

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

Tissue Faktor induzierte Zellmigration: Bedeutung der GTPase Rac

Nooshin Sabbari-Erfani

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. I. Ott

2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker

Die Dissertation wurde am 28.10.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
2. Fragestellung	23
3. Materialien und Methoden	24
3.1 Materialien	24
3.2 Chemikalien und Lösungen	24
3.3 Geräte	24
3.4 Kulturbedingung	24
3.5 Transfektion der J82	25
3.6 Migrationsassays	25
3.7 Western Blot	27
3.8 Durchflußzytometrie	27
4. Ergebnisse	28
5. Diskussion	35
6. Zusammenfassung	41

7. Literaturverzeichnis	42
Danksagung	66

1. Einleitung

Als Tissue Factor (TF) wird ein 47 Kilodalton (kDa) schweres membran-gebundenes Glykoprotein der Subklasse II der Zytokin-Rezeptor-Superfamilie (Osterud 1997) bezeichnet, zu der auch Interferon α/β und γ -Rezeptoren gehören (Harlos et al. 1994; Mueller et al. 1994; Bazan 1990).

Der Tissue Factor besteht insgesamt aus 263 Aminosäuren (AS). Er lässt sich in eine extrazelluläre (219 Aminosäuren), eine transmembranöse (23 Aminosäuren) und eine zytoplasmatische (21 Aminosäuren) Domäne einteilen (siehe Abb.1). Das menschliche TF-Gen setzt sich aus sechs Exons im Wechsel mit fünf Introns zusammen, wobei die Exons 2-5 die Kofaktor- und Rezeptorfunktion kodieren (Koyama et al. 1994).

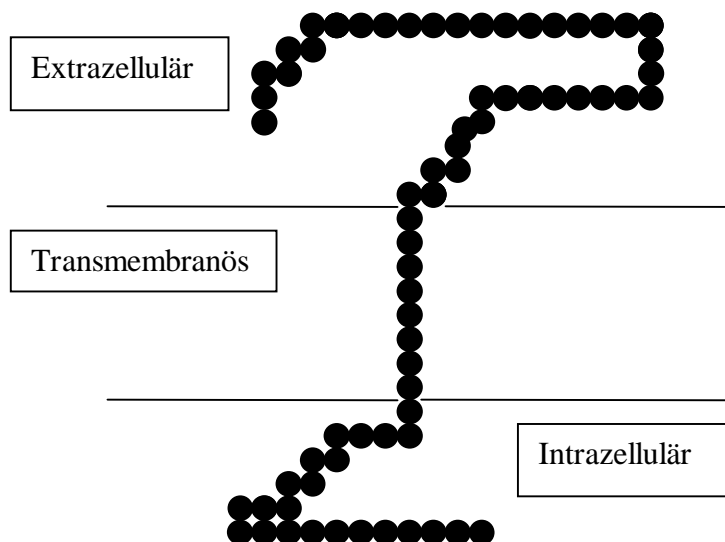


Abb.1 Schematische Darstellung des Tissue Factors

Während die extrazelluläre Domäne Faktor VII (FVII)/ Faktor VIIa (FVIIa) bindet, und dadurch die extrinsische Gerinnungskaskade aktiviert, geht die zytoplasmatische Komponente mit dem Aktin-bindenden Protein eine Bindung ein. Dies könnte eine Rolle bei den durch den TF induzierten Zytoskelettveränderungen wie Zellausbreitung spielen (Ott et al. 1998).

Unter physiologischen Bedingungen wird der TF an der Zelloberfläche von mesenchymalen Zellen, auf der Adventitia von Gefäßsystemen sowie auf der epithelialen Oberfläche von einzelnen Organen, wie beispiels-

weise den fibrösen Kapseln von Leber, Milz und Niere produziert (Camerer et al. 1996). Perivaskulär lässt sich der TF in Fibroblasten und glatten Muskelzellen nachweisen. Daneben wird er von Kardiomyozyten, Epithelzellen des Gehirns und der Plazenta sowie von glomerulären Endothelzellen exprimiert (Edgington et al. 1991).

Physiologischerweise besteht kein direkter Kontakt zwischen dem zirkulierenden Blut und dem TF. Nach Bindung von FVII an den TF wird FVII zu FVIIa aktiviert und dadurch die extrinsische Gerinnungskaskade initiiert (Darke et al. 1991; Camerer et al. 1996; Beck et al. 1997; Wilcox et al. 1989).

Der TF/ FVIIa bildet wiederum mit Ca^{2+} und Phospholipiden einen Komplex und leitet durch die proteolytische Spaltung von FX und FIX zu FXa und FIXa die Gerinnungskaskade ein (Martin et al. 1995; Osterud et al. 1977). Prothrombin wird zu Thrombin aktiviert. Dies katalysiert die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin (Weiss et al. 1988) und Bildung eines Gerinnungskoagels (Nemerson 1988/ 1994; Edgington et al. 1991; Banner et al. 1996; Monroe et al. 1998; Bach 1998; Hatakeyama et al. 1997).

Neben der Thrombusbildung induzieren aktivierte Gerinnungsfaktoren intrazelluläre Aktivierung der Signaltransduktionskaskaden. So stimuliert Thrombin neben FXa und FVIIa bei Zellaktivierungsvorgängen sogenannte Proteasen-aktivierte Rezeptoren (PARs) (Camerer et al. 2000), eine G-Protein-gekoppelte Rezeptorsubklasse (Pendurthi et al. 2000; Peterson et al. 2000). Bisher sind vier verschiedene PAR Formen (PAR-1-4) bekannt. Während PAR-2 über den TF/ FVIIa-Komplex aktiviert werden kann, ist der TF/ FVIIa-Xa-Komplex in der Lage, sowohl PAR-1 als auch PAR-2 zu aktivieren (Riewald et al 2001; Camerer et al 2000/2001). Diese werden nach proteolytischer Spaltung einer extrazellulären Region des Rezeptors aktiviert. Das dadurch neu gebildete aminoternale Ende dient als Ligand für die Triggerung der Rezeptoraktivierung. PAR werden auf Fibroblasten, EC (Endothelzellen) und Monozyten exprimiert und regulieren angesichts ihrer ausgeprägten intra- und extravaskulären Verbreitung verschiedene zelluläre Funktionen wie Genexpression, Apoptose und Zellmotilität (Ruf et al. 2000).

Daneben erhöht Thrombin unter anderem die Produktion von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Tsopanoglou et al 2002). Dies wird durch Wachstumsfaktoren vermehrt in den Endothelzellen der Tumorzellen produziert (Feldin- Habermann et al 1992; Enenstein et al 1994; Brooks et al 1994). Liganden, die an $\alpha_v\beta_3$ -Integrin binden, unterstützen die Zellmigration (Giancotti et al 1999).

Die durch den TF induzierte Gerinnungsaktivierung wird durch den endogenen Inhibitor TFPI (Tissue factor pathway inhibitor) reguliert. Der TFPI wird in den Gefäßendothelzellen synthetisiert und bindet den TF-FVIIa-FXa-Komplex, wodurch dieser proteolytisch inaktiviert wird (Broze 1995).

Der TFPI inhibiert den TF in 2 Schritten:

1. Er bindet auf der aktivierten Seite des FXa.
2. Die katalytische Aktivität des TF/ FVIIa-Komplexes wird inhibiert.

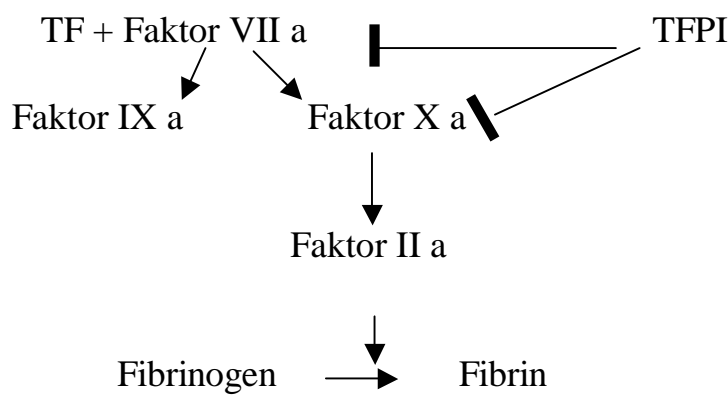


Abb. 2 Schematische Darstellung der TF-Inhibition mittels TFPI

Intravaskuläre Zellen wie Leukozyten, Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen exprimieren unter physiologischen Bedingungen keinen TF (Osterud et al. 1995). Durch eine Vielzahl inflammatorischer (Cunningham et al 1999; Poulsen et al. 1998) und immunologischer Signale wird die Produktion des TF induziert. Dazu gehören: Immunkomplexe, Zytokine (z.B. Interleukin-1 β (IL-1 β)) (Scarpati et al. 1987; Lyberg et al. 1982; Tipping et al. 1988; Levy et al. 1981; Ernoffsson et al. 1996), der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Wachstumsfaktoren wie der Vascular endothelial growth factor (VEGF) und der Platelet derived growth factor (PDGF), zahlreiche Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1), E-Selectin, P-Selectin und der CD40- Ligand (Camerer et al. 1996; Zhou et al. 1998), Plasmalipoprotein, LDL und Phorbolster. (Marti et al. 1997; Tsao et al. 1984; Levy et al. 1981; Schwartz et al. 1981; Schuff- Werner et al. 1989; Darke et al. 1991; Weis et al. 1991; Fei et al. 1993; Meade et al. 1986; Constantino et al. 1977; Simpson et al. 1983; Hoffman et al. 1994). Die Stimulation vollzieht sich auf der Transkriptionsebene. Dies induziert eine prokoagulatorische Aktivität (Chapmann et al. 1985) durch

Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (nuclear factor kappa B) (Bierhaus et al 1995; Bohrer et al 1997; Mackman et al. 1991/2000; Holschermann et al 1997), AP-1 (activated protein-1) (Bierhaus et al 1995, Moll et al 1995), Egr-1 (early growth response-1) (Bierhaus et al 1997; Mechtcheriakova et al 2001; Group et al 1996; Cui et al 1996) zur Transkription des TF-Gens (Wilcox et al. 2002; Connolly et al. 1996; Cui et al. 1996).

Somit stellt sich der TF durch seine multiplen regulatorischen Modifikationsfähigkeiten als induzierbares „Aktivations- Effektor- Gen“ dar, wobei nach der Stimulation die Oberfläche eines einzelnen Monozyten mit bis zu 17000 TF-Molekülen besetzt sein kann (Edgington et al. 1991).

Die Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne des TF im Vergleich zur Gerinnungsaktivierung durch die extrazelluläre Domäne ist Inhalt vieler Studien.

In knock-out Mäusen resultierte die Inaktivierung des TF-Gens in vivo in Entwicklungsdefekten, vor allem der Vaskulogenese der Mäuseembryonen, und führte zum Tod des Embryos. Wurde allerdings in diesen TF-knock-out Mäusen eine Mutante von TF, die keine zytoplasmatische Domäne besitzt, überexprimiert, überlebten die Tiere. Für die Embryonalentwicklung ist deshalb die hämostatische Funktion des TF entscheidend. Daneben bestehen Hinweise auf eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden über den TF z.B. bei Tumorinvasion und Metastasierung, wo die zytoplasmatische Domäne von Bedeutung ist. Dieser Prozeß ist unabhängig von der proteolytischen Aktivität von FVIIa (Ott et al. 1998; Bromberg et al. 1995/1999; Mueller et al. 1992; Mueller und Ruf 1998).

Der TF wird in vivo mittels proinflammatorischer Stimuli im Rahmen einer Entzündungsreaktionen bei Sepsis (Ruf und Edgington 1994), Atherosklerose und Tumorleiden aktiviert (Huang et al. 1997; Mueller et al. 1998; Zhang et al. 1994). Es kommt dabei zur vermehrten Expression von TF auf Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen (Chapman et al. 1985; Scarpati et al. 1987; Lyberg et al 1982; Tipping et al. 1988; Levy et al. 1981).

Nachfolgend die Bedeutung des TF für die Pathogenese einzelner Krankheiten.

In atherosklerotischen Plaque wird eine erhöhte TF-Aktivität beobachtet (Wilcox et al. 1989/2002; Thiruvikraman et al. 1996; Marmur et al. 1996; Annex et al. 1995). Bei der Plaque-Ruptur während des akuten Herz-

infarktes spielt der TF eine entscheidende Rolle bei der Thrombusbildung. (Fuster et al. 1996; Darke et al 1989; Wilcox et al. 1989; Landers et al. 1994; Thiruvikraman et al. 1996; Ichikawa et al. 1996; Hatakeyama et al. 1997; Muhlfelder et al. 1999; Marmur et al. 1996). Daneben ist die Konzentration der zirkulierenden TF bei einem akuten Infarkt ereignis sowie bei instabiler Angina pectoris viel höher im Vergleich zur stabilen Angina pectoris bzw. bei gesundem Probanden. Durch die Verschiebung des hämostatischen Gleichgewichts zugunsten prokoagulatorischer Aktivität kann der TF sowohl bei der Entstehung lokaler thrombotischer Komplikationen als auch für den Verlauf des akuten Koronarsyndroms von besonderer Bedeutung sein (Ott et al. 1998; Levi et al. 1993; Semeraro et al. 1992).

Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen vermögen, wie bereits erwähnt, die zelluläre Immunantwort und Entzündungsreaktion durch eine Vielzahl inflammatorischer und immunologischer Signale zu stimulieren. Dies führt zu einer vorübergehenden Transkription des TF-Gens mit nachfolgender Hyperkoagulabilität und Thrombusformation und stellt somit einen wichtigen Mechanismus auf dem Wege der Entstehung einer Verbrauchskoagulopathie im Rahmen des septischen Geschehens dar. Dies kann in Multiorganversagen und Tod enden. (Luther et al. 1990; Takahashi et al. 1994; Ruf und Edgington 1994; Creasey et al. 1993).

Ein Zusammenhang zwischen Tumorerkrankungen und thromboembolischen Ereignissen ist seit dem 19. Jahrhundert bekannt (Dano et al. 1985). Er wird auf eine erhöhte Konzentration von Fibrin in Tumorzellen zurückgeführt (Nash et al 2001). Nicht selten werden die Tumorpatienten durch thromboembolische Ereignisse auffällig und in diesem Zusammenhang wird ein neoplastischer Prozess diagnostiziert. Die Erklärung dafür wäre ein Ungleichgewicht des Koagulationssystems, dass sich zugunsten der Thrombosebildung anstatt der Fibrinolyse bemerkbar macht (Nash et al 2001).

Die TF-Expression bei den Tumorzellen scheint einen außerordentlichen Effekt auf deren Neovaskularisation und Invasivität zu haben. Dabei scheint die TF-Konzentration die Transkriptionsrate des proangiogenetischen Faktors (VEGF) sowie die des angiogenetischen Gens Thrombospondin zu regulieren. Dabei produzieren tumorassoziierte Endothelzellen den TF (Contrino et al. 1996). Dieser Prozeß wird durch den VEGF unterstützt (Clauss et al 1990).

Im Rahmen maligner Erkrankungen entfalten Onkogene ihre Funktion über die Wirkung der von ihnen kodierten Onkogenprodukte bzw. Proteine. Die Einteilung der Onkogene kann aufgrund der Funktion ihrer Produkte erfolgen: 1. Wachstumsfaktoren; 2. Wachstumsfaktor-Rezeptoren; 3. Tyrosinkinasen; 4. G-proteinähnliche Proteine; 5. Transkriptionsfakto-

ren und 6. sonstige Onkogenprodukte. Die von Onkogenen kodierten Proteine können auf verschiedenen Ebenen wirksam werden:

1. Auf der Zelloberfläche können sie als Wachstumsfaktor-Rezeptor fungieren oder als Wachstumsfaktor die eigene (autokrine) oder andere Zellen stimulieren.
2. Im Zytoplasma können sie an der Übermittlung von Wachstumsstimulierenden Signale beteiligt sein.
3. In Zellen können sie als nukleäre Transkriptionsfaktoren für andere Gene fungieren.

Onkogene, die einen Wachstumsfaktor kodieren, bewirken eine direkte Wachstumsstimulation. So kodiert z.B. das sis-Onkogen den Wachstumsfaktor PDGF (Platelet-derived growth factor) der Thrombozyten. Dadurch kann ein autokriner Wachstumsmechanismus unterhalten werden, der das Zellwachstum unabhängig vom exogenen Wachstumsfaktor macht. Parakrine Wachstumsmechanismen unterhalten Onkogene, deren Produkt die Produktion von Wachstumsfaktoren in anderen Zellen induziert, die dann ihrerseits das Wachstum der Tumorzelle stimuliert. Beispielweise können Leukämiezellen den Tumor-Nekrose-Faktor produzieren (TNF). Der TNF induziert in Endothelzellen die Bildung vom Kolonie-stimulierenden Faktor (CSF), der dann wiederum über entsprechende Rezeptoren auf den Leukämiezellen deren Wachstum stimuliert.

Beim autokrinen Wachstumsmechanismus kommt es durch die Aktivierung eines Onkogens zur Produktion eines Wachstumsfaktors. Dabei kann das Onkogenprodukt selbst ein Wachstumsfaktor sein, oder das Onkogenprodukt führt indirekt zur Produktion eines Wachstumsfaktors, indem es ein Wachstumsfaktor-Gen stimuliert. Wenn dieser Wachstumsfaktor an seinem Rezeptor auf der Zelloberfläche bindet und ihn aktiviert, erreichen wachstumsstimulierende Signale über einen Signalvermittler den Zellkern. Bei der parakrinen Wachstumsstimulation bewirkt das Produkt des aktivierten Onkogens die Produktion von Wachstumsfaktoren in einer zweiten Zelle, die dann über den Wachstumsfaktorrezeptor auf der Tumorzelle wirksam werden. Die meisten Onkogenprodukte greifen auf der zweiten Ebene (im Zytoplasma) in die Wachstumsregulation ein. Ihre Produkte sind an der Regulation der Signalübermittlung beteiligt, d.h. dem Transport der Wachstumsfaktoren von der Zelloberfläche an die entscheidenden Strukturen im Zellinneren. Hierzu gehören die Tyrosinkinase und die G-Protein-ähnlichen Proteine. Protoonkogenprodukte mit Tyrosinkinase-Aktivität sind z.B. src und abl, die Phosphatgruppen von ATP auf Tyrosinreste von Zielproteinen (z.B. Signalübermittler) übertragen und damit deren funktionellen Zustand ändern. Guanin-Nukleotid-bindende Proteine, kurz G-Proteine genannt, binden an Rezeptoren, deren Konformation sich durch Interaktion mit den Liganden geändert hat. In der GTP-gebundenen aktiven Form können sie weitere Enzyme, sog.

Intrazelluläre Effektoren, aktivieren und damit die Signalübermittlung beeinflussen.

Die TF-Konzentration in den Tumor-assoziierten Endothelzellen korreliert mit dem Malignitäts- und Differenzierungsgrad des Tumors (Hamad et al. 1996).

Eine entscheidende Rolle spielt der TF angesichts seiner vielseitigen Beteiligung an der Tumorangio-genese. Er kann für eine erhöhte mitogene Aktivität der Endothelzellen, eine gesteigerte Transkriptionsrate des vascular endothelial growth factor (VEGF), sowie eine verminderte Transkription des angiogenetischen Thrombospondin (Tsp2) im Falle einer Überexpression von TF verantwortlich gemacht werden. In vivo führt das zu einem schnelleren Tumorwachstum und bietet ideale Bedingungen für eine breite hämatogene Metastasierung (Zhang et al. 1994). Bei der Tumorangio-genese induzieren TNF- α und VEGF die TF-Produktion (Clauss et al. 1996).

Die molekularen und zellulären Mechanismen, die für die Metastasierung bösartiger Tumoren verantwortlich sind, ähneln in vielen Aspekten denen der Wundheilung. Diese sind aber in den Tumorzellen häufig fehlreguliert.

Voraussetzung für die Metastasierung ist die Adhäsion der Tumorzelle an das Endothel einer Kapillare, die zur Plättchenaggregation, Retraktion der Endothel-junktion und Exposition der darunterliegenden Basalmembran führt. Metastasen können sich bilden, wenn zirkulierende Agglomerate von Tumorzellen, Thrombozyten und Lymphozyten in Kapillaren über Adhäsionsmoleküle Kontakt zum Endothel aufnehmen. Diese Kontaktaufnahme liefert das Signal zur Öffnung der endothelialen Zelljunktions. Dadurch können die Tumorzellen über weitere Adhäsionsmoleküle an Rezeptoren auf der Basalmembran binden.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der proteolytische Aktivierung und in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne TF die Zellmigrationsprozesse beeinflusst. Zugrundeliegende Mechanismen sind Inhalt dieser Studie.

