-Inhibition auf das Phosphorylierungsmuster der SR-Proteine

Zur Bestimmung des Einflusses der SR-Proteinkinasen auf die Expression und die Phosphorylierung der SR-Proteine SRp75, SRp55, SC35 und SF2/ASF wurden Western Blot-Experimente durchgeführt und die Ergebnisse quantifiziert.

Sowohl unbehandelte als auch TNF- $\alpha$ -induzierte HUVEC exprimieren alle vier oben genannten SR-Proteine (Abbildung 31). Weder die einstündige Vorbehandlung mit den Inhibitoren der Clk-Familie bzw. DNA topo I noch die Stimulation mit TNF- $\alpha$  für 2 min beeinflusste die Expression von SRp75, SRp55, SC35 und SF2/ASF in diesen Zellen (Abbildung 31).



**Abbildung 31.** Die Proteinexpression der SR-Proteine 2 min nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ .

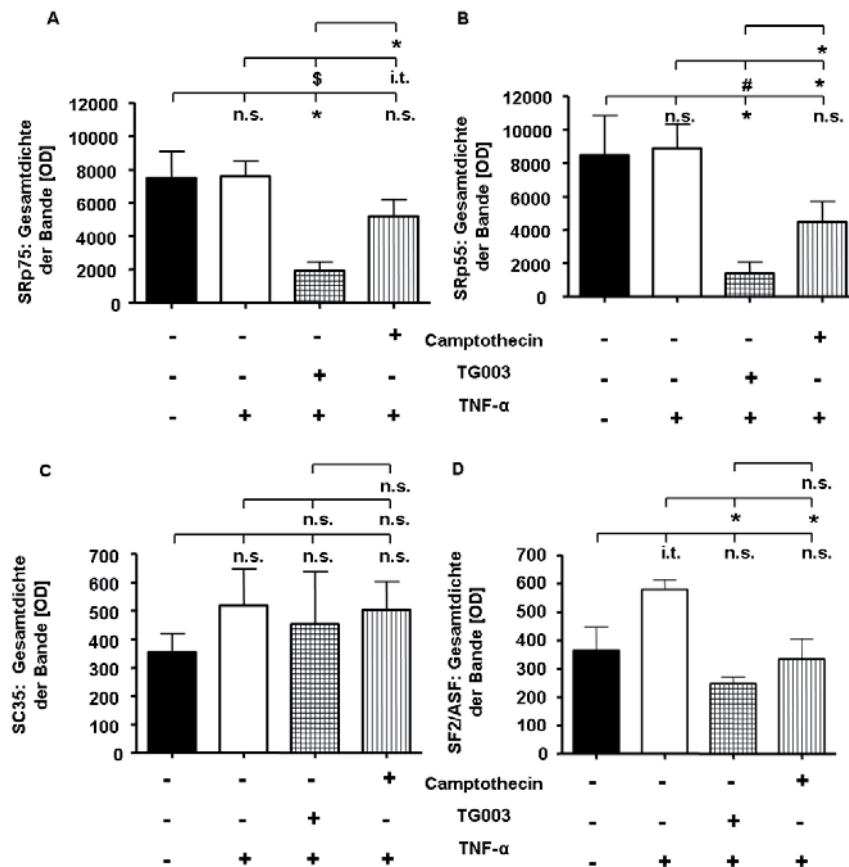
Dargestellt ist die Expression von SRp75, SRp55, SC35 und SF2/ASF in unbehandelten HUVEC, TNF- $\alpha$ -stimulierten Endothelzellen und Zellen, die vor der Stimulation mit Camptothecin bzw. TG003 vorbehandelt wurden. Die Detektion der entsprechenden SR-Proteine erfolgte mit Hilfe von phosphorylierungsunabhängigen monoklonalen Antikörpern. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Mit Hilfe des Antikörpers mAb1H4, welcher gegen die Phosphoepitope der SR-Proteinfamilie gerichtet ist, wurden die Phosphorylierungszustände dieser Faktoren in inhibierten bzw. stimulierten HUVEC untersucht (Abbildung 32).

In ruhenden humanen Endothelzellen wurden phosphorylierte Formen der SR-Proteine SRp75, SRp55, SC35 und SF2/ASF detektiert (Abbildung 32A). Eine zweiminütige Stimulation mit TNF- $\alpha$  veränderte das Phosphorylierungsmuster der SR-Proteine SC35 und SF2/ASF in HUVEC (Abbildung 32A). Die Inhibition der SR-Proteinkinasen beeinflusste das Phosphorylierungsmuster der SR-Proteine SRp75, SRp55 und SF2/ASF 2 min nach der TNF- $\alpha$ -Stimulation (Abbildung 32A). In nichtstimulierten Zellen wurde das Phosphorylierungsmuster dieser Proteine ebenfalls durch die Inhibition der Clk-Familie bzw. der DNA topo I sowohl nach 2 min als auch nach 20 min verändert (Abbildung 32B).



Phosphorylierung von SF2/ASF 2 min nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  (Abbildung 33D).



**Abbildung 33.** Quantifizierung der Untersuchungen zur Phosphorylierung der SR-Proteine.

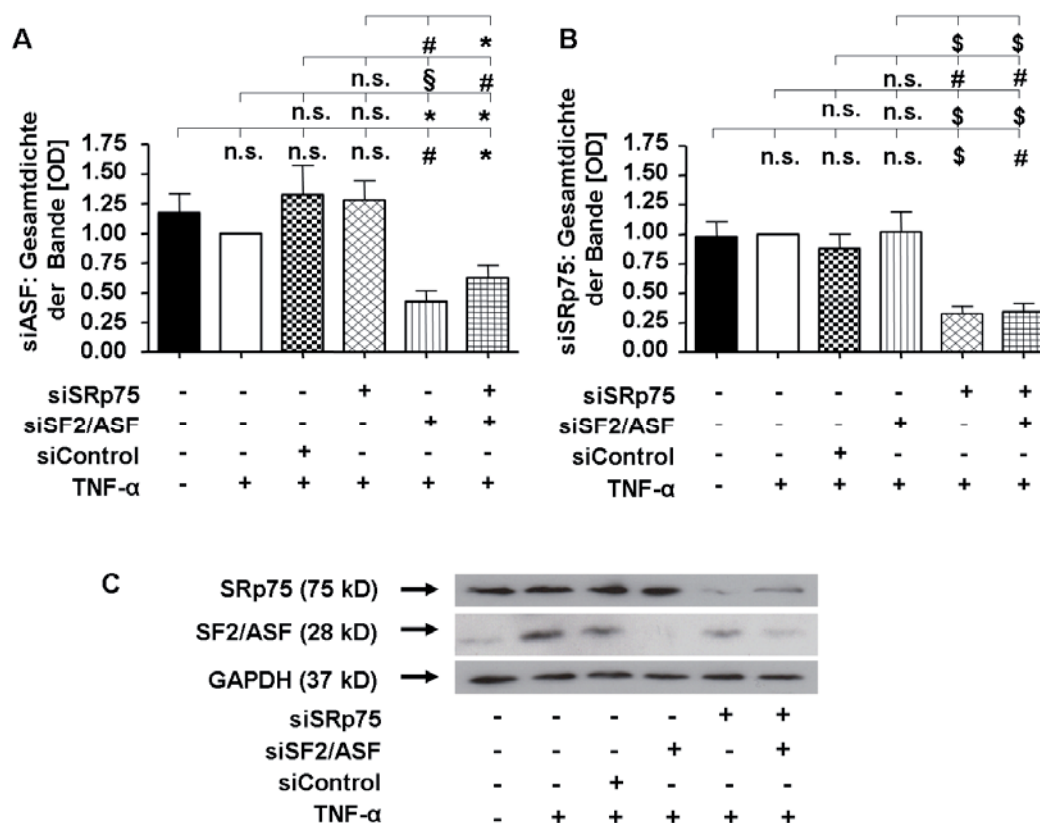
Analysiert wurden die Phosphorylierungsmuster von SRp75, SRp55, SC35 und SF2/ASF, im Vergleich zwischen unbehandelten HUVEC, TNF- $\alpha$ -induzierten Zellen und Endothelzellen, die vor der TNF- $\alpha$ -Stimulation mit Camptothecin bzw. TG003 vorbehandelt wurden. Dargestellt sind die Messungen der Gesamtdichte der Western Blot-Banden als relative optische Dichte (OD). (\*)  $p < 0,05$ ; (#)  $p < 0,01$ ; (\$)  $p < 0,001$ ; (i.t.)  $p < 0,15$  (im Trend); (n.s.) nicht signifikant unterschiedlich.

#### 4.2.5 Die Bedeutung von SR-Proteinen für die Expression und Aktivität der TF-Isoformen

Um die Bedeutung der SR-Proteine bei der Regulation der differentiellen TF-Isoform-Expression zu charakterisieren, wurden exemplarisch die SR-Proteine SRp75 und SF2/ASF mit Hilfe spezifischer siRNAs herunterreguliert („knock-down“). Die Überprüfung Effektivität des „knock-downs“ erfolgte mittels semiquantitativer PCR und Western Blot-Analysen (Abbildung 34).

Die mRNA-Expression von SF2/ASF und SRp75 (Abbildung 34A und B), wie auch die Proteinexpression dieser Faktoren (Abbildung 34C), war 48 h nach der

Transfektion signifikant reduziert. Die Transfektion mit Kontroll-siRNAs beeinflusste die Expression von SRp75 oder SF2/ASF weder auf mRNA- noch auf Proteinebene (Abbildung 34). Die siRNA-vermittelte Hemmung eines der beiden SR-Proteine zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression des jeweils anderen SR-Proteins (Abbildung 34). Im Gegensatz dazu führte der zeitgleiche „knock-down“ beider Faktoren in HUVEC zu einer signifikanten Expressionsreduktion beider SR-Proteine. Aus diesen Daten geht hervor, dass die Reduktion von SRp75 und SF2/ASF mit Hilfe entsprechender siRNAs spezifisch für das jeweilige Zielgen ist.

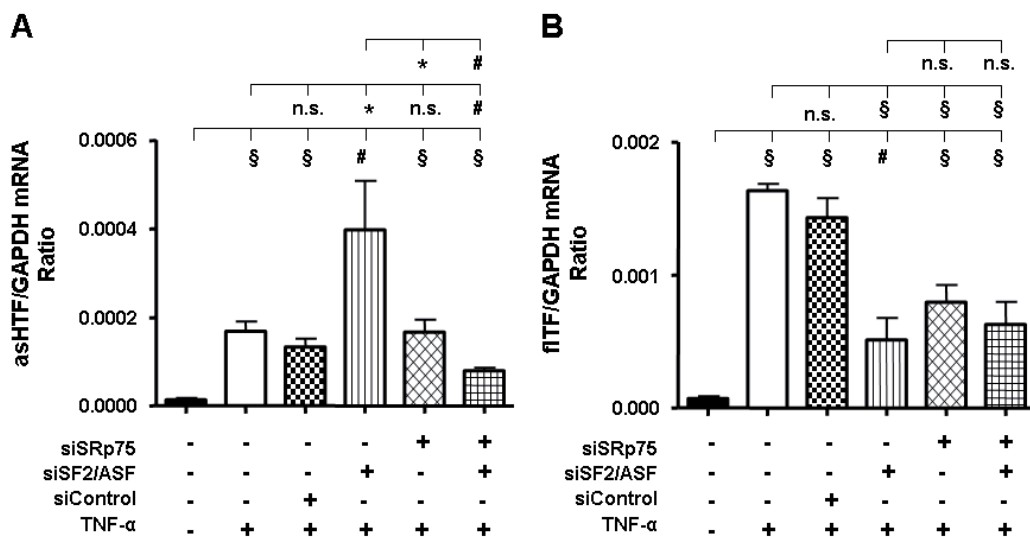


**Abbildung 34.** Bestimmung der Transfektionseffizienz spezifischer siRNAs gegen SRp75 und SF2/ASF.

Gestestet wurde die mRNA-Expression von SF2/ASF (A) und SRp75 (B) 1 h nach der TNF- $\alpha$ -Stimulation und 48 h nach der Transfektion. (C) Die Analyse der Proteinexpression beider SR-Proteine in HUVEC erfolgte 5 h nach der TNF- $\alpha$ -stimulation und 48 h nach der Transfektion. Verglichen werden unbehandelte Kontrollen, TNF- $\alpha$ -stimulierte HUVEC und Zellen, die vor der Stimulation mit Kontroll-siRNAs (siControl), siRNAs gegen SRp75 (siSRp75) oder siRNAs gegen SF2/ASF (siSF2/ASF) transfiziert wurden. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die mRNA-Expression wurde quantifiziert und als relative optische Dichte (OD) angegeben. (\*)  $p < 0,05$ ; (#)  $p < 0,01$ ; (\$)  $p < 0,001$ ; (§)  $p < 0,0001$ ; (n.s.) nicht signifikant unterschiedlich.

Der Einfluss der siRNA-vermittelten Inhibition von SF2/ASF und SRp75 auf die mRNA-Expression der TF-Isoformen wurde mittels Real-Time-PCR 1 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  bestimmt.

Eine einstündige Stimulation der HUVEC mit TNF- $\alpha$  führte, wie schon zuvor gezeigt, zu einer signifikanten Induktion der mRNA-Expression beider TF-Isoformen (Abbildung 35). Die Transfektion der Endothelzellen mit Kontroll-siRNAs hatte keinen Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -induzierte Expressionserhöhung der TF-Isoformen (Abbildung 35). Im Gegensatz dazu veränderte die Transfektion dieser Zellen mit spezifischen siRNAs gegen die SR-Proteine SRp75 bzw. SF2/ASF das Expressionsmuster der TF-Isoformen in unterschiedlicher Weise. Die Transfektion mit siRNAs gegen SF2/ASF führte zu einer Erhöhung der asHTF-Expression nach einer einstündigen Stimulation der HUVEC mit TNF- $\alpha$  (Abbildung 35A). Die Expression von fITF wurde hingegen signifikant verringert unter diesen Bedingungen (Abbildung 35B). Der „knock-down“ von SRp75 allein beeinflusste die Expression der löslichen TF-Isoform nicht (Abbildung 35A). Im Gegensatz zu asHTF wurde die Expression von fITF in den TNF- $\alpha$ -stimulierten Endothelzellen deutlich reduziert (Abbildung 35B). Die simultane Hemmung beider SR-Proteine führte zu einer signifikanten Reduktion der mRNA-Expression von asHTF sowie von fITF in den proinflammatorisch induzierten Zellen (Abbildung 35A und B).

