

**Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Ulrich Walter

**Strukturelle und funktionelle Analyse der Interaktion des
Blutgerinnungsfaktors XI mit H-Kininogen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Thomas Renné

aus Kusel

Würzburg, Juli 2007

Referent: Prof. Dr. U. Walter

Korreferentin: Prof. Dr. M. Kuhn

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2007

Der Promovend ist Arzt

INHALTSVERZEICHNIS

A	Einleitung	1
A 1	Gerinnungsphysiologie des Blutgerinnungsfaktors XI	1
A 2	Biochemie des Blutgerinnungsfaktors XI	4
A 3	Kontaktphasenaktivierung	6
A 4	Nomenklatur	7
A 5	Aufgabenstellung	8
B	Material und Methoden	9
B 1	Material	9
B 1.1	Proteine, Peptide und Chemikalien	9
B 1.2	Reagenzien für die Molekular- und Zellbiologie	10
B 2	Methoden	10
B 2.1	Biotinylierung von HK	10
B 2.2	Aktivierung von PPK, FXI und chimären Konstrukten	10
B 2.3	Elektrophorese und Transfertechniken	11
B 2.4	Expression von PPK-Deletionsmutanten und PPK/FXI-Chimären	12
B 2.5	Expression von FXI Apple Domänen Fusionsproteinen mit tPA	12
B 2.6	Rekombinante Expression von FXI, PPK und FXI/PPK -chimären Proteinen	13
B 2.7	Expression und Aufreinigung des Plättchenfaktors XI	14
B 2.8	Proteinbestimmungen	14
B 2.9	Immunopräzipitation	16
B 2.10	<i>In vitro</i> Bindungsassays für die HK FXI/PPK Interaktion	16
B 2.11	Verdrängungsexperimente	17
B 2.12	Scatchard-Analysen	18
C	Ergebnisse	19
C 1	Bindung von HK an einzelne FXI Apple-Domänen	19
C 2	Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen FXI und PPK	21
C 3	Die Apple Domäne 2 beinhaltet die wichtigste HK-Bindungsstelle	23
C 4	Die Integrität der Apple Domäne 2 ist essentiell für die Bindung an HK	25
C 5	Charakterisierung des Plättchenfaktors XI	31

C 6	Bindung des Plättchenfaktors XI an HK	31
D	Diskussion	35
D 1	Funktion von FXI und FXI/HK Komplexe bei der Fibrinbildung	35
D 2	Vergleich der FXI und PPK Komplexe mit Kininogen	37
D 3	Biochemie und Funktion des Plättchenfaktors XI	40
D 4	Ausblick	42
E	Literaturverzeichnis	43
F 1	Zusammenfassung	53
F 2	Summary	54
G	Abkürzungsverzeichnis	55
H	Danksagung	
I	Lebenslauf	

A EINLEITUNG

A 1 Gerinnungsphysiologie des Blutgerinnungsfaktors XI

Die Blutgerinnung ist physiologisch notwendig, um Blut nach Gefäßverletzungen innerhalb des geschlossenen Kreislaufsystems zu halten. Störungen des Blutgerinnungssystems manifestieren sich in Blutungen oder Thromboembolien. Diesen Krankheitsbildern kommt eine große medizinische Bedeutung zu, da Schlaganfällen, Myokardinfarkten oder Lungenembolien zu den häufigsten Todesursachen in Industrienationen zählen (Murray and Lopez, 1997). Nach Verletzung eines Gefäßes läuft die Blutgerinnung in zwei miteinander verzahnte Systemen ab (Rosenberg and Aird, 1999). Die primäre Blutgerinnung (primäre Hämostase) führt über Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten zu einem Plättchenthrombus, der die Läsion initial abdeckt und die Blutung damit stoppt, jedoch mechanisch instabil ist (Furie and Furie, 1992). Eine stabilere Abdeckung der Gefäßläsion erfolgt dann durch die sekundäre Blutgerinnung (plasmatische bzw. sekundäre Hämostase). Hierbei werden in einer Reaktionskaskade Proteasenvorstufen durch limitierte Proteolyse aktiviert und so das Produkt der plasmatischen Gerinnung, das Fibrin, gebildet, das den Plättchenthrombus stabilisiert (Spronk *et al.*, 2003).

Nach der klassischen Modellvorstellung kann die plasmatische Blutgerinnung durch einen intrinsischen („vom Blut aus“) oder extrinsischen („vom Gefäß aus“) Weg gestartet werden (Davie and Ratnoff, 1964; Macfarlane, 1964). Die intrinsische Kaskade wird durch Blutgerinnungsfaktor XII (Hageman Faktor, FXII) gestartet (Hojima *et al.*, 1984). Kontakt zu Oberflächenladungen induziert eine Konformationsänderung im FXII, der dadurch eine Proteasenaktivität erlangt (Cochrane and Revak, 1980). Aktiver FXII (FXIIa) aktiviert dann entweder direkt oder indirekt über Plasmakallikrein (PK) den Blutgerinnungsfaktor XI (FXI, Plasma thromboplastin antecedent) (Kurachi and Davie, 1977; Ratnoff and Saito, 1979). Aktiver FXI (FXIa) kann dann in einer Kalziumionen-abhängigen Reaktion, die durch Phospholipide signifikant beschleunigt wird, Faktor IX durch limitierte Proteolyse aktivieren. Dieser Gerinnungsfaktor kann seinerseits den Faktor X (FX) aktivieren. Bei FX trifft die intrinsische auf die extrinsische Kaskade, die über die Komplexbildung der membranständigen Gewebsthrombokinase („Tissue Factor“, TF) mit dem Faktor VII des Plasmas gestartet wird. Beide Kaskaden bewirken dann über

einen gemeinsamen Reaktionsweg die Aktivierung von Thrombin (FII) (Dahlback, 2000). Die Protease führt zur Bildung von Fibringerinneln, indem sie Thrombozyten aktiviert und Fibrinogen zu Fibrin umsetzt. Dieses „Wasserfall“ oder „Kaskaden“ Modell hat sich als sehr nützlich für das Verständnis vieler Tests in der Hämostasiologie erwiesen. Es ist jedoch unbestritten, dass die Fibrinbildung *in vivo* nicht durch zwei unabhängige lineare Kaskadensysteme beschrieben werden kann. Es existieren Interaktionen und wechselseitige Verstärkungen zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg (Jesty and Beltrami, 2005; Gailani and Broze, 1991; Osterud and Rapaport, 1977). Eine schematische Übersicht des revidierten aktuellen Modells der plasmatischen Blutgerinnungskaskade gibt Abbildung 1. Unter *in vivo* Bedingungen ist die Aktivierung der Fibrinbildung ausschließlich über den exogenen Weg ausreichend, um Blutungen zu stillen (Mackman, 2004). Nach der initialen Bildung einer kleinen Thrombinmenge durch die extrinsische Gerinnungskaskade wird weitere Gerinnungsaktivierung durch den TF/FVIIa Komplex rasch durch „Tissue Factor Pathway Inhibitor“ (TFPI) inhibiert (Broze, 1992; Walsh, 2001). Entstandenes Thrombin hält unabhängig vom extrinsischen Weg die Thrombingenerierung aufrecht, indem es in einem Verstärkerzyklus den FXI der intrinsischen Kaskade aktiviert. Dieser Rückkopplungsmechanismus bietet ausserdem eine Erklärung dafür, dass FXII Mangel nicht mit einer Blutungsneigung assoziiert ist. Über Thrombin existiert ein FXII-unabhängiger Weg, FXI zu aktivieren (Gailani and Broze, 1993; Minnema *et al.*, 1998).

Eine wichtige Interaktion der primären mit der sekundären Hämostase stellt die Bindung von FXI auf Thrombozytenoberflächen dar (Walsh, 2001; Walsh, 2003). FXI bindet spezifisch und unabhängig von H-Kininogen (HK) an Glykoprotein (GP) Ib in „Lipid Rafts“ (Baglia *et al.*, 2003). Die Arbeitsgruppe von Peter Walsh, Philadelphia, isolierte eine alternative FXI-Spliceform, der Exon 5 und damit der N-terminale Anteil der Apple Domäne P2 fehlt. Diese FXI Mutante bindet direkt an die Plättchenoberfläche (Hsu *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1998). Thrombozyten-gebundener FXI katalysiert die Thrombinbildung durch lokale Assemblierung von Gerinnungsfaktoren. Aktiver FXI kann sein Substrat Faktor IX in der einzigen Kalziumionen abhängigen Reaktion des intrinsischen Schenkels auf Thrombozyten proteolytisch aktivieren (Gailani *et al.*, 2001b). Durch laterale Diffusion erreicht aktiver FIX den ebenfalls Membran gebundenen Prothrombinase Komplex und

initiiert über diesen die Thrombin generierenden Schritte. Alternativ zu FXI kann auch der TF/FVIIa Komplex FIX auf Thrombozyten aktivieren (Walsh, 2001). Im rekonstituierten System in der Abwesenheit von Thrombozyten ist dieser Reaktionsschritt, der auch als Josso-Schleife bezeichnet wird, sogar der Aktivierung über die intrinsische Kaskade kinetisch überlegen, was die Bedeutung der extrinsischen Kaskade unterstreicht (Bauer *et al.*, 1990; Osterud and Rapaport, 1977). Diese zentrale Funktion der extrinsischen Gerinnungskaskade für die Hämostase ist erst in den letzten Jahrzehnten herausgearbeitet worden. Da Patienten mit einer Defizienz des „intrinsischen“ Faktors IX im Vergleich zur Defizienz des „extrinsischen“ Faktors VII stärker bluten, nahm man lange Zeit an, dass die intrinsische Gerinnungskaskade wichtiger für die Blutstillung sei (Davie, 1981; Morrissey, 2004). Dem gegenüber stand, dass FXII Defizienz nicht zu Blutungen führt. Erst im revidierten Konzept der Blutgerinnung durch die Identifikation von Thrombin als wichtigsten Aktivator für FXI konnte dieser scheinbare Widerspruch aufgelöst werden (Gailani and Broze, 1991). Aktuell besagt die Lehrbuchmeinung, dass die durch FXII-initiierte intrinsische Gerinnungskaskade keine Funktion für das Hämostasessystem *in vivo* besitzt (Colman, 2001; Mackman, 2004).

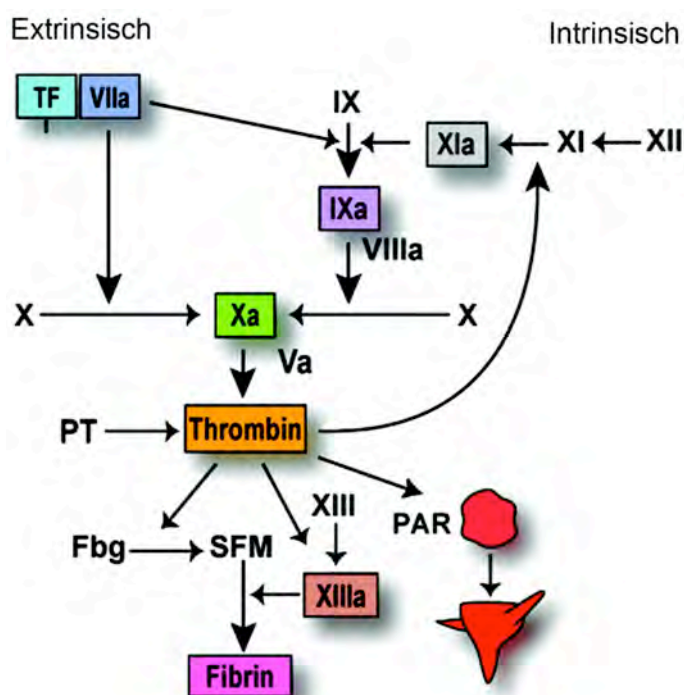


Abbildung 1: Das plasmatische Blutgerinnungssystem. Die Bildung von Thrombin kann durch zwei im Faktor X konvergierende Reaktionskaskaden gestartet werden. Die extrinsische Gerinnung wird durch Exposition des „Tissue Factors“ (TF) initiiert, an den Faktor VII bindet und so aktiviert wird (VIIa). Die intrinsische Kaskade wird durch Faktor XII (XII) gestartet, der sein Substrat Faktor XI (XI) aktiviert. *In vivo* ist Thrombin, das durch Faktor X (X) aus Prothrombin (PT) generiert wird, der wichtigste Aktivator des Faktors XI. Weiterhin aktiviert Thrombin Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) auf Thrombozyten und prozessiert Fibrinogen (Fbg) zu löslichen Fibrinmonomeren (SFM), die zu Fibrinfäden polymerisieren und durch aktiven Faktor XIII (XIIIa) vernetzt werden. Modifiziert nach (Mackman, 2004)

A 2 Biochemie des Faktors XI

Humaner FXI zirkuliert als dimeres Glycoprotein, aus zwei identischen Polypeptidketten im Plasma. FXI migriert unter nicht reduzierenden Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen mit einem apparenten Molekulargewicht von 160 kDa bedingt durch einen Kohlenhydratanteil von 5%, der aus N-glycosidisch verknüpften Hexose-, N-Acetylneuraminsäure und N-Acetylhexosaminresten besteht (Fujikawa *et al.*, 1986; McMullen and Fujikawa, 1985). Beide Untereinheiten sind durch eine Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinresten 321 miteinander kovalent verknüpft (McMullen *et al.*, 1991a). Reduktion mit z.B. β -Mercaptoethanol spaltet diese Bindung und zwei Polypeptidketten mit einem apparentem Molekulargewicht von je 80 kDa entstehen. Eine kovalente Bindung zwischen den beiden Polypeptiden ist aber nicht unbedingt notwendig für die Bildung des dimeren Proteins. Studien, mit humanen FXI Punktmutanten, bei denen Cystein321- gegen Alanin ausgetauscht wurden, belegen, dass FXI auch unabhängig von der Disulfidbrücke dimerisiert (Dorfman and Walsh, 2001). Das zeigt auch der FXI des Kaninchens, bei dem die Disulfidbrücke bildenden Cysteinreste fehlen. Auch ohne kovalente Verknüpfung liegt der FXI des Kaninchens als Dimer im Plasma vor (Sinha *et al.*, 2002). Diese Daten legen weiterhin nahe, dass die Dimerisierung während oder direkt nach der Translation stattfindet und dass der FXI bereits als Dimer von Hepatozyten ins Plasma sekretiert wird. In diesen Zellen wird FXI als Proform mit N-terminalem Signalpeptid aus 18 Aminosäureresten synthetisiert. Mit der Sekretion wird die Signalsequenz proteolytisch entfernt, so dass das mature humane Protein aus zwei, jeweils 607 Aminosäurenresten großen Polypeptiden, besteht (Fujikawa *et al.*, 1986). Glukokortikoide steigern die Expression von FXI. Erhöhte FXI Plasmaspiegel sind so physiologisch in der Schwangerschaft (Schved *et al.*, 1988).

Die beiden 80 kDa Polypeptidketten des dimeren Proteins bestehen aus jeweils fünf Domänen. Die N-terminale Hälfte wird als schwere Kette bezeichnet und besteht aus vier repetitiven Apple Domänen von jeweils 90-91 Aminosäuren Länge. Im Gegensatz dazu ist die C-terminale leichte Kette eine typische Trypsin-ähnliche Domäne (Fujikawa *et al.*, 1986). Diese Domäne ist für die Serinproteasenaktivität des aktiven FXI verantwortlich. Die vier Apple Domänen hingegen vermitteln die Bindung an hochmolekulares Kininogen (H-Kininogen, HK), den Vorläufer der Kinin-Hormone (Bouma *et al.*, 1983b). Plasmaprokalikrein (PPK) ist das einzige Protein beim

Menschen, das ebenfalls Apple Domänen besitzt (Abbildung 2). Diese Proteasen Zymogenform bindet ebenfalls an HK und zirkuliert wie FXI im Plasma als nicht-kovalenter Komplex mit HK (Mandle *et al.*, 1976). Auf Aminosäureebene weisen FXI und PPK 58% Identität (78% Homologie) auf (Chung *et al.*, 1986).

Die Bindungsstellen für PPK und FXI an HK wurden auf ein kontinuierliches Peptidsegment von 31 Aminosäuren (HKH31) Länge in der HK Domäne D_{6H} im extremen C-Terminus des Proteins lokalisiert. Die Bindungsstelle für FXI überlappt mit der HK-Bindungsstelle für PPK und daher kompetieren die beiden Zymogene um Bindung zu HK. Im Plasma liegt HK als Komplex mit jeweils nur einem der beiden Proteine vor (Tait and Fujikawa, 1986; Tait and Fujikawa, 1987; Vogel *et al.*, 1990). Die identische HK-Bindungsstelle suggeriert, dass PPK und FXI über homologe Bereiche an HK binden. Die PPK-Apple-Domänen bilden gemeinsam eine Oberfläche aus, an die HK spezifisch, reversibel und mit hoher Affinität bindet (PPK: $K_D = 1,2 \times 10^{-8}$ M; vgl. FXI: $K_D = 2,9 \times 10^{-8}$ M (Thompson *et al.*, 1979)). Mittels einzelner Apple Domänen, PPK Deletions-Konstrukten, Affinitäts-Kreuzvernetzung und Konkurrenzexperimente, konnte die HK-Bindungsstelle im PPK lokalisiert werden. PPK bildet eine diskontinuierliche HK-Bindungsstelle aus. Anteile aus den Apple Domänen 1, 2 und 4 sind an der Bindung beteiligt (Herwald *et al.*, 1993; Renne *et al.*, 1999). Der zentrale Bereich der Domäne 2 beinhaltet die wichtigste und am stärksten an HK-bindende Sequenz (Renne *et al.*, 1999). Der von der 2. Apple Domäne gebildete Anteil der HK-Bindungsstelle wird von Aminosäuren des N-terminalen Anteils der Apple Domäne 1 und Resten aus dem zentralen Bereich der Apple 4 Domäne flankiert. Im Gegensatz dazu scheint nur ein kleiner Bereich von Phe⁵⁶ zu Ser⁸⁶ in der Apple Domäne 1 des FXI an der Bindung zu HK beteiligt zu sein (Baglia *et al.*, 1990; Baglia *et al.*, 1992).

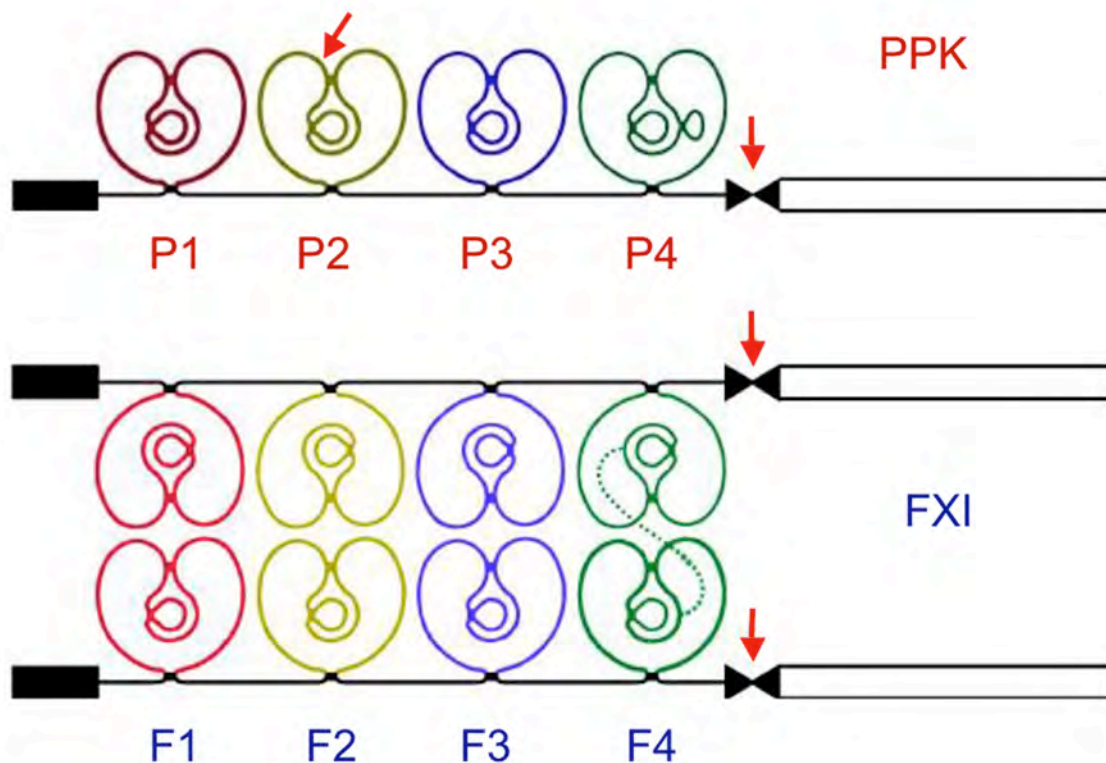


Abbildung 2: Domänenstruktur von Prokallikrein und Faktor XI. Die schweren Ketten von PPK und FXI sind aus 4 Apple-Domänen (P1-P4 und F1-F4) aufgebaut. Die Pfeile geben die Spaltstellen von Faktor XIIa an. Proteolyse an diesen Positionen aktiviert Plasmaprothrombin zu α -Kallikrein und FXI zu FXIa. Die nach Spaltung einer Peptidbindung resultierende separate schwere und leichte Kette sind noch durch eine Disulfidbrücke miteinander kovalent verknüpft. Diese Disulfidbrücke zwischen den beiden Apple-Domänen 4 in Faktor XI ist als gepunktete Linie eingezeichnet.