Ein gemeinsamer zellbiologischer Mechanismus der Tumormetastasierung, der Angiogenese und der Neovaskularisation ist die Zellmigration. Eine Vielzahl von Faktoren nehmen Einfluss auf die Zellmigration einzelner Zellen.

Dazu vorerst eine kurze Zusammenfassung des strukturellen Aufbaus der Zelle. Der Name „Zelle“ wurde ursprünglich von dem Engländer Hooke

1665 für die Hohlräume, die er im Flaschenkorken sah, verwendet und von dem lateinischen Wort „Cella“ in das englische „Celles“ abgeleitet. Die allgemeine Zytologie beschreibt den grundsätzlichen Aufbau und die Leistungen der Zellen. Eine Zelle ist die kleinste selbständige Funktionseinheit eines Organismus mit allen Zeichen des „Lebens“. Zur vollen Funktionsentfaltung ist das Zytoplasma notwendig. Zu den Charakteristika des „Lebens“ gehören:

- Stoffwechsel
- Wachstum
- Fortpflanzung/ Zellteilung
- Reaktions- und Regulationsvermögen
- Bewegung

Der Mensch und die meisten Tiere bestehen aus Zellverbänden, in denen die Zellen auf bestimmte Aufgaben spezialisiert sind und nur Teilfunktionen im Interesse des Gesamtorganismus ausüben. Durch Zusammenschluss gleichartig gebauter (differenzierter) Zellen entstehen die Organe. Die verschiedenen Zellen der Organe unterscheiden sich in Form und Größe. Trotz aller Form- und Funktionsunterschiede lässt sich in allen Zellen ein gemeinsames Bauprinzip erkennen. Sie bestehen aus den zwei Zellanteilen a) Zytoplasma und b) Nukleus.

Das Zytoplasma macht die Hauptmasse der meisten Zellen aus. Es lässt sich wiederum in fünf Hauptbestandteile trennen:

1. die Zytomembran
2. das Zytosol
3. die Zellorganellen
4. das Zytoskelett
5. die paraplastischen Einschlüsse

Die Zytomembran besteht aus Phospholipidmolekülen, die einen hydrophilen Kopf und zwei hydrophobe Ketten besitzen. Sie bilden in wässriger Lösung einen bimolekularen Film (Phospholipiddoppelschicht), wobei die hydrophoben Enden sich jeweils gegenüberstehen. Nach dem „Fluid Mosaic Modell“ „schwimmen“ in und auf der Phospholipiddoppelschicht globuläre Proteine. Man unterscheidet periphere Proteine, die sich leicht von der Membran trennen lassen, und integrierte Proteine, die in der Membran relativ fest verankert sind.

Voraussetzung für jede Zellmigration, Immunreaktion und für die Metastasierung ist eine Zellinteraktion zwischen verschiedenen Zellen. Diese Interaktionen werden durch Moleküle vermittelt, die einen engen „Zell-zu-Zell-Kontakt“ ermöglichen. Sie werden in der Gruppe der sog. Adhäsionsmoleküle zusammengefasst. Die Adhäsionsmoleküle stellen dabei nicht nur Zellkontakte her, sondern dienen auch der Signalvermittlung in die Zelle. Jedes Adhäsionsmolekül geht dabei als Rezeptor auf der Oberfläche der einen Zelle eine Bindung mit einem definierten Liganden auf

der Oberfläche der anderen Zelle, der extrazellulären Matrix oder dem Stroma ein. Aufgrund von Sequenzhomologien und Strukturähnlichkeiten werden die Adhäsionsmoleküle in Familien eingeteilt: Immunglobulinfamilie, Integrine, Selektine und Cadherine.

Die Moleküle der Immunglobulinfamilie sind an den Immunreaktionen beteiligt, die Integrine ermöglichen zusätzlich Kontakte mit der extrazellulären Matrix (z.B. bei der Leukozytenadhäsion und Entzündungsreaktion). Die Selektine vermitteln Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und der Gefäßwand (z.B. bei der Extravasation). Die Cadherine sind erforderlich bei der Morphogenese und der Kontrolle der Zellinvasivität (z.B. beim Tumorwachstum) (Konos et al. 1991; Fox et al. 1996). Nach der Bindung eines Liganden an den Rezeptor werden die Signale weitergeleitet (Clark et al. 1995). Beispielsweise in Folge der Interaktion zwischen den neutrophilen Granulozyten und dem Integrin kommt es nach der Signaltransduktion zu einer Migration des neutrophilen Granulozyten auf der Seite der Verletzung (Marlin et al. 1986; Meerschaert et al. 1994). Ähnliche Situationen sind bei der Angiogenese, bei der embryonalen Entwicklung und der Tumormetastasierung vorzufinden (Schwartz et al. 1995; Hynes 1992; Rosales et al. 1995).

Betrachtet man sich das Zytoskelett und dessen typische Veränderungsprozesse während der Migration, so findet man verschiedene filamentöse und tubuläre Strukturen. Man unterscheidet:

1. Aktinfilamente
2. Intermediärfilamente
3. Mikrotubuli

Die Filamente werden durch Aneinanderlagerung von Proteinen gebildet. Aktin ist ein globuläres Proteinmolekül (G-Aktin), von dem jeweils 400 eine perlschnurartige Kette bilden, welche als Aktin-F (fibrös) bezeichnet wird. Jeweils zwei solche miteinander verdrillten Ketten bilden das Aktinfilament. Die Aktinfilamente bilden kein kontraktiles System, sondern beeinflussen die Zellform durch Assoziation bzw. Dissoziation monomerer Aktinmoleküle. Das Zusammentreten der kugelförmigen F-Aktinmoleküle durch hydrophobe Wechselwirkungen zu einem F-Aktinkettenmolekül entspricht im Prinzip der Bildung von dünnen Filamenten in der Skelettmuskulatur. Auf den Funktionsmechanismus wird in Zusammenhang mit der Muskulatur später eingegangen. Die Aktinfilamente sind an dem Membranprotein verankert. Die Verankerung ist durch das Bindungsprotein Vinculin gegeben. Damit fixieren sich die Rezeptoren an der Zelloberfläche und schränken die Lateraldiffusion innerhalb der Membran ein.

Die Mikrotubuli stellen lange Hohlzylinder dar, die die gesamte Zelle in Form eines feinen zytoplasmatischen Netzwerkes durchziehen. Ein Mikrotubulus besteht aus einer großen Zahl von kugelförmigen, aus einer α -

und β - Untereinheit bestehenden Tubulin-Molekülen. Durch perlschnurartige Anordnung und helikale Aufwicklung der Tubulin-Moleküle entsteht ein zylinderförmiger Hohlraum mit einem Innendurchmesser von 15 nm. Ähnlich wie die Aktinfilamente sind die Mikrotubuli an der Verankerung von Zellmembranproteinen sowie an der Stabilität und Form der Zellmembran beteiligt. Da sie häufig die Zellmembran mit einer zellkernnahen Zone verbinden, könnten sie auch an der Informationsübertragung von der Zelloberfläche zum Zellkern beteiligt sein (Clark et al. 1998; Price et al. 1998; Kupfer et al. 1982).

Die intermediären Filamente bestehen aus biochemisch und immunologisch unterscheidbaren Untereinheiten. Sie bilden stabile, für die verschiedenen Zelltypen charakteristische Komponenten des Zytoskeletts, z.B. das Keratin der Epithelzellen sowie Desmin und Vimetin, die in glatten Muskelzellen, Mesenchymzellen, Gliazellen und Epithelzellen vorkommen.

Das Zytoskelett ist eine Stützstruktur, die der Zelle ihre Form gibt und gegen Kräfte, z.B. osmotische Kräfte, stabilisierend wirkt.

Das Zytoplasma einer lebenden Zelle befindet sich in einer ständigen Durchmischungsströmung, auch als Plasmaströmung bekannt. Eine Ortsbewegung im Körper ist auf vier Arten möglich:

1. Amöboide Bewegung
2. Flimmerbewegung
3. Muskelbewegung
4. Gerichtete Bewegung, Chemotaxis

Die amöboide Bewegung ist die Bewegung ganzer Zellen. Unter Ausnutzung der Plasmaströmung streckt die Zelle Zytoplasmafortsätze (Pseudopodien) aus und schiebt sich unter fließender Bewegung des Zelleibes durch die Gewebsspalten. Es kommt zur Bündelung von den Aktinfilamenten (s.u.). Dies führt zur Streckbewegung der Zelle und wird als „Filopodia“ bezeichnet. Die Bildung netzwerkartiger, submembranärer Strukturen dagegen wird als „Lamellipodia“ bezeichnet (Kozma et al. 1995; Nobes et al. 1995; Ridley et al. 1992).

Die Flimmerbewegung ist eine Bewegungsart, die nur mit Hilfe besonderer Zellorganellen, der Kinozilien, durchgeführt werden kann. Diese auch als Flimmerhärchen bezeichneten Einrichtungen finden sich als dichter Zellüberzug im Flimmerepithel (der Luftwege) oder als einzelne Geißeln bei den Spermien.

Notwendig für die Muskelbewegung sind besondere metaplasmatistische Strukturen, die Myofibrillen, die aus kontraktile Eiweißkomplexen (Aktin und Myosin) bestehen. Die Assoziation der Aktinfilamente mit Myosin, auch als „Stress fibers“ bekannt, führt zur Kontraktion der Muskulatur (Ridley et al. 1992; Nobes et al. 1995).

Betrachtet man sich die Physiologie der Muskelbewegung und den Funktionsmechanismus der Aktinfilamente, so besteht die Muskulatur aus mehreren Tausend Muskelfaserbündeln, die wiederum aus etwa Tausend Muskelfasern bestehen. Jede Muskelfaser enthält einige hundert Muskelfibrillen. In ihnen verlaufen abwechselnd Schichten aus den Eiweißarten Aktin und Myosin.

Das Myosinmolekül besitzt einen zweigeteilten Kopf (ATPase beinhaltend), der gelenkartig mit einem Halsstück verbunden ist (Kopf+Hals = sog. Schweres Meromyosin). An dieses schließt sich wiederum gelenkartig das Schwanzstück (sog. Leichtes Meromyosin) an. Ein Myosinfilament besteht aus ca. 150-360 solcher Moleküle, die bündelartig zusammengefasst sind. Die gelenkartige Beweglichkeit des Kopf- Halsstückes ermöglicht die reversible Bindung des Myosins an das Aktin (Aktinomyosinkomplex) und das Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente (Filamentgleiten).

Aktinfilamente bestehen aus Aktin, Tropomyosin sowie bei quergestreifter Muskulatur Troponin bzw. bei glatter Muskulatur Cadmodulin. Etwa 400 kugelförmige globuläre Aktinmoleküle (G- Aktin) liegen entlang eines fadenförmigen Eiweißkörpers, Tropomyosin, (über Aktin-Aktin-Bindungsstellen (perlschnurartig) hintereinander, und bilden F-Aktin. Das Tropomyosin windet sich um das Aktinfilament, wobei ca. alle 40 nm ein Troponinmolekül angeheftet ist.

Troponin (TN) besteht aus drei Untereinheiten: a) TN-C, das die Ca^{2+} -Bindung eingeht b) TN-T, das TN mit Tropomyosin verbindet und c) TN-I, das in Ruhe die Brückenbildung zwischen Myosin und Aktin verhindert. Dieser Hemmeffekt von TN-I wird aufgehoben, wenn TN-C mit Ca^{2+} -gesättigt ist. Während der Kontraktion legt sich der Tropomyosin „Faden“ in die Rinne zwischen zwei Aktin-F-Ketten und gibt dabei deren Bindungsstellen für das Myosin frei. Als „Schalter“ wirkt dabei das Ca^{2+} -sensitive Troponin.

Die Myosin- und Aktinfilamente eines Sarkolems sind so angeordnet, dass sie ineinander gleiten können, d.h. die jeweils dickeren Myosinfäden liegen zwischen den dünneren Aktinfäden. Das Zusammenspiel dieser „Fäden“ ist Voraussetzung für die Muskelbewegung. Von den Myosinfäden gehen rechtwinklig Querverbindungen zu den Aktinfäden ab. Bei der Kontraktion klappen die Aktinfäden im Winkel um 45° um, machen eine „ruderartige“ Bewegung und werden so zwischen die Myosinfäden geschoben. Dieser Vorgang findet in allen Abschnitten der Muskelfibrillen statt. So verkürzt sich der gesamte Muskel. Danach lösen sich die Querverbindungen wieder, und die Fäden nehmen ihre Ausgangsstellung ein. Der Muskel erschlafft.

Zur Kontraktion der Muskulatur ist neben Aktin und Myosin u.a. die Anwesenheit von Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATP (Adenosintriphosphat) und ATPase notwendig. Ca^{2+} verbindet sich mit Troponin, wodurch Tropomyosin seine hemmende Wirkung auf die Aktin- Myosin- Verbindung verliert. Für den Transport des Ca^{2+} aus und in die longitudinalen Tubuli wird ATP verbraucht.

Auch die beiden Myosinköpfe eines Myosinmoleküls binden je ein ATP. Nach Verbindung von Aktin und Myosin aktiviert Aktin dabei die ATPase des Myosinkopfes, so dass an ihn gebundenes ATP gespalten wird. Dazu wird Mg^{2+} benötigt. Dieser Prozess ist zur Kippung des Myosinkopfes notwendig.

Ähnlich funktioniert es bei der glatten Muskulatur. Der Unterschied ist lediglich, dass der primäre intrazelluläre Rezeptor für Ca^{2+} hier statt des Troponin C das Calmodulin ist. Calmodulin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 16700 Dalton mit einer starken strukturellen Ähnlichkeit zu Troponin C. Der Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex bildet zusammen mit einem weiteren Protein ein Enzym, die Myosin light chain kinase (MLCK) (Gallagher et al. 1997; Van Hinsberg 1997; Michel et al. 1999). Es ist in der Lage das leichte Meromyosin oder die „leichte Kette“ (engl. light chain) des Myosins zu phosphorylieren (Burrige et al. 1996; Adelstein et al. 1987). Das Myosin ändert daraufhin seine Konformation, die es dem Aktin ermöglicht, die ATPase des Myosins zu aktivieren. Daraufhin kommt es zur Kontraktion. Ein Absinken des Ca^{2+} und eine Dephosphorylierung des Myosins durch ein weiteres Enzym (Myosin light chain phosphatase (MLCP)) beendet die Kontraktion wieder und der Muskel erschlafft (Gallagher et al. 1997; Gong et al. 1996; Somylo et al. 2000).

Auch die Exozytose der sekretorischen Zellen ist wahrscheinlich eine primitive Art von Motorik. Ca^{2+} -Einstrom und Calmodulin- Ca^{2+} - Bindung beeinflussen hier das Mikrotubulus- Mikrofilament- System. Darüber hinaus spielt der Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex eine Rolle beim Zellwachstum. Er reguliert auch eine ganze Reihe von Enzymen in Leber, Niere, Herz, Pankreas, Gehirn, Spermien und Thrombozyten etc. (Van Hinsbergh et al. 1997; Michel et al. 1999).

Die gerichtete Bewegung, auch als Chemotaxis bekannt, wird ausgelöst, wenn pathogene Keime in Körpergewebe eingedrungen sind. Mittels Chemotaxis werden die Zellen des unspezifischen Immunsystems zum Ort des Geschehens angezogen. Dies wird durch den Konzentrationsgradient chemischer Substanzen eingeleitet und aufrechterhalten. Zu chemotaktisch wirksamen Stoffen zählen PDGF (Platelet derived growth factor), Prostaglandine, Leukotriene etc. So können beispielsweise die neutrophilen Granulozyten aus dem Blut zunächst an die Gefäßwand anhaften und sich anschließend zu dem geschädigten Ort bewegen (Migration).

Dort können sie die Erreger vorerst umschließen und danach endozytotisch in sich aufnehmen (Phagozytose).

Betrachtet man die Signalweiterleitung in der Zelle und die Faktoren, die zu einer Migrationssteigerung führen, so stößt man auf die essentielle Rolle von Rho- GTPasen (Hall 1998).

Rho- GTPasen sind Anfang der 90er entdeckt worden. Sie gehören zu der Ras- Superfamilie (Macara et al. 1996), und kommen submembranös im Zytoplasma vor. Prototyp der Rho- GTPasen Familie sind Rac1, Cdc42, und RhoA. Ähnlich wie die Ras Proteine sind sie an G- Protein- Rezeptoren gekoppelt. Ihre Funktion erstreckt sich von der Aktinformation (Ridley et al. 1992) über die Zellmigration, Zell-Zell-Adhäsion, Zellmatrix-Interaktion, Gen-Expression und Regulation der Transkriptionsfaktoren, Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur, Endothelpermeabilität, Plättchenaktivierung und Leukozytenmigration (Randolph et al. 1998) bis hin zur Zellinvasion und Metastasierung der Tumorzellen (Riedley et al. 1992). Rho- GTPasen werden durch ankommende Signale aktiviert und aktivieren ihrerseits ihnen untergeordnete Effektorproteine und Enzymkinasen (Aspenstrom 1999; Boettner et al. 1999; Bishop et al. 2000). Dadurch können sie das Aktin-Zytoskelett und die Transkription in der Zelle beeinflussen (Hall 1998). Sie haben eine entscheidende Rolle bei der Zellmigration, Tumordinvasion und -metastasierung (Hanahan et al. 2000). Ihre Funktion wird durch verschiedene G-Proteinrezeptoren, wie Tyrosinkinase- Rezeptor, Zytokin- (Hall et al. 1998; Kjoller et al. 1999) sowie Adhäsionsrezeptoren reguliert (Ren et al. 1999; Clark et al. 1998; Schwartz 1997). Die genannten G-Proteinrezeptoren (GPCR) dienen erst nach Bindung eines löslichen Liganden als Rho-GTPase- Aktivatoren. Als solche Liganden fungieren unter anderem zur Aktivierung von RhoA LPA (Lysophosphatidsäure) (Liu et al. 1998; Cook et al. 1998; Ridley et al. 1992), Sphingosine 1- Phosphat, Bombesin, Thrombin und Endothelin (Ren et al. 1999; Seasholtz et al. 1999; Moolenaar 1999). Zur Aktivierung von Rac1 dienen Insulin, PDGF (Platelet- derived growth factor) sowie EGF (Epidermal growth factor), wobei PDGF und Insulin ihre Funktion mit Hilfe von Phosphatidyl-inositol-3-Kinase (PI-3K) ausüben können (Nobes et al. 1995; Rodriguez- Viciano et al. 1997; Timokhina et al. 1998). PI3-K aktiviert Tiam-1 (T- lymphoma- invasion and metastasis) (Michiels et al. 1997; Sander et al. 1998). Tiam-1 kann nach seiner Aktivierung Rac-1 und Cdc42 aktivieren (Habetes et al. 1994). Dieser Regelkreis beeinflusst die Zellmigration entscheidend (Michiels et al. 1995; Stam et al. 1998; Bourguignon et al. 2000). Bradykinin, TNF α und IL-1 führen zur Cdc42 Aktivierung (Puls et al. 1999; Wojciak- Stothard et al. 1998) (Abb. 3). Wie alle anderen G-Protein- Rezeptoren können auch diese in einer aktiven oder inaktiven Form vorliegen. Sie bestehen aus

den drei Untereinheiten α_s (bzw. α_i), β und γ . Die α - Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für GDP (Guanosin- diphosphat) bzw. GTP (Guanosin- triphosphat). An die α - Untereinheit ist in Ruhe GDP gebunden. Reagiert nun ein Hormon mit dem Rezeptor, zieht der Rezeptor nach einer Konformationsänderung sein G- Protein an sich. Nach dem Austausch von GDP gegen GTP kann der Rezeptor/ G-Proteinkomplex den Liganden nicht mehr halten. Das G-Protein verlässt den Rezeptor und zerfällt in GTP- α_s - und $\beta\gamma$ - Untereinheiten. Für diesen Prozess stehen den Rho GTPasen direkte Regulatorproteine zur Verfügung (Abb. 3). Dabei wird mittels GEF (Guanine nukleotid Exchange factor) GDP gegen GTP ausgetauscht (Seasholtz et al. 1999). Während einige GEF, wie beispielsweise vav, unspezifisch auf verschiedene Rho- GTPasen wirken (Han et al. 1997, Olson et al. 1996), haben andere nur auf spezielle Rho- GTPasen wie IBC und p115 Rho GEF auf Rho (Hart et al. 1998), Tiam-1 (T-lymphoma invasion and metastasis) und STEF auf Rac1 (Hoshino et al. 1999; Michiels et al. 1995) sowie FGD1 auf Cdc42 (Olson et al. 1996) Einfluß. GTPase activating protein (GAP) beeinflusst die intrinsische GTPase- Aktivität, während der Guanine nukleotide dissociation inhibitor (GDI) den Austausch von GDP gegen GTP inhibieren kann (Kjoller and Hall 1999; Symons and Settleman 2000; Van Aelst and D'Souza Schorony 1997; Olofsson 1999). Daneben existiert die Möglichkeit einer direkten Rho- GTPase Aktivierung, nachdem Integrin (Tapon et al. 1997) an eine extrazelluläre Matrix (ECM) wie Fibronectin (FN), Vitronectin (VN), Kollagen oder Laminin bindet und dadurch die Fähigkeit zur GTPasen Aktivierung erlangt (Barry et al. 1997; Clark et al. 1998; Price et al. 1998).

