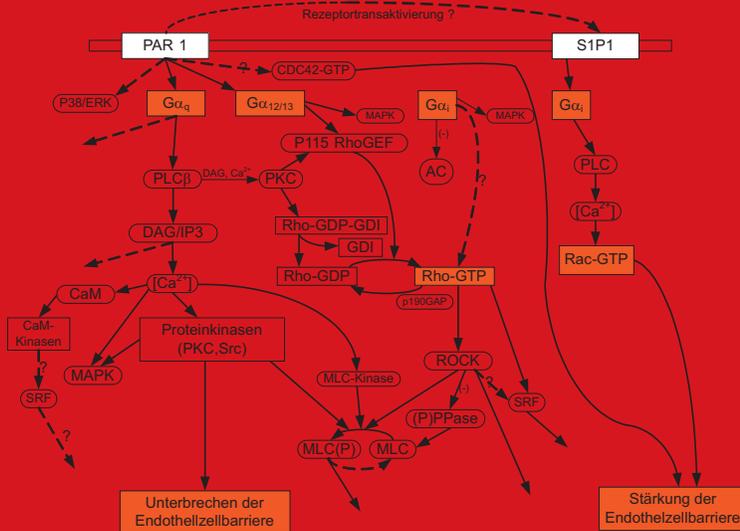


BEITRAG VON Rho SOWIE G12/13, Gq/11 UND Gi PROTEINEN ZUR SIGNALTRANSDUKTION ÜBER PROTEINASE AKTIVIERBARE REZEPTOREN NACH STIMULATION MIT DEN SERINPROTEINASEN AKTIVIERTES PROTEIN C, THROMBIN UND FAKTOR Xa

KLAUDIA BLÖDORN



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der
Justus-Liebig-Universität Giessen
Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

und

aus der I. Medizinischen Klinik der Medizinischen Fakultät
Mannheim der Universität Heidelberg
Betreuerin: PD Dr. Martina Brückmann

**Beitrag von Rho sowie G12/13, Gq/11 und
Gi Proteinen zur Signaltransduktion über
Proteinase aktivierbare Rezeptoren nach
Stimulation mit den Serinproteinasen aktiviertes
Protein C, Thrombin und Faktor Xa**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Kludia Blödorn

Tierärztin aus Haren/Ems

Giessen 2008

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Giessen**

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter / in:

Prof. Dr. J. Roth

PD Dr. M. Brückmann

Tag der Disputation: 28.04.2008

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	10
1.1	Signalverarbeitung der Zelle.....	10
1.1.1	Serinproteinasen.....	11
1.1.1.1	Aktiviertes Protein C	13
1.1.1.2	Thrombin	16
1.1.1.3	Faktor Xa	18
1.1.2	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)	19
1.1.2.1	Aktivierung von GPCRs	20
1.1.2.2	Spezifität der GPCRs	20
1.1.2.3	Proteinase aktivierbare Rezeptoren (PARs).....	20
1.1.3	Guaninnukleotid bindende Proteine (G-Proteine)	22
1.1.3.1	Heterotrimere G-Proteine.....	22
1.1.3.2	Regulation der Aktivität heterotrimerer G-Proteine	22
1.1.3.3	Regulators of G Protein Signaling (RGS).....	23
1.1.3.4	Monomere GTP bindende Proteine (G-Proteine)	24
1.1.3.5	Rho-GTPasen.....	24
1.1.3.6	Funktionen von RhoA und Rac1	25
1.1.4	Intrazelluläre Effekte nach Stimulation der PARs 1 und 2.....	26
1.2	Zielsetzung der Arbeit.....	33
2	Materialien	34
2.1	Reagenzien.....	34
2.2	Plasmide.....	36
2.3	Genspezifische Primer	37
2.4	Bakterien.....	37
2.5	Zellen	37
2.6	Reagenzien für die Zellkultur	38
2.7	Reagenzien für die Bakterienkultur	39
2.8	Puffer	40
2.9	Gele.....	40

2.10	Verbrauchsmaterialien	40
2.11	Geräte	40
2.12	Kommerziell erhältliche Kits	42
2.13	Spezielle Software	42
3	Methoden.....	43
3.1	Molekularbiologische Methoden	43
3.1.1	Gewinnung der Plasmide	43
3.1.2	RNA Aufbereitung	49
3.1.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	51
3.2	Proteinbiochemische Methoden.....	55
3.2.1	Proteingewinnung für die SDS-Page	55
3.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
3.2.3	Western-Blot.....	56
3.2.4	Densitometrie.....	57
3.3	Zellbiologische Methoden	57
3.3.1	Zellkultur	57
3.3.2	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in HEK293-Zellen.....	60
3.3.3	Transfektion von HEK293-Zellen für die PCR	61
3.3.4	Luciferase Assay.....	62
3.3.5	Herstellung von Sepharose-gekoppelten Pulldown GST-Fusions-Proteinen	65
3.3.6	Pulldown Assay	66
3.3.7	G-Lisa	67
3.4	Statistische Auswertung.....	69
4	Ergebnisse	70
4.1	Etablierung der Genkonstrukte pCMV6-XL5, pcDNA 3.1 und pEF-BOS	70
4.1.1	Zellmorphologie von HEK293-Zellen	70
4.1.2	Ergebnisse aus der Plasmidgewinnung.....	71
4.1.3	Ergebnisse aus der Polymerase Kettenreaktion	74
4.2	Etablierung des Luciferase Assays	77
4.2.1	Transfektion eines den Histamin-Rezeptor codierenden Genkonstrukts.....	77
4.2.2	Nachweis der Expression von PAR 1 und 2 durch selektive PAR Agonisten.....	78

4.2.3	Überprüfung der Funktion von rhAPC	81
4.2.4	Wirkung von rhAPC an PAR 1 und 2 mit und ohne EPCR	83
4.2.5	Wirkung von Thrombin an PAR 1 und 2 mit und ohne EPCR.....	86
4.2.6	Zeit- und Dosisabhängigkeiten	87
4.2.6.1	rhAPC an PAR 2 und EPCR.....	87
4.2.6.2	rhAPC an PAR 1 und EPCR.....	91
4.2.6.3	Thrombin an PAR 2 und EPCR.....	94
4.2.6.4	Thrombin an PAR 1 und EPCR.....	95
4.2.6.5	SLIGKV-OH an PAR 2 und EPCR	98
4.2.6.6	TFLLRNPNDK-NH2 an PAR 1 und EPCR.....	100
4.2.6.7	Faktor Xa an PAR 1 und PAR 2	103
4.3	Additive Effekte der Agonisten	105
4.3.1	Kostimulation von rhAPC mit Thrombin	105
4.3.2	Kostimulation von rhAPC mit Faktor Xa	108
4.3.3	Zeitabhängige Vor- bzw. Kostimulationen mit rhAPC und Faktor Xa	112
4.4	Erklärung für die additiven Effekte der Agonisten.....	115
4.4.1	Hemmung von G α 12/13	117
4.4.2	Hemmung von G α q/11	123
4.4.3	Hemmung von G α 12/13 in Kombination mit G α q/11	128
4.4.4	Hemmung von G α i/o	132
4.4.5	Nachweis von RhoA	133
4.4.6	Hemmung von Rho / ROCK.....	136
5	Diskussion.....	140
5.1	Etablierung.....	140
5.1.1	Luciferase Assay	140
5.1.2	Luciferase Assay – Testlauf.....	141
5.1.3	Selektive PAR Agonisten aktivieren die PARs 1 und 2	141
5.1.4	Nur EPCR gebundenes rhAPC aktiviert effizient die PARs 1 und 2	142
5.1.5	Thrombin aktiviert den PAR 1 unabhängig vom EPC Rezeptor	143
5.1.6	Zeit-und Dosisabhängigkeiten	144
5.2	Additive Effekte der Agonisten	146
5.2.1	RhAPC und Thrombin wirken additiv	146

5.2.2	RhAPC und Faktor Xa wirken additiv.....	150
5.3	Signaltransduktion	151
6	Zusammenfassung / Summary	156
6.1	Zusammenfassung.....	156
6.2	Summary	157
7	Publikationen	159
7.1	Eigene Publikation	159
7.2	Allgemeines Literaturverzeichnis	160
8	Anhang.....	171
8.1	Eidesstattliche Erklärung	171
8.2	Danksagung	172

Abkürzungsverzeichnis

a.d.	Aqua destillata
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
DEPC-H ₂ O	Diethyl Pyrocarbonat behandeltes RNase- und DNase-freies Wasser
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds cDNA	doppelsträngige komplementäre Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EDTA	Ethylendiamintetraesssäure
EPCR	Endothelialer Protein C Rezeptor
ERK 1, 2	Extracellular Regulated Kinases 1, 2
FV, VII, VIII, IX, X	Faktor V, VII, VIII, IX, X
Fa.	Firma
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase Accelerating Protein
GEF	Guaninnukleotid Exchange Factor
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
hbFGF	Human Basic Fibroblast Growth Factor
HEK cells	Human Embryonic Kidney Cells
hEGF	Human Endothelial Growth Factor
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IQR	Interquartile Range
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt

LPS	Lipopolysaccharid
LB-Medium	Luria Broth Base Medium (Luria Miller Medium)
M	mol/l, Molar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PAR	Proteinase aktivierbarer Rezeptor
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Protein C
PS	Protein S
PTX	Pertussis Toxin
RGS	Regulators of G-Protein signaling
rhAPC	rekombinantes humanes aktiviertes Protein C
RLU	Relative Light Units
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute
S1P1	Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor
SD	Standardabweichung
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Factor
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TER	Transendothelial Electrical Resistance
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TM	Thrombomodulin
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
U	Unit

ÜN-Kultur

U/ml

U/min

Übernachtskultur

Units pro Milliliter

Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

1.1 Signalverarbeitung der Zelle

Der Informationsaustausch zwischen Zellen bzw. vielzelligen Organismen und ihrer Umwelt geschieht in Form von Konzentrationsänderungen extrazellulärer, chemischer Signalmoleküle oder durch physikalische Signale, die an die Zellen weitergegeben werden.

Solche Botenstoffe können Ionen und größere Moleküle sein. Diese können nicht ungehindert in das Zellinnere diffundieren, da die Zellen von einer semipermeablen Membran umgeben sind. Je nach Molekülart passieren sie stattdessen die Zellmembran entweder durch die für jeden Zelltyp charakteristischen aktiven bzw. passiven Transportsysteme und wirken direkt im Inneren der Zelle, oder sie geben durch Andocken an spezielle membrangebundene Rezeptoren ihr Signal ins Innere der Zelle weiter. Durch die Interaktion eines solchen Liganden mit seinem membrangebundenen Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins und damit zum Ablaufen einer Reaktionskaskade im Inneren der Zelle. Im Gegensatz zu diesen Membranrezeptoren sind die Rezeptoren der lipophilen Signalstoffe (z.B. der Steroidhormone) intrazellulär lokalisiert.

Bezüglich der Struktur des membrangebundenen Rezeptorproteins sowie der ausgelösten Signalübertragung unterscheidet man Rezeptorsysteme, die aus einer einzigen strukturellen Einheit bestehen (wie z.B. der intrinsische Insulin-Rezeptor oder die rezeptorassoziierten Ligandengesteuerten Ionenkanäle, wie z.B. der nikotinsche Acetylcholin Rezeptor), und Rezeptorsysteme, die funktionell aus drei separaten Komponenten bestehen (z.B. die Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2). Dieser zuletzt genannte Rezeptortyp stellt die größte Gruppe der Membranrezeptoren dar. Sie besitzen eine heptahelikale Struktur und koppeln über ein heterotrimeres Guaninnukleotid bindendes Protein (G-Protein) an einen Effektor. Bislang sind mehr als 800 dieser G-Protein gekoppelten Rezeptoren bekannt und charakterisiert, zu denen beispielsweise Rezeptoren für Neurotransmitter (muskarinische Acetylcholinrezeptoren, adrenerge Rezeptoren), biogene Amine, Peptid- und Glykoprotein hormone aber auch Rezeptoren für Licht und Geruchsstoffe gehören. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnten für die meisten Liganden verschiedene Rezeptorsubtypen identifiziert werden, welche pharmakologisch unterschieden werden können [1-5]. Die Signaltransduktion über G-Protein gekoppelte Rezeptoren ist für viele physiologische und pharmakologische Prozesse von entscheidender Bedeutung.

1.1.1 Serinproteinasen

Serinproteinasen bilden eine Familie aus proteolytischen Enzymen, deren charakteristisches Merkmal eine katalytische Triade aus Serin, Histidin und Asparaginsäure darstellt. Diese Aminosäurereste haben die Fähigkeit, Peptidbindungen zu hydrolysieren [6, 7]. Aktiviert werden die inaktiven Vorstufen der Serinproteinasen (Zymogene) durch einen Prozess der limitierten Proteolyse [5, 7-9].

Serinproteinasen kommen ubiquitär in Prokaryonten und Eukaryonten vor und wirken mit bei Homöostase, Fibrinolyse, Blutgerinnung und Proteinverdau. Entgegen der traditionellen Ansicht, dass ihre eigentliche Funktion der Abbau extrazellulärer Proteine ist, weiß man heute, dass bestimmte Serinproteinasen zusätzlich die Funktion von Signalmolekülen innehaben und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) durch Proteolyse aktivieren [10]. Zur Familie der GPCRs gehören die Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 bis 4 [11-14].

Der Mechanismus der Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren durch Proteolyse verläuft für alle Serinproteinasen gleich [11]. Die Proteinase schneiden an einer spezifischen Stelle innerhalb des extrazellulär gelegenen Aminoterminus des Rezeptors. Dadurch wird ein neuer Aminoterminus freigelegt, welcher als spezieller Ligand an die konservierte Region der zweiten extrazellulären Schleife des geschnittenen Rezeptors bindet und zur Aktivierung des Rezeptors führt (Abb. 1-1).

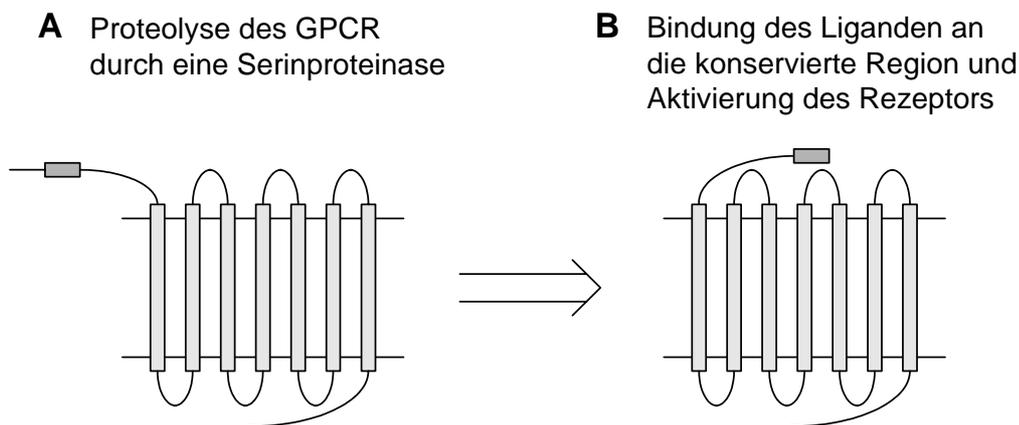


Abb. 1-1: Mechanismus der Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCRs)
[modifiziert nach 11].

Die im Rahmen dieser Arbeit zu beschreibenden Serinproteinasen Thrombin und Faktor Xa sind Bestandteile der Blutgerinnungskaskade. Ihre dortigen Funktionen sowie die Rolle, die aktiviertes Protein C (APC) im Zusammenhang mit der Blutgerinnung spielt, sind in Abbildung 1-2 dargestellt.

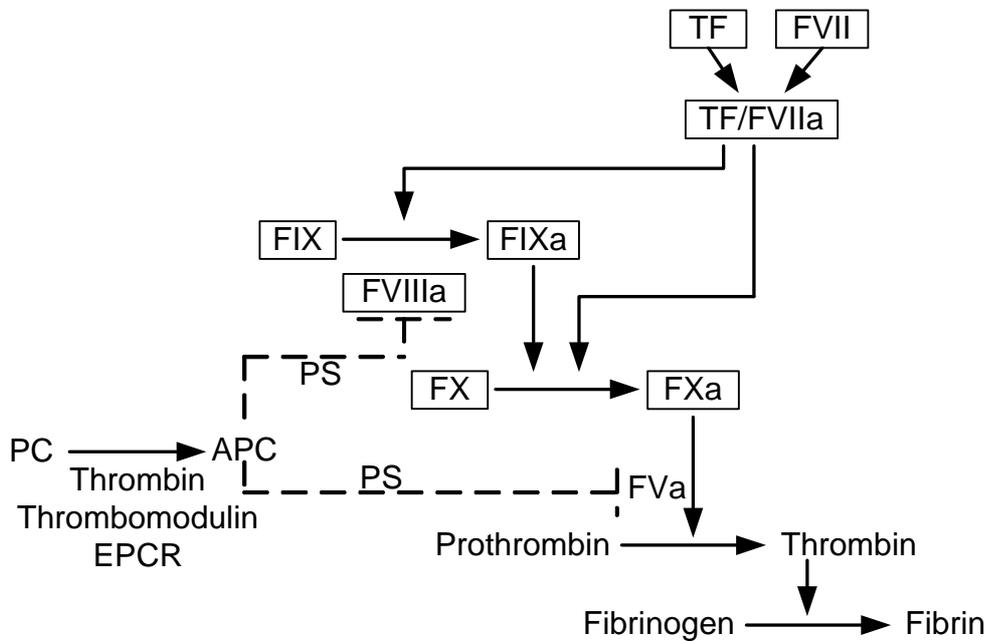


Abb. 1-2: Vereinfachte schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade im Zusammenhang mit der Wirkung von aktiviertem Protein C (APC).

Das klassische Modell der Blutgerinnung setzt sich aus einer Kaskade aktivierender Reaktionen zusammen. Jeder Schritt beinhaltet die Aktivierung eines Zymogens durch Proteolyse. Kommt es zu einem vaskulären Defekt, interagiert der membrangebundene Rezeptor TF (Tissue Factor) mit dem im Blut in niedrigen Konzentrationen zirkulierenden Faktor VII (FVII). Der gebildete Komplex aus TF und FVIIa führt entweder direkt (extrinsischer Weg) zur Aktivierung von Faktor X (FX), oder es wird erst der Faktor IX (FIX) aktiviert und dieser aktiviert daraufhin Faktor X (intrinsischer Weg). Mit Hilfe des Kofaktors Va (FVa) verwandelt Faktor Xa Prothrombin in Thrombin und es resultiert eine Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin (Thrombusbildung). TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) kann die Blutgerinnungskaskade hemmen. Die „Feedback“ Regulation der Kaskade wird vermittelt durch die Faktoren VIIIa, IXa und XIa. Protein C (PC) wird durch einen Komplex bestehend aus Thrombomodulin (TM), Thrombin und dem EPCR Rezeptor zu APC aktiviert. Aktiviertes Protein C inaktiviert mit Hilfe des Kofaktors Protein S durch Proteolyse die Faktoren Va (Kofaktor für die Faktor Xa vermittelte Thrombin Bildung) und VIIIa (Kofaktor für die TF/FVIIa abhängige Faktor IXa Bildung) und hemmt dadurch die Thrombin Bildung [modifiziert nach 15].

1.1.1.1 Aktiviertes Protein C

Aktiviertes Protein C (APC) ist eine Serinproteinase, die durch die Aktivierung des Vitamin K abhängigen Protein C (PC) entsteht [16]. An Thrombomodulin (ein Oberflächenprotein des Endothels) gebundenes Thrombin aktiviert PC zu APC [17].

Der endotheliale Protein C-Rezeptor (EPCR), der nach Meinung einiger Autoren überwiegend von Endothelzellen der großen Blutgefäße exprimiert wird (auch im sinusoidalen Endothel der Leber und der Milz), aber auch auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten zu finden ist, gehört zu dem Typ 1 der Transmembranären Proteine [18-21]. Andere Autoren vertreten die Meinung, dass der EPC Rezeptor im mikrovasculären Endothel anzutreffen ist [22]. Der EPC Rezeptor ist beteiligt an der Aktivierung von PC zu APC. PC bindet an den EPCR und wird so dem Thrombin-Thrombomodulin Komplex präsentiert [23].

Ein wichtiger Rezeptor für die Signaltransduktion von APC ist der G-Protein gekoppelte Proteinase aktivierbare Rezeptor 1 (PAR 1). APC induziert die Expression protektiver Gene in Endothelzellen mittels PAR 1 in Abhängigkeit von der Bindung an EPCR [24, 25]. Dabei ist bisher nicht bekannt, wie APC antiinflammatorische Effekte über den Proteinase aktivierbaren Rezeptor 1 steuert, obwohl Thrombin über denselben Rezeptor proinflammatorische Wirkungen hervorruft [26]. In heterologen Expressionssystemen ist auch die Aktivierung des Proteinase aktivierbaren Rezeptors 2 (PAR 2) durch APC beobachtet worden. In endothelialen Zellen dagegen verläuft die Signaltransduktion des APC-EPCR Komplexes überwiegend über den PAR 1 Rezeptor [21, 24, 27]. Seit kurzem wird eine EPCR-PAR 1-Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor abhängige (S1P1) Kostimulation zur Förderung der Endothelzell-Integrität diskutiert. Dabei wird vermutet, dass APC über die Aktivierung von EPCR und PAR 1 die Sphingosin-Kinase-1 (SK1)-Aktivität steigert und dadurch vermehrt Sphingosin-1-Phosphat (S1P) gebildet wird. Dieses ruft durch eine Bindung an den Spingosin-1-Phosphat-Rezeptor protektive Effekte am Endothel hervor [28, 29].

APC wirkt zum Teil zusammen mit Protein S antikoagulativ, profibrinolytisch, antiinflammatorisch, antiapoptotisch und zytoprotektiv (vergleiche auch Tabelle. 1-1) [25, 28, 30, 31]. Eingesetzt wird rekombinantes humanes APC (rhAPC, *Xigris*®, Eli Lilly, Indianapolis) zur Therapie der schweren Sepsis (*PROWESS-Studie*, Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis) [32]. Die normale Plasmakonzentration von PC beim Menschen beträgt 4 µg/ml, die Konzentration von APC beim gesunden Menschen 2,3 ng/ml [33-41]. Die therapeutische Dosis von rhAPC in klinischen Studien am Menschen beträgt 24 µg/kg/h [32]. Im Tierversuch müssen aufgrund der Speziesunterschiede höhere Dosen eingesetzt werden (ca. 100 µg/kg bis 2 mg/kg) [42, 43].

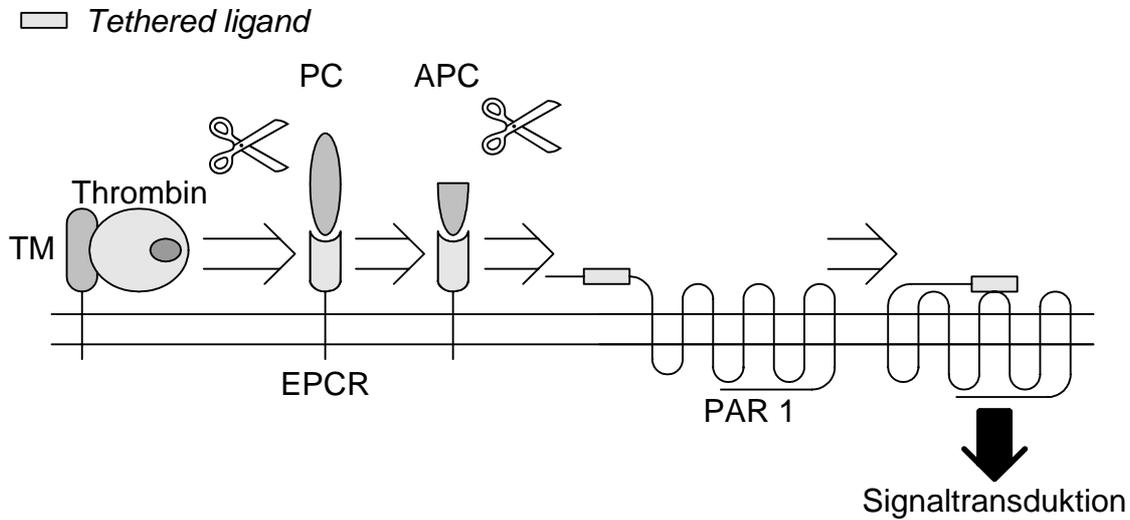


Abb. 1-3: Aktivierung des Protein C sowie des Proteinase aktivierbaren Rezeptors 1 durch aktiviertes Protein C.

Thrombomodulin (TM) reichert niedrige Konzentrationen von Thrombin auf der Oberfläche von Endothelzellen an. Endothelialer Protein C Rezeptor (EPCR) bindet Protein C (PC) und Thrombin wandelt PC proteolytisch in aktiviertes Protein C (APC) um. An EPCR gebundenes APC aktiviert den Proteinase aktivierbaren Rezeptor 1 (PAR 1) [modifiziert nach 11].

Tabelle 1-1: APC-Wirkungen im Überblick.

Wirkung	Mechanismus	Literatur
Antikoagulativ	Proteolytische Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa (vergleiche Abb. 1-2)	15, 17
Profibrinolytisch	Inaktivierung von PAI-1; Hemmung der Bildung von Thrombin (siehe antikoagulativer Effekt); Hemmung der Bildung von TAFI (Plasma-Procarboxypeptidase B); t-PA (tissue-Plasminogen Aktivator)-induzierte Lyse des Fibrinnetzes	31, 38, 44-46
Antiinflammatorisch	Indirekt: Durch Hemmung der Thrombinbildung Minderung der durch Thrombin induzierten proinflammatorischen Aktivitäten, z.B. Chemotaxis von Monozyten und Neutrophilen Direkte: Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor- α , Hemmung der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF- κ B) nach Endotoxin-Stimulation	47-54
Antiapoptotisch	Suppression der proapoptotischen Gene Calreticulin und TRMP-2, Förderung der Expression antiapoptotisch wirkender Gene (Bcl-2, Inhibitor of Apoptosis)	54
Zytoprotektiv	Membranstabilisierung durch noch nicht vollständig geklärten Mechanismus: Aktivierung von EPCR und PAR 1, Transaktivierung von SIP1?	25, 28, 55

1.1.1.2 Thrombin

Thrombin, das Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade, besitzt sowohl enzymatische (Serinproteinase) als auch hormonartige Eigenschaften [10]. Es wird bei Schädigung von Gefäßwänden durch den extrinsischen Weg der Blutgerinnung gebildet und entsteht überwiegend an der Oberfläche zirkulierender Blutplättchen nach proteolytischer Aktivierung aus dem Prothrombokinasekomplex (vergleiche Abb. 1-2).

Die primäre Aufgabe des Thrombins besteht darin, lösliches Fibrinogen in unlösliche Fibrinmonomere umzuwandeln. Gleichzeitig können auch zirkulierende Thrombozyten aktiviert werden, die mit der Fibrinmatrix das Blutgerinnsel bilden. Dieses inkorporiert auch proteolytisch aktives Thrombin und schützt es damit vor löslichen Plasmainhibitoren. Während der Thrombolyse wird das Blutgerinnsel durch fibrinolytische Enzyme aufgelöst, wobei aktives Thrombin freigesetzt wird. Die zellulären Effekte von Thrombin sind nicht nur auf Thrombozyten beschränkt, sondern lassen sich auch bei anderen Zellen nachweisen [10]. So reguliert Thrombin inflammatorische Prozesse in Leukozyten und Makrophagen [56] und kann mitogene Effekte in Lymphozyten [57], mesenchymalen Zellen [58], Fibroblasten [59] und glatten Muskelzellen [60] auslösen [61-63]. Demzufolge trägt die Wachstumsstimulation durch Thrombin während Wundheilung, inflammatorischen Prozessen oder Infektionen mit zur Pathogenität von Atherosklerose, Vaskulitis und Hyperplasie nach Gefäßwandverletzungen bei. In Endothelzellen verursacht Thrombin Veränderungen der Zellform und steigert die Zellpermeabilität innerhalb der Endothelzellschicht [7, 55, 64].

Thrombin aktiviert die auf Endothelzellen vorkommenden Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 3 (PAR 1 und PAR 3). Der ebenfalls auf dem Endothel vorkommende Proteinase aktivierbare Rezeptor 2 (PAR 2) kann nicht durch Thrombin aktiviert werden. Der durch Thrombin aktivierte Rezeptor PAR 3 kann in der Funktion eines Kofaktors den Proteinase aktivierbaren Rezeptor 4 (PAR 4) aktivieren (Abb. 1-4) [11].

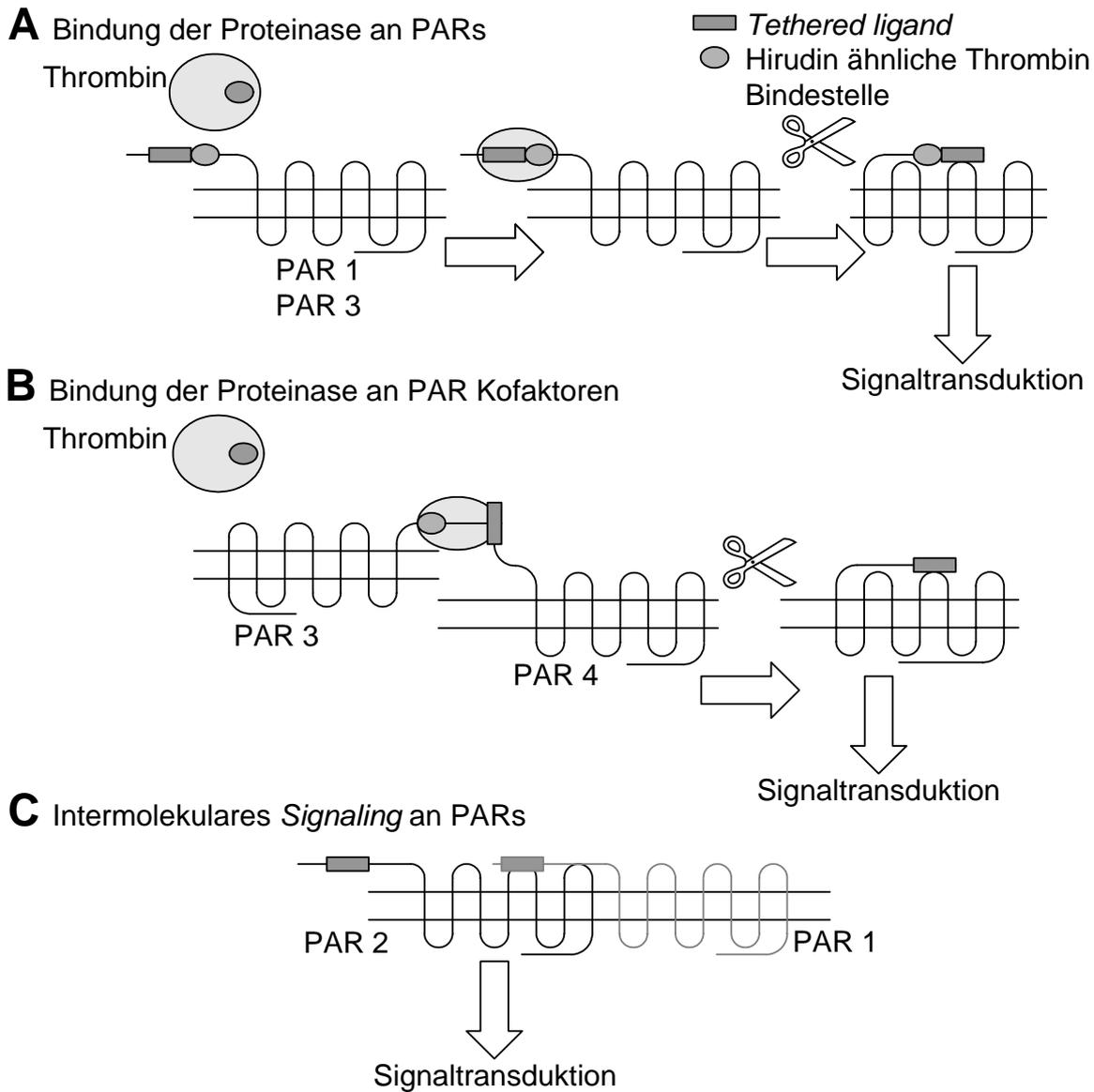


Abb. 1-4: Mechanismus der Aktivierung der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 bis 4.

A: Zweistufige Aktivierung der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 3 (PAR 1 und PAR 3) durch Thrombin (z.B in Endothelzellen des Menschen): Im ersten Schritt bindet Thrombin an die Hirudin ähnliche Domäne, im zweiten Schritt schneidet Thrombin den PAR 1 bzw. PAR 3 im aminoterminalen Bereich und legt den neuen Aminoterminus frei (so genannter *Tethered Ligand*), welcher den PAR 1 bzw. PAR 3 aktiviert. B: PAR 3 ist ein Kofaktor für PAR 4 in Blutplättchen. Thrombin bindet an PAR 3. Dieser vermittelt jedoch in Mäuse-Blutplättchen keine Signaltransduktion. Durch Rezeptortransaktivierung wird PAR 4 aktiviert und es kommt zur Signaltransduktion via PAR 4. C: In endothelialen Zellen z. B. des Menschen kann der aktivierte PAR 1 den PAR 2 aktivieren [modifiziert nach 11].

1.1.1.3 Faktor Xa

Die Serinproteinase Faktor X wird im Verlauf der Blutgerinnungskaskade (extrinsische bzw. intrinsische Blutgerinnung) durch einen Komplex aus Tissue factor (TF) und Faktor VIIa mittels Proteolyse in Faktor Xa umgewandelt (vergleiche auch Abb. 1-2). Faktor Xa wandelt daraufhin zusammen mit dem Faktor Va Prothrombin in Thrombin um [65].

In Endothelzellen aktiviert Faktor Xa die Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 und wirkt auf die Endothelzellschicht protektiv. Dies wurde in einem *in vitro* Permeabilitätstest an HUVECs ermittelt. Dabei reduzierte die Vorinkubation mit Faktor Xa die Thrombin vermittelte Hyperpermeabilität der HUVEC-Zellschicht. Blockade der Rezeptoren PAR 1 und PAR 2 mit den jeweiligen Antikörpern sowie Vorstimulation mit Faktor Xa und nachfolgende Thrombin-Stimulation ergaben eine vollständige Hemmung des protektiven Effektes erst bei Blockade beider Rezeptoren gleichzeitig [66]. Andere Ergebnisse zeigen, dass Faktor Xa die Freisetzung von Cytokinen [67, 68] und Adhäsionsmolekülen [68] sowie Proliferation [69] und endothelabhängige Vasorelaxation [70] bewirkt. Diskutiert wird eine Beteiligung der an der Blutgerinnung „upstream“ vom Thrombin vorkommenden Proteinase an der Pathogenese des „septischen Schocks“ unabhängig von der Thrombin Bildung [71, 72]. Löslicher Faktor Xa aktiviert die beiden Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 nur schwach. Ist der Faktor Xa dagegen in einem Komplex zusammen mit Tissue Factor und Faktor VIIa gebunden, kommt es zu einer effizienten Aktivierung von PAR 1 und PAR 2 [11, 73, 74].

Der Komplex aus Tissue Factor und Faktor VIIa (vergleiche Abb.1-5) aktiviert PAR 2 wesentlich weniger effizient als der Komplex aus TF, Faktor VIIa und Faktor Xa. Weitere Versuche ergaben, dass die Signaltransduktion des Faktors Xa in Endothelzellen überwiegend über den Proteinase aktivierbaren Rezeptor 2 verläuft, in Fibroblasten überwiegend über den Proteinase aktivierbaren Rezeptor 1 [11]. Dabei wird der Faktor Xa auf der Endothelzellmembran angereichert durch seinen Kofaktor Effektor Proteinase Rezeptor-1 (EPR-1) und aktiviert dort selektiv den Proteinase aktivierbaren Rezeptor 2 [75]. Desweiteren wurde festgestellt, dass der Faktor Xa in Endothelzellen ebenfalls eine Signaltransduktion über den Proteinase aktivierbaren Rezeptor 4 bewirkt [72, 76].

Zusammengefasst ist im Moment noch nicht klar, inwieweit die Signaltransduktionen von Faktor Xa an den Proteinase aktivierbaren Rezeptoren eine physiologische Rolle spielen [66].

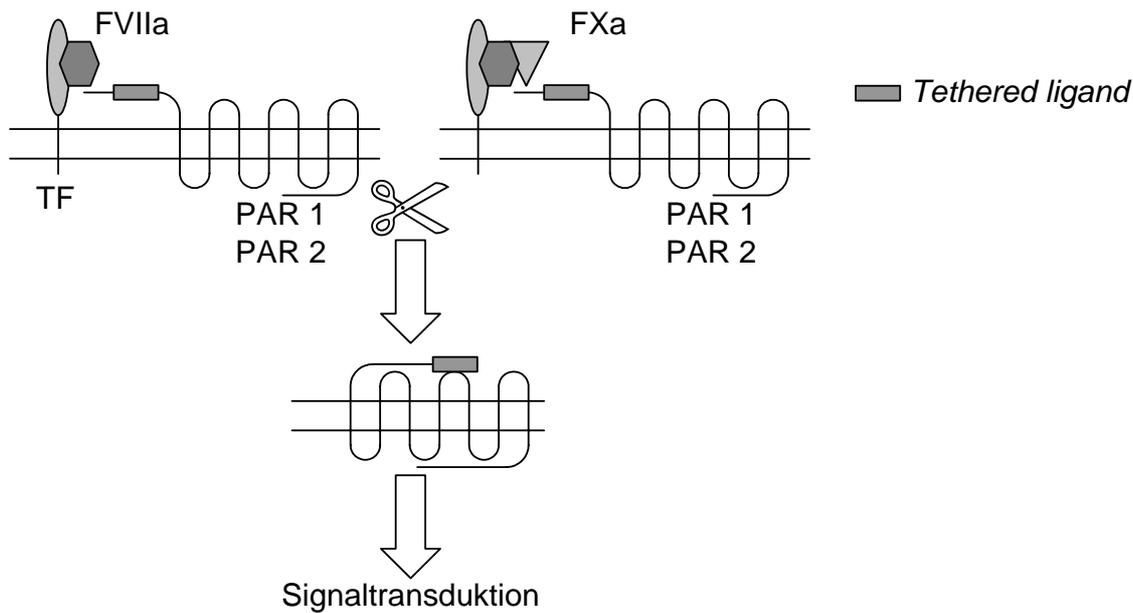


Abb. 1-5: Mechanismus der Aktivierung der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 durch Faktor Xa.

Tissue factor (TF) bindet Faktor VIIa an der Zelloberfläche und aktiviert die Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 (PAR 1 und PAR 2). Ein ternärer (aus drei Grundeinheiten bestehender) Komplex aus TF, Faktor VIIa und Faktor Xa aktiviert die Rezeptoren PAR 1 und PAR 2 effizienter [modifiziert nach 11].

1.1.2 G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

Viele Botenstoffe wie Hormone, Neurotransmitter, Peptide und Wachstumsfaktoren sind nicht membranpermeabel und vermitteln ihre Signalwirkung über spezifische, integrale Membranoberflächenmoleküle, sogenannte Rezeptoren, in das Zellinnere.

Die größte Familie der Oberflächenrezeptoren bilden mit über 1000 Mitgliedern die G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Sie sind allesamt heptahelikale Transmembranproteine und können aufgrund ihrer Sequenzhomologien in fünf Klassen (Rhodopsin ähnliche, Sekretin ähnliche, metatrophe Glutamatrezeptoren, Pheromon Rezeptoren, cAMP-Rezeptoren) untergliedert werden, welche wiederum zahlreiche Subfamilien beinhalten [77]. Alle GPCRs bestehen aus einem extrazellulären N-terminalen Segment, sieben hydrophoben Transmembrandomänen, drei extrazellulären und drei intrazellulären Schleifen und einem intrazellulären C-terminalen Segment [2, 78, 79].

1.1.2.1 Aktivierung von GPCRs

Abhängig von der Art des Agonisten erfolgt bei den meisten Rezeptoren die Bindung an die extrazellulären oder transmembranären Domänen des GPCRs, was zu einer Konformationsänderung führt, die auf einer relativen Bewegung der Transmembranhelices zueinander basiert. Dadurch verändert sich die cytoplasmatische Oberfläche der GPCRs und die im inaktiven Zustand verdeckten Bindungsstellen für heterotrimere G-Proteine werden exponiert [80-82]. Der Rezeptor kann jetzt als GTP-Austauschfaktor (GEF) für das gebundene heterotrimere G-Protein fungieren.

Für viele GPCRs konnte nachgewiesen werden, dass sie sich bereits in Abwesenheit eines Agonisten in einem Gleichgewicht zwischen inaktivem und aktivem Zustand befinden. Die Bindung des Agonisten verschiebt dann das Gleichgewicht in Richtung des aktiven Zustands [79, 83-87].

1.1.2.2 Spezifität der GPCRs

Viele GPCRs zeigen eine Spezifität bezüglich ihrer Fähigkeit, verschiedene G-Protein Familien zu aktivieren. So aktivieren z.B. viele $G\alpha_{12/13}$ - und einige $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren auch $G\alpha_{q/11}$ Proteine [88-90]. Dies führt zur Auslösung komplexer Signalkaskaden in den Zellen.

In der vorliegenden Arbeit stehen insbesondere die Signalübertragungen der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 nach Stimulation mit den Serinproteinasen rhAPC, Thrombin und Faktor Xa im Mittelpunkt.

1.1.2.3 Proteinase aktivierbare Rezeptoren (PARs)

Die durch Serinproteinasen aktivierbaren G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) werden aufgrund ihres Aktivierungsmechanismus in die Urokinase Rezeptoren und die Proteinase aktivierbaren Rezeptoren unterteilt [7].

Das Säugetiergenom enthält die Information für vier Proteinase aktivierbare Rezeptoren (PAR 1 bis PAR 4). Der Mechanismus der Aktivierung der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren ist nicht derselbe wie bei den „klassischen“ Rezeptoren (z.B. dem Insulinrezeptor). Bei den Proteinase aktivierbaren Rezeptoren ist der den Rezeptor aktivierende spezifische Ligand (*Tethered ligand*) Teil des Rezeptors und der Agonist eine relativ unspezifische Serinproteinase [7] (vergleiche auch 1.1.1). Thrombin und Trypsin aktivieren humane Proteinase aktivierbare Rezeptoren 1, 3 und 4 [7, 91a-c, 92]. In humanen Endothelzellen kann der Proteinase aktivierbare Rezeptor 1 durch APC in Gegenwart des Kofaktors EPCR aktiviert werden. In heterologen Expressionssystemen (z.B.

Zellkulturen und bakterielle bzw. virale Expressionssysteme) ist auch die Aktivierung des PAR 2 durch APC-EPCR [27] festgestellt worden. PAR 2 wird ebenfalls aktiviert durch Mastzelltryptase, Faktor Xa, Acrosin, Gingipain und neuronale Serinproteinasen, nicht jedoch durch Thrombin [7, 92]. Alle vier Proteinase aktivierbaren Rezeptoren können durch den Faktor Xa aktiviert werden (Tabelle 1-2) [7, 11, 76, 92].

Weitere Studien ergaben, dass das Auslösen und die Termination des Rezeptorsignals auch gesteuert werden durch das sogenannte Rezeptor „trafficking“ aus intrazellulären Speichern sowie durch die Anwesenheit bestimmter G-Proteine und G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinasen (GRKs) [7, 11].

Für PAR 1, PAR 2 und PAR 4 wurden spezielle PAR aktivierende Peptide (PAR-APs) entwickelt, deren Sequenzen denen des sogenannten *tethered ligand* entsprechen, und die als selektive Rezeptor Agonisten fungieren [7, 11, 93, 94]. Dabei ist für das PAR 1-AP bekannt, dass es ebenfalls PAR 2 aktiviert, das PAR 2-AP dagegen soll keine anderen PARs aktivieren [7].

Tabelle 1-2: Ausgewählte Eigenschaften der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren
(h = human, m = mouse) [modifiziert nach 6 und 11].

Eigenschaften	PAR 1	PAR 2	PAR 3	PAR 4
Aktivierende Serinproteinasen	Thrombin Faktor Xa APC Trypsin	Trypsin Tryptase Faktor VIIa Faktor Xa APC Acrosin Gingipain Neuronale Serin Proteinasen	Thrombin Trypsin Faktor Xa	Thrombin Trypsin Faktor Xa
PAR-aktivierende Peptide	TFLLRN SFLLRN	SLIGKV	Keine	GYPGQV AYPGKF
Lokalisierung	Thrombozyten (h) Endothel Epithel Fibroblasten Myozyten Neuronen Astrozyten	Endothel Epithel Fibroblasten Myozyten Neuronen Astrozyten	Thrombozyten(m) Endothel Myozyten Neuronen Astrozyten	Thrombozyten (h) Endothel Myozyten Astrozyten

1.1.3 Guaninnukleotid bindende Proteine (G-Proteine)

Guaninnukleotid bindende Proteine (G-Proteine) sind zentrale Mediatoren vieler Signalübertragungswege in ein- und vielzelligen Organismen. Sie können aufgrund ihrer Quartärstruktur in heterotrimere und monomere G-Proteine unterteilt werden [95].

1.1.3.1 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine stellen wie auch die monomeren G-Proteine molekulare Schalter dar, die aktiv oder inaktiv sein können [96]. Im Gegensatz zu den monomeren G-Proteinen bestehen sie aus drei verschiedenen Polypeptiden (α -, β - und γ -Untereinheit) und liegen je nach Aktivierungszustand als undissoziiertes Trimer ($\alpha\beta\gamma$) oder freie GTP-gebundene α -Untereinheit und $\beta\gamma$ -Dimer vor. Bislang wurden 16 kodierende $G\alpha$ -Untereinheiten mit einem Molekulargewicht zwischen 39 und 46 kDa identifiziert, die sich aufgrund ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Funktion in vier Klassen unterteilen lassen: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$ [97-99]. Daneben wurden fünf verschiedene $G\beta$ -Untereinheiten (35-36 kDa) und 14 $G\gamma$ -Untereinheiten (ca. 8 kDa) identifiziert [99, 100]. Die β - und γ -Untereinheit bilden zusammen stabile, nicht kovalente Komplexe und stellen eine funktionelle Einheit dar. Wie die monomeren G-Proteine sind auch die heterotrimeren G-Proteine das Angriffsziel bakterieller Toxine. Während z.B. das Pertussis Toxin (PTX) des Keuchhusten auslösenden Erregers *Bordetella pertussis* die Aktivierung von $G\alpha_{i/o}$ -Proteinen verhindert, kommt es durch das Cholera Toxin von *Vibrio cholerae* zu einer Daueraktivierung von $G\alpha_s$ Proteinen. Beide Toxine ADPribosylieren die jeweiligen α -Untereinheiten an einer spezifischen Aminosäure (Cystein im Falle des PTX, Arginin beim Cholera Toxin).

1.1.3.2 Regulation der Aktivität heterotrimerer G-Proteine

Im inaktiven Zustand bindet das heterotrimere G-Protein an die entsprechenden G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Vergleichbar mit den monomeren G-Proteinen ist in diesem Aktivierungszustand ein GDP/Magnesium-Komplex in der Nukleotidbindetasche der $G\alpha$ -Untereinheit gebunden. Die Bindung eines Rezeptoragonisten an seinen Rezeptor bewirkt, über eine Konformationsänderung des Rezeptors, eine Konformationsänderung des G-Proteins. Dies führt zum Austausch des GDPs durch GTP in der $G\alpha$ -Untereinheit. Dadurch zerfällt das Trimer in die GTP-tragende α -Untereinheit und das $\beta\gamma$ -Dimer. Sowohl die α -Untereinheit als auch das $\beta\gamma$ -Dimer können anschließend unabhängig voneinander an spezifische Effektoren binden und deren Aktivität steuern [100]. Die Aktivierung der Effektorsysteme hält solange an, wie die Assoziation mit

$G\alpha$ -GTP besteht. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit wird das gebundene GTP zu GDP und freiem Phosphat hydrolysiert und es kommt zur Reassoziierung der GDP-tragenden α -Untereinheit mit dem $G\beta\gamma$ -Dimer. Der trimere G-Protein Komplex ist nun für eine neue Aktivierung bereit [101].

Ursprünglich wurde angenommen, dass die Dauer der Aktivierung von nur zwei Faktoren moduliert wird: 1) Der intrinsischen GTP-Hydrolyserate von $G\alpha$ selbst und 2) der durch bestimmte $G\alpha$ -Effektoren, wie z.B. PLC- β induzierten Beschleunigung dieser Hydrolyserate [102]. Heute weiß man jedoch, dass die GTPase-Aktivität zusätzlich durch eine Familie GAPs (GTPase Accelerating Proteins) für $G\alpha$ -Untereinheiten, den „Regulators of G-Protein Signaling“ [103-106] reguliert wird, welche nachfolgend eingehender beschrieben werden.

1.1.3.3 Regulators of G Protein Signaling (RGS)

Erste Hinweise darauf, dass der G-Protein Zyklus durch extrinsische Faktoren kontrolliert wird, beruhen auf der Beobachtung, dass in Hefe das Zellzyklusprotein SST2 die Signale heterotrimerer G-Proteine negativ regulierte [107, 108]. Verschiedenen Arbeitsgruppen gelang es, andere Proteine mit ähnlicher Funktion aus *Clostridium elegans* und Säugetierzellen zu isolieren, die aufgrund ihrer Fähigkeit, Signale unterschiedlicher heterotrimerer G-Proteine abzuschwächen, als „Regulators of G Protein Signaling“ (RGS) bezeichnet wurden [104, 105, 109]. All diese Proteine besitzen eine, manche auch mehrere, ca. 125 Aminosäuren große „RGS-Domänen“, bzw. eine RGS-ähnliche Domäne. Bisher konnten 37 verschiedene RGS und RGS ähnliche Proteine identifiziert werden [106, 110, 111]. Diese lassen sich in 8 Unterfamilien einteilen (RZ, R4, R7, R12, RA, GEF, GRK, SNX) [112].

Während die GAP-Proteine für die Hydrolyse des GTPs monomerer GTPasen biologisch essentiell sind, beschleunigen RGS-Proteine lediglich modulatorisch die intrinsische Hydrolyseaktivität der heterotrimeren G-Proteine. Dabei binden sie an die GTP-gebundene α - Untereinheit, besitzen aber die größte Affinität zum im Übergangszustand befindlichen $G\alpha$ -Protein während der Hydrolyse [113, 114]. Die RGS-Proteine interagieren dabei mit den „Switch-Regionen“ I bis III der α -Untereinheit [115, 116] und beschleunigen die intrinsische GTPase-Aktivität um das 300 fache [117]. Als GAPs spielen die RGS-Proteine somit eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Dauer und der Stärke der Signalübertragung.

Allerdings ist das vermutlich nicht ihre einzige Aufgabe, da viele RGS-Proteine GAP-unabhängige Funktionen haben, die die Signale von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und nicht GPCRs beeinflussen, wie z.B. Effektorregulation oder selbst als Effektor zu agieren [118]. Manche

RGS-Proteine weisen deshalb vermutlich auch nur sehr schwache GAP-Aktivität auf [96, 109, 119]. Im Rahmen der folgenden Untersuchungen wurden die GAPs RGS 2 und LSC verwendet. RGS 2 ist ein spezifisches GAP für G α q/11-Proteine, LSC hemmt spezifisch die Signaltransduktion über G α 12/13 [120, 121].

1.1.3.4 Monomere GTP bindende Proteine (G-Proteine)

Die Familie der monomeren G-Proteine wird auch als „Ras-Superfamilie“ bezeichnet. Sie umfasst bezogen auf den Menschen mehr als 150 Mitglieder und lässt sich anhand der Primärsequenz und der physiologischen Funktion in fünf Familien (Arf, Rab, Ran, Rho, Ras) unterteilen [122, 123]. Die physiologische Funktion der zahlreichen Mitglieder der Arf- (ADP-ribosylation factor) und Rab-Familie (Ras-like proteins in brain) liegt in der Regulation des intrazellulären Transportes von Vesikeln zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten [124]. Das Ran-Protein (Ras-like nuklear) wird für die Steuerung des Transportes von Proteinen und RNA in den Zellkern benötigt [125]. Die Proteine der Ras-Familie (Ras sarcoma) sind an der Kontrolle des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Apoptose beteiligt [126]. Die Familie der Rho-GTPasen (Ras homologous) sind zentrale Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts, des Zell-Zyklus und der Gentranskription [127]. Sie werden im folgenden Kapitel eingehender besprochen.