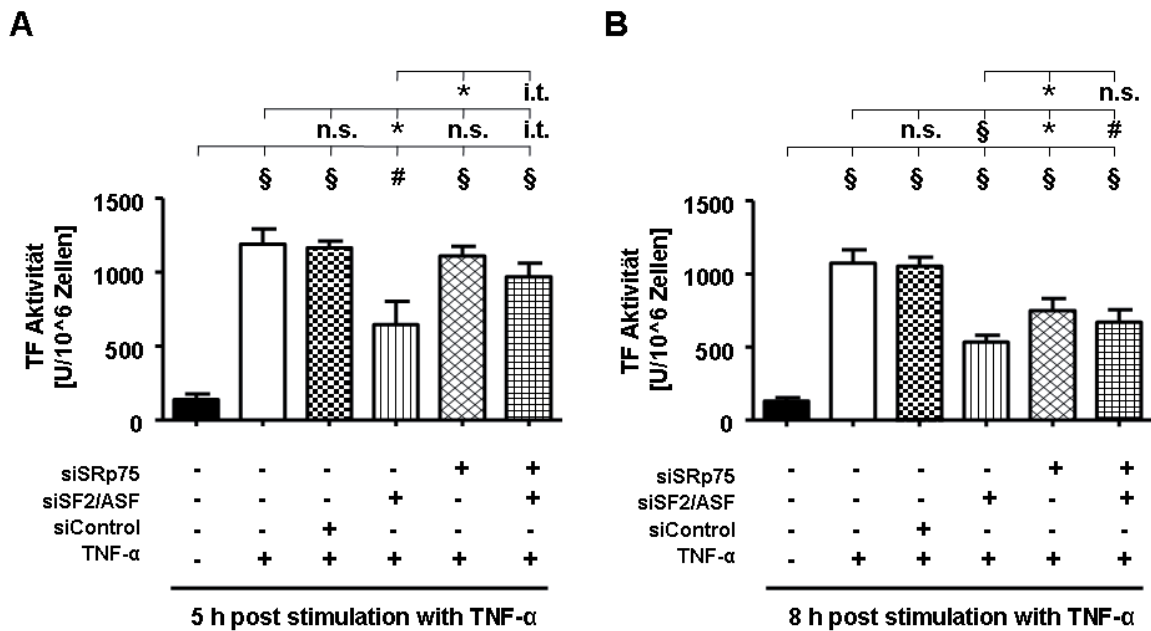


**Abbildung 35.** Die mRNA-Expression von asHTF (A) und fITF(B) in HUVEC 48 h nach der Transfektion und 1 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$ .

Vergleichend dargestellt sind unbehandelte Kontrollen, Zellen, die mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurden, und Zellen, die 48 h vor der Stimulation mit Kontroll-siRNAs (siControl), siRNAs gegen SRp75 (siSRp75) oder siRNAs gegen SF2/ASF (siSF2/ASF) transfiziert wurden. (\*) p<0,05; (#) p<0,01; § p<0,0001; (n.s.) nicht signifikant unterschiedlich.

Um den Einfluss der siRNA-vermittelten Inhibition von SF2/ASF und SRp75 auf die thrombogene Aktivität in Endothelzellen abzuschätzen, wurde die TF-Aktivität in HUVEC 48 h nach der siRNA-Transfektion und 5 h bzw. 8 h nach der Induktion mit TNF- $\alpha$  bestimmt.

Im Vergleich zu den unbehandelten HUVEC führte die Stimulation der humanen Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  zu einer deutlichen Steigerung der TF-Aktivität sowohl nach 5 h (Abbildung 36A) als auch nach 8 h (Abbildung 36B). Die Transfektion der Zellen mit Kontroll-siRNAs beeinflusste die TNF- $\alpha$ -induzierte Erhöhung der TF-Aktivität nicht (Abbildung 36). Die spezifische Inhibition von SF2/ASF verringerte 5 h nach der TNF- $\alpha$ -Stimulation die endotheliale TF-Aktivität signifikant (Abbildung 36A). Die Hemmung von SRp75 allein beeinflusste die TF-Aktivität unter diesen Bedingungen nicht (Abbildung 36A). Die simultane Inhibition beider SR-Proteine führte hingegen zu einer tendenziellen Reduktion der thrombogenen Aktivität in HUVEC gegenüber den TNF- $\alpha$ -stimulierten Kontrollen (Abbildung 36A). 8 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  führte sowohl die siRNA-vermittelte Hemmung von SRp75 oder SF2/ASF allein als auch die gleichzeitige Inhibition beider Faktoren zu einer signifikanten Reduktion der zellulären TF-Aktivität in HUVEC.



**Abbildung 36.** Darstellung der zellulären TF-Aktivität von HUVEC 48 h nach der Transfektion und 5 h (A) bzw. 8 h (B) nach Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$ .

Es sind unbehandelte Kontrollen, TNF- $\alpha$ -stimulierte HUVEC und Endothelzellen, die 48 h vor der TNF- $\alpha$ -Stimulation mit Kontroll-siRNAs (siControl), siRNAs gegen SRp75 (siSRp75) oder siRNAs gegen SF2/ASF (siSF2/ASF) transfiziert wurden dargestellt. Die TF-Aktivität wird in U (Units) je 10<sup>6</sup> Zellen angegeben. (\*) p<0,05; (#) p<0,01; (§) p<0,0001; (i.t.) p<0,15 (im Trend); (n.s.) nicht signifikant unterschiedlich.

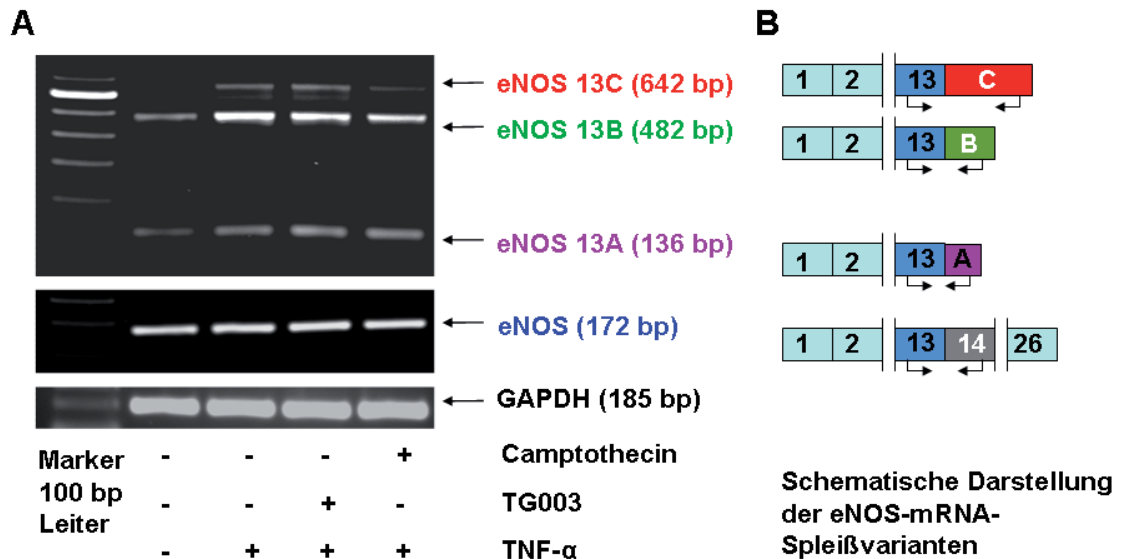
### 4.3 Die Bedeutung und Kontrolle des alternativen Spleißens von Exon 13 der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase

Die im folgenden Abschnitt dargestellten Ergebnisse befassen sich mit dem Einfluss der Clk-Familie und der DNA topo I auf die Regulation des alternativen Spleißens von Exon 13 der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) und der daraus resultierenden Beeinflussung der eNOS-Aktivität unter proinflammatorischen Bedingungen.

#### 4.3.1 Regulationsmechanismen der differentiellen eNOS-Isoform-Expression

Unbehandelte HUVEC exprimierten konstitutiv sowohl eNOS als auch die alternativ gespleißten Isoformen eNOS 13A, B und C (Abbildung 37A). Die einstündige Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  führte zu einer deutlichen Erhöhung der Expression der alternativ gespleißten eNOS-Isoformen, nicht aber von eNOS selbst (Abbildung 37A). Die Vorinkubation der Endothelzellen mit dem Inhibitor der Clk-Familie

beeinflusste das Expressionsmuster der eNOS-Isoformen unter diesen Bedingungen nicht (Abbildung 37A). Im Gegensatz dazu führte die Inhibition der DNA topo I zu einer Reduktion der TNF- $\alpha$ -induzierten Expressionserhöhung von eNOS 13A, B und C zu diesem Zeitpunkt (Abbildung 37A). Die Lage der eNOS-Isoform-spezifischen Primer ist der Abbildung 37B zu entnehmen.

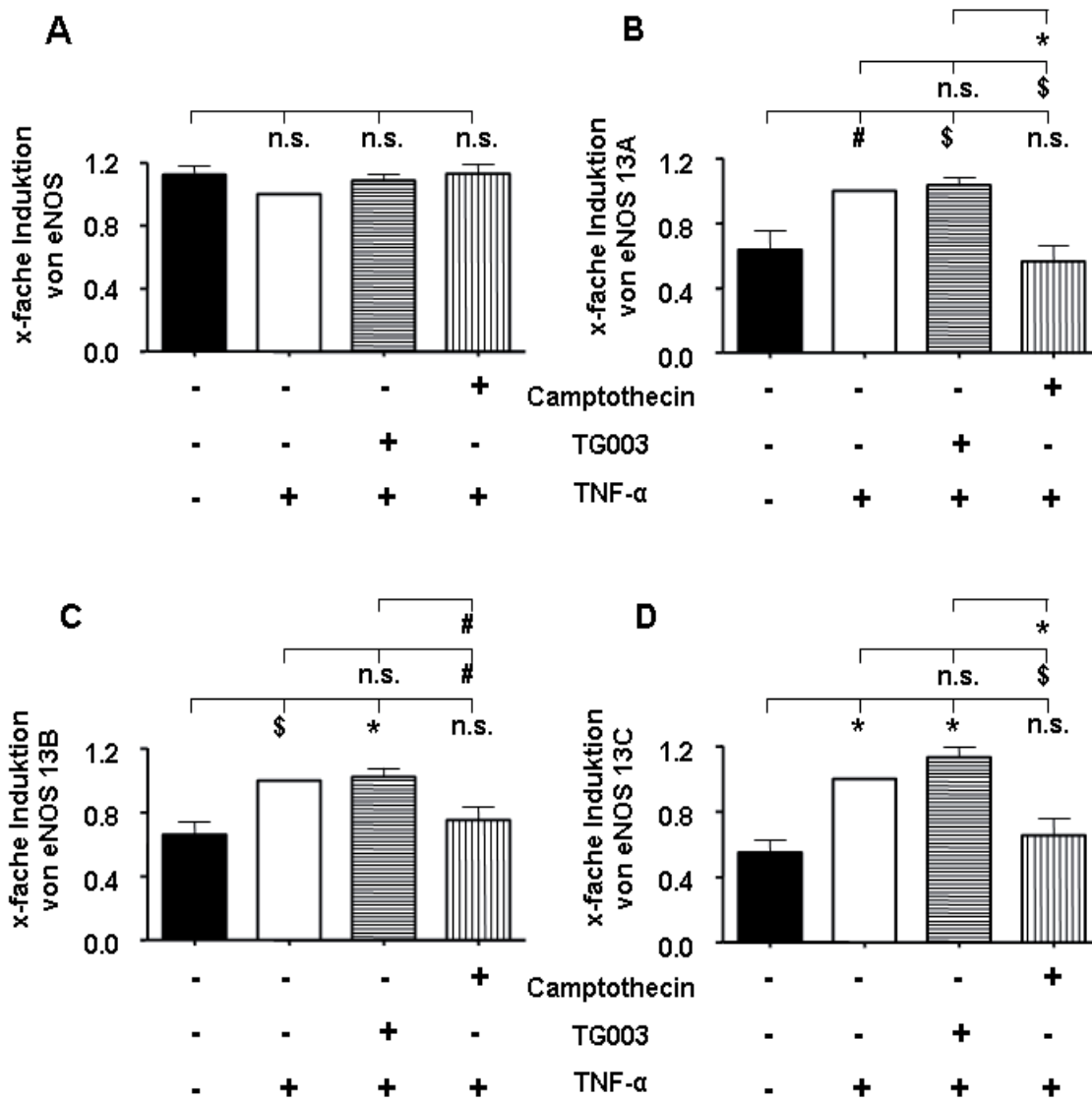


**Abbildung 37.** Die mRNA-Expression von eNOS und der alternativ gespleißten Isoformen eNOS 13A, B und C in HUVEC.

Die Zellen wurden für 1 h mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  stimuliert. (A) Dargestellt sind unbehandelte Kontrollen, TNF- $\alpha$ -induzierte Zellen und HUVEC, welche vor der Stimulation mit 100 nM Camptothecin (DNA topo I-Inhibitor) bzw. 10  $\mu$ M TG003 (Clk-Inhibitor) vorbehandelt wurden. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Der verwendete Marker war eine 100-Basenpaar (bp)-Leiter. Die PCR-Produkte sind eNOS (172 bp), eNOS 13A (136 bp), eNOS 13B (482 bp), eNOS 13C (642 bp) und GAPDH (185 bp). (B) Schematische Darstellung der eNOS-mRNA-Spleißvarianten mit der Position der verwendeten Primer (Pfeile). Die Exons sind mit 1-26 nummeriert, und der intronische Abschnitt hinter Exon 13 ist mit A, B und C gekennzeichnet.

Die densitometrische Auswertung der PCR-Versuche zeigte, dass sowohl die einstündige Stimulation mit TNF- $\alpha$  als auch die Vorbehandlung der humanen Endothelzellen mit den Inhibitoren der jeweiligen SR-Proteinkinasen die Expression von eNOS nicht beeinflussten (Abbildung 38A). Im Gegensatz zu eNOS wurde die Expression der drei Isoformen eNOS13A, B und C durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$  signifikant erhöht gegenüber den unbehandelten HUVEC (Abbildung 38B, C, D). Die pharmakologische Inhibition der Clk-Familie besaß keinen Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -induzierte Erhöhung der eNOS-Isoform-Expression (Abbildung 38B, C, D). Die Inhibition der DNA topo I hingegen führte zu einer signifikanten Reduktion der

Expression von eNOS 13A, B und C nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  (Abbildung 38B, C, D).

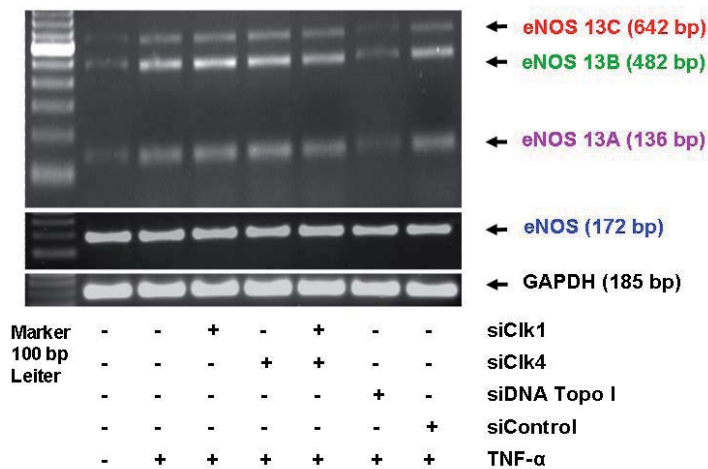


**Abbildung 38.** Quantifizierung der mRNA-Expression der eNOS-mRNA-Spleißvarianten in HUVEC.

Untersucht wurde die mRNA-Expression von eNOS, eNOS13A, eNOS13B und eNOS13C und als x-fache Induktion der Isoform-Expression 1 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  dargestellt. Nichtstimulierte Zellen, TNF- $\alpha$ -stimulierte Zellen, und HUVEC, die vor der Stimulation mit Camptothecin bzw. TG003 vorbehandelt wurden, wurden miteinander verglichen. (\*)  $p < 0,05$ ; (#)  $p < 0,01$ ; (\$)  $p < 0,001$ ; (n.s.) nicht signifikant unterschiedlich.