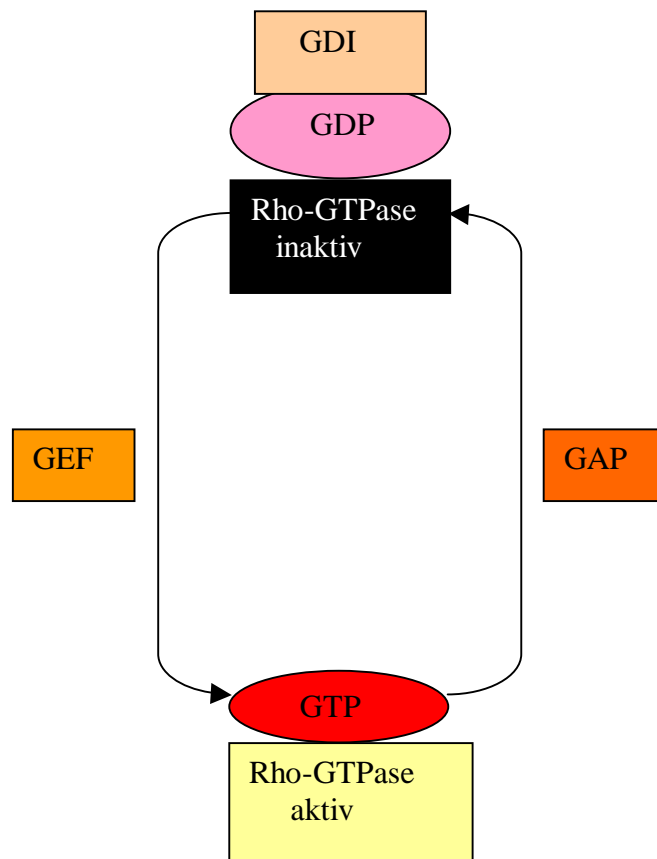


Abb. 3 Schematische Darstellung des Aktivierungs-/ Inaktivierungsmechanismus der Rho-GTPasen

Trotz einer gegenseitigen Kooperation zwischen den Rho- GTPasen sowie zwischen Rho- und Ras- GTPasen, erledigt jedes Mitglied der Rho-GTPasen nach der Aktivierung eine bestimmte Aufgabe, indem es die ankommenden Signale über spezifische „Targetproteine“ an intrazelluläre Effektorproteine weiterleitet (Van Aelst et al. 1997; Hall 1998) (Abb. 4). Eine Vielzahl von Effektorproteinen ist an der Zellmotilität beteiligt, während andere eher zur Zelladhäsion führen. Rac1 aktiviert Phosphatidylinositol-5-Kinase (PI-5K), die durch die Aktin- Polymerisation die Interaktion zwischen Aktin und Plasmamembran bewirkt und damit zur Formation von Lamellipodia führt (Hartwig et al. 1995; Tsukita et al. 1997; Chrzanowska- Wodnicka et al. 1996). Daneben teilt Rac1 einige „Targetproteine“ mit Cdc42, wie beispielsweise IQGAP (Immuno quality assured guanosine triphosphatase- activating protein) (Kuroda et al. 1996; Erickson et al. 1997), Par-6 (Platelet aggregation receptor-6) und PAK (P21-activated kinase). PAK ist eine Serin-/ Threonin- Kinase. Rac1 und Cdc42 können, nachdem sie an GTP gebunden aktiviert vorliegen, mit PAK

interagieren und die PAK- Kinase stimulieren (Manser et al. 1994/1995; Knaus et al. 1995; Martin et al. 1995). PAK kann ihrerseits JNK (C- Jun NH₂-terminal Kinase) und MAPK p38 (mitogene activated protein Kinase) aktivieren (Coso et al. 1995; Minden et al. 1995). Dabei wird über JNK und MAPK P38 die Gentranskription reguliert. PAK spielt eine große Rolle bei der Aktindynamik und Zelladhäsion. Zur Entfaltung ihrer Wirkung bedient PAK sich dreier Mechanismen. Auf der einen Seite kann sie durch Phosphorylierung von MLCK zur Abnahme der phosphorylierte MLC und demzufolge zur Zerlegung von „Stress fibers“ führen (Sanders et al. 1999). Auf der anderen Seite kann sie durch Phosphorylierung der MLC die Aktin/ Myosin Interaktion induzieren (Sanders et al. 1999). Drittens kann PAK mittels Phosphorylierung der LIM -Kinase (Localized leukocyte mobilization) das Aktinzytoskelett kontrahieren, indem sie Cofilin, ein aktindepolymerisierendes Protein, inhibiert (Arber et al. 1998; Yang et al. 1998; Edwards et al. 1999). IQGAP und Par-6 sind an Zelladhäsions- sowie Aktinpolarisationsprozessen involviert. IQGAP kann durch seine regulierende Wirkung auf α - Catenin, β - Catenin (Kuroda et al. 1996) und E- Cadherin zur Zell- Zell- Adhäsion führen. Es geht mit F-Aktin eine Bindung ein (Fukata et al. 1997; Erikson et al. 1997). Par-6 kann als ein weiteres „Targetprotein“ der Rac1 und Cdc42 über Par-3 (Platelet aggregation receptor- 3) zur Zellpolarisation und -adhäsion führen, nachdem er mit aPKC (atypical protein kinase C) eine Bindung eingegangen ist (Qiu et al. 2000; Joberty et al. 2000; Lin et al. 2000).

Nach der Interaktion von Cdc42 mit WASP (Wiskott-Aldrich Syndrom protein), ein Cdc42 spezifisches „Zielprotein“ (Miki et al. 1996; Aspenström et al. 1996; Kolluri et al. 1996), welches die Aktinpolymerisation reguliert, wird die Filopodiaformation induziert. Zuvor geht er mit Arp2/3 (assimilation regulatory protein) eine Bindung ein (Remol- O'Donnell et al. 1996; Symons et al. 1996; Welch et al. 1997; Miki et al 1998; Mullins et al. 1998; Machesky et al. 1998). MRCK (Mytonic dystrophy Kinase Related Cdc42-binding Kinase) ist ein weiteres Cdc42 spezifisches Effektorprotein, das nach seiner Aktivierung mittels ROK- (Rho- Kinase) ähnlicher Kinase MLC phosphoryliert (Leung et al. 1998), dadurch beteiligt es sich an der Aktinmyosin- Interaktion und deren Kontraktion. Daneben induziert MRCK die Filopodiaformation (Leung et al. 1998).

RhoA phosphoryliert neben PI5-K (Phosphatidylinositol 5- Kinase) (Toker 1998) und Dia (depolarization induced automaticity) die Rho- Kinase (ROK), welche eine Vielzahl der Zytoskelettproteine, einschließlich Myosinphosphatase, Adducin (Kimura et al. 1998; Fukata et al. 1999), ein neben Spektrin wichtiger Bestandteil des Plasmamembrans (Gardner et al. 1987), sowie ERM- Proteine (Ezrin/ Radixin/ Moesin Proteine) phosphorylieren kann (Matsui et al. 1998/1999). Die Phosphorylierung der

leichten Kette des Myosins (Kimura et al. 1996; Kawano et al. 1999) führt zur Aktin- Myosin- Interaktion (Amano et al. 1996). Diese wird durch antagonistische Wirkung von Rac1 und Cdc42 via PAK aufgehoben und erklärt die antagonistische Einflussnahme der Rac1 und Cdc42 auf Rho in manchen Zellen (Royal et al. 2000; Rottner et al. 1999; Van Leeuwen 1999; Sander et al. 1999). ERM- Phosphorylierung führt zur Assoziation des Aktins mit der Plasmamembran, die bedeutsam für Zelladhäsion und Zellmotilität ist. Adducin- Phosphorylierung führt zu deren Interaktion mit F- Aktin und folglich zur Zellmigration (Chrazanowska Wodnika et al. 1996; Kimura et al. 1996/1998; Amano et al. 1996; Burridge et al. 1996; Matsui et al. 1998; Shaw et al. 1998; Aspenstrom 1999; Boettner et al. 1999; Kaibuchi 1999; Ridley 1999). Dia interagiert mit Profilin, ein G-Aktin bindendes Protein, das die Aktinfilamente polymerisiert und zur „Stress fiber“ Formation führt (Watanabe et al. 1997/1999; Wassermann 1998). Eine weitere Aufgabe des Dias besteht in Stabilisierung und Polarisierung der Mikrotubuli (Palazzo et al 2001). PI5-K dient zusätzlich zur „Stress fibers“ Formation und Polymerisation der Aktinfilamente (Toker 1998; Gilmore et al. 1996).

PAR-1 Aktivität induziert die Rho- Aktivität (Klarenbach et al. 2003; Vouret-Craviari et al 2003), die eine erhöhte Zellpermeabilität zur Folge hat. Im Gegensatz dazu kann PAR-2 Rac1, PAK 21 (P21- activated Kinase) und ERK (extracellular signal regulated kinase) aktivieren und damit sich an der Pseudopodiabildung und der Chemotaxis beteiligen (DeFea et al 2000; Ge et al 2003). In einer bereits vor kurzem veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass PAR2 die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des TF induziert (Ahamed et Ruf 2004). Dieser Prozeß läuft über PMA (Phorbol 12- Myristate 13-acetate) Stimulation. An diesem Prozeß ist PKC α (Protein kinase C) involviert (Zinocheck et al 1992; Mody et al 1997; Dorfleutner et al 2003).

Es wurde gezeigt, dass die PKC α Aktivität unterhalb von PAR-2 von PC-PLC (Phosphatidylcholine Phospholipase C) abhängig ist (Exton 1994). Während die Aktivität von PMA sowie die TF- Phosphorylierung mittels PMA unabhängig von der PAR-2 Aktivität ist. PAR-2 und TF werden in den entzündlichen Zellen und in den Endothelzellen der Milz, den endothelassozierten Brustkrebszellen sowie in Monozyten und Makrophagen produziert (Nawroth et al 1986; Nystedt et al 1996; Drake et al 1993; Contrino et al 1996). Die erwähnten Rezeptoren spielen nur bei den Zellen eine Rolle, in denen sowohl TF als auch PAR-2 vorkommen. Dies ist beispielsweise bei den Blasentumorzellen (J82) sowie in einigen anderen Zellen nicht der Fall, so dass FVIIa abhängige Zellsignale in den Zellen nicht über PAR-2 weitergeleitet werden können (Petersen et al 2000; Prydz et al 2000; Camerer et al 1999).

Durch ihre zahlreichen lebensnotwendigen Funktionen ist es nicht verwunderlich, wie Studien an Rho- GTPase „knock-out“ Mäusen deutlich zeigen können, dass ein Defizit an Rho- GTPasen unverzüglich zum Tod führt (Sugihara et al. 1998).

Zusammenfassend hat Rac1 im Hinblick auf die Zellmigration eine sehr wichtige Funktion (Kjoller et al. 1999; Nobes et al. 1999). Auf der einen Seite durch die „Lamellipodia-“ Formation, auf der anderen Seite trägt er via PAK einen großen Beitrag zur Zellmigration bei (Kiosses et al. 1999; Sells et al. 1999). Cdc42 passt sich durch die Regulation der Zellpolarität und Bestimmung der Migrationsrichtung an den Migrationsvorgang in der Zelle an (Allen et al. 1998; Peppelenbosch et al. 1999). Rho beteiligt sich hauptsächlich mittels ROK an der Zellmigration bzw. an der Kontraktion der Muskulatur (Fukata et al. 1999; Seasholtz et al. 1999).

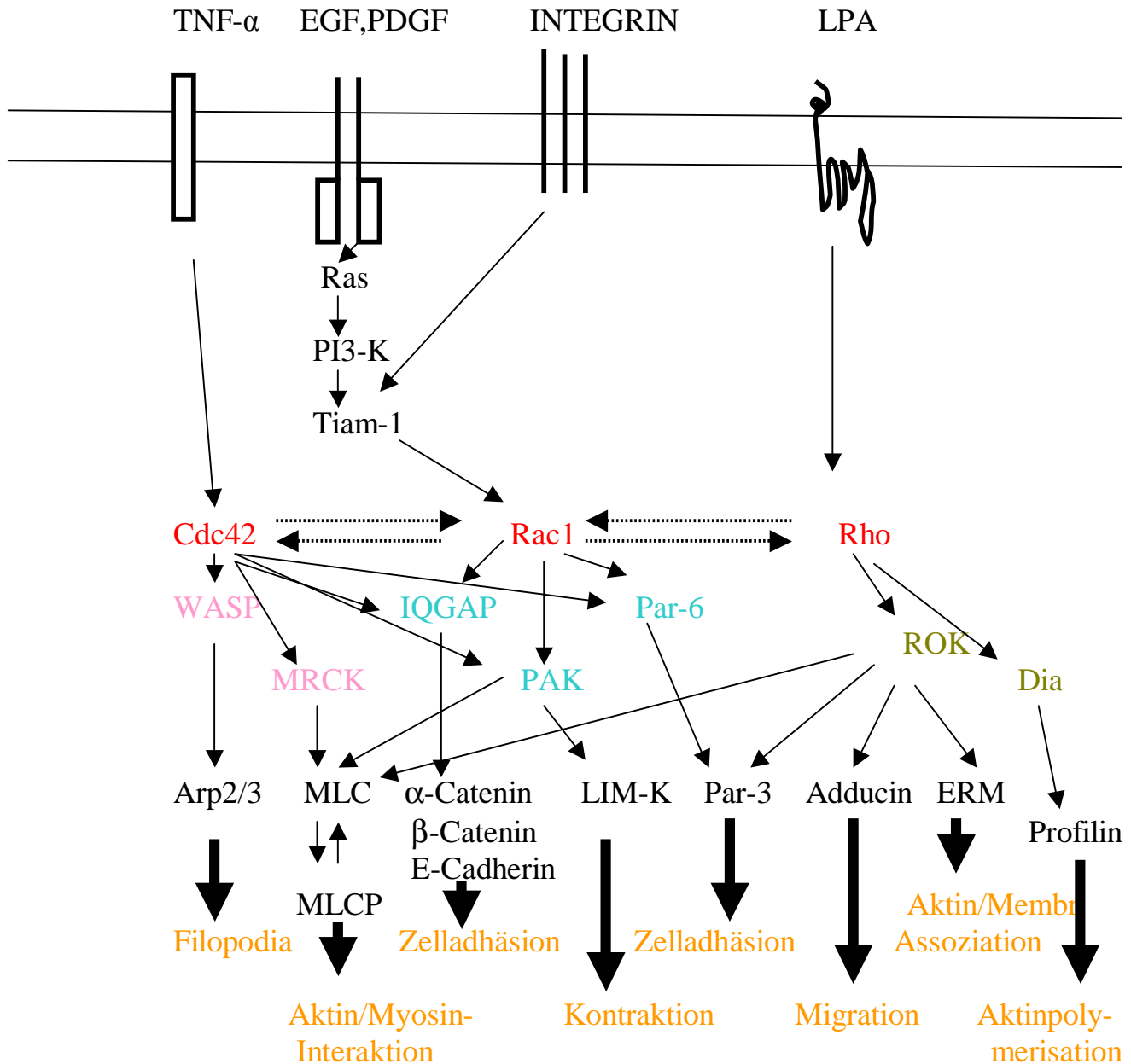


Abb. 4 Einfluss der Rho-GTPasen (rot) nach Bindung eines Liganden auf ihre Effektorproteine und der resultierende Effekt auf die Zelle (dicker Pfeil)

2. Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese gestellt, dass FVIIa unabhängig von seiner proteolytischen Aktivität über eine Bindung an den Tissue Factor Einfluss auf die Zellmigration hat.

Deswegen haben wir die Mechanismen der Migrationssteigerung von proteolytisch inaktivem FVIIa (FFR-FVIIa) beobachtet.

Insbesondere wurde untersucht, inwieweit eine Aktivierung von Rho-GTPasen für die Migrationssteigerung von Bedeutung ist.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

- Effectene Transfection Reagent, Qiagen, Valencia
- Quantitative cell Migration Assay, Fibronectin (FN), Vitronectin (VN) oder Collagen, Chemicon International, Inc., Temecula
- Zellkulturflaschen, Cellstar, Greiner Bio-one
- 96-well-Platten, Cellstar, Greiner Bio-one

3.2 Chemikalien und Lösungen

- FFR-FVIIa, Novo Nordisk
- DNA (GTPase)
- Trypsin, Promocell
- Dulbecco's MEM 25 MM HEPES (DMEM mit HEPES), Gibco
- Dulbecco's MOD Eagle Medium (DMEM), Gibco
- Fetal Bovine Serum (FCS), Biochrom
- Voll-Medium = DMEM + FCS (HI)*+ Penicillin-Streptomycin + L-Glutamin
- Trypan blue (Färbelösung), Chemicon
- Esel- Anti- Maus Antikörper, Immuno Research Laboratores
- Chemiluminescence Substrate, Roche Diagnostics Corporation
- Anti-c- myc Antikörper, (9 E 10), Santa Cruz

*)HI: Hitze-Inaktivierung des FCS unter Sterile Bedingung im Wasserbad bei 56°C für 30 Minuten

3.3 Geräte

- Brutschrank, Heraeus, Keudro
- Zellkultur-hood (steril), Heraeus, Keudro
- Neubauer-Zählkammer, Tiefe Depth Profondeur 0,100 mm, 0,0025mm², Brand
- Mikroskop, Zeiss, Axiovert 100
- Photometer, Dynatech, MR 500

3.4 Kulturbedingungen

J82 (ATCC) Zellen wuchsen in adhärenenten Kulturen in so genannten Monolayern, angeheftet an Plastik- Kulturgefäße aus Polystyrol (Cell-star). Die Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C und einem CO₂ Gehalt der

Luft von 6% zur Konstanthaltung des pH-Wertes des Mediums gehalten. Sie wurden in DMEM mit 1% Glutamin, 1% Penicillin und 1% Streptomycin sowie 10% fetales Kälberserum kultiviert.

3.5 Transfektion der J82

J82 Zellen wurden mittels liposomaler Transfektionfaktoren transfiziert. Ein Tag vor der Transfektion wurden die Zellen geteilt. Dabei wurden ca. 6×10^5 Zellen pro 60-mm Zellkulturflaschen in 5ml Medium verteilt. Die Zellen wurden bei 37°C und 6% CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20 µg Plasmid DNA mit 600 µl Pufferlösung (EC) und 100 µl Enhancer 10 Sekunden gemischt. Das Ganze wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 90 µl Liposomenlösung (Effectene) wurden hinzugefügt, für 10 Sekunden wurde gemischt und bei Raumtemperatur etwa 10 Minuten inkubiert. Dann wurden 5,4 ml DMEM mit Hepes dazugeben. Danach wurde dies auf die J82 gegeben und 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert.

Die Zellen wurden unter streng sterilen Bedingungen behandelt.

Für eine optimale Transfektion ist die Anwendung einer konstanten Menge von Effektenen sowie die gleiche DNA-Menge und Zelldichte notwendig.

Bei den Versuchen wurden J82 mit Wildtyp Rac (pRK Rac1), dominant negativem Rac (pRK N17Rac1), Wildtyp CDC42 (pRK Cdc42), dominant negativem CDC42 (pRK N17Cdc42), Wildtyp RhoA (pRK RhoA), dominant negativem RhoA (RhoA N19) oder Vektor alleine (pRK) transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde durch Western Blotting gegen myc untersucht. Nach Transfektion mit pRK wird dieses als Marker mit exprimiert. Zur Optimierung der Transfektionsexperimente wurde das Plasmid pEGFP-C1 verwendet und die Transfektionseffizienz mittels Durchflußzytometrie gemessen.

3.6 Migrationsassay

Die Test-, und die Kontrollplatten bestanden aus jeweils 24-Näpfen. Die erste Reihe der Testplatte war mit Kammern ausgestattet, die entweder mit Fibronectin oder Vitronectin bzw. mit Kollagen beschichtet waren (siehe Abbildung). Im Vergleich dazu waren bei der Kontrollplatte die Kammern mit BSA beschichtet (siehe Abbildung 5). Diese fanden sich bei der Kontrollplatte in der zweiten Reihe. Die erste Reihe der Kontrollplatte diente als Adhäsionskontrolle. Dabei waren die Kammer entsprechend der Testplatte entweder mit Fibronectin, Vitronectin oder Kollagen beschichtet.