1.1.3.5 Rho-GTPasen

Die bisher bekannten 25 Vertreter der Rho-Familie lassen sich in sechs Unterfamilien (RhoA ähnliche, Rnd, Cdc42 ähnliche, Rac1 ähnliche, RhoBTB, Miro) und einige wenige nicht einzuordnende Proteine einteilen [128-133]. Sie übernehmen zellphysiologisch wichtige Funktionen, wie z.B. Zellmigration, Chemotaxis, Phago- und Pinocytose, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion, Regulation des Zellzyklus, Apoptose und Gentranskription [134, 135-137]. Eine weitere wichtige Rolle spielen Rho-GTPasen für die Pathogenese bestimmter bakterieller Erkrankungen. Die Erreger exprimieren bakterielle Toxine, welche die Aktivität verschiedener Rho-GTPasen beeinflussen. Toxine, wie die Zytotoxine A/B des Diarrhö-verursachenden Bakteriums *Clostridium difficile* oder das lethale Toxin des entzündungsauslösenden Bakteriums *Clostridium sordellii*, glykosylieren und inaktivieren relativ unspezifisch verschiedene Rho-GTPasen, z.B. RhoA, Rac1 und Cdc42 [138-144]. Neben ihrer Bedeutung für die Pathogenese von bakteriellen Erkrankungen haben die verschiedenen Toxine auch als molekulare Werkzeuge zum Verständnis der einzelnen Rho-GTPasen für die unterschiedlichen zellulären Vorgänge beigetragen. Dazu

gehört auch die C3 ADP-Ribosyltransferase des Botulismus auslösenden Bakteriums *Clostridium botulinum*, das spezifisch Rho(A-C) inaktiviert [145].

1.1.3.6 Funktionen von RhoA und Rac1

Eine Aktivierung von RhoA in der sogenannten „Tail-Region“ der Zelle löst das Nachziehen des Zellkörpers während der Migration aus [146]. Die durch RhoA induzierten Stressfasern sind Bündel von Aktin-Filamenten, die unter anderem Myosin II enthalten. Diese Filamente durchspannen die Zelle und verbinden sie mit der extrazellulären Matrix durch sogenannte „fokale Adhäsionspunkte“ [147]. Stressfasern bilden sich z.B. aus, wenn aktiviertes RhoA die Rho-assoziierte Kinase (ROCK) aktiviert und diese dann die leichte Kette des Myosin (MLC) phosphoryliert. Gleichzeitig inhibiert ROCK die MLC-Phosphatase und verhindert dadurch die Dephosphorylierung von Phospho-MLC. Aktiviertes RhoA reguliert auf diese Weise die Kontraktilität der Actin/Myosin-enthaltenden Stressfasern und ermöglicht die gerichtete Migration [148, 149].

Neben der Regulation der Zytoskelettausbildung erfüllen Rho-GTPasen auch Aufgaben bei der Kontrolle der Gentranskription. Rho-Proteine aktivieren den Transkriptionsfaktor „Serum Response Factor“ (SRF) [150, 151], der anschließend mit dem „Ternary Complex Factor“ (TCF) und der Promotor-Regulatorsequenz „Serum Response Element“ (SRE) einen Komplex bildet und dadurch die Transkription bestimmter Gene stimuliert. Weitere Effektoren, die von RhoA beeinflusst werden, sind z.B. L-Typ Ca^{2+} -Kanäle und K^{+} -Kanäle [152, 153].

Die Aktivierung von Rac(1-3) induziert durch Aktin-Polymerisation in der Zellperipherie die Bildung von sogenannten „membrane ruffles“, auch als „Lamellipodien“ bezeichnet, die sich am in Migrationsrichtung befindlichen Ende der Zellen bilden [154]. Ein weiterer Effektor von aktiviertem Rac ist die „p21-aktivierte-Kinase“ (PAK), deren Aktivierung ebenfalls zur Bildung von Lamellipodien führt [155], aber gleichzeitig auch die Aufhebung von RhoA-bedingten Stressfasern und fokalen Adhäsionspunkten an der Zellfront auslöst [156].

Rho GTPasen binden mit hoher Affinität GDP sowie GTP wobei sie in Abhängigkeit vom gebundenen Nukleotid ihre Konformation ändern. Dieser GDP/GTP-Zyklus wird hauptsächlich von drei Proteinklassen reguliert: Die Guaninnukleotid Austauschfaktoren (GEFs) fördern die Bildung des aktiven GTP gebundenen Zustandes [157], die GTPase aktivierenden Proteine (GAPs) verstärken die GTP-Hydrolyse [158a] und Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) fördern den inaktiven GDP gebundenen Zustand [158b].

1.1.4 Intrazelluläre Effekte nach Stimulation der PARs 1 und 2

Nach Aktivierung und damit einhergehender Konformationsänderung des Proteinase aktivierbaren Rezeptors (vergleiche auch 1.1.2.1) werden im weiteren Verlauf der Signalübertragung verschiedene heterotrimere G-Proteine aktiviert (vergleiche auch 1.1.3.1). Dabei wurde die Hypothese aufgestellt [93], dass verschiedene Liganden an ein und demselben Rezeptor unterschiedliche Konformationen bewirken, die wiederum selektiv zur Aktivierung unterschiedlicher G-Proteine führen. Ein Beispiel für ein PAR spezifisches „signaling“ ist die Aktivierung des PAR 2 durch Tryptase-induzierte Glykosylierung [159, 160]. Andere Autoren stellen die Vermutung auf, dass der Grad der Rezeptoraktivierung wichtig ist für bestimmte Zellantworten. Aktiviertes Protein C und Thrombin aktivieren proteolytisch den Proteinase aktivierbaren Rezeptor 1 und lösen an ein und demselben Rezeptor sowohl antiinflammatorische als auch proinflammatorische Effekte aus. Niedrige Thrombin- und hohe APC-Konzentrationen können diese Effekte umkehren [161a].

Eine wichtige Rolle am Proteinase aktivierbaren Rezeptor 1 spielt die Signaltransduktion über das heterotrimere G-Protein $G\alpha q/11$ [11] (Abb. 1-6). Untersuchungen in Fibroblasten zeigten, dass die Signaltransduktion von Thrombin nach Mikroinjektion von Antikörpern gegen $G\alpha q/11$ gehemmt wurde [11]. $G\alpha q/11$ aktiviert die Phospholipase $C\beta$, was wiederum zur Bildung von Inositol-3-Phosphat ($InsP_3$) und Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat führt. $InsP_3$ mobilisiert intrazelluläres Kalzium, welches unter anderem zusammen mit DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert [11, 162]. Calcium aktiviert ebenfalls Calmodulin, welches wiederum Calmodulin-abhängige Kinasen aktiviert, die zu einer Stimulation des „Serum Response Factors“ (SRF) beitragen. Viele mitogene Signalkaskaden enden in einer Aktivierung des SRF. Dieser ist verantwortlich für die Aktivierung des Promotors „Serum Response Element“ (SRE) und damit für die Einleitung der Gentranskription [94].

Kalzium und PKC aktivieren zahlreiche Signalwege, unter anderem die mitogen aktivierbaren Proteinkinasen (MAPK) [7, 11]. Die Aktivierung der MAPKs spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung Thrombin induzierter Effekte in Endothelzellen. Sie beeinflussen die Produktion von Cytokinen, Chemokinen und die Expression von Zelladhäsionsmolekülen [7, 163].

In Endothelzellen können alle drei $G\alpha$ -Subfamilien ($G\alpha q$, $G\alpha 12/13$, $G\alpha i/o$) nach Thrombin induzierter PAR 1-Aktivierung eine Stimulation der MAP-Kinase-Aktivität bewirken [94]. Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass induziert durch Thrombin und das PAR-1 aktivierende Peptid TFLLRNPNDK das $G\alpha q$ -Protein sowie das G $\beta\gamma$ -Dimer verantwortlich sind für die

Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und die Transkription von Interzellulärem Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) in Endothelzellen [7].

Im Gegensatz zur Signaltransduktion von PAR 1 über G α q ist noch wenig bekannt über die Regulation der endothelialen Zellpermeabilität vermittelt durch die heterotrimeren G-Proteine G α 12/13 „downstream“ des aktivierten PAR 1 [162]. An verschiedenen Zelltypen durchgeführte Studien weisen darauf hin, dass die Überexpression von dominant-aktiven G α 12/13-Mutanten durch p115RhoGEF (Guanine Nucleotid Exchange Factor) zur Aktivierung von RhoA führen [11, 162, 164]. Die G α 12/13 induzierte RhoA-Aktivierung erfordert die Proteinkinase C α -abhängige Phosphorylierung von p115RhoGEF [162]. Diese Untersuchungen legen folglich nahe, dass RhoA ein zentraler „Downstream-Effektor“ für die Signalwege über G α q und G α 12/13 ist, und damit einen wichtigen Mechanismus in der Thrombin induzierten Steigerung der Endothelzellpermeabilität darstellt [11, 162]. Dabei agiert Rho wie ein molekularer Schalter. Es induziert auf extrazelluläre Signale hin Änderungen in der Organisation des Actin-Cytoskeletts sowie der Gentranskription und bewirkt eine Vielzahl biologischer Antworten, wie z.B. Morphogenese, Zellmigration und Chemotaxis [55].

Das RhoA-Signaling ist abhängig von einer großen Anzahl von RhoA-Effektorproteinen, die mit RhoA interagieren und so Signale in der Zelle vermitteln. Zu diesen Effektorproteinen gehört die Familie der Rho-assoziierten Kinasen (ROCK). Sie sind unter anderem beteiligt an den RhoA induzierten Änderungen des Zytoskeletts [165].

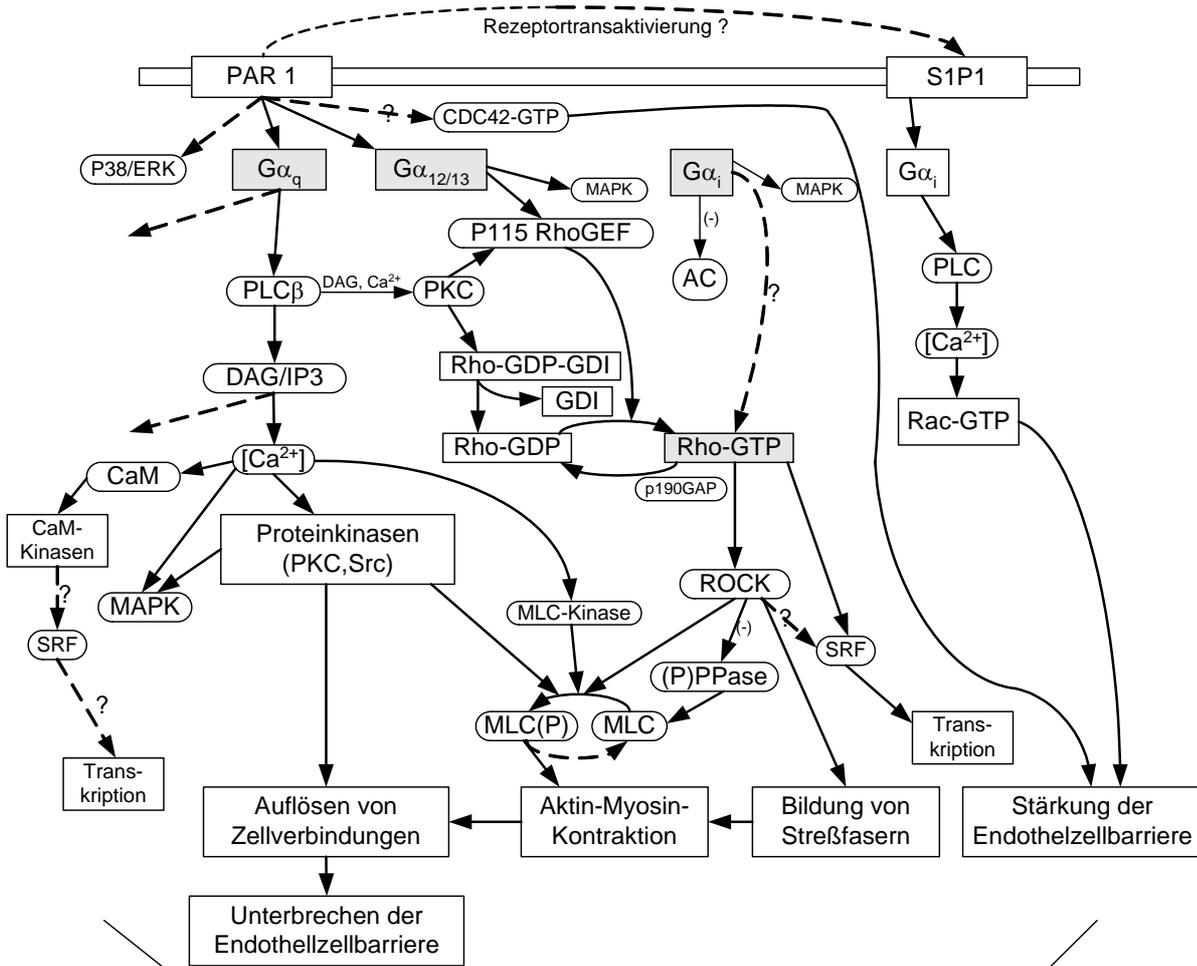
Untersuchungen in HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) zeigten, dass PAR 1-Aktivatoren zur Bildung von Stressfasern, zur Anhäufung von kortikalem Aktin und zum Abrunden der Zellen führten [166]. Die Hemmung von Rho führte dabei teilweise zum Abschwächen der „Zellabrundung“, Rac 1 dagegen blockte die Thrombin Wirkung komplett. Dies deutet darauf hin, dass eine Aktivierung von Rho Auswirkungen auf die Endothelzellbarriere hat, wohingegen eine Thrombin induzierte Rac-Aktivierung zu einer Wiederherstellung des Zytoskeletts führt [11]. Ebenfalls wurde gezeigt, dass die Aktivierung von PAR 1 zu einer verzögerten Aktivierung der RhoGTPase CDC42 führte (vergleiche auch 1.1.3.5). Dies deutet auf einen Prozeß der kompensatorischen Wiederherstellung der durch Thrombin erhöhten Endothelzell-Permeabilität hin [161b].

Beschrieben ist eine Aktivierung der G α i/o-Familie heterotrimerer G-Proteine durch den PAR 1 mit anschließender Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität (AC) [167]. Dabei soll die Hemmung von G α i durch Pertussis-Toxin vor der Thrombin induzierten Steigerung der

Endothelzellpermeabilität schützen [168]. Zur Stärkung der Zellbarriere ist ebenfalls die Aktivierung von $G\alpha_i$ durch den Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor (S1P-Rezeptor) erforderlich. Dabei ist der Zusammenhang zur Thrombin induzierten Steigerung der Permeabilität der Endothelzellmembran weitestgehend ungeklärt [169, 170].

Durch den PAR 1 aktivierte $G\beta\gamma$ -Dimere kurbeln wiederum viele andere Signalwege an, z.B. führen sie zur Aktivierung der Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase und bewirken Änderungen des Zytoskeletts, der Zellmotilität, der Überlebensdauer der Zellen sowie der Mitogenese [11].

Neuere Untersuchungen zeigen eine Beteiligung des Faktors Xa an der Signaltransduktion über den PAR 1 [24, 69, 72, 171]. Faktor Xa wird gebildet nach vaskulären Defekten und innerhalb des Entzündungsgeschehens aus dem Tissue Factor (TF) und Faktor VIIa (FVIIa)-Komplex (vergleiche auch Punkt 1.1.1.3). In HeLa-Zellen wurden eine Faktor Xa induzierte Aktivierung von NF κ B, die Phosphorylierung der MAP-Kinase, die Induktion der Genexpression sowie eine Kalziumfreisetzung festgestellt [74, 171]. Hemmstudien mit spezifischen Antikörpern ließen den Schluss zu, dass Faktor Xa über den PAR 1 wirkt [74]. Ebenfalls wurde eine Aktivierung des PAR 2 durch Faktor Xa beschrieben [28, 72, 171]. In dem Zusammenhang wurde die Hypothese aufgestellt, dass dem PAR 2, wie auch dem PAR 1, zwar eine bedeutende Rolle im Entzündungsgeschehen zukommt, aber auch protektive, die Endothelzellmembran schützende Effekte durch ihn vermittelt werden [28].



Apoptose, Zellzyklus, Zellwachstum, Zellmotilität, Differenzierung, Abwehr, Immunantwort, Entzündung, Stoffwechsel, Rezeptortransaktivierung, Regulation, Sekretion, Zellform

Abb. 1-6: Schematische Darstellung der durch den PAR 1 auslösbaren Signaltransduktionswege. (Gα q , Gα 12/13, Gα i = Heterotrimere G Proteine; PLCβ = Phospholipase Cβ; DAG = Diacylglycerol; IP₃ = Inositol-3-Phosphat; PKC = Proteinkinase C; GEF = Guaninnukleotid Exchange Factor; SRF = Serum Response Factor; Src = Kinase; AC = Adenylatzyklase; MLC = Myosin Light Chain; GAP = GTPase Accelerating Protein; ROCK = Rho gekoppelte Kinase; MAPK = Mitogen Aktivierbare Proteinkinase; GDI = Guaninnukleotid-Austauschinhibitoren; CaM = Calmodulin; ERK 1/2 = Extracellular Regulated Kinases 1 und 2; p38 = p38-Kinase)

Vergleichende Untersuchungen bezüglich der Signaltransduktion von humanem PAR 1 und humanem PAR 2 ergaben, dass, obwohl sie eine signifikante Sequenzhomologie (35 %) aufweisen, ihr Signalvermögen unterschiedlich ist [93]. Zur Zeit ist noch wenig über die Signalmechanismen des PAR 2 bekannt [10, 11, 61, 65, 93] (Abb. 1-7). PAR 2-Aktivatoren stimulieren die Bildung des sekundären Botenstoffs Inositol-3-Phosphat (IP_3) und die Mobilisierung von Kalzium über das heterotrimere G-Protein $G\alpha_{q11}$ [11]. Möglicherweise führt die Aktivierung von $G\alpha_i$ und $G\alpha_q$ wiederum zur Aktivierung der Phospholipase-C, der Proteinkinase-C sowie der MAP-Kinase. Dies würde wiederum eine Vielzahl von Signalwegen eröffnen [7]. Desweiteren wurde eine mögliche Beteiligung von PAR 2 an der Aktivierung von RhoA in HUVEC beschrieben [172]. Neuere Untersuchungen zeigen eine Aktivierung von nicht-G Protein-Effektoren wie z.B. Arrestine durch den PAR 2-Rezeptor. Diese führen wiederum zu einer Aktivierung von „Extracellular Regulated Kinases 1, 2“ (ERK 1,2) [161a].

Weitere Untersuchungen an der endothelialen Zelllinie HMEC-1 und an HUVECs haben ergeben, dass die Stimulation der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 mit den jeweiligen PAR-aktivierenden Peptiden eine intrazelluläre Kalzium Ausschüttung bewirken. Eine gesteigerte Endothelzellpermeabilität sowie die Bildung von Aktin Stressfasern ergab jedoch nur die Stimulation des PAR 1 Rezeptors sowohl nach Stimulation mit Thrombin als auch nach Stimulation mit dem PAR 1-aktivierenden Peptid [92, 93]. Dabei wird die Veränderung der Zellpermeabilität durch die Aktivierung von $G\alpha_{12/13}$ bewirkt, die Veränderung des Kalziumhaushaltes der Zelle durch $G\alpha_q$. Das legte die Vermutung nahe, dass der Unterschied zwischen der PAR 1- und der PAR 2-Aktivierung in der Fähigkeit besteht, $G\alpha_q$ bzw. $G\alpha_{12/13}$ zu aktivieren [93]. Die PAR 1-vermittelte Steigerung der Zellpermeabilität ist abhängig von der Rho-Aktivierung, so dass weiter geschlussfolgert wurde, dass der Unterschied zwischen der PAR 1- und der PAR 2-Aktivierung in der Fähigkeit bzw. Unfähigkeit liegt, die Rho-GTPase und nicht Rac1 zu aktivieren [28, 93].

Die Hemmung des gebildeten Chelat-Kalziums in HMEC-1-Zellen sowie die Hemmung von $G\alpha_{i/o}$ zeigten keine Auswirkungen auf die Zellpermeabilität [93]. Andere Zellsysteme zeigten eine gesteigerte Zellpermeabilität durch Kalzium Mobilisation [64, 92]. Diese Unterschiede der Kalziumwirkungen in den verschiedenen Zellsystemen können durch die unterschiedlichen „Myosin Light Chain“ (MLC) Phosphorylierungen begründet werden. Die Phosphorylierung der „Myosin Light Chains“ erfolgt durch die MLC-Kinase (bzw. ROCK) und induziert die Kontraktion der Endothelzellen. Die MLC-Kinase kann durch gebildetes Chelat-Kalzium aktiviert werden [173, 174]. Durch die Aktivierung von Rho käme es zu einer Inaktivierung der MLC-Phosphatasen und

somit bliebe die Phosphorylierung der MLC bestehen, der Signalweg bliebe Kalzium-unabhängig [92, 175, 176]. Die Mobilisierung von Kalzium durch die $G\alpha_q$ -aktivierte Phospholipase C- β ist unabhängig von $G\alpha_{12/13}$ und $G\alpha_{i/o}$ [93].

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Behandlung von PAR 2-transfizierten Zellen und Enterozyten mit Pertussis Toxin keine Hemmung der Signaltransduktionen ergab. Daraus wurde geschlossen, dass es zu keiner Aktivierung von $G\alpha_i$ -Proteinen durch den PAR 2-Rezeptor kommt [177].

Aktiviertes Protein C (APC) bewirkt in HUVECs eine gesteigerte Kalzium-Mobilisierung, die Aktivierung von ERK 1 und 2 (Extracellular Signal Regulated Kinases 1/2) sowie die Expression von antiinflammatorischen und antiapoptotischen Genen [178]. Neuere Versuchsergebnisse schreiben dem aktivierten Protein C bei Aktivierung des PAR 1-Rezeptors über eine Aktivierung von Rac1 zellprotektive Effekte zu [29]. Dabei sollen sowohl APC als auch geringe Konzentrationen von Thrombin eine Transaktivierung des Sphingosin-1-Phosphat Rezeptors (S1P-Rezeptor) bewirken [28, 29]. Ebenfalls soll eine Transaktivierung des S1P-Rezeptors durch den PAR 2-Rezeptor und damit einhergehend ein Schutz der Zellmembran möglich sein [28].

Ebenfalls wurde bei Stimulation der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 eine APC-EPCR induzierte Phosphorylierung der „Mitogen aktivierten Protein Kinase“ (MAPK) beobachtet. Diese MAPK-Phosphorylierung findet auch bei Stimulation der Proteinase-aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 mit anderen Aktivatoren statt [24].

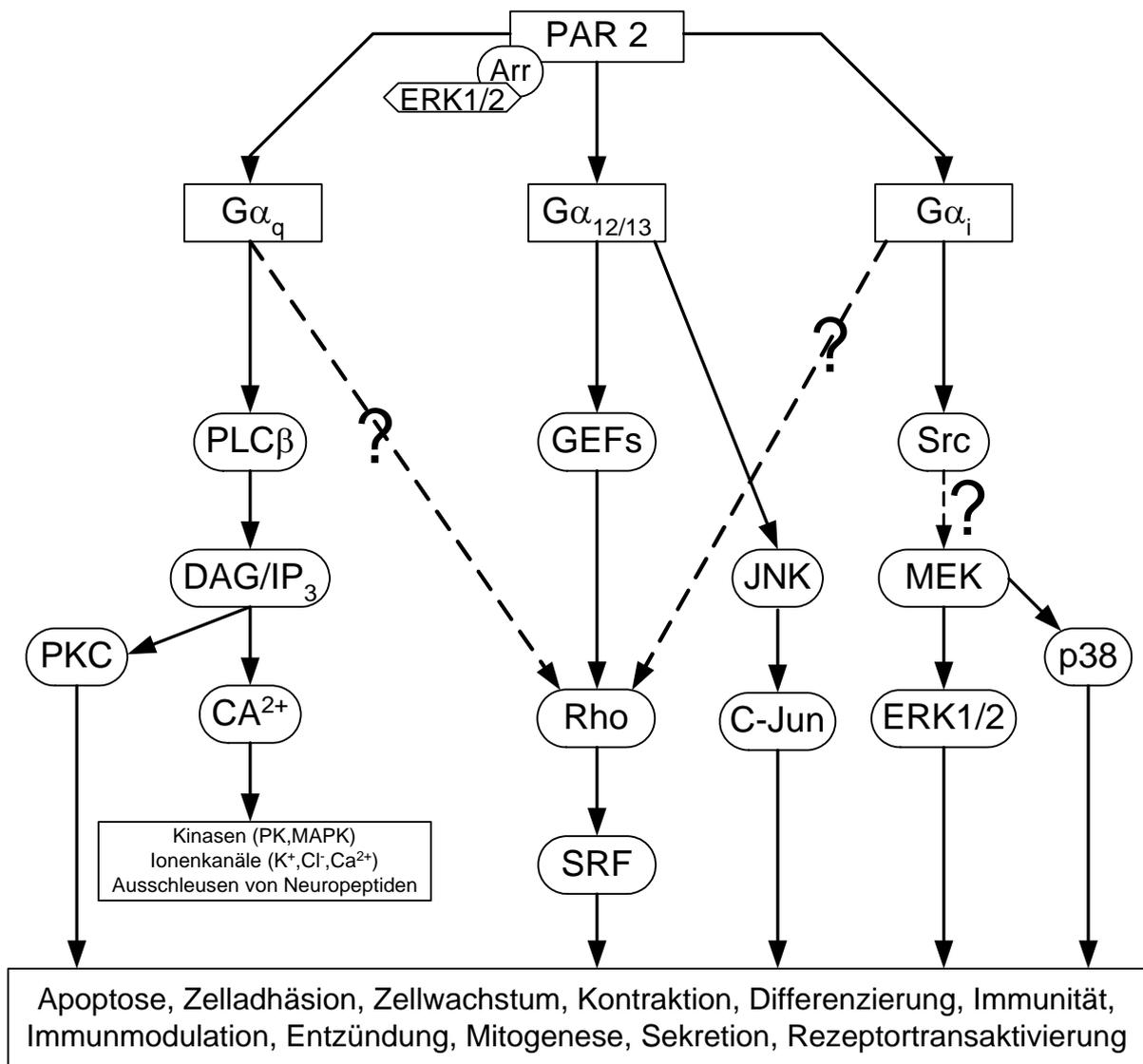


Abb. 1-7: Schematische Darstellung der durch den PAR 2 auslösbaren Signaltransduktionswege.
 (Arr = Arrestine; ERK 1/2 = Extracellular Regulated Kinases 1 und 2; $G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_i$ = Heterotrimere G Proteine; $PLC\beta$ = Phospholipase C β ; DAG = Diacylglycerol; IP_3 = Inositol-3-Phosphat; PKC = Proteinkinase C; GEF = Guaninnukleotid Exchange Factor; SRF = Serum Response Factor; c-Jun = Transriptionsfaktoren; Src, JNK, MEK = Kinasen; MAPK = Mitogen aktivierbare Protein Kinase; p38 = p38-Kinase)

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Die Steigerung der vaskulären Membranpermeabilität spielt im Sepsisgeschehen eine Schlüsselrolle [66, 72]. Dabei sind Blutgerinnung und Entzündungsgeschehen eng verknüpft mit der Signaltransduktion proinflammatorisch wirkender Serinproteinasen wie z.B. Thrombin und Faktor Xa über Proteinase aktivierbare Rezeptoren [66, 74, 75, 93, 144, 166, 179]. Kontrovers diskutiert werden im Gegensatz dazu die durch aktiviertes Protein C vermittelten „membranprotektiven“ Wirkungen [24-27, 29, 180-184]. Diese Zellmembran schützenden Effekte sollen durch Aktivierung derselben Proteinase aktivierbaren Rezeptoren induziert werden, die sonst proinflammatorische membrandestruktive Wirkungen vermitteln [24, 26, 55, 185]. Dabei sind die Signaltransduktionsmechanismen der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren bisher nicht vollständig aufgeklärt [161a].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Untersuchungen sollen einen Beitrag leisten zur Aufklärung dieser proinflammatorischen, membrandestruktiven versus antiinflammatorischen, membranprotektiven Wirkungen an Proteinase aktivierbaren Rezeptoren. Dabei bestand nach Etablierung des „Serum Response Element“ (SRE) abhängigen Luciferase Assays in HEK293A-Zellen das Hauptziel darin, die dem aktivierten Protein C zugeschriebenen protektiven Effekte näher zu untersuchen. Dazu wurden unter gleichbleibenden Versuchsbedingungen im SRE abhängigen Luciferase Assay in HEK293A-Zellen die Auswirkungen der Kostimulationen von rhAPC mit jeweils Thrombin und Faktor Xa an den Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 sowie im Vergleich dazu die Effekte der Vorstimulation mit rhAPC auf die Nachstimulation jeweils mit Thrombin und Faktor Xa ermittelt.

Im Folgenden sollten die aus diesen Versuchen hervorgegangenen Ergebnisse auf molekularer Ebene erklärt werden. Dazu wurden wiederum unter gleichbleibenden Versuchsbedingungen im Luciferase Assay die Auswirkungen der Stimulation der HEK293A-Zellen jeweils mit den Serinproteinasen rhAPC, Thrombin und Faktor Xa auf die Signaltransduktion in HEK293A-Zellen untersucht. Dabei standen speziell die Auswirkungen der Hemmung der heterotrimeren G-Proteine $G\alpha_q$, $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_i$ sowie die Hemmung von Rho bzw. der Rho assoziierten Kinase (ROCK) im Mittelpunkt.

2 Materialien

2.1 Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Invitrogen (Carlsbad, USA) Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Inhibitoren

PTX (Pertussis Toxin, <i>Bordetella pertussis</i>), Kat.-Nr. 516561	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Refludan® (rekombinantes humanes Lepirudin)	Pharmion Ltd., Windsor, Großbritannien
RhoAssociated Protein Kinase Inhibitor Y-27632, Kat.-Nr. 688000	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Agonisten

Coagulation Factor Xa, Human Plasma, Kat.-Nr. 233526	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland
Histamin, Kat.-Nr. H-7125	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PAR 1-Agonist, TFLLRNPNDK-NH2	Serva, Heidelberg, Deutschland
PAR 2-Agonist, SLIGKV-OH, Kat.-Nr. H-5042	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Rekombinantes humanes Aktiviertes Protein C	Eli Lilly, Indianapolis, USA
Thrombin, Human Plasma, Kat.-Nr. 605195	Calbiochem, Schwalbach, Deutschland

Transfektionsreagenzien

Polyfect® 2000

Qiagen,
Hilden, Deutschland

Sonstige Reagenzien

Bovines Serum Albumin (20 mg), Kat.-Nr. 10711454001

Hoffmann-La Roche,
Basel, Schweiz

dNTP-Mix (10 mM), Kat.-Nr. 18427-013

Invitrogen,
Carlsbad, USA

100 bp DNA Ladder, Kat.-Nr. 15628-019

Invitrogen,
Carlsbad, USA

Glutathione Sepharose 4 Fast Flow, Kat.-Nr. 17-5132-01

Amersham,
Freiburg, Deutschland

H₂O_{DEPC}, Kat.-Nr. A2864

AppliChem,
Darmstadt, Deutschland

Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid (IPTG), Kat.-Nr. 37-2020

PEQLab,
Erlangen, Deutschland

Milchpulver, Kat.-Nr. T145.1

Roth,
Karlsruhe, Deutschland

Antikörper

Primärantikörper:

Anti-RhoA-Antikörper

Santa Cruz,
Santa Cruz, USA

Par-2 (SAM 11), Kat.-Nr. sc-13504

Santa Cruz,
Santa Cruz, USA

Rabbit anti-EPCR

Zymed,
San Francisco, USA

Thrombin-R (ATAP2), Kat.-Nr. sc-13503

Santa Cruz,
Santa Cruz, USA

Sekundärantikörper

Anti-Mouse Ig, Kat.-Nr. NXA931

Amersham,
Freiburg, Deutschland

Enzyme

AMV Reverse Transkriptase (des“Avian Myeloblastosis Virus“)

Hoffmann-La Roche,
Basel, Schweiz

Restriktionsenzyme

NEB,
Ipswich, USA

Taq DNA Polymerase

Hoffmann-La Roche,
Basel, Schweiz

2.2 Plasmide

EFC3

von A. Hall (University College London,
Großbritannien) zur Verfügung gestellt

pRL-TK

Stratagene, Amsterdam, Niederlande

pSRE.L

von J. Mao, D. Wu (Universität Rochester,
USA) zur Verfügung gestellt

pEF-BOS

von K. Fukudome (Saga Medical School, Japan)
zur Verfügung gestellt

pCMV6-XL5, PAR 1

OriGene, Rockville, USA

pcDNA3.1, PAR 2

UMR cDNA Resource Center, Miner Circle
Rolla, USA

pcDNA3.1, EDG1

UMR cDNA Resource Center, Miner Circle
Rolla, USA

pCMVTag 3B, LSC

Stratagene, Amsterdam, Niederlande

pET-19b, RGS2

von S. P. Heximer (Washington University
School of Medicine, St. Louis, USA) zur
Verfügung gestellt

2.3 Genspezifische Primer

c-DNA-Synthese p(dt)15, Kat.-Nr. 10814270001

Hoffmann-La Roche,

Basel, Schweiz

Nachfolgende Primer wurden bei der Firma Applera (Norwalk, USA) bezogen:

GAPDH: Sense Primer: 5`-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3`

Antisense Primer: 5`-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3`

PAR 1: Sense Primer: 5`-CAG TTT GGG TCT GAA TTG TGT CG-3`

Antisense Primer: 5`-TGC ACG AGC TTA TGC TGC TGA C-3`

PAR 2: Sense Primer: 5`-TGG ATG AGT TTT CTG CAT CTG TCC-3`

Antisense Primer: 5`-CGT `GAT GTT CAG GGC AGG AAT G-3`

EPCR: Sense Primer: 5`-ATG TCT TCT TCG AAG TGG CTG-3`

Antisense Primer: 5`-GAG TGC GGT TGT AGG CAT TG-3`

2.4 Bakterien

XL1-Blue Electroporation-Competent Cells, Kat.-Nr.200228

Stratagene,

Amsterdam, Niederlande

2.5 Zellen

HEKtsA201 aus HEK293-Zellen (Human Embryonic Kidney Cells) gewonnen, die stabil transfiziert wurden mit dem SV40-large-T-Antigen.

HUVEC Human Umbilical Vein Endothelial Cells (Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg, Ethikantrag-Nr.: 109/2005)

2.6 Reagenzien für die Zellkultur

Amphotericin B, Kat.-Nr. C-42040	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Dispase-2-Lösung, Kat.-Nr. 29582	Hoffmann La Roche, Basel, Schweiz
DMSO, Kat.-Nr. D2650	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM), Kat.-Nr. D6546	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Endothelial Cell Growth Medium, Kat.-Nr. C-22110	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS), Kat.-Nr. S0115/880F	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Gentamycin, Kat.-Nr. C-42060	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Glycerol, Kat.-Nr. 15514-011	Invitrogen, Carlsbad, USA
Kollagen Typ I, rat tail, Kat.-Nr. 08-115	Upstate, Billerica, USA
L-Glutamin, Kat.-Nr. G7513	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS, Kat.-Nr. D5652	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin, Kat.-Nr. P4333	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Supplement Pack, Kat.-Nr. C-39210	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Trypsin-EDTA, Kat.-Nr. T3924	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.7 Reagenzien für die Bakterienkultur

LB-Medium (Luria Broth Base Medium) aus:

- 10 g Trypton, Pancreatic Digest of Casein, Kat.-Nr. 212705
Firma BD (Schwechat, Österreich)
- 5 g Hefeextrakt, Extract of Autolysed Yeast Cells, Kat.-Nr. 211705
Firma BD (Schwechat, Österreich)
- 5 g NaCl, 58,44 g/Mol, Kat.-Nr. 1064041000
Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Ad 1 Liter Aqua dest, Kat.-Nr. D-55671
Delta Select (Dreieich, Deutschland)
- 200 µl Ampicillin, Kat.-Nr. A5354
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

LB (Luria Broth Base Medium)-Agarplatten aus:

- 15 g Agarose, Kat.-Nr. 15510-027
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- ad 1 Liter LB-Medium

S.O.C. (Super Optimal Broth)-Medium aus:

- 2 g Trypton, Kat.-Nr. 211705
Firma BD (Schwechat, Österreich)
- 0,5 % Hefeextrakt, Kat.-Nr. 211705
Firma BD (Schwechat, Österreich)
- 10 mM NaCl, Kat.-Nr. 310166-1KG
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
- 10 mM MgCl₂, Kat.-Nr. 208337-100G
Sigma-Aldrich
- 10 mM MgSO₄, Kat.-Nr.: M-9397
Sigma-Aldrich
- 20 mM Glucose, Kat.-Nr. 310816-250MG
Sigma-Aldrich
- Ad 100 ml a.d.
- sterilfiltriert

2.8 Puffer

50 x TAE-Puffer, Kat.-Nr. A1691

AppliChem,
Darmstadt, Deutschland

NuPAGE® MOPS SDS Buffer Kit (für Bis-Tris Gels), Kat.-Nr. NP0050 Invitrogen,
Carlsbad, USA

2.9 Gele

Bis-Tris-Gel (12 %), Kat.-Nr. NP0341BOX

Invitrogen,
Carlsbad, USA

Bis-Tris-Gel (4 – 12 %), Kat.-Nr. NP0321BOX

Invitrogen

NuPage®, Kat.-Nr. NP0341BOX

Invitrogen

Gel 2 % aus:

- 2 g Agarose
- 100 ml TAE (1x)
- 5 µl UltraPure Ethidium Bromide , Kat.-Nr. 15585-011 Invitrogen

2.10 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Glas- und Plastikwaren wurden von den Firmen Qiagen (Hilden, Deutschland), Perkin Elmer (Waltham, USA), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Nunc (Wiesbaden, Deutschland) und Eppendorf (Hamburg, Deutschland) bezogen.

2.11 Geräte

Blotkammer

BIO-RAD,
München, Deutschland

Elektrophoresekammer

PEQLab,
Erlangen, Deutschland

Elektrophoresegerät

Axon,
Kaiserslautern, Deutschland

ELISA Reader (Genesis Light)

Labsystems,
Quickborn, Deutschland

EXcell Sure Lock Electrophoresis Cell	Novex, Mandelbachtal, Deutschland
Electrophoresis Power Supply	Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
Gene-Pulser II	BIO-RAD, München, Deutschland
INTAS GDS®	INTAS, Hamburg, Deutschland
Luminoskan Ascent	Labsystems, Quickborn, Deutschland
Magnetrührer	Janke und Kunke GmbH, Staufen, Deutschland
Mikroskop, Leica DM IL	Leica, Bensheim, Deutschland
Mikrowelle	Sharp, Hamburg, Deutschland
PCR Thermocycler	BIO-RAD, München, Deutschland
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia, Ratingen, Deutschland
Präzitherm-Wärmetisch	Störk Tronic, Stuttgart, Deutschland
RC Multiskan („Genesis Light“)	Labsystems, Quickborn, Deutschland
Schüttler	IKA- Labortechnik, Staufen, Deutschland
Schüttelwasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Sterile Arbeitsbank, HERAsafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermoschüttler	Braun, Tuttlingen, Deutschland

Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zellkulturinkubator, HERAccl	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.12 Kommerziell erhältliche Kits

Dual Glo™ Luciferase Assay System, 100 ml, Kat.-Nr. E2940,	Promega, Mannheim, Deutschland
ECL Advance Western Blotting Detection Kit, Kat.-Nr. RPN2135	Amersham, Little Chalfont, Großbritannien
G-Lisa™ RhoA Activation Assay, Kat.-Nr. BK124	Cytoskeleton, Denver, USA
Plas/mini Isolation Spin Kit, Kat.-Nr. A5172	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Plas/midi Isolation Spin Kit, Kat.-Nr. A5182	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
RNeasy Mini Kit (250), Kat.-Nr. 74106	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Midi Kit (50), Kat.-Nr. 74110	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.13 Spezielle Software

AIDA Software®	Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland
Ascent Software® for Luminoskan Ascent V 2.6	Labsystems, Quickborn, Deutschland
GraphPad InStat®	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
GraphPad Prism®	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
INTAS GDS® Gel Dokumentationssystem	INTAS, Hamburg, Deutschland
Microsoft® Office Paket 2003	Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
SPSS (Statistical Package For The Social Science	SPSS Software GmbH, München, Deutschland

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Gewinnung der Plasmide

Die für die nachfolgenden Versuche benötigten Plasmide wurden mittels Elektrottransformation in elektrokompente Bakterien (XL-1 Blue Electroporation Competent Cells) eingebracht und sind von diesen während ihrer kulturellen Anzucht vervielfältigt worden.

Die anschliessenden Schritte dienten der Plasmidgewinnung (Plas/mini-Isolation, Plas/midi-Isolation) und Reinigung sowie deren Verifizierung mittels Restriktionsverdau durch Restriktionsendonukleasen mit anschliessender Agarosegel-Elektrophorese. Elektroporierte und transformierte Bakterien wurden bei -80°C bevorratet. Die Konzentration der gewonnenen Plasmide ist absorptionspektrometrisch ermittelt worden. Die Plasmide wurden bei -20°C eingefroren.

Elution der DNA

Die kommerziell erhältliche Plasmid-DNA wurde in 100 μl Tris Elution Solution gelöst und bei 37°C unter Schütteln für dreißig Minuten inkubiert. Pro Ansatz wurden jeweils 2 μl DNA-Lösung auf Eis gestellt. Die restliche DNA-Lösung wurde bei -20°C eingefroren.

Herstellung elektrokompenter Bakterien

Mit einer Einzelkolonie E. coli XL1 Blue (Fa. Stratagene) wurde zunächst eine Übernachtskultur in 4 ml LB-Medium angeimpft. Am nächsten Tag wurden zu 50 ml LB-Medium 0,5 ml der Übernachtskultur gegeben und bis zu einer OD 600 zwischen 0,4 und 0,6 schüttelnd inkubiert (37°C , 230 rpm). Anschließend wurden die Bakterien für 15 min auf Eis gestellt und danach für 10 min bei $3000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert. Alle folgenden Arbeiten wurden auf Eis und bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Die Bakterien wurden zweimal in eiskaltem Aqua dest. resuspendiert, zentrifugiert und abschließend in 200 μl 20%igem Glycerin aufgenommen. Die elektrokompenten Bakterien wurden zu je 50 μl aliquotiert und sofort verwendet oder bis zum späteren Gebrauch bei -80°C eingefroren.

Elektrotransformation in elektrokompetente Bakterien

Vorbereitung der Elektroporation:

Die bei -80°C eingefrorenen Bakterien wurden kurz vor ihrer Elektroporation auf Eis aufgetaut. Spezielle Elektroporationsküvetten (diese sind an zwei gegenüberliegenden Seiten mit dünnen Plattenelektroden ausgekleidet, Elektrodenabstand 2 mm, Fa. PEQLab) wurden mit HCl, NaOH und H_2O gespült, 10 Minuten unter eine UV-Lampe gestellt, um mögliche in den Küvetten enthaltene Fremd DNA zu entfernen, und auf Eis gestellt. Pro Ansatz wurden 200 μl S.O.C. (Super Optimal Broth)-Medium bei 37°C aufgewärmt.

Durchführung der Elektroporation:

Zur vorbereiteten DNA-Lösung wurden pro Ansatz 50 μl Bakterienlösung hinzugefügt, mit der Pipette vermischt und in die vorbereitete Elektroporationsküvette gegeben. Mit gelockertem Deckel wurde die Küvette in den Küvettenschlitten des Gene Pulser II gesetzt. Die Bakterienzellen wurden einem kurzen elektrischen Impuls mit 2,5 kV ausgesetzt, der Poren in der Zellmembran entstehen ließ. Diese wurde dadurch kurzfristig permeabilisiert, und die DNA-Moleküle konnten aus der Lösung in das Innere der Bakterienzelle gelangen. Der Transformationssansatz wurde sofort mit S.O.C.-Medium versorgt und für 15 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Ausplattieren der Bakterien

Giessen der LB-Selektionsplatten:

Pro Transformationsansatz wurden zwei Petrischalen vorbereitet:

Die Herstellung des LB-Mediums erfolgte aus 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl (ad 1000ml H_2O) und wurde dann zwei bis vier Stunden autoklaviert. Fertiges LB-Medium wurde bei -4°C gelagert. Nun wurden 2,8 g Agarose und 200 ml LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben gegeben, einige Male in der Mikrowelle aufgeköcht, mit 200 μl Ampicillin (je nach Resistenzlage des Plasmids) versetzt und auf den Petrischalen verteilt. Diese wurden nach Auskühlen bei 4°C gelagert.

Ausstreichen der Bakterien auf LB-Selektionsplatten

Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde auf die erste Petrischale von zweien 10 μl der Bakterienlösung, auf die zweite Petrischale wurde der Rest der Bakterienlösung aufgetragen. Nach Gebrauch wurden die Pasteurpipetten abgeflammt und verworfen. Die Agarplatten wurden für 12 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Überführen der Bakterienkolonien in Flüssig LB Medium

Vorbereitung für die Plas/mini Isolation:

Pro Petrischale wurden vier Falcon Röhrchen jeweils mit 5 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin bestückt. Mit gelben Pipettenspitzen wurden einzelne Bakterien-Kolonien (von mittlerer Größe) vom Agar abgenommen und mitsamt der Pipettenspitze in das Flüssigmedium überführt (pro Falcon Röhrchen eine Kolonie). Daraufhin wurden die Bakterien über Nacht bei 37°C im Thermoschüttler (230 rpm) inkubiert.

Plas/mini Isolation Spin-kit

Dieser kommerziell erhältliche Kit basiert auf der Fähigkeit von DNA, in der Gegenwart hoher Konzentrationen chaotropischer Salze auf Silikat-Oberflächen zu adsorbieren. Die DNA wird in alkalischem Lysepuffer gelöst, der Überstand mit enthaltener DNA in eine Säule mit Filter geladen. Durch Zentrifugation wird die DNA auf der Silikat-Oberfläche des Filters adsorbiert, Fremdstoffe passieren den Filter ohne zu adsorbieren. Nun wird die DNA gewaschen und in sterilem H₂O gelöst. Im ersten Schritt wurde aus der Übernacht-Bakterienkultur mittels Zentrifugation ein Zellpellet gewonnen. Dieses wurde in 200 µl Resuspension Solution (ACL1) gelöst. Nun wurde die Alkaline Lysis Solution (ACL2) zugegeben, das Falcon Röhrchen mehrere Male vorsichtig geschwenkt und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 400 µl Neutralization/Binding Solution (ACGL3) zugegeben und das Falcon Röhrchen wiederum mehrmals geschwenkt. Es folgte die Zentrifugation bei 3000 rpm für 10 Minuten. Die DNA befand sich nun im Überstand, der in die Säule geladen wurde. Es folgte die Zentrifugation der Säule (in einem Zentrifugationsgefäß) für 1 Minute bei 3000 rpm. Bei diesem Schritt blieb die DNA auf der Silikat-Oberfläche des Filters haften. Das Filtrat wurde entfernt und nach Zugabe von 500 µl First Wash Solution (ACW) auf den Filter wurde erneut für 1 Minute zentrifugiert (3000 rpm). Wiederum wurde das Filtrat entfernt und es folgte ein zweiter Waschschriff mit der Second Wash Solution (AC1, 700 µl) mit anschließender Zentrifugation für 1 Minute bei 3000 rpm. Um die DNA nun aus dem Filter herauszulösen, wurde die Säule in ein neues Zentrifugationsgefäß gestellt, mit 60 µl sterilem H₂O bestückt und 3 Minuten inkubiert. Die Säule wurde entfernt, die DNA befand sich nun im Filtrat. Das Einfrieren der Plasmide erfolgte bei -20°C.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäurelösungen erfolgte in einer Quartzküvette in einem Volumen von 100 µl im Photometer Ultrospec 2000 (Fa. Pharmacia Biotech) bei 260 nm gegen eine Leerprobe. Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Die Purin- und Pyrimidinringe der Nukleinsäurebasen zeigen nach Anregung mit UV-Licht bei 260 nm eine maximale Absorption. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Absorptionswert von 1,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngige DNA. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 230, 260 und 280 nm erlaubt außerdem eine Aussage über die Reinheit der DNA-Präparation. Für eine ausreichende Reinheit der gemessenen Nukleinsäuren galten folgende Richtwerte:

$$E_{260}/E_{280} = 1,8$$

$$E_{260}/E_{230} = 2,2$$

Verifizierung der hergestellten Plasmide

Die Plasmide wurden mit Restriktionsendonukleasen geschnitten (vergleiche Tabelle 3-1). Diese bauen DNA-Moleküle ab, indem sie die Phosphodiesterbindungen zwischen den Nukleotiden eines DNA-Stranges spalten. Da diese Enzyme die Phosphodiesterbindungen im Inneren eines DNA-Moleküls spalten, nennt man sie Endonukleasen. Für jedes Enzym gibt es eine bestimmte palindromische Erkennungssequenz, an der es die DNA spaltet. Einige Enzyme spalten beide DNA-Stränge in der Mitte der Erkennungssequenz, so dass glatte Enden (blunt ends) entstehen, andere Restriktionsendonukleasen spalten dagegen die DNA-Stränge so, dass die entstehenden DNA-Fragmente an ihren Enden kurze überstehende Einzelstrangabschnitte besitzen, die man als klebrige Enden (sticky ends) bezeichnet.

Tabelle 3-1: Auflistung der mittels Restriktionsendonukleasen gespaltenen Plasmide, sowie der palindromischen DNA-Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen mit enthaltenen Schnittstellen.

Plasmide	Restriktions- endonuklease	Erkennungssequenz
PAR 1, pCMV6-XL5, 8370bp	Not I	5`...GC↓GGCCGC...3' 3'...CGCCGG↓CG...5'
PAR 2, pcDNA 3.1, 5428bp	PstI	5'...CTGCA↓G...3' 3'...G↓ACGTC...5'
EPCR, pEF-BOS, 5685bp	XbaI	5'...T↓CTAGA...3' 3'...AGATC↓T...5'
EPCR, pEF-BOS, 5685bp	BstX1	5'...C C A N N N N N↓N T G G...3' 3'...G G T N↓N N N N N A C C...5'

Zu analytischen Zwecken wurde 1 bis 3 µg DNA (20 µl Ansatz) mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten. 1 bis 10 U Restriktionsenzym pro 1 µg DNA wurden für 1 bis 3 h in dem vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer bei geeigneter Reaktionstemperatur inkubiert. Zur Vorbereitung für die nachfolgende Agarosegel-Elektrophorese wurden 5 µl farbiger Elektrophorese Laufpuffer zugegeben.

DNA Gelelektrophorese

DNA-Fragmente mit einer Größe von 100 bis 10.000 bp können in der Agarosegelelektrophorese [186] aufgetrennt werden. Nukleinsäuren (DNA) sind aufgrund ihrer Phosphatgruppen ionisiert, und die Polydesoxynukleotide liegen als Polyanionen vor. Sie wandern daher bei der Elektrophorese von der Kathode zur Anode. In der Gelelektrophorese werden die DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt, d.h. die kleinsten DNA-Fragmente wandern am schnellsten und die größten DNA-Fragmente am langsamsten zur positiven Elektrode. Die Elektrophorese wurde solange durchgeführt, bis der im Ladepuffer enthaltene Farbstoffmarker (Bromphenolblau) die erforderliche Trennstrecke zurückgelegt hatte. Das zum Agarosegel hinzugefügte Ethidiumbromid interkaliert zwischen zwei benachbarten Basenpaaren der DNA, die dadurch teilweise entwunden und gedehnt wird. Nach Anregung mit UV-Licht der Wellenlängen 254, 302 oder 366 nm (Geldokumentationssystem Alpha Imager 2200, Fa. Alpha-Innotech) fluoresziert der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex im sichtbaren Bereich (500 bis 590 nm) als rot-orange leuchtende Bande.

Giessen eines 1%igen Gels für die DNA Gelelektrophorese:

In einem Erlenmeyerkolben wurden 1,5 g Agarose und 150 ml 1x TAE-Puffer mehrmals in einer Mikrowelle aufgekocht, bis eine klare Lösung entstanden war. Diese wurde daraufhin unter fließendem Wasser auf 50 bis 60°C abgekühlt, mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt und in die vorbereitete Gelkammer (mit eingespanntem Probenkamm) gegossen. Die Aushärtung dauerte ca. 30 Minuten.