A 3 Kontaktphasenaktivierung

Zusammen mit FXII, PPK und HK gehört FXI zu den Kontaktphaseproteinen. Diese Proteine bilden einen Aktivator-Komplex auf Zelloberflächen des kardiovaskulären Systems aus. Durch „Kontakt“ zu negativen Oberflächen wie Kaolin, geladene Polymere, Heparin oder Phosphatidylserinen in der Membran von Phospholipidvesikeln wird eine Konformationsänderung im FXII induziert, die zur proteolytischen Autoaktivierung führt. Aktiver FXII kann dann in räumlicher Nachbarschaft an HK gebundenes PPK durch limitierte Proteolyse aktivieren. In einem Verstärkerzyklus aktiviert Plasmakallikrein (PK) weitere FXII Moleküle (Colman and Schmaier, 1997). Diese initiale Verstärkung scheint *in vitro* notwendig zu sein, um eine ausreichende FXII Aktivität zu generieren. Erst dann wird FXI von FXIIa durch limitierte Proteolyse zum aktiven Faktor (FXIa) aktiviert. Die Aktivierung des Kontaktphasesystems und damit der intrinsischen Gerinnungskaskade durch Kaolin wird klinisch eingesetzt und bildet die Basis eines wichtigen Gerinnungstestes, der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT). Im Gegensatz zum FXI sind Mangelzustände der übrigen Kontaktphaseproteine nicht mit gesteigerter

Blutungsneigung oder pathologischer Thrombophilie assoziiert (Girolami *et al.*, 2006; Mackman, 2004). FXI Defizienz selbst bei Plasmaspiegeln $<1\%$ kann klinisch unauffällig sein, jedoch sind auch FXI-defiziente Patienten mit schwere Blutungsneigungen bekannt. FXI Defizienz ist häufig bei Ashkenazi Juden, Kurden im Südirak und Basken. Diese Patientenkollektive leiden unter Schleimhautblutungen und Nachblutungen nach Operationen (Asakai *et al.*, 1991; Broze and Gailani, 1993; Seligsohn, 1993a). Da es sich bei diesen Patienten um relativ kleine abgeschlossene Populationen handelt ist es möglich, dass hier im Sinne eines „Founder“ Effekts die Blutungsneigung nicht kausal durch hereditären Mangel an FXI sondern einen weiteren mit FXI-kosegregierenden Gendefekt verursacht ist. In der Klinik kann bei bekanntem schweren FXI Mangel und positiver Blutungsanamnese prä- oder perioperativ humaner FXI oder Frischplasma (FFP) substituiert werden, was durch die lange Halbwertszeit von FXI (50 h) rasch den FXI Plasmaspiegel ansteigen lässt (Bolton-Maggs, 2000; O'Connell N, 2004). Diese Therapieform basiert auf der Erkenntnis, dass *in vivo* aktives Thrombin der wichtigste Aktivator für FXI darstellt (Gailani and Broze, 1991; Minnema *et al.*, 1998). Eine Alternative, um FXI-assoziierte Blutungen zu therapieren, bietet die Applikation von rekombinantem aktiven Faktor VII (rFVIIa, NovoSeven) (Bern *et al.*, 2005; Hedner and Erhardtsen, 2003).

A 4 NOMENKLATUR

Zur Unterscheidung zwischen Plasmakallikrein und FXI wird eine einheitliche Nomenklatur für die Dissertationsschrift eingeführt. Die Apple Domänen des FXI werden mit einem grossen „F“ gefolgt von der Nummer der Domäne bezeichnet. Im Gegensatz dazu werden die Plasmakallikrein Apple-Domänen mit einem großen „P“ ebenfalls gefolgt von der Domänennummer deklariert. Hierauf aufbauend werden Antikörper mit dem Symbol „ α “ klassifiziert, gefolgt von entweder „F“, wenn es sich um Antikörper gegen FXI handelt oder „P“ wenn die Antikörper gegen PPK generiert wurden und jeweils der Nummer der Apple Domäne (1-4), die von dem Antikörper erkannt wird. So ist z.B. α P2 ein Antikörper gegen das Antigen PPK, der die Domäne P2 erkennt. Für chimäre PPK/FXI-Proteine bezeichnet der erste Teil des Namens denjenigen Proteinanteil, der den größten Anteil des chimären Konstruktes ausmacht und der zweite Teil den substituierten Anteil. So stellt z.B. PPK/F2 ein Protein dar, das auf PPK basiert und bei dem die P2 Domäne durch F2 substituiert wurde. Im Gegensatz dazu wurde bei FXI/P2 die P2 Domäne anstelle der F2 Apple Domäne in den FXI eingeführt.

A 5 AUFGABENSTELLUNG

FXI und PPK sind auf Aminosäurenebene zu 58% identisch (Chung *et al.*, 1986). Beide Zymogene sind indirekt über den nicht enzymatischen Kofaktor HK an Zelloberflächen gebunden und zirkulieren auch als bimolekulare Proteinkomplexe mit HK im Plasma (Bouma *et al.*, 1983a). Auf Seiten des HK konnte die Bindungsstelle für beide Zymogen auf eine Sequenz von 31 Aminosäuren im Bereich des C-Terminus des Proteins kartiert werden (Tait and Fujikawa, 1986; Tait and Fujikawa, 1987; Vogel *et al.*, 1990). Die Bindung an HK wird über die schweren Ketten von FXI und PPK vermittelt, die aus jeweils vier Apple-Domänen aufgebaut sind (McMullen *et al.*, 1991a; McMullen *et al.*, 1991b). Im Gegensatz zur kontinuierlichen Bindungsstelle auf Seiten des Komplexpartners HK in der Domäne D_{6H} sind die HK-Bindungsstellen der Zymogene diskontinuierlich. Für PPK konnte die HK-Bindungsstelle weitgehend aufgeklärt werden. Den wichtigsten Anteil bildet die Domäne P2 aus (Renne *et al.*, 1999). Weiterhin sind Aminosäurenreste aus dem zentralen Bereich von P4 (Herwald *et al.*, 1996b) sowie aus dem C-Terminus von P1 an der Bindung beteiligt (Herwald *et al.*, 1993). Durch Konkurrenzexperimente konnte für FXI gezeigt werden, dass ein hierzu homologer Bereich aus dem C-terminalen Anteil von F1 wichtig für die Komplexbildung mit HK ist. F2 und F4 scheinen aber nicht an der HK-Bindung beteiligt zu sein (Baglia *et al.*, 1990).

Ausgehend von strukturellen Ähnlichkeiten zwischen FXI und PPK sollte der FXI/HK Komplex strukturell und funktionell analysiert und mit dem PPK/HK Komplex verglichen werden. In diesem Projekt standen drei Aufgaben im Mittelpunkt.

1. Lokalisation der HK-Bindungsstelle in der schweren Kette des FXI.
2. Struktureller Vergleich der Komplexe von HK mit FXI und PPK.
3. Funktionelle Unterschiede zwischen der Aktivierung des FXI/HK und dem PPK/HK Komplex im Rahmen der Kontaktphasenkaskade.

B MATERIAL UND METHODEN

B 1 MATERIAL

B 1.1 Proteine, Peptide und Chemikalien

HK wurde entsprechend eines Standardverfahrens mit geringen Modifikationen aus humanem Citratplasma (Müller-Esterl *et al.*, 1988) isoliert. 200 ml Plasma wurden mit 400 ml 50 mM Bis-Tris, pH 5,5 versetzt und mit dieser Mischung eine Diethylaminoethyl-Sephadex A-50 Ionentauschersäule aus Polyethylen (Pharmacia, Uppsala, Schweden) bei 4°C beladen. Die Säule wurde mit 1 M NaCl entwickelt, HK-haltige Fraktionen mittels ELISA identifiziert und diese vereinigt. Eine weitere Aufreinigung erfolgte mittels Affinitätschromatographie über eine AffiGel-10 Säule (BioRad) mit immobilisiertem Antikörper HKL16 (Kaufmann *et al.*, 1993). Das eluierte HK wurde durch Silberfärbung (Heukeshoven and Dernick, 1988) und Immunoprint-Analyse (D 2.1.3) mit den anti-HK Antikörpern HKL22, HKH14, α BR und LKL1 analysiert (Renne *et al.*, 2005b). Es war Kinin-haltig und lag zu > 95% in ungespaltener Einkettenform vor. Plasmaprokallikrein wurde von Dr. Jimmy Page (Temple University School of Medicine, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt und war zu > 95% in der Einkettenform vorhanden. Humaner FXII und FXI wurde von Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN, USA) bezogen.

Die Namen einiger Antikörper wurden entsprechend der in B4 eingeführten Nomenklatur geändert. So hießen die anti-PPK Antikörper α P1, α P2, and α P4 vorher PKH19, PHK6 und PKH1. Diese Antikörper entstammen dem Laborbestand und wurden von Dr. H. Hock generiert und charakterisiert (Hock *et al.*, 1990). Die anti-FXI Antikörper α F1, α F2 und α F4 wurden freundlicherweise von Dr. J. Meijers, Amsterdam, Niederlande zur Verfügung gestellt und hießen ursprünglich XI-5, XI-3 und XI-1. Auch der Antikörper α tPA stammt von Dr. J. Meijers (Wuillemin *et al.*, 1995). Der polyklonale anti-FXII Antikörper wurde von Nordic Laboratories, Tilsit, Holland bezogen.

Der monoklonale anti-HK Antikörper HKH14 kommt aus Laborbeständen und war von Dr. Jörg Kaufmann gegen humanes HK generiert worden (Kaufmann *et al.*, 1993). Das Antikörperepitop wurde auf die Domäne D5_H kartiert (Renne *et al.*, 2005b). Die polyklonalen Antiseren AS199 (α FXI) und AS176 (α PPK) wurden durch Immunisierung von Hasen mit humanem FXI bzw. PPK von Dr. Armin Maidhof, Mainz erzeugt.

B 1.2 Reagenzien für die Molekular- und Zellbiologie

Humane embryonale Niereneithelzellen (Xiao *et al.*, 1998) (HEK293 - ATCC: CRL-1573) wurden in „Dulbecco´s modified Eagle´s medium“ (DMEM, Life Technologies, Inc.) mit 4,5 g/l Glucose, 10% (v/v) fötalem Kälberserum, 50 mg/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Baby Hamster Nieren Zellen (BHK - ATCC: CRL-10314) wurden in DMEM mit 5% (v/v) fötalem Kälberserum und 50 µg/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert. Für COS-7 Zellen wurde RPMI-Medium und identische Kulturbedingungen verwendet. Alle Zellkulturen wuchsen in einer 5% CO₂ Atmosphäre bei 37°C.

B 2 METHODEN

B 2.1 Biotinylierung von HK

Zur Biotinylierung wurden 100 µg HK mit 10 µg Biotin-β-aminocaproyl-N-hydroxysuccinimid (Biotin-X-NHS, Pierce) 4 h lang bei 4°C in 0,1 M NaHCO₃ inkubiert. Freies Biotin-X-NHS wurde anschließend mittels Zentrifugation über eine Microcon-10 Säule (Amicon, Beverly, MA, USA) aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt (Subba Rao *et al.*, 1983). Zur Detektion von biotinyliertem HK wurde Streptavidin-Peroxidase (Roche, Mannheim) verwendet.

B 2.2 Aktivierung von PPK, FXI und chimären Konstrukten

50 µg/ml FXII wurde 2 h bei 37°C in 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 (PBS) supplementiert mit 50 µM Zinkchlorid (ZnCl₂) und Glasperlen unter stetigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Aktivierung von FXII zu FXIIa durch die Kontaktphasenkaskade mittels Immunoprint-Analyse mit einem polyklonalen anti-FXII Antikörper überprüft. Hierbei war kein FXII-Zymogen, das bei 88 kDa in der SDS-PAGE wandert, mehr nachweisbar. Stattdessen erschienen proteolytische Spaltprodukte bei 45 und 40 kDa.

Um FXI, PPK oder chimäre Konstrukte zu aktivieren, wurden diese Proteine mit FXIIa im molaren Verhältnis von 250:1 in PBS bei 37°C für 2 h oder 72 h inkubiert. Dies führte zu α-Kallikrein, FXIa und den aktivierten chimären Konstrukten bzw. zu β-Kallikrein. Alle Ansätze wurden mittels SDS-PAGE und Silberfärbung (Heukeshoven und Dernick, 1988) analysiert. Die Identifizierung aller Banden erfolgte mit Domänen-spezifischen monoklonalen anti-PPK-Antikörpern. Eine Quantifizierung der

Bandenstärke der Spaltprodukte mittels des Programmes NIH Image 1.61 ergab, dass > 90% des eingesetzten PPKs gespalten wurde.

C 2.3 Elektrophorese und Transfertechniken

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gelen mit 0,1% (w/v) Natrium Dodecylsulfat (SDS) bei 30 mA Stromstärke innerhalb von 90 min aufgetrennt (Laemmli, 1970). Proteine wurden dann entweder durch Silber-Färbung nachgewiesen oder mittel Coomassie brilliant Blau gefärbt. Zur Detektion von Proteinen durch Immunoprint Analyse (Western-Blotting) wurden die Proteine aus der SDS-Polyacrylamidmatrix auf eine Nitrocellulosemembran (Sartorius, Göttingen) bei 1,5 mA pro cm² Gelfläche innerhalb von 90 min elektrotransferrt. Hierbei wurde das semi-dry-Verfahren (Knierim *et al.*, 1988) und ein Transferpuffer aus 0,96 M Glycin, 12,5 mM Tris-Base und 10% (v/v) Methanol angewendet. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran nach ausgiebigem Wässern mit 0,2% (m/v) Ponceau S (Serva, Heidelberg) in 3% (m/v) Trichloressigsäure angefärbt, um den Proteintransfer zu überprüfen. Die Antikörperinkubationen erfolgten für jeweils 1 h bei 37°C in PBS mit 0,1% (v/v) Tween20 (Roth) und 4% (m/v) Magermilchpulver (Glücksklee, Nestlé). Typischerweise wurde der Primärantikörper 1:1000 oder 1 µg/ml in PBS/Tween/Milch verdünnt. Zur Absättigung unbesetzter Bindungsstellen wurde die Membran in der gleichen Lösung zuvor für 45 min bei 37°C in einem Rollerbrutschrank (Biometra, Göttingen) inkubiert (Ogata *et al.*, 1989). Nach jedem Antikörper wurde 3-mal für 5 min bei 37°C mit PBS/Tween20 gewaschen. Die Detektion des Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörpers (DAKO, Hamburg) erfolgte durch Chemilumineszenzreaktion. Hierzu wurde die Membran getrocknet, dann 1 min mit einer Substratlösung aus 100 mM Tris-HCl, 2,5 mM 3-Aminophthalhydrazid (Luminol, Roth) und 0,4 mM p-Cumarsäure (gelöst in Dimethylsulfoxid, Roth), pH 8,5 inkubiert. Die Chemilumineszenz des Luminols belichtete einen Röntgenfilm (X-100, Fuji-Film) innerhalb von 30 sec.

DNA-Fragmente wurden in einem 1% (m/v) Agarosegel (Pharmacia, Freiburg) mit 10 µg/ml Ethidiumbromid (Roth) bei 100 V im Laufpuffer TAE (40 mM Tris-Acetat, 0,1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), pH 7,6) aufgetrennt.

B 2.4 Expression von PPK-Deletionsmutanten und PPK/FXI-Chimären

PPK/FXI-Chimären (pZEM-6.2, pZEM-6.3, pZEM-7.1, pZEM-7.2), PPK- bzw. FXI-Wild-type im pZEM229R Vektor (Dr. Donald Foster, ZymoGenetics, Inc.) wurden von Dr. Dominic Chung (University of Washington, Seattle, USA) generiert und sind schematisch in Abbildung 11 dargestellt. Bei den Chimären kodiert pZEM-6.2 ein Konstrukt, in dem das Signalpeptid und die schwere Kette von PPK an die leichte Kette von FXI fusioniert sind. pZEM-7.1 hingegen kodiert die komplementäre Chimäre, die aus dem Signalpeptid und der schweren Kette von FXI und der leichten Kette von PPK besteht. pZEM-6.3 kodiert ein Konstrukt in der die zweite Apple-Domäne (F2) von FXI durch die P2 Domäne von PPK ausgetauscht ist, wohingegen pZEM-7.2 die hierzu komplementäre Chimäre kodiert, in der die P2 Domäne von PPK durch F2 von FXI ersetzt wurde. Zur Expression wurden die entsprechenden Konstrukte mit *EcoRI* aus dem pZEM229R-Vektor herausgeschnitten und in den *EcoRI*- geschnittenen pcDNA3-Vektor (Invitrogen) kloniert. Die Orientierung der Konstrukte wurde mittels Restriktionsanalysen überprüft und HEK293-Zellen mit LipofectAMIN (Gibco) und den Expressionsvektoren entsprechend dem Protokoll des Herstellers transient transfiziert. Die Effizienz der Transfektion wurde mittels Immunfluoreszenz mit dem Grün-fluoreszierenden-Protein zu $\geq 45\%$ bestimmt.

B 2.5 Expression von FXI Apple Domänen Fusionsproteinen mit dem tPA

Kodierende cDNAs für die vier FXI-Apple, F1 (Glu¹-Ser⁹⁰), F2 (Ala⁹¹-Leu¹⁸⁰), F3 (Ala¹⁸¹-Val²⁷¹) und F4 (Phe²⁷²-Glu³⁶¹), wurden durch einen PCR Ansatz mit der *Taq* Polymerase kloniert. Als Matritze diente die cDNA des humanen FXI, die freundlicherweise von Dr. D. Chung, Seattle, USA zur Verfügung gestellt wurde. Die für die PCR Reaktion verwendeten „forward“ Primer führten eine *BglII* Restriktionsschnittstelle und einen reversen Primer eine *XhoI* an ihrem 5'- bzw. 3'-Ende ein. Zusätzlich of wurden durch den „reverse“ Primer Codons für sechs zusätzliche Aminosäuren (Pro-Arg-Ile-Lys-Gly-Gly) eingeführt. Diese Peptidsequenz zwischen der Apple Domäne und dem tPA Fusionsanteil erlaubt eine maximale Konformationsänderung und somit Flexibilität zwischen den beiden Proteinanteilen (Johannessen *et al.*, 1990). Anschliessend wurden die DNAs, die für die einzelnen Apple-Domänen kodieren mit *BglII* und *XhoI* restringiert und gerichtet in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen modifizierten tPA Expressionsvektor ZpL7(Ser478Ala) kloniert. Die fertigen Expressionskonstrukte wurden mittels DNA-

Sequenzierung (MBI-Fermentas) überprüft und stimmen mit der publizierten Sequenz des humanen FXI fehlerfrei überein. Die Konstrukte kodieren jeweils für Fusionsproteine, die aus mehreren Anteilen bestehen: Der N-Terminus wird von der Signalsequenz des Gewebsplasminogen Aktivators (tPA) gebildet, die auch die Sekretion der Konstrukte ins Kulturmedium bewirkt. Dann schließt sich die jeweilige FXI-Apple-Einzeldomäne (F1-F4), gefolgt von einem Abstandshalter aus sechs Aminosäuren an. Der Fusionsanteil, der den C-Terminus bildet, besteht aus den Kringel Domänen 1 und 2 und der katalytischen Kette des tPA, bei der jedoch das Serin der katalytischen Triade gegen Alanin ausgetauscht wurde (Ser478Ala). Somit weist der Fusionsanteil keine Proteasenaktivität auf. Mit den Expressionskonstrukten wurden BHK (Baby Hamster Kidney) Zellen stabil transfiziert und in 1 µM Methotrexat kultiviert. Die Fusionsproteine wurden aus dem serumfreien Zellkulturüberstand (Opti-MEM, Invitrogen) durch Affinitätschromatographie an Säulen mit einem immobilisierten Antikörper gegen tPA aufgereinigt. Eluate wurden durch PAGE und Silberfärbung auf Reinheit getestet und anschließend die Proteinkonzentrationen durch ein kommerzielles ELISA System für tPA bestimmt (Meijers *et al.*, 1992a).