Um die Bedeutung der beiden SR-Proteinkinasen bei der differentiellen eNOS-Isoform-Expression zu untermauern, wurden exemplarisch die Clk1 und die Clk4 sowie die DNA topo I mit Hilfe spezifischer siRNAs herunterreguliert (Abbildung 39).

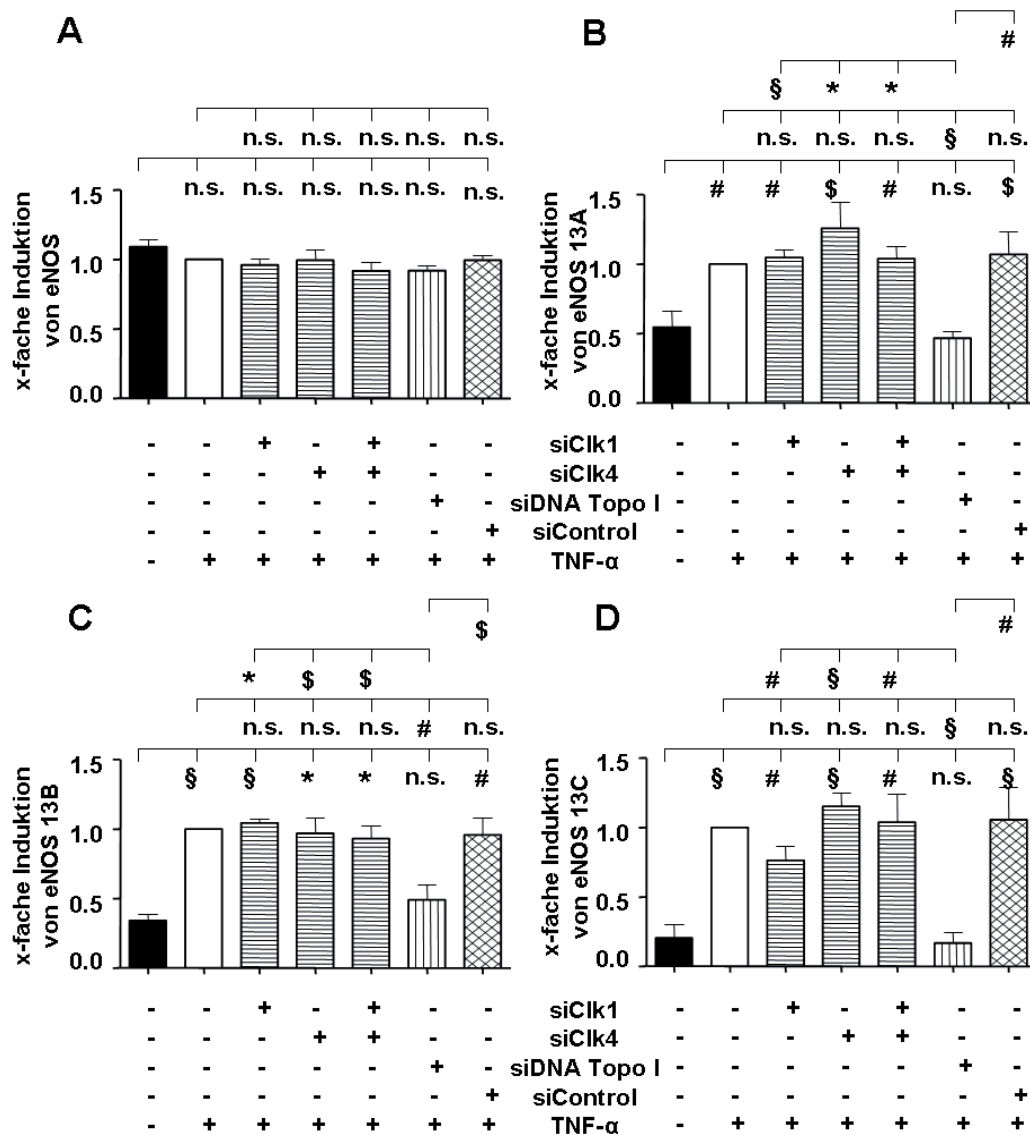
Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten aus der pharmakologischen Inhibition der SR-Proteinkinasen in HUVEC überein (Abbildung 37).



**Abbildung 39.** Darstellung der mRNA-Expression von eNOS und der alternativ gespleißten Isoformen eNOS 13A, B und C in HUVEC.

Die Expression wurde 48 h nach der Transfektion und 1 h nach der Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  untersucht. Verglichen wurden unbehandelte Kontrollen, TNF- $\alpha$ -stimulierte HUVEC und Endothelzellen, welche mit Kontroll-siRNAs (siControl) bzw. spezifischen siRNAs gegen Clk1, Clk4, Clk1 und 4 und DNA topo I transfiziert wurden. Die Amplikons sind eNOS (172 bp), eNOS 13A (136 bp), eNOS 13B (482 bp), eNOS 13C (642 bp) und GAPDH (185 bp). GAPDH wurde als Ladekontrolle verwendet. Als Marker diente eine 100-bp-Leiter.

Die densitometrische Analyse der PCR-Versuche ergab, dass ruhende HUVEC sowohl eNOS als auch die Isoformen eNOS 13A, B und C konstitutiv exprimieren (Abbildung 40). Unter proinflammatorischen Bedingungen wurde die Expression von eNOS in HUVEC nicht beeinflusst (Abbildung 40A). Die Stimulation der HUVEC mit TNF- $\alpha$  für 1 h führte zu einer signifikanten Erhöhung der Expression der drei alternativ gespleißten eNOS-Isoformen (Abbildung 40B, C, D). Im Vergleich zu den TNF- $\alpha$ -stimulierten Kontrollen beeinflusste die siRNA-vermittelte Inhibition der Clks 1 und 4 allein oder in Kombination die mRNA-Expression von eNOS 13A, B und C nicht (Abbildung 40B, C, D). Die spezifische Hemmung der DNA topo I hingegen hob die TNF- $\alpha$ -induzierte Expressionserhöhung von eNOS 13A, B und C vollständig auf (Abbildung 40B, C, D).



**Abbildung 40.** Die quantitative Analyse der mRNA-Expression der eNOS-Spleißvarianten in HUVEC.

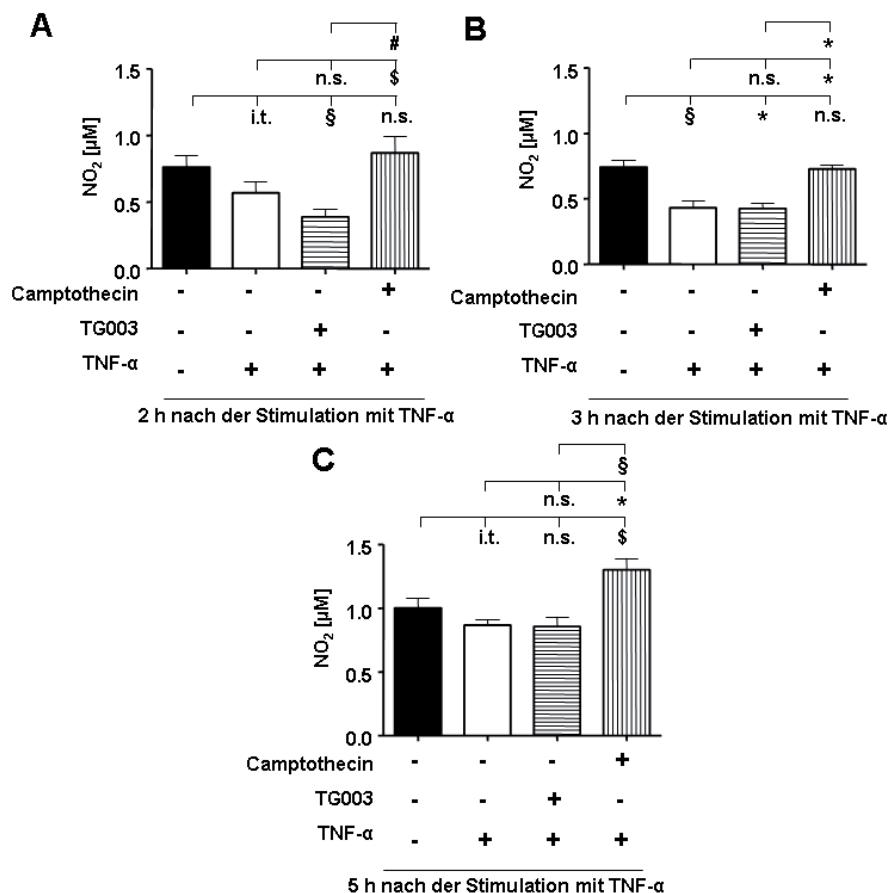
Untersucht wurde die mRNA-Expression von eNOS, eNOS13A, eNOS13B und eNOS13C. Die Ergebnisse wurden als x-fache Induktion der Isoform-Expression 48 h nach der Transfektion und 1 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  dargestellt. Untersucht wurden unbehandelte Kontrollen, TNF- $\alpha$ -induzierte Endothelzellen und HUVEC, welche mit Kontroll-siRNAs (siControl) bzw. mit spezifischen siRNAs gegen Clk1, Clk4, Clk1 und 4 und DNA topo I transfiziert wurden. (\*) p<0,05; (#) p<0,01; (\$) p<0,001; (§) p<0,0001; (n.s.) nicht signifikant unterschiedlich.

#### 4.3.2 Die Bedeutung der SR-Proteinkinasen für die eNOS-Aktivität in HUVEC

Die eNOS-Aktivität kann über die Stickstoffmonoxid (NO)-Synthese abgeleitet werden. Daher wurde die Konzentration von NO sowohl im Zellüberstand als auch in den Zellen bestimmt, um Rückschlüsse auf die eNOS-Aktivität ziehen zu können.

### 4.3.2.1 Die Bestimmung der extrazellulären NO<sub>2</sub>-Konzentration im Zellüberstand

Die Menge an NO im Zellüberstand von HUVEC wurde mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt. Die Stimulation der HUVEC mit TNF- $\alpha$  führte sowohl nach 2 h als auch nach 3 h zu einer Reduktion der NO<sub>2</sub>-Konzentration im Zellüberstand gegenüber den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 41A, B). Die pharmakologische Inhibition der Clk-Familie beeinflusste diesen TNF- $\alpha$ -induzierten Effekt in den Endothelzellen nicht (Abbildung 41A, B). Im Gegensatz dazu verhinderte die Vorbehandlung der HUVEC mit dem DNA topo I-Inhibitor die TNF- $\alpha$ -induzierte Verringerung des NO<sub>2</sub>-Gehaltes sowohl 2 h als auch 3 h nach der Stimulation (Abbildung 41A, B). 5 h nach der TNF- $\alpha$ -Stimulation näherte sich der NO<sub>2</sub>-Gehalt im Zellüberstand der TNF- $\alpha$ -stimulierten Kontrollen sowie der Clk-inhibierten HUVEC wieder dem Niveau der unbehandelten Kontrollen an (Abbildung 41C). Die Inhibition der DNA topo I führte 5 h nach der Stimulation der Endothelzellen sogar zu einer signifikanten Erhöhung der NO<sub>2</sub>-Konzentration im Zellüberstand (Abbildung 41C).



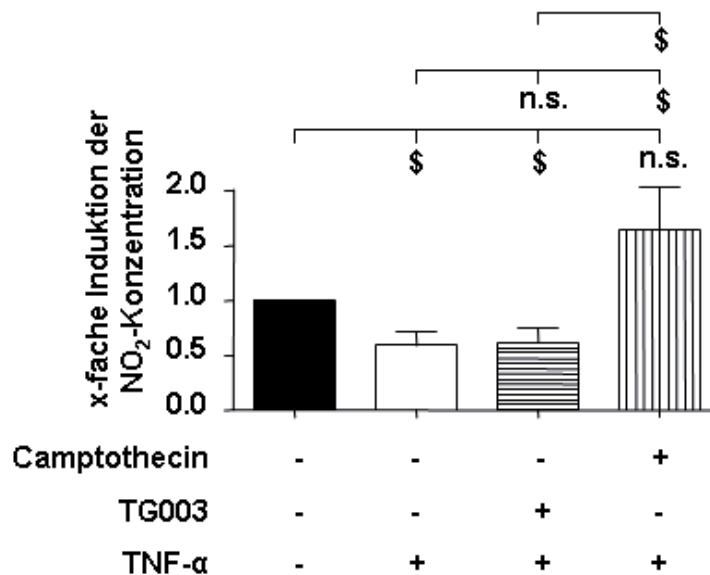
**Abbildung 41.** Die Messung der NO-Konzentration im Zellüberstand von HUVEC 2 h (A), 3 h (B) und 5 h (C) nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$ .

Verglichen werden nichtstimulierte Kontrollen, HUVEC, die mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurden, und Zellen, die vor der Stimulation mit Camptothecin bzw. TG003 vorinkubiert wurden. Dargestellt wurde die Konzentration an NO<sub>2</sub> in  $\mu$ M. (\*) p<0,05; (#) p<0,01; (\$) p<0,001; (§) p<0,0001; (i.t.) p<0,15 (im Trend); (n.s.) nicht signifikant unterschiedlich.

#### 4.3.2.2 Der Einfluss der Inhibition der Clk-Familie und der DNA topo I auf die intrazelluläre NO-Konzentration

In weiterführenden Versuchen wurde der Einfluss der SR-Proteinkinasen auf den intrazellulären NO-Gehalt über die Konzentration an NO<sub>2</sub> untersucht. Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Methoden wurde die Umwandlung von DAF-2DA zu dem fluoreszierenden Produkt DAF-2 in Gegenwart von NO<sub>2</sub> bestimmt.

Die dreistündige Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  verringerte den NO<sub>2</sub>-Gehalt innerhalb der Zellen signifikant gegenüber den unbehandelten HUVEC (Abbildung 42). Die Hemmung der Clk-Familie besaß keinen Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -induzierte Verringerung der intrazellulären NO<sub>2</sub>-Konzentration zu diesem Zeitpunkt (Abbildung 42). Im Gegensatz dazu hob die Vorinkubation der HUVEC mit dem Inhibitor der DNA topo I diesen TNF- $\alpha$ -induzierten Effekt vollständig auf (Abbildung 42).