Durchführung der Agarosegelelektrophorese:

Das fertig ausgehärtete Gel wurde zusammen mit 1x TAE-Puffer in die Elektrophorese-Kammer gegeben. Die Proben (25 µl des oben hergestellten Ansatzes für den Restriktionsverdau) und der DNA Größenstandard (100 bp DNA-Ladder, 1 µg/µl, mit farbigem Elektrophorese-Laufpuffer versetzt) wurden jeweils in eine Probentasche (slot) aufgetragen. Die DNA wurde je nach Größe des Gels für 1 bzw. 2 Stunden bei einer Gleichspannung von 120 Volt aufgetrennt. Die unter UV-Licht sichtbaren Banden wurden mit dem Geldokumentationssystem Alpha Imager 2200 (Fa. Alpha-Innotech) elektronisch gespeichert und zur Verifizierung mit den Standardgrößen verglichen.

Plas/midi Isolation Spin-Kit

Vorbereitung für den Plas/midi Isolation Spin-Kit:

Um für nachfolgende Experimente größere Mengen Plasmid DNA zu gewinnen, wurde nach Verifizierung der in der Plas/mini Isolation gewonnenen Plasmide mittels Restriktionsverdau durch Restriktionsendonukleasen eine Plas/midi Isolation durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Bakterienkultur aus 200 ml LB-Medium, 200 µl Bakteriensuspension (Die Bakteriensuspension stammte aus oben beschriebener Pla/mini Isolation, sie war bei -80°C eingefroren) und 200 µl Ampicillin hergestellt und für 12 Stunden bei 37°C inkubiert.

Das Prinzip des kommerziell erhältlichen Plas/midi Isolation Spin-Kits beruht auf der Fähigkeit der Plasmid-DNA, zu 99% an spezielle Ionenaustausch-Membranen zu binden. Kontaminationen passieren die Membranen ungehindert, ohne adsorbiert zu werden. In den folgenden Arbeitsschritten wird die Plasmid DNA gewaschen, durch eine hochkonzentrierte Ionenlösung eluiert, von überschüssigen Salzen befreit, durch Präzipitation konzentriert und in H₂O gelöst.

Die Übernacht-Bakterienkultur wurde zentrifugiert und das entstandene Pellet in 5 ml Resuspension Solution (ACL1) resuspendiert. Nach Zugabe von 5 ml Alkaline Lysis Solution (ACL2) wurde das Zellysats vorsichtig geschwenkt und drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses war jetzt von klarer und durchsichtiger Farbe. Nun wurden 5 ml Neutralization Solution (ACL3) hinzugefügt

und vorsichtig geschwenkt. Dadurch kam es zu einer massiven Ausfällung von SDS-Salzen, chromosomaler DNA und Proteinen. Im Anschluß wurde die Lösung auf einen Filter gegeben, der in einem 50 ml Falcon Röhrchen plaziert war, und bei 2500 bis 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das klare Filtrat wurde im nächsten Schritt in eine Säule gegeben, die eine Ionenaustausch-Membran enthielt. Das Filtrat passierte diese Membran durch Schwerkraft. Anschließend wurde die Ionenaustausch-Membran mit daran gebundener DNA mit 20 ml der Wash Solution (ACK2) gewaschen, um Verunreinigungen wie z.B. Proteinreste zu entfernen. Die Säule wurde in ein neues Falcon Röhrchen gestellt und die DNA mittels Elution Solution (ACK3), die die Membran durch Schwerkraft passierte, von der Ionenaustausch-Membran gelöst. Zum fertigen Eluat mit enthaltener Plasmid-DNA wurden 25µl Precipitation Enhancer (dieser macht das Pellet durch bläuliche Anfärbung sichtbar) und 5 ml Isopropanol gegeben. Die DNA-Lösung wurde gemischt und bei 15.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen und noch mal bei 15.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 400 µl H₂O gelöst. Die Plasmid-Konzentration wurde absorptionsspektrometrisch gemessen. Das Einfrieren der Plasmide erfolgte bei -20°C.

Kryokonservierung von Bakterien

Für die Lagerung von Bakterien bei -80°C wurden 500 µl einer Bakterien Übernachtskultur mit 500µl 50 %igem Glycerin versetzt.

3.1.2 RNA Aufbereitung

Die Genexpression in HEK293T-Zellen wurde mittels RNA-Isolierung, Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und anschließender Taq-Polymerase-Kettenreaktion überprüft. Die Auswertung erfolgte im Geldokumentationssystem Alpha Imager 2200.

RNA Isolierung

Zur Isolation von Gesamt RNA wurden 3-10 x 10⁶ Zellen verwendet. Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des „RNeasy Mini Kit“ (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dabei wurden die Zellen zuerst in einem denaturierenden Guanidinthiocyanat-enthaltenden Puffer lysiert (dieser Puffer inaktiviert RNAsen) und mittels „QIAshredder-Säulen“ (Fa. Qiagen)

homogenisiert. Anschließend wurde RNA, die größer als 200 bp war, an eine Siliziummatrix gebunden, gewaschen und mit RNase-freiem H₂O eluiert. Die Konzentration der isolierten RNA wurde anschließend photometrisch bestimmt und die Integrität der RNA über ein RNA-Agarosegel bestätigt.

HEK293T-Zellen wurden in 6 cm-Schalen kultiviert und mit *Polyfect*® Transfection Reagent transfiziert (vergleiche auch 3.3.3). Pro Schale mit HEK293T-Zellen wurden 350 µl Pufferlösung (RLT mit beta-Mercaptoethanol versetzt) zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellscraper abgeschabt und resuspendiert. Das Lysat wurde in eine „Qiashredder Säule“ überführt und für zwei Minuten bei 9000 x g zentrifugiert. Die Zugabe von 1 Vol. (350 µl) 70 %igem Ethanol ließ die RNA ausfällen. Nun wurde die Lösung in eine „RNeasy-Mini-Säule“ überführt, 15 s bei 9000 x g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Es folgte die Zugabe von 700 µl RW1-Puffer und erneutes Zentrifugieren (15 s, 9000 x g). Wiederum wurde das Filtrat verworfen. Die Säule wurde in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und nach Zugabe von 500 µl RPE-Puffer wurde nochmals 15 s bei 9000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Dieser letzte Waschschrift wurde nochmals wiederholt (2 min, 9000 x g), die Säule in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und nochmals für 1 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die RNA in 30 µl H₂O_{DEPC} eluiert (Zentrifugation für 1 min, 9000 x g).

Reverse Transkription

Bei der Amplifikation von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden spezifische DNA-Polymerasen verwendet, welche DNA-abhängig sind, d.h. sie sind nicht in der Lage, RNA zu amplifizieren. Daher wird zunächst eine Reverse Transkriptase (Rt) eingesetzt. Sie ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, mit deren Hilfe RNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Die cDNA kann im Anschluß als Ausgangsprodukt in einer PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren. Die Produkte der Rt-PCR lassen sich in einem Agarosegel (mit Ethidiumbromid) auftrennen und im Geldokumentationssystem Alpha Imager 2200 mittels UV-Licht auswerten.

Zur Initiation der DNA-Synthese wurde ein Oligo-d(t)-Primer verwendet, welcher komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA war. Im zweiten Schritt wurde ein genspezifischer Primer eingesetzt. Die mittels der RNA Isolierung gewonnene RNA wurde mit H₂O_{DEPC} auf 0,5µg/µl verdünnt in einem Volumen von 6 µl aufgenommen und auf Eis gestellt. In PCR-Tubes (auf Eis) wurden pro Ansatz 6 µl 25 µM p(dT)₁₅-Primer vorgelegt, dazugegeben wurden jeweils die 6 µl RNA-Lösung (3 µg). Die Proben wurden homogenisiert und abzentrifugiert. Das erste Rt-

Programm wurde gestartet (4 min, 72°C, PCR-Thermocycler) und die Proben in die Maschine gestellt, sobald der Deckel eine Temperatur von 100°C und der Block eine Temperatur von 72°C erreicht hatte (Heißstart). Für den zweiten Teil der Rt wurde folgender Reaktionsansatz auf Eis hergestellt:

- 20,3 µl H₂O_{DEPC}
- 9,0 µl 5 x RT Puffer
- 1 µl dNTP Mix (220 µM Endkonzentration)
- 2,3 µl RNase Out (92 U/Reaktion)
- 0,45 µl BSA (100 ng/µl Endkonzentration)
- 0,6 µl AMV (Avian Myeloblastosis Virus)

Je 33 µl dieses Ansatzes wurden zu den Proben aus der ersten Rt hinzu gegeben, homogenisiert und das zweite Rt-Programm wurde gestartet (Heißstart, Transkription: 90 min bei 42°C, Denaturierung: 10 min bei 94°C). Die Proben konnten direkt für eine Taq-Polymerase-PCR verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wird eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Stranges zu amplifizieren. Im ersten Schritt (Initialisierung/Denaturierung) wird die doppelsträngige DNA auf 94 -96°C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, aufgebrochen. Im zweiten Schritt (Annealing) kommt es bei einer bestimmten Primer spezifischen Temperatur zur Anlagerung der Primer an die einzelnen DNA-Stränge. Im dritten Schritt (Elongation) füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3`-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Die Temperatur hängt von der verwendeten DNA Polymerase ab. Mit steigender Zyklenzahl kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der gewünschten DNA-Menge (vergleiche Tabellen 3-2 bis 3-6). Im Anschluß wurden die PCR-Produkte auf einem Agarosegel kontrolliert. Das PCR-Gemisch kann bei 4°C ca. zwei Wochen gelagert werden.

Durchführung der PCR:

PCR-Reaktionsansatz mit Taq Polymerase:

- 39 μ l $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$
- 1 μ l dNTP Mix (Endkonzentration 200 μ M)
- 2 μ l Primer (Endkonzentration 300 nM)
- 5 μ l 10 x PCR Puffer
- 0,5 μ l BSA (Endkonzentration 100 ng/ μ l)
- 0,5 μ l Taq Polymerase

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis pipettiert. 48 μ l des Reaktionsansatzes wurden zu 2 μ l vorgelegter Rt cDNA (entsprechen 134 ng Gesamt-RNA aus RT) hinzugefügt, homogenisiert, und in den auf 94°C Blocktemperatur vorgeheizten PCR-Thermocycler gestellt (Heißstart).

Tabelle 3-2: PCR-Programm für die Taq DNA-Polymerase und PAR 1.

Zyklus	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	1 x
Denaturierung	30 s	94 °C	25-30 x
Anlagerung	30 s	55 °C	
Verlängerung	45 s	72 °C	
Finale Verlängerung	5 min	72 °C	1 x
Kühlung	unendlich	4 °C	

Tabelle 3-3: PCR-Programm für die Taq-DNA-Polymerase und GAPDH.

Zyklus	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	1 x
Denaturierung	30 s	94 °C	25 x
Anlagerung	60 s	55 °C	
Verlängerung	120 s	72 °C	
Finale Verlängerung	5 min	72 °C	1 x
Kühlung	unendlich	4 °C	

Tabelle 3-4: PCR-Programm für die Taq-DNA-Polymerase und PAR 2.

Zyklus	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	1 x
Denaturierung	60 s	94 °C	22-24 x
Anlagerung	60 s	55 °C	
Verlängerung	60 s	72 °C	
Finale Verlängerung	5 min	72 °C	1 x
Kühlung	unendlich	4 °C	

Tabelle 3-5: PCR-Programm für die Taq-DNA-Polymerase und S1P1.

Zyklus	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	1 x
Denaturierung	45 s	94 °C	33 x
Anlagerung	45 s	69 °C	
Verlängerung	45 s	72 °C	
Finale Verlängerung	5 min	72 °C	1 x
Kühlung	unendlich	4 °C	

Tabelle 3-6: PCR-Programm für die Taq-DNA-Polymerase und EPCR.

Zyklus	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	9 min	95 °C	1 x
Denaturierung	30 s	95 °C	2 x
Anlagerung	30 s	66 °C	
Verlängerung	40 s	72 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	2 x
Anlagerung	30 s	64 °C	
Verlängerung	40 s	72 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	2 x
Anlagerung	30 s	62 °C	
Verlängerung	40 s	72 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	2 x
Anlagerung	30 s	60 °C	
Verlängerung	40 s	72 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	22-26 x
Anlagerung	30 s	58 °C	
Verlängerung	40 s	72 °C	
Finale Verlängerung	7 min	72 °C	1 x
Kühlung	unendlich	4 °C	

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Proteingewinnung für die SDS-Page

Für die Proteingewinnung wurden HUVEC in Zellkulturschalen (\varnothing 6 cm) nach Abnahme des Kulturmediums mit Lysepuffer behandelt. Die Proben wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt und fünfmal für 10 s mit Ultraschall (30 Hz) homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden bei 4°C und 16000 x g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend gleich verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe im elektrischen Feld wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt [187, 188]. Dazu wurde 10 bis 50 µg Protein in 1xSDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Je nach Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins variierte der prozentuale Anteil der Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung des Trenngels von 7 bis 15 %. Die Sammelgele hatten eine konstante Acrylamid-Bisacrylamid Konzentration von 5 %. Die vertikale Gelelektrophorese wurde bei 200 V in einer Mini-Gelapparatur (Protean II, Biorad) durchgeführt. Diese Kammer wurde mit 1xSDS-Laufpuffer gefüllt. Als Molekulargewichtsstandard wurde der „Roti-Mark Standard“ der Firma Roth verwendet. An die SDS-PAGE schloss sich ein Western Blot (siehe 3.2.3) an.

10 x SDS-Laufpuffer:

- 250 mM Tris
- 2,5 M Glycin
- 1 % SDS

4 x SDS-PAGE Probenpuffer:

- 50 % Glycerin
- 10 % β -Mercaptoethanol
- 7,5 % SDS
- 300 mM Tris pH 6,8
- 0,25 % Bromphenolblau

Die fertige Lösung wurde vor der Verwendung durch einen Papierfilter filtriert.

3.2.3 Western-Blot

Mit Hilfe des Western-Blots können durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine qualitativ und quantitativ nachgewiesen, sowie deren Größe näherungsweise bestimmt werden. Die Proteine werden dabei positionsgenau elektrophoretisch auf eine Membran transferiert und immunochemisch mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Fa. Schleicher & Schuell) fand in einer mit Western-Blot-Puffer gefüllten Blotkammer der Firma BIO-RAD im Nassblotverfahren statt. Die Transferzeit betrug 60 bis 105 min bei 100 V. Nach Abschluss des Transfers wurden die Proteine mit einer 0,2 %igen Ponceau S-Lösung angefärbt. Überschüssige Ponceau S-Lösung wurde mit H₂O abgespült. Anschließend wurde die Membran mit TBST-Puffer (Tris-Buffered Saline Tween-20) entfärbt und die freien Bindungsstellen der Membran für 60 min mit „Roti-Block“ der Firma Roth blockiert. Danach wurde die Membran 5 min in TBST-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper in TBST-Puffer erfolgte entsprechend den in Tab. 3-7 angegebenen Bedingungen. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Der entsprechende Sekundärantikörper (Tabelle 3-7) wurde in TBST-Puffer verdünnt und für 45 min bei RT mit der Membran inkubiert. Nach drei weiteren 10-minütigen Waschschritten wurden die Primär-Sekundär-Antikörperkomplexe über die an die Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase mit dem Chemilumineszenz-Substrat „Lumi-Light Plus“ der Firma Roche nachgewiesen. Die Signale wurden mit einem Geldokumentationssystem (Fa. Alpha-Innotech) ausgewertet.

Tabelle 3-7: Primär- und Sekundärantikörper (h = human, r = Ratte, m = Maus, ÜN = über Nacht).

Primärantikörper	Spezies	Konzentration	Bedingungen	Sekundärantikörper
Anti-RhoA	m, r, h	1 µg/ml	ÜN, 4 °C	Maus (1:10`000)
Par-2 (Sam11)	m,r,h	1-3 µg/ml	ÜN, 4 °C	Maus (1:10`000)
Anti-EPCR	h	1-3 µg/ml	ÜN, 4 °C	Kaninchen (1:80`000)
ThrombinR (ATAP2)	h, r	1-2 µg/ml	ÜN, 4 °C	Kaninchen (1:80`000)

Puffer und Lösungen für den Western-Blot:

WB-Puffer:

- 50 mM Tris
- 400 mM Glycin
- 20 % Methanol

Ponceau S-Lösung:

- 5 % Essigsäure
- 0,2 % Ponceau S

TBST-Puffer:

- 100 mM Tris pH 7,4
- 1,5 M NaCl
- 0,1 % Tween 20

3.2.4 Densitometrie

Die Auswertung der Bandenintensität aus dem Pulldown Assay (siehe 3.3.6) bzw. Western-Blot erfolgte mittels Densitometrie. Dafür wurde das Computerprogramm AIDA verwendet. Die Banden des aktivierten RhoA wurden dabei in Verhältnis zu den Banden des gesamten RhoA gesetzt. Die gebildete Ratio wurde für die Auswertung herangezogen.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Zellkultur

Verwendet wurden HEK293-Zellen (aus HEK293-Zellen, Human Embryonic Kidney Cells) gewonnen, die stabil transfiziert wurden mit dem SV40-large-T-Antigen und HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells). Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer HeraSafe Werkbank (Fa. Heraeus) durchgeführt. Die verwendeten Materialien und Lösungen wurden steril bezogen oder vor Gebrauch autoklaviert. Die Zellkulturen wurden in Brutschränken (HeraCell, Fa. Heraeus) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ (HEK293-Zellen, HUVEC) kultiviert.

Für HEK293T-Zellen wurde als Wachstumsmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Fa. Sigma-Aldrich) verwendet, das mit 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin und 10 % fetalem Kälberserum (FCS) (DMEkomp-Medium) versetzt wurde. Für die Transfektion der HEK293T-Zellen wurde ein Serum reduziertes DME-Medium mit 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 0,5 % FCS eingesetzt (DMERed-Medium). Für die Auswertung des Luciferase Assays im Luminoscan Ascent (Fa. Labsystems) wurde DME-Medium ohne Zusätze verwendet.

Für die HUVECs wurde als Wachstumsmedium Endothelial Cell Growth Medium (Fa. PromoCell) verwendet. Dem Medium wurden folgende Bestandteile, enthalten im „Supplement Pack“ (Fa. PromoCell), zugesetzt (Endothelial Cell Growth Medium- komplett): 2 % FCS, 1µg/ml Hydrocortison, 0,1 ng/ml hEGF (human Endothelial Growth Factor), 1 ng/ml hbFGF (human basic Fibroblast Growth Factor), ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement) zusammen mit Heparin in einer finalen Konzentration von 0,4 %. Desweiteren wurden 5 ng/ml Amphotericin B und 50 µg/ml Gentamycin zugesetzt. 24 Stunden vor jedem Experiment wurde das Kulturmedium von den konfluent in Multi-Loch-Platten bzw. Petrischalen gewachsenen HUVECs abgesaugt und einmal mit Endothelzell-Kulturmedium, welches die oben angeführten Zusätze mit Ausnahme von Hydrocortison enthielt, gewaschen. Danach wurden die HUVECs bis zum Experiment in diesem cortisonfreien Medium belassen (Cortison würde das Ergebnis verfälschen). Unmittelbar vor dem Experiment wurde das cortisonfreie Medium durch ein Medium ersetzt, welches keine Wachstumsfaktoren und kein FCS, sondern lediglich die bereits aufgeführten Antibiotika enthielt, um Störeffekte der Wachstumsfaktoren bzw. des FCS auszuschließen.

Zellen isolieren, kultivieren und passagieren

HEK293T-Zellen:

Je nach Bedarf wurde eine bestimmte Anzahl an 10-cm-Schalen (Fa. Nunc) ca. 20 Minuten mit Collagen Type I (ca. 3 ml pro Schale, 1:100 in kaltem PBS verdünnt) beschichtet. Das Medium einer konfluent (gesplittet wurde bei Konfluenz alle zwei bis drei Tage) mit HEK293T-Zellen bewachsenen 10-cm-Schale wurde abgenommen, verworfen und die Zellen wurden mit ca. 5 ml PBS (auf 37°C angewärmt) fünf Minuten im Brutschrank gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurde, um die Zellen vom Schalenboden abzulösen, für drei Minuten auf 37°C angewärmtes Trypsin-EDTA (3 ml) hinzugegeben und im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Enzymaktivität wurden 5 ml DMEkomp-Medium zugefügt. Dann wurden die Zellen in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt, das Medium ca. 5 Minuten bei 1000 U/min abzentrifugiert, der

Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml DMEkomp-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden daraufhin im Verhältnis 1:10 gesplittet.

HUVECs:

Zellisolierung und Erstellung einer Primärkultur:

HUVECs wurden nach der Methode von Jaffe et al. [189] aus der Vena umbilicalis menschlicher Nabelschnüre isoliert. Die Nabelschnüre wurden von der Klinik für Gynäkologie des Universitätsklinikums Mannheim bereitgestellt (Ethikantrag-Nr.: 109/2005). Die Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Nabelschnur wurde äußerlich mit 70 %igem Alkohol gesäubert und beide Enden mit einem Skalpell gekürzt. In jedes der dadurch entstandenen glatten Enden der Vena umbilicalis wurde ein Dreiwegehahn eingeführt, der mit jeweils einem Kabelbinder befestigt wurde. Die Vene wurde nun mehrmals mit steriler kalzium- und magnesiumfreier phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS) gespült, bis sämtliche Blutreste entfernt waren. Als nächstes wurde die Vene mit erwärmter Dispase-II-Enzymlösung gefüllt, um die Endothelzellen von der Intimaschicht der Gefäßwand abzulösen (vorsichtiges Massieren der Vene verstärkte diesen Effekt noch). Nach einer Inkubationszeit von ca. 40 Minuten bei 37 °C (Brutschrank) wurde die Dispaselösung mit darin enthaltenen Zellen in einen sterilen Zentrifugationsfalcon überführt. Durch Nachspülen mit Endothelzell-Kulturmedium, das 2 % FCS enthielt, konnte die Ausbeute an Zellen erhöht werden. Die Zellsuspension wurde bei 1500 U/min zentrifugiert, wobei sich die Endothelzellen als Pellet absetzten. Dieses wurde nach Abnahme und Verwerfen des Überstandes in Endothelzell-Kulturmedium resuspendiert und in mit Gelatine beschichtete Kulturflaschen überführt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank. Nach 24h wuchsen die Endothelzellen auf der Gelatineschicht adhärent, so dass durch einen Mediumwechsel die noch verbliebenen Erythrozyten und andere nicht adhärente Zellen des peripheren Blutes entfernt werden konnten.

Kultivieren und Passagieren von HUVECs:

Die Endothelzellen wurden routinemäßig in Endothelzell-Kulturmedium in einer mit Gelatine beschichteten 75-cm²-Kulturflasche angezüchtet. Das Medium der adhärent wachsenden Zellen wurde spätestens alle drei Tage gewechselt. Waren die Endothelzellen konfluent gewachsen, so wurden sie mit Hilfe von Trypsin-EDTA-Lösung passagiert: Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml angewärmter PBS-Lösung gewaschen. Nach Abnahme des PBS und Zugabe von 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen unter ständiger mikroskopischer

Kontrolle für zwei bis vier Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis ein Abrunden und Ablösen der Endothelzellen erkennbar war. Gestoppt wurde dieser enzymatische Vorgang durch Zugabe von Endothelzell-Kulturmedium. Das im Kulturmedium enthaltene FCS inaktiviert Trypsin. Zum Zentrifugieren wurde die Endothelzell-Suspension in ein steriles 50 ml-Falcon-Plastikröhrchen transferiert und für 5 Minuten bei 1000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert, und die Zellen in mit 2 %iger Gelatine beschichteten Petrischalen oder Multi-Loch-Platten im Verhältnis 1:4 bis 1:8 verdünnt.

Zellen einfrieren und auftauen

HEKsA201-Zellen:

Zum Einfrieren wurden die Zellen einer Ø10 cm Zellkulturschale trypsiniert, das Pellet in 2 ml Einfriermedium (100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10% FCS, 10% DMSO) aufgenommen und anschließend bei -80°C gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden 20ml DMEkomp-Medium in einer Zellkulturflasche (75 mm²) auf RT erwärmt. Das Kryoröhrchen mit den eingefrorenen Zellen wurde in der Hand erwärmt und zügig in die Kulturflasche überführt.

HUVECs:

Beim Einfrieren wurde zunächst wie beim Passagieren der HUVECs vorgegangen. Das nach dem Zentrifugieren gewonnene Zellpellet wurde dann in Endothelzell-Kulturmedium-komplett mit 20 % FCS unter Zusatz von 10 % DMSO resuspendiert und in 2ml-Kryoröhrchen überführt. Nach einer Stunde auf Eis konnten die Zellen weiter auf -20 °C heruntergekühlt werden. Nach mehreren Tagen wurden die Zellen dann bei -80 °C eingefroren, wo sie mehrere Monate aufbewahrt werden konnten. Das Auftauen der einzelnen Röhrchen geschah möglichst schnell in 37 °C warmem Wasserbad. Die DMSO-Zellsuspension wurde abzentrifugiert, die Zellen im angewärmten Kulturmedium resuspendiert und in gelatinebeschichtete Kulturflaschen überführt.

3.3.2 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in HEKsA201-Zellen

Die HEKsA201-Zellen wurden mit dem polykationischen Transfektionsreagenz *Polyfect*® (Fa. Qiagen) transfiziert. Durch Bindung der negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Moleküls an die positiv geladenen Aminogruppen, den sog. Dendrimeren, bildet sich ein aktivierter Komplex. Der Komplex besitzt eine insgesamt positive Ladung und bindet so an die negativ geladenen

Oberflächenrezeptoren der Zellen, was zu einer endozytotischen Aufnahme der DNA in die Zelle führt. Die Zellen wurden entweder 24 h nach dem Aussähen auf Zellkulturschalen (Ø10cm) oder gleichzeitig mit dem Aussähen der Zellen („Reverse Transfektion“) transfiziert. Dafür wurde die zu transfizierende Plasmid-DNA mit dem Transfektionsreagenz nach Angaben des Herstellers gemischt (Tabelle 3-8) und für 10 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium auf den Zellen durch DMERed-Medium ersetzt oder die geernteten Zellen direkt in DMERed-Medium ausgesät. Anschließend wurden die gebildeten DNA-Transfektionsreagenz-Komplexe hinzugefügt. Die Zelldichte betrug ca. 80-90 %. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen weiter verwendet.

Tabelle 3-8: Polyfect®-Transfektionsreagenz und dessen Anwendung.

Transfektionsreagenz (TR)	Schalengröße	Zellen	Menge TR	Menge DNA (ohne Leervektor)
Polyfect®	Ø 6 cm	HEK293A201	40 µl	4 µg
	96-Well-Platte		10 µl	0,1 µg
	48-Well-Platte		2,5 µl	0,25 µg

3.3.3 Transfektion von HEK293A201-Zellen für die PCR

Konfluent auf 6-cm-Zellkulturschalen gewachsene HEK293A201-Zellen wurden mit insgesamt 8 µg Plasmid-DNA (in 150 µl DMERed-Medium) transfiziert. Davon bestanden 4 µg aus Rezeptor-codierender Plasmid-DNA und 4 µg aus sogenannten Leervektoren (pcDNA-ZEO). Als nicht transfizierte Kontrollen dienten HEK293A201-Zellen, die nur mit Leervektoren pcDNA-ZEO (8 µg) transfiziert wurden. Inkubiert wurde im Brutschrank für 48 Stunden.

Die Negativkontrollen beinhalteten statt DNA ein entsprechendes Volumen an Wasser. Um das Gelingen der RT-PCR zu kontrollieren, wurde das House-Keeping Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitgeführt. Mit konfluent gewachsenen unbehandelten HUVEC wurde eine Reverse Transkription durchgeführt. Diese Probe wurde als Positivkontrolle für die folgende Polymerase Kettenreaktion verwendet. Zusätzlich wurde jede der transfizierten Proben doppelt angesetzt, um die optimale Zyklenzahl zur Darstellung jedes einzelnen Vektors herauszufinden.

3.3.4 Luciferase Assay

Mit Hilfe des „Dual Glo™ Luciferase Assay System“ der Firma Promega [190, 191] wurde die Aktivierung des „Serum Response Factor“ (SRF), welcher an die Promotor-Regulatorsequenz „Serum Response Element“ (SRE) bindet und damit die Transkription von Genen stimuliert, untersucht. Dabei wurde die Bildung der Glühwürmchen (Firefly-)-Luciferase (*Photinus pyralis*) als Maß für die Induktion der SRF-abhängigen Gentranskription verwendet. Diese Luciferase wird von dem pSRE.L-Plasmid (Dr. J. Mao, Dr. D. Wu, University of Rochester, Rochester, New York, USA) kodiert. Als Kontrollvektor wurde das pRL.TK-Plasmid (Fa. Promega) verwendet, welches den Herpes Simplex Virus Thymidin-Kinase-Promotor (HSV TK) besitzt, der für eine schwache, aber konstitutive Expression der Renilla-Luciferase (*Renilla reniformis*) sorgt. Beide Enzyme erzeugen ein Biolumineszenzsignal, können aber durch Verwendung unterschiedlicher Substrate in einer Probe unabhängig voneinander detektiert werden. Das Substrat der *Photinus pyralis*-Luciferase ist Luciferin und das der *Renilla reniformis*-Luciferase ist Coelenteracin. Die Kotransfektion beider Plasmide ermöglichte eine interne Kontrolle der Transfektionseffizienz und Minimierung von Messfehlern (Abb. 3-1).

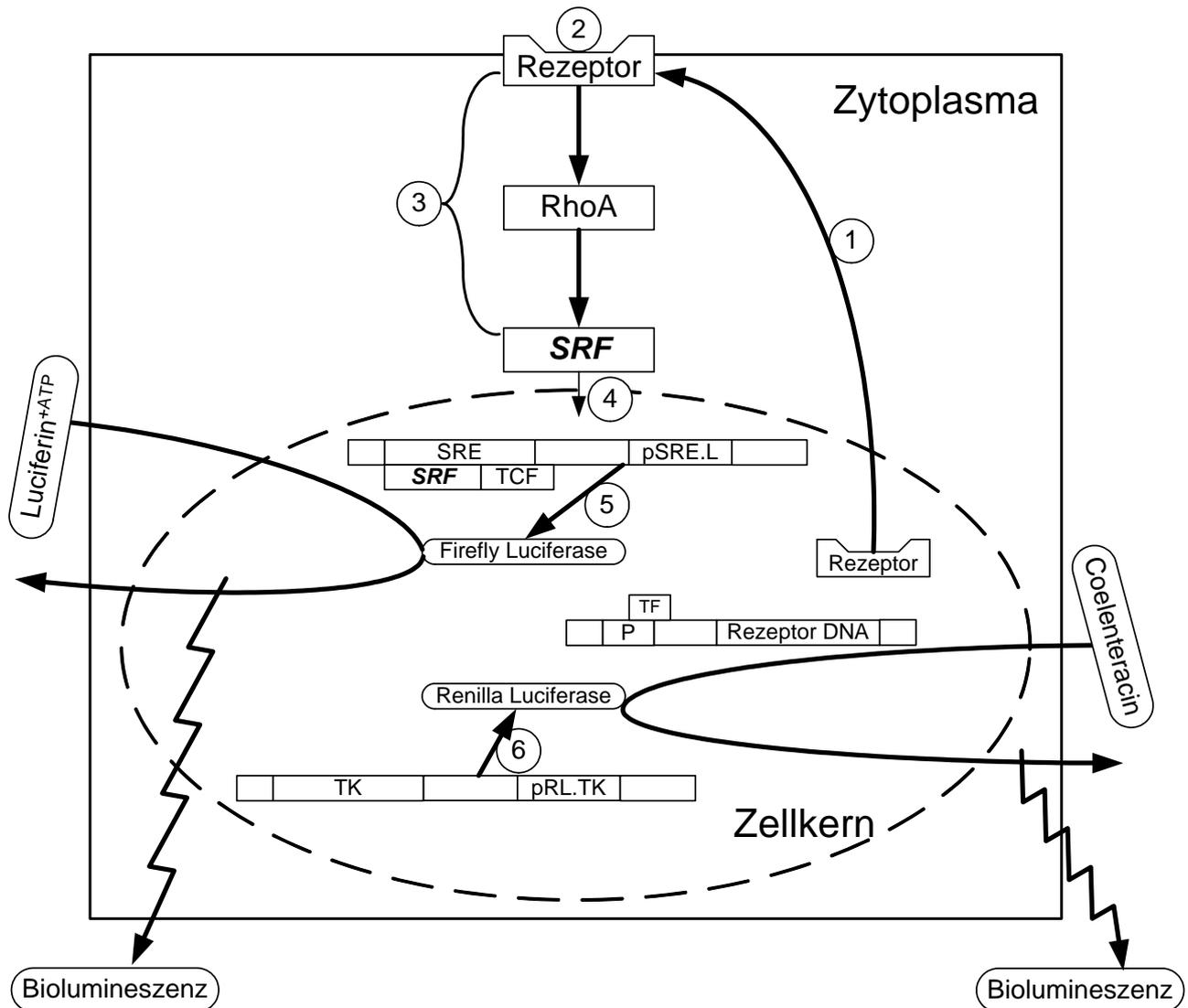


Abb. 3-1: Schematische Darstellung des Luciferase Assay Prinzips.

Durch Transfektion gelangen die Plasmide pSRE.L (Firefly-Luciferase), pRL.TK (Renilla-Luciferase) sowie ein Plasmid, das die Kodierung für den zu untersuchenden Rezeptor enthält, in den Kern der Zelle. Dort kommt es, eingeleitet durch einen Transkriptionsfaktor, zur Expression des zu untersuchenden Rezeptors. Dieser wird in die Zytoplasmamembran der Zelle eingebaut (1) und nimmt dort seine Funktion auf. Nach Andocken eines spezifischen Liganden an den Rezeptor (2) wird eine Signaltransduktionskaskade im Inneren der Zelle „in Gang gesetzt“ (3), die nach Durchlaufen mehrerer zum Teil ungeklärter Schritte in einer Aktivierung des Serum Response Factor (SRF) mündet. Dieser transloziert in den Kern (4) und bindet an die Promotor-Regulatorsequenzen „Serum Response Element“ und stimuliert die Transkription der Firefly Luciferase (5). Die Renilla Luciferase wird konstitutiv gebildet (6). Nach Lyse der Zellen und nacheinander erfolgender Zugabe des für jedes Enzym spezifischen Substrates (Luciferin und Coelenteracin) können die entstehenden Biolumineszenzsignale jeweils im Luminoskan Ascent (Fa. Labsystems) gemessen werden.

Insgesamt stand bei der 96-Well-Zellkulturplatte eine Gesamtmenge von 125 ng DNA zur Transfektion pro Well zur Verfügung, einschließlich 3,6 ng pRL-TK und 21,4 ng pSRE.L. Die Gesamtmenge an DNA von 125 ng wurde gegebenenfalls durch Zugabe von Leer-Plasmiden erreicht. Nach der Transfektion wurden die HEK2A201-Zellen für 48 h (bis zur Auswertung) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. 12 bis 15 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen stimuliert. Zur Durchführung des Luciferase Assays wurden konfluent gewachsene HEK2A201-Zellen benötigt. Eine 10 cm- Schale reichte zum Bestücken von ca. drei 96-Well-Kulturplatten aus. Die 96-Well-Kulturplatten wurden mit Collagen-Typ-I (Verdünnung 1:100 in kaltem PBS, 100 µl pro well) 20 bis 30 Minuten vorbehandelt. Die zu transfizierenden Plasmide (vergleiche 3.1.1) wurden in DMEM-Kulturmedium verdünnt (25 ng pro Plasmid). Nach Abnahme des Mediums von den Zellen wurden diese mit 10 ml angewärmter Phosphate Buffered Saline (PBS) ca. 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C gewaschen. Das PBS wurde abgenommen und zugegeben wurden 3 ml Trypsin-EDTA für drei Minuten (im Brutschrank), um die Zellen vom Boden der Petrischale abzulösen. Nun wurden zum Inaktivieren des Trypsins 10 ml DMEM-Kulturmedium zugefügt und die Zellsuspension 3 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet mit 30 ml DMEM-Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bis zum Gebrauch im Brutschrank bei 37 °C belassen. Für die nun folgende Transfektion der Zellen wurde das Collagen von den 96-Well-Platten abgesaugt und die Plasmide nach einer vorher festgelegten Plattenbelegung in die Wells pipettiert. Pro Well wurden 10 µl Luci-Mix (hergestellt aus 60 µg pSRE.L und 10 µg PRL.TK ad 700 µl sterilem a.d.) entsprechend einer Plasmidmenge von 25 ng und 10 µl *Polyfect*® Transfektionsreagenz zugefügt. Die Platte wurde vorsichtig geschwenkt und die Plasmid Lösung 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden pro Well 100 µl der Zellsuspension zugegeben. Die 96-Well-Kulturplatte wurde vorsichtig geschwenkt und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. 12 bis 15 Stunden nach der Transfektion folgte die Stimulation der Zellen mit Agonisten und/oder die Zugabe von Inhibitoren. Verdünnt wurden diese mit DMEM-Kulturmedium. Die Konzentration der Agonisten (Inhibitoren) und die Stimulationsdauer variierten innerhalb der verschiedenen Versuchsprotokolle. Inkubiert wurde weiterhin bis zur Auswertung im Brutschrank. Für die Messung (48 h nach Transfektion) wurde das Medium von der 96-Well-Platte abgenommen und zugegeben wurden 25 µl DMEM-Kulturmedium ohne Zusätze (um Meßungenauigkeiten zu minimieren) sowie 25 µl Dual Glo (Glühwürmchen-Luciferase, nach Herstellerangaben aliquotiert). Inkubiert wurde 10 Minuten auf dem Schüttler (Lyse der Zellen). Es folgte ein Umpipettieren des Zell-Lysats in eine spezielle für die Messung im Luminoskan Ascent (Fa. Labsystems) geeignete 96-Well-Platte und die erste

Messung. Dabei wurde das entstandene Lichtsignal fünf Sekunden lang gemessen. Im Anschluß an diese erste Messung wurden 25 µl der Substrat-Stop & Glo-Buffer-Lösung (Renilla-Luciferase, nach Herstellerangaben aliquotiert) pro Well zugegeben, und es folgte wiederum eine fünf Sekunden lange Messung des entstandenen Lichtsignals. Die Daten wurden gespeichert und ausgewertet.

3.3.5 Herstellung von Sepharose-gekoppelten Pulldown GST-Fusions-Proteinen

Zur Herstellung von Glutathion-Sepharose-gekoppelten (Fa. GE Healthcare) rekombinanten GST-Fusionsproteinen wurde die Rho-Bindedomäne von Rhotekin in pGEX-Plasmiden verwendet. Diese Vektoren kodieren für die entsprechende Proteindomäne, zusammen mit einem Glutathion-S-Transferase-Fusionsanteil. Von jeweils 4 ml (100 µg/ml Ampicillin) über Nacht Kultur (*E. coli Rosetta* mit jeweils dem entsprechenden Konstrukt) wurde 1 ml zum Animpfen von 100 ml 2 x YT-Medium (Yeast Trypton, 100 µg/ml Ampicillin) verwendet. Bei 37°C und 230 rpm wurden die Bakterien bis zu einer OD600 von 0,5 bis 0,7 im Inkubationsschüttler herangezogen. Anschließend wurde die Proteinsynthese mit 100 µl 1M IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) für 1 h induziert (25°C, 300 rpm). Dann wurden die Bakterien bei 4°C bei 3000 x g für 10 min abzentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien in 10 ml kaltem PBS resuspendiert und für fünfmal 30 s mit Ultraschall (60 Hz) lysiert. Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation für 10 min bei 16.000 x g und 4°C pelletiert. Zur Herstellung von „GST-Rhotekin“-Sepharose wurde der Überstand zu 300 µl Glutathion-Sepharose (Fa. Amersham), welche zuvor zweimal mit kaltem PBS gewaschen wurden, gegeben und für 45 min auf Eis wippend inkubiert. Danach wurden die Glutathion-Sepharose und die Magnetpartikel zweimal mit kaltem PBS gewaschen und jeweils ein gleichgroßes Volumen PBS über den Glutathion-Sepharose-Partikeln stehen gelassen. Im Anschluss erfolgte eine Proteinkonzentrationsbestimmung und die Glutathion-Sepharose-Partikel wurden jeweils in 50 µg Aliquots mit zusätzlich 100 µl Beads-Einfrierpuffer bei -60°C eingelagert.

Beads-Einfrierpuffer

- 50 mM Tris pH 7,5
- 0,5 % Triton X-100
- 150 mM NaCl
- 5 mM MgCl₂
- 1 mM DTT
- 0,1 mM PMSF
- 10 % Glycerin

2 x YT-Medium

- 16 g Bacto Trypton
- 10 g Bacto Yeast
- 5 g NaCl

Auf 1 Liter a.d., pH = 7,5

3.3.6 Pulldown Assay

Im Pulldown Assay lassen sich die kleinen RhoA GTPasen im aktivierten, GTP-gebundenen Zustand nachweisen [192, 193]. Dabei bindet aktiviertes RhoA mit hoher Affinität an die Rho-Bindedomäne von Rhotekin.

Für den Pulldown Assay wurden 3 bis 15×10^6 Zellen (HEK TsA201) auf Zellkulturschalen (\emptyset 6 cm oder 15 cm) ausgesät und entsprechend transfiziert. HUVEC wurden auf 6 cm-Schalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Durchführung des Pulldown Assays begann mit der Stimulation der Zellen durch einen Agonisten oder Inibitor. Die Inhibitoren wurden für eine bestimmte Zeit zu dem Wachstumsmedium dazugegeben. Die Agonisten-Stimulation fand unmittelbar vor der Durchführung des Pulldown Assays statt (z.B. Stimulation mit Thrombin in der Konzentration 250U/ml für 1 Minute). Dazu wurden die Zellkulturschalen mit den Zellen auf einen 37° C-Wärmetisch (Präzitherm, Fa. Störktronic) gestellt und für die angegebenen Zeiten mit einem Agonisten stimuliert. Das Medium wurde restlos entfernt und die Zellkulturschalen sofort auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte fanden im Kühlraum bei 4 °C und auf Eis statt. Nach Zugabe von 500 µl eiskaltem GST-Fish-Puffer wurden die Zellen abgeschabt und das Homogenat in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 50 µg der Rhotekin-gebundenen Glutathion-Sepharose in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (16.000 x g, 1min, 4°C) wurden 80 µl Lysat für die spätere Beladungskontrolle abgenommen. Das restliche Lysat wurde zu den Glutathion-Sepharose-Partikeln pipettiert und 60 min auf Eis über Kopf schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde das aktivierte RhoA an der Glutathion-Sepharose mit dem Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Sepharose wurde jeweils zweimal mit 1 ml GST-Fish-Puffer gewaschen, bevor ein Volumen GST-Fish-Puffer über der Glutathion Sepharose

stehen gelassen wurde. Anschließend wurden die Proben mit der entsprechenden Menge 4xSDS-Pulldown Probenpuffer versetzt, bei 95 °C für 5 min aufgekocht und mittels SDS-PAGE und Immunoblot (vergleiche 3.2) analysiert.

Puffer für den Pulldown-Assay:

GST-Fish-Puffer:

- 50 mM Tris
- 150 mM NaCl
- 4 mM MgCl₂
- 10 % Glycerin
- 0,1 % TritonX-100

4xSDS-Pulldown Probenpuffer

- 10 % β -Mercaptoethanol
- 7,5 % SDS
- 300 mM Tris pH 6,8
- 0,25 % Bromphenolblau

Die fertige Lösung wurde durch einen Papierfilter filtriert.

3.3.7 G-Lisa

Der G-Lisa ist eine Weiterentwicklung des Pulldown Assays (vergleiche 3.3.6) und soll dem Benutzer in einem vereinfachten Verfahren (in Kit-Form) die Bestimmung des Maßes der RhoA-Aktivierung erlauben. Wie auch beim Pulldown Assay lassen sich die kleinen RhoA GTPasen im aktivierten, GTP-gebundenen Zustand nachweisen.

Im G-Lisa Assay werden 96-Well-Platten verwendet, deren Böden mit RBD (rho binding domain) beschichtet sind. An diese binden RhoA GTPasen (aus einem Zelllysate) mit hoher Affinität während das inaktive GDP gebundene RhoA nicht bindet. Das gebundene aktive RhoA wird mit einem spezifischen Antikörper markiert, dieser wiederum mit einem zweiten Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Antikörper. Das daraus resultierende Signal wird bei 490 nm Wellenlänge im ELISA Reader als optische Dichte bestimmt. Dabei wird der Grad der RhoA-Aktivierung ermittelt durch den Vergleich aktivierter Zelllysate mit nicht aktivierten Zelllysaten.

Der Assay wurde nach Herstelleranweisung durchgeführt:

Die Zellen (HEK293A-Zellen, HUVEC) wurden in 6-Well-Kulturplatten ausgesät, am Abend vor dem Versuch in Serum freies Medium überführt und je nach Versuchsprotokoll stimuliert. Direkt nach der Stimulation wurde die 6-Well-Kulturplatte auf Eis gestellt, das Medium von den Zellen abgezogen und die Zellen wurden mit eiskalter PBS (1x) einmal gewaschen. Dieses wurde sofort

und gründlich wieder entfernt und die Zellen wurden daraufhin mit eiskaltem Lysis Buffer (100 µl) behandelt und mit einem Zellscraper geerntet. Das Lysat wurde in auf Eis stehende Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Für die folgende Proteinmessung wurden 10 µl Zelllysate pro Probe und pro Well in einer 96-Well-Platte vorgelegt. Hinzugefügt wurden dann pro Well 300 µl Precision Red Advanced Protein Assay Reagent. Inkubiert wurde für eine Minute bei Raumtemperatur. Die Messung erfolgte bei 600 nm im ELISA-Reader („Genesis Light“, Fa. Labsystems). Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte nach folgender Formel: $(OD \text{ Zelllysate} - OD \text{ Blank}) \times 3 = \text{Proteinkonzentration (mg/ml)}$. Dabei lag die optimale Konzentration bei 0,4 – 2,0 mg/ml. Im nächsten Schritt wurden 35 µl Binding Buffer in Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf Eis vorgelegt, dazugegeben wurden 35 µl in Lysis Buffer gelöste Probe aus dem Zelllysate. Es wurden eine Blank-Probe (aus 70 µl Binding Buffer und 70 µl Lysis Buffer) und eine Rho-Kontrolle (aus 12 µl Rho-Kontroll-Protein, 48 µl Lysis Buffer und 60 µl Binding Buffer) mitgeführt. In eine 96-Well-Platte mit entsprechender Anzahl von Strips wurden 100 µl eiskaltes Aqua dest. pro Well pipettiert, zwei Minuten inkubiert und dann wieder abgenommen. In die Wells wurden 50 µl der Proben bzw. Blank - und Rho-Kontrolle gegeben und für 30 Minuten im Kühlschrank geschüttelt. Es folgten zwei Waschschrte mit 200 µl Wash Buffer pro Well, dann wurden 200 µl Antigen Presenting Buffer in jedes Well gegeben, für zwei Minuten inkubiert und dreimal gewaschen. Im nächsten Schritt wurden erst 50 µl Primärantikörper (1:250 in Antikörper Dilution Buffer gelöst) zugefügt und für 45 Minuten inkubiert, dann folgte die Zugabe des Sekundärantikörpers (50 µl, 1:62,5) und nochmalige Inkubation für 45 Minuten. Es folgten drei Waschschrte und die Zugabe von HRP Detection Reagent (50 µl pro Well, aus Reagent A und Reagent B, 1:1). Inkubiert wurde 15 Minuten bei 37 °C im Brutschrank. Die Zugabe von HRP Stop Buffer (50 µl pro Well) stoppte die Reaktion. Gemessen wurde die Optische Dichte im ELISA-Reader („Genesis Light“, Labsystems) bei 490 nm Wellenlänge.

3.4 Statistische Auswertung

Die Statistikauswertung wurde mit den Programmen *GraphPad InStat*®, Version 3.01 (Graphpad Software INC., San Diego, USA) sowie *SPSS* (Statistical Package For The Social Science, SPSS Software GmbH, München) durchgeführt. Die Abbildungen im Kapitel Ergebnisse wurden unter Verwendung von *Microsoft*® *Office Excel* 2003 und *GraphPad Prism*®, Version 4 (GraphPad Software INC., San Diego, USA) angefertigt. Sofern nicht anders angegeben, zeigen die Abbildungen jeweils ein repräsentatives Experiment aus einer Gesamtzahl von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Einzelmessungen. ($n = 3$). Die Daten sind, wie jeweils in der Legende angegeben, dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD). Die Daten wurden mit dem *Kolmogorov – Smirnov - Test* auf Normalverteilung untersucht. Die Behandlungen wurden mit einer Varianzanalyse (Analysis of Variance – *ANOVA*) mit nachfolgendem auf das jeweilige Experiment passenden post hoc Test (nach *Tukey – Kramer, Dunnett, Bonforri*) miteinander verglichen. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Genkonstrukte pCMV6-XL5, pcDNA 3.1 und pEF-BOS

4.1.1 Zellmorphologie von HEKtsA201-Zellen

Die Abbildung 4-1 zeigt im Phasenkontrast – Mikroskop fotografierte konfluent gewachsene HEKtsA201-Zellen (gewonnen aus HEK293 - Zellen, Human Embryonic Kidney Cells) der Passage 8 in 400facher Vergrößerung. Für die Experimente wurden Zellen der Passagen 1 bis 25 verwendet. Die einschichtig auf Kollagen gewachsenen Zellen zeigen das typische Relief konfluent gewachsener Zellen.

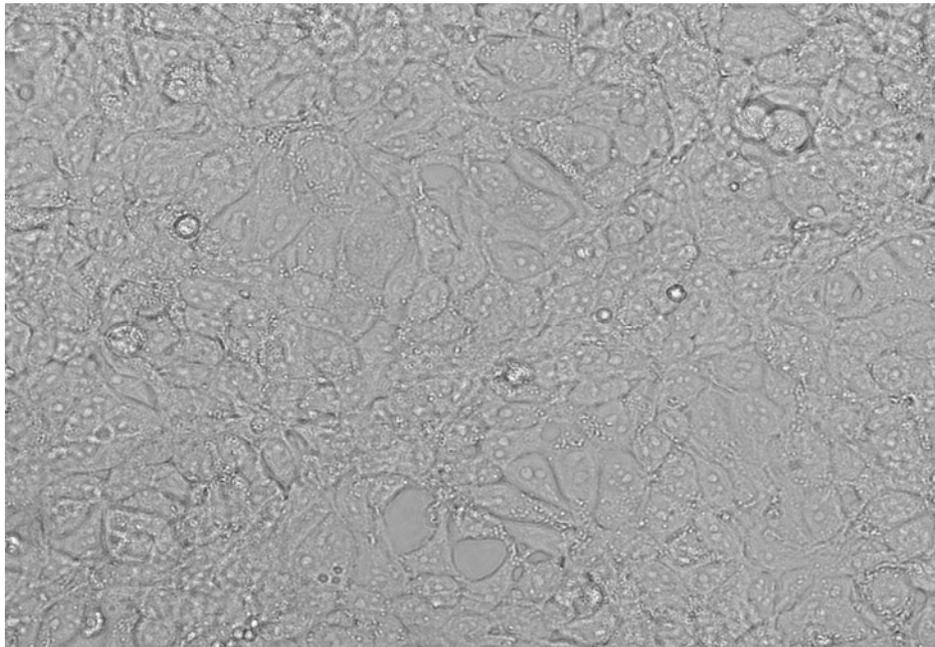


Abb. 4-1: HEKtsA201-Zellen der Passage 8.

4.1.2 Ergebnisse aus der Plasmidgewinnung

Die im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden, auf kommerziell erhältlichen Plasmiden codierten Rezeptoren (PAR 1, PAR 2, EPCR) wurden, wie im Kapitel Methoden unter Punkt 3.1.1 beschrieben, mittels Elektrotransformation in elektrokompetente Bakterien eingeschleust, von diesen vervielfältigt und mittels Plas/mini Isolation zurückgewonnen.

Um zu kontrollieren, ob nach der Elektrotransformation Plasmide in den Zellen vorhanden waren, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (Abb. 4-2).

Zur weiteren Verifizierung der Plasmide erfolgte ein Restriktionsverdau mit anschließender Agarosegelelektrophorese (Tabelle 4-1 und Abb. 4-3 bis 4-5).

Tabelle 4-1: Auflistung der verwendeten Plasmide, deren Länge Basenpaaren (bp), die dazugehörigen Restriktionsenzyme und die Länge der nach dem Restriktionsverdau entstandenen Fragmente in Basenpaaren (bp).