Um optimale Bedingungen zu erzielen, wurden die Migrationsplatten vor dem Versuchsbeginn für einige Stunden bei Raumtemperatur (25 °C) erwärmt.

Zu beiden Platten wurden untransfizierte oder transfizierte Zellen hinzugefügt. In der dritten und vierten Kammer wurden Zellen hinzugefügt, die mit dem DNA Wildtyp transfiziert waren.

Folgende Schritte wurden unter steriler Bedingung ausgeführt:

Je 300 µl Vollmedium wurden in der ersten Reihe der Testplatte unterhalb der Kammer zugegeben. Bei der Kontrollplatte wurden in die erste und zweite Reihe je 300 µl Vollmedium pipettiert. In jeden zweiten Napf wurde bei beiden Platten zusätzlich FFR-FVIIa hinzugegeben.

Nach Abtrypsinierung und Auszählung wurden die für 24 Stunden transfizierten Zellen in die Kammern für den Migrationsassay verteilt. In jede Kammer wurden $1,6 \times 10^5$ Zellen gegeben. Die Platten wurden dann für weitere 24 Stunden bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert.

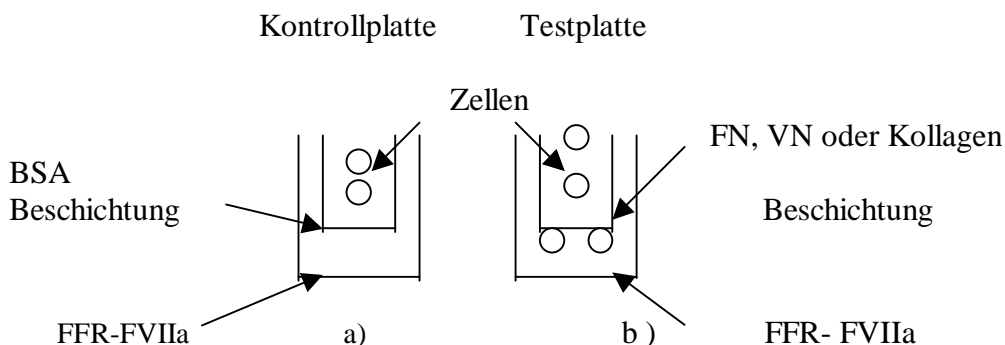


Abb. 5a Dargestellt ist die Kontrollplatte mit der BSA beschichtete Kammer; Abb. 5b Dargestellt ist die Testplatte, die je nach Versuch entweder mit FN, VN oder Kollagen beschichtet sind.

Zur Quantifizierung der migrierten Zellen wurden diese angefärbt und ausgezählt.

Dazu wurden in einer leeren Reihe der beiden Platten acht Tropfen von der Trypanblau Lösung gegeben. Die Kammer wurde mit einer Pinzette aus dem Napf genommen und vorsichtig mit einem Wattestäbchen von innen geputzt. Die Kammer wurden dann mit dem Trypanblau 30 Minuten angefärbt.

Nach ca. 30 Minuten wurde die Kammer vorsichtig herausgeholt, mit destilliertem Wasser 3x gewaschen und mit einem Wattestäbchen vorsichtig

getrocknet. Unter dem Mikroskop wurde bei 20-facher Vergrößerung die Anzahl der angefärbten migrierten Zellen in jeweils fünf Gesichtsfeldern ausgezählt. Zur photometrischen Bestimmung der migrierten Zellen wurden die Kammer mit 300 µl Pufferlösung für 5- 10 Minuten inkubiert. 100 µl der Lösung wurden nach dem Mischen auf eine 96-Well-Platte verteilt und im Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

3.7 Western Blot

Die GTPasen Rac1 und Rac1 N17 lagen als Fusionsprotein mit c- myc vor. Dadurch war es möglich, die Transfektionseffizienz mittels Protein-Nachweis von myc zu monitoren. Die Expression von myc entspricht also der Expression der GTPasen. Nach jeder Transfektion wurden ein Teil der Zellen mit Lysepuffer (Lämmlil 5x) lysiert. Nach Separation einer konstanten Menge von 5 µg Protein auf einem Polyacrylamidgel (Gradient 8-12%) folgte der Transferprotein auf Immobilon P (Millipore Corp., Bedford) unter Verwendung eines halbtrockenen Transfersystems (Sevinsky et al. 1996). Der Nachweis einer erfolgreichen Transfektion erfolgte mittels eines monoklonalen Maus-anti-myc-IgG, ein gebundener Erstantikörper, mit einem geeigneten Meerrettich -Peroxidase- konjugierten Esel-anti-Maus Zweitantikörper (1: 1000), der mittels chemiluminiszenz auf einem Röntgenfilm detektiert wurde.

3.8 Durchflußzytometrie

Nach Ablösen der Zellen mit Trypsin wurden diese mit Medium gewaschen. 5x 10⁵ J82 Zellen und 45 µl Phosphate-buffered- Saline (PBS: 0,145 molare (M) NaCl, 0,01 M Kaliumphosphat, PH 7,2, Fa GIBCO, Life Technologies, Leopoldshafen, Deutschland) wurden mit 5 µl Fluoreszein- Isothiozyanit (FITC) – konjugierten anti- TF- Antikörper (American Diagnostica Pfungstadt, Deutschland) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein FITC– konjugiertes Immunglobulin IgG1 verwendet. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS-Puffer und Zentrifugation für 5 Minuten mit 1600 Umdrehungen pro Minute wurden die Zellen mit 200 µl einer 1% Paraformaldehyd (PFA-) Lösung fixiert. Die durchflußzytometrische Messung erfolgte innerhalb von 24 Stunden in einem FACS Calibur (Becton – Dickinson, Mountain View, USA). Die Messung wurde in Form von „List mode Files“ gespeichert und mit Hilfe der „Cell Quest“- Software ausgewertet. Bei der Messung von GFP-transfizierten Zellen wurde auf den Fixierungsschritt verzichtet und die Messung unmittelbar nach Ablösen der Zellen durchgeführt.

4. Ergebnisse

J82- Zellen (Blasentumorzellen) exprimieren konstitutiv große Mengen von TF. Abb. 6 zeigt mittels Facs-Färbung die TF-Expression bei J82-Zellen.

Diese Zellen sind daher geeignet, die Rolle von TF auf die Zellmigration zu untersuchen.

Um die Aktivierung von anderen Rezeptoren wie PAR-1 oder PAR-2 auszuschließen, wurde der proteolytisch inaktive FFR-FVIIa verwendet. Proteolytisch inaktiver FFR-FVIIa aktiviert keine PAR Rezeptoren, bindet jedoch spezifisch an TF. Deswegen können isolierte Effekt der Rezeptor-Liganden-Interaktion TF mit FFR-FVIIa untersucht werden.

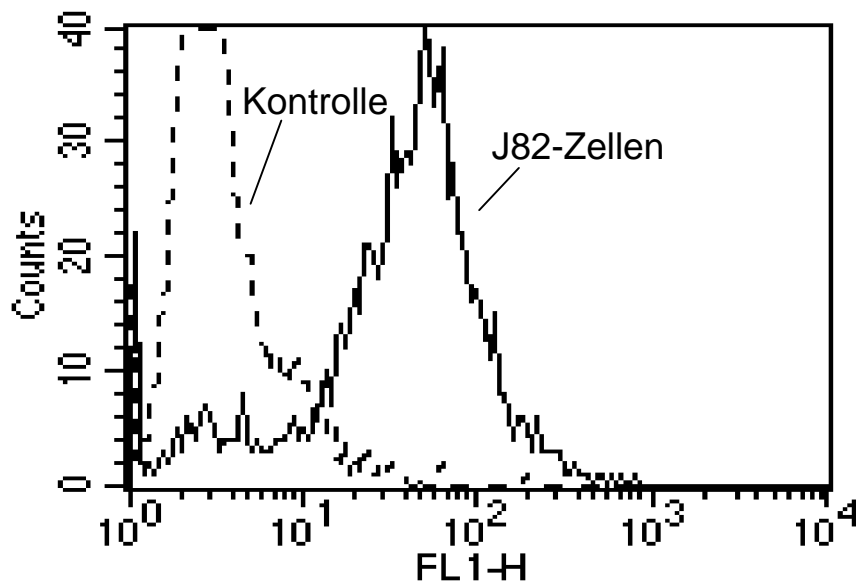


Abb. 6 Dargestellt ist mittels Facs- Färbung die TF-Expression bei J82 Zellen versus Kontrollzellen ohne TF- Expression

Als Maß für die Zellmigration wurden die Anzahl der migrierten Zellen, die sich unterhalb der beschichteten Migrationskammern befanden, bestimmt.

FFR-FVIIa alleine steigerte die Migration von J82 Zellen nicht. Untersuchte man jedoch die Migration gegenüber Fibronektin, beobachtete man eine dosisabhängige Steigerung durch FFR-FVIIa ab 200 nM. Ein Maximum wurde bei 500 nM erreicht und konnte durch weitere Steigerung der Konzentrationen nicht weiter erhöht werden (Abb. 7). Dieser Effekt wur-

de nicht beobachtet bei Migration von J82 Zellen gegen andere Matrixproteine wie Kollagen oder Vitronektin. Er war jedoch spezifisch für TF und β_1 -Integrine, da er durch Antikörperinhibition aufgehoben werden konnte.

FFR-FVIIa stellte somit einen kostimulatorischen Effekt für Migrationsprozesse gegen Fibronektin dar.

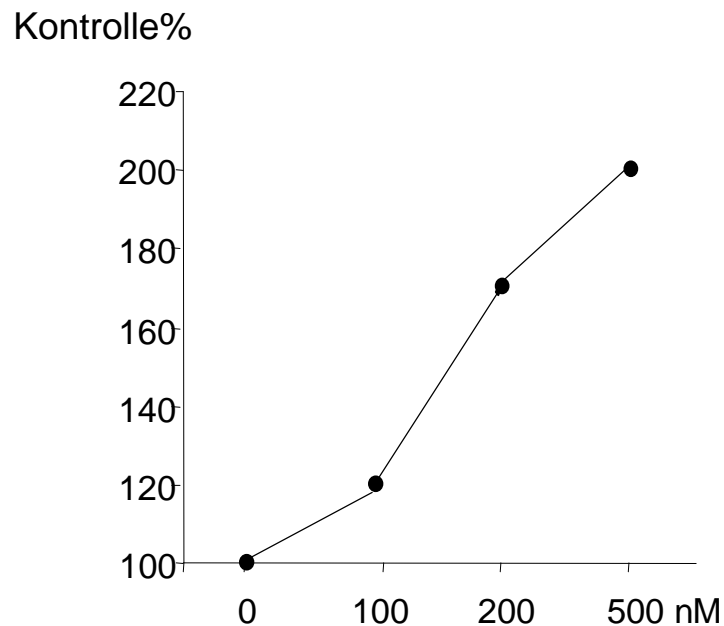


Abb. 7 Migrationsteigerung gegenüber Fibronektin durch FFR-FVIIa. Gezeigt wird eine dosisabhängige Migrationssteigerung ab 200 nM, die ein Maximum bei 500 nM erreicht und durch weitere FFR-FVIIa Konzentrationssteigerung unbeeinflusst bleibt.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, inwieweit die Migrationssteigerung durch FFR-FVIIa spezifisch für Fibronektin war. Dazu wurden Migrationsexperimente gegenüber mit Vitronektin und Kollagen beschichteten Membranen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Steigerung der Migration durch FFR-FVIIa nur gegenüber Fibronektin, nicht jedoch gegenüber Vitronektin und Kollagen zu beobachten war (Abb. 8).

Eine Steigerung der Migration durch FFR-FVIIa gegen Fibronektin wurde beobachtet. Während die Migration gegen Vitronektin und Kollagen durch FFR-FVIIa unbeeinflusst blieb (Abb. 8).

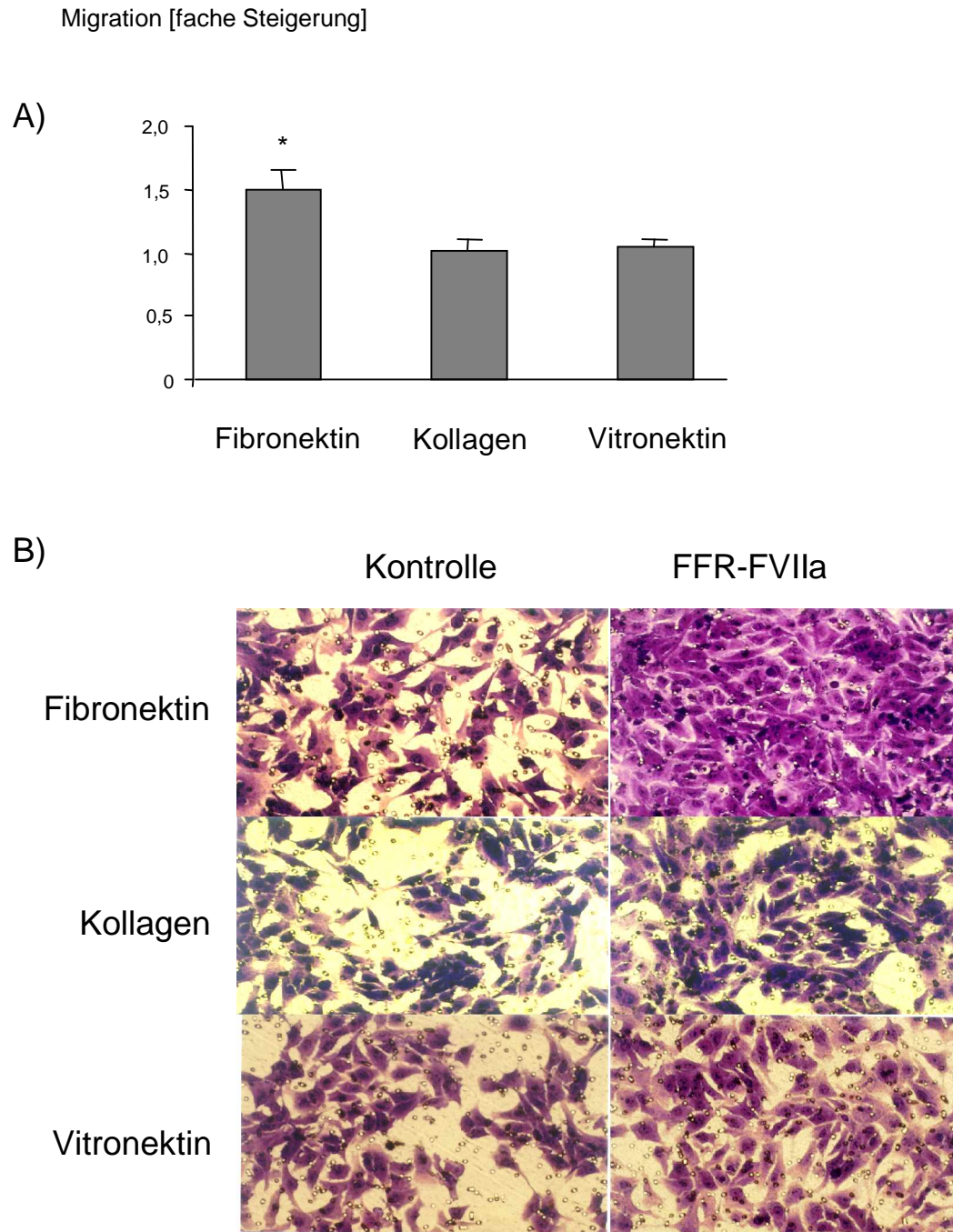


Abb.8 Untersucht wird der migrationssteigernde Effekt durch FFR-FVIIa gegenüber Fibronektin, Vitronektin und Kollagen beschichteten Membran. A) Dargestellt ist die Mittelwerte \pm SEM von 5 verschiedenen Versuchen * zeigt eine Signifikanz der Migrationssteigerung gegenüber Fibronektin mit $p < 0,05$ an. B) Repräsentative Photos migrierter Zellen gegen Fibronektin, Kollagen und Vitronektin in Ab- und Anwesenheit von FFR-FVIIa. Beobachtet wird eine Migrationssteigerung durch FFR-FVIIa gegen Fibronektin, während die Migration gegen Vitronektin und Kollagen durch FFR-FVIIa nicht signifikant ansteigt.

Um die Bedeutung einer Aktivierung der GTPasen Rac1 und Cdc42 bei der Migrationssteigerung durch FFR-FVIIa zu untersuchen, wurden Transfektionsexperimente mit dominant negativen Mutanten durchgeführt. Diese wurden mit den Ergebnissen nach Transfektion von Kontrollplasmid oder nach Transfektion von der entsprechenden Wildtyp GTPase verglichen.

In initialen Versuchen wurden verschiedene Transfektionsmethoden verglichen. Die höchsten Transfektionseffizienzen wurden mit dem liposomalen Transfektionsreagenz Effektene erzielt. Nach Transfektion mit pEGFP-C1 wurde eine Effizienz von $74 \pm 7\%$ erreicht ($n=5$). Abbildung 9 zeigt das Ergebnis einer repräsentativen durchflußzytometrischen Analyse nach Transfektion der J82 mit dem pEGFP- C₁- Plasmid.

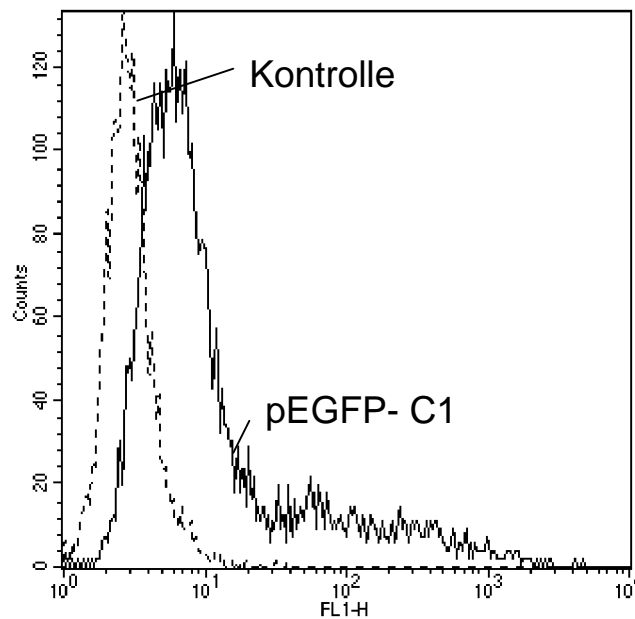


Abb. 9 Expression des grünen Fluoreszenzprotein nach Transfektion von J82 Zellen mit pEGFP-C1. Gezeigt wird die Transfektionseffizienz der J82 nach Transfektion mit pEGFP-C1 im Vergleich zur J82 Zellen (Kontrolle) ohne Transfektion mit einem liposomalen Transfektionsreagenz.

Nach Optimierung des Transfektionsprotokolles wurde dieses zur Transfektion von der GTPasen verwendet. Dabei wurde die Transfektionseffizienz mittels Western Blotting gegen den Marker myc untersucht. Ab-

bildung 10 zeigt ein repräsentatives Beispiel für die Expression von myc nach Transfektion mit Rac1 Wildtyp und dominant negativem Rac1 N17.

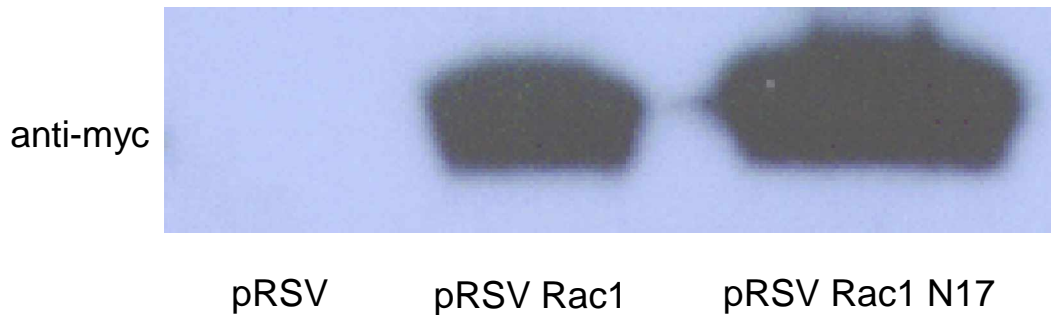


Abb. 10 Expression von myc und damit die Transfektionseffizienz nach Transfektion von pRSV, pRSV Rac1 oder pRSV Rac1 N17 mittels Western Blot.

Rho GTPasen spielen eine entscheidende Rolle bei der Zytoskelett-Reorganisation, die für die Zellmigrationsvorgänge notwendig ist.

Um die Mechanismus der Migrationssteigerung durch FFR-FVIIa zu untersuchen, wurden Transfektionsexperimente mit Kontrollplasmid, Rac1 Wildtyp und einer dominant negativen Mutante von Rac1 (Rac1 N17) durchgeführt.