B 2.6 Rekombinante Expression von FXI, PPK und FXI/PPK-chimären Proteinen

Rekombinante Proteine wurden in HEK293 Zellen sowohl mittels stabiler als auch über transiente Transfektionen dargestellt. Für die Generierung der stabil mit humanem FXI oder PPK bzw. dem FXI/P2 transfizierten Zelllinien wurden die cDNAs in den pJCMV Vektor (Stratagene) kloniert, dieser mit *SpeI* linearisiert und anschließend die Zellen durch Elektroporation transfiziert. Zellklone, die den Vektor stabil ins Genom integriert hatten wurden durch 14-tägige Kultivierung mit G418 (150 µg/ml) selektiert. Da die rekombinanten Proteine von den HEK293 Zellen sekretiert wurden, konnten sie mittels Affinitätschromatographie an Säulen mit an AffiGel10 immobilisiertem anti-FXI Antikörper aus Serum-freiem Kulturmedium (OptiMem, Invitrogen) aufgereinigt werden. Zur Elution wurde 50 mM Tris-Glycin, pH 2.5 verwendet, das sofort durch 10x PBS neutralisiert wurde.

Im Unterschied hierzu wurden für transiente Transfektionen die chimären Konstrukte, die durch „overlap extension PCR“ von Dr. D. Chung, Seattle, im Vektor pZEM hergestellt worden waren erst komplett sequenziert und dann mit *EcoRI* aus pZEM restringiert und in den ebenfalls *EcoRI* geschnittenen pcDNA3 Vektor (Invitrogen)

kloniert. Mit den Konstrukten wurden dann HEK293 mit lipofectAMINE (Invitrogen) entsprechend der Anleitung des Herstellers transfiziert. Nach 48 h wurden die rekombinanten Proteine aus dem Zellkulturüberstand durch Affinitätschromatographie mit anti-FXI Antikörpern aufgereinigt. Die Transfektionsrate wurde durch Kontrolltransfektionen mit einem das Grün-fluoreszierende-Protein kodierenden Vektor zu mehr als 40% bestimmt.

B 2.7 Expression und Aufreinigung des Plättchenfaktors XI

Die cDNA, die für den Plättchenfaktor XI, eine aus Megakaryozyten klonierte FXI-Splicevariante FXI/ Δ F2N kodiert, wurde von Prof. Dr. Peter Walsh, Philadelphia, USA zur Verfügung gestellt. Die cDNA wurde in die *EcoRI* Restriktionsschnittstelle des pcDNA3 Vektors kloniert und HEK293 Zellen mit der lipofectAMINE-Methode transient transfiziert. Nach 48 h wurden die überexprimierenden Zellen in 2-fachem PBS resuspendiert, mit einem Proteaseinhibitorcocktail (10 μ g/ml Sojabohnen Trypsin Inhibitor, 10 μ g/ml Benzamidin, 10 μ g/ml Leupetin und 0,1 mM Pefabloc SC) versetzt und auf Eis durch kurze Ultraschallpulse für 3 min lysiert. Die Zellsuspension wurde anschliessend bei 20.000 x g für 10 min bei 4°C pelletiert und die Überstände mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierzu wurden Säulen an denen anti-FXI Antikörper (Antiserum AS199) über aktivierte Sepharose (AffiGel 10) gekoppelt worden waren, verwendet. Nach ausgiebigem Waschen mit PBS wurden die Säulen durch 1 M NaSCN entwickelt und das eluierte PL-FXI Protein erst gegen PBS dialysiert und dann durch Gelfiltration an Sephadex 200 Säulen (Amersham) in PBS umgepuffert und weiter aufgereinigt. Fraktionen die PL-FXI enthielten wurden durch Immunoprint Analyse mit Antikörpern gegen Apple Domäne F4 identifiziert, vereinigt und anschliessend durch einen Amicon Konzentrator (Ausschluss 10 kDa) aufkonzentriert. Abschließend wurden die Proteinkonzentrationen durch einen „Enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) bestimmt.

B 2.8 Proteinbestimmungen

Um die Konzentrationen der rekombinant exprimierten Proteine zu bestimmen, wurde ein „Sandwich“ ELISA etabliert. Hierzu wurde ein polyklonales Kaninchen Antiserum das durch Immunisierung mit humanem FXI generiert worden war (AS199) in einer Verdünnung von 1:1000 über Nacht bei 4 °C auf Mitrotiter Platten immobilisiert (Nunc Maxisorp, Wiesbaden). Nach 6 x Waschen mit PBS wurden freie

Bindungsstellen mit 1% BSA in PBS für 45 min bei 37 °C blockiert. Anschließend wurden serielle 1:2 Verdünnungsreihen der Zellkulturüberstände oder gereinigte Proteine in PBS/BSA für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach weiteren 6 Waschschritten wurde spezifisch gebundenes Protein nachgewiesen. Hierzu wurde im ersten Schritt Antikörper gegen die leichten Ketten von PPK bzw. FXI (0,5 µg/ml PKL16 bzw. D7H, 1 h bei 37°C) verwendet und dann im zweiten Schritt die Antikörper durch Meerrettich-Peroxidase konjugierte anti-Maus IgG Antikörper (0,5 µg/ml, DAKO, Hamburg) detektiert. Der „Sandwich“ ELISA wurde photometrisch bei einer Absorptionswellenlänge von 405 nm mit einem ELISA-Reader (Dynatech) nach Substratlösung aus 0,15% (w/v) Diammonium 2,2'-azido-bis-(3-ethyl-2,3-dihydrobenzthiazoline-6-sulfonat) (ABTS), 0,012% (v/v) H₂O₂ in 100 mM Zitronensäure, pH 4,5, quantifiziert. Zur Eichung des „Sandwich“ ELISAs wurden sowohl gereinigtes PPK und FXI als auch Überstände von mit Kinin B1-Rezeptor transfizierten HEK293 Zellen verwendet, die mit definierten Konzentrationen an PPK oder FXI supplementiert worden waren. Alternativ wurden Konzentrationen von rekombinanten Proteinen durch „Biospecific-Interaction-Analysis“ (BIA) mit einem BIAcore-X (BIAcore, Freiburg) mittels Plasmonenresonanzspektroskopie bestimmt. Hierzu wurden anti-PPK und anti-FXI Antikörper (AS176/AS199) an einen CM5 Sensor-Chip (BIAcore, Freiburg) mit dem „Amine-Coupling-Kit“ nach der Vorschrift des Herstellers gekoppelt. Über eine so präparierte Chipoberfläche wurde Zellüberstand in einem konstanten Fluß von 20 µl/ml gespült und die Assoziation für 90 sec aufgezeichnet. Die Dissoziation der Protein-Antikörper Komplexe wurde für 180 sec verfolgt. In dieser Zeit strömte nur PBS über die Chipoberfläche und transportierte abdissoziierte Ligandenmoleküle fort. Solche Assoziations-Dissoziationszyklen wurden für serielle Verdünnungsreihen der Überstände (1:2, Startkonzentration 100 µg/ml) durchgeführt. Die Kalibrierung der relativen „Resonance-Unit“ Werte auf absolute Konzentrationen erfolgte mittels Überständen von B1-Rezeptor transfizierten Zellen, die mit definierten Mengen PPK versetzt worden waren. Ligandenmoleküle die sich innerhalb der Dissoziationsperiode nicht selbständig abgelöst hatten, wurden durch 30 µl einer 20 mM HCl abgewaschen. Die Auswertung der Sensorgramme erfolgte mit dem Programm BIAevaluation 2.1 (BIAcore). Die durch Plasmonen Resonanz ermittelten Konzentrationen unterschieden sich von denen aus dem Sandwich ELISA um weniger als 10%.

B 2.9 Immunopräzipitation

HEK293 Zellen wurden transient mit FXI, FXI/P2, oder PL-FXI kodierender cDNA im pcDNA3 Vektor mittels lipofectAMINE transfiziert. Nach 48 h wurden die überexprimierenden Kulturen 2-mal mit PBS gewaschen und in Cystein/Methionin-freiem DMEM 45 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen metabolisch mit 100 µCi/ml [³⁵S]-Cystein/Methionin (Trans-label, ICN, Eschwege) 12 h bei 37°C markiert. Die Kulturüberstände wurden dann abgenommen bei 2.500 x g 10 min zentrifugiert und der Überstand für die Immunpräzipitation eingesetzt. Adhärenente Zellen wurden anschließend 3x mit PBS gewaschen und in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1% SDS, 0,5% Deoxycholsäure, 1% Nonidet NP-40, 10 µg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (Roth) und 10 µg/ml Benzamidin-HCl (RIPA) unter ständigem leichtem Schütteln 1 h bei 4°C lysiert und solubilisiert. Anschließend wurde das Zellysat bei 14.000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein Schraubdeckelreaktionsgefäß überführt und darin 60 min bei 4°C mit 20 µl einer Mischung aus αPPK- (AS176) und αFXI- (AS199) Antikörpern, die an *Staphylococcus-A* Zellen (Pansorbin, Calbiochem, La Jolla, USA) gekoppelt waren, immunpräzipitiert. Anschließend wurden die Mischungen bei 8.000 x g 2 min bei 4°C zentrifugiert und die Präzipitate 4x mit RIPA resuspendiert und wieder zentrifugiert. Die Immunpräzipitate wurden dann in Probenpuffer aufgenommen und über eine SDS-PAGE getrennt. Die Proteine in der Gelmatrix wurden mit Essigsäure fixiert, mit Coomassie gefärbt, dann ausgiebig gewässert und mit 15% (m/v) Natriumsalicylat (Merck, Darmstadt) als Szintillator 30 min bei RT inkubiert. Nach Trocknung bei 55°C wurde mit den Gelen ein Fuji X-Ray Röntgenfilm innerhalb von 24 h bei -80°C belichtet. Außerdem wurden Immunpräzipitate nach SDS-PAGE und Elektrotransfer durch Immunoprint Analyse mit den Antikörpern αP2 oder αF4 nachgewiesen.

B 2.10 *In vitro* Bindungsassays für die HK FXI/PPK-Interaktionen

Alle Bindungen von HK und rekombinanten Konstrukten *in vitro* wurde mittels ELISA an Maxisorp Mikrotiter Platten (Nunc, Wiesbaden) untersucht. Um die Interaktion von HK mit Einzeldomänen zu analysieren, wurde 25 nM (3 µg/ml) HK in 100 mM NaCl, pH 5,5 („coating buffer“) über Nacht bei 4°C adsorbiert, dann die HK-beschichteten Platten 6x mit PBS gewaschen, freie Bindungsstellen mit 1% (w/v) BSA in PBS blockiert und sie dann mit seriellen 1:2 Verdünnungreihen beginnend mit 500 nM (25

µg/ml) von Einzeldomänen des FXI oder PPK als Fusionsproteine mit tPA 45 min bei 37°C in BSA/PBS inkubiert. Nach 6 Waschschritten mit PBS wurden gebundene Einzeldomänen durch 13,3 nM (2 µg/ml) eines α tPA Antikörpers (aus Kaninchenserum) der gegen den gemeinsamen Fusionsanteil gerichtet ist, gefolgt von einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper gegen F_c-Fragment des Kaninchens (BioRad, München) in 1:4000 facher Verdünnung und Substratreaktion (0,15% (w/v) Diammonium 2,2'-azido-bis-(3-ethyl-2,3-dihydrobenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS), 0,012% (v/v) H₂O₂ in 100 mM Zitronensäure, pH 4,5) nachgewiesen. Die photometrische Bestimmung bei einer Absorptionswellenlänge von 405 nm erfolgte nach 30 min mit einem ELISA „Reader“ der Firma Dynatech (Deppendorf).

Zur Untersuchung der Bindung von HK an Komplexpartner wurden 5 nM der rekombinanten Konstrukte FXI, PPK, FXI/PPK chimärer Proteine oder Produkte aus limitierten Proteolysereaktionen an Mikrotiterplatten immobilisiert und dann mit seriellen 1:2 Verdünnungsreihen von biot-HK beginnend von 2 µM (240 µg/ml) in PBS/BSA für 1 h bei 37 °C inkubiert. Gebundenes biot-HK wurde durch Streptavidin-POD (1:4000, Roche) nachgewiesen und photometrisch nach Substratreaktion quantifiziert.

Im reversen Ansatz wurde die Interaktion von FXI-Konstrukten an immobilisiertes HK (4 nM = 4,8 µg/ml) analysiert. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit HK beschichtet und mit seriellen 1:2 Verdünnungsstufen von FXI oder PL-FXI (Startkonzentration jeweils 300 nM) inkubiert. Dann folgte 6,7 nM (1 µg/ml) der α FXI (AS 199) Antikörper, eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper gegen Kaninchen-F_c Fragment und Substratreaktion. Am ELISA Reader wurden die gebundenen Konstrukte photometrisch quantifiziert. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei 37°C für 60 min in PBS/BSA mit Ausnahme der Beschichtung die über Nacht bei 4°C durchgeführt wurde.

B 2.11 Verdrängungsexperimente

Die Interferenz von anti-FXI Antikörpern und rekombinanten Konstrukten mit der HK-FXI Komplex-Bildung wurde mittels eines kompetitiven ELISAs untersucht. Hierzu wurde PPK mit einer konstanten Konzentration von 4 µg/ml (45,4 nM) auf die Mikrotiterplatte beschichtet und 1 µg/ml (8,3 nM) biot-HK nach Waschen und Blockieren mit seriellen 1:2 Verdünnungsreihen der Antikörper beginnend mit 1,2 µM

(= 180 µg/ml), bzw. FXI Apple-tPA Konstrukten (Startkonzentration: 4 µM = 240 µg/ml) oder kompletten rekombinanten FXI bzw. PPK Proteinen (Startkonzentration 2 µM) zusammen in PBS/BSA bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach 6x PBS Waschschritten wurde gebundenes biot-HK durch Streptavidin-Peroxidase (1 µg/ml, Roche) und Substratreaktion wie oben beschreiben nachgewiesen.

B 2.12 Scatchard-Analysen

Scatchard Analysen wurden zur Bestimmung von apparenten Dissoziationskonstanten (K_D) und maximalen Bindungswerten (B_{max}) für Interaktionen von HK an einzelnen rekombinanten Konstrukte durchgeführt. Hierzu wurde die unspezifische Bindung von biot-HK in Gegenwart von 100-fachem Überschuss von unmarkiertem HK bestimmt. Die spezifische Bindung ergibt sich als Differenz der absoluten und der unspezifischen Bindung. Die Auswertung der Bindungsdaten und die Scatchard-Transformation wurde mit dem Programm Prism 2.0a (GraphPad Software, San Diego, CA) auf einem Apple Macintosh errechnet. Die relativen B_{max} Werte für die einzelnen PPK, PPK/F2, FXI/P2, und FXI/Δ2N Konstrukte variierten um < 15% vom B_{max} Wert der Bindung von HK an FXI, der zur als Standard gleich 100% gesetzt wurde.

C ERGEBNISSE

C 1 Bindung von HK an einzelne FXI Apple-Domänen

Die Komplexbindung von FXI mit dem nicht enzymatischen Kofaktor HK wird durch die schwere Kette des Zymogens vermittelt, die aus vier Apple-Domänen (F1-F4) besteht (Tait and Fujikawa, 1987; Thompson *et al.*, 1979). Um diejenigen Bereiche in der schweren Kette von FXI zu kartieren, die die Bindung zu HK vermitteln, wurde zuerst die Bindung von HK an einzelne FXI Apple Domänen untersucht. Hierzu wurden mittels PCR einzelne Apple Domänen kloniert und BHK-Zellen mit den Konstrukten stabil transfiziert. Diese Zellen sekretieren die einzelnen Apple Domänen als Fusionsproteine mit einem modifizierten verkürzten Gewebsplasminogenaktivator (tPA) ins Kulturmedium. Um eine unabhängige Faltung der Apple Domänen von tPA Fusionsanteil zu ermöglichen, wurde ein Oligonukleotid, das für ein Peptid von sechs Aminosäuren Länge kodiert, als Abstandshalter zwischen beide Proteinteile kloniert. Die serumfreien Zellüberstände wurden gesammelt und hieraus tPA-Apple Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie an Säulen mit immobilisierten Antikörpern gegen den Fusionsanteil tPA aufgereinigt. Nach mehreren Waschschritten wurden die spezifisch gebundenen tPA-Apple Domänen mit einem 50 mM Glycin-Puffer, pH 2 von der Säule eluiert, das Eluat neutralisiert und mittels SDS-PAGE mit nachfolgender Silberfärbung überprüft (Abbildung 3). Aus 50 ml Überstand konnte so ca. 1 mg Protein mit einer Reinheit von >95% gewonnen werden.

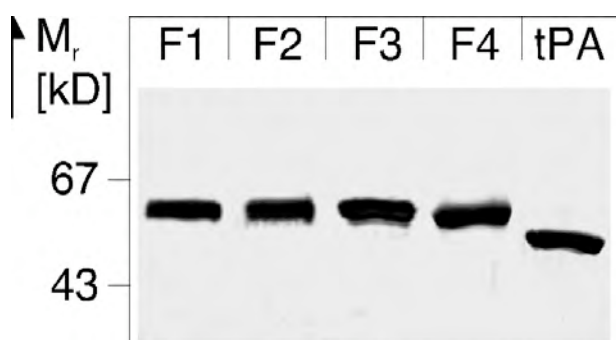


Abbildung 3: Expression von einzelnen FXI Apple Domänen. Die vier FXI Apple Domänen wurden kloniert und in BHK Zellen als Fusionsprotein mit tPA exprimiert. Die Konstrukte wurden aus dem Zellüberstand mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und die Reinheit von je 100 ng (1,8 pmol) der Domänen F1, F2, F3, F4 und Fusionsprotein tPA alleine unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE und Silberfärbung überprüft.

Mit einem direkten Festphasen Bindungsversuch wurde dann die relative Bindung dieser einzelnen Apple-Domäne zu HK bestimmt. Hierzu wurden Mikrotiterplatten mit 25 nM HK beschichtet und dann mit einer 1:2 Verdünnungreihe (beginnend mit 500 nM) der tPA-fusionierten Apple Domänen inkubiert. Spezifisch gebundene

Fusionsproteine wurden durch ein Detektionssystem bestehend aus einem monoklonalen Antikörper gegen den gemeinsamen Fusionsanteil und nachfolgend einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper (1 µg/ml = 6,7 nM) nach Substratreaktion photometrisch quantifiziert. Hierbei fand sich eine relative Reihenfolge der Bindungsaffinität der einzelnen FXI Apple Domänen zu HK entsprechend F2 >> F4 > F1 >> F3 (Abbildung 4).