**Abbildung 42.** Die Bestimmung der intrazellulären NO<sub>2</sub>-Konzentration in HUVEC 3 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$ .

Vergleichend dargestellt sind unbehandelte Zellen, TNF- $\alpha$ -induzierte HUVEC und Endothelzellen, die mit Camptothecin bzw. TG003 vorbehandelt wurden. Angegeben ist die x-fache Induktion der Konzentration an NO<sub>2</sub>. (\$) p<0,001; (n.s.) nicht signifikant unterschiedlich.

## 5. Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die SR-Proteinkinasen DNA topo I und die Clk-Familie eine wichtige Rolle bei der Regulation der differentiellen TF-Isoform-Expression spielen. In diesem Zusammenhang besitzen sie auch großen Einfluss auf die Modifikation der thrombogenen TF-Aktivität proinflammatorisch stimulierter Endothelzellen sowohl unter statischen als auch dynamischen Bedingungen. Des Weiteren ist die DNA topo I, nicht jedoch die Clk-Familie für die Regulation der Isoform-Expression und der Funktion von eNOS unter proinflammatorischen Bedingungen von großer Bedeutung. Ferner zeigte sich in Transfektionsversuchen, dass verschiedene SR-Proteine, deren Phosphorylierungszustand über die oben genannten Kinasen reguliert wird, ebenfalls das alternative Spleißen und damit die prokoagulatorische Aktivität von TF in humanen Endothelzellen beeinflussen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Regulation alternativer Spleißprozesse von TF sowie eNOS bedeutsam für die Aufrechterhaltung der endothelialen Homöostase und Thrombogenität des Blutes sind.

### 5.1 Das endotheliale Expressionsmuster der Clk-Familie und DNA topo I unter normalen sowie proinflammatorischen Bedingungen

Alternatives Spleißen von Prä-mRNA ist ein essenzieller Mechanismus, welcher der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression, der Proteindiversität sowie der funktionellen Vielfalt des Proteoms in eukaryotischen Zellen dient (Black et al., 2003; Stamm et al., 2005). Die SR-Proteinkinasen DNA topo I und die Mitglieder der Clk-Familie regulieren alternative Spleißprozesse über die Phosphorylierung von SR-Proteinen (Soret et al., 2003; Muraki et al., 2004; Stamm et al., 2008). Innerhalb der Clk-Familie kommt es durch alternative Spleißprozesse zur Ausbildung zweier verschiedener Isoformen aller vier Mitglieder, die sich sowohl in ihrer Struktur als auch ihrer Aktivität unterscheiden (Duncan et al., 1995; Duncan et al., 1998). Durch diese Spleißprozesse entstehen verkürzte („*truncated*“) Clk-Isoformen, die keine Kinasefunktion aufweisen, und funktionelle („*full length*“) Isoformen, welche SR-Proteine phosphorylieren und so alternative Spleißprozesse regulieren können. Für

die DNA topo I sind derartige Isoformen, bzw. deren Expression unter natürlichen Bedingungen nicht bekannt (Soret et al., 2003; Matsubara et al., 2003). Die Bildung dieser zuvor genannten SR-Proteinkinasen bzw. deren Isoformen in humanen Endothelzellen wurde bisher nicht untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmalig die Charakterisierung des Expressionsmusters der Clk-Familie bzw. der DNA topo I in humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen.

Es zeigte sich in den durchgeführten Untersuchungen, dass HUVEC auf mRNA-Ebene alle vier „full length“-Isoformen exprimierten. Ferner bildeten diese Endothelzellen die alternativ gespleißten verkürzten Isoformen von Clk1, 2 und 4. Die funktionslose mRNA-Spleißvariante von Clk3 konnte aber nicht nachgewiesen werden. Die Stimulation der Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  führte zu einer Erhöhung der „full length“-Isoform-Expression der Clks und zu einer Expressionsreduktion der alternativ gespleißten Clk-Isoformen. Auch auf Translationsebene ergab sich eine induktive Wirkung der TNF- $\alpha$ -Stimulation auf die Expression der „full length“-Clks. Duncan et al. berichteten, dass Clk1 Heterodimere mit seiner nicht-aktiven alternativ gespleißten Isoform bildet und dass diese Heterodimerisierung an der Regulation der Clk1-Aktivität beteiligt ist (Duncan et al., 1995). Die TNF- $\alpha$ -induzierten Veränderungen des Spleißmusters der aktiven „full length“-Clks und ihrer inaktiven alternativ gespleißten Isoformen stellt möglicherweise einen zusätzlichen regulatorischen Mechanismus zur Steuerung der Clk-Aktivität in Endothelzellen unter normalen sowie proinflammatorischen Bedingungen dar. Diese Hypothese wird derzeit in weiterführenden Experimenten geprüft.

## **5.2 Der Einfluss des alternativen Spleißens von TF auf die Thrombogenität humaner Endothelzellen**

TF ist neben seiner Funktion als primärer Initiator der Blutgerinnungskaskade auch an weiteren wichtigen Prozessen unter normalen sowie pathophysiologischen Bedingungen beteiligt (Szotowski et al., 2006). So spielt TF unter anderem eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, der Blutgefäßentwicklung, der intrazellulären Signaltransduktion, der Zelladhäsion und Transmigration, der embryonalen sowie tumorassoziierten Angiogenese, der Tumormetastasierung und der Inflammation (Mackman et al., 2004; Eilertsen et al., 2004). TF ist ein bedeutender Regulator der Gefäßwandhomöostase und der Thrombogenität des Blutes unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen, wie bei der Bildung von Tumoren, der

Atherosklerose, der Sepsis und anderen entzündlichen Krankheiten (Szotowski et al., 2006; Mackman et al., 2004).

Das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  stellt einen starken Induktor der TF-Expression dar (Szotowski et al., 2005). Die Transkriptionsfaktoren Aktivator-Protein 1 (AP-1) und nukleärer Transkriptionsfaktor kappt B (NF $\kappa$ B) gelten als essenziell für die TNF- $\alpha$ -induzierte Transkription des TF-Gens (Bierhaus et al., 1995). Posttranskriptionell kommt es über alternatives Spleißen der TF-prä-mRNA zur Bildung zweier TF-Isoformen auf Proteinebene, der membrangebundenen flTF und der löslichen alternativ gespleißten Isoform asHTF (Bogdanov et al., 2003). Die beiden Isoformen unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihren Funktionen (Szotowski et al., 2006; Bogdanov et al., 2003). In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass flTF und weniger asHTF entscheidend für die prothrombogene TF-Aktivität ist. AsHTF induziert hierbei in einem deutlich geringeren Ausmaß die Entstehung von FXa (Bogdanov et al., 2003; Szotowski et al., 2005). Die weitere biologische Bedeutung der löslichen TF-Isoform ist unbekannt. Erste Arbeiten weisen darauf hin, dass asHTF eine Bedeutung für die tumorassoziierte Angiogenese, Zellmigration und Zelldifferenzierung besitzt (Hobbs et al., 2007; He et al., 2008).

Wie schon dargestellt, ist es bekannt, dass TNF- $\alpha$  die Expression beider TF-Isoformen in Endothelzellen stimuliert (Stähli et al., 2007; Szotowski et al., 2005). Bislang liegen allerdings keine Erkenntnisse über die Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation der differentiellen TF-Isoform-Expression in humanen Endothelzellen unter proinflammatorischen Bedingungen vor. In dieser Studie wurde daher der Einfluss der Regulation alternativer Spleißprozesse auf die Isoform-Expression von TF und die Bedeutung dieser Prozesse für die Thrombogenität TNF- $\alpha$ -stimulierter humaner Nabelschnurvenen-Endothelzellen untersucht.

## **5.2.1 Die Regulation des alternativen Spleißens der TF-prä-mRNA in TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC**

### **5.2.1.1 Die Bedeutung der Clk-Familie und der DNA topo I für die mRNA-Expression der TF-Isoformen**

Die Regulation alternativer Spleißprozesse über die Phosphorylierung von SR-Proteinen durch SR-Proteinkinasen, wie den Mitgliedern der Clk-Familie oder der

DNA topo I, sind von fundamentaler Bedeutung für die posttranskriptionelle Kontrolle der Genexpression und der funktionellen Diversität des Proteoms (Stamm et al., 2005; Soret et al., 2003; Muraki et al., 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl die Clk-Familie als auch die DNA topo I die differenzielle Expression der TF-mRNA-Isoformen in TNF- $\alpha$ -stimulierten Endothelzellen in unterschiedlicher Form beeinflussen. Eine Hemmung der Clks führte zu einer signifikanten Verringerung der mRNA-Expression von asHTF sowie von flTF. Im Gegensatz dazu bewirkte die DNA topo I-Inhibition einerseits eine Induktion der asHTF-mRNA und andererseits eine Reduktion von flTF, die allerdings deutlich intensiver war als die nach Hemmung der Clk-Familie. Diese Beobachtungen wurden exemplarisch mit Hilfe der siRNA-vermittelten Inhibition von Clk1 und 4 bzw. der DNA topo I bestätigt. Dabei war zu beobachten, dass der „*knock-down*“ von Clk1 bzw. Clk4 allein nur einen geringen, aber nicht signifikanten Einfluss auf die flTF-Expression in TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC besaß, während die Inhibition beider Clks eine deutliche Reduktion bewirkte. Dieser additive Effekt deutet auf eine redundante Funktion der Mitglieder der Clk-Familie bei der Regulation des alternativen TF-Spleißens hin. In Arbeiten anderer Arbeitsgruppen wurde dargestellt, dass alle vier Mitglieder der Clk-Familie ähnliche Konsensussequenzen bevorzugen (Nikolakaki et al., 2002). Sowohl Clk2 als auch Clk3 sind in der Lage, die subnukleäre Verteilung von SR-Proteinen zu verändern und das alternative Spleißen adenoviraler E1A-prä-mRNA gleichsinnig zu beeinflussen (Duncan et al., 1998). Diese Beobachtungen lassen, wie die in dieser Arbeit vorgestellten Daten, ebenfalls auf redundante Funktionen innerhalb dieser Kinase-Familie schließen.

Aus den zuvor erläuterten Versuchen zur pharmakologischen Inhibition der beiden SR-Proteinkinasen geht hervor, dass die Inhibition der Clk-Familie, nicht aber der DNA topo I, mit der Bildung einer weiteren nichtkodierenden TF-mRNA-Spleißvariante, nämlich TF-A in TNF- $\alpha$ -stimulierten humanen Endothelzellen, verbunden war. Alternative Spleißprozesse führen dazu, dass ein Teil von Intron 1 nicht aus der TF-prä-mRNA zwischen dem Exon 1/Exon 2-Übergang entfernt wird. Diese Vorgänge resultieren in der Expression der reifen TF-A-mRNA. Diese Spleißvariante wurde zuvor ausschließlich in verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen (Chand et al., 2006). Ihre biologische Funktion ist allerdings unbekannt. Möglicherweise könnte die Bildung von TF-A eine Form der zellulären Regulation der TF-Synthese über kompetitive Einflüsse dieser mRNA-Spleißvariante

darstellen. Dies wurde beispielsweise für die Regulation der mRNA-Expression des mitochondrialen Proteins „*Uncoupling Protein-3*“ (UCP3) im menschlichen Skelettmuskel gezeigt (Millet et al., 1998).

#### **5.2.1.2 Die Steuerung des Phosphorylierungsmusters der SR-Proteine durch die Clks und die DNA topo I**

Die regulatorische Funktion von sowohl Clks als auch der DNA topo I wird über die Phosphorylierung und damit die Aktivität von SR-Proteinen kontrolliert (Prasad et al., 1999; Rossi et al., 1996; Stamm et al., 2008). Daher wurde im Zusammenhang mit der differentiellen TF-Isoform-Expression auch der Einfluss der Clk- bzw. DNA topo I-Inhibition auf die Phosphorylierung der SR-Proteine untersucht. Die Inhibition der SR-Proteinkinasen führte zu einer Modifizierung des Phosphorylierungsmusters der SR-Proteine. Die Expression dieser Proteine wurde dadurch aber nicht verändert. Die Inhibition der Clk-Familie verringerte die Phosphorylierung von SRp75, SRp55 und SF2/ASF. Die DNA topo I-Inhibition hingegen reduzierte nur die Phosphorylierung von SRp55 und SF2/ASF. Diese Daten stimmen mit den Beobachtungen anderer Gruppen überein, die bestätigen, dass beide Kinasen die Phosphorylierung der oben genannten SR-Proteine modifizieren (Rossi et al., 1996; Soret et al., 2003; Nikolakaki et al., 2002; Nowak et al., 2008).

Wie schon zuvor erläutert, wird die Aktivität, Lokalisierung und RNA-Bindungs-Affinität über die reversible Phosphorylierung von SR-Proteinen determiniert (Bourgeois et al., 2004; Stamm et al., 2008). Die Wahl des Spleißortes wird durch bestimmte regulatorische Sequenzen („*cis-acting*“-Elemente), wie exonische Spleißverstärker („*exonic splice Enhancer*“, ESE), bestimmt (Soret et al., 2003). Die richtige Erkennung solcher regulatorischer Sequenzen bewirkt Veränderungen sowohl der Struktur als auch der Zahl der verschiedenen mRNA-Spezies, welche aus einer Prä-mRNA entstehen können (Bogdanov et al., 2006; Duncan et al., 1997). Bogdanov et al. berichteten, dass in Exon 5 der humanen TF-prä-mRNA funktionelle ESEs für SR-Proteine, wie SF2/ASF, vorhanden sind (Bogdanov et al., 2006; Tardos et al., 2008). Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen demonstrierten Schwertz et al., dass die Inhibition von Clk1 zu einer Reduktion der Phosphorylierung von SF2/ASF und, im Zusammenhang damit, zu einer signifikant verringerten flTF-Expression in Thrombin-stimulierten Thrombozyten führte (Schwertz et al., 2006).

### 5.2.1.3 Der Einfluss der SR-Proteine auf die differentielle Expression der mRNA-Spleißvarianten von TF

Aufgrund der oben genannten Beobachtungen, in Verbindung mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten zur Inhibition der Clks bzw. der DNA topo I, wurde im nächsten Schritt die Bedeutung der SR-Proteine für die differentielle TF-Isoform-Expression charakterisiert. Dies erfolgte exemplarisch mit Hilfe der siRNA-vermittelten Inhibition von SRp75 und SF2/ASF. Aus den Ergebnissen dieser Experimente ist zu ersehen, dass der spezifische „*knock-down*“ eines der beiden untersuchten SR-Proteine, bzw. beider Proteine gemeinsam, die mRNA-Expression beider Isoformen in unterschiedlicher Form, induktiv bzw. reduktiv beeinflusst. Dies lässt vermuten, dass beide SR-Proteine an der Regulation der differentiellen TF-Isoform-Expression in humanen Endothelzellen beteiligt sind. Sowohl SF2/ASF als auch SRp75 sind in der Lage, alternative Spleißprozesse zu steuern (Bourgeois et al., 2004; Schwertz et al., 2006). Der simultane „*knock-down*“ von SF2/ASF und SRp75 verringerte die mRNA-Expression von asHTF sowie flTF in ähnlicher Intensität, wie es auch nach der pharmakologischen Inhibition der Clks zu beobachten war. Dies ging wiederum mit einer Reduktion der Phosphorylierung dieser beiden SR-Proteine einher. Die siRNA-vermittelte Inhibition von SF2/ASF allein führte zu einer Erhöhung der asHTF-mRNA und einer Verminderung der flTF-Expression. Diese Induktion bzw. Reduktion der beiden TF-Isoformen entsprach in ihrer Intensität dem Ausmaß der pharmakologischen Inhibition der DNA topo I. In diesen Zellen war die SF2/ASF-Phosphorylierung ebenfalls reduziert. Diese Daten deuten darauf hin, dass sowohl die Clk-Familie als auch die DNA topo I sowie SF2/ASF und SRp75 an der Regulation des alternativen Spleißens der TF-prä-mRNA involviert sind.