Es zeigte sich nach Transfektion vom Kontrollplasmid oder auch Rac1 Wildtyp eine Steigerung der Migration durch FFR-FVIIa, die vergleichbar mit der Migrationssteigerung untransfizierter Zellen war. Transfizierte man dagegen dominant negatives Rac1, so war keine Migrationssteigerung durch FFR-FVIIa mehr zu beobachten. Abbildung 11A zeigt die Migration der Zellen, die mit Rac1 Wildtyp und Rac1 N17 transfiziert worden waren im Vergleich zu Kontrollzellen, die nur mit dem pRSV Plasmid transfiziert wurden. Gegenüber Fibronectin stieg die Migration nach FFR-FVIIa –Zugabe bei Rac1 Wt um 85%, während Rac1 N17 eine Migrationsabnahme um 1% zeigte. Bei den Kontrollzellen wurde, vergleichbar mit nicht transfizierten Zellen, eine Migrationssteigerung um 70% beobachtet.

Nach der Transfektion mit Rac1 Wildtyp verglichen mit den Kontrollzellen wurde also eine signifikante Steigerung der Migration gegenüber Fibronectin durch FFR-FVIIa beobachtet. Diese Steigerung war jedoch

aufgehoben in Zellen, die mit dominant negativen Rac1 N17 transfiziert waren. Für die Migrationssteigerung durch FFR-FVIIa war also eine Aktivierung der GTPase Rac1 notwendig.

Transfektionsexperimente mit Cdc42 Wildtyp, Rho Wildtyp oder dominant negativem Cdc42 und dominant negativem Rho zeigten keine Unterschiede bei der Zellmigration gegenüber FFR-FVIIa. Für die FFR-FVIIa induzierte Migrationssteigerung war also nur eine Aktivierung der GTPase Rac1 notwendig.

Zellzahl/Gesichtsfeld

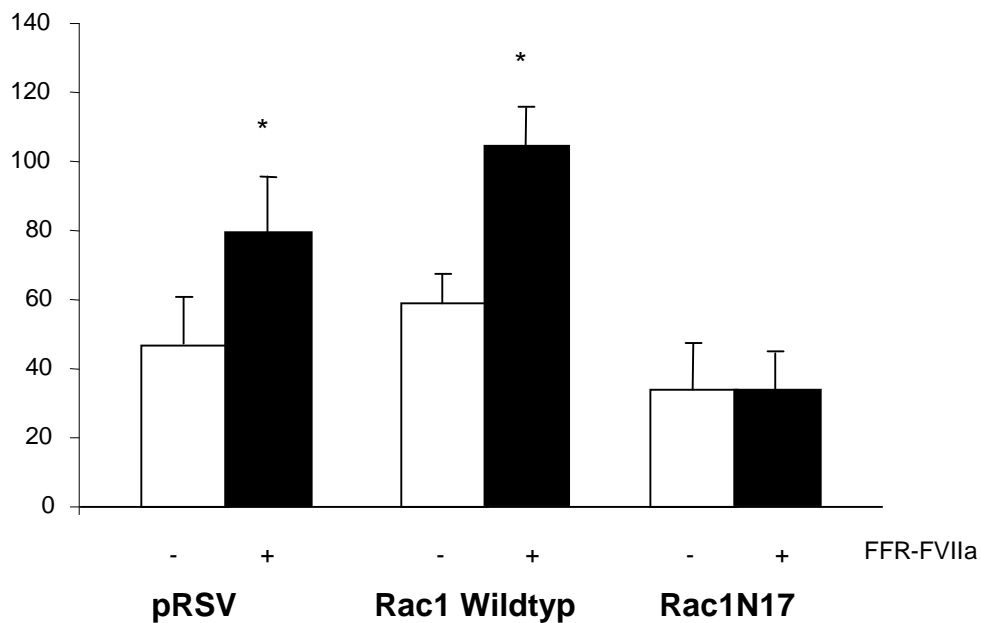


Abb. 11A Wirkung von FFR-FVIIa auf die Migration gegenüber Fibronectin nach Transfektion von pRSV, Rac1 Wildtyp und dominant negativer Mutante Rac1 N17. Gezeigt wird die signifikante Migrationssteigerung gegenüber Fibronectin nach FFR-FVIIa-Zugabe bei Rac1 Wildtyp.

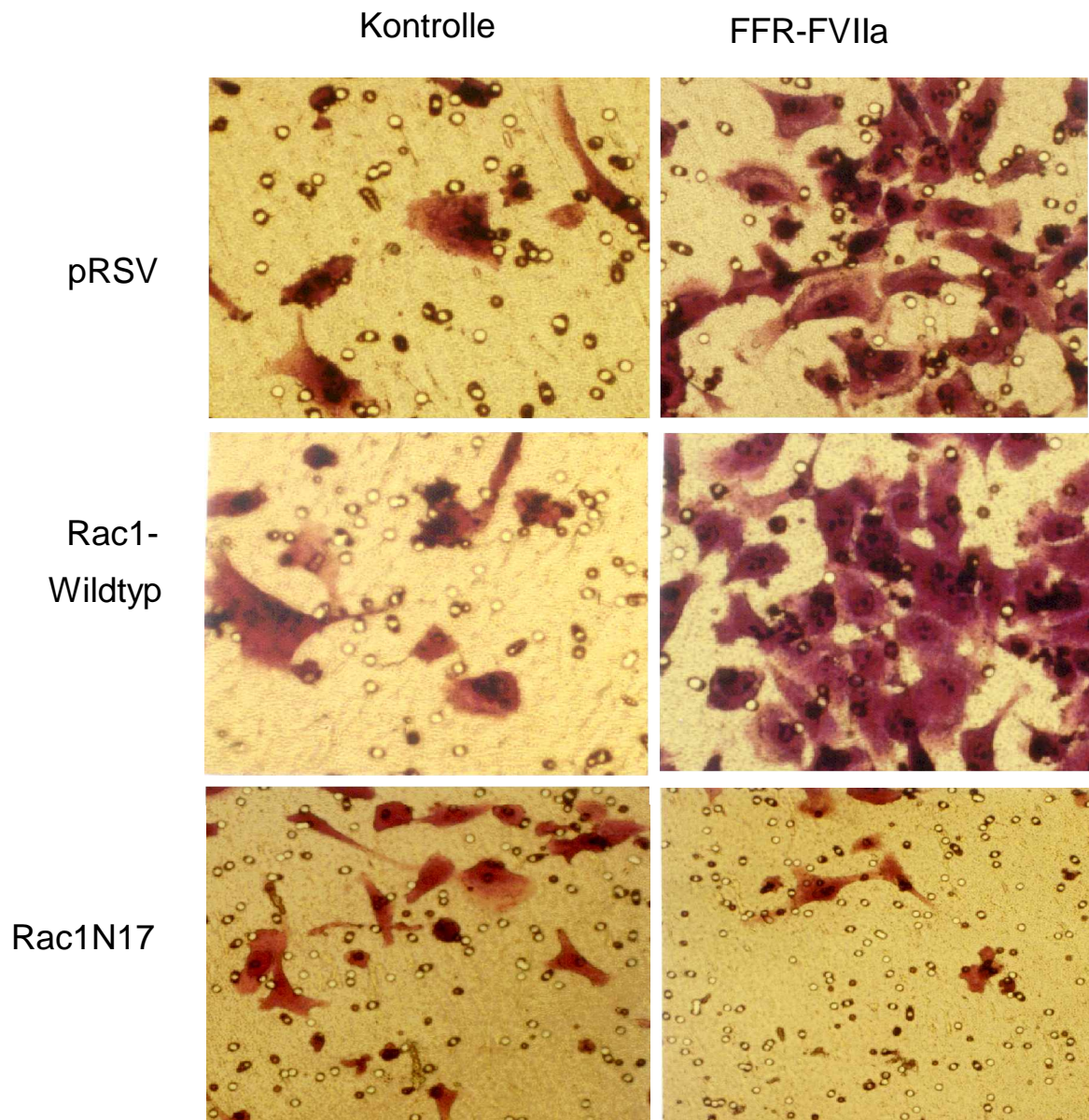


Abb. 11B Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen (30 x Vergrößerung) migrierter Zellen gegenüber Fibronektin und FFR- FVIIa nach Transfektion mit pRSV, Rac1 Wildtyp und dominant negativem Rac1 N17. Gezeigt wird der Migrationsanstieg nach FFR-FVIIa-Zugabe bei Rac1 Wildtyp versus pRSV und Rac1 N17.

5. Diskussion

Vorliegende Untersuchungen zeigten eine Migrationssteigerung durch FFR-FVIIa in J82 Blasenkarzinomzellen, die große Mengen von TF exprimieren. Die Migrationssteigerung durch FFR-FVIIa war nur gegenüber Fibronectin, nicht aber gegenüber Vitronectin oder Kollagen zu beobachten. Transfektion mit dominant negativen GTPasen Rac1, CDC42 und Rho zeigte, dass nur die Aktivierung von Rac1 für die Migrationssteigerung durch FFR-FVIIa gegenüber Fibronectin notwendig war, da dieser Effekt nach Überexpression von dominant negativem Rac1 aufgehoben war.

Eine Vielzahl von Faktoren, wie Integrinrezeptoren, interagieren mit verschiedenen Matrices wie Fibronectin, Vitronectin und Kollagen (Giancotti et al. 1999; Ivaska et al. 2000). Für die Interaktion mit Fibronectin sind überwiegend β_1 Integrine von Bedeutung. Dies lässt vermuten, dass eine spezifische Interaktion zwischen TF und β_1 Integrinen als zugrundeliegender Mechanismus von Bedeutung sein könnte.

TF wurde in einer anderen Studie als ein Protein identifiziert, das in engem Kontakt mit Aktin und ABP 280, ein Mitglied der Filaminfamilie, Einfluß auf das Migrationsgeschehen in der Zelle nimmt (Ott et al. 1998; Müller et al. 1999; Lauffenburger et al. 1996).

Doch war bislang ein Zusammenhang zwischen den Effekten von FFR-FVIIa und Integrinen und deren Einfluss auf Migrationssteigerung nicht untersucht worden.

Mit dieser Arbeit konnte erstmals ein kostimulatorischer Effekt von FFR-FVIIa mit Integrin β_1 induzierter Migration über eine Aktivierung der GTPase Rac1 beobachtet werden.

Um den im Rahmen der Untersuchungen zu den migrationssteigernden Effekten immer wieder geäußerten Bedenken zu interferierenden Störfaktoren während und nach der Transfektion, sowie bei der Messung entgegenzuwirken, wurde sowohl die Zeit zwischen Verarbeitung und Messung, als auch sämtliche methodische Variablen bei allen Proben konstant gehalten. Trotz aller Bemühungen ist es nicht auszuschließen, dass minimale unvermeidliche Schwankungen bei der Durchführung und den Messungen aufgetreten sind. Gerade da die Transfektion zum einen eine transiente Eigenschaft besitzt. Als ein weiterer studienlimitierender Faktor ist die Unklarheit, inwieweit die Tumorzelllinie sich mit den Endothelzellen und glatten Muskelzellen vergleichen lässt.

Die proteolytische Aktivität von FVIIa spielt eine entscheidende Rolle für Zellaktivierungsvorgänge. Während FVIIa sowohl an TF bindet als auch PARs aktiviert, werden Mechanismen der PAR Aktivierung durch FFR-FVIIa nicht ausgelöst. Die beobachteten Effekte auf die Zellmigration können also nicht durch eine Aktivierung der PARs erklärt werden. Darüber hinaus wurde auf RNA Ebene keine Expression von PAR-2, der hauptsächlich durch FVIIa aktiviert wird, nachgewiesen. Die FFR-FVIIa induzierte Migrationssteigerung und Aktivierung der GTPase Rac1 wird also über TF vermittelt (Petersen et al. 2000; Prydz et al. 2000; Camerer et al. 1999).

Mögliche Mechanismen der Migrationssteigerung wären zum einen die Steigerung der Integrindichte bzw. eine erhöhte Expression von β_1 -Untereinheiten. Zum anderen wäre die Affinitätsänderung des Integrins gegenüber unterschiedlichen Liganden eine weitere Möglichkeit (Faull et al. 1993; Byzova et al. 1998). Ferner stellt die Modifikation von Signalwegen eine andere erdenkliche Möglichkeit dar (DiPersio et al. 2001; Retta et al. 1998; Diaz-Gonzales et al. 1996; Dogic et al. 1998; Lichtner et al. 1998; Tomatis et al. 1999).

Eine weitere mögliche Funktionsmechanismus wäre Filamin, ein aktinbindendes Protein, das sowohl mit der zytoplasmatische Komponente des TF als auch mit der β - Untereinheit des Integrins eine Bindung eingehen kann. Die J82 Zellen haften mittels β_1 -Integrin an Fibronectin. β_1 -Integrin ist im Gegensatz zu β_2 -Integrin ABP-280 abhängig (Sharma et al. 1995; Ott et al. 1998). ABP 280 ist ein Ligand der zytoplasmatische Domäne des TF, die neben TF mit den Aktinfilamenten in Verbindung steht und dadurch bei Migrationsprozessen von Bedeutung sein könnte (Gorlin et al. 1990). TF erhöht nach der Phosphorylierung des Ser- Restes seine Interaktion mit ABP- 280. Ser wird nach der Stimulation des Phorbolster phosphoryliert (Zioncheck et al. 1992). Dabei geht das carboxylterminale Ende des Filamin 1 mit der zytoplasmatische Domäne des TF eine Bindung ein (Ott et al. 1998). Frühere Studien konnten zeigen, dass eine Mutation der zytoplasmatischen Domäne der TF (ser durch ala ausgetauscht) seine Interaktion zur ABP 280 aufhebt. ABP 280 unterstützt die Zelle einerseits bei ihrer Motilität und andererseits verleiht es ihr Stabilität (Cunningham et al. 1992). Daneben hat Filamin neben Bündelung und Quervernetzung von Aktinfilamenten mit zahlreichen intrazellulären Proteinen wie beispielsweise GTPasen etc. Kontakt (Calderwood et al. 2001). Phosphorylierungsprozesse der zytoplasmatischen Domäne des TF spielen eine Rolle bei der Tumormetastasierung (Ott et al. 1998; Mueller et al. 1992/1998; Bromberg et al. 1995). Extrazelluläre Liganden von TF beeinflussen die Interaktion mit ABP 280 mit nachfolgender Aktivierung von

MAP- Kinasen, wodurch Migrationsprozesse gesteigert werden könnten (Marti et al. 1997, Cunningham et al. 1992).

Zur Regulation der Integrinfunktion und Signaltransduktion ist zusätzlich Proteinkinase C - α notwendig. Beispielsweise reguliert sie die Fibronektin und Integrininduzierte Zelladhäsion (Couchman et al. 1999; Miranti et al. 1999; Vuori et al. 1993), die unter anderem wichtig für die Zellmigration ist und einen hyperkinetischen Mechanismus auslöst (Huang et al. 1998; Bromberg et al. 1999; Zinochek et al. 1992).

In einigen bereits veröffentlichten Studien wurden die Beteiligung der Integrine an Signaltransduktionen beschrieben. Wie bereits erwähnt, sind Integrine transmembranäre Proteine, die aus α - und β - Untereinheiten bestehen. Es sind 18 verschiedene α - und 8 β - Untereinheiten bekannt, die 24 verschiedene Rezeptoren ergeben. Die extrazelluläre Domäne bindet bestimmte Aminosäuren in ECM sowie andere Zelloberflächenrezeptoren. Dabei bindet $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_v\beta_1$ Fibronektin (George et al. 1997; DiPersio et al. 1997; Yang et al. 1993/1995; Taverna et al. 2001; Akiyama et al. 1989; Varner et al. 1995) , $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_1\beta_1$ fungieren als Kollagenrezeptoren (Lee et al. 1995; Gotwals et al. 1996), während $\alpha_v\beta_1$ und $\alpha_v\beta_3$ als Vitronektinrezeptoren dienen (Reynolds et al. 2002; Friedlander et al. 1995; Gutheil et al. 2000; Collier 1997; Stephens et al. 1995; Bloch et al. 1997; Rehn et al. 2001; Kim et al. 1994; Turley 2001; Yee et al. 1999). Der Einfluss des Integrins in der Entwicklung liegt auf der einen Seite an seiner adhäsiven Wirkung und auf der anderen Seite an der Fähigkeit zur Modulation der Signaltransduktion. Integrininduzierte Zelladhäsion triggert den Ca^{2+} - Einstrom und aktiviert FAK (Fokal Adhesion kinase), src, PKC - α , MAP- Kinase/ ERK Kinase (MEK) und reguliert die Aktivität der GTPasen. Dadurch könnten durch TF Ligandeninteraktion induzierte Signale erst für Migrationsprozesse bedeutsam werden. (Parsons und Parsons 1997; Aplin et al 1998; Schlaepfer und Hunter 1998; Giancotti und Rouslahti 1999; Yamada und Danen 2000).

Die Rho GTPasen sind Schlüsselregulatoren des Aktinzytoskeletts. Sie beteiligen sich an Muskelzellkontraktion, Endothelpermeabilität und Leukozytenmigration.

Um zu untersuchen, welche Rho GTPasen einen migrationssteigernden Effekt zeigen, wurden dominant negative Mutanten verwendet. Es zeigte sich ein migrationssteigernder Effekt von Rac1wt im Vergleich zum migrationsverzögernden Effekt der dominant negativen Mutante. Die Bedeutung von Rac1 Wildtyp bei Migrationsvorgängen wurde in früheren Studien bereits gezeigt (Price et al. 1998, Allen et al. 1998, Anand- Apte et al. 1997, Nobes et al. 1999, Riedley et al. 1995). Rho GTPasen spielen insbesondere eine Vermittler-Rolle zwischen Integrin und dem Zyto-

skelett. Dabei führt die Ligandenbindung an das Integrin vorerst zur Aktivierung der zytosmatische Tyrosin- Kinase und anschließend mittels activate nucleotide exchange Factor, wie beispielsweise Vav oder PIP3 (Phosphatidylinositoltriphosphate) zur Aktivierung der Rac1 und anderen Rho- GTPasen (Crespo et al. 1997, Han et al. 1997). Mittels der Interaktion von Rho- GTPasen Rac1 und CDC42 mit den Effektorproteinen, besonders mit P21- activated Kinase (PAK) und folglich PAK-Kinase Aktivität, kann die Zellmigration beeinflusst werden (Manser et al. 1994, Knaus et al. 1995, Martin et al. 1995). Diese wiederum können die Reorganisation des Aktinzytoskeletts und die Bildung von Filopodia und Lammelipodia induzieren (Sells et al 1997). Die Integrin-abhängige Aktivität von PAK und anderen Effektorproteinen ist von Rac1 und Cdc-42 abhängig. Allerdings könnte PAK nicht unabhängig von der Integrin-stimulation aktiviert werden (Price et al 1998). Rac1 kann die Phosphorylierung von Myosin heavy chain und MLC-Kinase mittels PAK und den Aktinfilamenten induzieren (Sanders et al 1999, Van Leeuwen et al 1999). Studien haben gezeigt, dass Rac1 nicht nur das Aktinzytoskelett reguliert, sondern auch die Mikrotubulusdynamik beeinflussen kann (Larsson et al 1997, Anderson et al 2000). Rac1 könnte über Aktivierung der MAPK p38 Kinase Aktivität und Phosphorylierung des Hitzeschockproteins 27 die Zytoskelettorganisation beeinflussen (Hedges). Daneben kann Rac1 durch die MAPK p38 die Aktivierung der Gen- Transkription regulieren (Coso et al 1995, Minden et al 1995). Vor kurzen wurde gezeigt, dass MAPK p38 zur Phosphorylierung und Aktivierung von MLCK führt (Klemke et al 1997), somit können sich die Migrationssteigernden Effekte von Rho-GTPasen und MAPK p38 subsumieren.

Die Tatsache, dass nur gegen FN eine Steigerung der Migration beobachtet wurde, lässt vermuten, dass es sich um eine für β_1 Integrin spezifische TF-induzierte Kostimulation handelt. Der intrazelluläre Bereich des Integrins assoziiert mit verschiedenen Adhäsionsproteinen und wirkt dadurch auf viele Zytoskelettproteine und -kinasen ein (Humphries 2000; Leitinger et al. 2000; Plow et al. 2000; Schwartz 2001; Vuori 1998; Xiong et al. 2001; Davis et al. 2001). Während in unserer Versuchsreihe Fibronektin ein migrationssteigernder Effekt zeigt, bleibt dieser Effekt bei Vitronektin und Kollagen aus.

Fibronektin aktiviert mittels GEF's, Vav1 (Miranti et al. 1998) und Sos (Nimnual et al. 1998) die GTPasen Rac1 und Cdc42.