Plasmide	Länge der Plasmide (bp)	Restriktionsenzyme	Länge der Fragmente (bp)
PAR 1 (pCMV6-XL5)	8370	Not I	4500 / 3870
PAR 2 (pcDNA 3.1)	5428	Pst I	4138 / 2460
EPCR (pEF-BOS)	5685	Xba I BstX I	4250 / 991 / 444 4340 / 1345

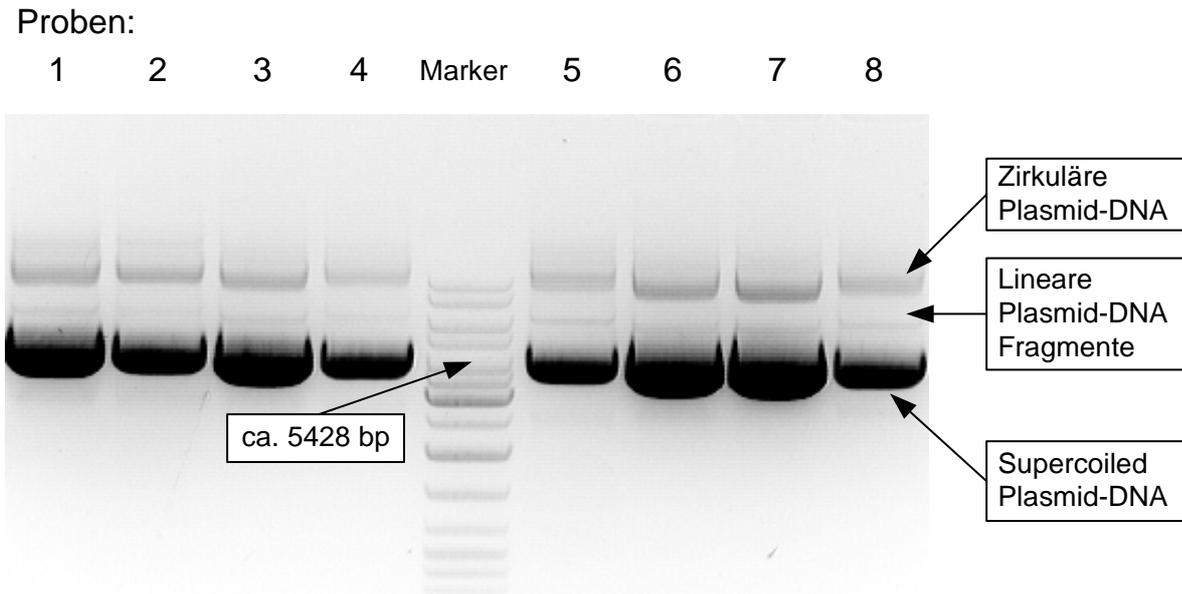


Abb. 4-2: Ergebnis der Agarosegelelektrophorese nach Plas/mini Isolation am Beispiel des den PAR 2 codierenden Plasmids pcDNA 3.1.

In der Gelelektrophorese wanderten die polyanionischen DNA-Moleküle von der Kathode zur Anode und wurden der Größe nach aufgetrennt. Die kleinsten DNA-Moleküle, in diesem Fall die *supercoiled* Plasmid-DNA (*supercoiled* DNA ist ein Synonym für ein geschlossenes, ringförmiges DNA-Molekül, welches extrem gepackt als spiralisierte Helix vorliegt), wanderte am weitesten in Richtung Anode, gefolgt von linearen Plasmid-Fragmenten. Zirkuläre Plasmid-DNA legte die kürzeste Strecke zurück.

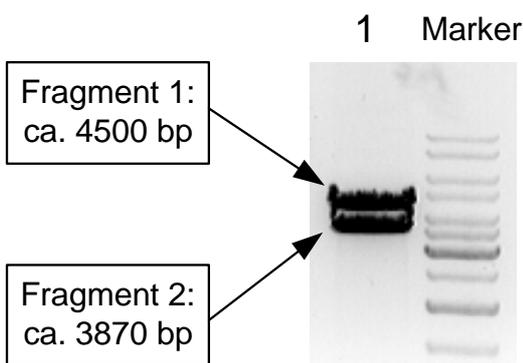


Abb. 4-3: Ergebnis der Agarosegelelektrophorese nach Plas/mini Isolation des den PAR 1 codierenden Plasmids pCMV-XL5 mit anschließendem Restriktionsverdau durch Not I.

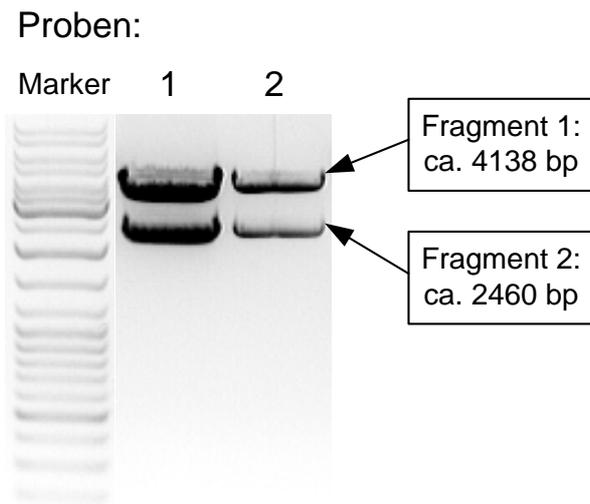


Abb. 4-4: Ergebnis der Agarosegelelektrophorese nach Plas/mini Isolation des den PAR 2 codierenden Plasmids pCMV-XL5 mit anschliessendem Restriktionsverdau durch Pst I. Aufgetragen wurden zwei identische Proben.

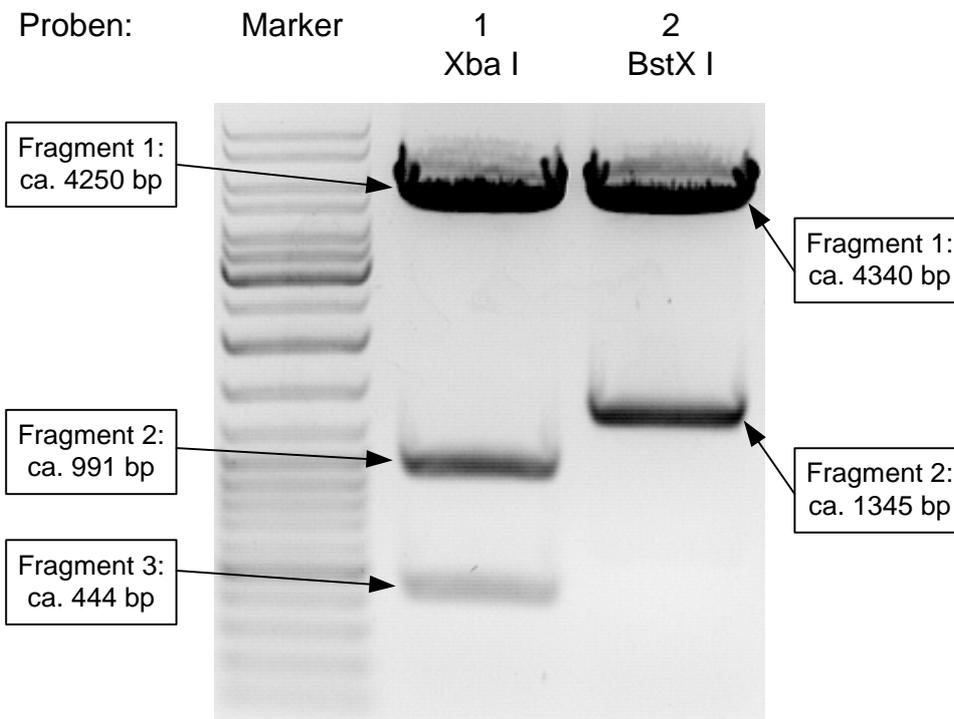


Abb. 4-5: Ergebnis der Agarosegelelektrophorese nach Plas/mini Isolation des den EPC Rezeptor codierenden Plasmids pEF-Bos mit anschließenden Restriktionsverdau durch Xba I und PstX I.

Nachdem die Plasmide identifiziert waren, wurden im nächsten Schritt mittels Plas/midi Isolation (vergleiche auch 3.1.1) für die nachfolgenden Experimente erforderliche größere Plasmidmengen hergestellt mit dem einen Ziel, durch Transfektion dieser Plasmide in HEK293T-Zellen und nachfolgender Polymerase Kettenreaktion nachzuweisen, dass die auf den Plasmiden codierten Rezeptoren von den Zellen exprimiert werden, sowie mit dem anderen Ziel, in den nachfolgenden Luciferase Assays die Auswirkungen der Stimulation der Zellen mit rhAPC, Thrombin und Faktor Xa auf die Signaltransduktion in der Zelle zu untersuchen.

4.1.3 Ergebnisse aus der Polymerase Kettenreaktion

Um nachzuweisen, dass mit den Plasmiden pCMV6-XL5, pcDNA 3.1 und pEF-BOS transfizierte HEK293T-Zellen die auf den Plasmiden codierten Rezeptoren PAR 1, PAR 2 und EPCR exprimieren, wurde eine Reverse-Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (Rt PCR; vergleiche auch 3.1.2) durchgeführt. Die Abbildungen 4-6 und 4-7 zeigen ein repräsentatives Ergebnis einer Rt PCR. Dabei zeigt jedes rezeptorspezifische Expressionsprodukt eine spezielle Bande, die für das verwendete Primer-Paar charakteristisch ist. Das Gelingen der Rt PCR konnte dadurch nachgewiesen werden, dass das House-Keeping Gen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in allen dafür vorgesehenen Proben mit Ausnahme der Negativkontrolle als Expressionsprodukt der HEK293T-Zellen dargestellt werden konnte.

Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die in die HEK293T-Zellen transfizierten Plasmide (pCMV6-XL5, pcDNA 3.1 und pEF-BOS) in diesen Zellen zur Expression der Rezeptoren PAR 1, PAR 2 und EPCR führten. Ebenfalls exprimierten die nicht transfizierten HEK293T-Zellen diese Rezeptoren in geringerem Maße, was aus der schwächeren Bandenintensität im Vergleich zu den Banden der transfizierten HEK293T-Zellen bei jeweils gleicher Rt-PCR Zyklenzahl deutlich wird. Die DNA freien Negativkontrollen zeigten keine Banden. Eine Abnahme der Rt PCR Zyklenzahl führte bei allen transfizierten Rezeptoren zu einer Abnahme der Bandenintensität. Beim PAR 2 war bei einer Rt PCR Zyklenzahl von 22 bei den nicht transfizierten HEK293T-Zellen keine Bande mehr darstellbar.

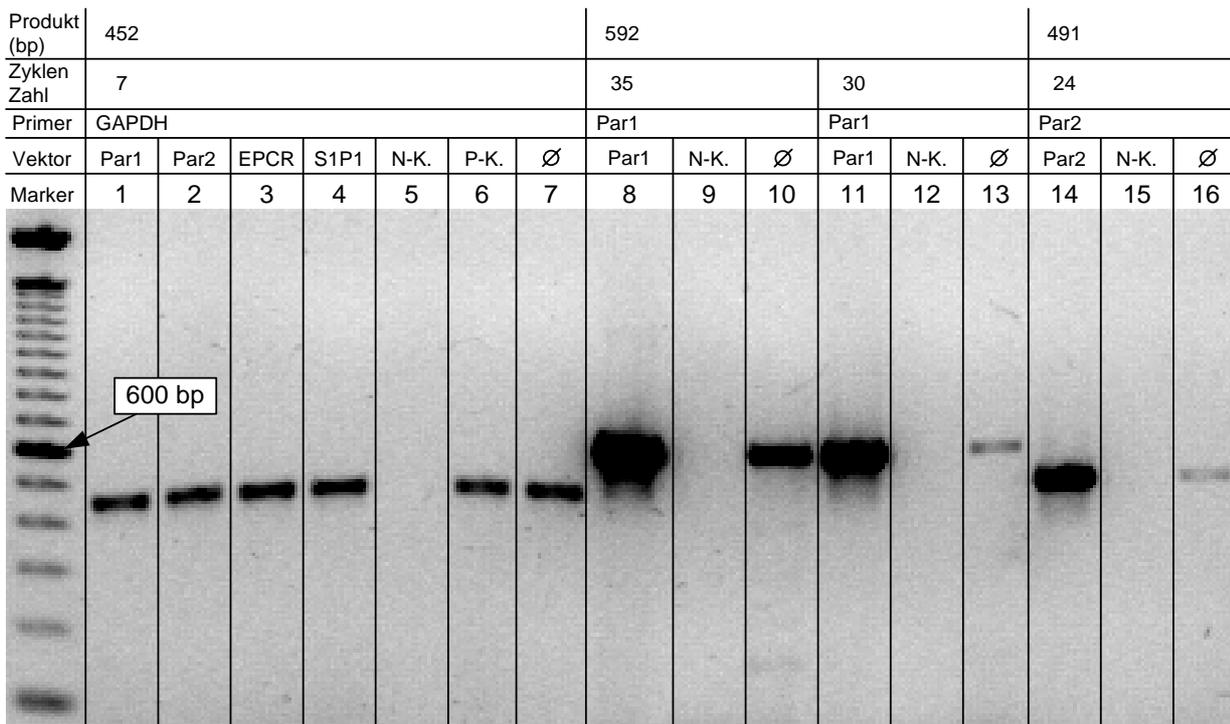


Abb. 4-6: Dargestellt ist das Ergebnis einer Rt PCR.

Die Rezeptoren PAR 1, PAR 2, EPCR und S1P1 wurden in HEK293T-Zellen transfiziert. Es wurden GAPDH-, PAR 1- und PAR 2-spezifische Primer verwendet. Angegeben sind die verwendeten Rt PCR Zykluszahlen sowie die Länge der Expressionsprodukte in Basenpaaren (bp).

Jede Bande stellt ein rezeptorspezifisches Expressionsprodukt dar. Verglichen werden die Expressionsprodukte der mit dem jeweiligen Rezeptor transfizierten HEK293T-Zellen mit denen nicht transfizierter HEK293T-Zellen (d.h. nur mit dem Leervektor pcDNA-ZEO transfiziert) sowie mit der Negativkontrolle. Desweiteren sind für jeden transfizierten Rezeptor zwei Expressionsprodukte dargestellt, die unterschiedliche Zykluszahlen durchlaufen haben (das zweite Expressionsprodukt des PAR 2 ist in Abb. 4-7 dargestellt).

(N-K. = Negativkontrolle, P-K. = Positivkontrolle, Ø = nicht transfizierte HEK293T-Zellen)

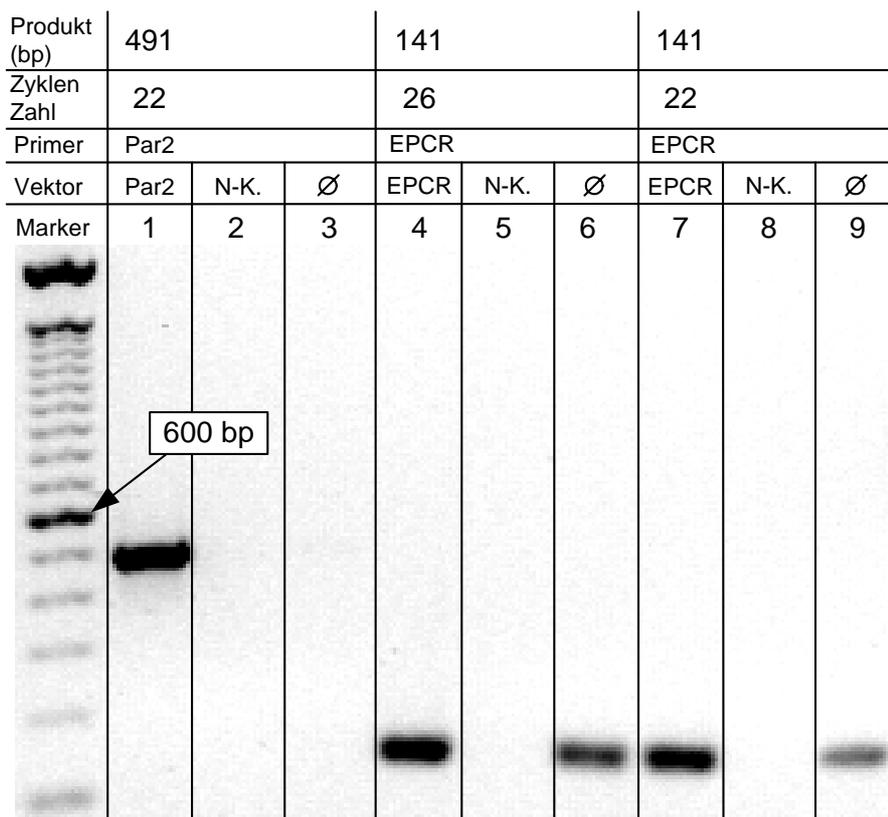


Abb. 4-7: Dargestellt ist das Ergebnis einer Rt PCR.

Die Rezeptoren PAR 2 und EPCR wurden in HEK293T-Zellen transfiziert. Es wurden PAR 2- und EPCR-spezifische Primer verwendet. Angegeben sind die verwendeten Rt PCR Zyklenzahlen sowie die Länge der Expressionsprodukte in Basenpaaren (bp).

Jede Bande stellt ein rezeptorspezifisches Expressionsprodukt dar. Verglichen werden die Expressionsprodukte der mit dem jeweiligen Rezeptor transfizierten HEK293T-Zellen mit denen nicht transfizierter HEK293T-Zellen (d.h. nur mit dem Leervektor pcDNA-ZEO transfizierte) sowie mit der Negativkontrolle. Desweiteren sind für den EPC Rezeptor zwei Expressionsprodukte dargestellt, die unterschiedliche Zyklenzahlen durchlaufen haben (das erste Expressionsprodukt des PAR 2 ist in Abb. 4-6 dargestellt).

(N-K. = Negativkontrolle, P-K. = Positivkontrolle, ∅ = nicht transfizierte HEK293T-Zellen)

4.2 Etablierung des Luciferase Assays

4.2.1 Transfektion eines den Histamin-Rezeptor codierenden Genkonstrukts

Für diesen „Luciferase Assay Testlauf“ schien der Histamin-Rezeptor am geeignetsten zu sein, da dieser natürlicherweise in den HEK293A-Zellen nicht vorkommt und Histamin auch keine der anderen natürlicherweise in HEK293A-Zellen vorkommenden Rezeptoren aktiviert. Somit war ein falsch positives Luciferase Ergebnis ausgeschlossen. Das Ziel des „Testlaufes“ war, nach erfolgter Transfektion der HEK293A-Zellen mit dem Plasmid, das den Histamin-Rezeptor codiert (vergleiche auch 3.3.2), und anschließendem Luciferase Assay (siehe auch 3.3.4), eine Erhöhung des Serum Response Factors und damit im weiteren Verlauf nach Zugabe der Luciferase-Substrate ein Biolumineszenz Signal zu erhalten (Abb. 3-1).

Die Abbildung 4-8 zeigt einen signifikanten Anstieg der Luciferase Aktivität nach Histamin-Stimulation ($180,62 \pm 0,4$) gegenüber der untransfizierten und unstimulierten Kontrolle ($1,0 \pm 0,1$).

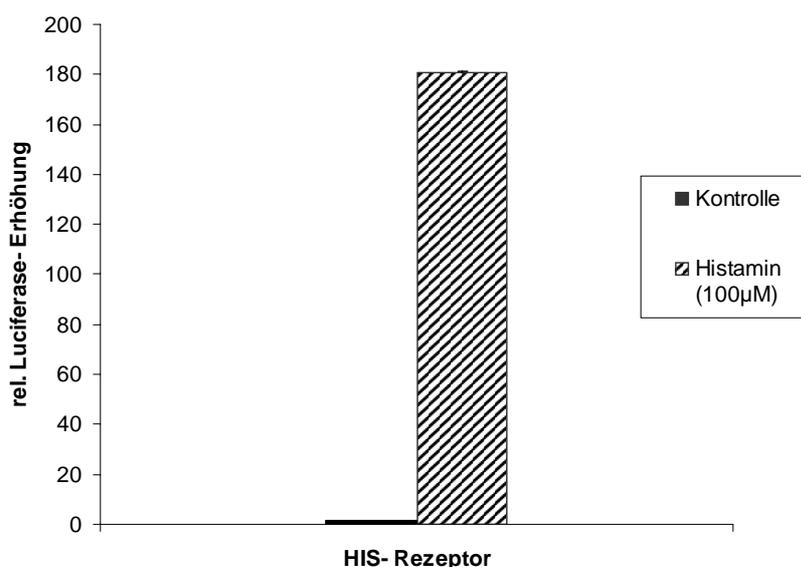


Abb. 4-8: Ermittlung der Luciferase Aktivität nach Stimulation mit Histamin (100 µM).

HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit dem Plasmid, das den Histamin-Rezeptor kodiert (25 ng), transfiziert. Die Stimulationszeit betrug 20 Stunden. Dargestellt sind normierte Mittelwerte (Um die Versuchswerte vergleichbar zu machen, wurde der erste Kontrollwert gleich eins gesetzt. Alle weiteren Werte wurden durch diesen Kontrollwert dividiert.) \pm SD aus einem Experiment mit jeweils zwei Einzelmesspunkten versus Kontrolle (mit dem Histamin-Rezeptor transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen).

4.2.2 Nachweis der Expression von PAR 1 und 2 durch selektive PAR Agonisten

Nachdem der „Luciferase Assay Testlauf“ positiv verlaufen war, bestand der nächste Schritt darin, die Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 auf Vorhandensein und Funktion zu überprüfen. Um das Vorhandensein der Rezeptoren nachzuweisen, wurden diese in HEK293A-Zellen transfiziert (siehe 3.3.2) und die Zellen mit den selektiven Proteinase aktivierbaren Rezeptor Agonisten TFLLRNPNDK-NH₂ und SLIGKV-OH stimuliert (Abb. 4-9 und 4-10). Der nächste Schritt beinhaltete die Überprüfung der Spezifität der PAR-Agonisten. Dazu wurden wiederum die Plasmide pCMV6-XL5 und pcDNA 3.1 in HEK293A-Zellen transfiziert. Nachfolgend wurden jeweils beide Rezeptoren mit TFLLRNPNDK-NH₂ und SLIGKV-OH stimuliert (Abb. 4-11).

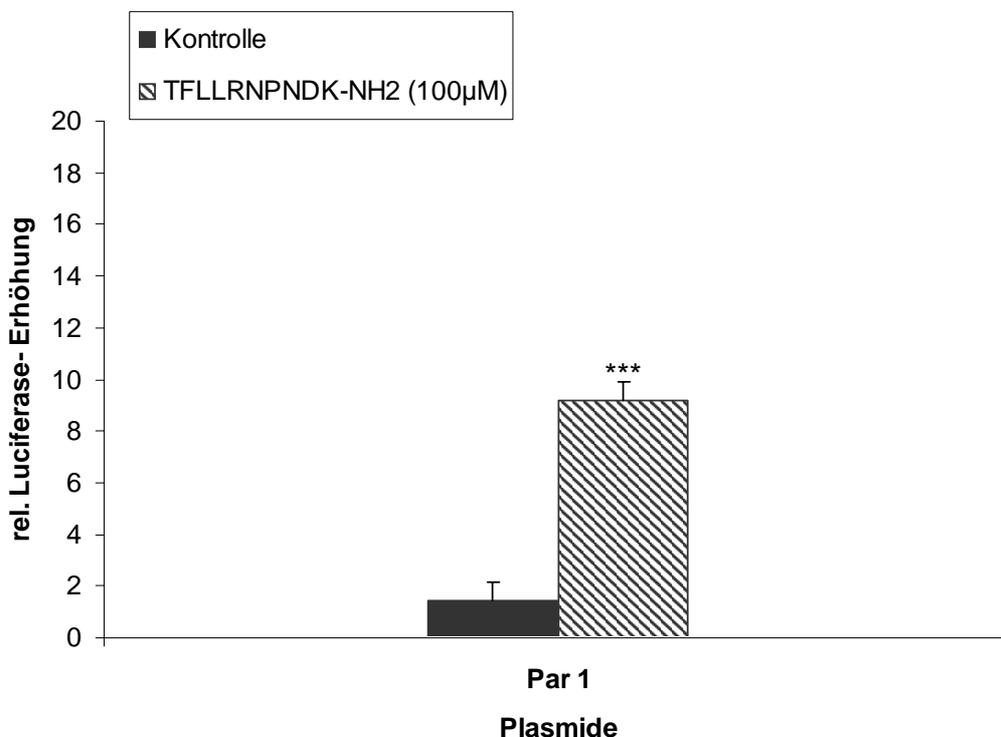


Abb. 4-9: Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit TFLLRNPNDK-NH₂ (100 µM).

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit dem Plasmid **PAR 1 (50 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils vier Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit *** $p < 0.001$ versus Kontrolle (mit dem zu untersuchenden Plasmid transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen) angegeben.

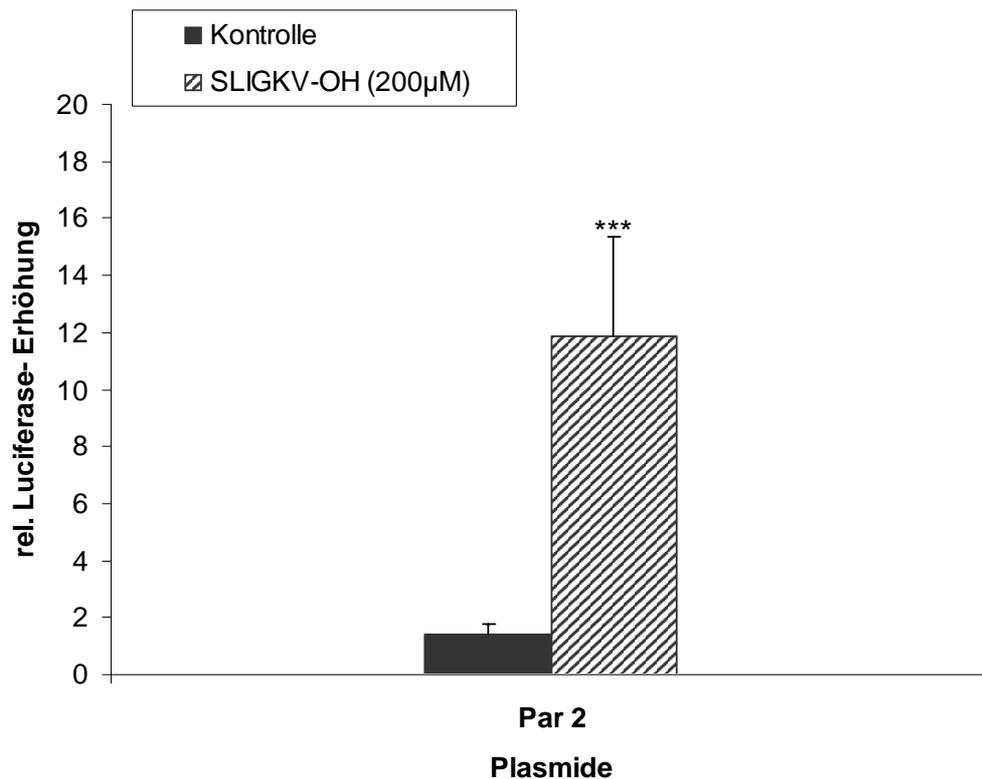


Abb. 4-10: Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit SLIGKV-OH (200 μM).

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEKtsA201-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit dem Plasmid **PAR 2 (25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils vier Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit *** $p < 0.001$ versus Kontrolle (mit dem jeweiligen zu untersuchenden Plasmid transfizierte nicht stimulierte HEKtsA201-Zellen) angegeben.

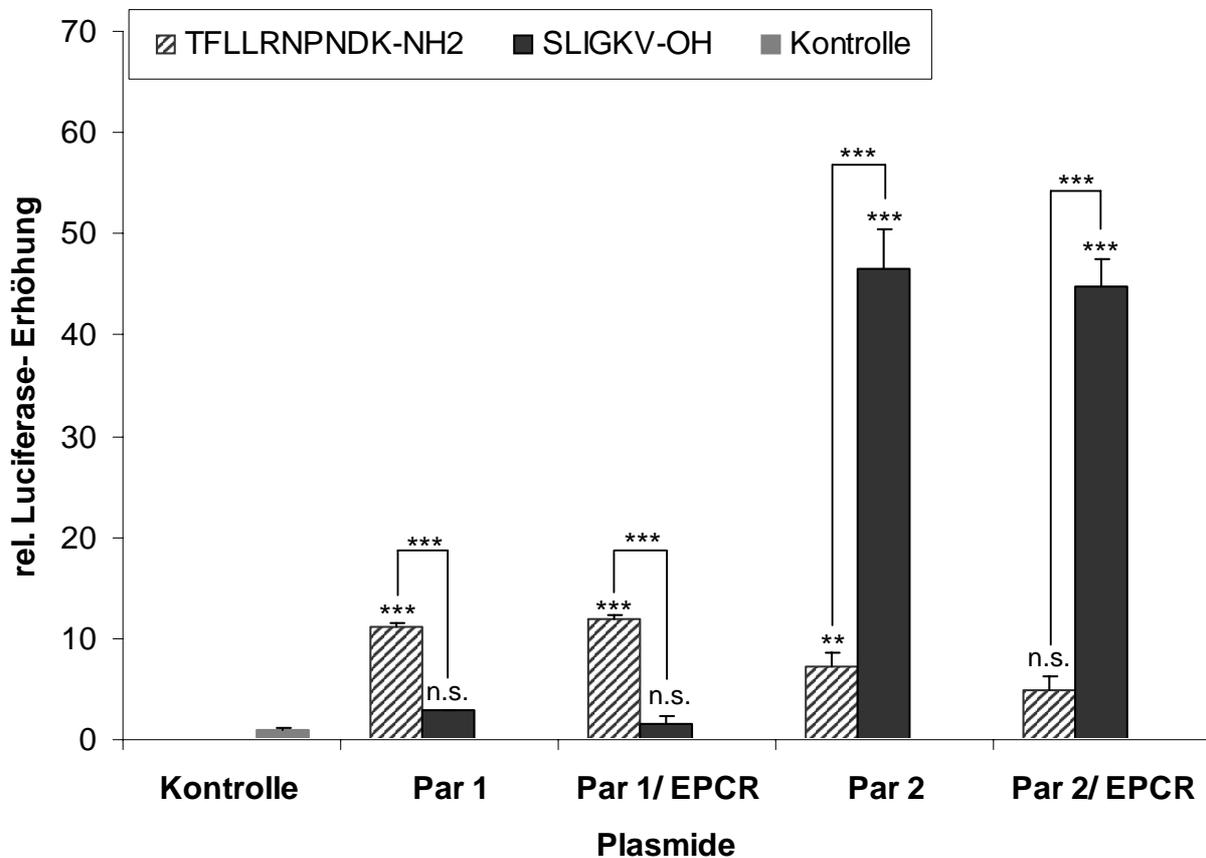


Abb. 4-11: Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit TFLLRNPNDK-NH2 (100 μ M) und SLIGKV-OH (200 μ M).

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293T-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (50 ng)**, **PAR 1 (50 ng) + EPCR (25 ng)**, **PAR 2 (25 ng)** und **PAR 2 (25 ng) + EPCR (25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit ** $p < 0,01$ und *** $p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293T-Zellen), sowie versus transfizierten, mit SLIGKV-OH (200 μ M) oder TFLLRNPNDK-NH2 (100 μ M) stimulierten HEK293T-Zellen angegeben.

Aus den Abbildungen 4-9 und 4-10 wird deutlich, dass die beiden PAR-Agonisten TFLLRNPNDK-NH₂ und SLIGKV-OH an ihren jeweils zugehörigen Rezeptoren zu signifikanten Erhöhungen der Luciferase Aktivitäten gegenüber den transfizierten unstimulierten Kontrollen führten.

Die Abbildung 4-11 zeigt, dass der PAR 1-Agonist TFLLRNPNDK-NH₂ nicht nur an seinem spezifischen Rezeptor zu einer signifikanten Erhöhung der Luciferase Aktivität gegenüber der Kontrolle führte, sondern ebenfalls durch Stimulation des PAR 2 die Luciferase Aktivität signifikant gegenüber der Kontrolle ansteigen ließ. Der PAR 2-Agonist SLIGKV-OH dagegen erhöhte die Luciferase Aktivität gegenüber der Kontrolle signifikant nur an seinem spezifischen Rezeptor.

Die Stimulation von untransfizierten HEKsA201-Zellen mit TFLLRNPNDK-NH₂ bzw. SLIGKV-OH führte zu keiner signifikanten Erhöhung Luciferase Aktivität (nicht abgebildet).

4.2.3 Überprüfung der Funktion von rhAPC

Zur Überprüfung der Funktion von rhAPC an den Rezeptoren PAR 1 und EPCR wurden diese getrennt und zusammen in HEKsA201-Zellen transfiziert (Abb. 4-12).

Die HEKsA-Zellen, für die eine Stimulation mit rhAPC vorgesehen war, wurden vorher einer Behandlung mit rekombinant hergestelltem Hirudin (*Refludan*®) unterzogen. Dieses sollte möglicherweise *in vitro* vorkommendes Thrombin inaktivieren. Somit wurde eine zusätzliche Thrombin Wirkung ausgeschlossen, die das Luciferase Ergebnis möglicherweise verfälscht hätte. Im Vergleich dazu wurden zur selben Zeit und zu gleichen Versuchsbedingungen nicht transfizierte HEKsA201-Zellen stimuliert.

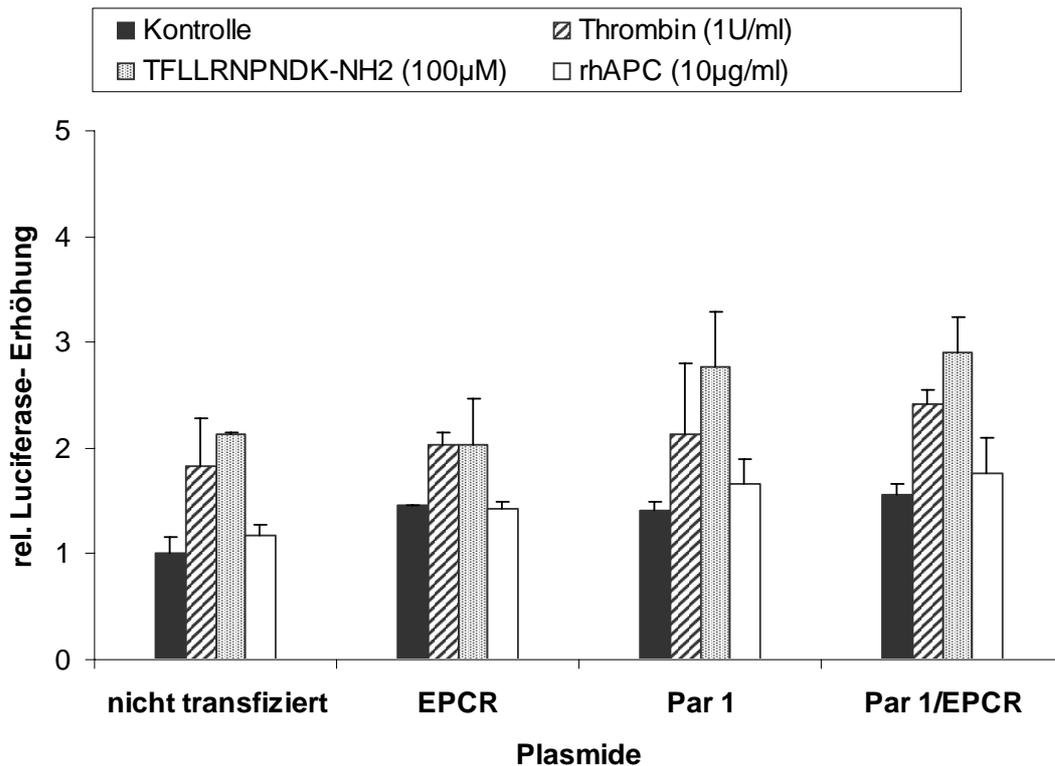


Abb. 4-12: Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit Thrombin (1 U/ml), TFLLRNPNDK-NH2 (100 µM) und rhAPC (10 µg/ml), Vorbehandlung der Zellen mit Refludan® in der Konzentration 5 µg/ml).

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEKtsA201-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (25 ng)**, **EPCR (25 ng)** und **PAR 1+ EPCR (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem Experiment mit jeweils zwei Einzelmesspunkten versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEKtsA201-Zellen).

RhAPC (Abb. 4-12) führte zu geringfügigen Steigerungen der Luciferase Aktivitäten gegenüber den jeweiligen Kontrollen am PAR 1- Rezeptor bzw. PAR 1 + EPC Rezeptor, nicht jedoch am EPCR alleine. Es war aufgrund der geringen Anzahl der Einzelmesspunkte nicht möglich, für dieses Experiment Signifikanzen zu bestimmen. Da die Luciferase Aktivitäten der nicht transfizierten und transfizierten HEKtsA201-Zellen im Vergleich kaum Unterschiede aufwiesen, sollte dieses Experiment vorsichtig bewertet werden.

Trotzdem deutet dieses Experiment zumindest an, dass rhAPC, Thrombin und TFLLRNPNDK-NH2 an PAR 1 bzw. PAR 1 in Kombination mit EPCR in HEKtsA201-Zellen einen Anstieg der Luciferase Aktivität bewirkten.

4.2.4 Wirkung von rhAPC an PAR 1 und 2 mit und ohne EPCR

Im folgenden Experiment sollte die Wirkung von rhAPC jeweils einzeln an den Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 sowie in Kombination mit dem EPCR Rezeptor untersucht werden (Abb. 4-13). Dafür wurde ein Teil der HEK293A-Zellen mit den Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 alleine, der andere Teil in Kombination mit dem EPCR Rezeptor transfiziert. Im Anschluss wurden die Zellen mit rhAPC stimuliert.

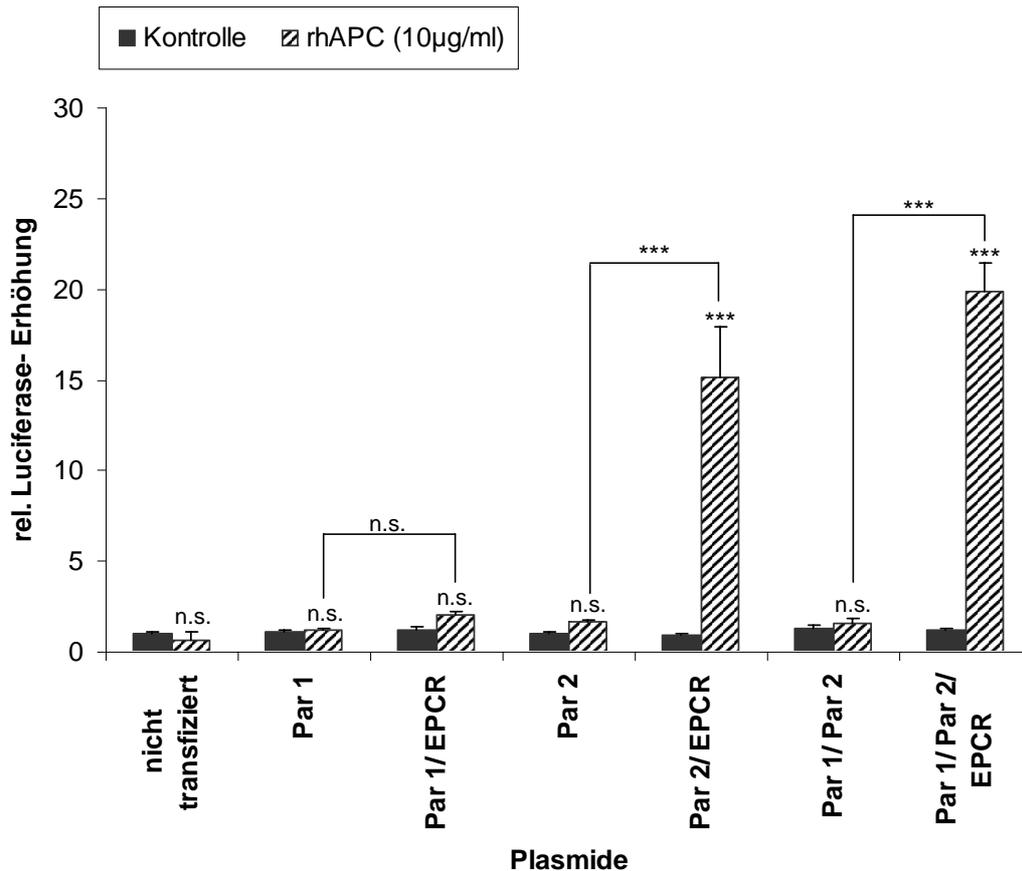


Abb. 4-13: Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit rhAPC (10 µg/ml).

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (25 ng), PAR 2 (25 ng), EPCR (25 ng) und mit verschiedenen Kombinationen dieser Plasmide (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils vier Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit $***p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen), sowie versus transfizierten und mit rhAPC (10 µg/ml) stimulierten HEK293A-Zellen angegeben.

RhAPC (Abb 4-13) führte an PAR 1 und an PAR 1 in Kombination mit dem EPC Rezeptor sowie an PAR 2 zu keinem signifikanten Anstieg der Luciferase Aktivität gegenüber den Kontrollen. Jedoch kam es zu einem signifikanten Anstieg der Luciferase Aktivität nach Stimulation des PAR 2 in Kombination mit dem EPC Rezeptor sowohl gegenüber der Kontrolle ($0,9 \pm 0,1$, rhAPC an PAR 2 + EPCR: $15,2 \pm 2,8$, $p < 0,001$) als auch gegenüber der Stimulation des PAR 2-Rezeptors alleine ($1,7 \pm 0,1$, $p < 0,001$).

Die Stimulation der Kombination aus den Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 durch rhAPC führte zu keinem signifikanten Anstieg der Luciferase Aktivität gegenüber der Kontrolle. Erst die Kombination aus PAR 1, PAR 2 und EPCR ließ die Luciferase Aktivität signifikant ansteigen ($19,9 \pm 1,5$, $p < 0,001$) sowohl gegenüber der Kontrolle ($1,2 \pm 0,1$) als auch im Vergleich zur alleinigen Stimulation von PAR 1 + PAR 2 ($1,6 \pm 0,2$, $p < 0,001$) mit rhAPC.

Die Stimulation der nicht transfizierten Zellen mit rhAPC zeigte keine signifikante Erhöhung der Luciferase Aktivität gegenüber der Kontrolle.

Insgesamt schien also die Stimulation der Kombination eines Proteinase aktivierbaren Rezeptors mit dem EPC Rezeptor, mit Ausnahme der Stimulation des PAR 1 und der Rezeptorkombination PAR 1 + EPCR, zu einem signifikanten Anstieg der Luciferase Aktivität zu führen. Um diese Hypothese noch einmal zu überprüfen, und um evtl. Fehler beim Versuchsablauf auszuschließen, wurde der Versuch mit den Rezeptoren PAR 1 und PAR 1 + EPCR wiederholt (Abb. 4-14).

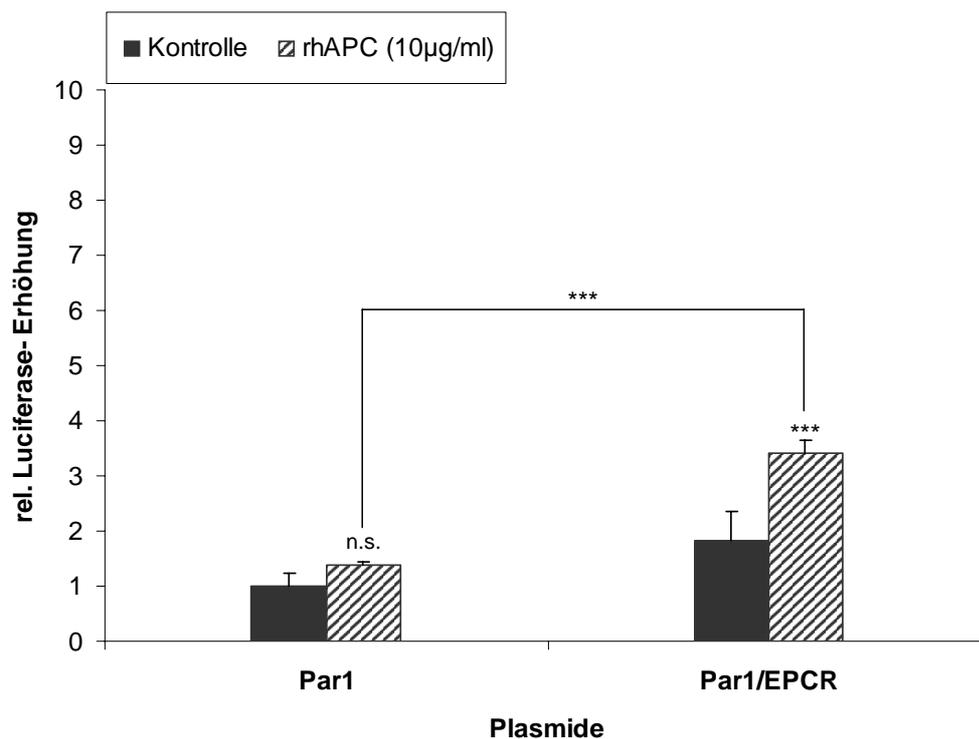


Abb. 4-14: Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit rhAPC (10 µg/ml).

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293T-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (25 ng)** und **PAR 1 + EPCR (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils vier Einzelmesspunkten. Die Signifikanz ist mit $***p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293T-Zellen), sowie versus transfizierten und mit rhAPC (10 µg/ml) stimulierten HEK293T-Zellen angegeben.

Die Stimulation mit rhAPC führte an PAR 1 alleine zu keinem signifikanten Anstieg der Luciferase Aktivität, die Stimulation von PAR 1 + EPCR mit rhAPC dagegen ergab in diesem Experiment im Gegensatz zum vorherigen Versuch (vergleiche Abb. 4-13) einen signifikanten Anstieg der Luciferase Aktivität ($3,4 \pm 0,2$, $p < 0,001$) gegenüber der Kontrolle ($1,8 \pm 0,5$). Möglicherweise ist der fehlende Anstieg der Luciferase Aktivität nach Stimulation der Rezeptorkombination PAR 1 + EPCR mit rhAPC im Experiment der Abbildung 4-13 durch Fehler im Versuchsablauf zu erklären. Signifikant war ebenfalls der Unterschied der Luciferase Aktivitäten nach Stimulation von PAR 1 im Vergleich zu PAR 1 + EPCR mit rhAPC.

4.2.5 Wirkung von Thrombin an PAR 1 und 2 mit und ohne EPCR

Im nächsten Schritt und in Anlehnung an Punkt 4.2.4 sollte nun die Wirkung von Thrombin sowohl an den Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 alleine als auch in Kombination mit dem EPCR Rezeptor untersucht werden. Dafür wurde wiederum ein Teil der HEK293T-Zellen mit den Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 alleine, der andere Teil in Kombination mit EPCR Rezeptor transfiziert. Nachfolgend wurde mit Thrombin stimuliert (Abb. 4-15).

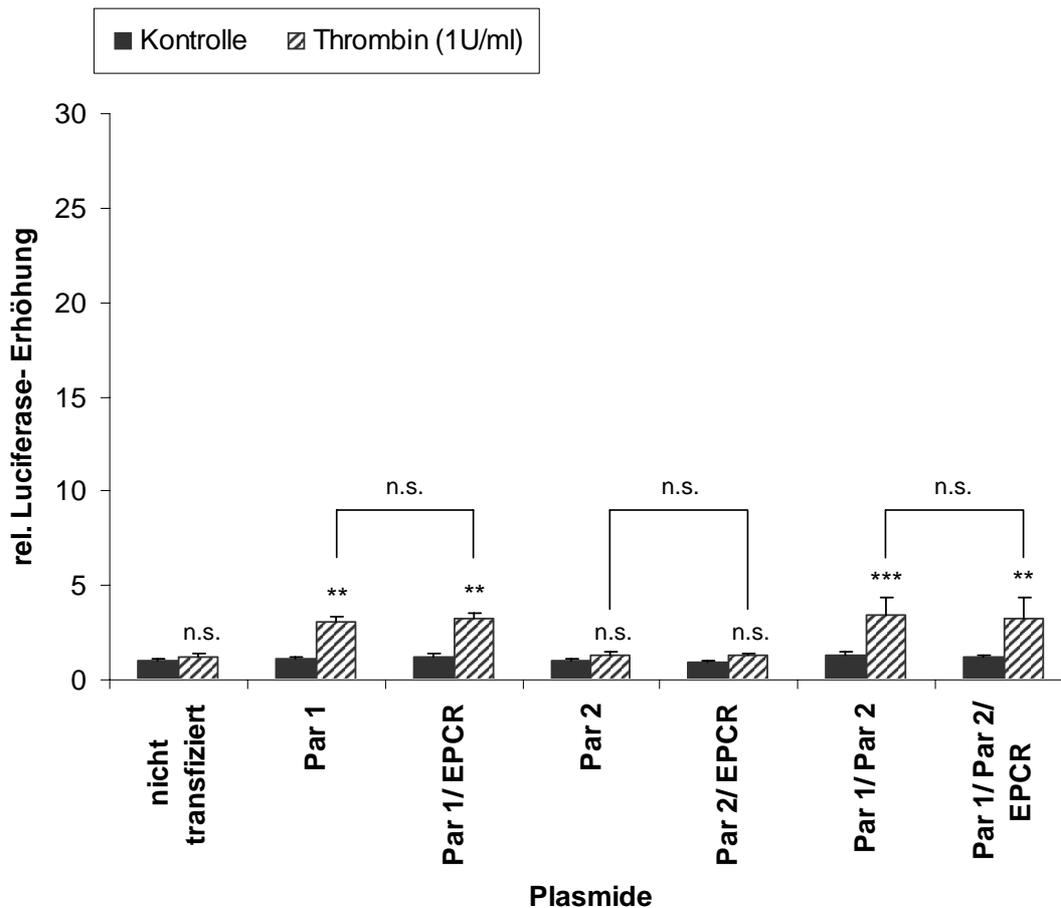


Abb. 4-15: Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit Thrombin (1 U/ml).

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293T-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (25 ng), PAR 2 (25 ng), EPCR (25 ng) und mit verschiedenen Kombinationen dieser Plasmide (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils vier Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit ****p < 0,01** und *****p < 0.001** versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293T-Zellen), sowie versus transfizierten und mit Thrombin (1 U/ml) stimulierten HEK293T-Zellen angegeben.

Thrombin (Abb. 4-15) führte an PAR 1 sowie an der Rezeptorkombination PAR 1 + EPCR ($3,1 \pm 0,3$, $p < 0,01$; $3,2 \pm 0,3$, $p < 0,01$) zu einem signifikanten Anstieg der Luciferase Aktivität gegenüber der jeweiligen Kontrolle ($1,1 \pm 0,1$ und $1,3 \pm 0,1$). Der Vergleich der Luciferase Aktivität an PAR 1 mit der an PAR 1 + EPCR zeigte keinen signifikanten Unterschied. An PAR 2 bzw. PAR 2 + EPCR traten nach Stimulation mit Thrombin keine signifikanten Erhöhungen der Luciferase Aktivitäten auf (vergleiche auch Punkt 4.4.1, Abb. 4-40). Bei der Stimulation beider Proteinase aktivierbaren Rezeptoren gemeinsam bzw. in Kombination mit EPCR kam es nach Stimulation mit Thrombin zu einem signifikanten Anstieg der Luciferase Aktivität gegenüber der jeweiligen Kontrolle. Die Stimulation der nicht transfizierten Zellen mit Thrombin ergab keine signifikante Erhöhung der Luciferase Aktivität gegenüber der Kontrolle.

Unsere Experimente lassen den Schluss zu, dass Thrombin über den Proteinase aktivierbaren Rezeptor 1 wirkt, jedoch nicht über PAR 2. EPCR scheint bei der Thrombin vermittelten Signaltransduktion keine Rolle zu spielen.

4.2.6 Zeit- und Dosisabhängigkeiten

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten sollten die Auswirkungen steigender Stimulationszeiten sowie Dosierungen der spezifischen PAR-Agonisten und der Serinproteinasen rhAPC, Thrombin und Faktor Xa auf die Luciferase Aktivität untersucht werden. Dazu wurden HEKtsA201-Zellen je nach Versuchsprotokoll mit den Rezeptoren PAR 1, PAR 2 und EPCR transfiziert und stimuliert.

4.2.6.1 rhAPC an PAR 2 und EPCR

Die folgenden Versuche (Abb. 4-16 und 4-17) zeigten eine dosisabhängige Steigerung der Luciferase Aktivitäten durch rhAPC an der Rezeptorkombination PAR 2 + EPCR in HEKtsA201-Zellen. Die Abbildung 4-16 zeigt zusätzlich zur Dosisabhängigkeit noch eine Zeitabhängigkeit. Dabei korrelierten längere Stimulationszeiten mit höheren Luciferase Aktivitäten. Untermuert wurde diese Zeitabhängigkeit der Stimulation mit rhAPC an PAR 2 + EPCR mit dem folgenden Versuch (Abb. 4-18). Hier blieben die Luciferase Aktivitäten bis zu einer Stimulationszeit von 60 Minuten ungefähr gleich hoch. Nach einer Stimulationszeit von 20 Stunden war die Luciferase Aktivität im Vergleich zu den kurzen Stimulationszeiten (60 min) signifikant erhöht. Die Abbildung

4-17 zeigt eine Sättigungskurve, die nach Stimulation der Rezeptorkombination PAR 2 und EPCR mit rhAPC entstanden ist. Die EC 50 beträgt 0,5541 $\mu\text{g/ml}$ [IQR: 0,2086 bis 1,472 $\mu\text{g/ml}$].