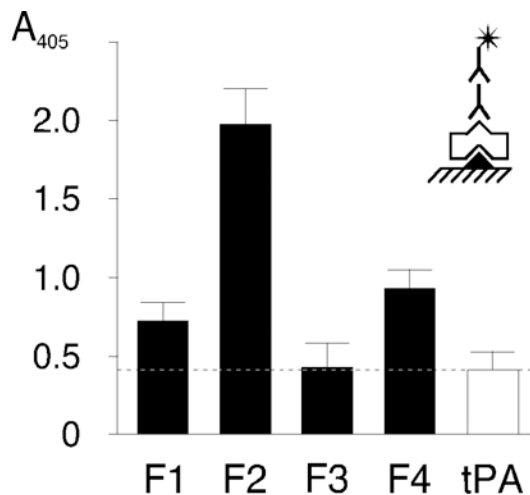
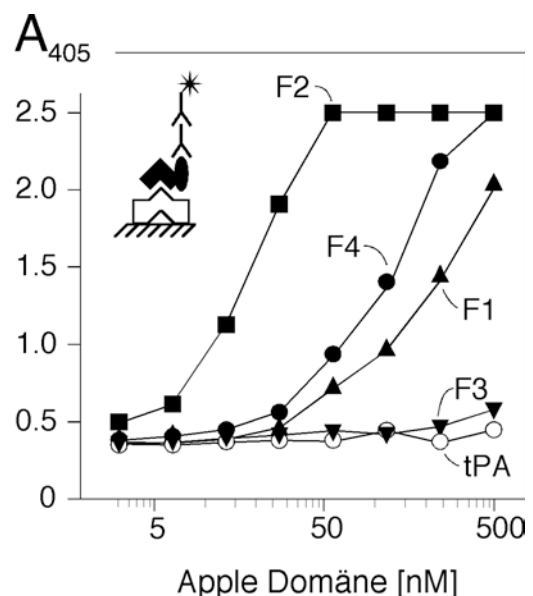


Abbildung 4: Vergleich der Bindung von HK an einzelnen FXI Apple Domänen. Mikrotiterplatten wurden mit 25 nM tPA-FXI Apple Domänen (F1-F4) oder unfusioniertem tPA als Kontrolle (schwarzes Dreieck) beschichtet und dann mit 1:2 Verdünnungsreihen von HK (höchste Konzentration 500 nM, weißes Polygon) inkubiert. Spezifisch gebundenes HK wurde mittels eines Antikörpers gegen HK Domäne D3, die nicht an der Bildung zu FXI beteiligt ist (HKH 13) und Meerrettichperoxidase-konjugiertem Zweitantikörper detektiert und photometrisch 15 min nach Substratreaktion quantifiziert. Die Säulendiagramme stellen Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten dar.

Die absolute Bindungsaffinität der einzelnen Domänen zu HK kann aus der graphischen Auftragung der Bindungskurven bei halbmaximalen Absorptionswerten grob abgeschätzt werden. Hierbei ergibt sich ein K_D -Wert von 17 nM für F2 und 300 bzw. 120 nM für F4 und F1. Die Domäne F3 bindet wie der als Negativkontrolle eingesetzte Fusionsanteil tPA nicht spezifisch an HK ($K_D > 100$ µM, Abbildung 5).

Abbildung 5: Bindung von FXI Domänen an HK. Mikrotiterplatten wurden mit 5 nM HK (weisses Polygon) über Nacht beschichtet und dann Bindung der vier tPA-FXI Apple Domänen (F1-F4) oder unfusioniertem tPA (schwarzes Polygon) untersucht. Spezifisch gebundenes tPA Fusionsprotein wurde mit einem anti-tPA Antikörper und Meerrettichperoxidase-konjugiertem Zweitantikörper detektiert und nach Substratreaktion quantifiziert.



In einem Bestätigungsexperiment konnte die relative Bindungsaffinität von HK an einzelne FXI Apple Domänen mit einem alternativen Ansatz bestätigt werden. Hierbei wurden die einzelnen Apple Domänen an Mikrotiterplatten gebunden und anschließend die Bildung von biot-KH an diese immobilisierten Konstrukte quantifiziert (nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die Komplexbildung unabhängig davon ist, welcher Bindungspartner an Oberflächen fixiert vorliegt. Interessanterweise sind die relativen Bindungsstärken von einzelnen FXI Apple Domänen annähernd identisch mit den entsprechenden Affinitäten von HK zu singuläre Apple Domänen des strukturell verwandten Zymogens PPK ($P2 \gg P4 > P1 \gg P3 \approx tPA$), die in vergleichbaren Experimenten bestimmt worden waren (Renne *et al.*, 1999). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die Apple Domäne 2 die wichtigste Domäne für die FXI/HK Komplexbildung darstellt.

C 2 Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen FXI und PPK

Um die Komplexbildung zwischen HK und FXI und PPK strukturell zu analysieren, wurden monoklonale Antikörper eingesetzt. Hierzu wurden drei monoklonale Antikörper, die gegen den humanen FXI generiert worden waren, von Dr. Joost Meijers, Amsterdam, zur Verfügung gestellt. In Vorversuchen wurden zuerst mit Hilfe der rekombinanten FXI-Einzeldomänen die Epitope der anti-FXI-Antikörper auf einzelne Domänen mittels „Western Blot“ kartiert. Hierbei zeigt sich, dass je ein Antikörper gegen Apple Domäne F1, F2 und gegen F4 gerichtet ist. Dementsprechend wurde eine Nomenklatur, z.B. $\alpha F1$ für den Antikörper, der F1 erkennt, eingeführt, Abbildung 6A. Durch Immunoprint Analyse mit tPA-fusionierten PPK-Einzeldomänen wurden analog die Epitope von 20 im Labor vorhandenen monoklonalen anti-PPK Antikörpern, die in 4 Epitopklassen (A-D) unterteilt worden waren (Hock *et al.*, 1990), kartiert. Alle Antikörper der Klassen A, B und D erkannten spezifisch die Apple Domäne P4. Die drei Epitope (A, B, D) sind also auf dieser Domäne lokalisiert. Von den gegen P4 gerichteten Antikörpern wurde PKH1 ausgewählt, da dieser Antikörper effizient mit der PPK/HK Komplexbildung interferiert (Renne *et al.*, 1999) und entsprechen der eingeführten Nomenklatur als $\alpha P4$ umbenannt. Das Epitop des Antikörper $\alpha P2$, der als einziger Antikörper der Epitopklasse C angehört, wurde auf die Apple-Domäne P2 kartiert. Antikörper $\alpha P1$, der gegen das Peptid PK31 aus P1 generiert worden war (Herwald *et al.*, 1993), erkannte auch rekombinante tPA-P1 Domäne. Keiner der 20 anti-PPK Antikörper war

gegen P3 gerichtet. Abbildung 6 fasst die Kartierung der anti-FXI und anti-PPK Antikörper zusammen.

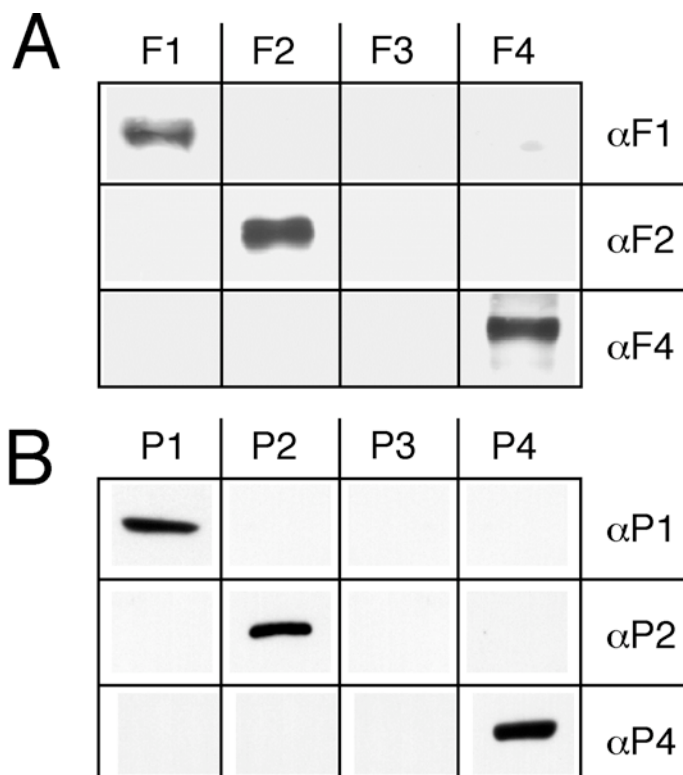


Abbildung 6: Epitopkartierung von monoklonalen anti-FXI und anti-PPK Antikörpern. 20 ng (0,36 pmol) der (A) FXI Einzeldomänen F1-F4 und der (B) PPK Einzeldomänen P1-P4 als tPA Fusionsprotein wurden unter reduzierenden Bedingungen im SDS-PAGE aufgetrennt und die Epitope von monoklonalen Antikörper, die gegen die kompletten FXI bzw. PPK generiert worden waren, im „Western Blot“ auf Einzeldomänen lokalisiert. Die Antikörper wurden dann entsprechend der Domäne, die sie erkennen bezeichnet; z.B. erkennt α F1 die FXI Apple Domäne F1.

Wegen der hohen Sequenzhomologie von 78% (58% Identität) (Chung *et al.*, 1986) und der konservierten Tertiärstruktur der beiden Zymogene wurden die monoklonalen anti-FXI und die entsprechenden anti-PPK Antikörper auf Kreuzreaktivität gegenüber PPK bzw. FXI im „Western Blot“ getestet.

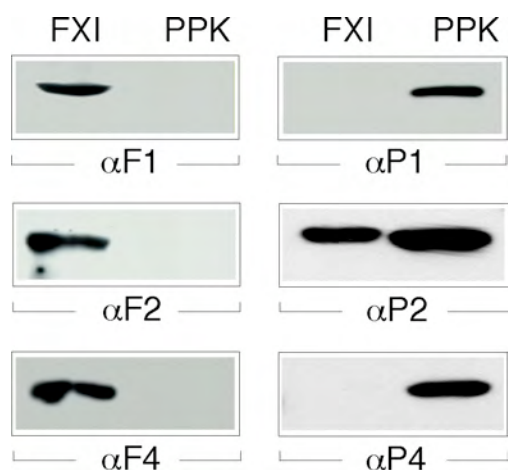


Abbildung 7. Der monoklonale anti-PPK Antikörper α P2 kreuzreagiert mit FXI. Je 20 ng FXI und PPK wurde unter reduzierenden Bedingungen im Western Blot mit den monoklonalen anti-PPK Antikörpern α P1, α P2 und α P4 und den anti-FXI Antikörpern α F1, α F2, and α F4 mittels „Western Blot“ analysiert. Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz und Schwärzung eines photographischen Filmes.

Hierbei zeigt sich, dass der gegen PPK generierte Antikörper α P2 auch FXI erkennt. Im Gegensatz erkennen alle anderen untersuchten Antikörper nur das Antigen, gegen das sie erzeugt worden waren (Abbildung 7, vorige Seite).

Die Kreuzreaktivität von α P2 mit FXI wurde weiter spezifiziert und untersucht, ob α P2 auch an rekombinanten FXI-Apple Domänen bindet. Einzelne tPA-FXI-Apple Domänen wurden unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE getrennt und im „Western Blot“ mit α P2 untersucht. Der Antikörper detektiert spezifisch tPA-F2. Zu anderen FXI-Domänen besteht keine Kreuzreaktivität (Abbildung 8).

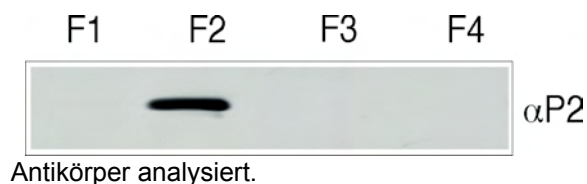


Abbildung 8: Der monoklonale anti-PPK Antikörper α P2 detektiert die F2 Domäne des FXI. 20 ng (0,36 pmol) FXI tPA-fusionierte Einzeldomänen wurden im Western Blot unter reduzierenden Bedingungen mit den α P2

Antikörper analysiert.

Mit diesen Experimenten wurde ein Satz von monoklonalen Antikörpern gegen FXI bzw. PPK charakterisiert, der im Nachfolgenden zur Untersuchung des FXI/HK Komplexes mit Konkurrenzexperimenten eingesetzt wurde. Darüber hinaus zeigen diese Daten, dass das Epitop von α P2 in den Apple Domänen F2 und P2 konserviert ist, was die strukturelle Ähnlichkeit zwischen FXI und PPK unterstreicht.

C 3 Die Apple Domäne 2 beinhaltet die wichtigste HK-Bindungsstelle

Um die Bedeutung der einzelnen Apple-Domänen im Kontext des vollständigen FXI-Proteins für die Komplexbildung mit HK weiter zu untersuchen, wurde Konkurrenzexperimente durchgeführt. Hierbei wurde analysiert, wie monoklonale Antikörper gegen FXI und PPK mit FXI um die Komplexbildung zu HK konkurrieren. α P2 blockiert die Bindung von HK an FXI mit einem apparenten IC_{50} von 8 nM. Hierbei ist dieser anti-PPK Antikörper sogar seinem anti-FXI Pendant α F2 überlegen, der die FXI/HK Komplexbildung mit einem apparenten IC_{50} von 35 nM blockiert. Die Antikörper α F4 und α F1 inhibieren die Bindung von FXI an HK mit apparenten IC_{50} Werten von 1 μ M und 2 μ M. Im Gegensatz dazu können α P4 und α P1 die FXI/HK Komplexbildung auch bei Konzentrationen der Kompetitoren über 5 μ M nicht blockieren (Abbildung 9).

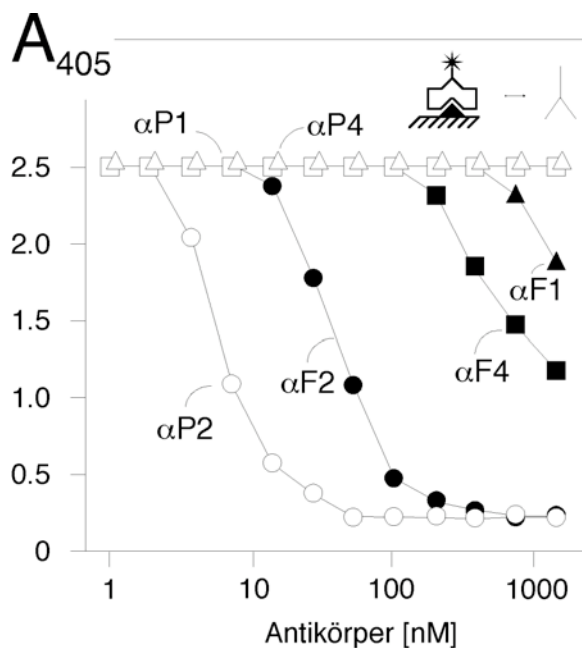


Abbildung 9: Antikörper blockieren die FXI/HK Komplexbildung. Mikrotiter Platten wurden mit 90,8 nM (8 µg/ml) FXI beschichtet und dann mit 8,3 nM (1 µg/ml) biotinyliertem HK und Antikörpern in seriellen 1:2 Verdünnungen inkubiert (Startkonzentration 1,2 µM = 180 µg/ml) αP1 (Δ), αP2 (○), αP4 (□), αF1 (●), αF2 (▲) und αF4 (■). Spezifisch gebundenes HK wurde mittels Streptavidin-POD detektiert und photometrisch quantifiziert. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei Konkurrenzexperimenten. Der schematische Aufbau des Verdrängungsassays ist oben rechts dargestellt. Das helle Polygon entspricht HK, die Antikörper sind durch ein invertiertes Y symbolisiert.

In Ergänzung zu den Antikörpern als Kompetitoren wurden auch die rekombinanten FXI-Einzeldomänen in Verdrängungsexperimenten getestet. Hierbei stellten sich die tPA-Apple-2-Domänen als effektivste Kompetitoren dar. F2 und P2 blockierten die FXI/HK Komplexbildung mit apparenten IC_{50} Werten von 35 nM bzw 50 nM. Wie auch bei den zugehörigen Antikörpern waren Domänen F4 und F1 mit IC_{50} Werten von 1,3 µM und 4 µM deutlich schlechtere Kompetitoren. P4 and P1 konnten die FXI/HK Komplexbildung nicht spezifisch blockieren, apparente IC_{50} Werte von > 10 µM (Abbildung 10).

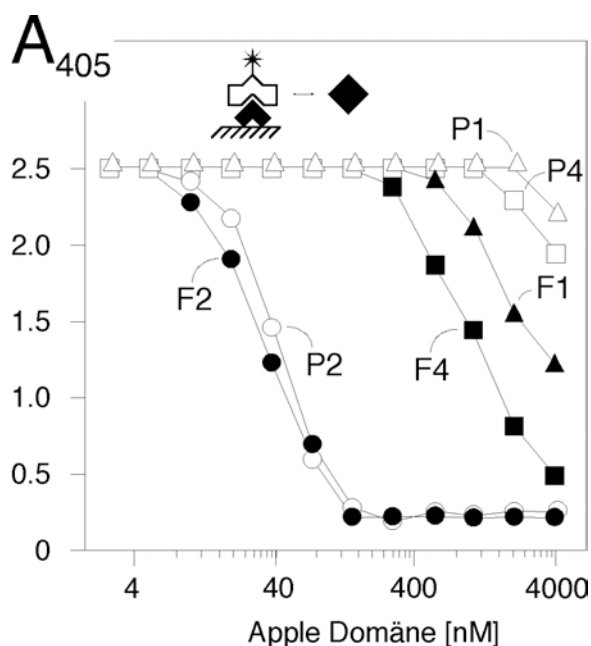


Abbildung 10: FXI/PPK Einzeldomänen inhibieren die FXI/HK Komplexbildung. Mikrotiterplatten wurden mit 90,8 nM (8 µg/ml) FXI beschichtet und dann mit 8,3 nM (1 µg/ml) biotinyliertem HK und tPA Fusionsproteinen der singulären FXI und PPK Apple Domänen in seriellen 1:2 Verdünnungen inkubiert (Startkonzentration 4 µM = 240 µg/ml, P1 (Δ), P2 (○), P4 (□), F1 (▲), F2 (●) und F4 (■)). Spezifisch gebundenes HK wurde mittels Streptavidin-POD detektiert und photometrisch quantifiziert. Die Kompetitoren sind schematisch oben durch die schwarze Raute dargestellt.

PPK und alpha-Kallikrein nicht jedoch beta-Kallikrein werden von diesem Antikörper im Western Blot und direkten Bindungsexperimenten erkannt (Renne *et al.*, 1999). Um die Rolle der Apple 2 Domänen von FXI und PPK für die Komplexbildung mit HK weiter zu untersuchen, wurden zwei chimäre FXI/PPK-Konstrukte kloniert, bei denen die Apple 2 Domäne zwischen den beiden Zymogenen ausgetauscht wurde (Abbildung 11, vorige Seite). Zur Darstellung dieser beiden Chimären, von PPK und FXI wurden HEK293 Zellen mit den cDNAs der vier Konstrukten stabil transfiziert und die sekretierten Proteine aus dem Zellüberstand mittels Affinitätschromatographie mit polyklonalen Antikörpern gegen FXI und PPK aufgereinigt. Die Reinheit der Proteine wurden in der Silberfärbung nach SDS-PAGE auf >95% abgeschätzt.

Anschließend wurden die Proteine mit aktiviertem Faktor XII im molaren Verhältnis 100:1 inkubiert und die Reaktionsprodukte unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE aufgetrennt und dann die mit unterschiedlichen apparenten Molekulargewichten migrierenden Proteolyseprodukten mit Domänen-spezifischen Antikörpern im „Western Blot“ identifiziert (Abbildung 12). Nach proteolytischer Aktivierung entstehen aus PPK, das mit einem apparenten Molekulargewicht von 88 kD migriert beta-Kallikrein, das aus drei Polypeptiden besteht. Mit einem Molekulargewicht von 37 kDa wandert die leichte Kette, die die enzymatische Aktivität beinhaltet. Die beiden Spaltprodukte der schweren Kette, das N-Fragment (P1 und P2 bis Rest 140) und das C-Fragment (P2 ab Rest 141 bis A4 Rest 371) fanden sich bei 25 bzw 31 kDa. Im Gegensatz dazu wird der FXI bei der Aktivierung nur in zwei Fragmente gespalten und eine leichte Kette mit 33 kDa sowie eine ungespaltene schwere Kette mit 49 kDa entsteht. Die Zymogenform FXI migriert, da die Disulfidbrücke zwischen den beiden F4 Domänen des dimeren Proteins reduziert wurde, im Gel als Monomer bei 85 kDa. Das chimäre Protein FXI/P2 verhält sich nach Aktivierung ähnlich wie PPK und eine Dreikettenform, bestehend aus der leichten Kette (33 kDa), dem N-Fragment (28 kDa) und dem C-Fragment (31 kDa) resultiert. Somit ist die Einführung der P2 Domäne in FXI ausreichend dafür, dass ein Spaltmuster wie bei beta-Kallikrein resultiert. Im umgekehrten Falle führte eine F2 Domäne im PPK/F2 Konstrukt nach Aktivierung zu einem Fragmentmuster mit nur zwei Spaltprodukten wie beim FXI (nicht dargestellt).