Bereits frühere Studien hatten die Bedeutung der Fibronektin für die Zellmigration während der Embryonalentwicklung und für die Wundheilung erkannt (Hynes et al. 1985; Engel et al. 1981). Fibronektin ist ein Zelloberflächenprotein, das die Wechselwirkung der Zellen mit der extrazellulären Matrix ermöglicht. Jede Fibronektindomäne kann spezifisch bestimmte Moleküle außerhalb der Zelle binden, z.B. Fibrin, Kollagen

und Heparin (Mostafavi- Pour et al. 2001; Liao et al. 2002; Mosher 1989; Carsons 1989; Hynes 1990; Yamada et al. 1996).

Viele Studien haben bereits den Effekt des FVIIa und des TF auf die Zellmigration und Signaltransduktion gezeigt. Der zyttoplasmatische Domäne von TF und ABP-280 interagieren miteinander (Ott et al. 1998; Müller et al. 1999; Lauffenburger et al. 1996). Es wurde gezeigt, dass die Aktinfilamente, die mit TF interagieren, zur Phosphorylierung von FAK führen. Daneben kann ABP 280, nachdem er durch TNF α oder Lyso-phosphatidic- acid stimuliert wurde, die MAPK P38 seinerseits phosphorylieren (Marti et al. 1997). Die Kooperation zwischen MAPK P38 und FAK unterstützen die migrationssteigernden Prozesse. Der Komplex FVIIa/ TF induziert die Phosphorylierung der MAPK P38 (mitogen-activated protein kinase) (Poulsen et al. 1998; Camerer et al. 1999) und der GTPase Rac1. Menschliche Fibroblasten zeigen eine hohe TF-Expression neben der PDGF- Expression. Der Komplex von TF und FFR-FVIIa steigert die PDGF-stimulierte Zellmigration. Dieser Effekt beruht auf einem proteolytisch unabhängigen Effekt des TF (Heldin et al. 1999; Siegbahn et al. 2000).

Beim FVIIa unterscheidet man zwischen proteolytisch aktiver und proteolytisch inaktiver (FFR-FVIIa) Form. Diese zwei Formen unterscheiden sich unter anderem vor allem durch die Art der Signalweiterleitung. Während die proteolytisch aktive Form nach der Komplexbildung mit TF (TF/FFR-FVIIa) seine Signale über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (PAR-2) weiterleiten kann (Prydz et al. 1999; Pendurthi et al. 2000/ 2002; Ruf et al 2003; Camerer et al. 1999/ 2000; Rottingen et al. 1995; Sorensen et al. 1999; Petersen et al 2000), aktiviert, wie auch in dieser Studie gezeigt, die proteolytisch inaktive Form von FFR-FVIIa keine PAR Rezeptoren. Sie bindet jedoch spezifisch an TF. Daher konnte in dieser Studie der isolierte Effekt der Rezeptor- Liganden Interaktion untersucht werden.

Diese Erkenntnisse untermauern unsere Beobachtungen und Schlussfolgerungen zum einen, was die Migration gegen Fibronectin angeht, zum anderen was den kostimulatorischen Effekt bei der Migrationssteigerung anbelangt. Durch den Vergleich „dominant negativen Mutante versus Wildtyp“ gelang es, die entscheidende Einflussnahme der GTPasen in diesem Zusammenhang explizit und unabhängig voneinander hervorzuheben. Es ist bewiesen, dass die dominant negativen Mutanten (Rac1 N17, Cdc42 N17 und Rho N19) eine stabilere Bindung mit den GEF eingehen, als der Wildtyp. Allerdings besitzen sie keine Fähigkeit, mit dem Effektorprotein eine Bindung einzugehen (Feig 1999). Dies führt u.a. zu einem Verlust der Zellmobilität (Liliental et al. 2000).

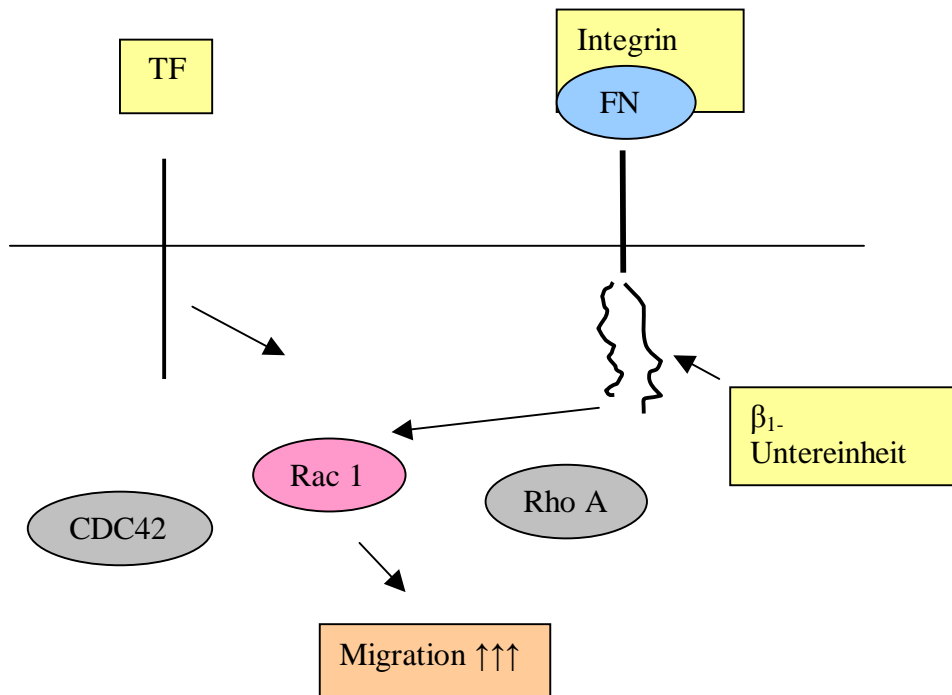


Abb. 12B Schematische Darstellung des migrationssteigernden Effektes des TF-/FVIIa-Komplexes und Integrin nach Fibronectinbindung.

Über nicht haemostatische Funktionen spielt TF eine bisher nur unzureichend charakterisierte Bedeutung bei Tumormetastasierung, Angiogenese, Neovaskularisation, Arteriosklerose, Inflammations- und Immunreaktion sowie Wundheilungsprozessen. Die durch den TF induzierte Steigerung von Zellmigration und die Aktivierung der GTPase Rac1 könnten dabei von entscheidender Bedeutung sein.

6. Zusammenfassung

Zellmigration spielt eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung, der Immunreaktionen, der Wundheilung, der Tumormetastasierung und der Atherosklerose.

Ziel der Untersuchungen war es, die Rolle des Tissue Factor (TF) für die Zellmigration zu untersuchen. Hierzu wurde die Migration von J82 Blasentumorzellen gegenüber proteolytisch inaktivem FFR-FVIIa im Boydenkammer Migrationsassays untersucht. Es zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung der Migration gegenüber Fibronectin durch FFR-FVIIa, nicht jedoch gegenüber Vitronectin oder Kollagen. Dieser Effekt war nach transienter Überexpression einer dominant negativen Mutante der GTPase Rac1 mittels liposomaler Transfektion aufgehoben. Die TF-induzierte Rac1 Aktivierung könnte als zugrunde liegender Mechanismus für die Steigerung von Zellmigrationsprozessen von Bedeutung sein.

7. Literatur

1. **Adelstein RS, Sellers JR.** Effects of calcium on vascular smooth muscle contraction. *Am J Cardiol.* 1987, 59:4B-10B.
2. **Ahamed J, Ruf W.** Protease –activated Receptor 2-dependent Phosphorylation of the Tissue factor Cytoplasmatic Domain. *J Biol Chem.* 2004,279,23038-23044.
3. **Akiyama SK, Yamada SS, Chen WT, Yamada KM.** Analysis of fibronectin receptor with monoclonal antibodies, role in cell adhesion, migration, matrix assembly and cytoskeletal organization. *J Cell Biol.* 1989, 109:869-875.
4. **Allen WE, Zicha D, Ridley AJ, Jones GE.** A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol.* 1998, 141:1147-1157.
5. **Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K.** Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem.* 1996, 271:20246-20249.
6. **Annex BH, Denning SM, Channon KM, Sketch MH Jr, Stack RS, Morrissey JH, Peters KG.** Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. *Circulation.* 1995, 91:619-622.
7. **Aplin AE, Howe A, Alahari SK et al.** Signal transduction and signal modulation by celladhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin- cell adhesion molecules, and selections. *Pharmacol Rev.* 1998, 50:197-263.
8. **Arber S, Barbayannis FA, Hanser H, Schneider C, Stanyon CA, Bernard O, Caroni P.** Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature,* 1998, 393:805-809.
9. **Aspenstroem P, Lindenberg U, Hall A.** Two GTPases , Cdc42 and Rac , bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Biol.* 1996, 6:70-75.
10. **Aspenstrom P.** Effector for the Rho GTPasen. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999, 11:95-102.
11. **Bach R.** Mechanism of Tissue factor Activation on cells, Blood coagulation and Fibrinolysis, 1998, 9: 37-43.
12. **Banner D, 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.

13. **Barry ST, Flinn HM, Humphries MJ, Critchley DR, Riedley AJ.** Requirement for Rho in integrin signalling. *Cell Adhes. Commun.* 1997, 4:387-398.
14. **Bazan JF.** Structural design and molecular evolution of cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990, 87:6934-6938.
15. **Beck L, Jr and P.A. D'Amore.** Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J.* 1997, 11:365-373.
16. **Bierhaus A, Hemmer CJ, Mackman N, Kutob R, Ziegler R, Dietrich M et al.** Antiparasitic treatment of patients with *P. falciparum* malaria reduces the ability of patient serum to induce tissue factor by decreasing NF- κ B activation. *Thromb Haemost.* 1995, 73:39-48.
17. **Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritscher H et al.** Advanced glycation end product (AGE)- mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation.* 1997,96:2262-2271.
18. **Bierhaus A, Zhang Y, Mackman N, Quebenberger P, Haase M et al.** Mechanism of the tumor necrosis factor alpha- mediated induction of endothelial tissue factor. *J Biol Chem.* 1995, 270:26419-26432.
19. **Bierhaus A, Zhang Y, Quehenberger P, Luther T, Haase M, Muller M et al.** The dietary pigment curcumin reduces endothelial tissue factor gene expression by inhibiting binding of AP-1 to the DNA and activation of NF- κ B. *Thromb Haemost.* 1997,77:772-782.
20. **Bishop AL, Hall A.** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 2000, 348:241-255.
21. **Bloch W, Forsberg E, Lentini S, Brakebusch C, Martin K, Krell HW, Weidle UH, Addicks K, Fassler R.** Beta 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis. *J Cell Biol.* 1997, 139:265-278.
22. **Boettner B, Van Aelst L.** Rac and Cdc42 effectors. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 1999, 22:135-158.
23. **Bohrer H, Qui F, Zimmermann T, Zhang Y, Jilmer T, Mannel D et al.** Role of Nf κ B in the mortality of sepsis. *J Clin Invest.* 1997;100:972-985.
24. **Bourguignon JY, Zhu H, Shao L, Chen YW.** Ankyrin- Tiam1 interaction promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration. *J Cell Biol.* 2000, 150:177-192.
25. **Bourguignon JY, Zhu H, Shao L, Chen YW.** CD44 interaction with Tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *J Biol. Chem.* 2000, 275:1829-1838.
26. **Bromberg ME, Konigsberg WH, Madison JF, Pawashe A, Garen A.** Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway

- independent of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:8205-8209.
27. **Bromberg ME, Sundaram R, Homer RJ, Garen A, Konigsberg WH.** Role of tissue factor in metastasis: function of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule. *Thromb Haemostas.* 1999, 82:88-92.
 28. **Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA.** Requirement of vascular integrin alpha V beta 3 for angiogenesis. *Science* 1994, 264:569:569-571.
 29. **Broze GJ.** Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annu. Rev. Med.* 1995, 46:103-112.
 30. **Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Holmback K, Danton MJS, Colbert MC, Witte DP, Fujikawa K, Davie EN, Degan JL.** Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:6258-6261.
 31. **Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka.** Focal adhesion, contractility and signalling. *Annu Rev Cell Biol.* 1996, 12:463-519.
 32. **Byzova TV, Rabbani R, D'Souza SE, Plow EF.** Role of integrin alpha v beta 3 in vascular biology. *Thromb Haemost* 1998, 80:726-734.
 33. **Calderwood DA, Huttenlocher A, Kiosses WB, Rose DM, Woodside DG, Schwartz MA, Ginsberg MH.** Increased filamin binding to beta-integrin cytoplasmic domains inhibites cell migration. *Nat Cell Biol* 2001, 3:1060-1068.
 34. **Camerer E, Gjernes E, Wiiger M, et al.** Binding of factor VIIa to tissue factor on keratinocytes induces gene expression. *J Biol Chem.* 2000a, 275:6580-6585.
 35. **Camerer E, Huang W, Coughlin SR.** Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease- activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000b, 97; 5255-5260.
 36. **Camerer E, Kataoka H, Kahn M, Lease K, Coughlin SR.** *J Biol Chem* 2002, 277, 16081-16087.
 37. **Camerer E, Kolsto AB, Prydz H.** Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res*, 1996, 81:1-41.
 38. **Camerer E, Rottingen JA, Gjernes E, et. al.** Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signalling leading to up- regulation of the *egr-1* gene. *J Biol Chem.* 1999, 274:32225-32233.
 39. **Camerer E, Rottingen JA, Iverson JG, Prydz H.** Coagulation factors VII and X induces Ca^{2+} oscillations in Madin- Darby canine kidney cells only when proteolytically active. *J Biol Chem*, 1996, 271:29034-29042.

40. **Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaederen I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Mueller M, Risau W, Edgington T, Collon D.** Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*, 1996, 383:73-75.
41. **Carsons SE.** Fibronectin in Health and Disease. Florida: CRC Press, Inc. 1989.
42. **Chapman HA Jr, Allen CL, Stone OL, Fair DS.** Human alveolar macrophages synthesize factor VII in vitro: Possible role in interstitial lung disease. *J Clin Invest.* 1985, 75:2030-2037.
43. **Chrzanowska- Wodnicka M, Burridge K.** Rho- stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol.* 1996, 133:1403-1415.
44. **Clark EA, Brugge JS.** Integrins and signal transduction pathways: The road taken. *Science.* 1995; 268:233-239.
45. **Clark EA, King WG, Brugge JS, Symons M, Hynes R.** Integrin – mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol.*, 1998, 142: 573-586.
46. **Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan Y-CE, Olander JV, Connolly DT, Stern D.** Vascular permeability factor: a tumor driven polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity and promotes monocyte migration. *J. Exp. Med.* 1990,172:1535-1545.
47. **Clauss M, Grell M, Fangmann C, Fiers W, Scheurich P, Risau W.** Synergistic induction of endothelial tissue factor by tumor necrosis factor and vascular endothelial growth factor: functional analysis of tumor necrosis factor receptors. *FEBS Lett* 1996,390:334-338.
48. **Coller BS.** Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. *J Clin Invest* 1997, 100:57-60.
49. **Connolly AJ, Ishihara H, Kahn ML, Farese RV, Coughlin SR and JR.** Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature*, 1996, 381:516-519.
50. **Constantino M, Merskey C, Kudzma DJ, Zucker MB.** Increased activity of vitamin K-dependent clotting factors in human hyperlipoproteinaemia: association with cholesterol and triglyceride levels. *Thromb Haemost.* 1977, 38:465-474.
51. **Contrino J, Hair G, Kreuzer DL, Rickles FR.** In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat. Med.* 1996, 2:209- 215.
52. **Cook TA, Nagasaki T, Gundersen GG.** Rho guanosine triphosphatase mediated the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J Cell Biol* 1998, 141:175-185.

53. **Coso OA, Chiarllo M, Yu JC, Teramolo H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS.** The small GTP- binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*. 1995, 81:1137-1146.
54. **Couchman JR, Woods A.** Syndecan-4 and integrins: combinatorial signaling in cell adhesion. *J cell Sci*. 1999, 112:3415-3420.
55. **Creasey AA, Chang AC, Feigen L, Wun TC, Taylor FB Jr, Hinshaw LB.** Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from Escherichia coli septic shock. *J Clin Invest*. 1993, 91:2850-2856.
56. **Cui JS, O'Shea KS, Purkayastha A, Saunders TL, Ginsburg D.** Fatal haemorrhage and incomplete block to embryogenesis in mice locking coagulation factor. *Nature*, 1996, 384:66-68.
57. **Cui MZ, Parry GC, Oeth P, Larson H, Smith M, Huang Rp et al.** Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated by Sp 1 and EGR-1. *J Biol Chem* 1996, 271:2731-2739.
58. **Cunningham CC, Gorlin JB, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH, Janmey PA, Byers HR, Stossel TP.** Actin -binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science*, 1992, 255: 325-327.
59. **Cunningham MA, Romas P, Hutchinson P, Holdsworth SR, Tipping PG.** Tissue factor and factor VIIa receptor/ligand interactions induce proinflammatory effects in macrophages. *Blood*, 1999,94:3413-3420.
60. **Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J et al.** Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv Cancer Res* 1985, 44:139-266.
61. **Darke TA, Hannani K, Fei HH, Lavi S, Berliner JA.** Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol*. 1991, 138:601-607.
62. **Darke TA, Morrisey 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.
63. **Datta K, Bellacosa A, Chan TO, Tsichlis PN.** Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3- kinase. *J Biol Chem*. 1996, 271:3035-30839.
64. **Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Davis GE, Hill MA, Meininger GA.** Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am J Physiol* 2001, 280:H1427-H1433.
65. **DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Déry O, Mullins RD, Bunnnett N.** *J Cell Biol*. 2000,148,1267-1281.

66. **Diaz-Gonzales F, Forsyth J, Steiner B, Ginsberg MH.** Trans-dominant inhibition of integrin function. *Mol Biol Cell* 1996, 7:1939-1951.
67. **DiPersio CM, Hodivala- Dilke KM, Jaenisch R, Kreidberg JA, Hynes RO.** Alpha3beta1 integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J Cell Biol.* 1997, 137:729-742.
68. **DiPersio CM, Trevithick JE, Hynes RO.** Functional comparison of the alpha 3a and beta 3B cytoplasmatic domain variants of the chicken alpha3 integrin subunit. *Exp Cell Res* 2001, 268:45-60.
69. **Dogic D, Rousselle P, Aumailley M.** Cell adhesion to laminin 1 or 5 induces isoform- specific clustering of integrins and other focal adhesion components. *J Cell Sci* 1998, 111:793-802.
70. **Dorfleutner A, Ruf W.** *Blood*, 2003, 102,3998-4005.
71. **Drake TA, Cheng J, Chang A, Taylor FB.** *Am J. Pathol* 1993,142,1458-1470.
72. **Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS.** Selective cellular expression of tissue factor in human tissues: implications for disorders of haemostasis and thrombosis. *Am J Pathol.* 1989, 134:1087-1097.
73. **Edgington TS, Mackman N, Braud K, Ruf W.** The structural biologie of expression and function of Tissue factor, *Thromb. and Haemost.*, 1991, 66:67-79.
74. **Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN.** Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeleton dynamics. *Nat. Cell Biol.* 1999, 1:253-259.
75. **Enenstein J, Kramer RH.** Confocal microscope analysis of integrin expression on the microvascularture and its sprous in the neonatal foreskin. *J Invest Dermatol.* 1994, 103:381-386.
76. **Engel J, Odermatt A, Engel A, Madri JA, Furthermayer H, Rhode H, Timple R.** Shaps Domain Organization, and Flexibility of Laminin and Fibronektin, two Multifunctional Proteins of the Extracellular Matrix. *J Mol Biol.*,1981, 150:97-120.
77. **Erickson JW, Cerione RA, Hart MJ.** Identification of an actin cytoskeletal complex that includes IQGAP and Cdc42 GTPases. *J Biol. Chem.* 1997, 272:24443-24447.
78. **Ernofsson M, Siegbahn A.** Plateletderived growth factor-BB and monocyte chemotactic protein-1 induce human peripheral blood monocytes to express tissue factor. *Thromb Haemost*, 1996, 83:307-320.
79. **Exton JH.** *Biochem. Biophys. Acta.* 1994,1212,26-42

80. **Faull RJ, Kovach NL, Harlan JM, Ginsberg MH.** Affinity modulation of integrin alpha 5 beta 1: regulation of function response by soluble fibronectin. *J Cell Biol* 1993, 121:155-162.
81. **Fei H, Berliner JA, Parhami F, Darke TA.** Regulation of endothelial cell tissue factor expression by minimally oxidized LDL and lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb.* 1993, 13:1711-1717.
82. **Feig LA.** Tools of the trade: Use dominant- inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat. Cell Biol.* 1999, 1:25-27.
83. **Felding- Habermann B, Mueller BM, Romerdahl CA, Cheresch DA.** Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J Clin Invest.* 1992, 89:2018-2022.
84. **Fischer EG, Ruf W, Mueller BM.** Tissue factor-inhibited thrombin generation activates the signaling thrombin receptor on malignant melanoma cells, *Cancer Research*, 1995, 55: 1629-1632.
85. **Folkman J, D'Amore PA.** Blood vessel formation: What is its molecular basis? *Cell*, 1996, 87:1153-1155.
86. **Folkman J.** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1995, 1:27-31.
87. **Fox JEB, Shattil SJ, Kinlough-Rathbone RL, Richardson M, Packham MA, Sanan DA.** The platelet cytoskeleton stabilizes the interaction between α IIb β 3 and its ligand and induces selective movements of ligand-occupied integrin. *J Biol Chem.* 1996, 271:7004-7011.
88. **Friedlander M, Brooks PC, Schaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA.** Definition of two angiogenic pathway by distinct alpha v integrins. *Science* 1995, 270:1500-1502.
89. **Fukata M, Kuroda S, Fujii K, Nakamura T, Shoji I, Matsuura Y, Okawa K, Iwamatsu A, Kikuchi A, Kaibuchi K.** Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J. Biol. Chem.* 1997, 272:29579-29583.
90. **Fukata Y, Oshiro N, Kinoshita N, Kawano Y, Matsuoka Y, Bennett V, Matsuura Y, Kaibuchi K.** Phosphorylation of adducing by Rho-kinase plays a crucial role in cell motility. *J Cell Biol.* 1999, 145:374-361.
91. **Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH.** The pathogenesis of coronary artery disease and acute coronary syndroms (2). *New Engl J Med* 1992, 326; 310-318.
92. **Fuster V, Fallon JT, Nemerson Y.** Coronary Thrombosis. *Lancet* 1996, 348(suppl 1):S7-S10.
93. **Gallagher PJ, Herring BP, Stull JT.** Myosin light chain kinases. *J Muscle Res Cell Motil.* 1997, 18:1-16.
94. **Gardner K, Bennett V.** Modulation of spectrin –actin assembly by erythrocyte adducing. *Nature*, 1987, 328:359-362.