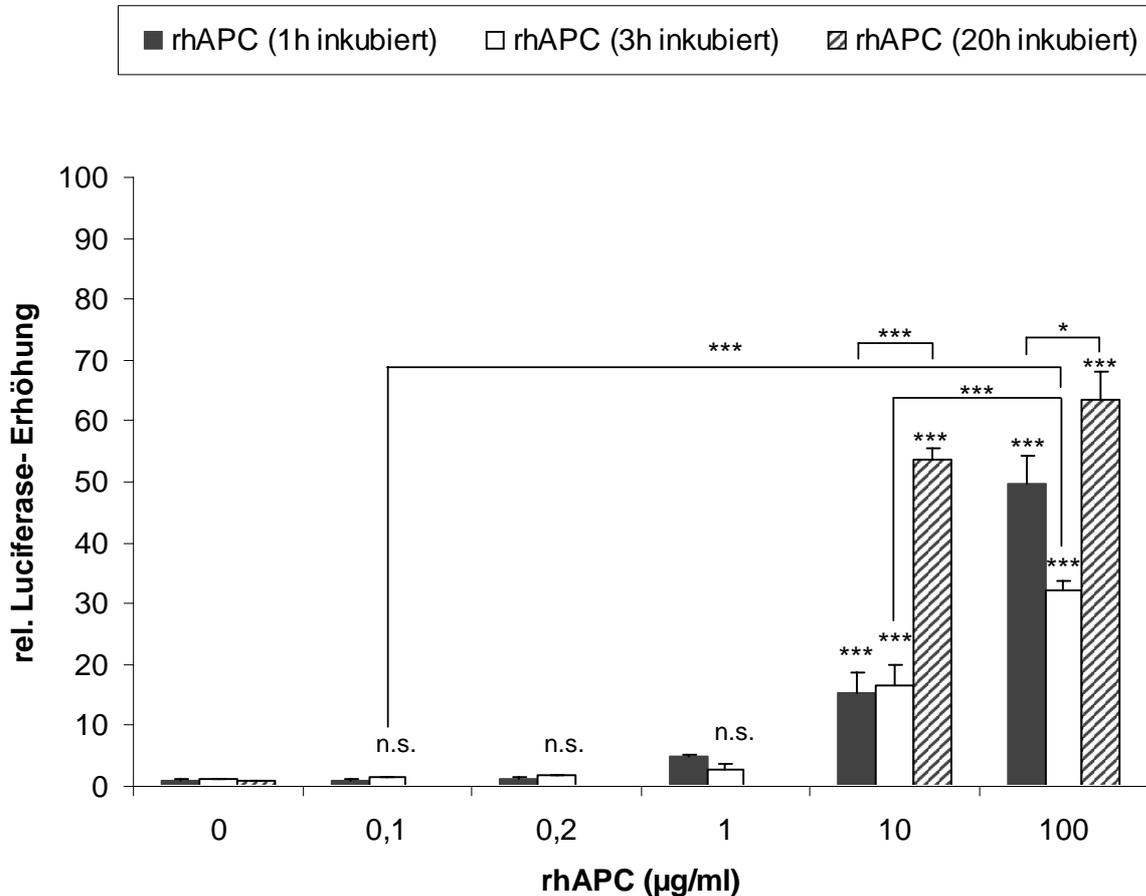


Abb. 4-16: Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit rhAPC in verschiedenen Konzentrationen.

Stimuliert wurde für 1 Stunde, 3 Stunden und 20 Stunden. Nach der Stimulation wurde das Medium mit enthaltenem Agonisten abgenommen und durch DMEMred (0,5 % FCS) ersetzt. HEK2A201-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 2 (25 ng) + EPCR (25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten. Die Signifikanz ist mit * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK2A201-Zellen), sowie versus transfizierten, mit rhAPC in verschiedenen Konzentrationen unterschiedlich lang stimulierten HEK2A201-Zellen angegeben.

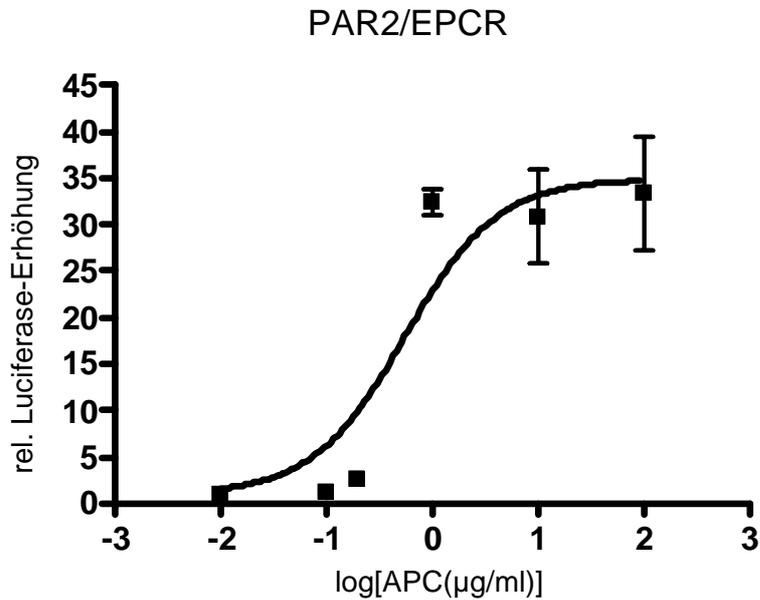


Abb. 4-17: Sättigungskurve – Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit rhAPC in steigenden Konzentrationen.

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEKtsA201-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 2 (25 ng) + EPCR (25 ng)** transfiziert (n = 3).

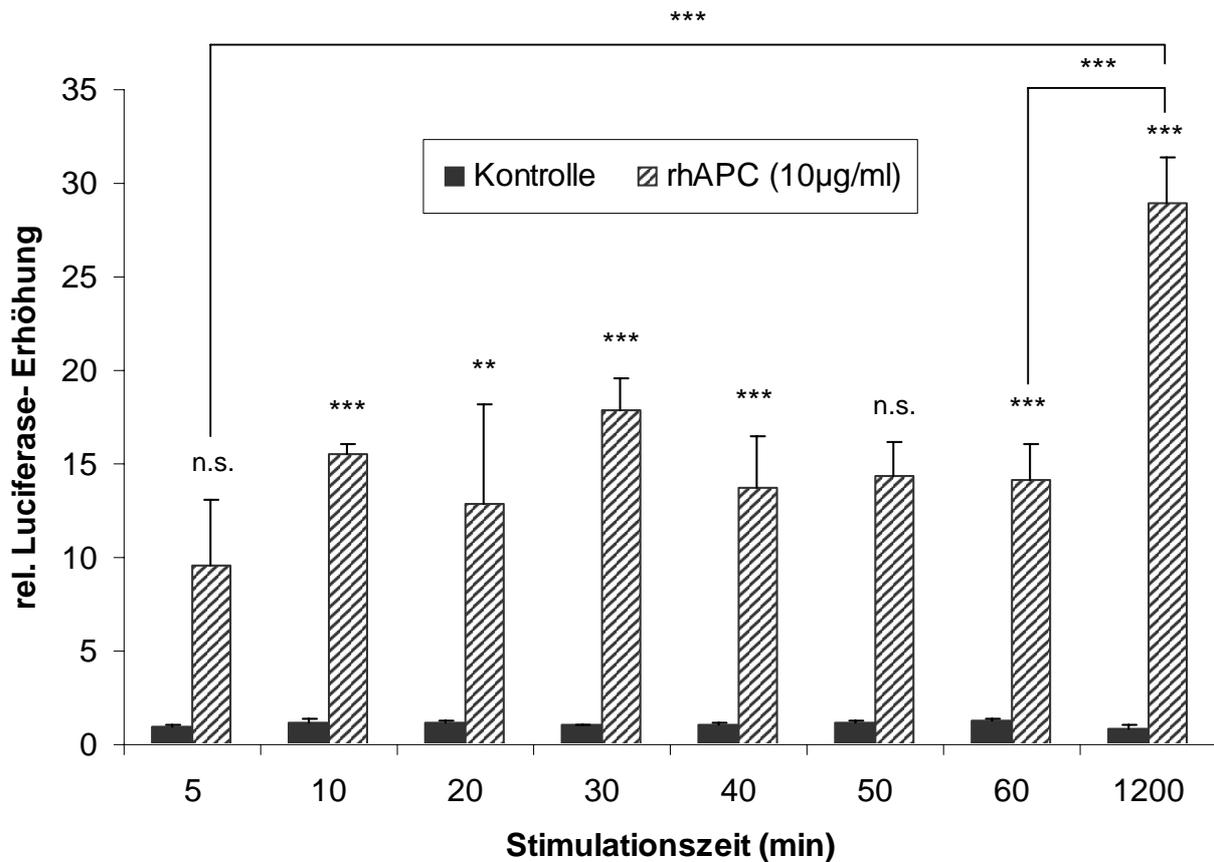


Abb. 4-18: Zeitabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit rhAPC (10 µg/ml).

Nach der Stimulation mit rhAPC wurde das Medium mit enthaltenem Agonisten von den Zellen abgezogen und durch DMEMred (0,5 % FCS) ersetzt. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 2 + EPCR (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist erstens mit $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen) dargestellt, sowie zweitens mit $***p < 0,001$ im Vergleich unterschiedlicher Stimulationszeiten der mit rhAPC stimulierten HEK293A-Zellen zueinander.

4.2.6.2 rhAPC an PAR 1 und EPCR

Die Abbildungen 4-19 bis 4-21 zeigen die dosis- und zeitabhängigen Wirkungen von rhAPC an der Rezeptorkombination PAR 1 und EPCR (in der Abbildung 4-21 auch im Vergleich zur Stimulation des PAR 1 alleine). Die EC 50 beträgt 0,3312 $\mu\text{g/ml}$ [IQR: 0,2198 bis 0,4990 $\mu\text{g/ml}$]. Dabei stiegen insgesamt die Luciferase Aktivitäten in HEKtsA201-Zellen dosis- und zeitabhängig. Im Vergleich zur Stimulation der Rezeptorkombination PAR 2 + EPCR mit rhAPC (vergleiche auch 4.2.6.1) fielen die Luciferase Aktivitäten niedriger aus.

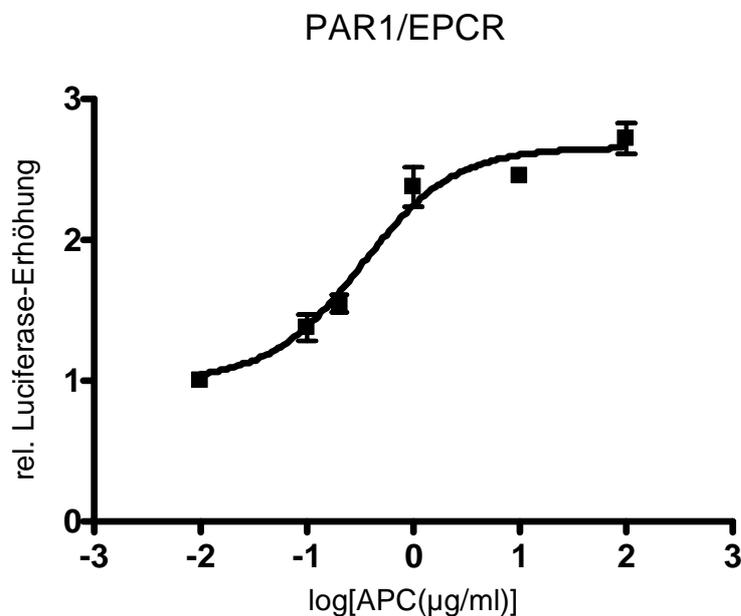


Abb. 4-19: Sättigungskurve – Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit rhAPC in steigenden Konzentrationen.

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEKtsA201-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (25 ng) + EPCR (25 ng)** transfiziert (n = 3).

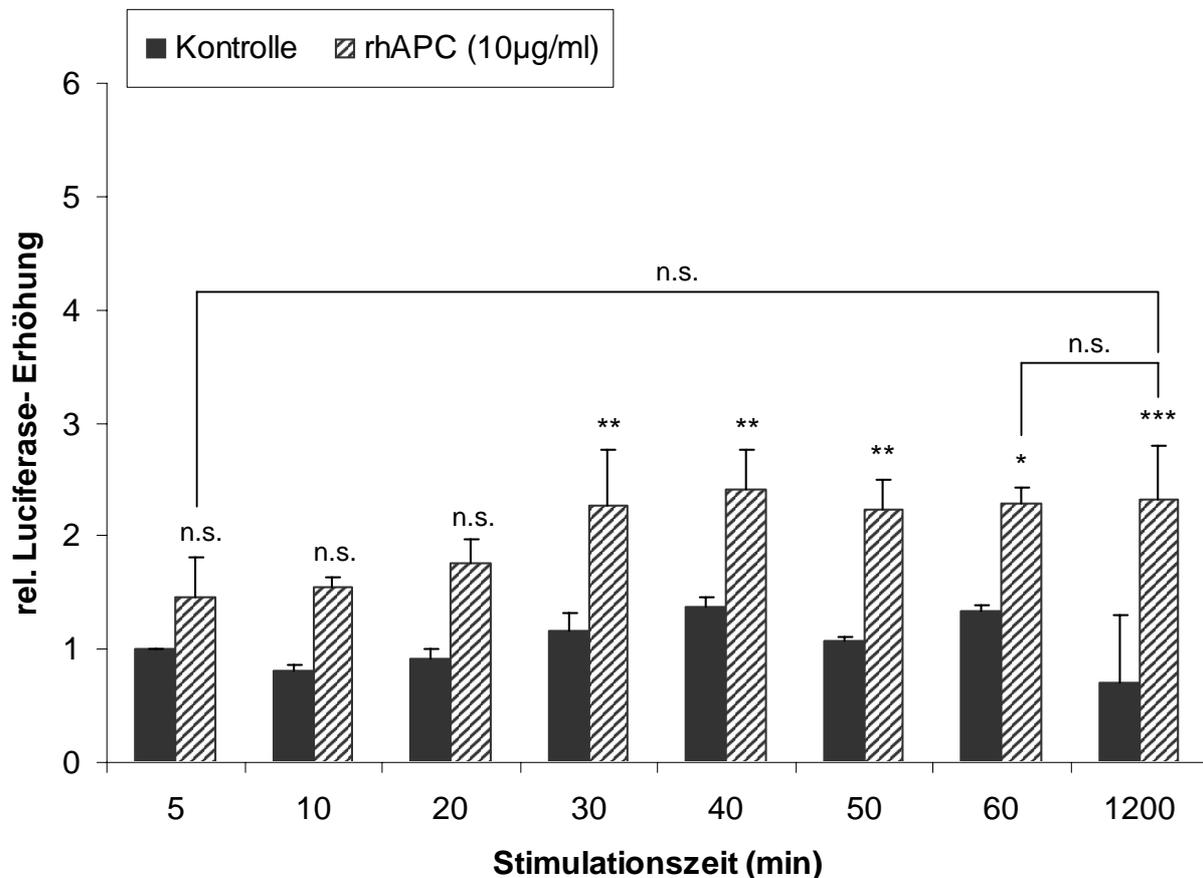


Abb. 4-20: Zeitabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit rhAPC (10 µg/ml).

Nach der Stimulation wurde das Medium mit enthaltenem Agonisten von den Zellen abgezogen und durch DMEMred (0,5 % FCS) ersetzt. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 + EPCR (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist erstens mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nichtstimulierte HEK293A-Zellen) dargestellt, sowie zweitens mit n.s. im Vergleich unterschiedlicher Stimulationszeiten der mit rhAPC stimulierten HEK293A-Zellen zueinander.

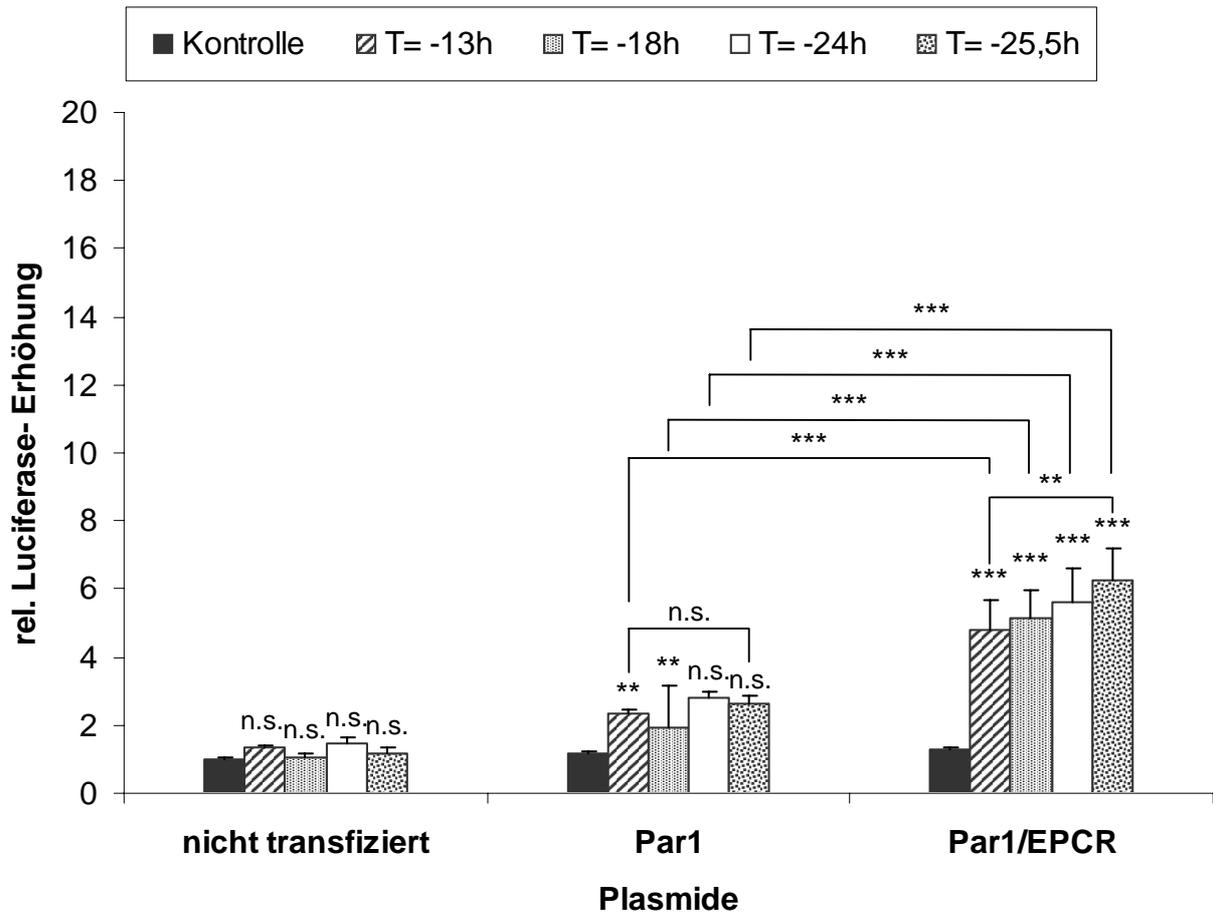


Abb. 4-21: Zeitabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit rhAPC (10 µg/ml).

Stimuliert wurde 13 h, 18 h, 24 h und 25,5 h lang (Minuszeichen vor den Stimulationszeiten in der Abbildung bedeuten Stimulationszeiten in Stunden bis zur Auswertung bei T = 48 h nach Transfektion der Zellen). HEKtsA201-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (25 ng)** und **PAR 1 + EPCR (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils vier Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit ** $p < 0,01$ und *** $p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEKtsA201-Zellen), sowie versus transfizierten und mit rhAPC (10µg/ml) stimulierten HEKtsA201-Zellen angegeben.

4.2.6.3 Thrombin an PAR 2 und EPCR

Abbildung 4-22 zeigt die zeitabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität nach Stimulation der Rezeptorkombination PAR 2 und EPCR mit Thrombin. Insgesamt kam es bei keiner der ausgewählten Stimulationszeiten zu einer signifikanten Erhöhung der Luciferase Aktivität.

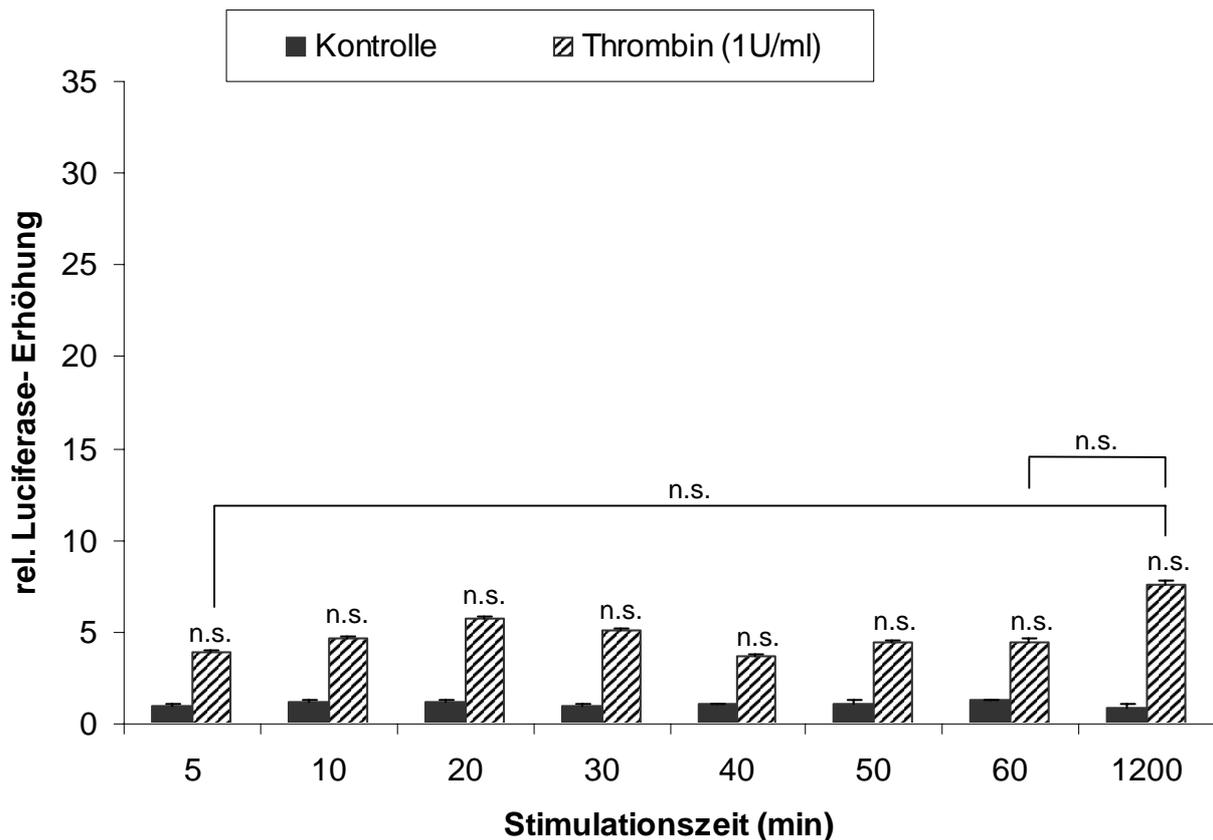


Abb. 4-22: Zeitabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit Thrombin (1 U/ml).

Nach der Stimulation wurde das Medium mit enthaltenem Agonisten von den Zellen abgezogen und durch DMEMred (0,5 % FCS) ersetzt. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 2 + EPCR** (jeweils 25 ng) transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist erstens mit n.s. versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen) angegeben, sowie zweitens mit n.s. im Vergleich unterschiedlicher Stimulationszeiten der mit Thrombin stimulierten HEK293A-Zellen zueinander.

4.2.6.4 Thrombin an PAR 1 und EPCR

Die Abbildungen 4-23 bis 4-25 zeigen die dosis- und zeitabhängigen Steigerungen der Luciferase Aktivitäten nach Thrombin Stimulation des PAR 1 alleine bzw. des PAR 1 in Kombination mit EPCR. Dabei hatte der EPC Rezeptor keinen Einfluß auf die Luciferase Aktivitäten (vergleiche auch 4.2.5). Die EC 50 beträgt 14,03 U/ml [IQR: 6,403 bis 30,74 U/ml]. Unsere Experimente ergaben keine Sättigung nach Thrombin Stimulation.

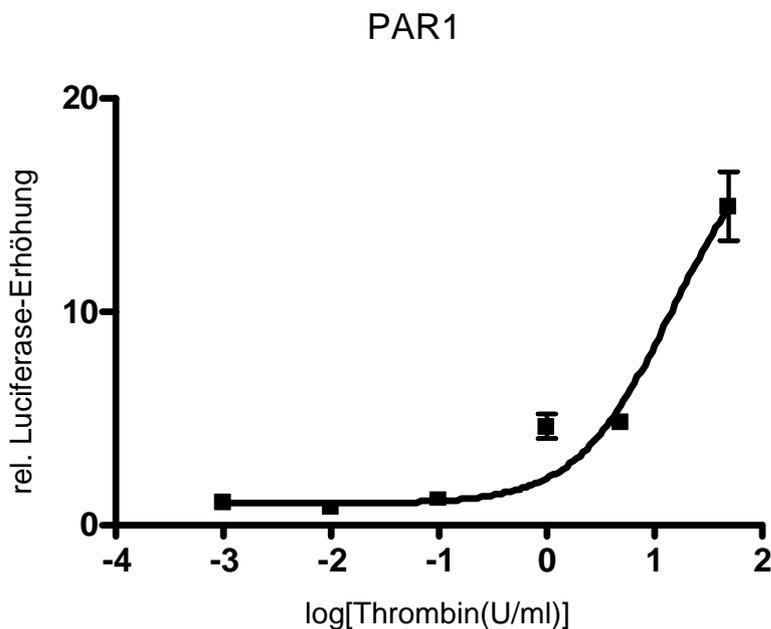


Abb. 4-23: Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit Thrombin in verschiedenen Konzentrationen.

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit dem Plasmid **PAR 1 (50 ng)** transfiziert (n = 3).

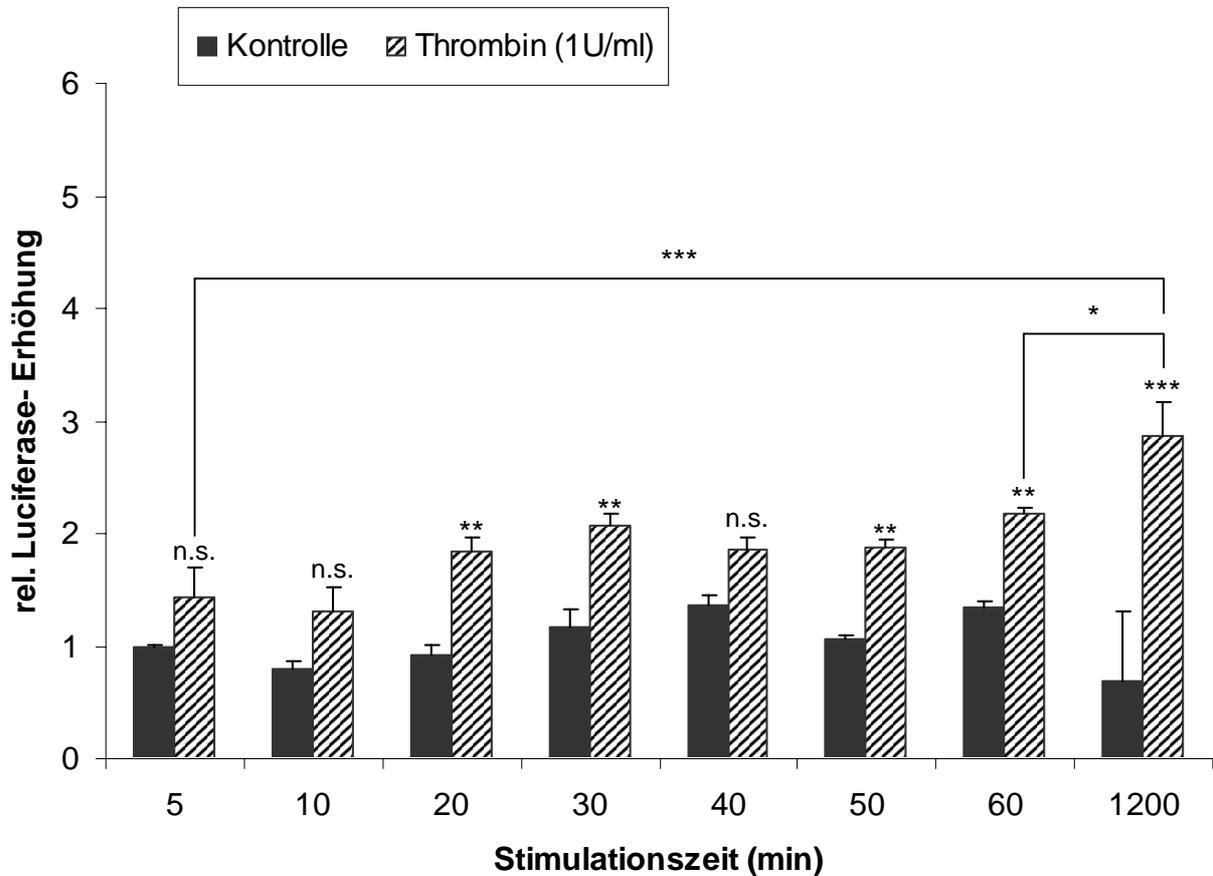


Abb. 4-24: Zeitabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit Thrombin (1 U/ml).

Nach der Stimulation wurde das Medium mit enthaltenem Agonisten von den Zellen abgezogen und durch DMEMred (0,5 % FCS) ersetzt. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 + EPCR (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist erstens mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen) angegeben, sowie zweitens im Vergleich unterschiedlicher Stimulationszeiten der mit Thrombin stimulierten HEK293A-Zellen zueinander.

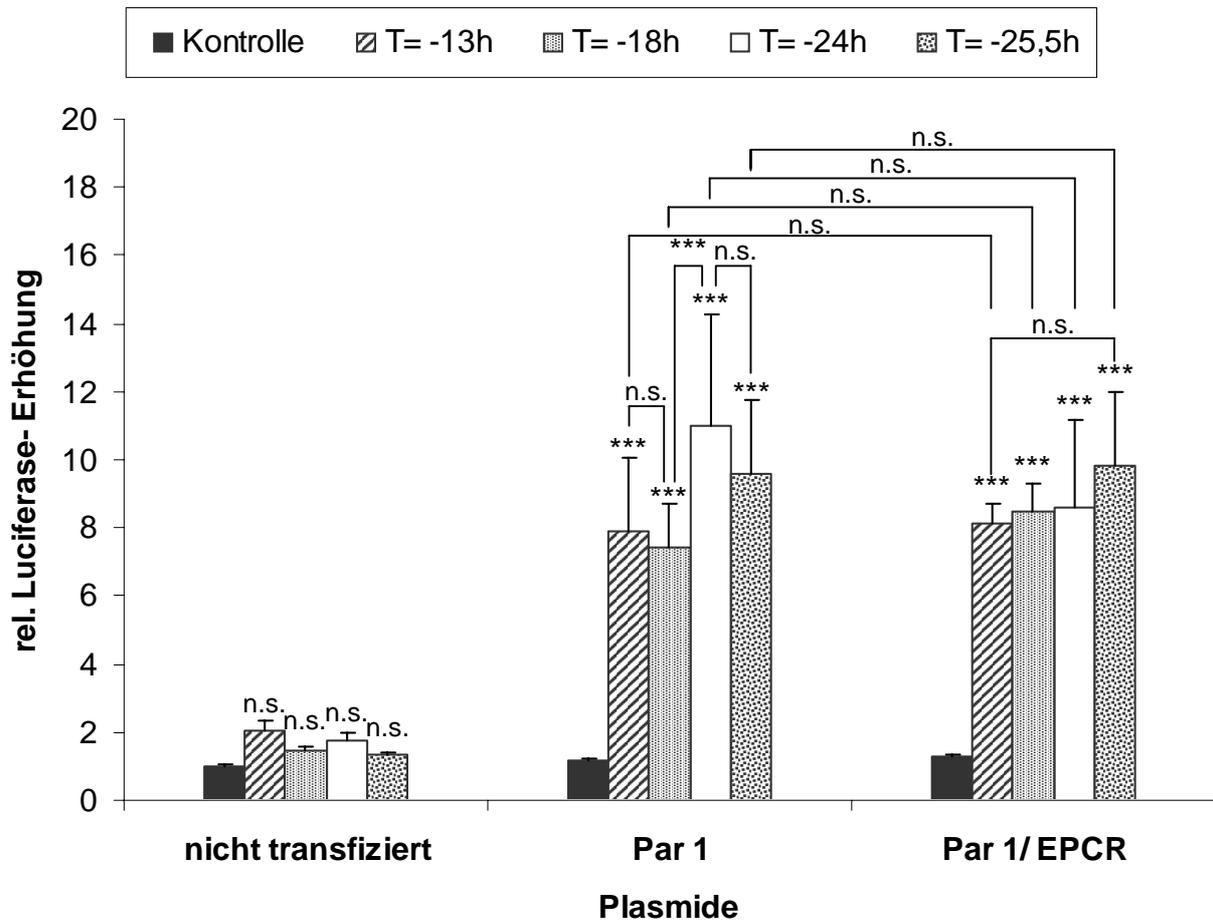


Abb. 4-25: Zeitabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit Thrombin (1 U/ml).

Stimuliert wurde 13 h, 18 h, 24 h und 25,5 h lang (Minuszeichen vor den Stimulationszeiten in der Abbildung bedeuten Stimulationszeiten in Stunden bis zur Auswertung bei T = 48 h nach Transfektion der Zellen). HEK293T-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (25 ng)** und **PAR 1 + EPCR (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils vier Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit $***p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293T-Zellen), sowie versus transfizierten und mit Thrombin (1 U/ml) stimulierten HEK293T-Zellen angegeben.

4.2.6.5 SLIGKV-OH an PAR 2 und EPCR

SLIGKV-OH führte zu dosis- und zeitabhängigen Steigerungen der Luciferase Aktivitäten an PAR 2 in HEK2sA201-Zellen (Abb. 4-26, 4-27). Dabei hatte der EPC Rezeptor keinen Einfluß auf die Luciferase Aktivitäten. Die EC 50 beträgt 308,9 μM [IQR: 262,7 bis 363,2 μM].

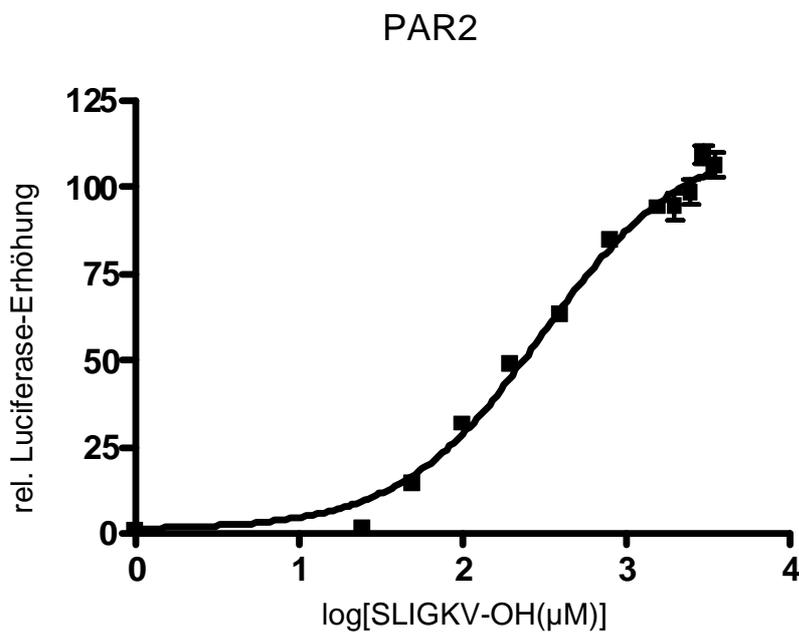


Abb. 4-26: Sättigungskurve; Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit SLIGKV-OH in verschiedenen Konzentrationen.

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK2sA201-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit dem Plasmid **PAR 2 (25 ng)** transfiziert (n = 3).

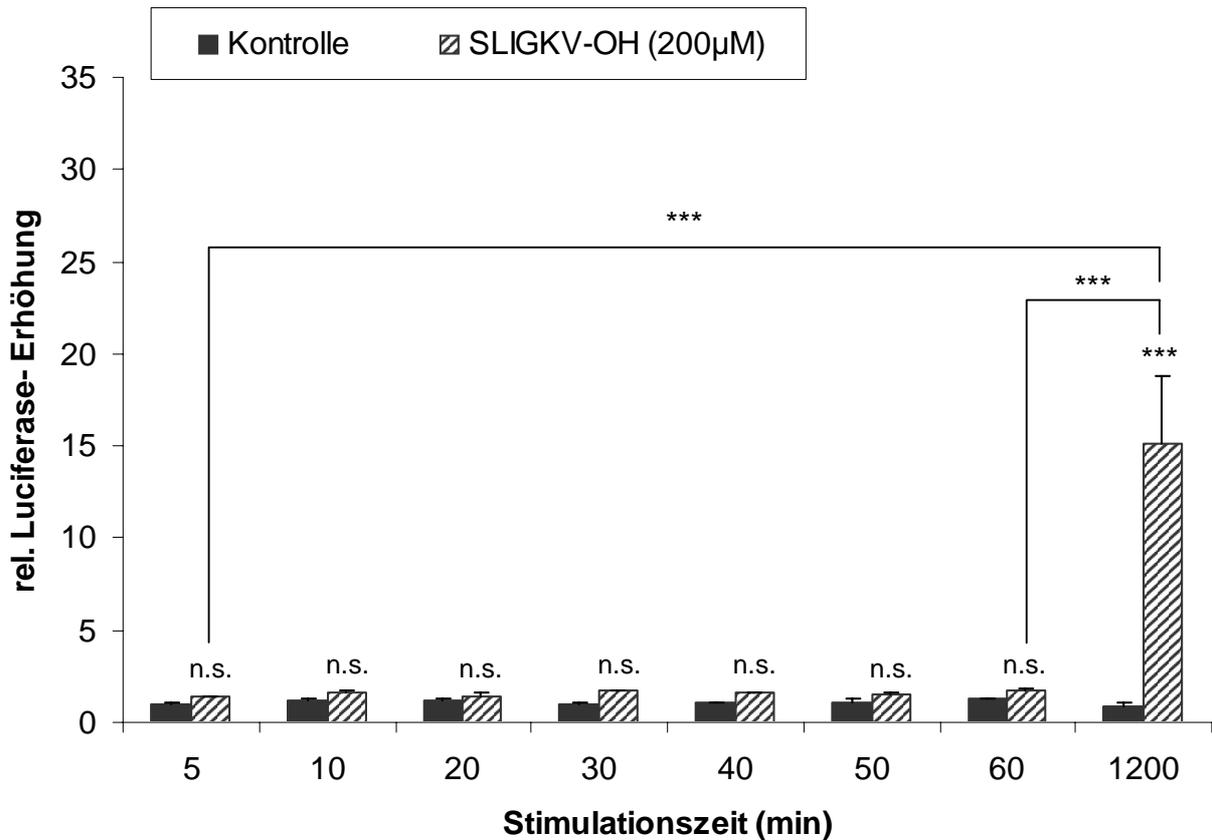


Abb. 4-27: Zeitabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit SLIGKV-OH (200 µM).

Nach der Stimulation wurde das Medium mit enthaltenem Agonisten von den Zellen abgezogen und durch DMEMred (0,5 % FCS) ersetzt. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 2 + EPCR (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist erstens mit $***p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen) angegeben, sowie zweitens im Vergleich unterschiedlicher Stimulationszeiten der mit SLIGKV-OH stimulierten HEK293A-Zellen zueinander.

4.2.6.6 TFLLRNPNDK-NH2 an PAR 1 und EPCR

Die Abbildungen 4-28 bis 4-30 zeigen die dosis- bzw. zeitabhängigen Steigerungen der Luciferase Aktivitäten nach Stimulation des PAR 1 alleine bzw. in Kombination mit dem EPC Rezeptor mit TFLLRNPNDK-NH2. Dabei hatte der EPCR keine Auswirkungen auf die Luciferase Aktivitäten. Die EC 50 beträgt 48,22 μM [IQR: 31,24 bis 74,45 μM].

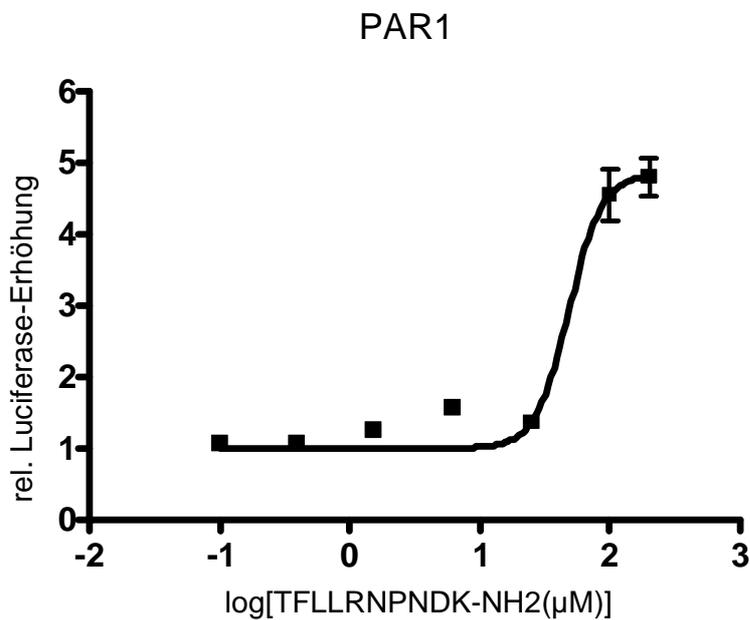


Abb. 4-28: Sättigungskurve; Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit TFLLRNPNDK-NH2 in verschiedenen Konzentrationen.

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit dem Plasmid **PAR 1 (50 ng)** transfiziert (n = 3).

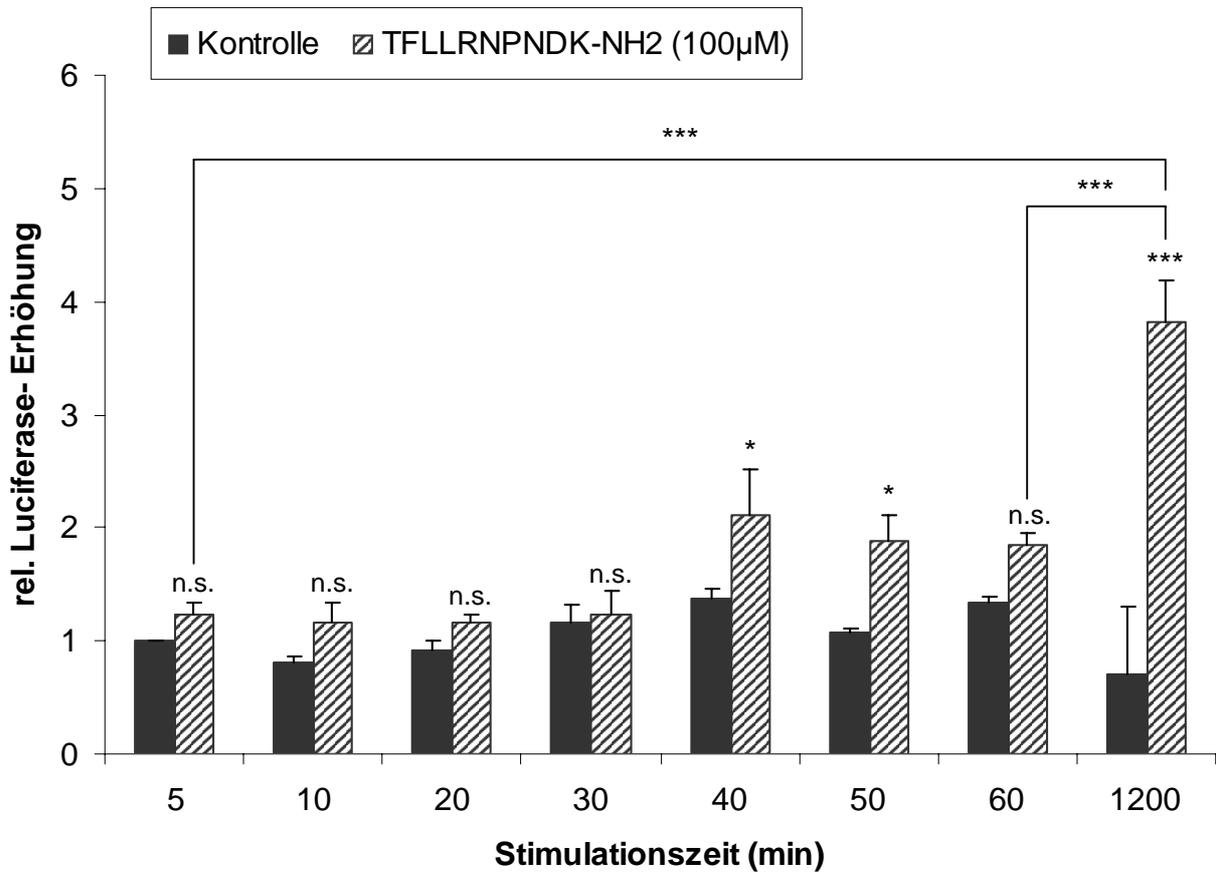


Abb. 4-29: Zeitabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit TFLLRNPNDK-NH2 (100 μM).

Nach der Stimulation wurde das Medium mit enthaltenem Agonisten von den Zellen abgezogen und durch DMEMred (0,5 % FCS) ersetzt. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 + EPCR (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist erstens mit * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen) angegeben, sowie zweitens im Vergleich unterschiedlicher Stimulationszeiten der mit TFLLRNPNDK-NH2 stimulierten HEK293A-Zellen zueinander.

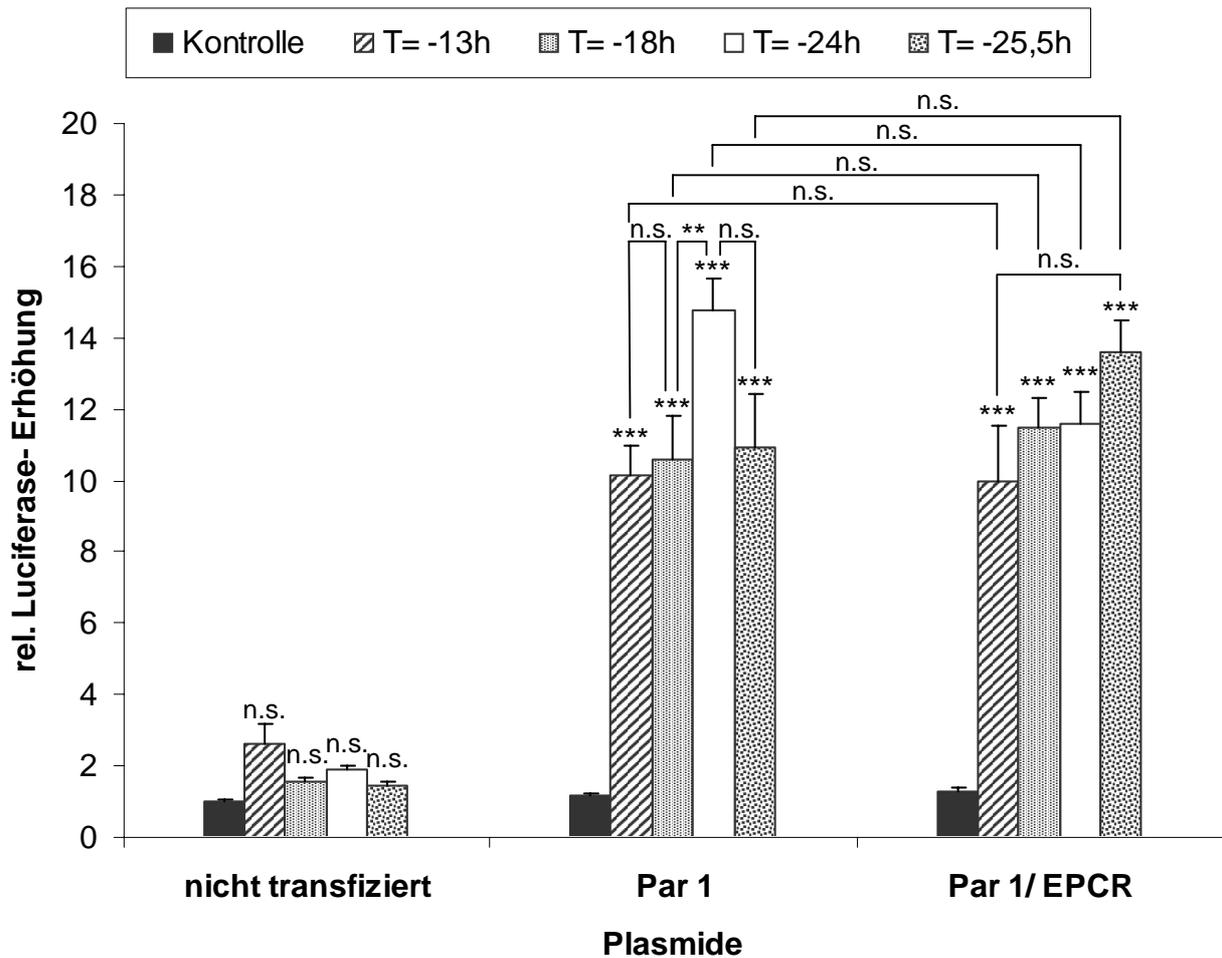


Abb. 4-30: Zeitabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit TFLLRNPNDK-NH2 (100 μ M).

Stimuliert wurde 13 h, 18 h, 24 h und 25,5 h lang (Minuszeichen vor den Stimulationszeiten in der Abbildung bedeuten Stimulationszeiten in Stunden bis zur Auswertung bei T = 48 h nach Transfektion der Zellen). HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (25 ng)** und **PAR 1 + EPCR (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils vier Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen), sowie versus transfizierten und mit TFLLRNPNDK-NH2 stimulierten HEK293A-Zellen angegeben.

4.2.6.7 Faktor Xa an PAR 1 und PAR 2

Die Abbildungen 4-31 und 4-32 stellen die dosisabhängigen Wirkungen von Faktor Xa an den Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 dar. Die EC 50 beträgt für den PAR 1 Rezeptor 28,75 μM [IQR: 15,29 bis 54,05 μM] und für den PAR 2 Rezeptor 59,25 μM [IQR: 22,95 bis 153,0 μM]. Faktor Xa bewirkte sowohl an PAR 1 als auch an PAR 2 dosisabhängige Steigerungen der Luciferase Aktivitäten. Allerdings wurde eine Sättigung in unseren Versuchen nicht erreicht.

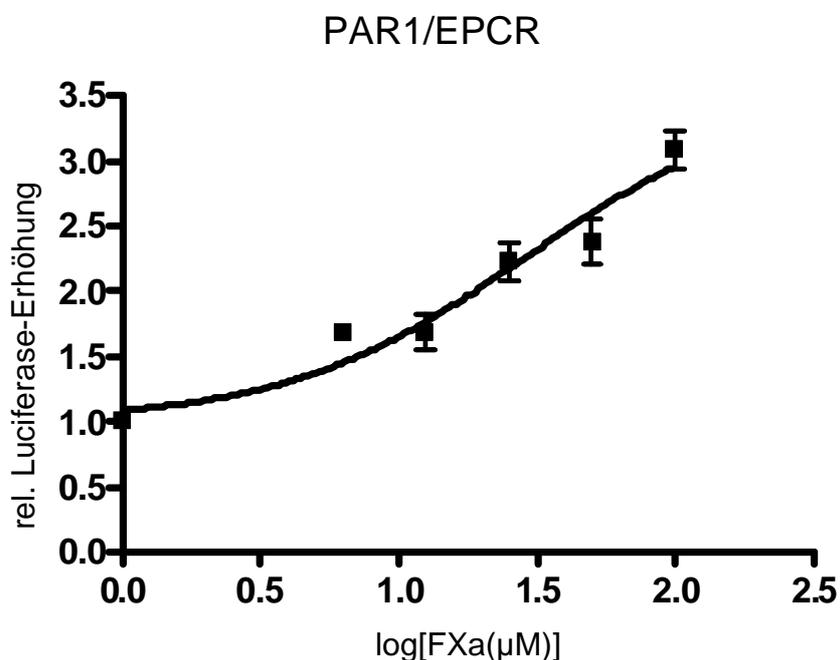


Abb. 4-31: Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit Faktor Xa in verschiedenen Konzentrationen.