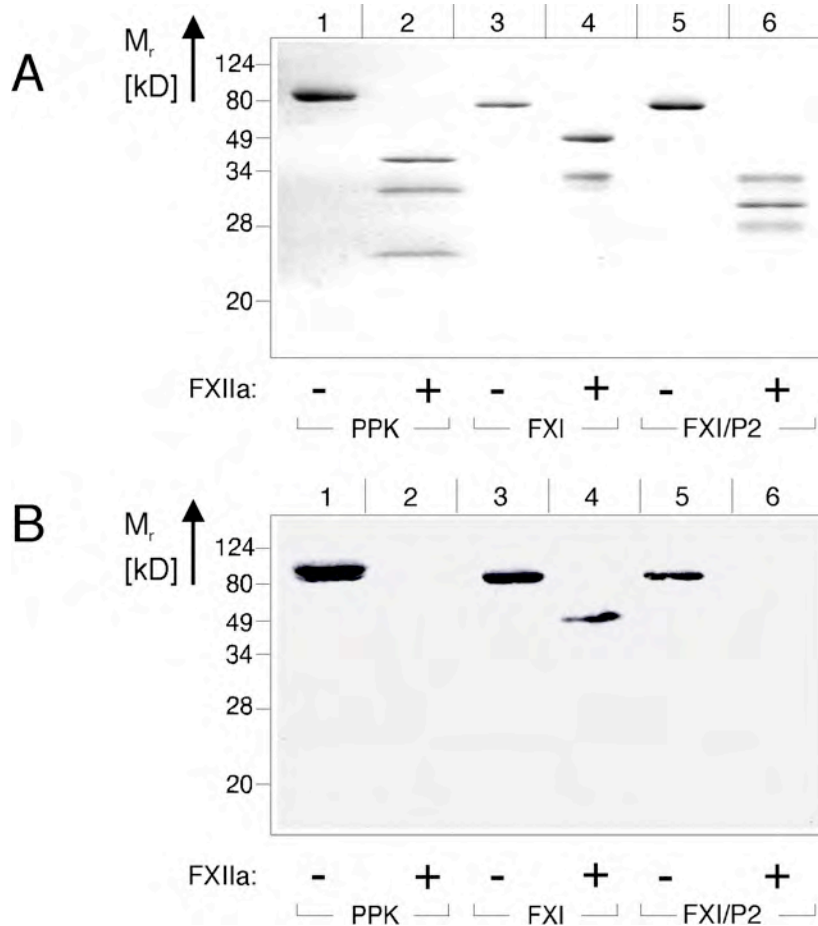
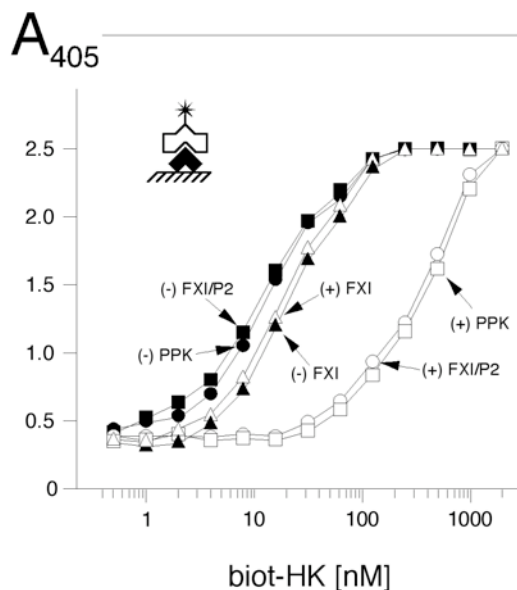


Abbildung 12: Proteolytische Spaltung in der Apple Domäne P2 führt zum Verlust der α P2 Bindung. Die Zymogen Formen PPK, FXI und FXI/P2 wurden mit FXIIa für 72 h bei 37°C aktiviert. Anschließend wurden die Zymogene (-) und aktivierten Proteine (+) unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Abbildung A zeigt das Coomassie brilliant Blau gefärbte Gel. B. Western Blot eines identischen Gels wie A auf Nitrocellulose mit 1 pmol/Spur Protein mit den anti-PPK Antikörper α P2 (1 μ g/ml) als primären Antikörper. Die Positionen der Molekulargewichtsstandards in kDa sind am linken Rand der Abbildung aufgezeichnet.

Mit diesen Proteolyseprodukten konnte dann die Frage beantwortet werden, welche Konsequenz die Spaltung der Apple Domäne P2 für die Bindung des Antikörpers α P2 hat, der die FXI/HK Komplexbildung blockiert. Im „Western Blot“ detektiert α P2 alle Zymogen Formen (PPK, FXI und FXI/P2). Von den Spaltprodukten wurde nur die ungespaltene schwere Kette von FXIa erkannt. Wenn Spaltung in P2 erfolgt, wird keines der dadurch generierten Fragmente mehr von α P2 detektiert, wie bei den N- und C-Fragmenten von FXI/P2 und PK zu sehen ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Epitop von α P2 von einer intakten vollständigen Apple 2 Domäne gebildet wird. Mit der Spaltung innerhalb dieser Domäne geht auch die das Epitop des Antikörpers verloren. Ausgehend von der Hypothese, dass das Epitop von α P2 zumindest partiell mit der HK-Bindungsstelle in F2 überlappt, wurde die HK-Bindungs-fähigkeit der

Zymogene und der aktivierten Proteine in einem direkten Bindungsexperiment bestimmt (Abbildung 13).

A



B

HK-Bindung [%]

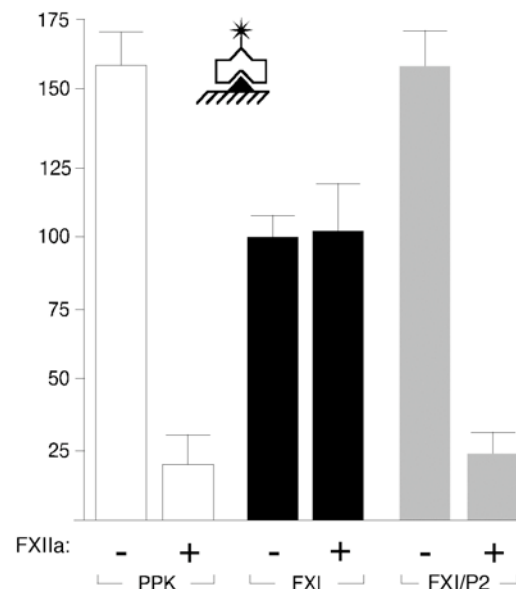


Abbildung 13: Proteolytische Spaltung in der Apple Domäne 2 reduziert die Bindung zu HK. Die Zymogen Formen PPK, FXI und FXI/P2 wurden mit FXIIa für 72 h bei 37°C inkubiert und dann die Bindung zu HK analysiert. (A) Hierzu wurden Mikrotiter Platten mit 5 nM (0,9 µg/ml) der Zymogene (-) oder der aktivierten Proteine (+) beschichtet. Nach Inkubation mit biotinyliertem HK in einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe (Startkonzentration: 2 µM = 240 µg/ml) wurde spezifisch gebundenes HK mit der Biotin-Streptavidin Peroxidase Technik detektiert. Das Piktogramm gibt den schematischen Aufbau des Assays wider. Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus einer Reihe von fünf Experimenten. (B) HK Bindung der aktivierten und unaktivierten Konstrukte. Die Daten sind aus A abgeleitet und stellen die relative Bindung der Konstrukte nach 15 min an HK (20 nM) relativ zur FXI/HK Bindung (100%) dar. Mittelwerte und Standardabweichungen für n=5.

Biotinyliertes HK band an die Zymogen Formen von Plasmakallikrein und Faktor XI hochaffin mit apparenten Dissoziationskonstanten von 10 bzw. 11 nM. Proteolytische Spaltung in der Apple Domäne P2 führte zu einem Rückgang der HK-Bindung um mehr als das 25-fache auf K_D von 270 nM beim gespaltenen Kallikrein und einem K_D Wert von 284 nM beim FXI/P2 Reaktionsprodukt. Im Gegensatz dazu wurde die HK-Bindung von FXI nicht durch die Aktivierung durch FXIIa verändert. Die Zymogenform band mit einem K_D Wert von 19 nM und das aktive Enzym FXIa mit $K_D = 20$ nM, was andeutet, dass die Spaltung in die leichte und die schwere Kette nur einen geringen Einfluss auf die Komplexbindung zu HK hat. Zusammengefasst in

Abbildung 13B zeigen diese Daten, dass die Bindung von HK an Kallikrein im Verlauf der Aktivierung erhalten bleibt, wohingegen sie beim FXI verloren geht. Dies besagt außerdem, dass eine intakte Apple 2 Domäne für die Komplexbildung mit HK sehr wichtig ist.

C 5 Charakterisierung des Plättchenfaktors XI

Welche physiologische Bedeutung kommt dem Befund zu, dass hauptsächlich die Domäne F2 die Komplexbildung zwischen FXI und HK vermittelt? Als ideales Modell, um die Funktion der F2 Domäne weiter zu charakterisieren, bot sich der Plättchenfaktor XI an. Hierbei handelt es sich um eine Splicevariante des FXI, die von Megakaryozyten und somit auch von Thrombozyten exprimiert wird. Dieser Mutante fehlt das Exon 5 und dadurch die N-terminale Hälfte von F2 (Aminosäuren Ala⁹¹-Arg¹⁴⁴, Abbildung 11). Im Gegensatz zum FXI aus Hepatozyten wird der Plättchenfaktor XI nicht sekretiert und konnte an der Thrombozytenoberfläche immunlokalisiert werden (Hsu and Walsh, 1993; Hsu *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1998). Über Funktion und mögliche Unterschiede zu FXI ist bisher nichts bekannt.

Um den Plättchenfaktor XI näher zu charakterisieren, wurde zuerst rekombinantes Protein dargestellt. Dazu wurden HEK293 Zellen transient mit den cDNAs für Plättchenfaktor XI (PL-FXI), FXI und FXI/P2 transfiziert und die Zellen mit [³⁵S]Cys/Met metabolisch markiert. Nach 3 Tagen wurden die exprimierten Proteine mit polyklonalen anti-FXI Antikörpern sowohl aus dem Überstand als auch aus den in RIPA Puffer lysierten HEK293 Zellen immunopräzipitiert. Das Präzipitat wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt und die rekombinanten Proteine mittels Autoradiographie analysiert (Abbildung 14).

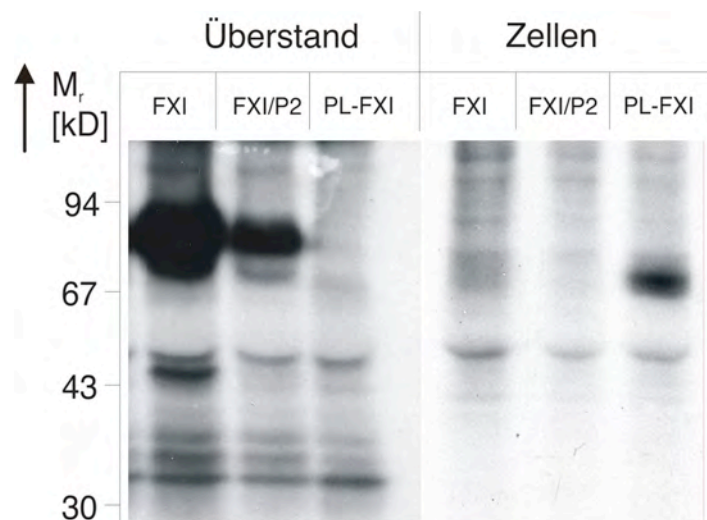


Abbildung 14: Expression der FXI Splicevariante PL-FXI. HEK293 wurden transient mit pcDNA3Vektor transfiziert, der die cDNAs von Wild-type FXI, FXI/P2 oder PL-FXI beinhaltet. Nach Transfektion wurden die Zellen metabolisch mit [³⁵S]-Cys/Met markiert und mittels anti-FXI Antikörpern aus den Zellüberständen (linke Hälfte) oder lysierten Zellen (rechte Hälfte) eine Immunopräzipitation durchgeführt. Die Präzipitate wurden mit SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. Ein typischer Film aus einer Reihe von 3 Experimenten ist gezeigt.

Wie erwartet, konnten sowohl der „komplette“ FXI als auch FXI/P2, die beide mit einem apparenten Molekulargewicht von 80 kDa migrieren, aus dem Zellkulturüberstand immunopräzipitiert werden. Dies zeigt, dass beide Proteine sekretiert werden. Im Gegensatz dazu fand sich kein PL-FXI im Zellüberstand, was besagt, dass diese FXI-Splicevariante nicht sekretiert wird. PL-FXI findet sich ausschließlich assoziiert mit Zellen und kann spezifisch mit einem apparenten Molekulargewicht von 73 kDa aus dem Zellysate präzipitiert werden. Die genaue subzelluläre Lokalisation von PL-FXI wurde in Absprache mit Dr. Walsh nicht weiter untersucht. Die unterschiedliche Sekretion der verschiedenen FXI-Formen ist nicht zelltypspezifisch. In Kontrolllexperimenten wurden COS-7 mit den Konstrukten transfiziert. Auch hier werden FXI und FXI/P2 sekretiert und PL-FXI findet sich in der zellulären Fraktion (nicht gezeigt).

Welche Konsequenz hat nun die Deletion der N-terminalen Hälfte von F2 für die Bindung an den Antikörper α P2? Hierzu wurden Immunopräzipitate mit anti-FXI Antikörpern aus unmarkierten transfizierten Zellen mit α P2 untersucht. Der Antikörper detektiert FXI und FXI/P2 jedoch nicht PL-FXI (Abbildung 15). Das Epitop von α P2 wird durch Deletion der N-terminalen Hälfte von F2 zerstört. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Detektion von β -Kallikrein durch α P2, bei dem ein proteolytischer Schnitt in der F2-homologen Region in P2 zum Verlust der Antikörper Bindung geführt hatte (Abbildung 12).



Abbildung 15: PL-FXI wird nicht von α P2 erkannt. HEK293 wurden transient mit den cDNAs für Wild-type FXI, FXI/P2 oder der plättchenspezifische Splicevariante PI-FXI im pcDNA3(+) Vektor transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellüberstände (linke Hälfte) und lysierten Zellen (rechte Hälfte) mit α P2 oder α F4 im „Western Blot“ unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Ein typisches Experiment einer Serie von 3 ist dargestellt.

PL-FXI kann jedoch mit α F4 detektiert werden. Dies zeigt, dass durch das Herauspleissen des Exons 5 das Leseraster erhalten bleibt und bis auf die Deletion in F2 ein FXI Protein synthetisiert wird, dessen F1, F3 und F4 Domänen mit dem hepatischen sekretierten FXI identisch sind. Wie verhält sich nun diese plättchenspezifische FXI Form bezüglich ihrer HK-Bindungsfähigkeit?

C 6 Bindung des Plättchenfaktors XI an HK

Der monoklonale Antikörper α P2 hatte sich als molekulare Sonde zur Analyse der FXI/HK Komplexbildung erwiesen. Dieser Antikörper inhibiert die Komplexbildung und der Verlust seines Epitops durch den β -Kallikrein spezifischen Schnitt war bei Kallikrein und FXI/P2 verbunden mit dem Verlust der HK-Bindungsfähigkeit. Da im Plättchenfaktor XI die Bindungsstelle(n) für α P2 verloren gegangen waren stellte sich die Frage, wie PL-FXI an HK bindet. Hierzu wurde ein direktes Bindungsexperiment durchgeführt. Zur Darstellung des Proteins wurden HEK293 Zellen mit Expressionsvektoren, die für PPK, FXI, PPK/F2 und PL-FXI kodieren transient transfiziert und nach 48h die rekombinanten Proteine durch Affinitätschromatographie an Säulen mit anti-PPK und anti-FXI Antikörpern aufgereinigt. Bei PL-FXI wurden hierbei die Zellen zuerst durch einen hypotonen Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4) aufgeschlossen, die anderen Konstrukte konnten direkt aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden. Eine besondere Schwierigkeit stellte die Proteinbestimmungen der vier aufgereinigten Konstrukte dar. Hierzu wurde sowohl ein „Sandwich“ ELISA als auch biospezifische Oberflächenplasmonen Resonanzmessungen durchgeführt. Anschließend wurde jeweils 1 ng Protein im „Western Blot“ mit den beiden Antikörpern α P2 oder α F4 analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die Proteine entsprechend ihren errechneten Molekulargewichten von 80 bzw. 73 kDa in der SDS-PAGE migrieren (Abbildung 16).



Abbildung 16: Detektion rekombinanter FXI Konstrukte durch α P2. HEK293 Zellen wurden mit den cDNAs für Wild-type FXI, PL-FXI, p33 (Kont, mitochondriales Protein als Negativkontrolle), Wild-type PPK, PPK/P2 oder FXI/F2 im pcDNA3 transfiziert und die rekombinanten Proteine mittels Affinitätschromatographie an Säulen mit gekoppelten α FXI/ α PPK Antikörpern aufgereinigt. Je 1 pmol der Proteine wurde mit SDS-PAGE aufgetrennt und im „Western Blot“ analysiert. Hierzu wurden die Antikörper α P2 für PPK, die Kontrolle und chimeren Proteine verwendet. Für FXI und PL-FXI wurde der α F4 Antikörper eingesetzt. Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz und Schwärzung eines photographischen Films.

Anschließend wurde die Bindung von HK an die so gewonnen rekombinanten Proteinen bestimmt. Hierzu wurden diese Konstrukte in einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe an Mikrotiterplatten immobilisiert und die Bindung von biotinyliertem HK photometrisch nach Substratreaktion gemessen (Abbildung 17).

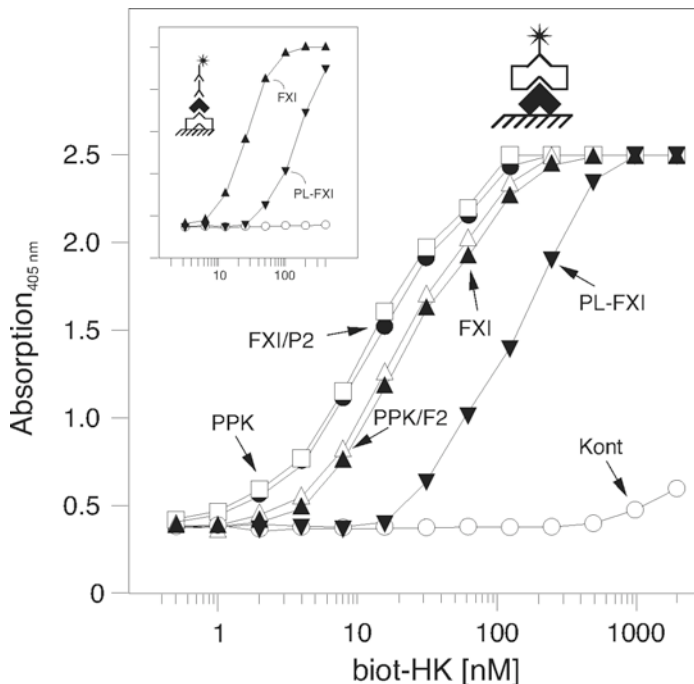


Abbildung 17: HK Bindung an rekombinante FXI Konstrukte. HEK293 Zellen wurden mit den cDNAs für FXI, PL-FXI, Maltose-bindendes Protein (Kont), PPK, PPK/P2 oder FXI/F2 transfiziert und die rekombinanten Proteine mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. (A) Mit 5 nM der isolierten PPK (□), FXI (▲), Kontrolle (Kont, ○), FXI/P2 (●), PPK/F2 (△) oder PL-FXI (▼) Proteine wurden Mikrotiterplatten beschichtet. Anschließend wurde die Bindung von biotinyliertem HK, das in einer seriellen 1:2 Verdünnungsreihe mit der höchsten Konzentration 2 μ M inkubiert wurde, bestimmt. Spezifisch gebundenes HK wurde nach Substratreaktion photometrisch quantifiziert. Alternativ wurde HK (4 nM) immobilisiert und das Protein mit 1:2 Verdünnungen von FXI und PL-FXI ab einer Startkonzentration von 300 nM inkubiert (Insert).