Auch in Arbeiten anderer Gruppen wurde die Beteiligung dieser beiden Kinasen und der SR-Proteine SF2/ASF und SRp75 bei der Steuerung alternativer Spleißprozesse verschiedener Prä-mRNAs nachgewiesen (Pilch et al., 2001; Nowak et al., 2008; Soret et al., 2003; Yomoda et al., 2008). Die Kinase-Aktivität der DNA topo I ist von großer Bedeutung für die Phosphorylierung von SF2/ASF und das Spleißen der  $\beta$ -Globin-prä-mRNA (Pilch et al., 2001). Ferner demonstrierten Yomoda et al., dass die Clk-Familie das alternative Spleißen adenoviraler E1A-prä-mRNA beeinflusst und im Zusammenhang damit die Phosphorylierung von SRp75 reguliert (Yomoda et al., 2008). Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, dass die Clks bzw. die

DNA topo I das alternative Spleißen der TF-prä-mRNA über die Regulation des Phosphorylierungsmusters der SR-Proteine SF2/ASF und SRp75 steuern.

## **5.2.2 Die Bedeutung der differentiellen TF-Isoform-Expression für die endotheliale Thrombogenität unter proinflammatorischen Bedingungen**

### **5.2.2.1 Der Einfluss des alternativen Spleißens von TF auf die endotheliale Thrombogenität im statischen Zellsystem**

Den oben dargestellten Ergebnissen entsprechend wurde neben der mRNA-Expression auch die TF-Isoform-Expression auf Proteinebene durch die Inhibition der SR-Proteinkinasen DNA topo I sowie die Clk-Familie beeinflusst. Schwertz et al. zeigten, dass die Inhibition von Clk1 die fITF-Synthese sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in mit Thrombin aktivierten Thrombozyten vollständig reduzierte (Schwertz et al., 2006). Unter diesen Bedingungen konnte im gewählten Versuchsaufbau keine asHTF-mRNA in Blutplättchen nachgewiesen werden. In TNF- $\alpha$ -stimulierten Endothelzellen führte die Hemmung der Clks nur zu einer teilweisen Reduktion der fITF-Expression. Eine mögliche Erklärung für die unvollständige Reduktion von fITF in HUVEC könnte darin liegen, dass diese Endothelzellen alle vier Mitglieder der Clk-Familie exprimieren. In Thrombozyten hingegen wurde ausschließlich Clk1 nachgewiesen. Der spezifische Inhibitor (TG003), welcher in dieser Studie eingesetzt wurde, blockt nur die Funktion von Clk1, 2 und 4, nicht aber Clk3 in der hier verwendeten Konzentration von 10  $\mu$ M (Muraki et al., 2004). Daher ist es möglich, dass die fITF-Synthese in den hier durchgeführten Untersuchungen nur teilweise reduziert wurde, da die Aktivität von Clk3 und damit dessen Einfluss auf die TF-Isoform-Expression nicht gehemmt war. Ferner führte die Inhibition der Clks zu einer nahezu vollständigen Reduktion der Proteinexpression von asHTF. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Clk-Familie die Expression beider TF-Isoformen in humanen Endothelzellen reguliert. Verschiedene Arbeiten anderer Forscher zeigen, dass die DNA topo I eine große Bedeutung für ESE-abhängige Spleißprozesse besitzt (Rossi et al., 1996; Pilch et al., 2001; Soret et al., 2003). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass die Inhibition der DNA topo I die Proteinexpression von fITF in HUVEC unter proinflammatorischen Bedingungen deutlich verringerte. Dies war mit einer drastischen Reduktion der prothrombogenen TF-Aktivität in diesen Zellen verbunden.

Im Gegensatz zu flTF wurde die Proteinsynthese von asHTF signifikant erhöht. Die Inhibition der Clk-Familie hingegen führte, in Verbindung mit der weniger deutlichen Verringerung der Proteinexpression von flTF und trotz der nahezu vollständigen Reduktion der löslichen TF-Isoform, erst acht Stunden nach der TNF- $\alpha$ -Stimulation zu einer Reduktion der TF-Aktivität um 30 %.

Der Beitrag der löslichen TF-Isoform zur Gesamt-Thrombogenität ist Gegenstand aktueller Diskussionen. In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Censarek et al. wurde keine prothrombotische Aktivität von asHTF nach der Überexpression dieser TF-Isoform in eukaryotischen Zellen entdeckt (Censarek et al., 2007). Die TF-Isoform wurde in den von Censarek et al. durchgeführten Versuchen allerdings nicht in den Überstand sezerniert. Daher ist es möglich, dass asHTF aufgrund einer veränderten Konformation keine prothrombogene Aktivität entwickeln konnte (Mackman, 2007). Aus anderen Arbeiten geht hervor, dass asHTF in Gegenwart von Phospholipiden die Bildung von FXa induziert (Szotowski et al., 2005). Die prokoagulatorische Aktivität von asHTF ist allerdings sehr viel geringer als die von flTF (Bogdanov et al., 2003; Szotowski et al., 2005). Diese Beobachtung wurde durch die Arbeit von Yu und Rak bestätigt, in der gezeigt wurde, dass flTF-tragende Mikropartikel und weniger die lösliche Isoform die prothrombogene TF-Aktivität bestimmen (Yu und Rak, 2004). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass nach der Clk-Inhibition die Verringerung der Proteinexpression von flTF eine deutliche Reduktion der TF-Aktivität bewirkt und die Erhöhung der asHTF-Expression kaum Einfluss auf die Prokoagulabilität besaß. Möglicherweise ist der hier verwendete chromogene TF-Aktivitätstest nicht sensitiv genug, um den relativen Beitrag der einzelnen TF-Isoformen zur Gesamtsumme der thrombogenen Aktivität innerhalb einer Probe zu bestimmen bzw. zu unterscheiden. Zu diesem Zeitpunkt steht allerdings auch kein anderer TF-Aktivitätstest zur Verfügung, mit dem dies möglich wäre. Nichtsdestotrotz kann die lösliche TF-Isoform von Endothelzellen in die Umgebung sezerniert werden. Somit beeinflusst asHTF eher die prokoagulative Aktivität des Blutes bzw. des Plasmas und nicht die der Endothelzellen.

Auf mRNA-Ebene führte die Hemmung der Clk-Familie zu einer Verringerung der flTF-Expression um 50 % und zu einer nahezu vollständigen Reduktion der löslichen TF-Isoform 1 h nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$ . Die Inhibition der DNA topo I reduzierte die flTF-mRNA um 75 % in den TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC. Im Gegensatz dazu wurde die mRNA-Expression von asHTF in diesen Zellen signifikant erhöht. Auf

Ebene der Proteinexpression führte die Inhibition der Clks erst 8 h nach der TNF- $\alpha$ -Induktion zu einer leichten Reduktion von fITF. In DNA topoI-inhibierten Endothelzellen hingegen wurde die Proteinexpression von fITF schon fünf Stunden nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  signifikant reduziert. Ebenso war die Hemmung der Clk-Familie nur mit einer Reduktion der TF-Aktivität um 30 % assoziiert. Im Gegensatz dazu führte die Inhibition der DNA topo I zu einer weitaus deutlicheren Verringerung der thrombogenen Aktivität. Eine Erklärung dafür könnte in dem dramatischen Anstieg des Verhältnisses von asHTF zu fITF in den DNA topoI-inhibierten HUVEC auf mRNA-Ebene liegen. Die Hemmung der Clk-Familie in den TNF- $\alpha$ -stimulierten Endothelzellen führte hingegen nicht zu einer Erhöhung der asHTF/fITF-Ratio. Dieses geänderte Verhältnis zu Gunsten von asHTF führt möglicherweise zu einer vermehrten Bildung von asHTF in den Zellen, die mit dem Inhibitor der DNA topo I vorinkubiert wurden. In Verbindung mit der deutlich erhöhten Bildung von asHTF könnte dies zu einer zusätzlichen Verminderung der fITF-Expression sowie einer reduzierten prothrombogenen Gesamt-TF-Aktivität auf der Endothelzelloberfläche führen. Andererseits ist es allerdings auch denkbar, dass die Inhibition der DNA topo I in HUVEC die fITF-Proteinexpression zu einem früheren Zeitpunkt beeinflusst als in den Zellen, die mit dem Clk-Inhibitor behandelt wurden. Zusammenfassend kann man sagen, dass die selektive Hemmung der Clks bzw. der DNA topo I in TNF- $\alpha$ -stimulierten humanen Endothelzellen das Verhältnis der gebildeten TF-Isoformen modifiziert, was sowohl die sekretierte prokoagulative TF-Aktivität als auch die TF-vermittelte Thrombogenität auf der Oberfläche der Endothelzellen in entscheidender Weise beeinflusst.

Im Zusammenhang mit der Beeinflussung der prothrombogenen TF-Aktivität durch alternatives Spleißen von TF wurde auch die Bedeutung der SR-Proteine exemplarisch an SF2/ASF und SRp75 untersucht. Es zeigte sich in Transfektionsversuchen, dass die siRNA-vermittelte simultane Inhibition beider SR-Proteine die Gesamt-TF-Aktivität in HUVEC acht Stunden nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  verringerte, was wiederum mit den Ergebnissen der pharmakologischen Clk-Inhibition übereinstimmt. Der „*knock-down*“ von SF2/ASF allein führte sowohl schon fünf als auch acht Stunden nach der TNF- $\alpha$ -Stimulation zu einer signifikanten Reduktion der zellulären prokoagulatorischen TF-Aktivität, wie es auch in den Zellen zu beobachten war, die mit dem DNA topoI-Inhibitor behandelt wurden.

### **5.2.2.2 Die Auswirkungen der Inhibition der Clks und der DNA topo I auf die prothrombogene Aktivität des Endothels unter dynamischen Bedingungen**

Die aus den Zellkulturversuchen gewonnenen Erkenntnisse, welche unter statischen Bedingungen erhoben wurden, führen zu der Frage nach der physiologischen Bedeutung der Regulation der differentiellen TF-Isoform-Expression durch die oben genannten SR-Proteinkinasen. Die Ergebnisse aus den dazu durchgeführten dynamischen Flusskammerversuchen machen deutlich, dass sowohl die Clks als auch die DNA topo I die prothrombogenen Eigenschaften auf der Oberfläche von humanen Endothelzellen unter proinflammatorischen Bedingungen beeinflussen. Es zeigte sich, dass die Inhibition der Clks sowie der DNA topo I zu einer Reduktion der TF-vermittelten Bildung von FXa in einem, den physiologischen Bedingungen angenäherten, dynamischen Flusskammermodell führte. Unter dynamischen Bedingungen führte die Hemmung der DNA topo I zu einer deutlicheren Reduktion der FXa-Bildung und damit der prokoagulativen TF-Aktivität, als dies die Inhibition der Clks zur Folge hatte. Diese Beobachtungen stimmen mit den Daten der Inhibitionsversuche im statischen Zellkulturmodell überein. Obwohl die Hemmung der DNA topo I eine deutlichere Reduktion der TF-Aktivität auf der Endothelzelloberfläche bewirkte, führte es daneben aber auch zu einer gesteigerten Bildung von sekretiertem asHTF. Dies könnte daher einen erheblichen Einfluss auf die Erhöhung der TF-Aktivität im zirkulierenden Plasma haben, welcher zu einem bedeutenden Anteil durch die lösliche TF-Isoform bestimmt wird (Bogdanov et al., 2003; Hathcock, 2004).

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass sowohl die Clk-Familie als auch die DNA topo I sowie die beiden SR-Proteine SF2/ASF und SRp75 an der Steuerung des alternativen Spleißens von TF in TNF- $\alpha$ -induzierten humanen Endothelzellen beteiligt sind. Ferner zeigen diese Ergebnisse, dass die Regulation der differentiellen TF-Isoform-Expression in Endothelzellen die Aktivierung der Gerinnungskaskade unter statischen sowie dynamischen Bedingungen beeinflusst. Diese Daten weisen somit auf einen bisher unbekanntem Mechanismus zur Steuerung der endothelialen prothrombogenen Aktivität hin.

### **5.3 Die Regulation des alternativen Spleißens und der Aktivität von eNOS in TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC**

In zunehmendem Maße wird eNOS als ein zentraler Regulator der Gefäßhomöostase unter normalen sowie proinflammatorischen Bedingungen angesehen (Ying et al., 2007; Heitzer et al., 2001). Man weiß, dass alternative Spleißprozesse für die Regulation der vaskulären Funktionen von großer Bedeutung sind (Hui et al., 2005; Bogdanov et al., 2006; Nowak et al., 2008, Stamm et al., 2005). Vor kurzem zeigten Lorenz et al., dass über alternative Spleißprozesse an Exon 13 von eNOS die Expression verschiedener Isoformen dieses Faktors gesteuert wird. Diese Vorgänge beeinflussen die Aktivität von eNOS entscheidend (Lorenz et al., 2007). Wie die differenzielle Isoform-Expression und dadurch die Funktion von eNOS reguliert werden, ist allerdings nicht bekannt. Daher war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, den Einfluss der Clk- bzw. DNA topo I-vermittelten Regulation alternativer Spleißprozesse auf das Expressionsmuster und die Funktion von eNOS in humanen Endothelzellen unter proinflammatorischen Bedingungen zu charakterisieren.

#### **5.3.1 Die Beeinflussung des alternativen Spleißens von eNOS-Exon 13 durch die Clk-Familie und die DNA topo I in humanen Endothelzellen**

Die Bedeutung der Clks sowie der DNA topo I für die differenzielle eNOS-Isoform-Expression wurde zunächst auf mRNA-Ebene analysiert. Im Rahmen dieser Versuche zeigte sich, dass die Hemmung der DNA topo I, nicht aber die der Clk-Familie die TNF- $\alpha$ -induzierte Expressionserhöhung der eNOS-Isoformen eNOS 13A, B und C in humanen Endothelzellen vollständig aufhob. Die spezifische siRNA-vermittelte Inhibition von Clk1 und Clk4 sowie der DNA topo I bestätigte diese Beobachtungen. Des Weiteren beeinflusste, wie schon im vorhergehenden Teil dieser Promotionsarbeit dargestellt, die pharmakologische Inhibition dieser Kinasen das Phosphorylierungsmuster der SR-Proteine in differenzieller Weise. Dies könnte zu einer Veränderung der Aktivität dieser Faktoren bei alternativen Spleißprozessen führen (Prasad et al., 1999; Stamm, 2008). Diese Ergebnisse lassen daher den Schluss zu, dass die SR-Proteinkinase DNA topo I, nicht aber die Clk-Familie ein wichtiger regulatorischer Faktor für das alternative Spleißens von eNOS unter

proinflammatorischen Bedingungen ist, was möglicherweise über dynamische Veränderungen des Phosphorylierungsmusters der SR-Proteine vermittelt wird.