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit dem Plasmid **PAR 1 (50 ng)** transfiziert (n = 3).

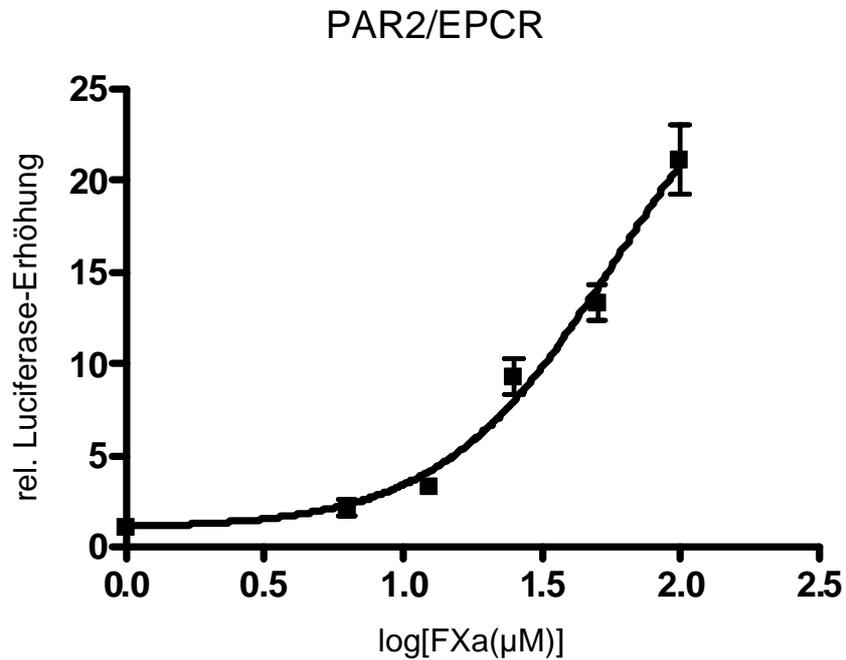


Abb. 4-32: Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Stimulation mit Faktor Xa in verschiedenen Konzentrationen.

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEKtsA201-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit dem Plasmid **PAR 2 (25 ng)** transfiziert (n = 3).

4.3 Additive Effekte der Agonisten

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die Kostimulationen von rhAPC mit Thrombin und Faktor Xa Einfluß auf die Luciferase Aktivitäten der HEKtsA201-Zellen hatten. Dazu wurden in einem ersten Versuch Kostimulationen sowohl mit rhAPC und Thrombin als auch mit rhAPC und Faktor Xa an den Rezeptorkombinationen PAR 1 + EPCR, PAR 2 + EPCR und PAR 1 + PAR 2 + EPCR durchgeführt. Die anschließenden Experimente sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit sich die Vorstimulation mit rhAPC und Nachstimulation mit Faktor Xa auf die Luciferase Aktivität in HEKtsA201-Zellen im Vergleich zu den Kostimulationen beider Agonisten auswirkt. Stimuliert wurde dabei die Rezeptorkombination PAR 2 und EPCR.

4.3.1 Kostimulation von rhAPC mit Thrombin

Für die Kostimulationen wurden HEKtsA201-Zellen mit den Rezeptorkombinationen PAR 1 + EPCR (Abb. 4-33) und PAR 1 + PAR 2 + EPCR (Abb. 4-34) transfiziert. Stimuliert wurde mit rhAPC und Thrombin. RhAPC und Thrombin führten in beiden Versuchen jeweils einzeln sowie in Kostimulation zu dosisabhängigen Steigerungen der Luciferase Aktivitäten in HEKtsA201-Zellen. Die Kostimulationen von rhAPC mit Thrombin ergaben signifikant höhere Luciferase Aktivitäten als die jeweiligen Einzelstimulationen und wirkten damit additiv. Zum Beispiel (Abb. 4-33) zeigte der Vergleich der alleinigen rhAPC-Wirkung in der Konzentration 0,2 µg/ml mit der Kostimulation Thrombin (1,0 U/ml) und rhAPC (0,2 µg/ml) einen signifikanten Anstieg der Luciferase Aktivität zugunsten der Kostimulation (rhAPC 0,2 µg/ml: $1,5 \pm 0,1$, Thrombin 1,0 U/ml + rhAPC 0,2 µg/ml: $2,6 \pm 0,1$, $p < 0,001$). Insgesamt wurden die höchsten Luciferase Aktivitäten in Kombination mit dem PAR 2 erzielt.

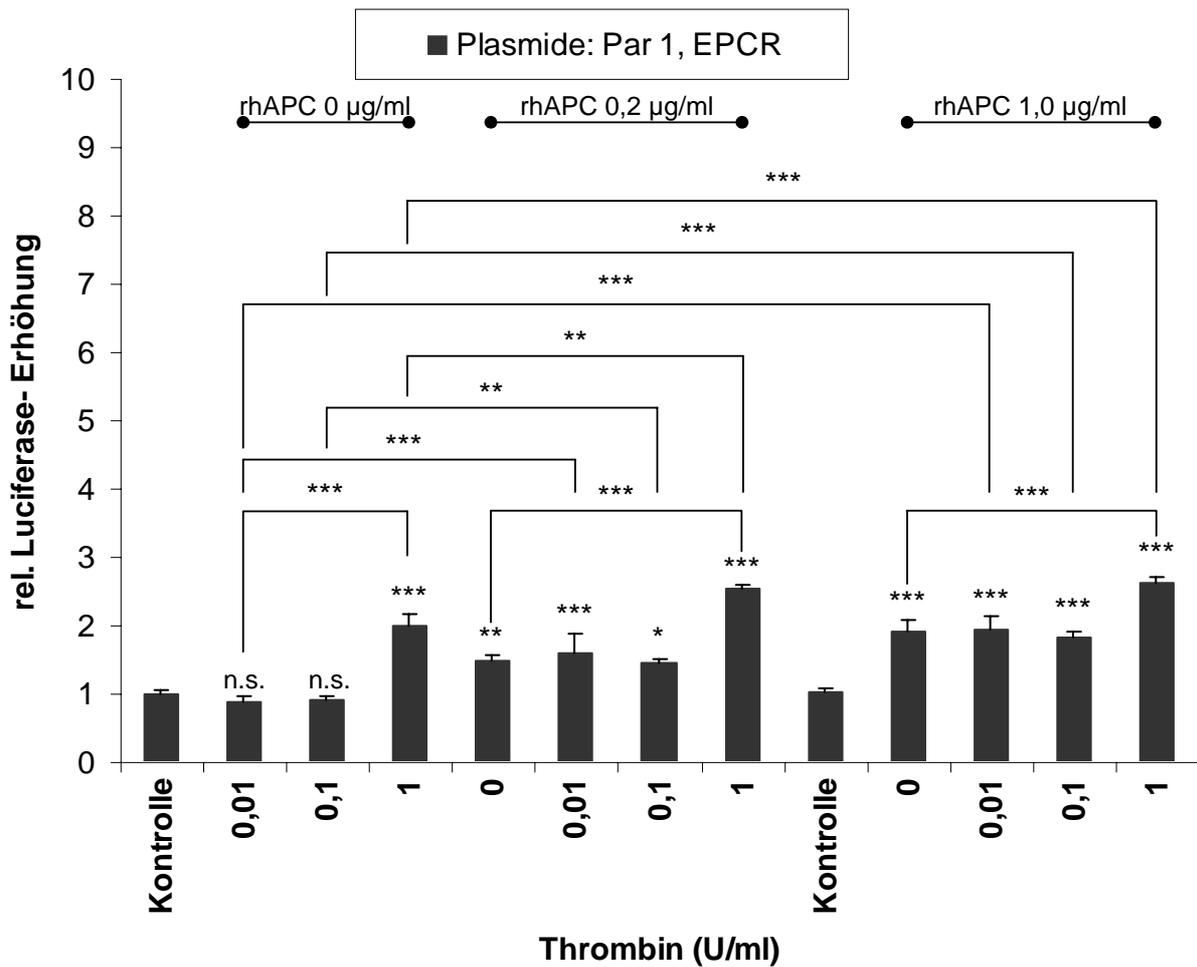


Abb. 4-33: Dosisabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Kostimulation mit Thrombin und rhAPC.

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEKtsA201-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 + EPCR (50 bzw. 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEKtsA201-Zellen), sowie versus transfizierten, mit rhAPC bzw. Thrombin (verschiedenen Konzentrationen) stimulierten HEKtsA201-Zellen angegeben.

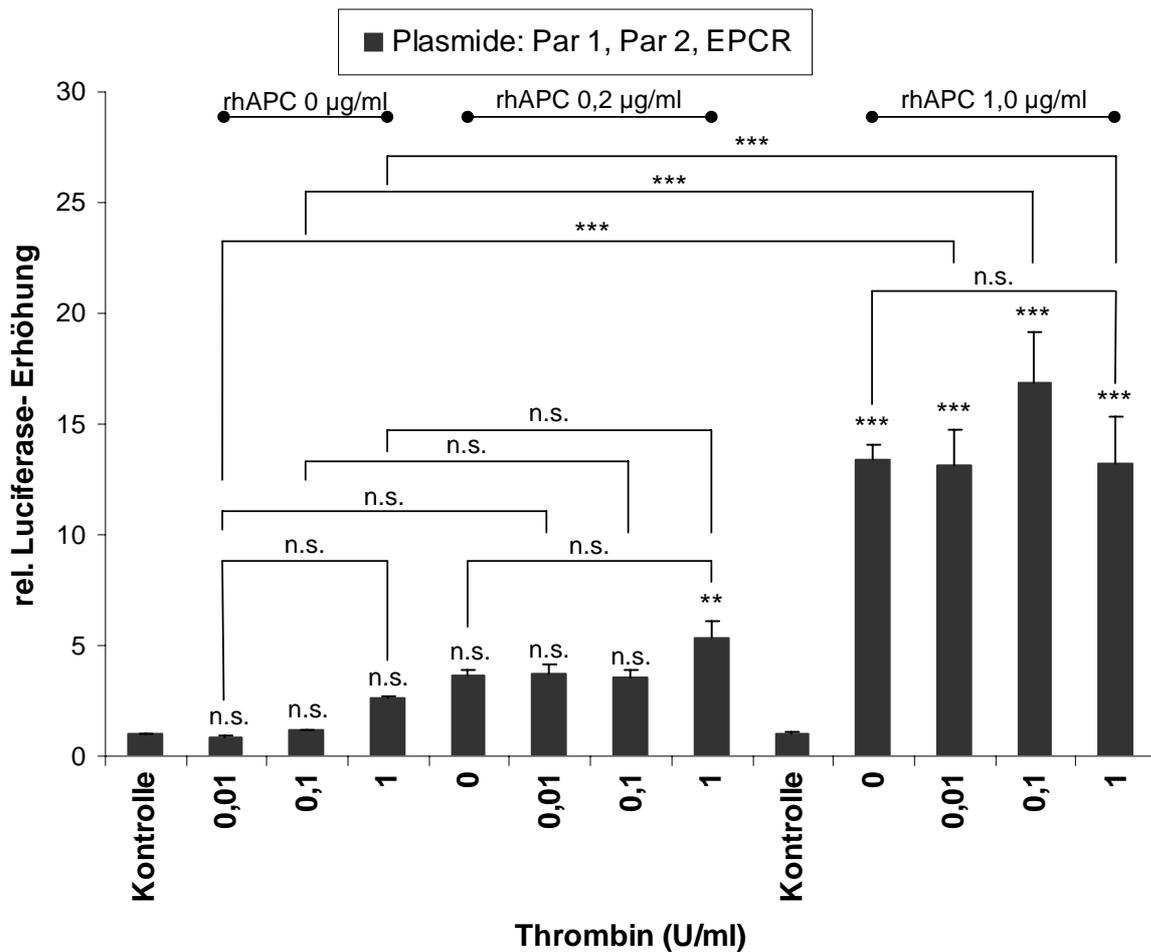


Abb. 4-34: Dosisabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Kostimulation mit Thrombin und rhAPC.

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (50 ng) + PAR 2 (25 ng) + EPCR (25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen), sowie versus transfizierten, mit rhAPC bzw. Thrombin (verschiedenen Konzentrationen) stimulierten HEK293A-Zellen angegeben.

4.3.2 Kostimulation von rhAPC mit Faktor Xa

Für diese Kostimulationen wurden HEK293A-Zellen mit den Rezeptorkombinationen PAR 1 + EPCR (Abb. 4-35), PAR 2 + EPCR (Abb. 4-36) und PAR 1 + PAR 2 + EPCR (Abb. 4-37) transfiziert. Stimuliert wurde mit rhAPC und mit Faktor Xa. Die Kostimulationen von rhAPC mit Faktor Xa führten in unseren Experimenten zu dosisabhängigen Steigerungen der Luciferase Aktivitäten. Sie ergaben signifikant höhere Luciferase Aktivitäten als die jeweiligen Einzelstimulationen mit rhAPC bzw. Faktor Xa und wirkten damit additiv. Zum Beispiel führten die alleinigen Stimulationen mit Faktor Xa (Abb. 4-37) in den Konzentrationen 25 nM und 100 nM zu keinen signifikanten Erhöhungen der Luciferase Aktivitäten gegenüber der jeweiligen transfizierten nicht stimulierten Kontrolle. Erst die Kostimulation von Faktor Xa 100 nM mit rhAPC 0,2 µg/ml führte zu einer signifikanten Erhöhung der Luciferase Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle: $1,1 \pm 0,3$, rhAPC 0,2 µg/ml + Faktor Xa 100 nM: $13,4 \pm 1,4$, $p < 0,001$). Dabei wurden insgesamt die höchsten Luciferase Aktivitäten in Kombination mit dem PAR 2 erzielt.

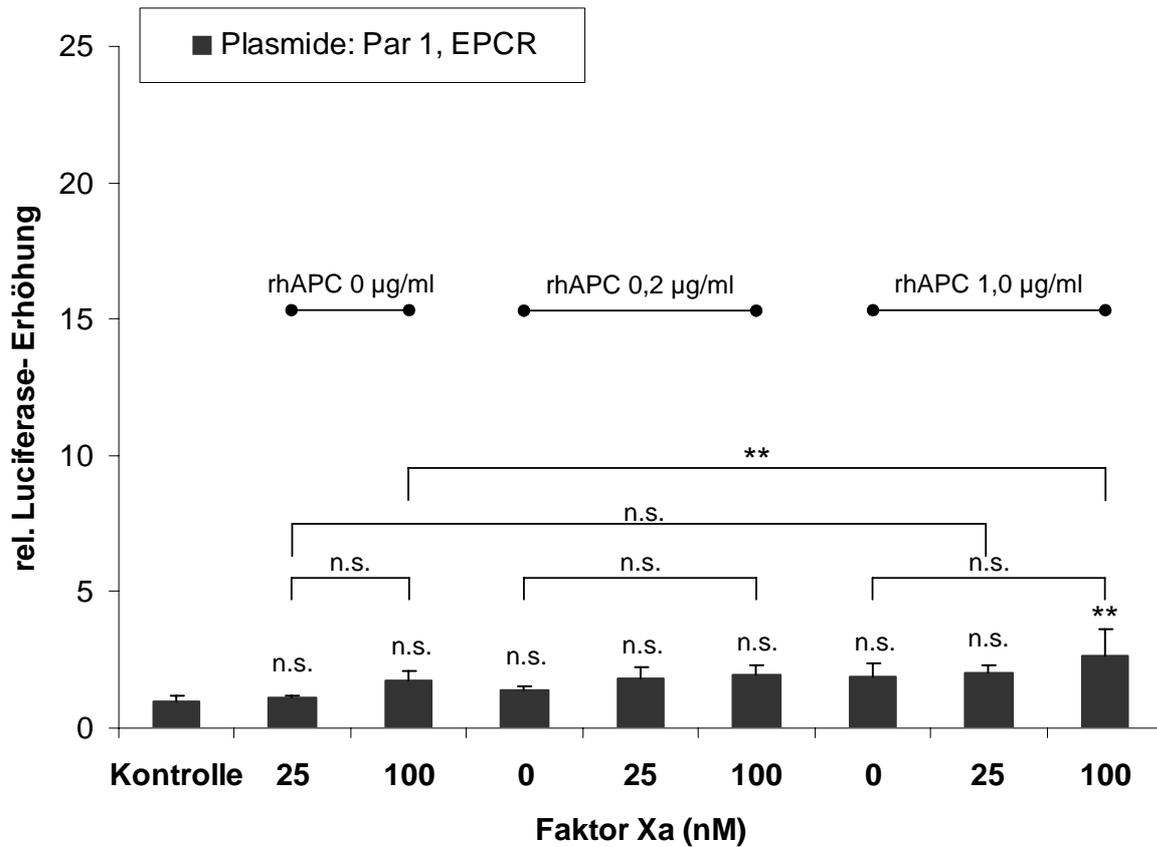


Abb. 4-35: Dosisabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Kostimulation mit Faktor Xa und rhAPC.

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293T-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 + EPCR (50 bzw. 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit ****p < 0,01** versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nichtstimulierte HEK293T-Zellen), sowie versus transfizierten, mit rhAPC bzw. Faktor Xa (in verschiedenen Konzentrationen) stimulierten HEK293T-Zellen angegeben.

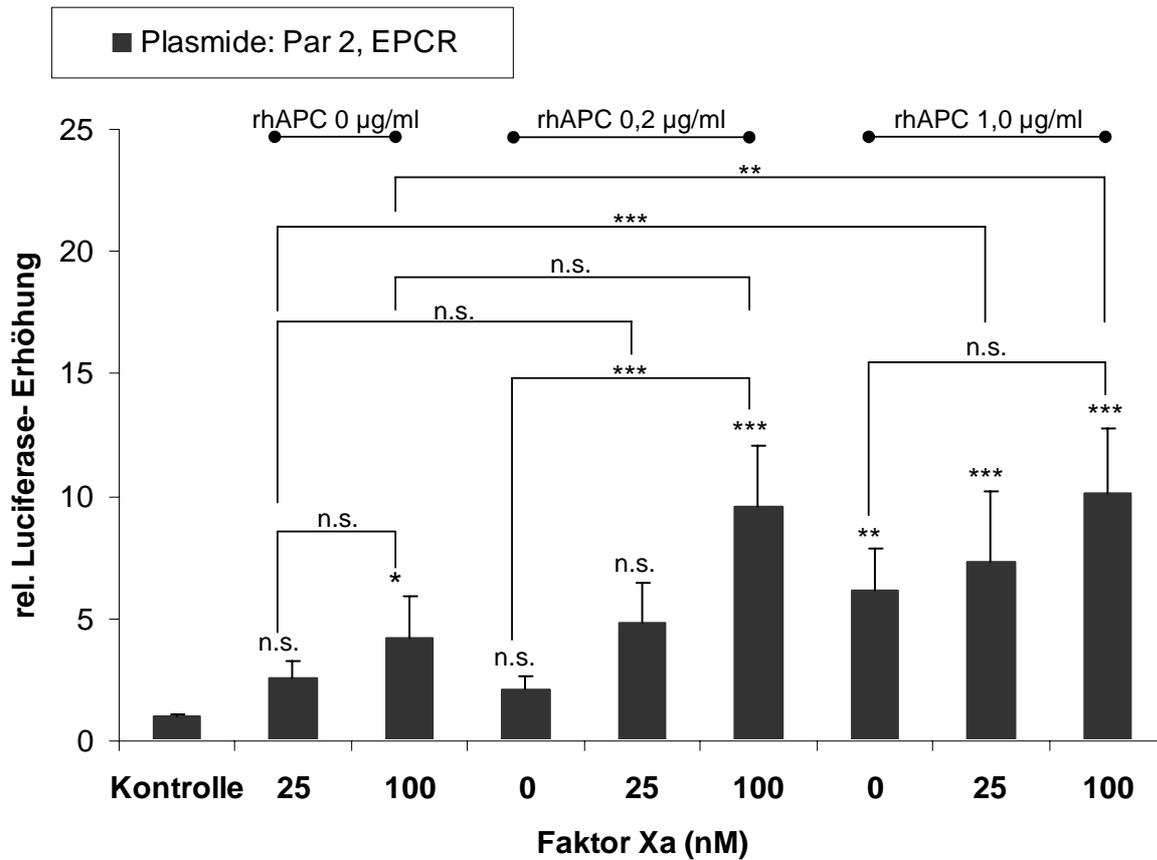


Abb. 4-36: Dosisabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität nach Kostimulation mit Faktor Xa und rhAPC.

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293T-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 2 + EPCR (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit ** $p < 0,01$ und *** $p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293T-Zellen), sowie versus transfizierten, mit rhAPC bzw. Faktor Xa (in verschiedenen Konzentrationen) stimulierten HEK293T-Zellen angegeben.

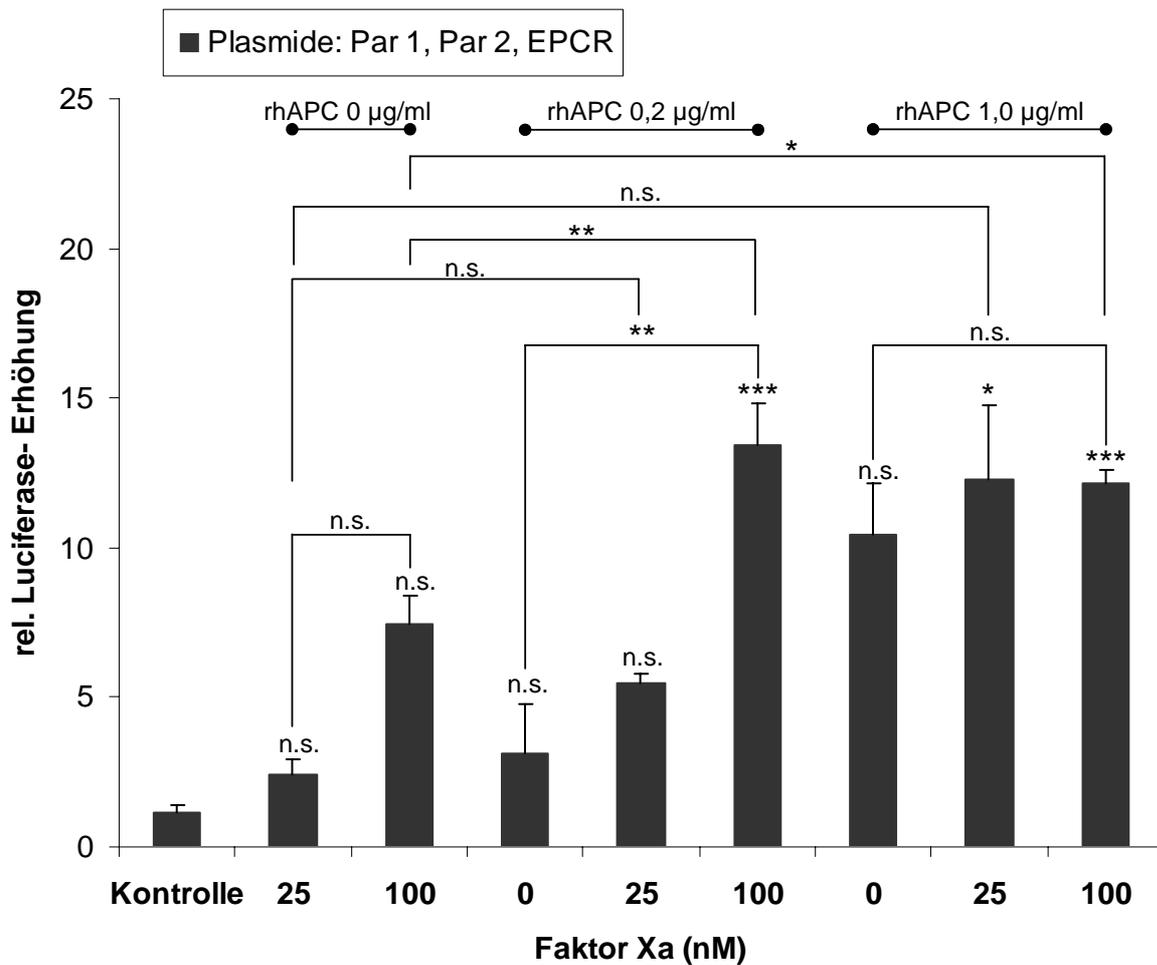


Abb. 4-37: Dosisabhängige Ermittlung der Luciferase Aktivität als Vielfaches der Kontrolle nach Kostimulation mit Faktor Xa und rhAPC.

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEKtsA201-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1**, **PAR 2** und **EPCR** (jeweils 25 ng) transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEKtsA201-Zellen), sowie versus transfizierten, mit rhAPC bzw. Faktor Xa (in verschiedenen Konzentrationen) stimulierten HEKtsA201-Zellen angegeben.

4.3.3 Zeitabhängige Vor- bzw. Kostimulationen mit rhAPC und Faktor Xa

Im folgenden Experiment (Abb. 4-38) sollte untersucht werden, wie sich Vor- bzw. Kostimulation mit rhAPC auf die Stimulation der HEK293A-Zellen mit Faktor Xa auswirken. HEK293A-Zellen wurden dazu mit der Rezeptorkombination PAR 2 und EPCR transfiziert. Zum Vergleich wurde sowohl mit rhAPC bzw. Faktor Xa alleine stimuliert, als auch kostimuliert, sowie mit rhAPC vorstimuliert (Mediumwechsel) und mit Faktor Xa nachstimuliert.

Die Kostimulationen von rhAPC mit Faktor Xa führten unabhängig von der Stimulationsdauer und dosisabhängig zu signifikanten Steigerungen der Luciferase Aktivitäten und damit zu additiven Wirkungen an der Rezeptorkombination PAR 2 + EPCR in HEK293A-Zellen. So ergab der Vergleich zwischen alleiniger Stimulation mit rhAPC (0,2 µg/ml und 1,0 µg/ml) von T = -8 h, -4 h, -2 h bis T = 20 h und der Stimulation mit rhAPC (0,2 µg/ml und 1,0 µg/ml) von T = -8 h, -4 h, -2 h bis T = 20 h mit Zugabe von Faktor Xa (25 nM) bei T = 0 h bis T = 20 h (Kostimulation) signifikante Erhöhungen der Luciferase Aktivitäten zugunsten der Kostimulationen. Ebenfalls führten die Vorstimulationen mit rhAPC (0,2 µg/ml und 1,0 µg/ml) von T = -8 h, -4 h, -2 h bis T = 0 h (Mediumwechsel) und anschließende Nachstimulationen mit Faktor Xa von T = 0 h bis T = 20 h zu signifikanten Erhöhungen der Luciferase Aktivitäten gegenüber den alleinigen Stimulationen mit rhAPC von T = -8 h, -4 h, -2 h bis T = 20 h.

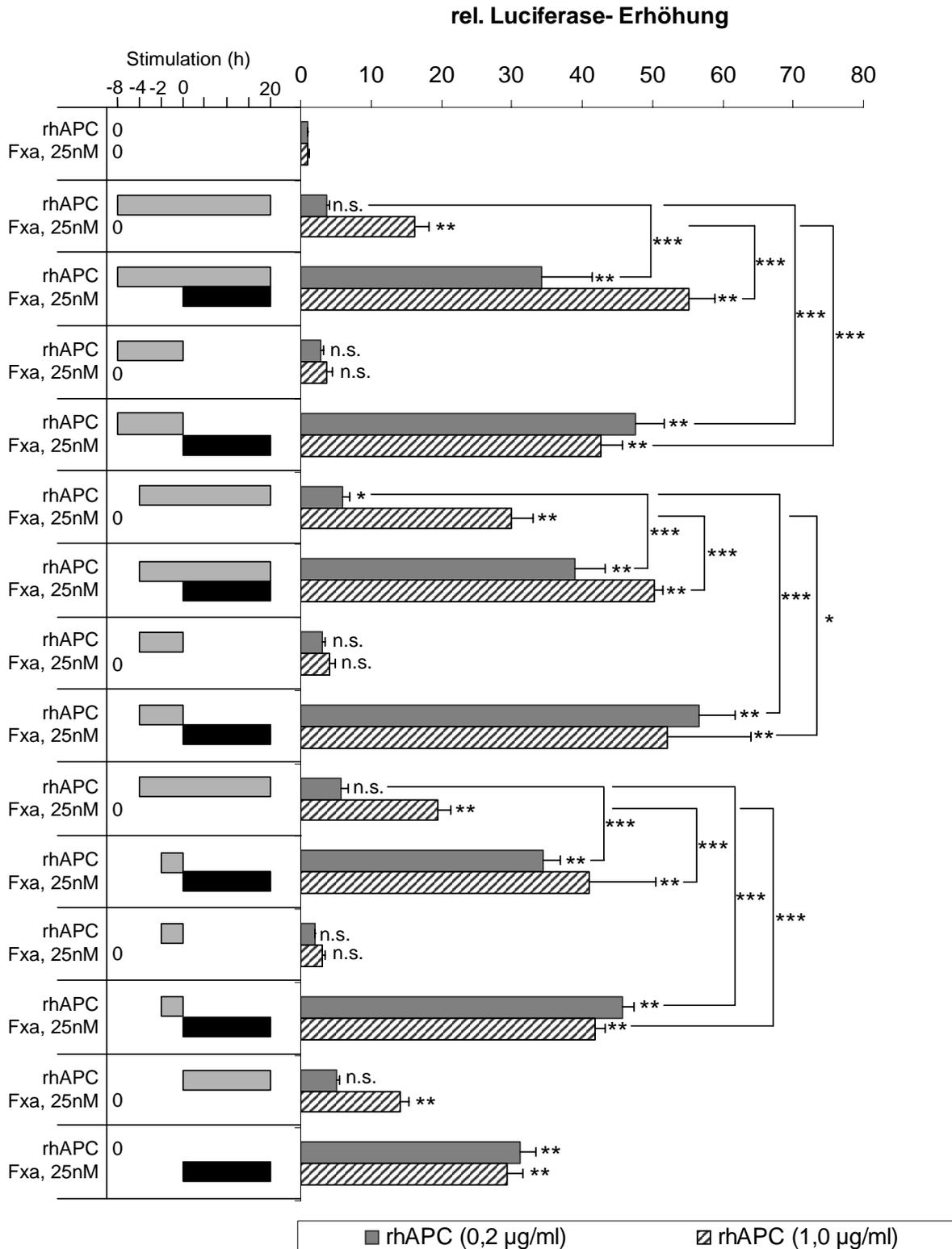


Abb. 4-38: Ermittlung der Luciferase Aktivität durch alleinige Stimulation mit rhAPC (0,2 µg/ml, 1,0 µg/ml) bzw. Faktor Xa (25 nM), Kostimulation beider Agonisten sowie Vorstimulation mit rhAPC und Nachstimulation mit Faktor Xa.

Legende zu Abb. 4-38:

In diesem Experiment wurde mit Faktor Xa und rhAPC in verschiedenen Kombinationen zu verschiedenen Zeitpunkten stimuliert. Bei T = 0 h wurde das Medium (DMEMred 0,5 % FCS) gewechselt. Die Auswertung erfolgte bei T = 20 h. HEKtsA-Zellen wurden 48 h vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 2 und EPCR (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils sechs Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0.001 versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEKtsA201-Zellen), sowie versus transfizierten, mit rhAPC (0,2 μ g/ml und 1,0 μ g/ml) und/oder Faktor Xa (25 nM) stimulierten HEKtsA201-Zellen angegeben.

4.4 Erklärung für die additiven Effekte der Agonisten

Zur weiteren Abklärung der unter Punkt 4.3 beschriebenen additiven Effekte wurden in den folgenden Experimenten die molekularen Abläufe in der Zelle untersucht, die nach Stimulation der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 in Kombination mit dem EPC Rezeptor durch die Serinproteinasen rhAPC, Thrombin, Faktor Xa sowie durch die spezifischen PAR-Agonisten TFLLRNPNDK-NH₂ und SLIGKV-OH in Gang gesetzt wurden. Dazu wurden nach Rezeptorstimulation systematisch G-Proteine und Rho bzw. ROCK im Ablauf der Signaltransduktionskaskade gehemmt (Tabelle 4-2, Abb. 4-39).

Die erfolgreiche oder nicht erfolgreiche Hemmung der Luciferase Aktivität ließ letztendlich Schlüsse über die Beteiligung des gehemmten Proteins an der Signaltransduktionskaskade zu.

Tabelle 4-2: Auflistung der verwendeten Inhibitoren, deren Eigenschaften sowie Angriffspunkte der Hemmung (GAP = GTPase Accelerating Protein).

Inhibitor	Eigenschaft	Hemmung
LSC-Plasmid	Codiert das GAP LSC	G α 12 / 13
RGS2-Plasmid	Codiert das GAP RGS2	G α q / 11
PTX	Pertussis Toxin des Keuchhusten-auslösenden Erregers <i>Bordetella pertussis</i>	G α i / o
EFC3-Plasmid	codiert die C3-ADP-Ribosyltransferase des Botulismus auslösenden Bakteriums <i>Clostridium botulinum</i>	Inaktivierung von Rho (A-C)
Y-27632		Rho Associated Protein Kinase (ROCK) - Hemmer

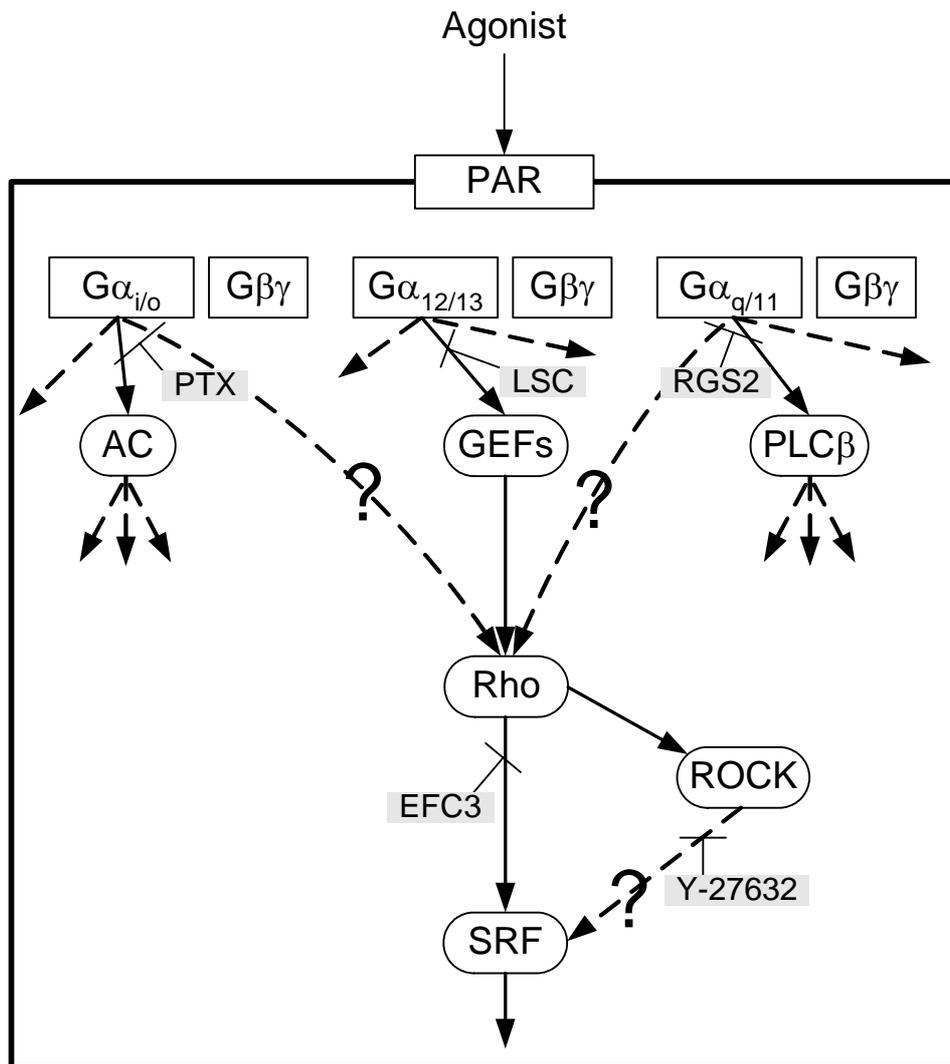


Abb. 4-39: Schematische Darstellung der Hemmung der G-Proteine und Rho bzw. ROCK in der Signaltransduktionskaskade der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2.

Die Aktivierung der Rezeptorkombinationen PAR 1 + EPCR bzw. PAR 2 + EPCR durch die jeweiligen Agonisten Thrombin, rhAPC, Faktor Xa, TFLLRNPNDK-NH2 und SLIGKV-OH führt zur Konformationsänderung des Rezeptors und damit zur Konformationsänderung des im inaktiven Zustand an den Rezeptor gebundenen heterotrimeren G-Proteins. Es kommt zum Austausch des an der $G\alpha$ -Untereinheit gebundenen GDPs durch GTP. Das Trimer zerfällt in die GTP-tragende $G\alpha$ -Untereinheit und das $\beta\gamma$ -Dimer. Sowohl die α -Untereinheit als auch das $\beta\gamma$ -Dimer können anschließend unabhängig voneinander an spezifische Effektoren binden und deren Aktivität steuern.

(AC = Adenylatcyclase; GEFs = Guaninnukleotid Exchange Factors; PLC β = Phospholipase C β ; SRF = Serum Response Factor; RhoA Protein; ROCK = Rho abhängige Kinase)

4.4.1 Hemmung von $G\alpha$ 12/13

Die $G\alpha$ 12/13-Untereinheit sollte in den folgenden Experimenten durch das GTPase Accelerating Protein (GAP) LSC gehemmt werden (Abb. 4-40 bis 4-48).

Die Stimulation der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 führte im Wesentlichen unabhängig vom verwendeten Agonisten in HEK293A-Zellen zu einer Signaltransduktion über $G\alpha$ 12/13. Die Transfektion von LSC ergab in unseren Experimenten mit Ausnahme der Stimulation der Rezeptorkombination PAR 2 + EPCR mit Thrombin (Abb. 4-40, vergleiche auch Punkt 4.2.5) eine dosisabhängige Hemmung der Luciferase Aktivität in HEK293A-Zellen.

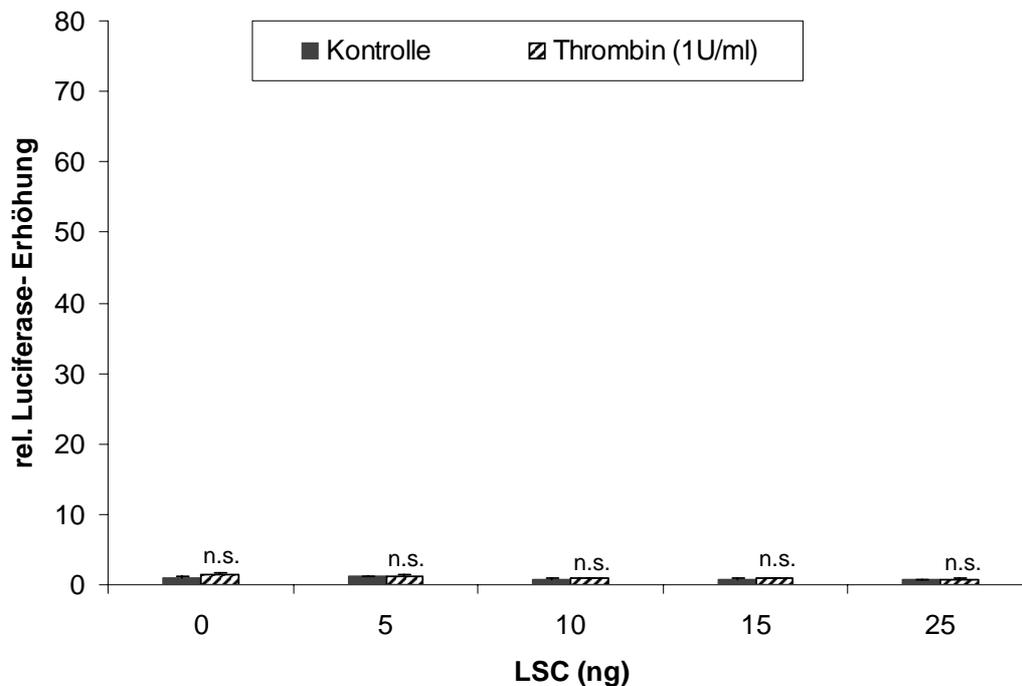


Abb. 4-40

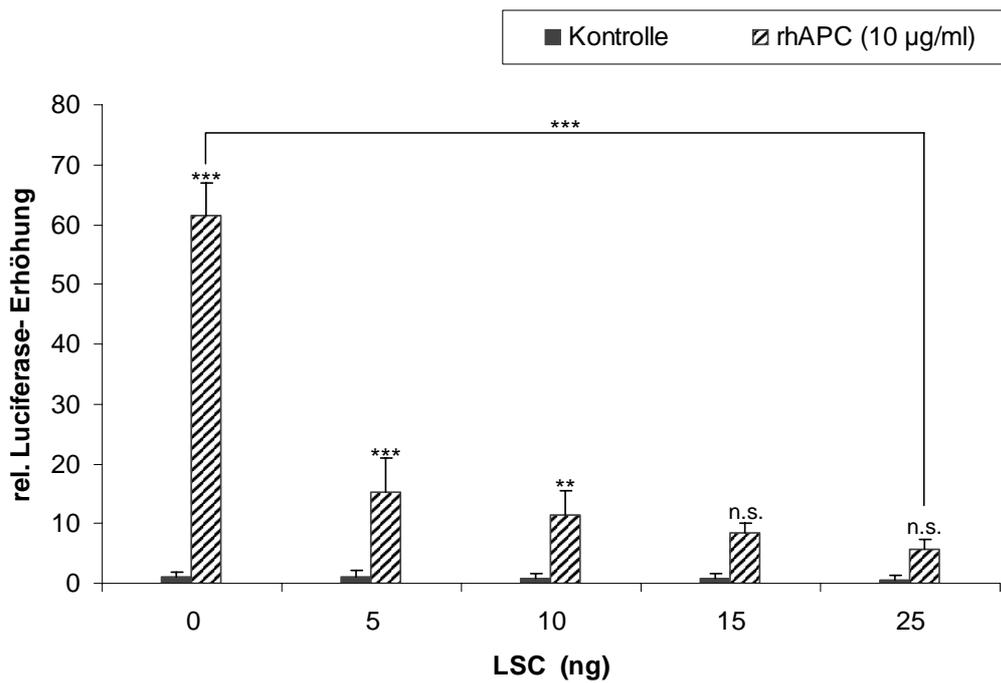


Abb. 4-41

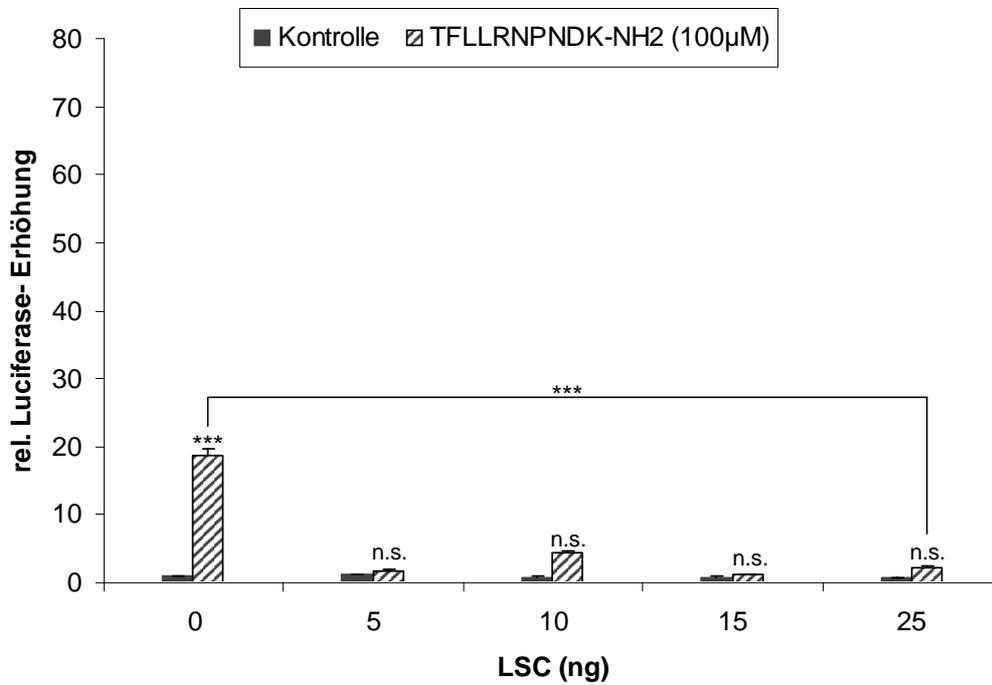


Abb. 4-42

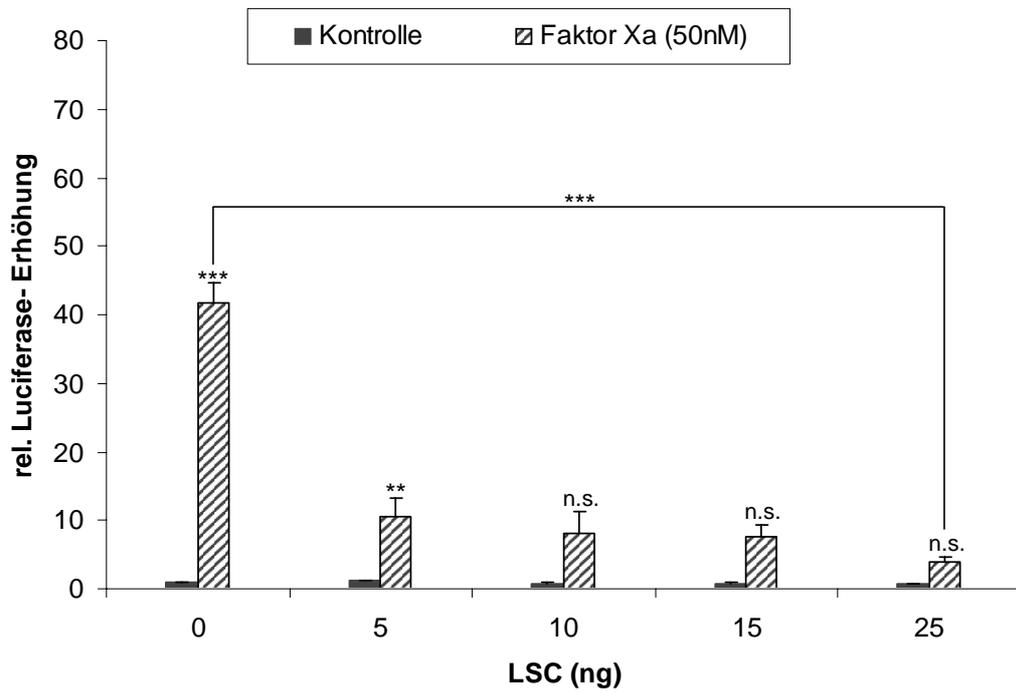


Abb. 4-43

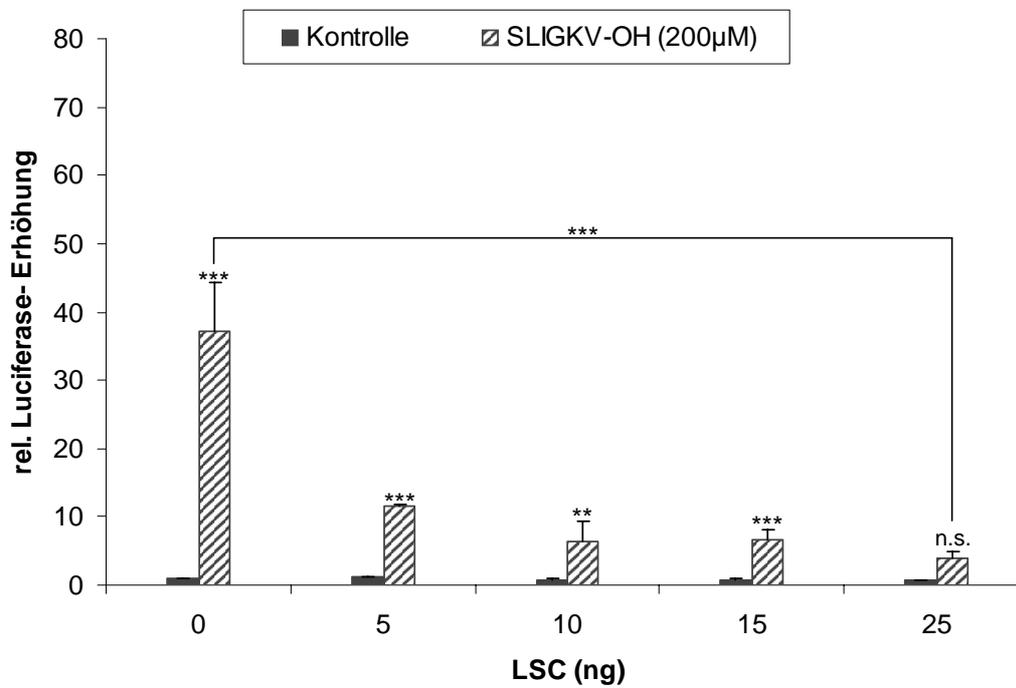


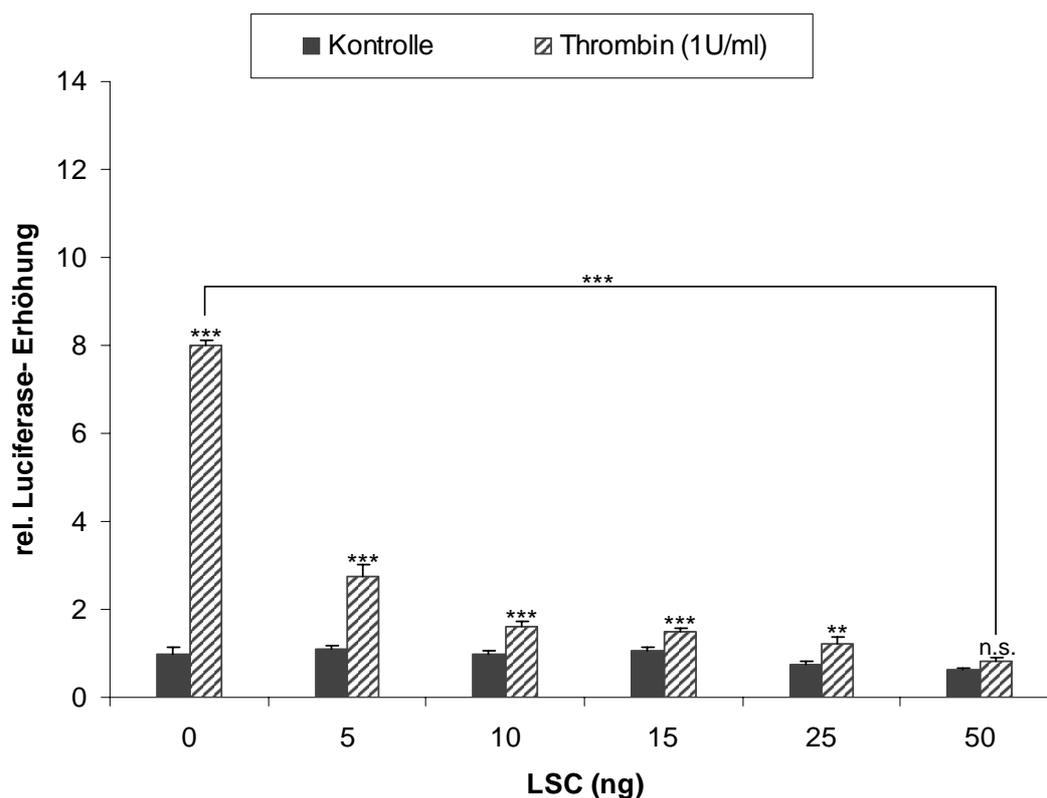
Abb. 4-44

Legende zu den Abb. 4-40 bis 4-44:

Ermittlung der Luciferase Aktivität in HEKtsA201-Zellen nach Stimulation mit Thrombin (1 U/ml), rhAPC (10 µg/ml), TFLLRNPNDK-NH2 (100 µM), Faktor Xa (50 nM) oder SLIGKV-OH (200 µM).

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEKtsA201-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 2 (50 ng) + EPCR (25 ng) und LSC in verschiedenen Konzentrationen** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit $**p < 0,01$ und $***p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEKtsA201-Zellen), sowie versus transfizierten und mit dem jeweiligem Agonisten stimulierten HEKtsA201-Zellen angegeben.