95. **Ge L, Ly Y, Hollenberg M, DeFea K.** J Biol Chem. 2003, 278,34418-34426.
96. **George EL, Baldwin HS, Hynes RO.** Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells. Blood 1997,90:3073-3081.
97. **Giancotti FG, Rouslahti E.** Integrin signaling. Science. 1999, 285:1028-1032.
98. **Gilmore AP, Burridge K.** Molecular mechanisms for focal adhesion assembly through regulation of protein- protein interactions. Structure. 1996, 4:647-651.
99. **Gong MC, Lizuka k, Nixon G, Browne JP, Hall A, Eccleston JF, Sugai M, Kobayashi S, Somlyo AV, Somlyo AP.** Role of guanine nucleotidebinding proteins-ras-family or trimeric proteins or both-in Ca^{2+} sensitization of smooth muscle. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996, 93:1340-1345.
100. **Gorlin JB, Yamin R, Egan S, Stewart M, Stossel TP, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH.** Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. J. Cell. Biol. 1990, 111:1089-1105.
101. **Gotwals PJ, Chi- Rosso G, Lindner V, Yang J, Ling L, Fawell SE, Koteliansky VE.** The Alpha1 beta1 integrin is expressed during neointima formation in rat arteries and mediates collagen matrix reorganization. J Clin Invest 1996, 97:2469-2477.
102. **Group ER, Donovan- Peluso M.** Lipopolysaccharide induction of THP-1 cells activation binding of c- Jun Ets, and Egr-1 to the tissue factor promotor. J Biol Chem 1996, 271:12423-12430.
103. **Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR, et al.** Targeted antiangiogenic therapy for cancer using vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphabeta3. Clin Cancer Res 2000, 6:3056-3061.
104. **Habets GGM, Scholtes EHM, zuydgeest D, Van der Kammen RA, Stam JC, Berns A, Collard JG.** Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. Cell, 1994, 77:537-549.
105. **Hall A.** G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch. Science 1998, 280:2074-2075.
106. **Hall A.** Rho GTPases and actin cytoskeleton. Science 1998, 279:509-514.
107. **Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, Takeshima H, Nishi T, Ushio Y.** Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. Cancer, 1996, 77:1877-1883.
108. **Han J, Das B, Wei W, Van aelst L, Mosteller RD, Khosravi-Far R, Westwick JK, Der CJ Broek D.** Lck regulates Vav activation of

- members of the Rho family of GTPases. *Mol. Cell. Biol.*, 1997, 17:1346-1353.
109. **Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ.** A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 1994, 265:808- 881.
110. **Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100:57-70.
111. **Harlos K, Martin DM, O'Brien DP, Jones EY, Stuart DI, Polikarpov I, Miller A, Tuddenham EG, Boys CW.** Crystal structure of the extracellular region of human tissue factor. *Nature*, 1994, 370:662-666.
112. **Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, Sternweis PC, Bollag G.** Direct stimulation of guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science*, 1998, 280:2112-2114.
113. **Hartwig JH, Bokoch GM, Carpenter CL, Janmey PA, Taylor LA, Toker A, Stossel TP.** Thrombin receptor ligation and activated Rac uncup actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell*, 1995, 82:643-653.
114. **Hatakeyama K, Asada y, Marutska K, Sato y, Kamikubo Y, Sumiyoshi A.** Localization and activity of Tissue factor in human aortic atherosclerotic lesions, *Atherosclerosis*, 1997, 133:213-219.
115. **Heldin CH, Westermark B.** Mechanism of action and in vivo role of platelet- derived growth factor. *Physiol Rev.* 1999, 79:1283-1316.
116. **Hoffmann CJ, Lawson WE, Miller RH, Hultin MB.** Correlation of vitamin K-dependent clotting factors with cholesterol and triglycerides in healthy Young adults. *Arterioscler Thromb.* 1994, 14:1737-1740.
117. **Holschermann H, Kohl O, Maus U, Durfeld F, Bierhaus A, Nawroth PP et al.** Cyclosporin A inhibits monocyte tissue factor activation in cardiac transplant recipients. *Circulation* 1997, 96:4232-4238.
118. **Hoshino M, Sone M, Fukata M, Kuroda S, Kaibuchi K, Nabeshima Y, Hama C.** Identification of the stef gene that encodes a novel guanine nucleotide exchange factor specific for Rac1. *J Biol. Chem.* 1999, 274:17837-17844.
119. **Huang X, Molema G, King S, Watkins L, Edgington TS, Thorpe PE.** Tumor infarction in mice by antibody- directed targeting of tissue factor to tumour vasculature. *Science*, 1997, 275:547-550.
120. **Huang X, Wu J, Spong S, Sheppard D.** The Integrin $\alpha v \beta 6$ is critical for keratinocyte migration on both its known ligand, Fibronectin and on vitronectin. *J Cell Sci.* 1998, 111:2189-2195.

121. **Humphries MJ.** Integrin structure. *Biochem soc Trans* 2000, 28:311-339.
122. **Hynes R.** Molecular Biology of fibronectin. *Cell Biol.* 1985, 1:67-90.
123. **Hynes RO.** *Fibronectins.* New York: Springer- Verlag. 1990.
124. **Hynes RO.** Integrins: Versatility, modulation, and signalling cell adhesion. *Cell.* 1992, 69:11-25.
125. **Ichikawa K, Nakagawa K, Hirano K, Sueishi K.** The localization of tissue factor and apolipoprotein (a) in atherosclerotic lesions of the human aorta and their relation to fibrinogen-fibrin transition. *Pathol Res Pract.* 1996, 192:224-232.
126. **Ivaska J, Heino J.** Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 2000, 57:16-24.
127. **Joberty G, Peterson C, Gao L, Macara IG.** The cell- polarity protein Par-6 links Par-3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat. Cell. Biol.* 2000, 2:531-539.
128. **Kahn ML, Hammes SR, Botka C, Coughlin SR.** Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family. *J Biol Chem.* 1998; 273(36):23290-23296.
129. **Kaibuchi K.** Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by Rho targets. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 1999, 22:23-38.
130. **Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K.** Phosphorylation of myosin- binding subunit of myosin phosphatase by Rho- kinase in vitro. *J Cell Biol.* 1999, 147:1023-1038.
131. **Kim JP, Zhang K, Chen JD et al.** Vitronectin- driven human keratinocyte locomotion is mediated by alpha V beta 5 integrin receptor. *J Biol Chem* 1994, 269:926-932.
132. **Kimura K, Fukata Y, Matsuoka Y, Bennett V, Matsuura Y, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K.** Regulation of the association of adducin with actin filaments by rho-associated kinase (Rho-kinase) and Myosin phosphatase. *J Biol Chem.* 1998, 273: 5542-5548.
133. **Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuko M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K.** Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase. *Science,* 1996, 273:245,248.
134. **Kiosses WB, Daniels RH, Otey C, Bokoch GM, Schwartz MA.** A role for p-21-activated kinase in endothelial cell migration. *J Cell Biol.* 1999, 147:831-844.
135. **Kjoller L, Hall A.** Signaling to rho GTPases. *Exp Cell Res.* 1999, 253:166, 179.

136. **Klarenbach SW, Chipiuk A, Nelson RC, Hollenberg MD, Murray AG.** *Circ. Res.* 2003,92,272-278.
137. **Knaus UG, Morris S, Dong HJ, Chernoff J, Bockoch GM.** Regulation of human leukocyte P21-activated kinases through G-protein-coupled receptors. *Science*, 1995, 269:221-223.
138. **Kolluri R, Tolias KF, Carpenter CL, Rosen FS, Kirchhausen T.** Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrom protein with the GTPase Cdc42. *Proc Natl. Acad Sci. USA*, 1996, 93:5615-5618.
139. **Konos Wc, Fox CF, Lamoreaux WJ, Coons LB, Jennings LK.** The effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor occupancy on the cytoskeleton of resting and activated platelets. *J Biol Chem.* 1991, 266:13891-13900.
140. **Koyama T, Nishia K, Ohdama S, Sawada M, Marohami N, Hiroshima S, Kariyama R, Matsuzawa K, Hasegawa R, Achi N.** Determination of plasma Tissue factor antigen and its clinical significance, *British journal of Haemat.*, 1994, 87:343-347.
141. **Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L.** The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15:1942-1952.
142. **Kupfer A, Louvard D, Singer SJ.** Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, 79:2603-2607.
143. **Kuroda S, Fukata M, Kobayashi K, Nakafuku M, Nomura N, Iwamatsu A, Kaibuchi K.** Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J Biol. Chem.* 1996, 271:23363-23367.
144. **Kyriakis JM, Avruch J.** Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioassays.* 1996, 18:567-577.
145. **Landers SC, Gupta M, Lewis JC.** Ultrastructural localization of tissue factor on monocyte-derived macrophages and macrophage foam cells associated with atherosclerotic lesions. *Virchows Arch* 1994, 425:49-54.
146. **Lasa M, Brook M, Saklatvala J, Clark AR.** Dexamethasone destabilizes cyclooxygenase 2 mRNA by inhibiting mitogen-activated protein kinase p38. *Mol. Cell. Biol.* 2001, 21:771-780.
147. **Lasa M, Mahtani KR, Finch A, Brewer G, Saklatvala J, Clark AR.** Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by mitogen-activated protein kinase p 38 signaling cascade. *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20:4265-4274.
148. **Lauffenburger DA, Horwitz AF.** Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996, 84:359-369.

149. **Lee JC, Young PR.** Role of CSB/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanism. *J. Leukoc. Biol.* 1996, 59:152-157.
150. **Lee RT, Berditchevski F, Cheng GC, Hemler ME.** Integrin-mediated collagen matrix reorganization by cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1995, 76:209- 214.
151. **Leitinger B, McDowall A, Stanley P, Hogg N.** The regulation of integrin function by Ca(2+). *Biochim Biophys Acta* 2000, 1498:91-98.
152. **Leung T, Chen XQ, Tan I, Manser E, Lim L.** Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol. Cell Biol.* 1998, 18:130-140.
153. **Levi M, Ten Cate H, Van der Poll T, Van Deventer SJ.** Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis, *Journal of the American Medical Association*, 1993, 270:975-979.
154. **Levy GA, Schwartz BS, Curtiss LK, Edgington TS.** Plasma lipoprotein induction and suppression of the generation of cellular procoagulant activity in vitro. *J Clin Invest.* 1981, 67:1614-1622.
155. **Liao YF, Gotwals PJ, Koteliansky VE, Sheppard D, Van De Water L.** The EIII segment of fibronectin is a ligand for integrins $\alpha 9\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing. *J Biol Chem.* 2002, 277:14467-14474.
156. **Lichtner RB, Howlett AR, Lerch M, Xuan JA, Brink J, Langton-Webster B, Schneider MR.** Negative cooperativity between alpha 3 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins in human mammary carcinoma MDA MB 231 Cells. *Exp Cell Res* 1998, 240:368-376.
157. **Liliental J, Moon SY, Lesche R, Mamillapalli R, Li D, Zheng Y, Sun H, Wu H.** Genetic deletion of the pten tumor suppressor gene promotes cell motility by activation of Rac1 and Cdc42 GTPases. *Curr. Biol.* 2000, 10:401-404.
158. **Lin D, Edwards AS, Fawcett JP, Mbamalu G, Scott JD, Pawson T.** A mammalian PAR-3 -PAR-6 complex implicated in Cdc42/ Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat. Cell Biol.* 2000, 2:540-547.
159. **Liu BP, Chrzanowska- Wodnicka M, Burridge K.** Microtubule depolymerization induces stress fibers, focal adhesions and DNA synthesis via the GTP-binding protein Rho. *Cell Adhes Commun* 1998, 5:249-255.
160. **Luther T, Flössel C, Hietschhold V, Koslowski R, Muller M.** Flow cytometric analysis of Tissue factor expression on stimulated

- monocytes- comparison to procoagulant activity of mononuclear blood cells, *Blood*, 1990, 61: 375-378.
161. **Lyberg T, Nilsson K, Prydz H.** Synthesis of thromboplastin by U-937 cells. *Br J Haematol.* 1982, 51:631-341.
 162. **Macara IG, Lounsbury KM, Richards SA, McKiernan C, Barsagi D.** The Ras superfamily of GTPases. *FASEB J.* 1996, 10:625-630.
 163. **Machesky LM, Insall RH.** Scar 1 and the related Wiskott- Aldrich syndrome protein, WASP regulate, the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol.* 1998, 8:1347-1356.
 164. **Mackman N, Brand K, Edgington TS.** Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. *J Exp Med.* 1991, 174:1517-1526.
 165. **Mackman N.** Lipopolysaccharide induction of gene expression in human monocytic cells. *Immunol Res.* 2000, 21:247-251.
 166. **Manser E, Chong C, Zhao Z- S, Leung T, Michael G, Hall C, Lim L.** Molecular cloning of a new member of the p21- Cdc42/ Rac-activated kinase (PAK) family. *J Biol Chem.* 1995, 270: 25070-25078.
 167. **Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao Z-S, Lim L.** A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature*, 1994, 367:40-46.
 168. **Marlin ST, Morton CC, Anderson DC, Springer TA.** LFA-1 Immunodeficiency disease. *J Exp Med.* 1986, 164:855-867.
 169. **Marmur JD, Thiruvikraman SV, Fyfe BS, Guha A, Sharma SK, Ambrose JA, Fallon JT, Nemerson Y, Taubman MB.** Identification of active tissue factor in human coronary atheroma. *Circulation.* 1996, 94:1226-1232.
 170. **Marti AZ, Luo C, Cunningham C, Ohta Y, Hartwig J, Stossel TP, Kyriakis JM, Avruch J.** Actin-binding protein- 280 binds the stress- activated protein kinase (SAPK) activator SEK-1 and its required for tumor necrosis factor - α activation of SPAK in melanoma cells. *J Biol. Chem.* 1997, 272:2620-2628.
 171. **Martin DMA, Boys CWG, Ruf W.** Tissue factor: molecular recognition and cofactor function. *FASEB (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J*, 1995, 272:2620-2628.
 172. **Martin GA, Bollag G, McCormick F. Abo A.** A novel serine kinase activated by rac1/ Cdc 42Hs- dependent autophosphorylation is related to PAK65 and STE20. *EMBO J.* 1995, 14:1970-1978.
 173. **Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S, Tsukita S.** Rho- kinase phosphorylates COOH- terminal

- threonine of ezrin/radixin/ moesin (ERM) proteins and regulates their head- to- tail association. *J Cell Biol.* 1998, 140:647-657.
174. **Matsui T, Yonemura S, Tsukita S.** Activation of ERM protein in vivo by Rho involves phosphatidyl-inositol 4- phosphate 5-kinase and not ROCKkinases. *Curr. Biol.* 1999, 9:1259-1262.
175. **Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, Haines AP, Stirling Y, Imeson JD, Thompson SG.** Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Lancet.* 1986, 2:533-537.
176. **Mechtcheriakova D, Schabbauer G, Lucerna M, Clauss M, De Martin R, Binder BR et al.** Specificity, diversity and convergence in VEGF and TNF-(alpha) signaling events leading to tissue factor up-regulation via EGR-1 in endothelial cells. *FASEB J,* 2001, 15:230-242.
177. **Meerschaert JA, Furie MB.** Monocytes use either CD11/CD18 or VLA-4 to migrate across human endothelium in vitro. *J Immunol.* 1994, 152:1915-1926.
178. **Michel CC, Curry FE.** Microvascular permeability. *Physiol Rev.* 1999, 79:703-761.
179. **Michiels F, Habets GG, Stam JC, Van der Kammen RA, Collard JG.** A role for Rac in Tiam1- induced membrane ruffling and invasion. *Nature,* 1995, 375:338-340.
180. **Michiels F, Stam JC, Hordijk PL, Van der Kammen RA, Ruuls-Van Stalle L, Feltkamp CA, Collard JG.** Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH₂- terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and c-Jun NH₂- terminal kinase activation. *J Cell Biol.* 1997, 137:387-398.
181. **Miki H, Miura K, Takenawa T.** N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J,* 1996, 15:5326-5335.
182. **Miki H, Sasaki T, Takai Y, Takenawa T.** Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature,* 1998, 391:93-96.
183. **Minden A, Lin A, Clarel FX, Abo A, Karin M.** Selective activation of the JNK signaling cascade and c- Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42 Hs. *Cell.* 1995, 81:1147-1157.
184. **Miranti CK, Leng L, Maschberger P, et al.** Identification of a novel integrin signalling pathway involving the kinase Syk and the guanine nucleotide exchange factor Vav1. *Curr Biol ,* 1998, 8:1289-1299.

185. **Miranti CK, Ohno S, Brugge JS.** Protein Kinase C regulates integrin- induced activation of the extracellular regulated kinase pathway upstream of Shc. *J Biol Chem.* 1999, 274:10571-10581.
186. **Mody RS, Carson SD.** *Biochemistry*, 1997,36,7869-7875.
187. **Moll T, Czyz M, Holzmuller H, Hofer- Warbinek R, Wagner E, Winkler H et al.** Regulation of the tissue factor promotor in endothelial cells. Binding of NF kappaB-, AP-1-, and Sp 1- like transcription factors. *J Biol Chem* 1995, 270:3849-3857.
188. **Monroe DM, Hoffman M, Oliver JA, Robert HR.** A possible mechanism of action of activated factor VII independent of Tissue factor, *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 1998, 9:15-20.
189. **Moolenaar WH.** Bioactive lysophospholipids and their G proteincoupled receptors. *Exp Cell Res.* 1999, 253:230-238.
190. **Mosher DF.** *Fibronectin.* San Diego: Academic press, Inc. 1989.
191. **Mostafavi-Pour Z, Askari JA, Wittard JD, Humphries MJ.** Identification of a novel heparin-binding site in the alternatively spliced IIIICS region of fibronectin: roles of integrins and proteoglycans in cell adhesion to fibronectin splice variants. *Matrix Biol.* 2001, 20:63-73.
192. **Mueller BM, Reisfeld RA, Edgington TS, Ruf W.** Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient haematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:11832-11836.
193. **Mueller BM, Ruf W.** Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor- dependent experimental metastasis. *J Clin Invest*, 1998, 101:1372-1378.
194. **Mueller YA, Ultsch MH, Kelley RF, de Vos AM.** Structure of the extracellular domain of tissue factor: location of the factor VIIa binding site. *Biochemistry*, 1994, 33:10,864-10,870.
195. **Muhlfelder TW, Teodorescu V, Rand J, Rosman A, Niemetz J.** Human atheromatous plaque extracts induce tissue factor activity (TFa) in monocytes and also express constitutive TFa. *Thromb Haemost* 1999, 81:146-150.
196. **Müller M, Albrecht S, Gölfert F.** Localisation of tissue factor in actin-filament-rich membrane areas of epithelial cells. *Exp Cell Res.* 1999, 248:136-147.
197. **Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD.** The interaction of Apr2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95:6181-6186.
198. **Nash GF, Walsh DC, Kakkar AK.** The role of the coagulation system in tumor angiogenesis. *Lancet Oncol.* 2001, 2:608-613.
199. **Nawroth PP, Hanley DA, Esmon CT, Stern DM.** *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986,83,3460-3464.