### **5.3.2 Einfluss der SR-Proteinkinasen auf die eNOS-Aktivität in TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC**

NO ist einer der wichtigsten Regulatoren der vaskulären Homöostase und ist unter anderem an der Steuerung des Blutdruckes, der Funktion des Immunsystems sowie der Aggregation und Adhäsion von Thrombozyten beteiligt (Klahr, 2001; Lorenz et al., 2007). Im vaskulären System wird NO hauptsächlich durch eNOS gebildet und spielt sowohl unter normalen als auch unter inflammatorischen Bedingungen eine wichtige Rolle (Ying et al., 2007; Rassaf et al., 2006). Im Zusammenhang mit diesen Beobachtungen und den Daten zur differentiellen eNOS-Isoform-Expression wurde der Einfluss der SR-Proteinkinasen auf die Aktivität von eNOS bzw. auf NO-Synthese in TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC untersucht. Im Rahmen dieser Versuche ergab sich, dass die Stimulation der Zellen mit TNF- $\alpha$  zu einer signifikanten Reduktion der NO-Konzentration sowohl intrazellulär als auch im Zellüberstand führte. Diese Wirkung ging mit der Induktion der Isoform-Expression von eNOS 13A, B und C, die zuvor schon in HUVEC und verschiedenen humanen Geweben nachgewiesen wurden, einher (Lorenz et al., 2007). Die Dimerisierung von eNOS ist für dessen enzymatische Aktivität notwendig (Rodriguez-Crespo et al., 1996). Lorenz et al. zeigten in ihren Experimenten, dass eine gesteigerte Expression von eNOS zusammen mit der Isoform eNOS 13A in COS-7-Zellen mit einer Verringerung der eNOS-Aktivität verbunden war (Lorenz et al., 2007). Die „full length“-Form von eNOS bildet mit seinen enzymatisch inaktiven Isoformen Heterodimere, welche im Gegensatz zu eNOS-Homodimeren eine verringerte enzymatische Aktivität aufweisen. Aus den in dieser Arbeit erhobenen Daten ging hervor, dass die Hemmung der Clk-Familie die TNF- $\alpha$ -induzierte Expressionserhöhung der alternativ gespleißten Isoformen von eNOS nicht beeinflusst. Die Inhibition der DNA topo I hingegen hob die Erhöhung der eNOS-Isoform-Expression und damit verbundene Reduktion der NO-Bildung in Reaktion auf die Stimulation der humanen Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  vollständig auf.

Die Behandlung der HUVEC mit TNF- $\alpha$  führte zu einer Erhöhung der DNA topo I-Expression sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene. In den Arbeiten anderer Gruppen zeigte sich, dass die Stimulation muriner sowie humaner Zellen mit TNF- $\alpha$

eine transiente Induktion der enzymatischen Aktivität der DNA Topoisomerase I und II bewirkte. Dies deutete auf eine direkte Verbindung dieses proinflammatorischen Zytokins und der SR-Proteinkinase DNA topo I hin (Baloch et al., 1990; Utsugi et al., 1990). Die Phosphorylierungsaktivität der DNA topo I reguliert – neben anderen Prozessen – die Aktivität von SR-Proteinen (Soret et al., 2003; Bourgeois et al., 2004). Wir konnten, wie schon zuvor erläutert, demonstrieren, dass die Inhibition der SR-Proteinkinasen den Phosphorylierungsstatus verschiedener SR-Proteine beeinflusst. Das alternative Spleißen von eNOS-Exon 13 wird über A/C-reiche intronische Spleißverstärker („*intronic splice Enhancer*“, ISE) kontrolliert (Lorenz et al., 2007). Spleißprozesse werden über die Anbindung von SR-Proteinen an solche regulatorische Sequenzen in entscheidender Weise gesteuert (Bourgeois et al., 2004; Soret et al., 2003).

Zusammenfassend weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass die SR-Proteinkinase DNA topo I von großer Bedeutung für die Kontrolle der differentiellen eNOS-Isoform-Expression unter proinflammatorischen Bedingungen ist, was – möglicherweise – durch die Regulation dynamischer Veränderungen des Phosphorylierungsmusters der SR-Proteine gesteuert wird. Dies könnte einen zusätzlichen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus zur Steuerung der NO-Synthese in Endothelzellen unter entzündlichen Bedingungen darstellen, wie sie bei kardiovaskulären Erkrankungen auftreten.

## 5.4 Ausblick

Welche Bedeutung die Regulation der differentiellen Isoform-Expression von TF sowie von eNOS unter normalen und pathologischen Bedingungen, wie bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen, besitzt, ist bisher unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Die DNA topo I und die Clk-Familie sind an der Regulation dieser alternativen Spleißprozesse in humanen TNF- $\alpha$ -stimulierten Endothelzellen beteiligt. Diese Ereignisse werden dabei – möglicherweise – über die Regulation des Phosphorylierungsmusters der SR-Proteine gesteuert. In weiterführenden Versuchen sollte die Rolle weiterer Faktoren und Signalwege analysiert werden. Die Proteinkinase B und die Mitglieder der heterogenen nukleären Ribonukleoprotein (hnRNP)-Familie, welche ebenfalls an der Regulation alternativer, wie auch konstitutiver Spleißprozesse beteiligt sein können (Black, 2003; Blaustein et al., 2005), wären hierbei von großem Interesse. Der Einfluss der SR-Proteinkinasen

auf die verschiedene Spleißvorgänge eines jeden Gens, von dem Prä-mRNA gebildet wird, und eines jeden Prä-mRNA-Segments, aus dem eine Spleißvariante entsteht, sollte hierbei gesondert betrachtet werden. Die Beeinflussung dieser alternativen Spleißprozesse lässt neue Einblicke in die Regulationsmechanismen der endothelialen Funktionen zu und trägt – möglicherweise – zur Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Verringerung thrombotischer Komplikationen bei Vorliegen einer arteriosklerotischen Erkrankung bei.

## 6. Zusammenfassung

Alternatives Spleißen ist ein entscheidender regulatorischer Mechanismus zur Kontrolle der Proteindiversität sowie der funktionellen Vielfalt und spielt besonders unter pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle. Die DNA Topoisomerase I (DNA topo I) und die Cdc2-like Kinase (Clk)-Familie steuern alternative Spleißprozesse über die Phosphorylierung von Serin/Arginin-reichen (SR) Proteinen. Tissue Factor (TF) und die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) sind zwei der wichtigsten Regulatoren der Endothelfunktion und spielen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von Gefäßkrankheiten. Durch alternative Spleißprozesse werden sowohl strukturell als auch funktionell verschiedene Isoformen von TF („*full length*“ (fl)TF und alternativ gespleißter humaner (asH)TF) und von eNOS (eNOS, eNOS 13A, B und C) gebildet. Wie das alternative Spleißen von TF und eNOS reguliert wird und welche Bedeutung diese Prozesse für die Funktion des Endothels haben, ist bislang nicht bekannt. Diese Arbeit untersucht den Einfluss der Clk-Familie und der DNA topo I sowie der beiden SR-Proteine SF2/ASF und SRp75 auf das alternative Spleißen von TF und eNOS in humanen Endothelzellen unter proinflammatorischen Bedingungen. Die Bedeutung dieser alternativen Spleißprozesse auf die Funktion des Endothels wurde im Hinblick auf die NO-Synthese sowie die endotheliale Thrombogenität erforscht.

Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene exprimierten HUVEC die DNA topo I und alle vier Mitglieder der Clk-Familie. Die Stimulation der humanen Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  führte zu einer Induktion der mRNA-Expression beider TF-Isoformen. Auf mRNA-Ebene reduzierte die Vorinkubation der TNF- $\alpha$ -stimulierten Endothelzellen mit einem Inhibitor der Clks die Expression von flTF und asHTF. Die Inhibition der DNA topo I hingegen führte zu einer signifikanten Induktion von asHTF und einer Reduktion der flTF-Expression in TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC. Ferner resultierte die Hemmung der Clk-Familie in der Bildung einer weiteren mRNA-Spleißvariante (TF-A), deren Funktion allerdings unbekannt ist. Auf Proteinebene führte die Vorinkubation der Zellen mit einem Inhibitor der DNA topo I ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der TNF- $\alpha$ -induzierten flTF-Expression. Die Expression von asHTF wurde hingegen nicht beeinflusst unter diesen Bedingungen. Die Hemmung der DNA topo I in den TNF- $\alpha$ -stimulierten HUVEC ging mit einer signifikanten Reduktion der thrombogenen TF-Aktivität sowohl unter statischen als auch unter

dynamischen Bedingungen einher. Die Inhibition der Clk-Familie führte zu einer weniger deutlichen Reduktion der Proteinexpression von flTF, während die TNF- $\alpha$ -induzierte Expressionserhöhung von asHTF vollständig inhibiert wurde. Die TF-Aktivität wurde in diesen Zellen nur geringfügig reduziert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Thrombogenität hauptsächlich durch flTF bestimmt wird, während die lösliche TF-Isoform nur eine geringe Prothrombogenität aufweist. Die Analysen zum Einfluss der beiden oben genannten SR-Proteinkinasen auf die Phosphorylierung und damit die Aktivität der SR-Proteine während des alternativen Spleißens ergaben, dass die Hemmung der Clk-Familie bzw. der DNA topo I das Phosphorylierungsmuster der SR-Proteine beeinflusste. Die siRNA-vermittelte Inhibition von SF2/ASF und SRp75 führte zu einer Modifikation der differentiellen TF-Isoform-Expression. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass sowohl die DNA topo I als auch die Clk-Familie sowie die beiden SR-Proteine SF2/ASF und SRp75 an der Regulation des alternativen Spleißens von TF in TNF- $\alpha$ -stimulierten humanen Endothelzellen beteiligt sind. Diese Prozesse beeinflussen die endotheliale Thrombogenität unter statischen sowie dynamischen Bedingungen in entscheidender Weise.

Wie zuvor erwähnt führen alternative Spleißprozesse an der Prä-mRNA von eNOS, neben der Bildung der „*full length*“-Form von eNOS auch zur Expression der Isoformen eNOS 13A, B und C. Die Stimulation von HUVEC mit TNF- $\alpha$  induzierte die Expression der alternativ gespleißten eNOS-Isoformen, nicht aber von eNOS, und verringerte die NO-Synthese und damit die eNOS-Aktivität. Die Hemmung der DNA topo I, nicht aber die der Clk-Familie hob die TNF- $\alpha$ -induzierte Expressionserhöhung von eNOS 13A, B und C nahezu vollständig auf. Ebenso verhinderte die Vorinkubation der HUVEC mit dem Inhibitor der DNA topo I die TNF- $\alpha$ -induzierte Reduktion der NO-Bildung und damit die eNOS-Aktivität. Die Inhibition der Clks hingegen besaß hierauf keinen Einfluss. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass die DNA topo I eine große Bedeutung für die Steuerung der differentiellen eNOS-Isoform-Expression und der damit verbundenen endothelialen NO-Synthese unter proinflammatorischen Bedingungen besitzt. Diese Funktion wird – möglicherweise – durch die Regulation des Phosphorylierungsmusters der SR-Proteine vermittelt.

Diese Arbeit eröffnet neue Einblicke in die Regulation des alternativen Spleißens von TF und eNOS und verdeutlicht die Bedeutung des alternativen Spleißens für die

endotheliale Thrombogenität und NO-Synthese. Weiterführende Untersuchungen, aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, tragen – möglicherweise – zur Entwicklung neuer Therapiestrategien mit dem Ziel der Reduktion thrombotischer Komplikationen bei Vorliegen arteriosklerotischer Erkrankungen.

## 7. Summary

Alternative splicing is an essential mechanism for regulating the proteomic diversity and the functional plasticity, especially under pathologic conditions. The DNA topoisomerase I (DNA topo I) and the Cdc2-like kinase (Clk) family control alternative splicing processes by phosphorylating serine/arginine-rich (SR) proteins. Tissue Factor (TF) and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) are crucial for the endothelial function and play an important role for the pathogenesis of vascular diseases. Alternative splicing processes lead to the formation of structurally and functionally diverse isoforms of TF („full length“ (fl)TF and alternatively spliced human (asH)TF) and eNOS (eNOS, eNOS 13A, B und C). How alternative splicing of TF and eNOS is regulated as well as the meaning of these processes for the endothelial function is still unknown.

Therefore, this study investigates the impact of Clks and DNA topo I as well as the SR proteins SF2/ASF and SRp75 on the alternative splicing of TF and eNOS in human endothelial cells under proinflammatory conditions. Moreover, the relevance of the alternative splicing on the endothelial function, especially, the NO synthesis and thrombogenicity was analysed.

HUVEC were found to express DNA topo I as well as all four members of the Clk family. Stimulation of cells with TNF- $\alpha$  induced the expression of these SR protein kinases. The stimulation of HUVEC with TNF- $\alpha$  induced the expression of both TF isoforms, flTF and asHTF. On mRNA level the inhibition of Clks reduced the expression of both TF isoforms. In contrary, DNA topo I inhibition resulted in a significant induction of asHTF and reduction of flTF expression in TNF- $\alpha$ -stimulated HUVEC. Furthermore, the inhibition of Clks led to the generation of a third mRNA-splice variant (TF-A). The function of the TF-A splice variant is unknown. On protein level the inhibition of DNA topo I also resulted in a reduction of flTF but not asHTF in TNF- $\alpha$ -stimulated humane endothelial cells. Corresponding to this observation a significant reduction of thrombogenic TF activity was found under static as well as dynamic conditions. Clk-inhibition led to a slightly reduced protein expression of flTF, whereas asHTF was completely reduced. After inhibition of DNA topo I the TNF- $\alpha$ -induced TF activity was also marginally diminished. These results are in line with the observation of other groups that showed flTF rather than asHTF to be the main contributor to thrombogenicity. Furthermore, the influence of the SR protein kinases

on the phosphorylation and the activity of SR proteins was analyzed during alternative splicing processes. The inhibition of Clks or DNA topo I, influenced the phosphorylation pattern of these SR proteins. Moreover, the siRNA-mediated inhibition of the SR proteins SF2/ASF as well as SRp75 was found to modify the differential TF isoform expression in TNF- $\alpha$ -induced HUVEC. These data indicate DNA topo I and the Clk family as well as both SR proteins SF2/ASF and SRp75 to be involved in the regulation of alternative splicing of TF in TNF- $\alpha$ -stimulated human endothelial cells. These alternative splicing processes determine the endothelial thrombogenicity under static as well as dynamic conditions.