**Abb. 4-45**

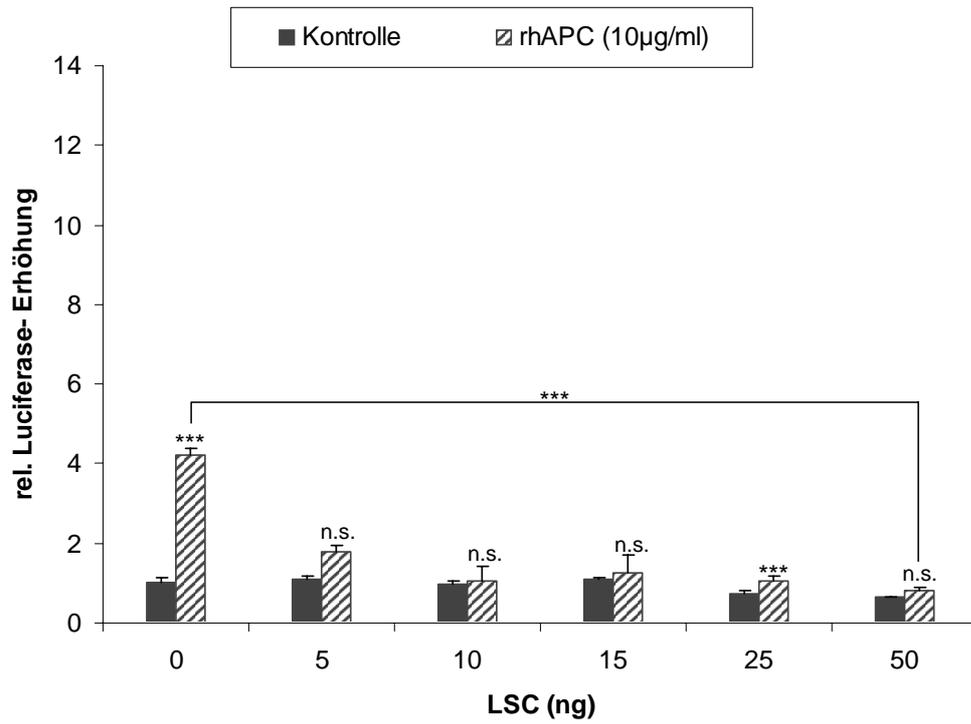


Abb. 4-46

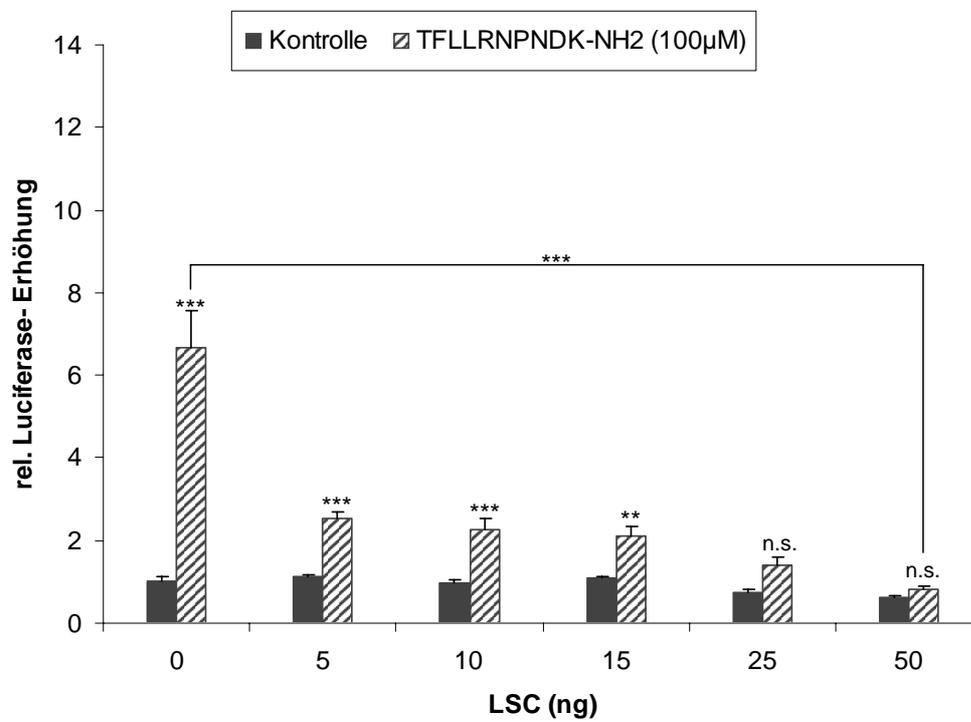


Abb. 4-47

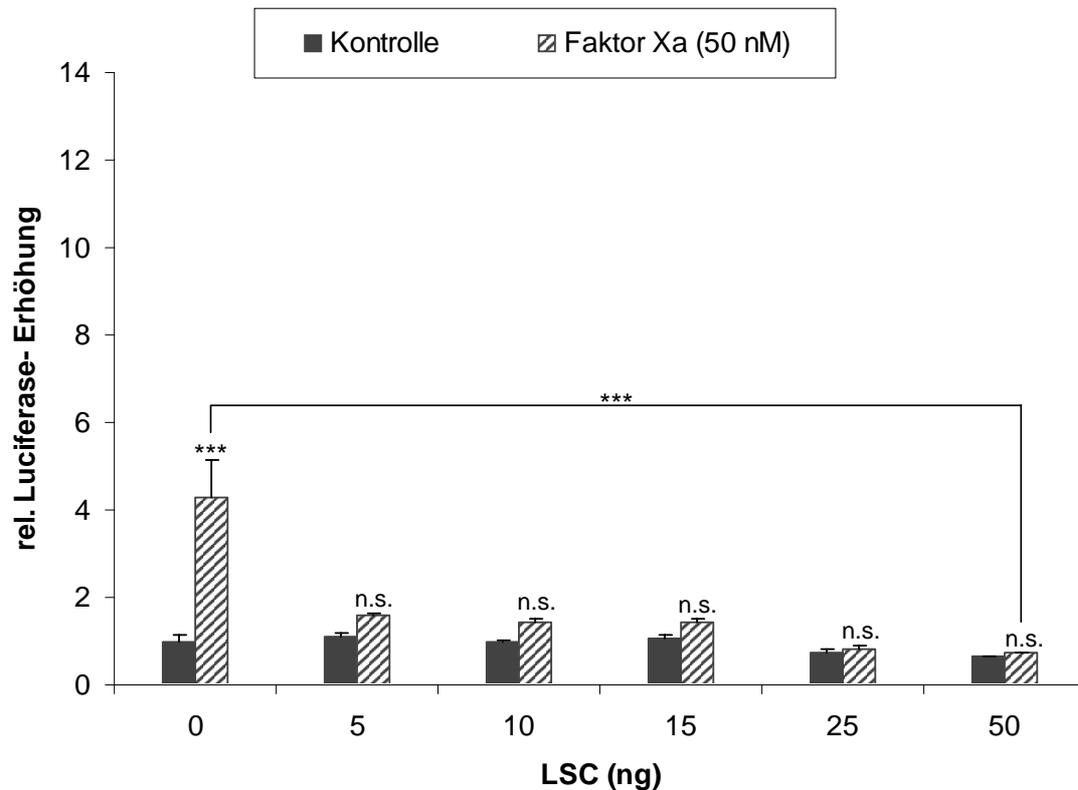


Abb. 4-48

Legende zu den Abb. 4-45 bis 4-48:

Ermittlung der Luciferase Aktivität in HEK293T-Zellen nach Stimulation mit Thrombin (1 U/ml), rhAPC (10 µg/ml), TFLLRNPNDK-NH2 (100 µM) oder Faktor Xa (50 nM).

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293T-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (50 ng) + EPCR (25 ng) und LSC in verschiedenen Konzentrationen** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit $**p < 0,01$ und $***p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293T-Zellen), sowie versus transfizierten und mit dem jeweiligem Agonisten stimulierten HEK293T-Zellen angegeben.

4.4.2 Hemmung von $G\alpha$ q/11

In den folgenden Versuchen sollte die $G\alpha$ q/11-Untereinheit durch das GTPase Accelerating Protein (GAP) RGS2 gehemmt werden (Abb. 4-49 bis 4-55).

Die Stimulation der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 führte im Wesentlichen unabhängig vom verwendeten Agonisten in HEK293A-Zellen zu einer Signaltransduktion über $G\alpha$ q/11. Die Transfektion von RGS2 ergab in unseren Experimenten eine dosisabhängige Hemmung der Luciferase Aktivität in HEK293A-Zellen.

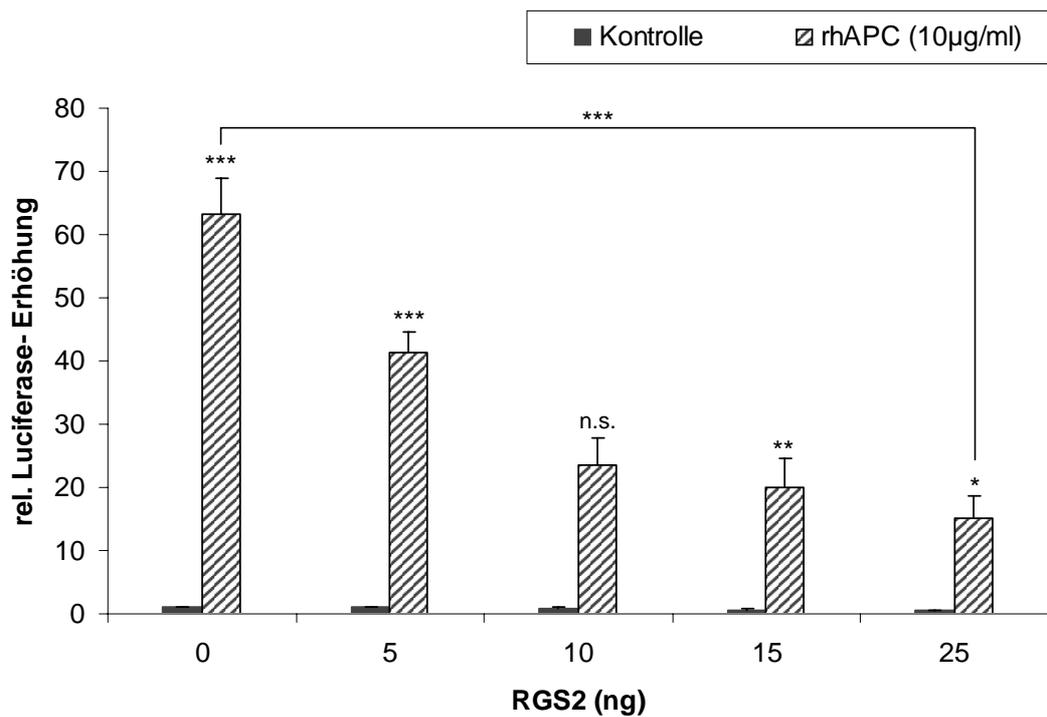


Abb. 4-49

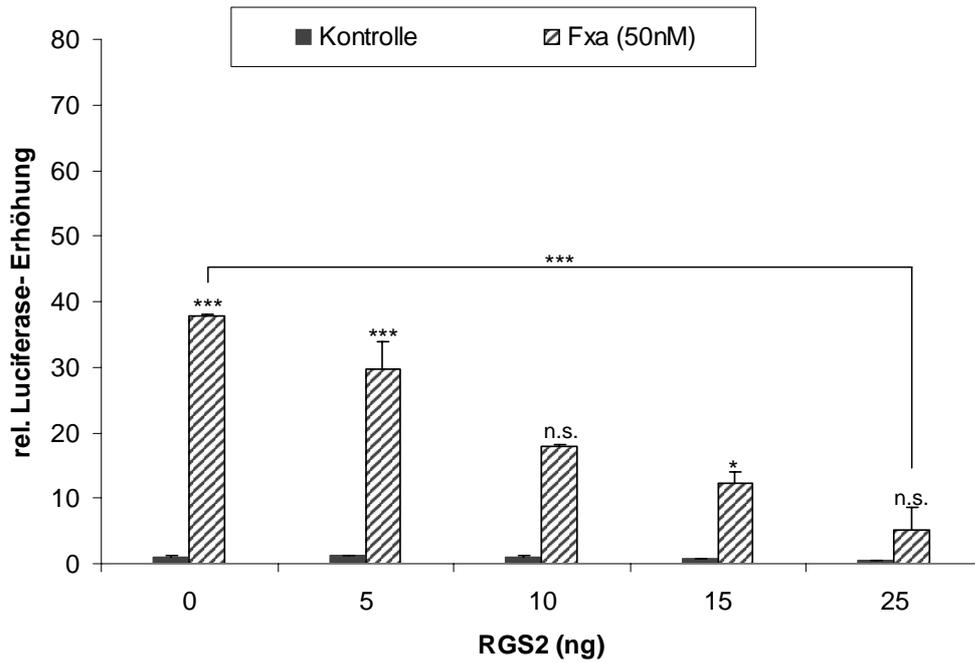


Abb. 4-50

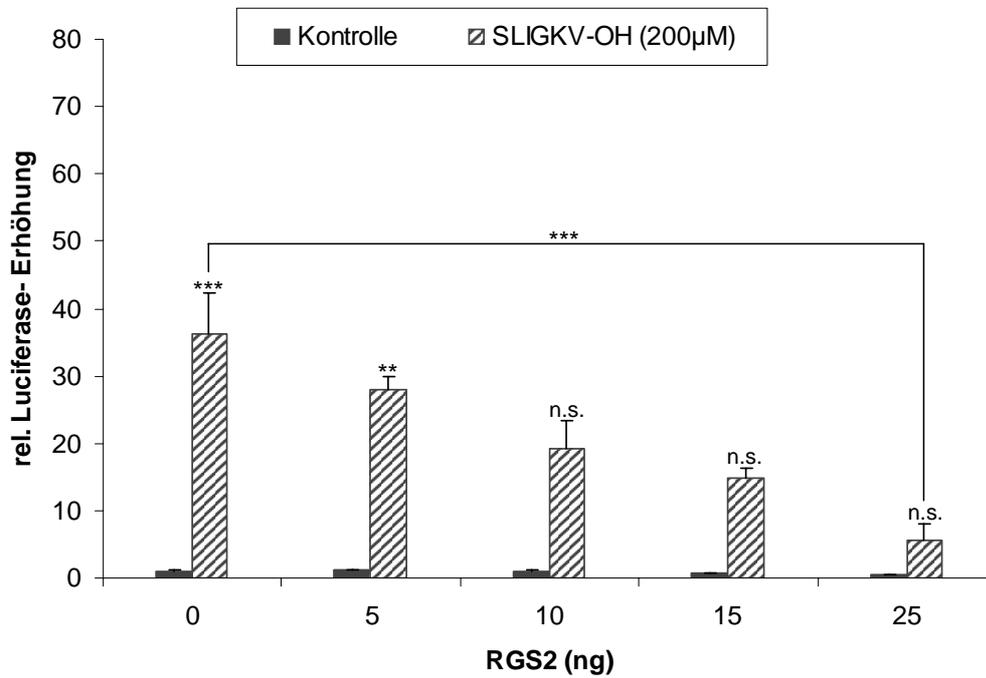
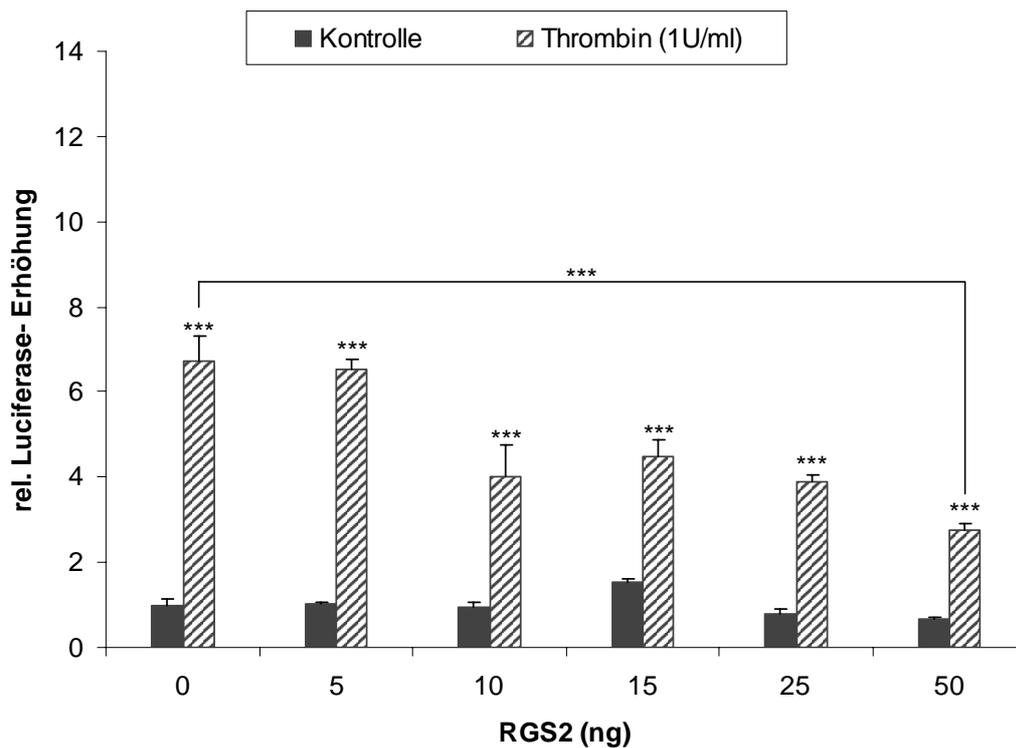


Abb. 4-51

Legende zu den Abb. 4-49 bis 4-51:**Ermittlung der Luciferase Aktivität in HEK293A-Zellen nach Stimulation mit rhAPC (10 µg/ml), Faktor Xa (50 nM) oder SLIGKV-OH (200 µM).**

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 2 (50 ng) + EPCR (25 ng) und RGS2 in verschiedenen Konzentrationen** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen), sowie versus transfizierten und mit dem jeweiligem Agonisten stimulierten HEK293A-Zellen angegeben.

**Abb. 4-52**

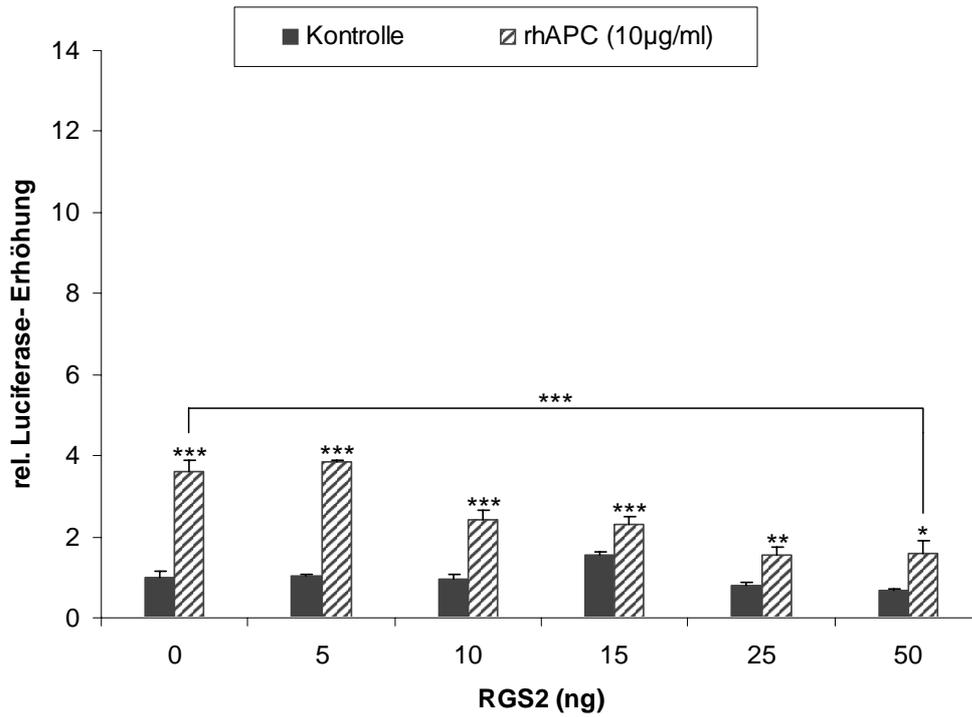


Abb. 4-53

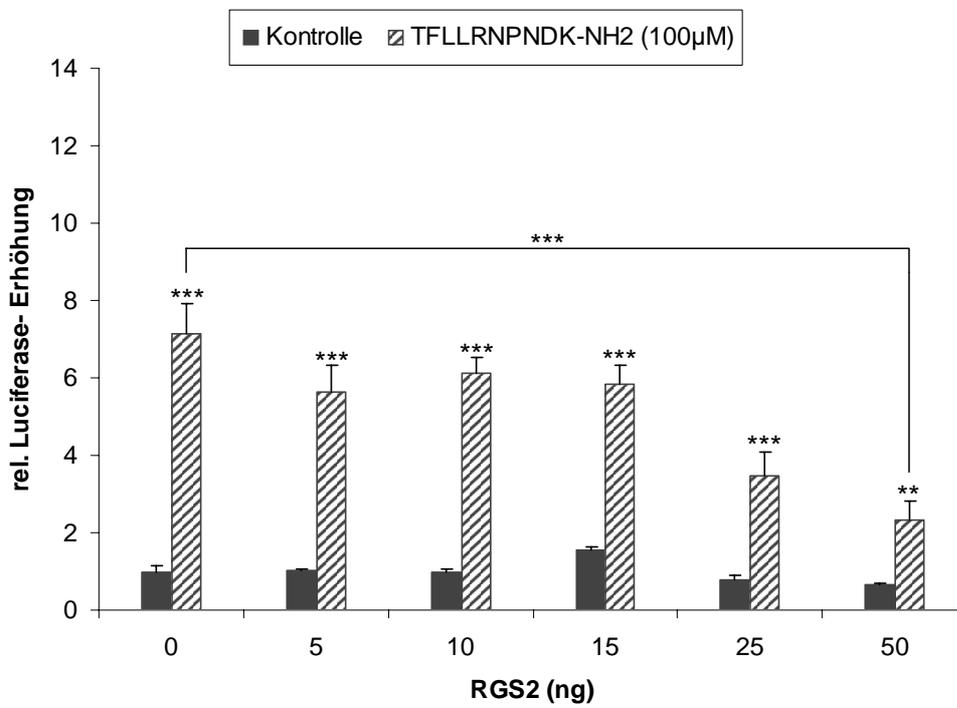


Abb. 4-54

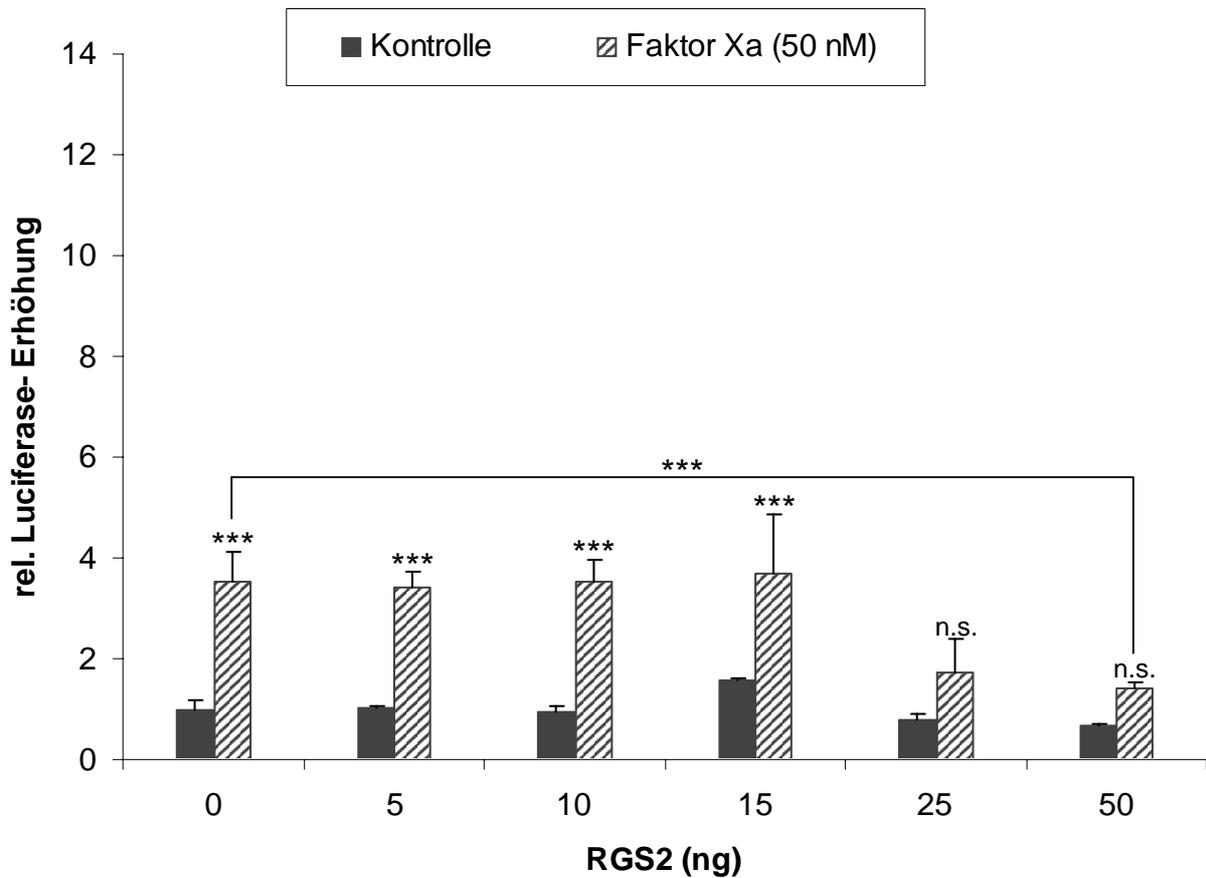


Abb. 4-55

Legende zu den Abb. 4-52 bis 4-55:

Ermittlung der Luciferase Aktivität in HEK293A-Zellen nach Stimulation mit Thrombin (1 U/ml), rhAPC (10 µg/ml), TFLLRNPDK-NH2 (100 µM) oder Faktor Xa (50 nM).

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (50 ng) + EPCR (25 ng) und RGS2 in verschiedenen Konzentrationen** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen), sowie versus transfizierten und mit dem jeweiligen Agonisten stimulierten HEK293A-Zellen angegeben.

4.4.3 Hemmung von $G\alpha$ 12/13 in Kombination mit $G\alpha$ q/11

In den folgenden Experimenten sollten die Auswirkungen der kombinierten Hemmung der Untereinheiten $G\alpha$ 12/13 und $G\alpha$ q/11 durch die GTPase Accelerating Proteine LSC und RGS2 im Vergleich zur alleinigen Hemmung mit LSC bzw. RGS2 auf die Luciferase Aktivität in HEK2A201-Zellen untersucht werden (Abb. 4-56 bis 4-60). Dabei ergab bei allen Experimenten die Kombination aus LSC + RGS2 die niedrigsten Luciferase Aktivitäten.

Der Vergleich der Einzelhemmungen zeigte signifikant niedrigere Luciferase Aktivitäten nach Stimulation der mit LSC- behandelten Zellen als nach Stimulation der mit RGS2-behandelten Zellen. Insgesamt führte die Stimulation der Rezeptoren PAR 1 und PAR 2 im Wesentlichen unabhängig vom verwendeten Agonisten zur Signaltransduktion über $G\alpha$ 12/13 und schwächer über $G\alpha$ q/11.

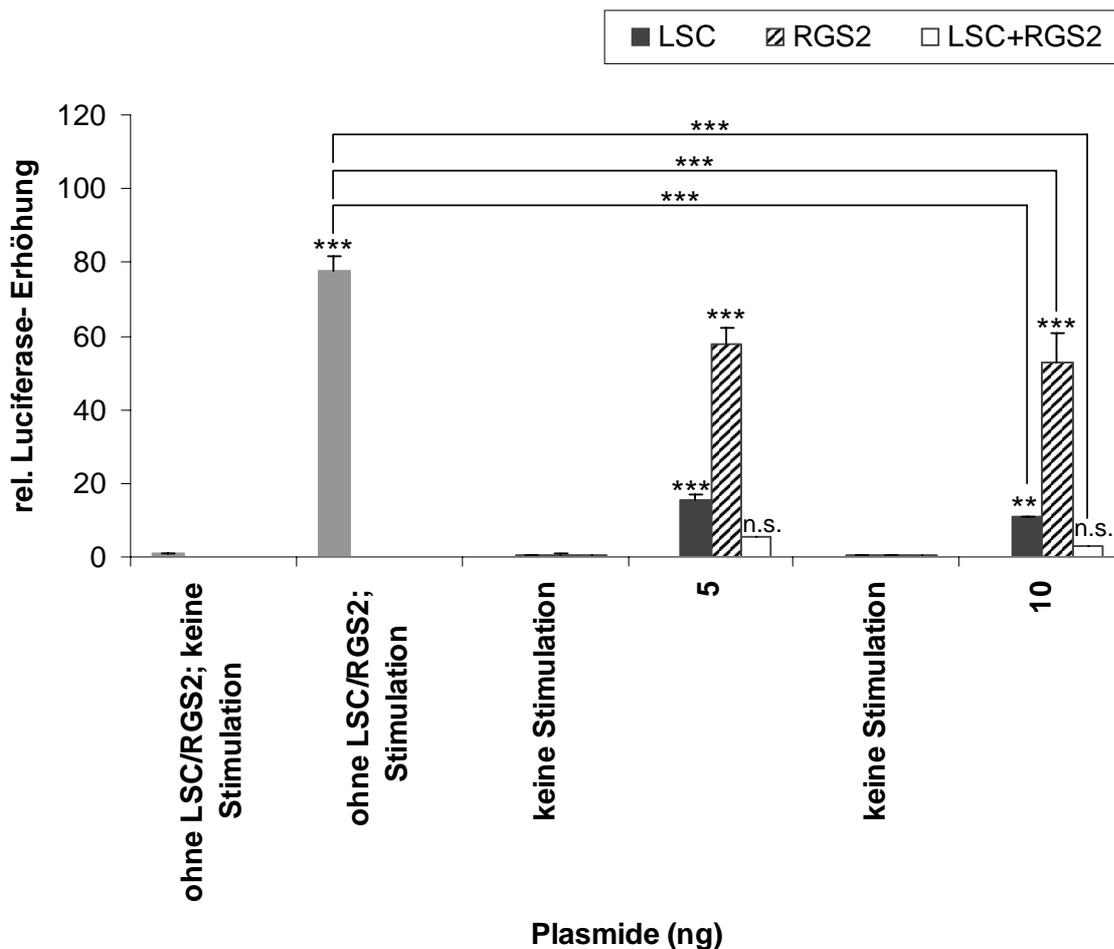


Abb. 4-56: Stimulation mit rhAPC (10 μ g/ml).

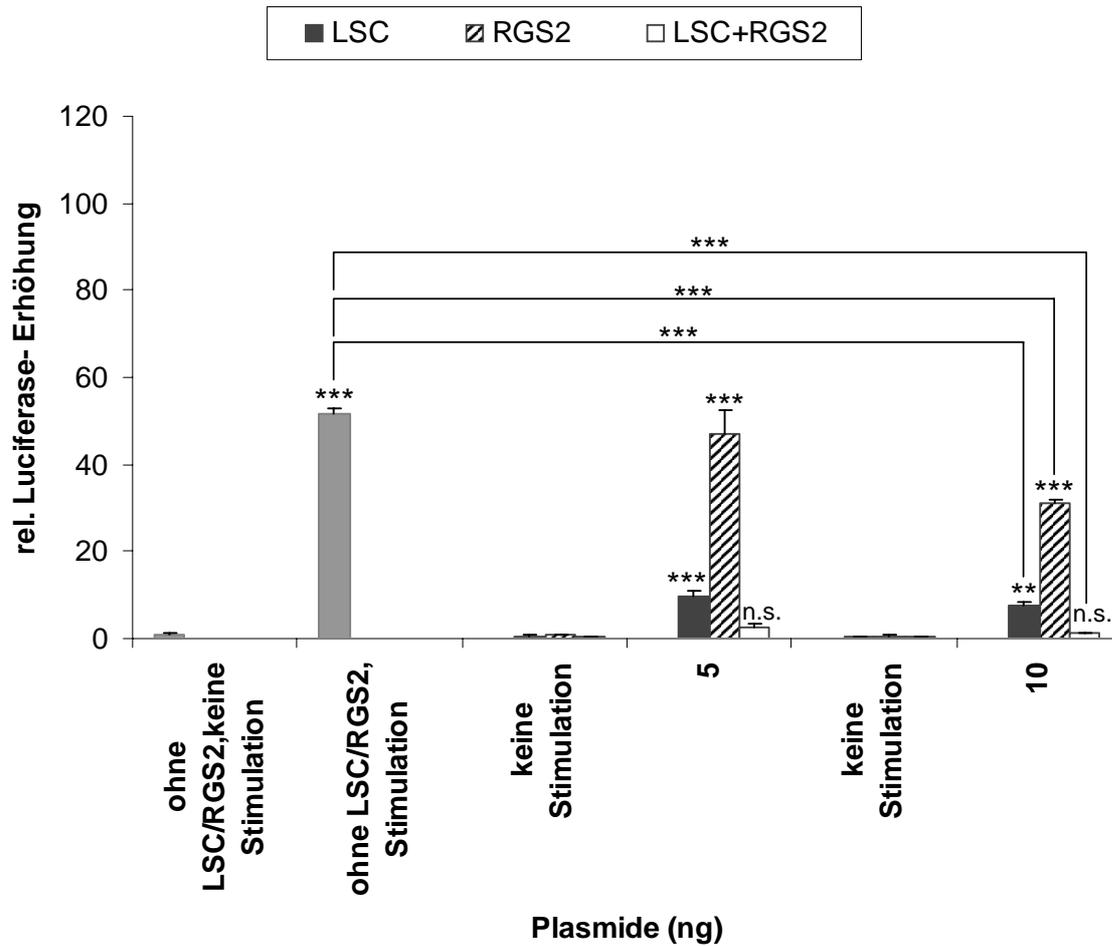


Abb. 4-57: Stimulation mit Faktor Xa (50 nM).

Legende zu den Abb. 4-56 und 4-57: Ermittlung der Luciferase Aktivität in HEK293A-Zellen nach Stimulation mit rhAPC (10 µg/ml) oder Faktor Xa (50 nM).

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 2 (50 ng) + EPCR (25 ng), LSC (5ng, 10ng), RGS2 (5ng, 10ng) und LSC + RGS2 (5ng, 10ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen) sowie versus transfizierten (PAR 2 + EPCR, LSC und / oder RGS2) und mit rhAPC (10 µg/ml) bzw. Faktor Xa (50nM) stimulierten HEK293A-Zellen angegeben.

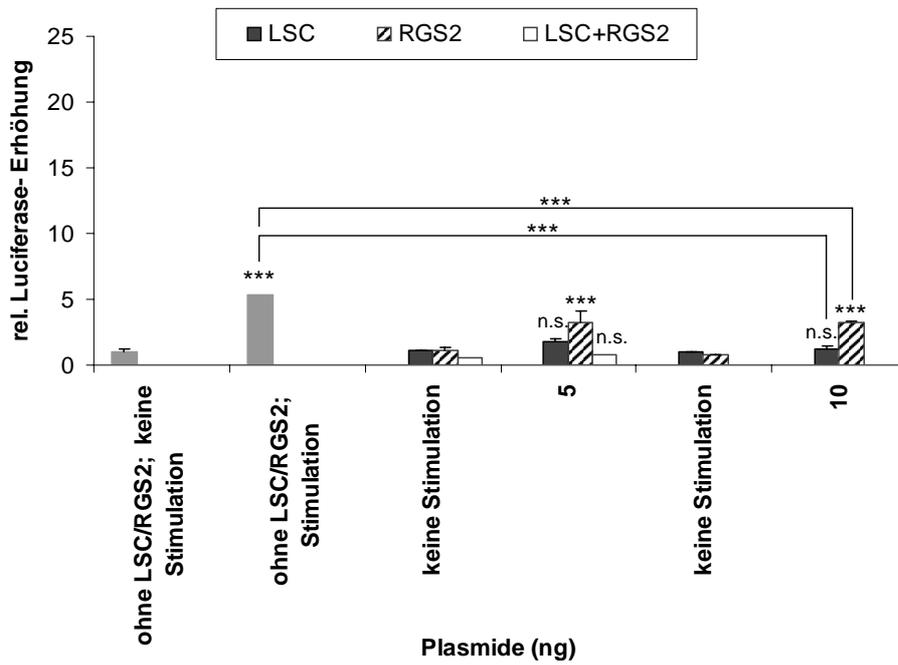


Abb. 4-58: Stimulation mit rhAPC (10 µg/ml).

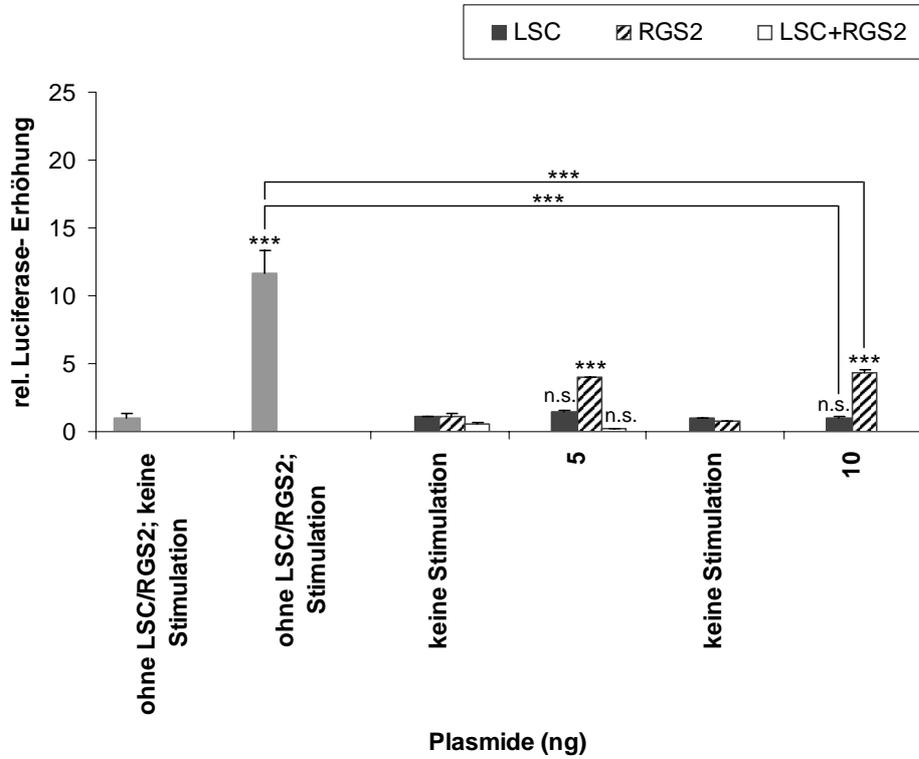


Abb. 4-59: Stimulation mit Faktor Xa (50 nM).

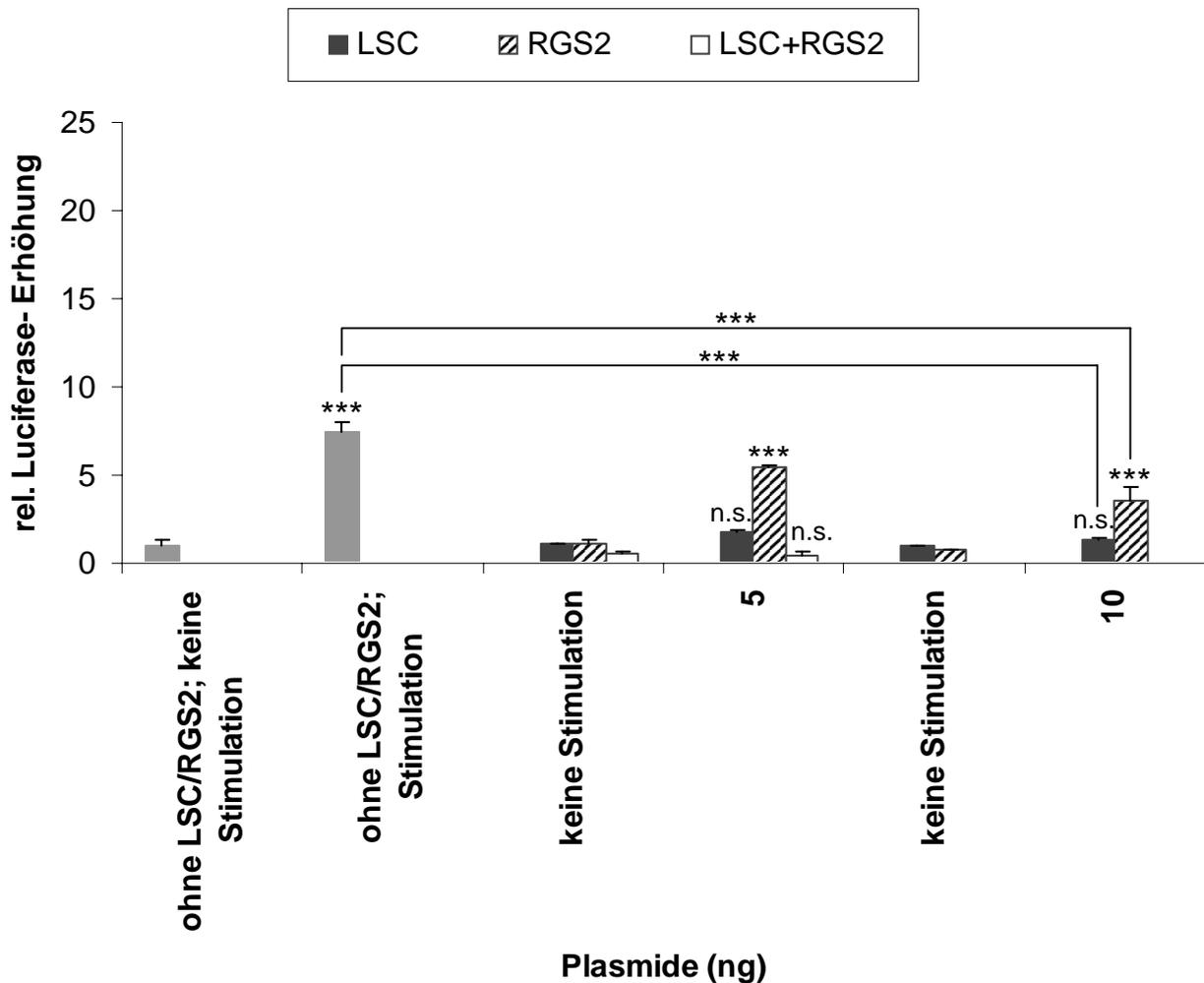


Abb. 4-60: Stimulation mit Thrombin (1 U/ml).

Legende zu den Abb. 4-58 bis 4-60: Ermittlung der Luciferase Aktivität in HEK293A-Zellen nach Stimulation mit rhAPC (10 µg/ml), Faktor Xa (50 nM) oder Thrombin (1 U/ml).

Die Auswertung erfolgte nach 20 stündiger Stimulationszeit. HEK293A-Zellen wurden 48 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (50 ng) + EPCR (25 ng), LSC (5ng, 10ng), RGS2 (5ng, 10ng) und LSC + RGS2 (5ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten. Die Signifikanz ist mit *** $p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293A-Zellen) sowie versus transfizierten (PAR 1 + EPCR, LSC und / oder RGS2) und mit jeweiligem Agonisten stimulierten HEK293A-Zellen angegeben.

4.4.4 Hemmung von $G\alpha$ i/o

Die folgenden Versuche beschäftigten sich mit der Hemmung der $G\alpha$ i/o-Untereinheit. Sämtliche durchgeführten Experimente ergaben keine signifikanten Unterschiede der Luciferase Aktivitäten der mit PTX vorbehandelten Zellen im Vergleich zu den Zellen, die nicht mit PTX vorbehandelt waren. Beispielhaft aufgeführt (Abb. 4-61) ist hier die Stimulation der Rezeptoren PAR 1 + EPCR mit rhAPC. Insgesamt ließ sich in unseren Experimenten keine Beteiligung von $G\alpha$ i/o an der Signaltransduktion nach Stimulation der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 nachweisen.

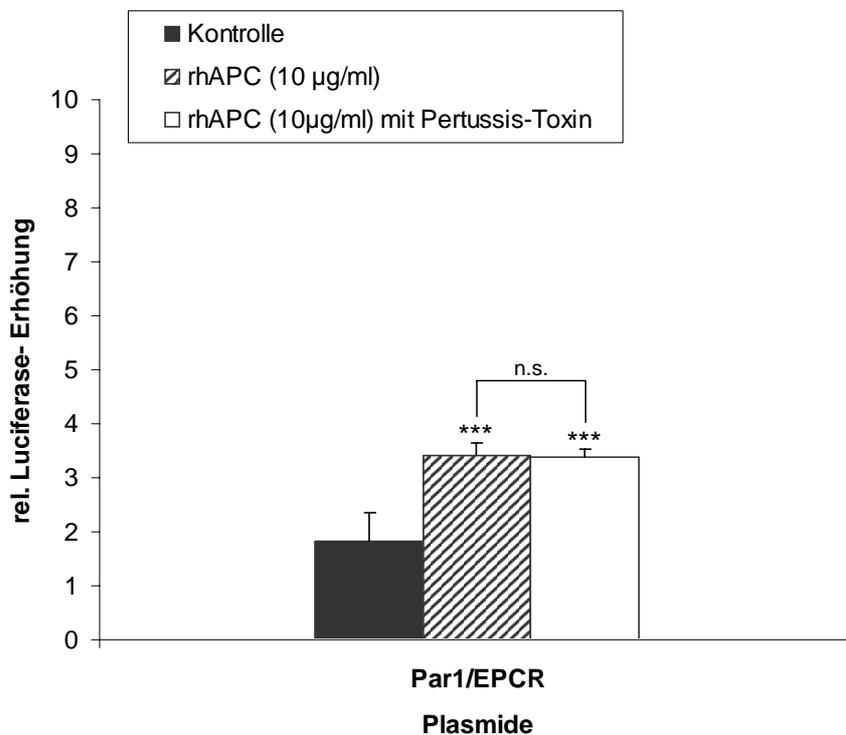


Abb. 4-61: Ermittlung der Luciferase Aktivität in HEKtsA201-Zellen nach Stimulation mit rhAPC (10 µg/ml).

Bei T = - 8 h wurden die HEKtsA201-Zellen mit Pertussis-Toxin behandelt. Dieses wurde während der Stimulation auf den Zellen belassen. Die Auswertung erfolgte bei T = 20 h. HEKtsA201-Zellen wurden 24 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 + EPCR (jeweils 25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils vier Einzelmesspunkten. Die Signifikanz ist mit ***p < 0.001 versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEKtsA201-Zellen), sowie versus transfizierten und mit rhAPC (10 µg/ml) stimulierten HEKtsA201-Zellen (mit bzw. ohne PTX-Vorbehandlung) angegeben.

4.4.5 Nachweis von RhoA

Vor der eigentlichen Hemmung von RhoA zur weiteren Untersuchung der Signaltransduktion in HEK293A-Zellen sollte in den folgenden Experimenten anhand der Stimulation von HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) der Nachweis für die Beteiligung von RhoA an den Signaltransduktionskaskaden der Rezeptoren PAR 1, PAR 2 und EPCR (nach Stimulation mit rhAPC und Thrombin) erbracht werden (Abb. 4-62 und 4-63 a, b). In HUVECs sind die Rezeptoren PAR 1, PAR 2 und EPCR natürlicherweise vorhanden. Als Nachweismethoden dienen der G-Lisa (vergleiche auch Punkt 3.3.7) und der Pulldown Assay (siehe auch Punkt 3.3.6).

Thrombin zeigte schon nach 1 Minute Inkubationszeit (Abb. 4-62) im G-Lisa ein Aktivitätsmaximum der RhoA Aktivierung, rhAPC dagegen erst nach 6 Minuten Inkubationszeit. Danach fielen für beide Agonisten die Werte stetig ab. Die Stimulation mit rhAPC erbrachte insgesamt niedrigere OD-Werte als die Stimulation mit Thrombin.

Das Ergebnis des Pulldown Assays (Abb. 4-63a und Abb. 4.-63b) bestätigte das aus dem G-Lisa gewonnene Ergebnis. Thrombin erreichte sein Maximum der RhoA Aktivierung auch im Pulldown Assay nach ca. 1 Minute Stimulationszeit. Danach sanken die Werte stetig ab.

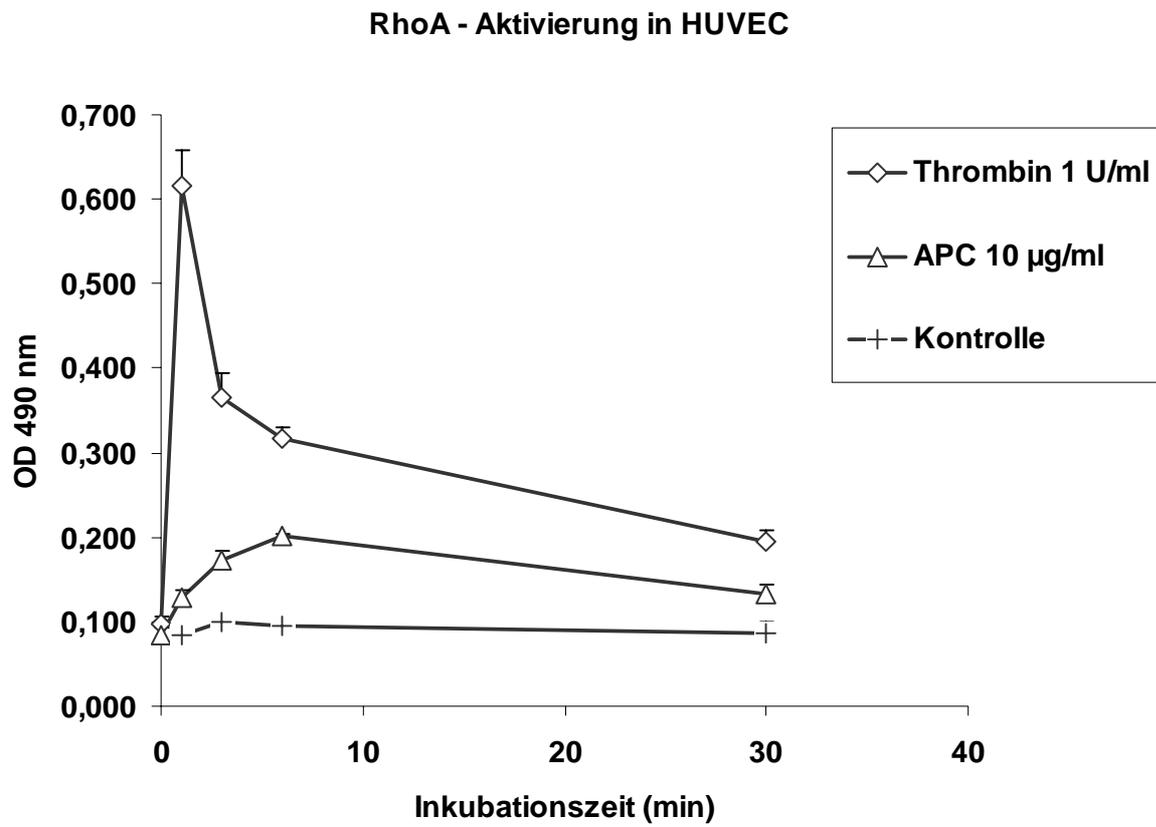


Abb. 4-62: Zeitabhängige Darstellung der RhoA-Aktivierung in Human Umbilical Vein Endothelial cells (HUVEC).

Konfluent auf 6-well-Kulturplatten kultivierte HUVECs wurden mit den Agonisten Thrombin (1 U/ml), und rhAPC (10 µg/ml) stimuliert. Ermittelt wurde die Optische Dichte bei 490 nm (n = 3).

(OD = Optische Dichte, nm = Nanometer)

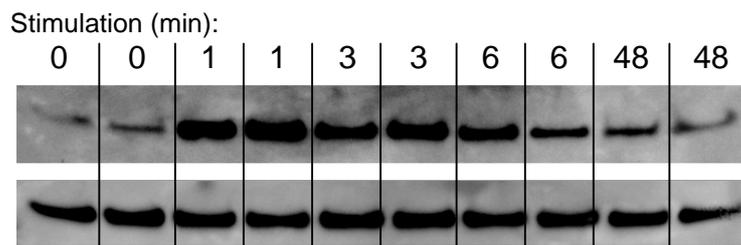


Abb. 4-63 a: Aktiviertes RhoA-GTP (oben) und RhoA-gesamt (unten) nach Western-Blot.