HK band an immobilisiertes PPK und FXI/P2. Aus der Ligandenkonzentration bei halbmaximaler Absorption wurden die apparenten Dissoziationskonstanten ($K_D = 10 \pm 3$ nM und 11 ± 3 nM) abgeschätzt. Wenn die P2 Domäne des PPK gegen F2 ausgetauscht wurde, führte dies zum Abfall der HK-Bindungsfähigkeit des PPK/F2 Chimär ($K_D = 18 \pm 5$ nM). Diese Bindungsstärke entspricht etwa der des FXI ($K_D = 19 \pm 5$ nM). Ein noch stärkerer Abfall der HK-Bindungsfähigkeit ist mit der Deletion des N-terminalen Teils der F2 Domäne verbunden. HK band an PL-FXI mit einem apparenten K_D Wert von 107 ± 19 nM, also 5-fach schwächer als an FXI. Jedoch hat auch PL-FXI noch eine spezifische Affinität zu HK, die weit über der unspezifischen Bindung (Bindung an MBP Kontrolle) liegt. Dies zeigt, dass neben F2 noch andere Bereiche der schweren Kette an der Bindung zu HK beteiligt sind. Um die Spezifität der Bindung von HK an die FXI/PPK Konstrukte weiter zu charakterisieren, wurde die Bindung von HK an immobilisierten FXI und PL-FXI also in einem „inversen“ Ansatz bestimmt. Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass HK deutlich schwächer an PL-FXI als an FXI bindet. Somit scheint eine Änderung der Konformation durch die

Immobilisierung jeweils eines der beiden Komplexpartner nur einen unwesentlichen Einfluss auf die Bindung auszuüben.

Um die in direkten Bindungsversuchen gefundenen Bindungsstärken zu überprüfen, wurde ein Konkurrenzexperiment angeschossen und gemessen, wie die verschiedenen FXI/PPK Konstrukte die Komplexbildung zwischen HK und FXI inhibieren. Hierzu wurde FXI an Mikrotiterplatten immobilisiert und biotinyliertem HK anschließend zusammen mit 1:2 Verdünnungsreihen (Start bei 2 μM) der Konstrukte inkubiert. Das spezifisch an FXI gebundene biot-HK wurde dann photometrisch bestimmt. Die beiden Proteine PPK und FXI/P2, die eine komplette P2 besitzen, blockierten die Komplexbildung zwischen HK und FXI mit apparenten IC_{50} Werten von 9 bzw. 10 nM. Wenn die P2 Domäne wie bei PPK/F2 und FXI gegen F2 getauscht wurde sank damit die apparenten IC_{50} Werte auf 27 nM bzw. 29 nM ab. Diese beiden Proteine stellten also schwächere Kompetitoren dar. Einen noch stärkeren Verlust der Konkurrenzkraft war mit der Deletion innerhalb der F2 Domäne verbunden. PL-FXI zeigte nur einen IC_{50} Werte von 312 nM. Das Konstrukt ist also etwa ein 8-fach schwächerer Kompetitor als FXI (Abbildung 18).

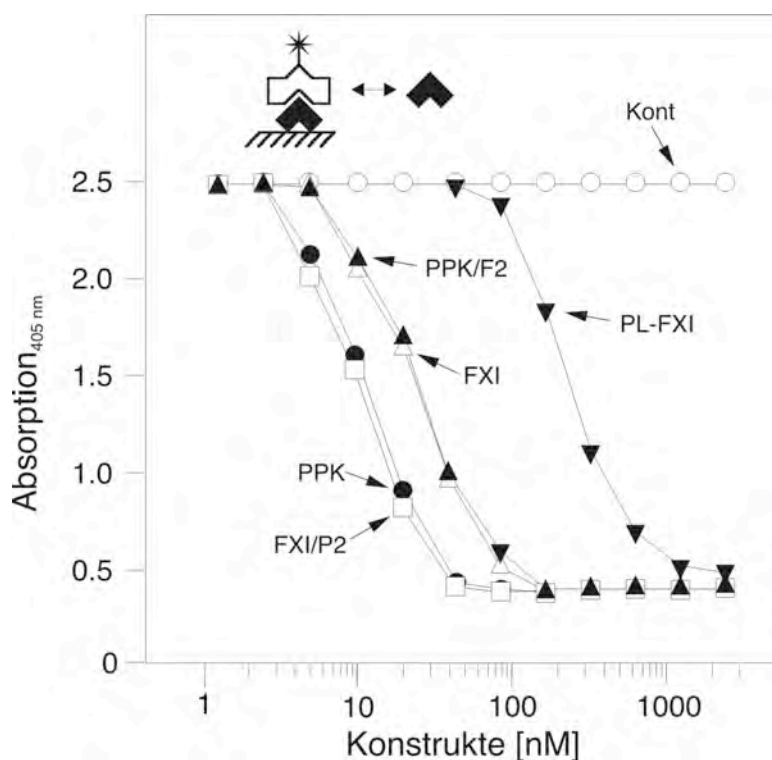


Abbildung 18: FXI Konstrukte konkurrieren um die Bindung von HK an FXI. Mikrotiterplatten wurden mit 45,5 nM FXI beschichtet und mit einer konstanten Konzentration an biotinyliertem HK (8,3 nM) und abfallenden Konzentration (1:2 Verdünnungsreihe von 2 μM) an PPK (□), FXI (▲), p33 (Kont, ○), FXI/P2 (●), PPK/F2 (Δ) oder PL-FXI (▼) inkubiert. Anschließend wurde die Bindung von biotinyliertem HK photometrisch nach Substratreaktion bestimmt. Die Abbildung zeigt ein typisches Bindungs-experiment aus einer Serie von 3 Versuchen.

Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass die Apple 2 Domäne die wichtigste Bindungsstelle für HK beinhaltet und dass der PL-FXI, dem ein Teil dieser wichtigen Domäne fehlt, nur sehr schwach an HK binden kann.

D DISKUSSION

D 1 Funktion von FXI und FXI/HK Komplexe bei der Fibrinbildung

HK liegt im Plasma als bimolekularer Komplex mit FXI oder PPK vor (Bouma *et al.*, 1983b; Fujikawa *et al.*, 1986; Mandle *et al.*, 1976). Die Zymogene der Serinproteasen binden mit so hoher Affinität ($K_D < 10$ nM) an HK, dass der Komplex auch nach Anlagerung auf Zelloberflächen bestehen bleibt (Henderson *et al.*, 1994). HK nimmt bei der Bindung des Komplexes an Zelloberflächen die Funktion eines Ankerproteines ein und dockt über seine zwei Zellbindungsstellen in Domäne D3 und D5_H an Proteoglykane (Renne *et al.*, 2000). Hierbei bilden die langen in Gefäßlumen reichenden Heparan- und Chondroitinsulfate Seitenketten repetitive Bindestellen für HK Komplexe aus (Renne and Müller-Esterl, 2001). Dadurch resultiert eine Anreicherung von PPK und FXI an der Zelloberfläche und eine lokale Assemblierung aller Proteine des Kontaktphasensystems auf Zellen des kardiovaskulären Systems (Herwald *et al.*, 1996a; Motta *et al.*, 1998). Die Funktion der HK-Komplexbildung liegt für PPK auf der Hand. Die BK-generierende Protease setzt das mit einer Halbwertszeit von unter 20 sec im Plasma sehr kurzlebige BK in räumlicher Nachbarschaft zu seinen Rezeptoren frei (Cochrane and Revak, 1980). Nur durch die enge räumliche Nähe vom Ort der BK Generierung zum BK Rezeptor besteht eine ausreichende Wahrscheinlichkeit, dass das Peptidhormon effektiv wirken kann und nicht vorher durch Kininasen wie Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE) abgebaut wird (Jaspard *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu PK ist die physiologische Funktion der Komplexbildung zwischen HK und FXI bisher nicht komplett verstanden. Im Plasma erhöht die Komplexbildung der beiden Proteine ihre Stabilität und somit ihre Halbwertszeit in der Zirkulation. Bei Menschen geht ein schwerer hereditärer HK Mangel mit partieller Defizienz an FXI und PPK einher (Cheung *et al.*, 1993). Auf Zelloberflächen ist HK an der Aktivierung von FXI beteiligt, jedoch ist der genaue molekulare Hintergrund bislang unklar. Für die FXIa-initiierte Thrombinbildung war die Rolle des FXI/HK Komplex insbesondere schwierig zu verstehen, da selbst die komplette Defizienz von HK das Blutungsrisiko nicht erhöht. In Gegensatz dazu ist aber FXI Mangel mit einer gesteigerten Blutungsneigung assoziiert (Bauer *et al.*, 1990; Pugh *et al.*, 1995). Dieser vermeindliche Widerspruch wurde erst in den letzten Jahren aufgeklärt. Zwar verstärkt HK die Bindung von FXI an ruhende Thrombozyten, wo das Zymogen dann rasch zur aktiven Protease FXIa aktiviert werden kann (Baglia and Walsh, 2000; Gailani *et al.*, 2001a; Ho *et al.*, 2000), aber

auch Prothrombin kann FXI an die Plättchenoberfläche binden und so einen HK Mangel kompensieren. Dies erklärt, weshalb die HK Defizienz im Gegensatz zu einem schweren FXI Mangel das Blutungsrisiko nicht erhöht (Baglia and Walsh, 1998). Bei Menschen ist FXI-Defizienz mit einem milden Blutungsphänotyp (Hämophilie C, Rosenthal Syndrom) assoziiert, die hauptsächlich nach Verletzungen insbesondere der Schleimhäute klinisch wichtig sein kann. Interessanterweise besteht jedoch keine Korrelation zwischen der Schwere der hämorrhagischen Diathese und dem FXI Spiegel bzw. seiner Aktivität (Asakai *et al.*, 1991; Hancock *et al.*, 1991; O'Connell, 2003). Dieser Widerspruch deutet an, dass die mit FXI-Mangel assoziierte Blutungsneigung nicht ursächlich durch den FXI-Defekt verursacht wird. Möglicherweise sind mit FXI-kosegregierende Genprodukte beteiligt, die durch bisher unidentifizierte Mechanismen wie z.B. Gefäßwandeffekte oder Fibrinolyse zur Blutungsneigung beitragen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist die Deletion des FXI Gens in der Maus nicht mit einem schwerwiegenden Blutungsphänotyp assoziiert. FXI-null Mäuse sind fertil und makroskopisch ununterscheidbar von Wild-type Geschwistertieren (Gailani *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zur klinisch eher untergeordneten Funktion von FXI bei der Blutstillung (Hämostase) gibt es experimentelle Hinweise darauf, dass die FXI-getriebene Fibrinbindung eine essentielle Funktion bei der Thrombusbildung einnimmt. Auf aktivierten Thrombozyten scheint FXI ohne HK an GP Ib binden zu können (Baglia *et al.*, 2002). Diese direkte Interaktion von Faktoren der intrinsischen Kaskade mit aktivierten Thrombozyten stellt eine wichtige Verbindung zwischen primärer und sekundärer Hämostase dar und ist die molekulare Erklärung für die Verkürzung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT, ein Gerinnungstest für die intrinsische Kaskade) in Gegenwart von aktivierten Thrombozyten (Walsh, 2004; Walsh and Griffin, 1981). Aktuelle Ergebnisse mit Mausmodellen mit Defekten in der intrinsischen Gerinnungskaskade zeigen die *in vivo* Relevanz dieses Befundes. In experimentellen Thrombosemodellen bei Mäusen, zeigt sich, dass FXII und FXI essentiell für die pathologische Thrombusbildung sind. Ein Mangel an FXI reduziert die Thrombusstabilität und führt zur defekter Thrombusbildung in arteriellen Gefäßen (Renne *et al.*, 2005a; Rosen *et al.*, 2002). Dieser Schutz vor arteriellen Thrombosen ist nicht nur auf klassische Thrombosemodelle beschränkt, bei denen die Gefäßwand entweder mechanisch oder chemisch durch FeCl₃-induzierte Radikalbildung geschädigt wird. Auch in Schlaganfallmodellen sind FXI-null Mäuse erheblich

geschützt. Nach transientem Verschluss der mittleren Zerebralarterie (tMCAO Modell) ist der ischämische Gewebsschaden und die pathologische Fibrinbildung bei FXI^{-/-} Mäusen im Vergleich zum Wild-type erheblich reduziert (Kleinschnitz *et al.*, 2006). Bei Kaninchen und Primaten blockiert eine Inhibition der FXI Aktivität durch Antikörpern die arterielle Thrombusbildung (Gruber and Hanson, 2003; Minnema *et al.*, 1998). Ganz aktuelle Daten zeigen, dass auch die venöse Thrombusbildung bei Mäusen mit FXI Mangel erheblich gestört ist. Nach Stase in der Hohlvene bilden sich bei FXI-defizienten Tieren signifikant weniger und kleinere Thromben aus (Wang *et al.*, 2006). Dieser schwere Defekt dokumentiert, dass die Aktivierung der intrinsischen Kaskade und Thrombinbildung auf oder zumindest in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche von aktivierten Thrombozyten ein wichtiges Element bei der Bildung und Stabilisierung von dreidimensionalen Thromben darstellt. Klinisch sind erhöhte FXI Spiegel ein wichtiger Risikofaktor für tiefe Beinvenenthrombosen (Meijers *et al.*, 2000). Im umgekehrten Fall scheint im arteriellen Gefäßen ein erniedrigter FXI Spiegel beim Menschen nicht mit einem protektiven Effekt bei gefäßokklusive myokardialen Ereignisse assoziiert zu sein (Salomon *et al.*, 2003). Ganz aktuelle Daten zeigen hingegen, dass die komplette FXI Defizienz einen erheblichen Schutz vor ischämischem Insult bewirkt. In der israelischen Bevölkerung traten bei 117 Menschen mit kompletter Defizienz (FXI<1%) nur einmal ein Schlaganfall auf. Bei der alters- und geschlechtsangepassten Kontrollpopulation jedoch in 14 Fällen (Solomon, persönliche Mitteilung). Der molekulare Mechanismus über den FXI zur Thrombusbildung beiträgt ist nicht abschließend geklärt. FXI kann sowohl die Fibrinolyse, über den Trombin-aktivierbaren Fibrinolyse Inhibitor (TAFI) herunterreguliert als auch die Fibrinbildung über FIX steigern (Minnema *et al.*, 1998). Daher ist nicht klar, ob die defekte Thrombusbildung durch Inhibition von FXI auf einem anti-koagulatorischen oder einen pro-fibrinolytischen Mechanismus beruht.

D 2 Vergleich der FXI und PPK Komplexe mit Kininogen

Trotz ihrer unterschiedlichen physiologischen Funktionen weisen PPK und FXI Gemeinsamkeiten auf. So sind die Primärsequenzen der Proteine zu 58% identisch und beide Zymogene weisen eine übereinstimmende Domänenorganisation auf (Chung *et al.*, 1986; McMullen *et al.*, 1991a; McMullen *et al.*, 1991b). Charakteristisch für die beiden Plasmaproteine sind ihre Apple Domänen. Diese Domänen existieren bei Säugern nur in den beiden Plasmaproteinen und finden sich

darüber hinaus nur im EtMIC 5 Protein des Parasiten *Eimeria tenella*. EtMIC 5 ist bei der Adhäsion und Invasion des Parasiten in Wirtszellen beteiligt, was auf eine konservierte Funktion im Bereich von Entzündungsprozessen und Infektabwehr für Apple Domänen hindeutet (Brown *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001). In der Tat ist bei Mäusen, die defizient an FXI und an Plasminogen sind, eine inflammatorische Infiltration der Lunge zu beobachten (Cheng *et al.*, 2005).

Humaner FXI ist das Produkt eines Gens auf dem distalen Ende des langen Arms von Chromosom 4 (4q35) aus 15 Exonen von einer Größe von 23 kbp (Asakai *et al.*, 1987). Die Homologie zwischen FXI und PPK liegt in der Organisation ihrer Gene begründet. Beide Gene bestehen aus 15 Exonen und haben identische Exon-Intron Grenzen. Beim Menschen liegen beide Gene auf dem distalen Ende des langen Arms von Chromosom 4 und weniger als 10 kb voneinander getrennt (Asakai *et al.*, 1987; Beaubien *et al.*, 1991). Diese genomische Nachbarschaft legt nahe, dass die Gene das Produkt einer Genduplizierung sind und evolutionär von einem gemeinsamen Vorläufergen abstammen (Beaubien *et al.*, 1991).

Trotz der vielen strukturellen Gemeinsamkeiten zwischen PPK und FXI legten alle publizierten Daten nahe, dass sich die beiden Zymogene bezüglich ihrer Bindung an HK unterscheiden (Baglia *et al.*, 1990). Die HK Bindungsstelle im FXI wurde mittels Konkurrenzexperimente mit Peptiden aus der Sequenz der schweren Kette von FXI lokalisiert. Hierbei zeigte sich, dass Aminosäurereste der F1 Domäne zwischen Phe⁵⁶ bis Ser⁸⁶ die Bindung an HK vermitteln. Im Gegensatz zu Peptiden aus zu F1 blockierten Peptide aus den anderen drei Apple Domänen (F2-F4) die FXI/HK Komplexbildung nicht (Baglia *et al.*, 1990). Auf Grund der sehr hohen Homologie zwischen PPK und FXI war wenig verständlich, wieso die HK Bindungsstellen der beiden Zymogene unterschiedlich sind. Mittels PPK-Apple Einzeldomänen oder PPK Deletionsmutanten, denen einzelne Apple Domänen fehlten und FXI/PPK chimären Proteine konnte die P2 Domäne als wichtigste Interaktionsstelle für HK lokalisiert werden (Renne *et al.*, 1999). Der zentrale Bereich in P2 wird flankiert von den Domänen P1 und P4, wohingegen P3 keinen Anteil an der diskontinuierlichen HK-Bindungsstelle besitzt (Herwald *et al.*, 1993; Herwald *et al.*, 1996b). Unabhängig davon konnte die Bedeutung von P2 für die PPK/HK Komplexbildung auch durch Verdrängungsexperimente mit anti-PPK Antikörpern bestätigt werden. Im Vergleich

der Antikörpern gegen alle PPK Apple Domänen blockieren Antikörper gegen P2 am effizientesten die Bindung zu HK (Renne *et al.*, 1999). Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die hier vorliegende Arbeit, die demonstriert dass bei FXI die F2 Domäne am wichtigsten für die Bindung zu HK ist. Zusammengefasst zeigt sich, dass die FXI und PPK ähnlich an HK binden, und dass jeweils die Apple Domäne 2 die wichtigste Bindestelle beinhaltet. Unsere Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit den Inhibitionsexperimenten mit FXI Peptiden. Zwar zeigen beide Ansätze, dass Sequenzen aus der F1 Domäne für die Komplexbildung wichtig sind, aber Peptide aus den Domänen F2 und F4 kompetieren nicht mit der FXI/HK Bindung (Baglia *et al.*, 1990). Die molekularen Ursachen hierfür sind nicht völlig klar, jedoch ist es möglich, dass die Peptide nicht in der korrekten Konformation vorlagen. Dies erscheint wahrscheinlich, da die Konformation der Apple Domänen durch drei (F2) bzw. vier (F4) Disulfidbrücken komplex ist und möglicherweise sogar gespannt vorliegt (McMullen *et al.*, 1991a; McMullen *et al.*, 1991b), was durch kurze lineare Peptide nur schwer zu imitieren ist. Ergebnisse von Peptidverdrängungsexperimenten bei PPK bestärken diese Hypothese. Auch beim PPK kompetieren Peptide aus P2 nicht mit der PPK/HK Komplexbildung (Renne *et al.*, 1999). Diese Diskrepanzen zwischen Studien mit Peptiden und Ergebnissen, die auf größeren rekombinant dargestellten Proteinen basieren, zeigt ein generelles Problem beim Modellieren von Proteinen mit komplexen Tertiärstrukturen durch Peptiden. Diese Problematik ist nicht auf Interaktionen von FXI mit HK beschränkt. Durch Peptide wurde die Faktor IX Bindungsstelle im FXI in der Domäne F2 lokalisiert (Baglia *et al.*, 1991), wohingegen Arbeiten, die FXI/PPK chimäre Proteine und Alanin-Substitutionsmutanten des FXI verwendeten übereinstimmend zeigen konnten, dass Domäne F3 die Interaktion zum FXI Substrat vermittelt (Sun *et al.*, 1999). Aber auch bei Fusionsproteinen sind Einschränkungen zu beachten. So kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass der tPA Fusionsproteinanteil mit 50 kDa nicht sterisch die Interaktion der sehr viel kleineren Apple Domäne (10 kDa) mit HK blockiert. Um dieses Problem zumindest teilweise zu minimieren, wurde hier ein Abstandshalter von 6 Aminosäure Länge zwischen tPA und die jeweilige Apple Domäne kloniert, wodurch sich beide Anteile voneinander entkoppeln und sich relativ unabhängig voneinander anordnen können (Meijers *et al.*, 1992b). Da auch durch einen unabhängigen Ansatz, der auf Konkurrenz durch monoklonale anti-FXI Antikörper basiert, die gleiche relative HK-Bindungsaffinität von einzelnen

FXI Domänen gefunden wurde (Abbildung 9) spricht vieles dafür, dass der tPA Fusionsanteil die Bindung von FXI-Einzeldomänen an HK im Vergleich zu Apple Domänen im intakten FXI Protein nicht wesentlich verändert.