200. **Nemerson Y.** The Tissue factor pathway of blood coagulation *Haemostasis and Thrombosis*, 1994, 84-93.
201. **Nemerson Y.** Tissue factor and haemostasis, *Blood*, 1988, 71:1-8.
202. **Nimnual AS, Yatsula BA, Bar- Sagi D.** Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science*, 1998, 279:560-563.
203. **Nobes CD, Hall A.** Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol.* 1999, 144:1235-1244.
204. **Nobes CD, Hall A.** Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia and filopodia. *Cell*, 1995, 81:53-62.
205. **Nobes CD, Hawkins P, Stephens L, Hall A.** Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. *J Cell. Sci.* 1995, 108: 225-233.
206. **Nystedt S, Emilsson K, Wahlstedt C, Sundelin J.** Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(20):9208-9212.
207. **Nystedt S, Ramakrishnan V, Sundelin J.** *J Biol Chem.* 1996, 71,14910-14915.
208. **Olofsson B.** Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signaling. *Cell signal.* 1999, 11:545-554.
209. **Olson MF, Pasteris NG, Gorski JL, Hall A.** Faciogenital dysplasia protein (FGDI) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Curr. Biol.* 1996, 6:1628-1633.
210. **Osterud B, Bajaj MS, Bajaj SP.** Sites of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and Tissue factor (TF) expression under physiologic and pathologic conditions, *Thromb. and Haemost.*, 1995, 73: 873-875.
211. **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.
212. **Osterud B.** Tissue factor: A complex biological role, *Thrombosis and Haemostasis*, 1997, 87: 755-758.
213. **Ott I, Fischer EG, Miyai Y, Mueller BM, Ruf w.** A Role for Tissue factor in Cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding Protein 280, *Journ. of cell biolog.*, 1998, 140:1241-1253.
214. **Pallazzo AF, Cook TA; Alberts AS, Gundersen GG.** mDia mediates Rho- regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* 2001, 3:723-729.

215. **Parsons JT, Parsons SJ.** Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1997, 9:187-192.
216. **Pendurthi UR, Allen KE, Ezban M, Rao LV.** Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, matrix signalling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor- induced signal transduction. *J Biol Chem.* 2000, 275:14,632-14,641.
217. **Pendurthi UR, Rao LVM.** Factor VIIa/tissue factor- induced signaling: a link between clotting and disease. In: Litwicck G, ed. *Vitamins and Hormons.* San Diego, CA: Academic Press. 2002,322-355.
218. **Peppelenbosch M, Boone E, Jones GE, van Deventer SJ, Haegeman G, Fiers W, Grooten J, Ridley AJ.** Multiple signal transduction pathways regulate TNF-induced actin reorganization in macrophages: inhibition of Cdc42- mediated filopodium formation by TNF. *J Immunol.* 1999, 162:837-845.
219. **Peterson LC, Thastrup O, Hagel G, Sorensen BB, Freskgrad PO, Rao LV, Ezban M.** Exclusion of known protease- activated receptors in factor VIIa- induced signal transduction. *Thromb Haemst,* 2000a, 83:571-576.
220. **Pfaff M, Liu S, Erle DJ, Ginsberg MH.** Integrin beta cytoplasmatic domains differentially bind to cytoskeletal Proteins. *J Biol Chem* 1998, 273:6104-6109.
221. **Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW.** Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 2000, 275:21785-21788.
222. **Pollak ES, Hung HL, Godin W, Overton GC, High KA.** Functional characterization of the human factor VII 5'-flanking region. *J Biol Chem.* 1996, 271:1738-1747.
223. **Poulsen LK, Jacobsen N, Sorensen BB, Bergenhem NC, Kelly JD, Foster DC, Thastrup O, Ezban M, Peterson LC.** Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor VIIa to tissue factor. *J Biol Chem,* 1998, 273:6228-6232.
224. **Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM.** Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol. Biol. Cell.* 1998, 9:1863-1871.
225. **Prydz H.** A new paradigm for blood coagulation research. *Thromb Haemost* 2000,83:520-522.
226. **Prydz HS, Camerer E, Rottingen JA, Wiiger MT, Gjernes E.** Cellular consequences of the initiation of blood coagulation. *Thromb Haemost.* 1999,82:183-192.

227. **Puls A, Eliopoulos AG, Nobes CD, Bridges T, Young LS, Hall A.** Activation of small GTPase Cdc42 by inflammatory cytokines TNF(α) and IL-1 and by the Epstein- Barr- virus transforming protein LMP1. *J Cell Sci.* 1999, 122:2983-2992.
228. **Qiu RG, Abo A, Steven Martin G.** A human homolog of the *C. elegans* polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKC signalling and cell transformation. *Curr. Biol.* 2000, 10:697-707.
229. **Randolph GJ, Luther T, Albrecht A, Magdolen V, Muller WA.** Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to trafficking through endothelium in vitro. *Blood.* 1998, 92:4167-77.
230. **Rehn M, Veikkola T, Kukk-Valdre E, Nakamura H, Ilmonen M, Lombardo C, Pihlajaniemi T, Alitalo K, Vouri K.** Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:1024-1029.
231. **Remold-O'Donnell E, Rosen FS, Kenney DM.** Defects in Wiskott-Aldrich Syndrome blood cells. *Blood.* 1996, 87:2621-2631.
232. **Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA.** Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 1999, 18:578-585.
233. **Retta SF, Balzac F, Ferraris P, Belkin AM, Fassler R, Humphries MJ, De Leo G, Silengo L, Tarone G.** Beta1- Integrin cytoplasmic subdomains involved in dominant negative function. *Mol Biol Cell* 1998, 9:715-731.
234. **Reynolds LE, Wyder L, Lively JC, et al.** Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med* 2002, 8:27-34.
235. **Ridley AJ, Hall A.** The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 1992, 70:389-399.
236. **Ridley AJ, Paterson HF, Johnson CL, Diekmann D, Hall A.** The small GTP-binding protein Rac1 regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992, 70:401-410.
237. **Ridley AJ.** Rho family proteins and regulation of the actin cytoskeleton. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 1999, 22:1-22.
238. **Riewald M, Kravchenko VV, Petrovan RJ, et al.** Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1. *Blood*, 2001, 97: 3109-3116.
239. **Riewald M, Ruf W.** Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001, 98:7742-7747.
240. **Rodriguez- Viciano P, Warne PH, Khawaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Warterfield MD, Riedley A, Downward J.** Role

- of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell*, 1997, 89:457-467.
241. **Rosales C, Juliano RL.** Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J Leukoc Biol.* 1995, 57:189-198.
242. **Rottingen JA, Endens T, Camerers E, Iversen JG, Prydz H.** Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca^{2+} 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.
243. **Rottner K, Hall A, Small JV.** Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol.* 1999, 9:640-648.
244. **Royal I, Lamarche- Van N, Lamorte L, Kaibuchi K, Park M.** Activation of Cdc42, rac, PAK and rho- kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Mol. Biol. Cell*, 2000, 11:1709-1725.
245. **Ruf w; Dorfleutner A, Riewald M.** Specificity of coagulation factor signaling. *J Thromb Haemost.* 2003.1:1495-1503.
246. **Ruf W, Edgington TS.** Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.) J*, 1994, 8:385-390.
247. **Ruf W, Fischer E, Huang HY, Miyahi Y, Ott I, Riewald M, Mueller BM.** Diverse funktion of protease receptor Tissue factor in inflammation and metastasis, *Immunologic Research*, 2000, 21:289-292.
248. **Ruf W, Schullek JR, Stone MJ, Edgington TS.** Mutational mapping of functional residues in Tissue Factor identification of factor VII recognition determinants in both structural modules of the predicted cytokine receptor homology domain, *Biochemistry*, 1994, 33:1565-1572.
249. **Ruf W.** Factor VIIa residue Arg 290 is required for efficient activation of the macromolecular substrate factor X, *Biochemistry*, 1994,33:11631-11636.
250. **Saklatvala J, Davis W, Guesdon F.** Interleukin 1 and tumor necrosis factor signal transduction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.*1996, 351:151-157.
251. **Sander EE, Ten Klooster JP, Van Delft S, Van der Kammen Collard JG.** Rac downregulates rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol.* 1999, 147:1009-1022.
252. **Sander EE, Van Delft S, ten Klooster JP, Reid T, van der Kammen RA, Michiels F, Collard JG.** Matrix- dependent Tiam1/ Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or

- cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol.* 1998, 143:1385-1398.
253. **Sanders LC, Matsumara F, Bokoch GM, Lanerolle P.** Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science*, 1999, 283:2083-2085.
254. **Scarpati EM, Wen D, Broze GJJ, Miletich JP, Flandermeyer RR, Siegel NR, Sadler JE.** Human tissue factor: cDNA sequence and chromosome localization of the gene. *Biochemistry.* 1987, 26:5234-5238.
255. **Schlaepfer DD, Hunter T.** Integrin signaling and tyrosine phosphorylation: Just the FAKs? *Trends Cell Biol* 1998, 8:151-157.
256. **Schuff- Werner P, Claus G, Armstrong VW, Kostering H, Seidel D.** Enhanced procoagulatory activity (PCA) of human monocytes/macrophages after in vitro stimulation with chemically modified LDL. *Atherosclerosis.* 1989, 78:109-112.
257. **Schwartz BS, Levy GA, Curtiss LK, Fair DS, Edgington TS.** Plasma lipoprotein induction and suppression of the generation of cellular procoagulant activity in vitro: two procoagulant activities are produced by peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest.* 1981, 67:1650-1658.
258. **Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH.** Integrins: Emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995, 11:549-599.
259. **Schwartz MA.** Integrin signalling revisited. *Trends Cell Biol* 2001, 11:466-470.
260. **Schwartz MA.** Integrins, oncogenes, and anchorage independence. *J Cell Biol.* 1997, 139:575-578.
261. **Seasholtz TM, Majumdar M, Brown JH.** Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signalling. *Mol Pharmacol.* 1999, 55:949-956.
262. **Sells MA, Boyd JT, Chernoff J.** P21-activated kinase 1 regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *J Cell Biol.* 1999, 145:837-849.
263. **Semeraro N, Colucci M.** Changes in the coagulation-fibrinolysis balance of endothelial cells and mononuclear phagocytes: Role in disseminated intravascular coagulation associated with infectious diseases, *International Journal of clinical laboratory Research*, 1992, 21:214-220.
264. **Sharma CP, Ezzell RM, Arnaout MA.** Direct interaction of filamin (ABP 280) with Beta-2 Integrin subunit CD 18. *J Immunol.* 1995, 154:3461-3470.
265. **Shaw RJ, Henry M, Solomon F, Jacks T.** RhoA-dependent phosphorylation and relocalisation of ERM proteins into apical

- membrane/ actin protrusions in fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 1998, 9:403-419.
266. **Siegbahn A, Johnell M, Rorsman L, Heldin C-H, Rönstrand L.** Binding of factor VIIa to tissue factor on human fibroblasts leads to activation of phospholipase C and enhanced PDGF-BB stimulated chemotaxis. *Blood* 2000, 96:3452-3458.
267. **Simpson HC, Mann JI, Meade TW, Chakrabarti R, Stirling Y, Woolf L.** Hypertriglyceridaemia and hypercoagulability. *Lancet*. 1983, 1:786-790.
268. **Somlyo AP, Somlyo AV.** Signal transduction by G- Proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle II. *J Physiol (Lond)*. 2000, 522:177-185.
269. **Sorensen BB, Freskgard PO, Nielson LS, et al.** Factor VIIa-induced p44/42 mitogen- activated protein kinase activation requires the proteolytic activity of factor VIIa and is independent of the tissue factor cytoplasmatic domain. *J Biol Chem*. 1999, 274:21,349-21,354.
270. **Stam JC, Michiels F, Van der Kammen RA, Moolenaar WH, Collard JG.** Invasion of T-lymphoma cells: Cooperation between Rho family GTPases and lysophospholipid receptor signaling. *EMBO J*, 1998, 17:4066-4074.
271. **Stephens LE, Sutherland AE, Klimanskaya IV, Andrieux A, Menses J, Pedersen RA, Damsky CH.** Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev* 1995, 9:1883-1895.
272. **Sugihara K, Nakatsuji N, Nakamura K, Nakao K, Hashimoto R, Otani H, Sakagami H, Kondo H, Nozawa S, Aiba A, et al.** Rac 1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene*, 1998, 17:3427-3433.
273. **Symons M, Derry JMJ, Kariak B, Jiang S, Lemahieu V, McCormick F, Francke U, Abo A.** Wiskott- Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase Cdc42- hs, is implicated in actin polymerisation. *Cell*. 1996, 84:723-734.
274. **Symons M, Settleman J.** Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol*. 2000, 10:415-419.
275. **Takahashi H, Satoh H, Wada K, Takakuwa E, Seki Y, Shibata A.** Tissue factor in Plasma of patient with disseminated intravascular coagulation, *American Journal of Haematology*, 1994, 46: 333-337.
276. **Tapon N, Hall A.** Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1997, 9:86-92.
277. **Taverna D, Hynes RO.** Reduced blood vessel formation and tumor growth in alpha5-integrin-negative teratocarcinomas and embryoid bodies. *Cancer Res*. 2001, 61:5255-5261.

278. **Thiruvikraman SV, Guha A, Roboz J, Taubman MB, Nemerson Y, Fallon JT.** In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin- labeled factors VIIa and X. *Lab Invest*, 1996, 75:451-461.
279. **Timokhina I, Kissel H, Stella G, Besmer P.** Kit signalling through PI 3- Kinase and Src kinase pathways: an essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *EMBO J*, 1998, 17:6250-6262.
280. **Tipping PG, Campbell DA, Boyce NW, Holdsworth SR.** Alveolar macrophage procoagulant activity is increased in acute hyperoxic lung injury. *Am J Pathol*. 1988, 131:206-212.
281. **Toker A.** The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate. *Curr Opin. Cell Biol*. 1998, 10:254-261.
282. **Tomatis D, Echtermayer F, Schober S, Balzac F, Retta SF, Silengo L, Tarone G.** The musclespecific laminin receptor $\alpha 7\beta 1$ integrin negatively regulates $\alpha 6\beta 1$ Fibronectin receptor function. *Exp Cell Res* 1999, 246:421-432.
283. **Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ Jr.** Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood*. 1996, 88:1583-1587.
284. **Tsao BP, Fair DS, Curtiss LK, Edgington TS.** Monocytes can be induced by lipopolysaccharide- triggered T lymphocytes to express functional factor VII/ VIIa protease activity. *J Exp Med*. 1984, 159:1042-1057.
285. **Tsopanoglou NE, Andriopoulou P, Maragoudakis ME.** On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis : involvement of $\alpha V\beta 3$ integrin. *Am J Physiol*. 2002, 283:C1501-C1510.
286. **Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S.** ERM proteins: head- to- tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem Sci*. 1997, 22:53-58.
287. **Turley EA.** Extracellular matrix remodelling: Multiple paradigms in vascular disease. *Circ Res* 2001, 88:2-4.
288. **Van Aelst L, D'Souza- Schorey C.** Rho GTPases and signalling networks. *Genes Dev*. 1997, 11:2295-2322.
289. **Van Hinsbergh VWM.** Endothelial permeability for macromolecules: mechanistic aspects of pathophysiological modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997, 17: 1018-1023.
290. **Van Leeuwen FN, van Delft S, Kain HE, van der Kammen RA, Collard JG.** Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nature Cell Biol.*, 1999, 1:242-248.

291. **Varner JA, Emerson DA, Juliano RL.** Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell.* 1995, 6:725-740.
292. **Vouret-Craviari V, Grall D, Van Obberghen- Schilling E. J.** *Thromb. Haemostasis*, 2003, 1, 1103-1111.
293. **Vu T-KH, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR.** Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 1991; 64:1057-1068.
294. **Vuori K, Ruoslahti E.** Activation of protein kinase C precedes $\alpha 5\beta 1$ integrin- mediated cell spreading on fibronectin. *J Biol. Chem.* 1993, 268:21459-21462.
295. **Vuori K.** Integrin signalling: Tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *J Member Biol* 1998, 165:191-199.
296. **Wasserman S.** FH protein as cytoskeletal organizers. *Trends Cell Biol.* 1998, 8:111-115.
297. **Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S.** Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho- induced actin reorganization. *Natl. Cell Biol.* 1999, 1:136-143.
298. **Watanabe N, Madaule P, Reid T, Ishizaki T, Watanabe G, Kakizuka A, Saito Y, Nakao K, Jockusch BM, Narumia S.** p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profiling. *EMBO J.* 1997, 16:3044-3056.
299. **Weis JR, Pitas RE, Wilson BD, Rodgers GM.** Oxidized low-density lipoprotein increases cultured human endothelial cell tissue factor activity and reduces protein C activation. *FASEB J.* 1991, 5:2459-2465.
300. **Weiss HJ, Lages B.** Evidence for tissue factor- dependent activation of the classic extrinsic coagulation mechanism in blood obtained from bleeding time wounds. *Blood.* 1988, 71:629-635.
301. **Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, Mitchison TJ.** The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol.* 1997, 138:375-384.
302. **Wilcox JN, Noguchi S, Casanova J.** Extrahepatic Synthesis of factor VII in Human Atherosclerosis Vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 23:136-141.
303. **Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D.** Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerosis plaque. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989, 86:2839-2843.
304. **Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm B, Chen CY, Shyu AB, Muller M, Gaestel M, Resch K, Holtmann H.** The MAP Kinase p38 pathway signals for cytokine- induced mRNA stabilization via

- MAP kinase- activated protein kinase 2 an AU- rich region- targeted mechanism. *EMBO J.* 1999, 18:4969-4980.
305. **Wojciak- Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley AJ.** Regulation of TNF-alpha induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1998, 176:150-165.
306. **Xiong JP, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA.** Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$. *Science* 2001, 294:339-345.
307. **Yamada KM, Clark RAF.** Provisional matrix. In *The Molecular and cellular Biology of wound Repair*. New York: Plenum Press. 1996.
308. **Yamada KM, Danen EHJ.** Integrin signaling. In: Gutkind JS, editor. *Signaling networks and cell cycle control- the molecular basis of cancer and other diseases*. Totowa, NJ: Humana Press. 2000, 1-25.
309. **Yang JT, Rayburn H, Hynes RO.** Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* 1995,121:549-560.
310. **Yang JT, Rayburn H, Hynes RO.** Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin- deficient mice. *Development.* 1993,119:1093-1105.
311. **Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, Nishida E, Mizuno K.** Cofilin Phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*, 1998, 393:809-812.
312. **Yee KO, Schwartz SM.** Why atherosclerotic vessels narrow: The fibrin hypothesis. *Thromb Haemost* 1999, 82:762-771.
313. **Zhang Y, Deng Y, Luther T, Muller M, Ziegler R, Waldherr R, Stern DM, Nawroth PP.** Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *Journal of clinical Investigation*, 1994, 94:1320-1327.
314. **Zhou L, Stordeur P, de Lavarelle A, Thielemans K, Chapel P, Goldman M, Pradier O.** CD40 engagement on endothelial cells promotes tissue factor-dependent procoagulant activity. *Thromb Haemost*, 1998, 79:1025-1028.
315. **Zinocheck TF, Roy S, Vehar GA.** The cytoplasmic domain of tissue factor is phosphorylated by a protein kinase C- dependent mechanism. *J Biol Chem* 1992, 267:3561-3564.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. I. Ott für die Bereitstellung des Themas, ihre kompetente Führung und ihre motivierende und hilfsbereite Betreuung. Auch für ihre Unterstützung bei Erhebung, Auswertung und Analyse der Datensätze, beim Anfertigen der Dissertationsschrift, sowie für ihre offene und gesprächsbereite Haltung möchte ich ganz herzlich Dank sagen.

Mein weiterer Dank gilt allen medizinisch-technischen und labor-technischen Assistentinnen, die an mancher Problemlösung im Labor wesentlich beteiligt waren. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Corina Huber, Frau Tanja Nordte und Frau Birgitt Campbell herzlich bedanken.

Bei meinen lieben Freundinnen, Annette Junker und Claudia Schwarz, möchte ich mich, besonders dafür, dass sie stets hilfsbereit an meiner Seite standen, herzlichst bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen lieben Eltern, meiner netten Schwester Niloofar und meinem lieben Schwager Rainer dafür besonderen Dank sagen, dass sie immer und überall, wo es nur möglich war, mich unterstützt und mir geholfen haben und stets ein offenes Ohr für mich hatten.