As mentioned above, alternative splicing of eNOS-pre-mRNA resulted in the expression of three truncated and enzymatic inactive isoforms eNOS 13A, B and C, beside active eNOS. Stimulation of HUVEC with TNF- $\alpha$  led to the induction of eNOS isoforms, but not of eNOS expression. The induction of eNOS isoforms led to a reduction of NO synthesis or, more precisely, eNOS activity. The analysis of the effect of the two SR protein kinases on alternative splicing of eNOS exon 13 and the enzymatic activity of eNOS revealed that DNA topo I inhibition but not inhibition of Clks almost completely abolished the TNF- $\alpha$ -mediated induction of eNOS 13A, B and C. Pre-incubation of HUVEC with the DNA topo I inhibitor prevented the TNF- $\alpha$ -induced reduction of NO generation. In contrast, the inhibition of Clks had no impact on the eNOS activity. These results suggested that it is the DNA topo I to play an important role in controlling the differential eNOS isoform expression, thereby, regulating the NO synthesis in HUVEC under proinflammatory conditions.

In conclusion, this study reveals new insights into the regulation of alternative splicing of TF and eNOS. The alternative splicing of TF and eNOS determine the endothelial thrombogenicity and the degree of NO generation. Continuation analysis based on the presented data may contribute to the development of novel therapeutic strategies for reducing thrombotic complications in the pathogenesis of arteriosclerotic disease.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ABP-280	Aktinbindendes Protein 280 (Filamin A)
AMV	Avian-Myeloblastosis-Virus
AP-1	Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure(n)
asHTF	alternativ gespleißter humaner Tissue Factor ( <i>alternatively spliced human tissue factor</i> )
BCA	Bicinchoninsäure ( <i>bicinchoninic acid</i> )
BN	Basalniveau
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
C-	Carboxy-
CaM	Calmodulin
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <i>copy desoxyribonucleic acid</i> )
Clk	Cdc2-ähnliche Kinase ( <i>cell division cycle2-like kinase</i> )
C <sub>t</sub>	Schwellenwert ( <i>Threshold Cycle</i> )
DAF-2DA	Diaminofluorescein-2 Diacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNA topo I	DNA Topoisomerase I
dNTP	2'-Desoxynukleotid 5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Exon
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGR-1	<i>early growth response gene 1</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ESE	exonischer Spleißverstärker ( <i>exonic splice enhancer</i> )
F	Faktor
FAK	fokale Adhäsionskinase

FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	fetales Kälberserum
fITF	„full length“ Tissue Factor
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
h	Stunde
HMWK	hochmolekulares Kininogen ( <i>high molecular weight kininogen</i> )
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HUVEC	humane Endothelzellen aus der Nabelschnur ( <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )
I	Intron
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ISE	Intronischer Spleißverstärker ( <i>intronic splice enhancer</i> )
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
min	Minuten
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N-	Amino-
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	nukleärer Faktor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub>	Nitrit
NO <sub>3</sub>	Nitrat
n.s.	nicht signifikant unterschiedlich
OD	Optische Dichte
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalz-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDTC	Pyrrolidindithiocarbamat
PK	Plasma-Kallikrein
PL	Phospholipid
PPK	Plasma-Präkallikrein

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radio-Immunopräzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RRM	RNA-Erkennungsmotiv ( <i>RNA recognition motif</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunden
SDS PAGE	<i>sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SF2/ASF	alternativer Spleißfaktor/Spleißfaktor 2
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SP-1	<i>specificity protein 1</i>
SR	Serin/Arginin-reich
SRPK	SR-Proteinkinase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalz-Lösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Tissue Factor
TF-A	<i>“alternative exon 1A”</i> Tissue Factor
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor-alpha
U	Unit
UCP3	<i>Uncoupling protein 3</i>

## 9. Literaturverzeichnis

1. Aasrum M, Prydz H. Gene targeting of tissue factor, factor X, and factor VII in mice: their involvement in embryonic development. *Biochemistry*. 2002; 67:25-32.
2. Ahamed J, Niessen F, Kurokawa T, Lee YK, Bhattacharjee G, Morrissey JH, Ruf W. Regulation of macrophage procoagulant responses by the tissue factor cytoplasmic domain in endotoxemia. *Blood*. 2007; 109:5251-5259.
3. Ahmad S, Hewett PW, Wang P, Al-Ani B, Cudmore M, Fujisawa T, Haigh JJ, le Noble F, Wang L, Mukhopadhyay D, Ahmed A. Direct evidence for endothelial vascular endothelial growth factor receptor-1 function in nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res*. 2006; 99:715-722.
4. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol*. 2003; 199:8-17
5. Azuma H, Ishikawa M, and Sekizaki S. Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol*. 1986; 88:411–415.
6. Bach R, Nemerson Y, Konigsberg W. Purification and characterization of bovine tissue factor. *J Biol Chem*. 1981; 256:8324-8331.
7. Bach RR. Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit Rev Biochem*. 1988; 23:339-368.
8. Baloch Z, Cohen S, Coffman FD. Synergistic interactions between tumor necrosis factor and inhibitors of DNA topoisomerase I and II. *J Immunol*. 1990; 145:2908-2913.
9. Banner DW, D'Arcy A, Chene C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchhofer D. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature*. 1996; 380:41-46.
10. Bauer KA, Kass BL, ten Cate H, Hawiger JJ, Rosenberg RD. Factor IX is activated in vivo by the tissue factor mechanism. *Blood*. 1990; 76:731- 736.
11. Bierhaus A, Zhang Y, Deng Y, Mackman N, Quehenberger P, Haase M, Luther T, Müller M, Böhrer H, Greten J. Mechanism of the tumor necrosis factor alpha-mediated induction of endothelial tissue factor. *J Biol Chem*. 1995; 270:26419-26432.
12. Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*. 2003; 72:291–336.

13. Blaustein M, Pelisch F, Tanos T, Muñoz MJ, Wengier D, Quadrana L, Sanford JR, Muschietti JP, Kornblihtt AR, Cáceres JF, Coso OA, Srebrow A. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat Struct Mol Biol.* 2005; 12:1037-1044.
14. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med.* 2003; 9:458-462.
15. Bogdanov VY. Blood coagulation and alternative pre-mRNA splicing: an overview. *Curr Mol Med.* 2006; 6:859-869.
16. Bourgeois CF, Lejeune F, Stévenin J. Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol.* 2004; 78:37-88.
17. Broze GJ Jr, Majerus PW. Purification and properties of human coagulation factor VII. *J Biol Chem.* 1980; 255:1242-1247.
18. Bruneel A, Labas V, Mailloux A, Sharma S, Vinh J, Vaubourdolle M, Baudin B. Proteomic study of human umbilical vein endothelial cells in culture. *Proteomics.* 2003; 3:714-723.
19. Busse R, Fleming I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res.* 1996; 33:181-94.
20. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van VI, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Muller M, Risau W, Edgington T, Collen D. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature.* 1996; 383:73-75.
21. Carson SD, Henry WM, Shows TB. Tissue factor gene localized to human chromosome 1 (1pter----1p21). *Science.* 1985; 229:991-993.
22. Censarek P, Bobbe A, Grandoch M, Schrör K, Weber AA. Alternatively spliced human tissue factor (asHTF) is not pro-coagulant. *Thromb Haemost.* 2007; 97:11-14.
23. Chand HS, Ness SA, Kisie W. Identification of a novel human tissue factor splice variant that is upregulated in tumor cells. *Int J Cancer.* 2006; 118:1713-1720.
24. Chen J, Kasper M, Heck T, Nakagawa K, Humpert PM, Bai L, Wu G, Zhang Y, Luther T, Andrassy M, Schiekofer S, Hamann A, Morcos M, Chen B, Stern

- DM, Nawroth PP, Bierhaus A. Tissue factor as a link between wounding and tissue repair. *Diabetes*. 2005; 54:2143-2154.
25. Clark TA, Schweitzer AC, Chen TX, Staples MK, Lu G, Wang H, Williams A, Blume JE. Discovery of tissue-specific exons using comprehensive human exon microarrays. *Genome Biol*. 2007; 8:R64.
26. Courtney JM, Forbes CD. Thrombosis on foreign surfaces. *Br Med Bull*. 1994; 50:966-981.
27. Cui X, Chopp M, Zacharek A, Zhang C, Roberts C, Chen J. Role of endothelial nitric oxide synthetase in arteriogenesis after stroke in mice. *Neuroscience*. 2009; 159:744-750.
28. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blot clotting. *Science*. 1964; 145:1310-1312.
29. De Palma C, Meacci E, Perrotta C, Bruni P, Clementi E. Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26:99-105.
30. Desjardins F, Balligand JL. Nitric oxide-dependent endothelial function and cardiovascular disease. *Acta Clin Belg*. 2006; 61:326-334.
31. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol*. 1989; 134:1087-1097.
32. Dschietzig T, Bartsch C, Richter C, Laule M, Baumann G, Stangl K. Relaxin, a pregnancy hormone, is a functional endothelin-1 antagonist: attenuation of endothelin-1-mediated vasoconstriction by stimulation of endothelin type-B receptor expression via ERK-1/2 and nuclear factor-kappaB. *Circ Res*. 2003; 92:32-40.
33. Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, and Michel T. The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006; 46:235-276.
34. Duncan PI, Howell BW, Marius RM, Drmanic S, Douville EM, Bell JC. Alternative splicing of STY, a nuclear dual specificity kinase. *J Biol Chem*. 1995; 270:21524-21531.

35. Duncan PI, Stojdl DF, Marius RM, Bell JC. In vivo regulation of alternative pre-mRNA splicing by the Clk1 protein kinase. *Mol Cell Biol.* 1997; 17:5996-6001.
36. Duncan PI, Stojdl DF, Marius RM, Scheit KH, Bell JC. The Clk2 and Clk3 dual-specificity protein kinases regulate the intranuclear distribution of SR proteins and influence pre-mRNA splicing. *Exp Cell Res.* 1998; 241:300-308.
37. Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. 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.* 1986; 25:505-512.
38. Edgington TS, Dickinson CD, Ruf W. The structural basis of function of the TF. VIIa complex in the cellular initiation of coagulation. *Thromb Haemost.* 1997; 78:401-405.
39. Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost.* 1991; 66:67-79.
40. Eilertsen KE, Osterud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2004; 15:521-538.
41. Esmon CT. The subunit structure of thrombin-activated factor V. Isolation of activated factor V, separation of subunits, and reconstitution of biological activity. *J Biol Chem.* 1979; 254:964-973.
42. Eum HA, Park SW, Lee SM. Role of nitric oxide in the expression of hepatic vascular stress genes in response to sepsis. *Nitric Oxide.* 2007; 17:126-133.
43. Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease, *Genes Dev.* 2003; 17:419-437.
44. Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI, Varki N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res.* 1990; 59:421-437.
45. Gailani D, Broze GJ, Jr. Factor XII-independent activation of factor XI in plasma: effects of sulfatides on tissue factor-induced coagulation. *Blood.* 1993; 82:813-819.
46. Garg UC and Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989; 83:1774-1777.

47. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:2311-2315.
48. Giordano FJ. Therapeutic gene regulation: targeting transcription. *Circulation*. 2007; 115:1180-1183.
49. Goldin-Lang P, Niebergall F, Antoniak S, Szotowski B, Rosenthal P, Pels K, Schultheiss HP, Rauch U. Ionizing radiation induces upregulation of cellular procoagulability and tissue factor expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Thromb Res*. 2007; 120:857-864.
50. González-Cabrero J, Pozo M, Durán MC, de Nicolás R, Egido J, Vivanco F. The proteome of endothelial cells. *Methods Mol Biol*. 2007; 357:181-198.
51. Goodwin BL, Pendleton LC, Levy MM, Solomonson LP, Eichler DC. Tumor necrosis factor-alpha reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293:H1115-H1121.
52. Hathcock J. Vascular biology-the role of tissue factor. *Semin Hematol*. 2004; 41:30-34.
53. He Y, Chang G, Zhan S, Song X, Wang X, Luo Y. Soluble tissue factor has unique angiogenic activities that selectively promote migration and differentiation but not proliferation of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 370:489-494.
54. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001; 104:2673-2678.
55. Hobbs JE, Zakarija A, Cundiff DL, Doll JA, Hymen E, Cornwell M, Crawford SE, Liu N, Signaevsky M, Soff GA. Alternatively spliced human tissue factor promotes tumor growth and angiogenesis in a pancreatic cancer tumor model. *Thromb Res*. 2007; 120 Suppl 2: S13-S21.
56. Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol*. 2005; 6:209.
57. Howell WH. Theories of blood coagulation. *Physiologic Review*. 1935; 435-470.

58. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995; 377:239-242.
59. Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996; 16:981-987.
60. Hui J, Bindereif A. Alternative pre-mRNA splicing in the human system: unexpected role of repetitive sequences as regulatory elements. *Biol Chem*. 2005; 386:1265-1271.
61. Hui J, Stangl K, Lane WS, Bindereif A. HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. *Nat Struct Biol*. 2003; 10:33-37.
62. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol*. 1987; 18:234-239.
63. Jagadeesha DK, Miller FJ Jr, Bhalla RC. Inhibition of apoptotic signaling and neointimal hyperplasia by tempol and nitric oxide synthase following vascular injury. *J Vasc Res*. 2009; 46:109-118.
64. Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science*. 2003; 302:2141-2144.
65. Kadl A, Huber J, Gruber F, Bochkov VN, Binder BR, Leitinger N. Analysis of inflammatory gene induction by oxidized phospholipids in vivo by quantitative real-time RT-PCR in comparison with effects of LPS. *Vascul Pharmacol*. 2002; 38:219-227.
66. Kalafatis M, Swords NA, Rand MD, Mann KG. Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1227:113-129.
67. Kawashima S. The two faces of endothelial nitric oxide synthase in the pathophysiology of atherosclerosis. *Endothelium*. 2004; 11:99-107.
68. Kienast J, Ostermann H. Blutgerinnung und Fibrinolyse. *Z Kardiol*. 1993; 82: Suppl 2: 65-69.
69. Klahr, S. The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16 Suppl 1:60-62.