Aktiver Faktor XII (FXIIa) spaltet PPK rasch, wodurch eine enzymatisch aktive Zweikettenform entsteht, die α -PKa genannt wird. Bei längerer Inkubation (72 h, 37°C) wird diese weiter prozessiert und in der P2 geschnitten und die Dreikettenform β -PKa entsteht. Die enzymatische Aktivität von α -PKa und β -PKa ist ähnlich (Colman *et al.*, 1985), aber β -PKa bindet mehr als 20-fach schlechter an HK als α -PKa oder PPK (Abbildung 13). Dies könnte funktionelle Bedeutung haben. Da Kallikrein über HK an kardiovaskuläre Zellen bindet bedeutet ein Verlust der Bindung an das Adapterprotein, dass β -PKa von Zellen abdissoziiert. Daher hat die Prozessierung von Kallikrein durch FXIIa zwei Funktionen. FXIIa aktiviert die Proteasenvorstufe und kann ihre biologische Wirkung auch terminieren, indem es die aktive Protease von von ihrem Substrat HK und so von der Zelloberfläche ablöst. In der vorliegenden Arbeit, konnten wir zeigen, dass FXI zwar durch FXIIa aktivierbar ist, im Gegensatz zu PK wird aber FXIa nicht weiter in der Domäne F2 prozessiert und der FXIa/HK Komplex bleibt bestehen. Funktionell bedeutet dies, dass die durch FXIa getriebene Fibrinbildung länger ablaufen wird, wenn sie aktiviert ist. Somit bestimmt der strukturelle Unterschied von FXI und PK in den Apple 2 Domänen möglicherweise eine physiologische Funktion der Systeme: schnelle Abschaltung des Entzündungsmediators BK aber länger ablaufende Gerinnungsaktivierung und Fibrinbildung. Es ist weiterhin denkbar, dass dieser zeitliche Unterschied auch dafür verantwortlich ist, dass nicht immer wenn FXIIa die Gerinnung aktiviert gleichzeitig auch eine BK vermittelte Entzündungsreaktion auftritt (Becker *et al.*, 1980; Renne *et al.*, 2005a).

D 3 Biochemie und Funktion des Plättchenfaktors XI

In der Arbeitsgruppe von Dr. Peter Walsh, Philadelphia, wurde in den letzten Jahren ein Splicevariante der FXI mRNA beschrieben und kloniert. Dieser Mutante fehlen die Reste Ala⁹¹-Arg¹⁴⁴ in der C-terminalen Hälfte der F2 Domäne, die vom Exon 5 kodiert werden (Hsu *et al.*, 1998). Basierend auf FACS Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese FXI Mutante auf Thrombozyten exprimiert wird, worauf sich ihr Name als „Plättchenfaktor XI“ begründet (Hsu and Walsh, 1993). Interessanterweise

scheint die Expression des Plättchenfaktor XI unabhängig von der des FXI im Plasma zu sein und so zumindest partiell eine Defizienz des „Plasma-Faktors XI“ kompensieren zu können (Hu *et al.*, 1998). Der zugrunde liegende Mechanismus, der für die differentielle Expression der beiden Produkte des einen humanen *FXI* Gens zugrunde liegt, ist bislang unbekannt. Möglicherweise bietet der Plättchenfaktor XI eine Erklärung, für die sehr variablen Blutungsneigungen bei FXI Mangel. Es wurde beschrieben, dass Plättchenfaktor XI mit Thrombozyten assoziiert ist (Hu *et al.*, 1998). Ob das Protein die Phospholipidmembran durchspannt oder über einen Rezeptor auf Thrombozyten gebunden wird ist bislang nicht bekannt. Unsere Strukturvorhersagen mit den Softwarepaketen DNASTAR und JEMBOSS zeigen, dass Plättchenfaktor XI keinen klassischen die Membran durchspannenden Bereich besitzt also eher indirekt an die Thrombozytenoberfläche gebunden ist. Initiale Daten zeigten, dass der Plättchenfaktor XI als Homo-Tetramer aus identischen 50-55 kDa Untereinheiten vorliegt und unter nicht reduzierenden Bedingungen mit einem apparenten Molekulargewicht von 220 kDa in der SDS-PAGE migriert (Lipscomb and Walsh, 1979; Tuszyński *et al.*, 1982). Im Gegensatz dazu hat der von uns in HEK293 Zellen rekombinant exprimierte Plättchenfaktor XI ein Molekulargewicht von 73 kDa (Abbildung 14). Diese Masse stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht überein, daß sich aus der Differenz des 80 kDa FXI, dem die von Exon 5 kodierten 53 Aminosäuren fehlen, ergibt. Der Plättchenfaktor XI ließ sich durch transiente Transfektion mit einem CMV-getriebenen starken Promotor nur in sehr geringen Mengen in Zellen darstellen. Im Gegensatz zu „komplettem“ FXI wird der PL-FXI nicht sekretiert, obwohl er das gleiche Signalpeptid besitzt. Die sehr geringe Expressionshöhe des Konstruktes, die Diskrepanz zwischen beschriebenen und nach der cDNA zu erwartendem apparentem Molekulargewicht und die nicht vorhandene Sekretion werfen Zweifel auf, ob der Plättchenfaktor XI *in vivo* überhaupt existiert. In Thrombozyten konnte keine mRNA für die FXI Splicemutante nachgewiesen werden (Martincic *et al.*, 1999) und die Klonierung der PL-FXI cDNA erfolgte aus einer Lymphozytentumorzelle (CHRF-288-11), bei der unphysiologische durch Tumortransformation bedingte DNA Veränderungen vorkommen. Zudem ist bei Patienten bekannt, dass schon einzelne Aminosäureaustausche in der von Exon 5 kodierten Sequenz zur Defizienz des FXI im Plasma führen (Imanaka *et al.*, 1995; Mitchell *et al.*, 2006), was nahe legt, dass der komplette Verlust von Exon 5 zum Verlust der Expression führen wird. Unabhängig von der physiologischen Relevanz

des PL-FXI ist dieses Protein eine ideale Mutante um die FXI/HK Komplexbildung über F2 zu analysieren. Unsere Experimente mit monoklonalen Antikörpern zeigen, dass die PL-FXI cDNA exprimiert werden kann und das von dieser cDNA codierte Protein bis auf den Defekt in der F2 Domäne mit der Primärstruktur des kompletten FXI übereinstimmt. So erkennt der α F4 Antikörper, der gegen FXI generiert wurden und dessen Epitop C-terminal der Deletion liegt, auch den PL-FXI (Abbildung 15, 16). Ein zentrales Ergebnis dieser Arbeit zeigt, dass der Plättchenfaktor XI im Vergleich zu FXI kaum noch an HK binden kann (Abbildung 17). Wenn beide Proteine bis auf F2 vergleichbare Konformationen aufweisen, unterstreicht der Verlust der HK Bindung im Plättchenfaktor XI, dass die F2 Domäne die wichtigste Bindungsstelle für HK beinhaltet.

D 4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde der PPK/HK Komplex strukturell und funktionell analysiert. Während diese Arbeit entstand, wurde von in der Arbeitsgruppe von Dr. J. Emsley, Nottingham, UK, humaner aus Plasma aufgereinigter FXI kristallisiert und die Raumstruktur des FXI Dimers aufgeklärt (Papagrigoriou *et al.*, 2006). Die durch Deletionsmutanten und Antikörper in dieser Arbeit kartierte HK-Bindungsstelle in F2 liegt an der Oberfläche des Proteins und ist für die Komplexbildung mit HK zugänglich (Dr. Emsley, persönliche Mitteilung). Auf Grund der neuen Strukturdaten kommt auch der N-terminalen Hälfte von F1 eine wichtige Funktion bei der Komplexbildung zu. Möglicherweise ist die Bedeutung von F1 größer als die Untersuchungen dieser Arbeit nahe legen. Basierend auf der großen Homologie zwischen FXI und PPK modelliert Dr. Emsley aktuell die Struktur von PPK. Möglicherweise ergeben sich durch diese strukturellen Daten neue Zielstrukturen, um die Wirkung von FXI und PPK und damit die pathologische Thrombusbildung mit geringen bis keinen Blutungskomplikationen zu therapieren.

E REFERENZEN

- Asakai, R., Chung, D., Davie, E. and Seligsohn, U. (1991) Factor XI deficiency in Ashkenazi Jews in Israel. *N. Eng. J. Med.*, **325**, 153-158.
- Asakai, R., Davie, E.W. and Chung, D.W. (1987) Organization of the gene for human factor XI. *Biochemistry*, **26**, 7221-7228.
- Baglia, F.A., Badellino, K.O., Li, C.Q., Lopez, J.A. and Walsh, P.N. (2002) Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex promotes factor XI activation by thrombin. *J Biol Chem*, **277**, 1662-1668.
- Baglia, F.A., Jameson, B.A. and Walsh, P.N. (1990) Localization of the high molecular weight kininogen binding site in the heavy chain of human factor XI to amino acids phenylalanine 56 through serine 86. *J Biol Chem*, **265**, 4149-4154.
- Baglia, F.A., Jameson, B.A. and Walsh, P.N. (1991) Identification and chemical synthesis of a substrate-binding site for factor IX on coagulation factor XIa. *J Biol Chem*, **266**, 24190-24197.
- Baglia, F.A., Jameson, B.A. and Walsh, P.N. (1992) Fine mapping of the high molecular weight kininogen binding site on blood coagulation factor XI through the use of rationally designed synthetic analogs. *J Biol Chem*, **267**, 4247-4252.
- Baglia, F.A., Shrimpton, C.N., Lopez, J.A. and Walsh, P.N. (2003) The glycoprotein Ib-IX-V complex mediates localization of factor XI to lipid rafts on the platelet membrane. *J Biol Chem*, **278**, 21744-21750.
- Baglia, F.A. and Walsh, P.N. (1998) Prothrombin is a cofactor for the binding of factor XI to the platelet surface and for platelet-mediated factor XI activation by thrombin. *Biochemistry*, **37**, 2271-2281.
- Baglia, F.A. and Walsh, P.N. (2000) Thrombin-mediated feedback activation of factor XI on the activated platelet surface is preferred over contact activation by factor XIIa or factor XIa. *J Biol Chem*, **275**, 20514-20519.
- Bauer, K.A., Kass, B.L., ten Cate, H., Hawiger, J.J. and Rosenberg, R.D. (1990) Factor IX is activated in vivo by the tissue factor mechanism. *Blood*, **76**, 731-736.

- Beaubien, G., Rosinski-Chupin, I., Mattei, M.G., Mbikay, M., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1991) Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry*, **30**, 1628-1635.
- Becker, C.G., Dubin, T. and Glenn, F. (1980) Induction of acute cholecystitis by activation of factor XII. *J Exp Med*, **151**, 81-90.
- Bern, M.M., Sahud, M., Zhukov, O., Qu, K. and Mitchell, W., Jr. (2005) Treatment of factor XI inhibitor using recombinant activated factor VIIa. *Haemophilia*, **11**, 20-25.
- Bolton-Maggs, P.H. (2000) Factor XI deficiency and its management. *Haemophilia*, **6**, 100-109.
- Bouma, B., Vlooswijk, R. and Davie, E. (1983a) Immunologic studies of human coagulation factor XI and its complex with high molecular weight kininogen. *Blood*, **62**, 1123-1131.
- Bouma, B.N., Vlooswijk, R.A. and Griffin, J.H. (1983b) Immunologic studies of human coagulation factor XI and its complex with high molecular weight kininogen. *Blood*, **62**, 1123-1131.
- Brown, P.J., Billington, K.J., Bumstead, J.M., Clark, J.D. and Tomley, F.M. (2000) A microneme protein from *Eimeria tenella* with homology to the Apple domains of coagulation factor XI and plasma pre-kallikrein. *Mol Biochem Parasitol*, **107**, 91-102.
- Brown, P.J., Gill, A.C., Nugent, P.G., McVey, J.H. and Tomley, F.M. (2001) Domains of invasion organelle proteins from apicomplexan parasites are homologous with the Apple domains of blood coagulation factor XI and plasma pre-kallikrein and are members of the PAN module superfamily. *FEBS Lett*, **497**, 31-38.
- Broze, G. (1992) The role of tissue factor pathway inhibitor in a revised coagulation cascade. *Sem Hematol*, **29**, 159-169.
- Broze, G.J., Jr. and Gailani, D. (1993) The role of factor XI in coagulation. *Thromb Haemost*, **70**, 72-74.
- Cheng, Q., Zhao, Y., Lawson, W.E., Polosukhin, V.V., Johnson, J.E., Blackwell, T.S. and Gailani, D. (2005) The effects of intrinsic pathway protease deficiencies on plasminogen-deficient mice. *Blood*, **106**, 3055-3057.

- Cheung, P.P., Kunapuli, S.P., Scott, C.F., Wachtfogel, Y.T. and Colman, R.W. (1993) Genetic basis of total kininogen deficiency in Williams' trait. *J Biol Chem*, **268**, 23361-23365.
- Chung, D., Fujikawa, K., McMullen, B. and Davie, E. (1986) Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats. *Biochemistry*, **25**, 2410-2417.
- Cochrane, C.G. and Revak, S.D. (1980) Dissemination of contact activation in plasma by plasma kallikrein. *J Exp Med*, **152**, 608-619.
- Colman, R.W. (2001) *Contact activation pathway: Inflammatory, fibrinolytic, anticoagulant, antiadhesive, and antiangiogenic activities*. in Colman R. W. et al. Thrombosis and Hemostasis, 5. Auflage. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Colman, R.W. and Schmaier, A.H. (1997) Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood*, **90**, 3819-3843.
- Colman, R.W., Wachtfogel, Y.T., Kucich, U., Weinbaum, G., Hahn, S., Pixley, R.A., Scott, C.F., de Agostini, A., Burger, D. and Schapira, M. (1985) Effect of cleavage of the heavy chain of human plasma kallikrein on its functional properties. *Blood*, **65**, 311-318.
- Dahlback, B. (2000) Blood coagulation. *Lancet*, **355**, 1627-1632.
- Davie, E.W. (1981) Introduction to clotting in blood plasma. *Methods Enzymol*, **80**, 153-156.
- Davie, E.W. and Ratnoff, O.D. (1964) Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science*, **145**, 1310-1312.
- Dorfman, R. and Walsh, P.N. (2001) Noncovalent interactions of the Apple 4 domain that mediate coagulation factor XI homodimerization. *J Biol Chem*, **276**, 6429-6438.
- Fujikawa, K., Chung, D., Hendrickson, L. and Davie, E. (1986) Amino acid sequence of human factor XI, a blood coagulation factor with four tandem repeats that are highly homologous with plasma prekallikrein. *Biochemistry*, **25**, 2417-2424.
- Furie, B. and Furie, B. (1992) Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N. Engl J Med*, **326**, 800-806.

- Gailani, D. and Broze, G.J., Jr. (1991) Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science*, **253**, 909-912.
- Gailani, D. and Broze, G.J., Jr. (1993) Factor XII-independent activation of factor XI in plasma: effects of sulfatides on tissue factor-induced coagulation. *Blood*, **82**, 813-819.
- Gailani, D., Ho, D., Sun, M.-F., Cheng, Q. and Walsh, P. (2001a) A model for a factor IX activating complex on blood platelets. *Blood*, **97**, 3117-3122.
- Gailani, D., Ho, D., Sun, M.F., Cheng, Q. and Walsh, P.N. (2001b) Model for a factor IX activation complex on blood platelets: dimeric conformation of factor XIa is essential. *Blood*, **97**, 3117-3122.
- Gailani, D., Lasky, N.M. and Broze, G.J., Jr. (1997) A murine model of factor XI deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis*, **8**, 134-144.
- Girolami, A., Ruzzon, E., Tezza, F., Scandellari, R., Vettore, S. and Girolami, B. (2006) Arterial and venous thrombosis in rare congenital bleeding disorders: a critical review. *Haemophilia*, **12**, 345-351.
- Gruber, A. and Hanson, S.R. (2003) Factor XI-dependence of surface- and tissue factor-initiated thrombus propagation in primates. *Blood*, **102**, 953-955.
- Hancock, J.F., Wieland, K., Pugh, R.E., Martinowitz, U., Schulman, S., Kakkar, V.V., Kernoff, P.B. and Cooper, D.N. (1991) A molecular genetic study of factor XI deficiency. *Blood*, **77**, 1942-1948.
- Hedner, U. and Erhardtsen, E. (2003) Potential role of recombinant factor VIIa as a hemostatic agent. *Clin Adv Hematol Oncol*, **1**, 112-119.
- Henderson, L.M., Figueroa, C.D., Müller-Esterl, W. and Bhoola, K.D. (1994) Assembly of contact-phase factors on the surface of the human neutrophil membrane. *Blood*, **84**, 474-482.
- Herwald, H., Dedio, J., Kellner, R., Loos, M. and Müller-Esterl, W. (1996a) Isolation and characterization of the kininogen-binding protein p33 from endothelial cells. Identity with the gC1q receptor. *J Biol Chem*, **271**, 13040-13047.
- Herwald, H., Jahnen-Dechent, W., Alla, S.A., Hock, J., Bouma, B.N. and Müller-Esterl, W. (1993) Mapping of the high molecular weight kininogen binding site of prekallikrein. Evidence for a discontinuous epitope formed by distinct segments of the prekallikrein heavy chain. *J Biol Chem*, **268**, 14527-14535.
- Herwald, H., Renne, T., Meijers, J.C., Chung, D.W., Page, J.D., Colman, R.W. and Müller-Esterl, W. (1996b) Mapping of the discontinuous kininogen binding site

- of prekallikrein. A distal binding segment is located in the heavy chain domain A4. *J Biol Chem*, **271**, 13061-13067.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, **9**, 28-32.
- Ho, D., Badellino, K., Baglia, F., Sun, M.-F., Zhao, M., Gailani, D. and Walsh, P. (2000) The role of high molecular weight kininogen and prothrombin as cofactors in the binding of factor XI A3 domain to the platelet surface. *J Biol Chem*, **275**, 25139-25145.
- Hock, J., Vogel, R., Linke, R.P. and Müller-Esterl, W. (1990) High molecular weight kininogen-binding site of prekallikrein probed by monoclonal antibodies. *J Biol Chem*, **265**, 12005-12011.
- Hojima, Y., Cochrane, C.G., Wiggins, R.C., Austen, K.F. and Stevens, R.L. (1984) In vitro activation of the contact (Hageman factor) system of plasma by heparin and chondroitin sulfate E. *Blood*, **63**, 1453-1459.
- Hsu, T. and Walsh, P. (1993) Platelet factor XI mRNA amplified from human platelets by reverse transcription polymerase chain reaction. *Blood*, **82**, 207A (abstract).
- Hsu, T.C., Shore, S.K., Seshsamma, T., Bagasra, O. and Walsh, P.N. (1998) Molecular cloning of platelet factor XI, an alternative splicing product of the plasma factor XI gene. *J Biol Chem*, **273**, 13787-13793.
- Hu, C.J., Baglia, F.A., Mills, D.C., Konkle, B.A. and Walsh, P.N. (1998) Tissue-specific expression of functional platelet factor XI is independent of plasma factor XI expression. *Blood*, **91**, 3800-3807.
- Imanaka, Y., Lal, K., Nishimura, T., Bolton-Maggs, P.H., Tuddenham, E.G. and McVey, J.H. (1995) Identification of two novel mutations in non-Jewish factor XI deficiency. *Br J Haematol*, **90**, 916-920.
- Jaspard, E., Wei, L. and Alhenc-Gelas, F. (1993) Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem*, **268**, 9496-9503.
- Jesty, J. and Beltrami, E. (2005) Positive feedbacks of coagulation: their role in threshold regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 2463-2469.

- Johannessen, M., Diness, V., Pingel, K., Petersen, L.C., Rao, D., Lioubin, P., O'Hara, P. and Mulvihill, E. (1990) Fibrin affinity and clearance of t-PA deletion and substitution analogues. *Thromb Haemost*, **63**, 54-59.
- Kaufmann, J., Haasemann, M., Modrow, S. and Müller-Esterl, W. (1993) Structural dissection of the multidomain kininogens. Fine mapping of the target epitopes of antibodies interfering with their functional properties. *J Biol Chem*, **268**, 9079-9091.
- Kleinschnitz, C., Stoll, G., Bendszus, M., Schuh, K., Pauer, H.U., Burfeind, P., Renne, C., Gailani, D., Nieswandt, B. and Renne, T. (2006) Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med*, **203**, 513-518.
- Knierim, M., Buchholz, J. and Pflug, W. (1988) Electrotransfer of proteins after isoelectric focusing (with or without urea) on fabric-reinforced, immobilized pH gradient gels. *Anal Biochem*, **172**, 139-144.
- Kurachi, K. and Davie, E.W. (1977) Activation of human factor XI (plasma thromboplastin antecedent) by factor XIIa (activated Hageman factor). *Biochemistry*, **16**, 5831-5839.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lipscomb, M.S. and Walsh, P.N. (1979) Human platelets and factor XI. Localization in platelet membranes of factor XI-like activity and its functional distinction from plasma factor XI. *J Clin Invest*, **63**, 1006-1014.
- Macfarlane, R.G. (1964) An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, **202**, 498-499.
- Mackman, N. (2004) Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 1015-1022.
- Mandle, R.J., Colman, R.W. and Kaplan, A.P. (1976) Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 4179-4183.
- Martincic, D., Kravtsov, V. and Gailani, D. (1999) Factor XI messenger RNA in human platelets. *Blood*, **94**, 3397-3404.

- McMullen, B.A. and Fujikawa, K. (1985) Amino acid sequence of the heavy chain of human alpha-factor XIIa (activated Hageman factor). *J Biol Chem*, **260**, 5328-5341.
- McMullen, B.A., Fujikawa, K. and Davie, E.W. (1991a) Location of the disulfide bonds in human coagulation factor XI: the presence of tandem apple domains. *Biochemistry*, **30**, 2056-2060.
- McMullen, B.A., Fujikawa, K. and Davie, E.W. (1991b) Location of the disulfide bonds in human plasma prekallikrein: the presence of four novel apple domains in the amino-terminal portion of the molecule. *Biochemistry*, **30**, 2050-2056.
- Meijers, J., Tekelenburg, W., Bouma, B., Bertina, R. and Rosendaal, F. (2000) High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N. Engl. J. Med.*, **342**, 696-701.
- Meijers, J.C., Davie, E.W. and Chung, D.W. (1992) Expression of human blood coagulation factor XI: characterization of the defect in factor XI type III deficiency. *Blood*, **79**, 1435-1440.
- Meijers, J.C., Mulvihill, E.R., Davie, E.W. and Chung, D.W. (1992b) Apple four in human blood coagulation factor XI mediates dimer formation. *Biochemistry*, **31**, 4680-4684.
- Minnema, M., Friederick, P., Levi, M., von dem Borne, P., Mosnier, L., Meijers, J., Briemond, B., Hack, C., Bouma, B. and ten Cate, H. (1998) Enhancement of rabbit jugular vein thrombolysis by neutralization of factor XI. In vivo evidence for a role of factor XI as an anti-fibrinolytic factor. *J Clin Invest*, **101**, 10-14.
- Mitchell, M., Mountford, R., Butler, R., Alhaq, A., Dai, L., Savidge, G. and Bolton-Maggs, P.H. (2006) Spectrum of factor XI (F11) mutations in the UK population--116 index cases and 140 mutations. *Hum Mutat*, **27**, 829.
- Morrissey, J.H. (2004) Tissue factor: a key molecule in hemostatic and nonhemostatic systems. *Int J Hematol*, **79**, 103-108.
- Motta, G., Rojkaer, R., Hasan, A.A., Cines, D.B. and Schmaier, A.H. (1998) High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation. *Blood*, **91**, 516-528.
- Müller-Esterl, W., Johnson, D.A., Salvesen, G. and Barrett, A.J. (1988) Human kininogens. *Methods Enzymol*, **163**, 240-256.

- Murray, C.J. and Lopez, A.D. (1997) Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, **349**, 1269-1276.
- O'Connell N, M. (2004) Factor XI deficiency. *Semin Hematol*, **41**, 76-81.
- O'Connell, N.M. (2003) Factor XI deficiency--from molecular genetics to clinical management. *Blood Coagul Fibrinolysis*, **14**, 59-64.
- Ogata, M., Suzuki, K. and Satoh, Y. (1989) Characterization of human residual catalase of an acatalasemic patient by isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by electrophoretic blotting and immunodetection. *Electrophoresis*, **10**, 194-198.
- Osterud, B. and Rapaport, S.I. (1977) Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5260-5264.
- Papagrigoriou, E., McEwan, P.A., Walsh, P.N. and Emsley, J. (2006) Crystal structure of the factor XI zymogen reveals a pathway for transactivation. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 557-558.
- Pugh, R.E., McVey, J.H., Tuddenham, E.G. and Hancock, J.F. (1995) Six point mutations that cause factor XI deficiency. *Blood*, **85**, 1509-1516.
- Ratnoff, O.D. and Saito, H. (1979) Interactions among Hageman factor, plasma prekallikrein, high molecular weight kininogen, and plasma thromboplastin antecedent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 958-961.
- Renne, T., Dedio, J., David, G. and Müller-Esterl, W. (2000) High molecular weight kininogen utilizes heparan sulfate proteoglycans for accumulation on endothelial cells. *J Biol Chem*, **275**, 33688-33696.
- Renne, T., Dedio, J., Meijers, J.C., Chung, D. and Müller-Esterl, W. (1999) Mapping of the discontinuous H-kininogen binding site of plasma prekallikrein. Evidence for a critical role of apple domain-2. *J Biol Chem*, **274**, 25777-25784.
- Renne, T. and Müller-Esterl, W. (2001) Cell surface-associated chondroitin sulfate proteoglycans bind contact phase factor H-kininogen. *FEBS Lett*, **500**, 36-40.
- Renne, T., Pozgajova, M., Gruner, S., Schuh, K., Pauer, H.U., Burfeind, P., Gailani, D. and Nieswandt, B. (2005a) Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med*, **202**, 271-281. Epub 2005 Jul 2011.
- Renne, T., Schuh, K. and Müller-Esterl, W. (2005b) Local bradykinin formation is controlled by glycosaminoglycans. *J Immunol*, **175**, 3377-3385.

- Rosen, E.D., Gailani, D. and Castellino, F.J. (2002) FXI is essential for thrombus formation following FeCl₃-induced injury of the carotid artery in the mouse. *Thromb Haemost*, **87**, 774-776.
- Rosenberg, R.D. and Aird, W.C. (1999) Vascular-bed--specific hemostasis and hypercoagulable states. *N Engl J Med*, **340**, 1555-1564.
- Salomon, O., Steinberg, D.M., Dardik, R., Rosenberg, N., Zivelin, A., Tamarin, I., Ravid, B., Berliner, S. and Seligsohn, U. (2003) Inherited factor XI deficiency confers no protection against acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost*, **1**, 658-661.
- Schved, J.F., Gris, J.C., Neveu, S., Mares, P. and Sarlat, C. (1988) Variations of factor XII level during pregnancy in a woman with Hageman factor deficiency. *Thromb Haemost*, **60**, 526-527.
- Seligsohn, U. (1993a) Factor XI deficiency. *Thromb. Haemost.*, **70**, 68-70.
- Sinha, D., Marcinkiewicz, M., Gailani, D. and Walsh, P.N. (2002) Molecular cloning and biochemical characterization of rabbit factor XI. *Biochem J*, **367**, 49-56.
- Spronk, H.M., Govers-Riemslog, J.W. and ten Cate, H. (2003) The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays*, **25**, 1220-1228.
- Subba Rao, P.V., McCartney-Francis, N.L. and Metcalfe, D.D. (1983) An avidin--biotin microELISA for rapid measurement of total and allergen-specific human IgE. *J Immunol Methods*, **57**, 71-85.
- Sun, M.F., Zhao, M. and Gailani, D. (1999) Identification of amino acids in the factor XI apple 3 domain required for activation of factor IX. *J Biol Chem*, **274**, 36373-36378.
- Tait, J.F. and Fujikawa, K. (1986) Identification of the binding site for plasma prekallikrein in human high molecular weight kininogen. A region from residues 185 to 224 of the kininogen light chain retains full binding activity. *J Biol Chem*, **261**, 15396-15401.
- Tait, J.F. and Fujikawa, K. (1987) Primary structure requirements for the binding of human high molecular weight kininogen to plasma prekallikrein and factor XI. *J Biol Chem*, **262**, 11651-11656.
- Thompson, R.E., Mandle, R., Jr. and Kaplan, A.P. (1979) Studies of binding of prekallikrein and Factor XI to high molecular weight kininogen and its light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4862-4866.

- Tuszynski, G.P., Bevacqua, S.J., Schmaier, A.H., Colman, R.W. and Walsh, P.N. (1982) Factor XI antigen and activity in human platelets. *Blood*, **59**, 1148-1156.
- Vogel, R., Kaufmann, J., Chung, D.W., Kellermann, J. and Müller-Esterl, W. (1990) Mapping of the prekallikrein-binding site of human H-kininogen by ligand screening of lambda gt11 expression libraries. Mimicking of the predicted binding site by anti-idiotypic antibodies. *J Biol Chem*, **265**, 12494-12502.
- Walsh, P.N. (2001) Roles of platelets and factor XI in the initiation of blood coagulation by thrombin. *Thromb Haemost*, **86**, 75-82.
- Walsh, P.N. (2003) Roles of factor XI, platelets and tissue factor-initiated blood coagulation. *J Thromb Haemost*, **1**, 2081-2086.
- Walsh, P.N. (2004) Platelet coagulation-protein interactions. *Semin Thromb Hemost*, **30**, 461-471.
- Walsh, P.N. and Griffin, J.H. (1981) Contributions of human platelets to the proteolytic activation of blood coagulation factors XII and XI. *Blood*, **57**, 106-118.
- Wang, X., Smith, P.L., Hsu, M.Y., Gailani, D., Schumacher, W.A., Ogletree, M.L. and Seiffert, D.A. (2006) Effects of factor XI deficiency on ferric chloride-induced vena cava thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*, **4**, 1982-1988.
- Wuillemin, W., Minnema, M., Meijers, J., Roem, D., Eerenberg, A., Nijjens, J., ten Cate, H. and Hack, C. (1995) Inactivation of factor XIa in human plasma assessed by measuring factor XIa-protease inhibitor complexes: Major role for C1-Inhibitor. *Blood*, **85**, 1517-1526.
- Xiao, Y.F., Wright, S.N., Wang, G.K., Morgan, J.P. and Leaf, A. (1998) Fatty acids suppress voltage-gated Na⁺ currents in HEK293t cells transfected with the alpha-subunit of the human cardiac Na⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2680-2685.

F 1 ZUSAMMENFASSUNG

Im Blutplasma und auf Zelloberflächen bildet H-Kininogen entweder mit dem Blutgerinnungsfaktor XI oder Plasmakallikrein Komplexe. Die beiden Proteasenvorstufen binden über ihre homologen schweren Ketten, die jeweils aus vier Apple Domänen bestehen (F1-F4 bei Faktor XI und P1-P4 bei Kallikrein), an HK. Die Kallikrein/Kininogen Interaktion wird über Domäne P2 vermittelt. Im Gegensatz dazu soll FXI über F1 an Kininogen binden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Lokalisation der Kininogen-Bindungsstelle des Faktors XI und ein funktioneller Vergleich der Kallikrein/Kininogen und Faktor XI/Kininogen Komplexe. Es zeigt sich, dass die relative Bindungsaffinität von HK an rekombinante Faktor XI-Einzeldomänen in der Reihenfolge F2 >> F4 > F1 >> F3 abfällt. Die Bedeutung der F2 Domäne für die Kininogen Bindung wird durch den monoklonale Antikörper α P2 unterstrichen, der die Faktor XI/Kininogen und die Kallikrein/Kininogen Bindung mit einem apparenten IC_{50} von 8 nM blockiert und dessen Epitop auf die F2 Domäne kartiert wird. Eine Thrombozyten-spezifische Faktor XI-Splicevariante, der die N-terminale Hälfte der F2 Domäne fehlt, bindet 5-fach schlechter als Faktor XI an Kininogen. Nach Aktivierung wird Kallikrein und ein chimäres Faktor XI-Protein, bei dem F2 durch P2 ersetzt wurde, in P2 gespalten, was zur Verlust der Bindungsaffinität zu Kininogen führt. Im Gegensatz bleibt die Bindung von aktiviertem Faktor XI oder einem chimärem Kallikrein-Protein, bei dem die P2 Domäne durch F2 ersetzt wurde, nach Aktivierung an Kininogen gebunden.

Diese Daten zeigen, dass Faktor XI und Kallikrein über ihre Domänen 2 an Kininogen binden. Trotz homologer Bindungsmotive unterscheiden sich Faktor XI/Kininogen und Kallikrein/Kininogen Komplexe in ihrer Stabilität nach Aktivierung. Die Daten tragen dazu bei, die Regulation der Kallikrein-vermittelten Bradykininbildung bei Entzündungsprozessen und die Faktor XI-getriebene Fibrinbildung besser zu verstehen.

F 2 SUMMARY

Factor XI (FXI), the zymogen of the blood coagulation protease FXIa, and the structurally homologous protein plasma prekallikrein circulate in plasma in non-covalent complexes with H-kininogen (HK). HK binds to the heavy chains of FXI and of prekallikrein. Each chain contains four apple domains (F1 - F4 for FXI; P1 - P4 for prekallikrein). Previous studies had indicated that the HK binding site on FXI is located in F1, while the major HK binding site on prekallikrein is on P2. To determine the contribution of each FXI apple domain to FXI/HK complex formation, we examined binding of recombinant single apple domain-tPA fusion proteins to HK. The order of affinity from highest to lowest is F2 >> F4 > F1 >> F3. Monoclonal antibodies against F2 are superior to F4 or F1 antibodies as inhibitors of HK binding to FXI. Antibody α P2, raised against prekallikrein, cross-reacts with FXI F2 and inhibits FXI/HK binding with an IC_{50} of 8 nM. HK binding to a platelet specific FXI variant lacking the N-terminal half of F2 is reduced > 5-fold compared to full-length FXI. A chimeric FXI molecule in which F2 is replaced by P2, is cleaved within P2 during activation by factor XIIa, resulting in greatly reduced HK binding capacity. In contrast, wild-type FXI is not cleaved within F2, and its binding capacity for HK is unaffected by factor XIIa. Our data show that HK binding to FXI involves multiple apple domains, with F2 being most important. The findings demonstrate a similarity in mechanism for FXI and prekallikrein binding to HK. Although the zymogens complex HK via homologous binding motives the stability of FXI/HK and kallikrein/HK complexes is largely different following activation. The data may help to understand kallikrein-driven bradykinin formation in inflammation and FXI-mediated fibrin generation in thrombosis.

G ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Absorption
AS	Aminosäure
B1R	Bradykinin-1 Rezeptor
B2R	Bradykinin-2 Rezeptor
BHK	„Baby-Hamster Kidney“
biot	biotinyliertes
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
cDNA	„Copy“ DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
EC	„Enzyme-Catalog Number“
ELISA	„Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“
FXI	Gerinnungsfaktor XI
FXII	Gerinnungsfaktor XII
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAG	Glycosaminoglycan-Seitenketten
HEK	„Human Embryonic Kidney“
HK	H-Kininogen
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“
HS	Heparansulfat
kDa	Kilodalton
KD	Dissoziationskonstante
K_A	Assoziationskonstante
KKS	Kallikrein-Kininsystem
m/m	Masse/Masse
m/v	Masse/Volumen
MBP	Maltose-bindendes Protein
MG	Molekulargewicht
Mr	relative Molekulare Masse
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pH-Wert
PK	Plasmakallikrein
POD	Peroxidase
PPK	Plasmaprokallikrein
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	„Sodium Dodecyl Sulfate“
tPA	Gewebsplasminogenaktivator
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

H DANKSAGUNG

Ich danke allen, die an den Arbeiten zum Blutgerinnungsfaktor XI und dem Kallikrein-Kinin-system wissenschaftlich beteiligt waren:

Drs. Dominic Chung (Seattle, USA), Robert Colman (Philadelphia, USA), Jürgen Dedio (Frankfurt), Jonas Emsley (Nottigham, UK), David Gailani (Nashville, USA), Heiko Herwald (Lund, Schweden), Willi Jahnen Dechent (Aachen), Joost Meijers (Amsterdam, Holland), Werner Müller-Esterl (Frankfurt), Uri Seligsohn (Tel Hashomer, Israel) und Peter Walsh (Philadelphia, USA).

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Ulrich Walter und Professor Dr. Michaela Kuhn für die Vertretung der Arbeit im Fachbereich Medizin der Universität Würzburg.

Dem Biomedizinischen Austausch Programm (BMEP) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für finanzielle Unterstützung.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Renné, T., Gailani, D., Meijers, J.C., and Müller-Esterl, W. (2002) Characterization of the H-kininogen binding site of factor XI. A comparison of factor XI and plasma kallikrein. **J. Biol. Chem.** 277, 4892-4899

Renné T., Sugiyama A., Gailani D., Jahnen-Dechent W., Walter U., Müller-Esterl W. (2002) Fine mapping of the H-kininogen binding site in plasma prekallikrein apple domain 2. **Int. Immunopharmacol.** 2, 1867-73

I LEBENS LAUF

Name: Thomas Renné, Priv.- Doz. Dr. rer.nat.
Geburtsdatum, -ort: 1.1.1969, Kusel

1975-1979 Grundschule Staudernheim
1979-1988 Gymnasium Sobernheim, Abitur
1988-1989 Grundwehrdienst, JaBoG 35 Pferdsfeld
10/1989-11/2001 Medizinstudium, Universität Mainz, Approbation
10/1990-07/1994 Chemiestudium, Universität Mainz, Diplom
08/1992-03/1993 Kyoto University, Japan, Bioorganic Chemistry (Prof. Ogoshi)
08/1994-08/1995 Diplomarbeit Chemie, Universität Mainz (Prof. Ringsdorf)
11/1995 Diplom-Chemiker
09/1995-02/1999 Promotion in Chemie „Molekulare Mechanismen Kinin-
generierender Systeme“ am Institut für Physiologische Chemie
und Pathobiochemie (Prof. Müller-Esterl)

08/1996 1. Staatsexamen Humanmedizin
03/1999-2/2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Biochemie II,
Universität Frankfurt (Prof. Müller-Esterl)

08/2000 2. Staatsexamen Humanmedizin
02/2001-10/2001 Vanderbilt University, USA, Hematology Division (Prof.
Gailani)

11/2001 3. Staatsexamen Humanmedizin
01/2002-06/2003 Arzt im Praktikum, Universität Würzburg
07/2003 Approbation als Arzt
seit 12/2002 Leiter der DFG-Nachwuchsgruppe „Effektoren der
endothelialen Permeabilität“ im SFB 355 und SFB 688,
Universität Würzburg

07/2003–06/2007 Weiterbildung zum Facharzt für Labormedizin am Institut für
Klinische Biochemie und Pathobiochemie - Zentrallabor (Prof.
Walter) und Institut für Hygiene und Mikrobiologie der
Universität Würzburg (Prof. Frosch)

12/2006 Habilitation für das Fachgebiet „Klinische Biochemie“
02/2007 Ernennung zum Privatdozenten, Universität Würzburg

Würzburg, 10.7.2007