70. Lademery MR, Harper SJ, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett.* 2007; 249:133-142.
71. Lefroy DC, Crake T, Uren NG, Davies GJ, and Maseri A. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on epicardial coronary artery caliber and coronary blood flow in humans. *Circulation.* 1993; 88:43-54.
72. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7:678-689.
73. Li C, Ruan L, Sood SG, Papapetropoulos A, Fulton D, Venema RC. Role of eNOS phosphorylation at Ser-116 in regulation of eNOS activity in endothelial cells. *Vascul Pharmacol.* 2007; 47:257-264.
74. Li H, Wallerath T, Förstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide.* 2002; 7:132-147.
75. Li H, Wallerath T, Munzel T, and Förstermann U. Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide* 2002; 7:149-164.
76. Lin Z, Kumar A, SenBanerjee S, Staniszewski K, Parmar K, Vaughan DE, Gimbrone MA Jr, Balasubramanian V, García-Cardeña G, Jain MK. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates endothelial thrombotic function. *Circ Res.* 2005; 96:e48-57.
77. Lorenz M, Hewing B, Hui J, Zepp A, Baumann G, Bindereif A, Stangl V, Stangl K. Alternative splicing in intron 13 of the human eNOS gene: a potential mechanism for regulating eNOS activity. *FASEB J.* 2007; 21:1556-1564.
78. Maarsingh H, Zaagsma J, Meurs H. Arginine homeostasis in allergic asthma. *Eur J Pharmacol.* 2008; 585:375-384.
79. MacFarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biological amplifier. *Nature.* 1964; 202: 498.
80. Mackman N, Fowler BJ, Edgington TS, Morrissey JH. Functional analysis of the human tissue factor promoter and induction by serum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:2254-2258.
81. Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry.* 1989; 28:1755-1762.

82. Mackman N. Alternatively spliced tissue factor - One cut too many? *Thromb Haemost.* 2007; 97:5-8.
83. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:1015-1022.
84. Marutsuka K, Hatakeyama K, Yamashita A, Asada Y. Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2005; 12:1-8.
85. Matsubara K, Matsumoto H, Mizushina Y, Lee JS, Kato N. Inhibitory effect of pyridoxal 5'-phosphate on endothelial cell proliferation, replicative DNA polymerase and DNA topoisomerase. *Int J Mol Med.* 2003; 12:51-55.
86. Millet L, Vidal H, Larrouy D, Andreelli F, Laville M, Langin D. mRNA expression of the long and short forms of uncoupling protein-3 in obese and lean humans. *Diabetologia.* 1998; 41:829-832.
87. Milsom C, Yu J, May L, Meehan B, Magnus N, Al-Nedawi K, Luyendyk J, Weitz J, Klement P, Broze G, Mackman N, Rak J. The role of tumor-and host-related tissue factor pools in oncogene-driven tumor progression. *Thromb Res.* 2007; 120 Suppl 2:S82-91.
88. Minagar A, Steven Alexander J, Kelley RE, Harper M, Jennings MH. Proteomic Analysis of Human Cerebral Endothelial Cells Activated by Glutamate/MK-801: Significance in Ischemic Stroke Injury. *J Mol Neurosci.* 2008 Oct 9. [Epub ahead of print].
89. Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet J M. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26:2594-2604.
90. Muller WA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol.* 1999; 66:698-704.
91. Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med.* 2008; 40:180-196.
92. Muraki M, Ohkawara B, Hosoya T, Onogi H, Koizumi J, Koizumi T, Sumi K, Yomoda J, Murray MV, Kimura H, Furuichi K, Shibuya H, Krainer AR, Suzuki M, Hagiwara M. Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J Biol Chem.* 2004; 279:24246–24254.

93. Muraki M, Ohkawara B, Hosoya T, Onogi H, Koizumi J, Koizumi T, Sumi K, Yomoda J, Murray MV, Kimura H, Furuichi K, Shibuya H, Krainer AR, Suzuki M, Hagiwara M. Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J Biol Chem.* 2004; 279:24246-24254.
94. Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 198:1027-1033.
95. Naito K, Fujikawa K. 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.* 1991; 266:7353-7358.
96. Napoleone E, Di Santo A, Bastone A, Peri G, Mantovani A, de Gaetano G, Donati MB, Lorenzet R. Long pentraxin PTX3 upregulates tissue factor expression in human endothelial cells: a novel link between vascular inflammation and clotting activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:782-787.
97. Nemerson Y, Bach R. Tissue factor revisited. *Prog Hemost Thromb.* 1982; 6:237-261.
98. Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood.* 1988; 71:1-8.
99. Ni W, Egashira K, Kataoka C, Kitamoto S, Koyanagi M, Inoue S, Takeshita A. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic actions of HMG-CoA reductase inhibitors in a rat model of chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Circ Res.* 2001; 89:415-421.
100. Nikolakaki E, Du C, Lai J, Giannakouros T, Cantley L, Rabinow L. Phosphorylation by LAMMER protein kinases: determination of a consensus site, identification of in vitro substrates, and implications for substrate preferences. *Biochemistry.* 2002; 41:2055-2066.
101. Nold-Petry CA, Nold MF, Zepp JA, Kim SH, Voelkel NF, Dinarello CA. IL-32-dependent effects of IL-1 $\beta$  on endothelial cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:3883-3888.
102. Nolf P. The coagulation of the blood. *Medicine (Baltimore),* 135-165. 1938.
103. Nowak DG, Woolard J, Amin EM, Konopatskaya O, Saleem MA, Churchill AJ, Lodomery MR, Harper SJ, Bates DO. Expression of pro- and anti-angiogenic

- isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *J Cell Sci.* 2008; 121:3487-3495.
- 104.Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74:5260-5264.
- 105.Osterud B. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1998; 9 Suppl 1:S9-S14.
- 106.Ott I, Fischer EG, Miyagi Y, Mueller BM, Ruf W. A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J Cell Biol.* 1998; 140:1241-1253.
- 107.Paborsky LR, Caras IW, Fisher KL, Gorman CM. Lipid association, but not the transmembrane domain, is required for tissue factor activity. Substitution of the transmembrane domain with a phosphatidylinositol anchor. *J Biol Chem.* 1991; 266:21911-21916.
- 108.Pilch B, Allemand E, Facompré M, Bailly C, Riou JF, Soret J, Tazi J. Specific inhibition of serine- and arginine-rich splicing factors phosphorylation, spliceosome assembly, and splicing by the antitumor drug NB-506. *Cancer Res.* 2001; 61:6876-6884.
- 109.Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation.* 1990; 50:537-544.
- 110.Potenza MA, Gagliardi S, Nacci C, Carratu' MR, Montagnani M. Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. *Curr Med Chem.* 2009; 16:94-112.
- 111.Prasad J, Colwill K, Pawson T, Manley JL. The protein kinase Clk/Sty directly modulates SR protein activity: both hyper- and hypophosphorylation inhibit splicing. *Mol Cell Biol.* 1999; 19:6991-7000.
- 112.Rao LV, Ruf W. Tissue factor residues Lys165 and Lys166 are essential for rapid formation of the quaternary complex of tissue factor.VIIa with Xa.tissue factor pathway inhibitor. *Biochemistry.* 1995; 34:10867-10871.
- 113.Rassaf T, Kleinbongard P, Kelm M. The L-arginine nitric oxide pathway: avenue for a multiple-level approach to assess vascular function. *Biol Chem.* 2006; 387:1347-1349.
- 114.Rauch U, Antoniak S, Boots M, Schulze K, Goldin-Lang P, Stein H, Schultheiss HP, Coupland SE. Association of tissue-factor upregulation in

- squamous-cell carcinoma of the lung with increased tissue factor in circulating blood. *Lancet Oncol.* 2005; 6:254.
- 115.Rauch U, Nemerson Y. Circulating tissue factor and thrombosis. *Curr Opin Hematol.* 2000a; 7:273-277.
- 116.Rauch U, Nemerson Y. Tissue factor, the blood, and the arterial wall. *Trends Cardiovasc Med.* 2000; 10:139-143.
- 117.Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med.* 2001; 134:224-238.
- 118.Riewald M, Ruf W. Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine-perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *J Biol Chem.* 2005; 280:19808-19814.
- 119.Rodriguez-Crespo I, Ortiz de Montellano PR. Human endothelial nitric oxide synthase: expression in *Escherichia coli*, coexpression with calmodulin, and characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; 336:151-156
- 120.Roesli C, Mumprecht V, Neri D, Detmar M. Identification of the surface-accessible, lineage-specific vascular proteome by two-dimensional peptide mapping. *FASEB J.* 2008; 22:1933-1944.
- 121.Rossi F, Labourier E, Forné T, Divita G, Derancourt J, Riou JF, Antoine E, Cathala G, Brunel C, Tazi J. Specific phosphorylation of SR proteins by mammalian DNA topoisomerase I. *Nature.* 1996; 381:80-82.
- 122.Rottingen JA, Enden T, Camerer E, Iversen JG, Prydz H. Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals in J82 cells, transfected COS-1 cells, Madin-Darby canine kidney cells and in human endothelial cells induced to synthesize tissue factor. *J Biol Chem.* 1995; 270:4650-4660.
- 123.Santiago-Delpin EA. The endothelium and early immune activation: new perspective and interactions. *Transplant Proc.* 2004; 36:1709-1713.
- 124.Schmidt A. Zur Blutlehre. Leipzig, FCW Vogel Verlag. 1892.
- 125.Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol.* 2008; 83:536-545.
- 126.Schwartz BS, Edgington TS. Immune complex-induced human monocyte procoagulant activity. I. a rapid unidirectional lymphocyte-instructed pathway. *J Exp Med.* 1981; 154:892-906.

127. Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med.* 2006; 203:2433-2440.
128. Soret J, Gabut M, Dupon C, Kohlhagen G, Stevenin J, Pommier Y, Tazi J. Altered serine/arginine-rich protein phosphorylation and exonic enhancer-dependent splicing in mammalian cells lacking topoisomerase I. *Cancer Res.* 2003; 63:8203-8211.
129. Stähli BE, Breitenstein A, Akhmedov A, Camici GG, Shojaati K, Bogdanov N, Steffel J, Ringli D, Lüscher TF, Tanner FC. Cardiac glycosides regulate endothelial tissue factor expression in culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27:2769-2776.
130. Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D, Thanaraj TA, Soreq H. Function of alternative splicing. *Gene.* 2005; 344:1-20.
131. Stamm S. Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation. *J Biol Chem.* 2008; 283:1223-1227.
132. Stamm S. Signals and their transduction pathways regulating alternative splicing: a new dimension of the human genome. *Hum Mol Genet.* 2002; 11:2409-2416.
133. Stangl K, Cascorbi I, Laule M, Klein T, Stangl V, Rost S, Wernecke KD, Felix SB, Bindereif A, Baumann G, Roots I. High CA repeat numbers in intron 13 of the endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease. *Pharmacogenetics.* 2000; 10:133-140.
134. Stangl V, Lorenz M, Meiners S, Ludwig A, Bartsch C, Moobed M, Vietzke A, Kinkel HT, Baumann G, Stangl K. Long-term up-regulation of eNOS and improvement of endothelial function by inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J.* 2004; 18:272-279.
135. Szotowski B, Antoniak S, Goldin-Lang P, Tran QV, Pels K, Rosenthal P, Bogdanov VY, Borchert HH, Schultheiss HP, Rauch U. Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2007; 73:806-812.
136. Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ Res.* 2005; 96:1233-1239.

137. Szotowski B, Antoniak S, Rauch U. Alternatively spliced tissue factor: a previously unknown piece in the puzzle of hemostasis. *Trends Cardiovasc Med.* 2006; 16:177-182.
138. Tai SC, Robb GB, Marsden PA. Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:405-412.
139. Tardos JG, Eisenreich A, Deikus G, Bechhofer DH, Chandradas S, Zafar U, Rauch U, Bogdanov VY. SR proteins ASF/SF2 and SRp55 participate in tissue factor biosynthesis in human monocytic cells. *J Thromb Haemost.* 2008; 6:877-884.
140. Tumor Z, Niwa T. Indoxyl Sulfate Inhibits Nitric Oxide Production and Cell Viability by Inducing Oxidative Stress in Vascular Endothelial Cells. *Am J Nephrol.* 2009; 29:551-557.
141. Utsugi T, Mattern MR, Mirabelli CK, Hanna N. Potentiation of topoisomerase inhibitor-induced DNA strand breakage and cytotoxicity by tumor necrosis factor: enhancement of topoisomerase activity as a mechanism of potentiation. *Cancer Res.* 1990; 50:2636-2640.
142. van der Logt CP, Reitsma PH, Bertina RM. Alternative splicing is responsible for the presence of two tissue factor mRNA species in LPS stimulated human monocytes. *Thromb Haemost.* 1992; 67:272-276.
143. van Eijk LT, van der Hoeven JG, Pickkers P. Endothelium-dependent vascular dysfunction in septic patients. *Anaesthesia.* 2008; 63:883-884; author reply 884-885.
144. Vanhoutte PM. Endothelial Dysfunction. *Circ J.* 2009; 73:595-601.
145. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86:2839-2843.
146. Yang TL, Cui J, Taylor JM, Yang A, Gruber SB, Ginsburg D. Rescue of fatal neonatal hemorrhage in factor V deficient mice by low level transgene expression. *Thromb Haemost.* 2000; 83:70-77.
147. Ying L, Hofseth LJ. An Emerging Role for Endothelial Nitric Oxide Synthase in Chronic Inflammation and Cancer. *Cancer Res.* 2007; 67:1407-1410.

148. Yomoda J, Muraki M, Kataoka N, Hosoya T, Suzuki M, Hagiwara M, Kimura H. Combination of Clk family kinase and SRp75 modulates alternative splicing of Adenovirus E1A. *Genes Cells*. 2008; 13:233-244.
149. Yu JL, Rak JW. Shedding of tissue factor (TF)-containing microparticles rather than alternatively spliced TF is the main source of TF activity released from human cancer cells. *J Thromb Haemost*. 2004; 2:2065-2067.
150. Zakrzewicz A, Gräfe M, Terbeek D, Bongrazio M, Auch-Schwelk W, Walzog B, Graf K, Fleck E, Ley K, Gaehtgens P. L-selectin-dependent leukocyte adhesion to microvascular but not to macrovascular endothelial cells of the human coronary system. *Blood*. 1997; 89:3228-3235.

## 10. Publikationen

Diese Dissertation wurde in Teilen in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

- 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; 389:1333-8.
- Eisenreich A, Bogdanov VY, Zakrzewicz A, Pries A, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Cdc2-like Kinases and DNA Topoisomerase I Regulate Alternative Splicing of Tissue Factor in Human Endothelial Cells. *Circ Res.* 2009; 104:589-99

Weitere Publikationen:

- Eisenreich A, Celebi O, Goldin-Lang P, Schultheiss HP, Rauch U. Upregulation of tissue factor expression and thrombogenic activity in human aortic smooth muscle cells by irradiation, rapamycin and paclitaxel. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8:307-311.
- Tardos JG, Eisenreich A, Deikus G, Bechhofer DH, Chandradas S, Zafar U, Rauch U, Bogdanov VY. SR proteins ASF/SF2 and SRp55 participate in tissue factor biosynthesis in human monocytic cells. *J Thromb Haemost.* 2008; 6:877-884.
- Goldin-Lang P, Tran QV, Fichtner I, Eisenreich A, Antoniak S, Schulze K, Coupland SE, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Tissue factor expression pattern in human non-small cell lung cancer tissues indicate increased blood thrombogenicity and tumor metastasis. *Oncol Rep.* 2008; 20:123-128.

- Antoniak S, Boltzen U, Eisenreich A, Stellbaum C, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Regulation of cardiomyocyte TF expression and cardiomyocyte-endothelium interaction under inflammatory conditions. *J Thromb Haemost.* 2009; 7:871-878.

.....  
(Andreas Eisenreich)