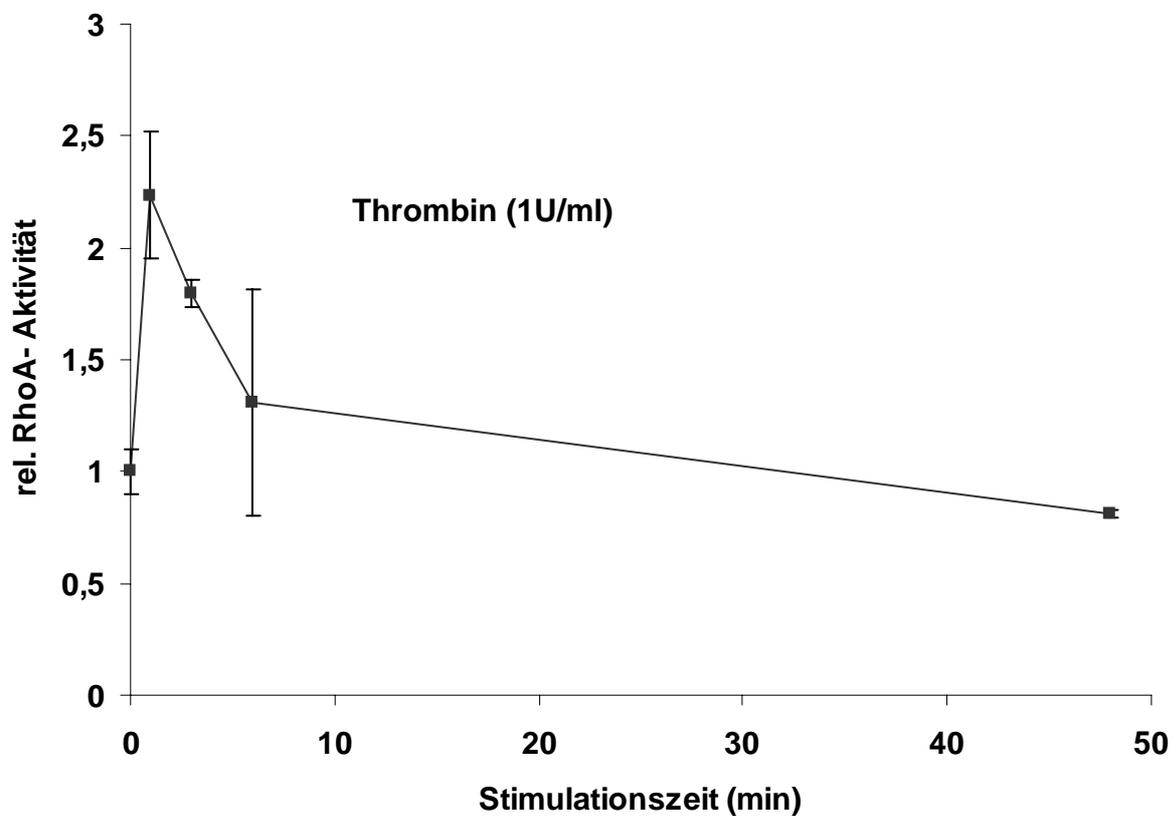


Abb. 4-63 b: Zeitabhängige RhoA Aktivierung (über basal) in HUVEC.

Konfluent auf 6-cm-Schalen kultivierte HUVECs wurden mit Thrombin (1 U/ml) stimuliert. Im Anschluss an den Pulldown Assay wurde ein Western-Blot zum Nachweis von RhoA durchgeführt.

Die densitometrisch ausgewerteten Daten für aktiviertes RhoA und RhoA-gesamt wurden ins Verhältnis gesetzt und grafisch dargestellt (n = 3).

4.4.6 Hemmung von Rho / ROCK

Die folgenden Experimente sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit sich eine Hemmung von Rho durch die C3-ADP-Ribosyltransferase des Botulismus auslösenden Bakteriums *Clostridium botulinum* (codiert auf dem EFC3-Plasmid) auf die Luciferase Aktivität von HEK293T-Zellen auswirkt (Abb. 4-64 und 4-65). Um die Beteiligung der Rho-abhängigen Kinase (ROCK) an der Signaltransduktion Proteinase aktivierbarer Rezeptoren näher zu untersuchen, wurde in den folgenden Experimenten die ROCK mittels Y-27632 gehemmt und die Auswirkungen auf die Luciferase Aktivität in HEK293T-Zellen untersucht (Abb. 4-66 und 4-67). Die Abbildungen 4-64 und 4-65 zeigen, dass EFC3 die Luciferase Aktivität in HEK293T-Zellen fast vollständig hemmte (z.B. rhAPC an PAR 2 + EPCR ohne EFC3: $67,5 \pm 6,6$, rhAPC an PAR 2 + EPCR mit EFC3: $0,8 \pm 0,1$, $p < 0,001$). Y-27632 (Abb. 4-66 und 4-67) führte in beiden Versuchen zu signifikanten Verringerungen der Luciferase Aktivitäten. Insgesamt zeigen unsere Experimente, dass die Signaltransduktionen der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 unabhängig vom verwendeten Agonisten unter Beteiligung von Rho und schwächer über ROCK verlaufen.

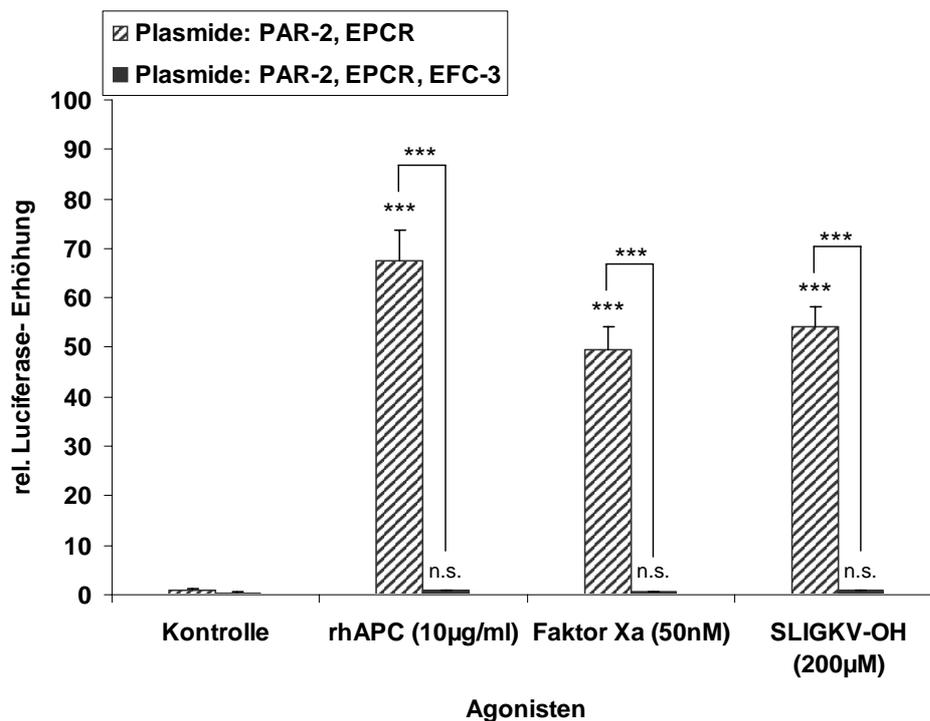


Abb. 4-64: Ermittlung der Luciferase Aktivität in HEK293T-Zellen nach Stimulation mit rhAPC (10 µg/ml), Faktor Xa (50 nM) und SLIGKV-OH (200 µM).

Legende zu Abb. 4-64:

Die Auswertung erfolgte bei T = 20 h. HEKtsA201-Zellen wurden 24 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 2 (25 ng) + EPCR (25 ng) und EFC3 (25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit $***p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEKtsA201-Zellen), sowie versus transfizierten (mit und ohne EFC3) und den jeweiligen Agonisten stimulierten HEKtsA201-Zellen angegeben.

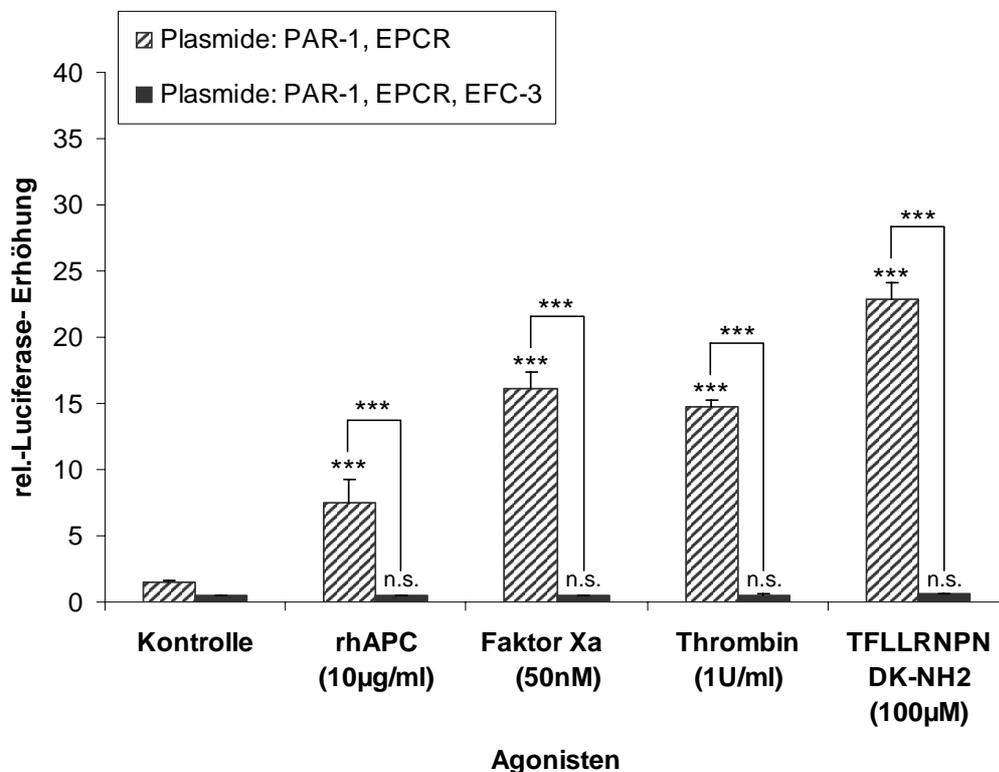


Abb. 4-65: Ermittlung der Luciferase Aktivität in HEKtsA201-Zellen nach Stimulation mit rhAPC (10 µg/ml), Faktor Xa (50 nM), Thrombin (1 U/ml) und TFLLRNPN DK-NH2 (100 µM).

Die Auswertung erfolgte bei T = 20 h. HEKtsA201-Zellen wurden 24 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (50 ng) + EPCR (25 ng) und EFC3 (25 ng)** transfiziert.

Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten. Die Signifikanz ist mit $***p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEKtsA201-Zellen), sowie versus transfizierten (mit und ohne EFC3) und den jeweiligen Agonisten stimulierten HEKtsA201-Zellen angegeben.

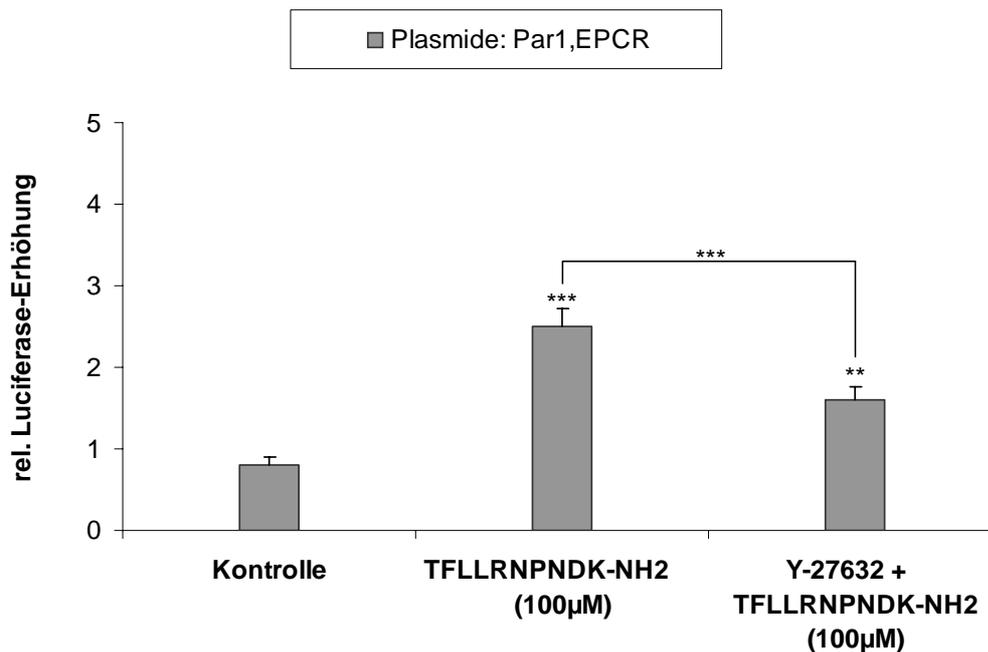


Abb. 4-66: Ermittlung der Luciferase Aktivität in HEK293T-Zellen nach Stimulation mit TFLLRNPNDK-NH2 (100 µM) sowie Vorbehandlung der Zellen mit Y-27632 (30 µM) und nachfolgend Stimulation mit TFLLRNPNDK-NH2.

Die Auswertung erfolgte bei T = 20 h. HEK293T-Zellen wurden 24 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 1 (25 ng) und EPCR (25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit $**p < 0,01$ und $***p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293T-Zellen), sowie versus transfizierten, mit TFLLRNPNDK-NH2 und Y-27632 + TFLLRNPNDK-NH2 stimulierten HEK293T-Zellen angegeben.

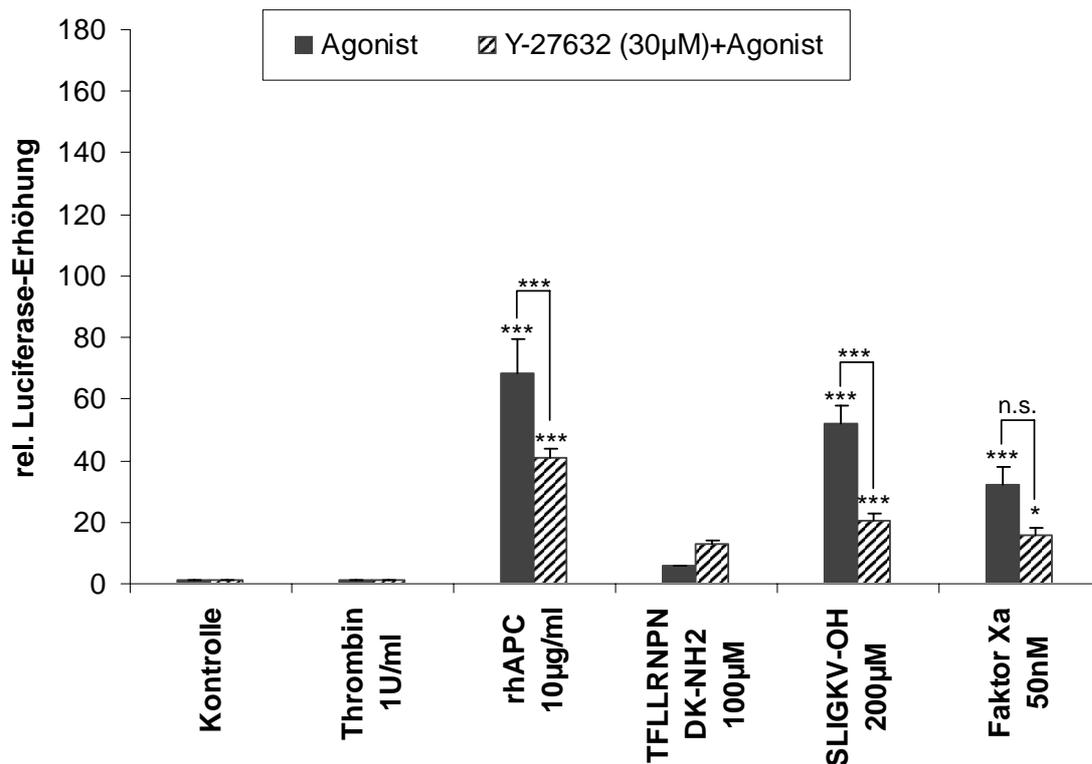


Abb. 4-67: Ermittlung der Luciferase Aktivität in HEK293T-Zellen nach Stimulation mit TFLLRNPNDK-NH2 (100 µM), Thrombin (1 U/ml), rhAPC (10 µg/ml), Faktor Xa (50 nM) und SLIGKV-OH (200 µM) sowie Vorbehandlung der Zellen mit Y-27632 (30 µM) und nachfolgend Stimulation mit TFLLRNPNDK-NH2 (100 µM), Thrombin (1 U/ml), rhAPC (10 µg/ml), Faktor Xa (50 nM) und SLIGKV-OH (200 µM).

Die Auswertung erfolgte bei T = 20 h. HEK293T-Zellen wurden 24 Stunden vor der Auswertung mit den Plasmiden **PAR 2 (50 ng)** und **EPCR (25 ng)** transfiziert. Dargestellt sind normierte Mittelwerte \pm SD aus einem repräsentativen Experiment mit jeweils drei Einzelmesspunkten.

Die Signifikanz ist mit * $p < 0,05$ und *** $p < 0.001$ versus Kontrolle (mit den jeweiligen zu untersuchenden Plasmiden transfizierte nicht stimulierte HEK293T-Zellen), sowie versus transfizierten, mit den jeweiligen Agonisten und mit den jeweilige Agonisten + Y-27632 stimulierten HEK293T-Zellen angegeben.

5 Diskussion

5.1 Etablierung

5.1.1 Luciferase Assay

Der Luciferase Assay (vergleiche auch 3.3.4) ist eine gängige Methode, um Genexpression zu quantifizieren [190, 191]. Üblicherweise folgt der Luciferase Assay nach Transfektion einer Zelllinie mit bestimmten zu untersuchenden Expressionsvektoren, die unter anderem das Luciferase Gen mit enthaltener spezifischer Promotorsequenz beinhalten. Die Transkriptionsaktivität dieses Promotors kann bestimmt werden durch Quantifizierung der Lichtmenge, die durch die Luciferase induzierte enzymatische Reaktion freigesetzt wird. Der Einsatz eines zweiten Luciferase Gens dient der Normalisierung der Werte [190].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein „Serum Response Element“ (SRE) abhängiger Luciferase Assay verwendet. SRE basierende Reporter Gen Assays wurden bisher erfolgreich eingesetzt bei der Ermittlung der Aktivität von GPCRs (G-Protein Coupled Receptors) wie z.B. des muscarinergen M1-Rezeptors und des α 1-adrenergen Rezeptors [194, 195]. Andere Veröffentlichungen berichten von einer Aktivierung Promotor spezifischer Elemente, wie z.B. AP-1, c-fos und Egr-1, durch Thrombin [196-199].

Mittels Luciferase Assay war es möglich, quantitativ die Aktivierung des „Serum Response Element“ nach Transfektion der HEK293-Zellen mit den zu untersuchenden Genkonstrukten und darauf folgenden unterschiedlichen Stimulationen bzw. Hemmungen zu bestimmen. Von der Aktivität des SRE konnte damit indirekt auf das Maß der RhoA-Aktivität geschlossen werden. RhoA induziert unter anderem Änderungen des Cytoskeletts, die mit der Steigerung der Membranpermeabilität einhergehen und aktiviert die Gentranskription [55]. Da mit dieser Methode der Rho Nachweis nur indirekt erbracht wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich Experimente zum direkten Nachweis von RhoA durchgeführt. Mittels Pulldown Assay und G-Lisa wurde aktiviertes, d.h. GTP-gebundenes RhoA direkt nachgewiesen (vergleiche auch 3.3.6 und 3.3.7).

Der SRE abhängige Luciferase Assay wurde bereits früher zur pharmakologischen Charakterisierung Proteinase aktivierbarer Rezeptoren eingesetzt [94]. Dabei wurden, wie auch im Rahmen dieser Arbeit, die Auswirkungen der Hemmung bestimmter Proteine im Ablauf der Signaltransduktionskaskaden Proteinase aktivierbarer Rezeptoren auf die Aktivität des SRE

ermittelt. Zukünftig soll der Luciferase Assay auch vermehrt zur Austestung Proteinase aktivierbarer Rezeptor Antagonisten eingesetzt werden, da er eine „robuste Methode“ darstellt [94].

5.1.2 Luciferase Assay – Testlauf

Unsere Ergebnisse (vergleiche Abb. 4-8) zeigen einen signifikanten Anstieg der SRE Aktivität nach Stimulation mit Histamin. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass es im Rahmen des SRE abhängigen Luciferase Assays im Verlauf der Histamin Rezeptor Signaltransduktionskaskade in HEK293A-Zellen zu einem Anstieg der Rho Aktivität kam. Schon in früheren Untersuchungen wurden die Auswirkungen der Stimulation mit Histamin auf die Funktion der Endothelzellbarriere von HUVECs mittels *Transendothelial Electrical Resistance* (TER) untersucht. Es wurde eine Steigerung der Permeabilität der Endothelzellbarriere durch Histamin festgestellt, die jedoch durch eine Hemmung von RhoA mit C3-Transferase nicht unterbunden werden konnte [200]. Der positive Verlauf dieses Tests gab „grünes Licht“ für die nachfolgenden Versuche.

5.1.3 Selektive PAR Agonisten aktivieren die PARs 1 und 2

Die Stimulation der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 mit den jeweiligen selektiven Agonisten (wir haben synthetische Peptide verwendet, vergleiche auch Abb. 4-9 und 4-10) führte in unseren Versuchen zu signifikanten Steigerungen der Luciferase Aktivitäten. In zahlreichen Publikationen ist der Nachweis Proteinase aktivierbarer Rezeptoren durch synthetische Peptide beschrieben [93, 94]. Diese bestehen entweder aus sechs Aminosäureresten oder stellen ein komplettes Abbild der sogenannten *tethered ligand domain* dar [7, 11].

Unsere Experimente ergaben weiterhin, dass das PAR 1 spezifische Peptid nicht nur am Proteinase aktivierbaren Rezeptor 1 zu signifikanten Erhöhungen der Luciferase-Aktivitäten führte, sondern auch am Proteinase aktivierbaren Rezeptor 2 (vergleiche auch Abb. 4-11). Umgekehrt führte die Stimulation des PAR 1 mit dem PAR 2-spezifischen Agonisten zu keiner signifikanten Erhöhung der Luciferase Aktivität. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen anderer Autoren [201, 202]. Die zusätzliche Transfektion des Endothelialen Protein C Rezeptors änderte dieses Ergebnis nicht, da EPCR nur als Kofaktor für die Wirkung von Protein C bzw. aktiviertem Protein C bekannt und als solcher in der Literatur beschrieben ist [21].

5.1.4 Nur EPCR gebundenes rhAPC aktiviert effizient die PARs 1 und 2

Unsere Ergebnisse zeigen (vergleiche Abb. 4-13 und Abb. 4-14), dass die Stimulation der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 bzw. 2 in Kombination mit dem EPC Rezeptor mit rhAPC zu signifikanten Erhöhungen der Luciferase Aktivitäten führten. Im Gegensatz dazu ergaben die Stimulationen mit rhAPC ohne Beteiligung von EPCR keine signifikanten Erhöhungen der Luciferase Aktivitäten. Andere Autoren veröffentlichten ähnliche Ergebnisse nach Experimenten an PAR 1-defizienten Fibroblasten [24]. Diese zeigten erst Aktivitäten im Egr-1 abhängigen Luciferase Assay nach Koexpression von PAR 1 mit EPCR. Andere Publikationen zeigen entsprechende Resultate im Zusammenhang mit dem PAR 2-Rezeptor. Auch hier wurden in Fibroblasten der PAR 2 bzw. der EPC Rezeptor jeweils alleine stimuliert sowie eine Koexpression aus PAR 2 mit einer EPCR Mutante, die nicht in der Lage war, APC zu binden. Alle drei Stimulationen zeigten keine Aktivitäten im Luciferase Assay [203]. Unsere Ergebnisse sowie die Ergebnisse anderer Autoren zeigen also, dass nur EPCR gebundenes APC effektiv Proteinase aktivierbare Rezeptoren aktivieren kann. Dabei können in heterologen Expressionssystemen (z.B in Zellkulturen und bakteriellen bzw. viralen Expressionssystemen) sowohl der PAR 1 als auch der PAR 2 durch EPCR gebundenes APC aktiviert werden [24, 26, 180, 181, 183].

Die Stimulationen der Rezeptorkombination PAR 1 + PAR 2 + EPCR mit rhAPC (vergleiche auch Abb. 4-13) erbrachten die signifikant höchsten Luciferase Aktivitäten. Die Rezeptoren scheinen sich dabei gegenseitig in ihrer Wirkung zu verstärken.

In Endothelzellen (Primärkulturen) soll das rhAPC-EPCR *signaling* nur über den Proteinase aktivierbaren Rezeptor 1 vermittelt werden [27]. Dabei wurde die APC-EPCR induzierte Aktivierung des PAR 1 in HUVECs durch die Blockade des EPC Rezeptors mit spezifischen Antikörpern gehemmt [185]. Die Blockade einer möglichen Thrombin induzierten Aktivierung des PAR 1-Rezeptors an der Zelloberfläche in Experimenten, die die Kostimulation mit aktiviertem Protein C *in vitro* untersuchen, ist vielfach in Publikationen beschrieben [24, 26, 182, 185]. Unsere Experimente zeigten nur einen geringen Anstieg der Luciferase Aktivitäten in HEK293T-Zellen nach Stimulation mit rhAPC und Vorbehandlung mit *Refludan*® (vergleiche auch Abb. 4-12). Vergleichend zur rhAPC Wirkung wurde in diesen Experimenten ebenfalls mit Thrombin und dem synthetischen Peptid TFLLRNPNDK-NH₂ stimuliert, die beide zu Erhöhungen der Luciferase Aktivitäten an den Rezeptoren PAR 1 sowie PAR 1 + EPCR führten. Insgesamt handelt es sich um ein nicht-repräsentatives Experiment. Signifikanzen konnten aufgrund der mit n = 2 sehr niedrigen Probenanzahl nicht berechnet werden. Die niedrigen Luciferase Aktivitäten bei Stimulation der Rezeptorkombination PAR 1 + EPCR mit rhAPC sind vielleicht durch Fehler im Versuchsablauf

(z.B. Verwendung „zu alter“ Zellen oder falsche rhAPC Konzentration) entstanden. Dass die Stimulation des EPC Rezeptors mit Thrombin, rhAPC und TFLLRNPNDK-NH₂ kaum Auswirkungen auf die SRE vermittelten Luciferase Aktivitäten hatte, deckt sich jedoch mit den Resultaten anderer Autoren. Diese führten einen Egr-1 abhängigen Luciferase Assay an PAR 1-defizienten Fibroblasten durch, die mit dem EPC Rezeptor transfiziert wurden. Stimulationen mit Thrombin, rhAPC sowie TFLLRNPNDK-NH₂ ergaben keine signifikanten Erhöhungen der Luciferase Aktivitäten [24].

5.1.5 Thrombin aktiviert den PAR 1 unabhängig vom EPC Rezeptor

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Thrombin in mit PAR 1 transfizierten HEK293A-Zellen die SRE abhängige Luciferase Aktivität signifikant steigerte (vergleiche Abb. 4-15). Dabei hatte die zusätzliche Transfektion des EPC Rezeptors keine Auswirkungen auf die Höhe der Luciferase Aktivität. Die Stimulation der Rezeptoren PAR 2 bzw. PAR 2 + EPCR mit Thrombin ergab keine signifikanten Erhöhungen der Luciferase Aktivitäten.

Die Aktivierung des PAR 1 durch Thrombin ist mittlerweile ebenso gesichert wie die Annahme, dass Thrombin den PAR 2 nicht aktiviert [93, 162, 179]. Die *Humane Keratozyten Zelllinie* HaCaT exprimiert den PAR 2. Stimulation mit Thrombin ergab keine signifikante Steigerung der TR3-Expression [179]. Ist ein Teil der PAR 1 z.B. durch Antagonisten gehemmt, kann es zu einer Kreuzaktivierung des PAR 2 durch nicht blockierte PAR 1 kommen. Die Aktivierung des PAR 2 erfolgt in diesem Fall ebenfalls über den *tethered ligand* Mechanismus. Dieser Weg funktioniert umgekehrt jedoch nicht [202, 204]. Da *in vivo* in den meisten Zellgeweben unterschiedliche Proteinase aktivierbare Rezeptoren vorkommen, wird die Diversität der Signaltransduktionsmechanismen ausgelöst durch PARs auch durch diese Möglichkeit der Kreuzaktivierungen bestimmt [179]. Stimulation des in Fibroblasten transfizierten Genkonstrukts PAR 1 + EPCR mit Thrombin erbrachte im Vergleich zur Stimulation mit einem PAR 1-EPCR S221-Genkonstrukts (enthält statt Cys²²¹ Ser²²¹) keine signifikanten Unterschiede in der Egr-1 vermittelten Luciferase Aktivität [24]. Das lässt auch im Hinblick auf unsere Versuchsergebnisse den Schluss zu, dass EPCR auch nach Veränderung einer für das rezeptorspezifische *signaling* wichtigen Aminosäure, keinen Einfluss auf das Thrombin induzierte PAR 1 *signaling* hat.

5.1.6 Zeit-und Dosisabhängigkeiten

Unsere Ergebnisse zeigen, dass rhAPC, Thrombin und Faktor Xa dosis- und zeitabhängig zu Steigerungen der Luciferase Aktivitäten in HEK293T-Zellen führten (vergleiche auch Abb. 4-16 bis 4-32).

Schon in früheren Veröffentlichungen wurden in HMEC-1 Zellen mittels Transendothelial Electrical Resistance (TER) zur Messung der Zellmembranpermeabilität und FlexStation zur real time Erfassung der intrazellulären Kalzium Mobilisierung Vergleiche gezogen zwischen der EC50 von Thrombin und verschiedenen PAR 1 spezifischen Peptiden. Dabei ergaben sich für Thrombin EC50 Werte von 0,1 nM (TER) und 1,7 nM ($[Ca^{2+}]$). Höhere EC50 Werte erzielten dagegen TFLLRNPNDK-NH₂ (TER: 900 nM, $[Ca^{2+}]$: 400 nM) und ein spezifisches den PAR 1 und PAR 2 Rezeptor aktivierendes Peptid SFLLRN-CONH₂ (TER: 800 nM, $[Ca^{2+}]$: 2000 nM). Es wurde daraufhin von den Autoren auf einen charakteristischen intramolekularen Aktivierungsmechanismus bezüglich der PAR Aktivierung geschlossen [93]. Im Vergleich dazu wurde in unseren Versuchen mit TFLLRNPNDK-NH₂ (PAR 1 spezifisch) im Luciferase Assay in HEK293T-Zellen eine deutlich höhere EC50 von 48.220 nM bestimmt (vergleiche auch Abb. 4-28), ebenso für SLIGKV-OH (PAR 2 spezifisch; vergleiche auch Abb. 4-26) eine EC50 von 308.900 nM. Der von uns im Luciferase Assay ermittelte EC50 Wert für Thrombin beträgt 375 nM und liegt damit ebenfalls deutlich über den von anderen Autoren ermittelten Werten. Der Vergleich der von uns im Luciferase Assay ermittelten EC50 Werte mit denen anderer Autoren sollte jedoch kritisch betrachtet werden, da unterschiedliche Zellsysteme verwendet wurden und die Versuchsbedingungen abweichen. Weitere Publikationen geben für Thrombin pEC50 Werte (Dieser berechnet sich aus dem EC50 Wert durch das Negative des Zehnerlogarithmus der Konzentration in nM) von 10,5 an, ermittelt im SRE abhängigen Luciferase Assay in transfizierten COS-7 Zellen. Diese Autoren fanden heraus, dass die mit den PAR 1 spezifischen Peptiden SFLLR und G721-40 induzierte Luciferase Aktivität biphasisch war und führten dies auf die Beteiligung unterschiedlicher heterotrimerer G-Proteine an der Signaltransduktion zurück [94]. Die von diesen Autoren ermittelten pEC50 Werte liegen für SFLLR bei 7,02 und 4,92 (*High and Low*) und sind damit im Vergleich zur Thrombin Wirkung ca. 3000fach schwächer bezüglich der Induktion der Luciferase Aktivität. Weitere Publikationen schreiben dem Thrombin (im *Permeability Assay* ermittelt) membrandestabilisierende Effekte in HUVECs zu in Konzentrationen, die höher als eine berechnete EC50 von 50 pM liegen. In niedrigeren Konzentrationen soll Thrombin membranschützend wirken [28, 205, 206].

Ergebnisse zur dosis- und zeitabhängigen Stimulation mit rhAPC wurden schon in früheren Publikationen an HPAEC Zellen (*Human Pulmonary Artery Endothelial Cells*) bezüglich der MLC (Myosin Light Chain) Phosphorylierung beschrieben. Dort wurde schon nach 5 minütiger Stimulationszeit mit rhAPC (1,0 µg/ml) ein Stimulationsmaximum erreicht [29]. Andere Veröffentlichungen stellen ebenfalls eine dosisabhängige APC Wirkung bezüglich des $[Ca^{2+}]$ *signalings* in BECs (*Brain microvascular endothelial cells*) dar. Dabei wurde eine EC50 von 0,23nM berechnet [207]. Die Ergebnisse unserer Stimulationen mit rhAPC im Luciferase Assay in HEK293T Zellen ergaben eine EC50 von 10 nM an der Rezeptorkombination PAR 2 + EPCR (vergleiche auch Abb. 4-17) und 6 nM an den Rezeptoren PAR 1 + EPCR (vergleiche auch Abb. 4-19) und lagen damit deutlich höher.

Dass Faktor Xa die Fähigkeit hat, die Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 zu aktivieren, ist vielfach beschrieben [73, 75, 171]. Dafür mussten *in vitro* hohe Konzentrationen an Faktor Xa (ca. 10 nM) eingesetzt werden [74]. Die EC50 Werte für das Faktor Xa *signaling* in PAR transfizierten Fibroblasten und endothelialen Zellen wurden in diversen Publikationen veröffentlicht und stimmen größtenteils überein [68-70, 72, 208]. Messungen bezüglich des relaxierenden Effekts, den Faktor Xa auf Aortenzellen der Ratte ausübte, ergaben einen EC50 Wert von 16 nM (im Vergleich dazu betrug der EC50 Wert für Thrombin 3 nM) [70]. Aus Experimenten zur Ermittlung der Egr1 mRNA Induktion durch Faktor Xa in HaCaT Zellen wurde ein EC50 Wert von 13 nM bestimmt [209]. Dagegen ergaben unsere Versuche aus den Luciferase Assays in HEK293T-Zellen wesentlich höhere EC50 Werte für die Stimulation der Rezeptoren PAR 1 und PAR 2 mit Faktor Xa von 28.750 nM und 59.250 nM (vergleiche auch Abb. 4-31 und 4-32).

Insgesamt liegen die von uns im Luciferase Assay ermittelten EC50 Werte für die Stimulation der Rezeptoren PAR 1, PAR 2 und EPCR mit rhAPC, Thrombin und Faktor Xa deutlich über den in der Literatur angegebenen Werten. Dies könnte durch eine niedrige Rezeptorexpressionsrate auf den HEK293T-Zellen begründet sein. Möglicherweise kommen diese Unterschiede in den EC50 Werten aber auch dadurch zustande, dass unterschiedliche Zellsysteme verwendet wurden und die Versuchsprotokolle und Experimente abweichen. Deshalb ist der Vergleich der von uns ermittelten EC50 Werte mit den EC50 Werten anderer Publikationen kritisch zu hinterfragen.

5.2 Additive Effekte der Agonisten

Defekte des antikoagulativ wirkenden APC [210] können Risikofaktoren für die Entstehung von Venenthrombosen sein [15]. Schon Anfang der 80iger Jahre wurde in Tierversuchen an Hunden gezeigt, dass sich eine gezielte, die APC Produktion anregende Thrombingabe, vor einer Infusion mit Endotoxinen günstig auf die Überlebensrate auswirkte [211]. An mit *Escherichia coli* infizierten Affen durchgeführte Tierversuche zeigten eine Verbesserung der Überlebensrate nach direkter Infusion mit APC [212].

Nach den positiven Ergebnissen aus der *PROWESS* Studie (Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis), die zeigten, dass APC die Mortalität bei schwerer Sepsis reduzierte, wurden dem APC neben den antikoagulativen auch antiinflammatorische Wirkungen zugeschrieben [32]. Zahlreiche durchgeführte *in vitro* Studien bezüglich der APC Wirkungsmechanismen schlugen einen protektiven intrazellulären Signaltransduktionsmechanismus vor [24-27, 29, 54, 55, 93, 180-183]. Dabei ist der genaue Mechanismus der Signalvermittlung antiinflammatorischer Effekte durch rhAPC bisher unbekannt [161a, 213, 214]. Seit kurzem wird der Schutzeffekt des APC im Zusammenhang mit der Sepsis in Frage gestellt, da es scheinbar nur in einer bestimmten Patientengruppe (Patienten mit schwerer Sepsis) zu protektiven Wirkungen kommt, und weil einige *in vitro* ermittelten Eigenschaften von APC *in vivo* nicht nachweisbar waren. *In vivo* wurden bisher nur der antikoagulative Effekt des APC sowie eine APC induzierte Interleukin-6 Verminderung (*PROWESS*) bewiesen. Inwieweit die APC induzierte Signaltransduktion *in vivo* eine Rolle spielt, bedarf weiterer Untersuchungen [15].

Obwohl die Übertragbarkeit von Resultaten der *in vitro* Studien nicht ohne weiteres auf klinische Studien möglich ist, sind Zellkulturuntersuchungen dennoch unerlässlich, um erste Hinweise auf die molekularen Wirkungsmechanismen einer Substanz zu bekommen.

5.2.1 RhAPC und Thrombin wirken additiv

Die Kostimulationen von rhAPC mit Thrombin ergaben signifikante Steigerungen der Luciferase Aktivitäten an den Rezeptoren PAR 1 + EPCR bzw. PAR 1 + PAR 2 + EPCR in HEK2sA201-Zellen und wirkten damit additiv (vergleiche auch Abb. 4-33 und 4-34). Zur Zeit ist noch nicht geklärt, wie APC über die Aktivierung des PAR 1 Rezeptors antiinflammatorisch wirken kann, obwohl doch Thrombin mittels Aktivierung desselben Rezeptors proinflammatorisch wirksam ist [93]. Neuere *in vitro* Studien vergleichen die Kinetik der APC induzierten Aktivierung des

Proteinase aktivierbaren Rezeptors 1 mit der Thrombin induzierten Aktivierung und kommen zu dem Schluss, dass APC ausreichend hoch konzentriert den PAR 1 Rezeptor aktiviert. Dabei aktivierte APC den PAR 1 Rezeptor jedoch 10^3 bis 10^4 mal schwächer als Thrombin [26]. Eine ausreichende Aktivierung des PAR 1 Rezeptors *in vitro* wurde beobachtet bei einer APC Konzentration von 10 bis 100 nM. Diese Konzentration liegt aber deutlich über der endogenen APC Konzentration *in vivo* [185]. Die in der *PROWESS Studie* ermittelte mittlere Plasma APC Konzentration bei Patienten mit schwerer Sepsis betrug 45 ng/ml (0,9 nM) und liegt damit unterhalb der für die Aktivierung des PAR 1-Rezeptors erforderlichen Konzentration [32]. Dabei ist zu beachten, dass die Kinetiken der PAR 1 Aktivierung *in vitro* ermittelt worden sind, ohne Interaktionen wie z.B. durch Proteinase Inhibitoren zu berücksichtigen.

Unsere *in vitro* Experimente wurden mit APC Konzentrationen von 0,2 µg/ml (4 nM) und 1,0 µg/ml (20 nM) durchgeführt und liegen damit ebenfalls über den in der *PROWESS Studie* an Sepsis Patienten ermittelten Werten. Unsere Ergebnisse aus den Kostimulationen mit rhAPC und Thrombin im SRE abhängigen Luciferas Assay in HEK293A-Zellen deuten darauf hin, dass rhAPC nicht zu einer Reduzierung bzw. Abschwächung der Thrombin Wirkung in transfizierten HEK293A-Zellen führt, sondern im Gegenteil eine Addition bzw. Verstärkung der Effekte bewirkt. Diese Effekte steigen mit zunehmender APC Konzentration und scheinen sich in Anwesenheit des PAR 2 Rezeptors noch einmal deutlich zu verstärken (vergleiche auch 5.1.4). Unsere Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren, die zeigen, dass APC *in vitro* inflammatorische Wirkungen dämpft sowie vor Apoptose schützt [210].

Genexpressionsstudien in Endothelzellen zeigten, dass, obwohl einige Gene im selben Maße von Thrombin und APC induziert wurden, Thrombin deutlich stärker proinflammatorische Mediatoren wie IL6 und IL8 sowie Tissue Factor aktivierte. APC dagegen regulierte die mRNA Level einiger proinflammatorischer sowie proapoptotischer Proteine wie z.B. das Tumorsuppressor Protein p53 und Thrombospondin-1 herunter [26]. Diese Experimente zeigen die Gegensätzlichkeit der APC bzw. Thrombin vermittelten Wirkungen, obwohl beide Agonisten in gleicher Konzentration (10 nM) eingesetzt wurden.

Neuere Untersuchungen [28] stellen die Vermutung auf, dass APC protektive Effekte unter Beteiligung der Sphingosin-Kinase-1 bzw. über den S1P1-Rezeptor (Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor) unter Beteiligung von Rac1 vermittelt (vergleiche Abb. 5-1). Dies könnte möglicherweise ein Grund dafür sein, dass wir bei unseren Kostimulationen keine protektiven Wirkungen des rhAPC feststellen konnten, da der S1P1-Rezeptor nicht natürlicherweise in HEK293A-Zellen vorkommt und von uns auch nicht zusätzlich in die Zellen transfiziert wurde.

Die Vorstimulation menschlicher Endothelzellen aus der Lunge mit APC (1 µg/ml) für 1 bis 4 Stunden reduzierte die Thrombin induzierte membrandestabilisierende Wirkung (ermittelt durch *Transendothelial Electrical Resistance* [29]). Ebenfalls sollen niedrige Thrombinkonzentrationen im Gegensatz zu hohen Konzentrationen, die als Auslöser für die Schädigung der Endothelzellbarriere gesehen werden, dem Schutz der Endothelzellmembran dienen [28]. In unseren Experimenten ergaben die Stimulationen mit niedrigen Thrombin Konzentrationen (0,01 U/ml und 0,1 U/ml) geringfügige bis keine Erhöhungen der Luciferase Aktivitäten. Dagegen bewirkten unphysiologisch hohe rhAPC Konzentrationen (1,0 µg/ml) eine hohe Luciferase Aktivität und damit einhergehend eine gesteigerte RhoA Aktivität. In der Literatur werden hohe APC Konzentrationen mit einer membrandestruktiven Wirkung in Verbindung gebracht. Daraus wurde geschlossen, dass der Grad der Aktivierung des Proteinase aktivierbaren Rezeptors 1 entscheidend ist für die unterschiedlichen zellulären Effekte [28].

Neue Studien stellen die Hypothese auf, dass in Endothelzellen die für die Protein C Wirkung (via Thrombomodulin und EPCR) bzw. für das APC *signaling* (via EPCR und PAR 1) entscheidenden Rezeptoren *in vivo* kolokalisiert sind in sogenannten *membrane lipid rafts*. Thrombin könne somit endogenes APC effektiv in Richtung protektives Zell *signaling* lenken [215].

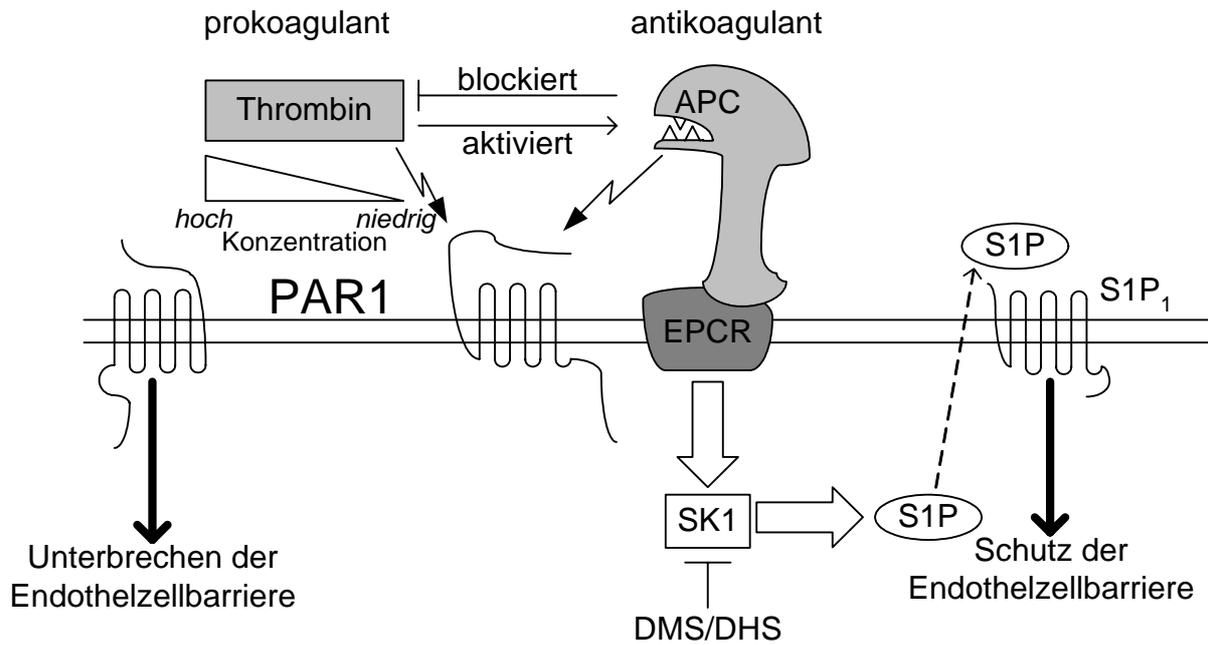


Abb. 5-1: Die „Doppelrolle“ des Proteinase aktivierbaren Rezeptors 1.

Das Proteinase aktivierbare Rezeptor 1 (PAR 1) induzierte *signaling* der pro- und antikoagulativen wirksamen Proteinase APC und Thrombin kann gegenteilige Effekte auf die Integrität der Endothelzellbarriere haben. Der Schutz der Endothelzellmembran durch APC oder niedrige Thrombin Konzentrationen wird vermittelt durch die Spingosin-1-Kinase (SK1) Aktivität und Transaktivierung des Sphingosin-1-Phosphat Rezeptors (S1P₁). (DMS = Dimethylsulfat; DHS = Dihydroxysulfat) [modifiziert nach 28]

5.2.2 RhAPC und Faktor Xa wirken additiv

Unsere Ergebnisse aus den Luciferase Assays zeigen, dass in HEK293T-Zellen an den Rezeptoren PAR 1 + EPCR, PAR 2 + EPCR und PAR 1 + PAR 2 + EPCR die Agonisten Faktor Xa und rhAPC in Kostimulation dosisabhängig additiv wirken (vergleiche auch Abb. 4-35 bis 4-37). Ebenfalls konnten wir an der Rezeptorkombination PAR 2 + EPCR zeigen, dass Faktor Xa in Kombination mit rhAPC unabhängig von der Stimulationsdauer dosisabhängig additiv wirkt (vergleiche auch Abb. 4-38). Dabei wurden die höchsten Luciferase Aktivitäten bei Stimulation der Rezeptorkombination PAR 1 + PAR 2 + EPCR erzielt.

Es ist seit längerem bekannt, dass Faktor Xa *in vitro* die Rezeptoren PAR 1 und PAR 2 aktiviert [11, 72, 74, 171] und dabei von Thrombin unabhängig proinflammatorisch wirkt (Induktion von Cytokinen und Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen, NF κ B-Induktion in HeLa-Zellen, Proliferation glatter Muskelzellen) [68, 171, 208, 216, 217]. Die protektiven Wirkungen von rhAPC in HUVECs durch eine mögliche S1P1-Rezeptor-Transaktivierung wurden bereits ausführlich diskutiert (vergleiche 5.2.1) [28]. Die additiven Effekte, die in unseren Versuchen beobachtet wurden, sind möglicherweise wiederum dadurch entstanden, dass der protektiv wirkende S1P1 Rezeptor nicht vorhanden war. Dabei traten in unseren Experimenten die höchsten Luciferase Aktivitäten und damit die stärksten additiven Effekte an der Rezeptorkombination PAR 1 + PAR 2 + EPCR auf (siehe auch 5.2.1). Andere Autoren berichten von einer membrandestrutiven Wirkung des supraphysiologisch konzentrierten APC [28]. Unsere Ergebnisse zeigen unter anderem signifikante Erhöhungen der Luciferase Aktivitäten nach Einzelstimulationen mit supraphysiologischen rhAPC Konzentrationen. In vielen *in vitro* Studien, wie auch in unseren Experimenten, wurde Faktor Xa in den Konzentrationen 20 bis 100 nM eingesetzt. In diesen Konzentrationen wurden auch die proinflammatorischen Wirkungen beobachtet [68, 208, 216, 217]. Diese Beobachtungen decken sich mit unseren Ergebnissen. Eingesetzt haben wir Faktor Xa in den Konzentrationen 25 nM und 100 nM. Sowohl die Einzelstimulationen mit Faktor Xa in diesen Konzentrationen, als auch die Kombinationen mit den supraphysiologischen rhAPC Konzentrationen ergaben signifikante Steigerungen der Luciferase Aktivitäten in HEK293T-Zellen, die mit den Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und/oder 2 (in Kombination mit dem EPC Rezeptor) transfiziert worden waren. Dabei ist im Moment unbekannt, ob *in vivo* übliche Konzentrationen des Faktor Xa (Die Plasmakonzentration beträgt 1,8 bis 12,63 nM) ausreichen, um den Proteinase aktivierbaren Rezeptor 1 *in vivo* zu aktivieren [66].

Neuere Ergebnisse schreiben dem Faktor Xa neben seiner proinflammatorischen Wirkung ebenfalls endothelmembranprotektive Wirkungen zu. *Permeabilitäts Assays* an EA.hy926-Zellen ergaben, dass Faktor Xa in der Konzentration 5 nM Endothelzellmembran protektiv wirkte [66]. Weitere *Permeabilitäts Assays* an EA.hy926-Zellen deuteten bei Stimulation mit Faktor Xa (50 nM) und/oder APC (20 nM) und anschließender Nachstimulation mit niedrig konzentriertem Thrombin (40 pM) auf eine Schutzwirkung, vermittelt durch APC und Faktor Xa, hin, obwohl diese hoch konzentriert eingesetzt wurden. Dabei wurden im Gegensatz zu unseren Ergebnissen aus den Luciferase Assays keine additiven Effekte bei Kostimulation von rhAPC mit Faktor Xa in diesem Fall bezüglich der Membranpermeabilität beobachtet [66].

Aus diesen und weiteren Experimenten, in denen unter anderem der PAR 1-Rezeptor in EA.hy926-Zellen mit Antikörpern gehemmt wurde, schlussfolgerte man, dass Faktor Xa über beide Proteinase aktivierbaren Rezeptoren (PAR 1 und PAR 2) den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor aktivieren und somit membranprotektiv wirken kann [28, 29, 66].

5.3 Signaltransduktion

Die folgenden Untersuchungen dienten der näheren Charakterisierung der in den Zellen ablaufenden Signaltransduktionswege nach Stimulation der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren mit den Serinproteinasen Faktor Xa, Thrombin und rhAPC. Im Mittelpunkt der Experimente stand dabei die nähere Darstellung der heterotrimeren G-Proteine $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_i$ sowie der Rho GTPase RhoA bzw. der Rho abhängigen Kinase ROCK.

In verschiedenen Zelltypen können unterschiedliche Rezeptor G-Protein Kombinationen auftreten, was eine Interpretation der Signaltransduktionswege schwierig macht [94]. Alle unsere Experimente wurden zur besseren Vergleichbarkeit in HEK293A-Zellen durchgeführt. Die zu untersuchenden Rezeptoren kommen natürlicherweise in diesen Zellen in zu vernachlässigender Menge vor und wurden je nach Versuchsanforderung in die Zellen transfiziert, so dass eventuell störende Interaktionen mit anderen Rezeptoren auszuschließen waren.

Wir konnten in unseren Versuchen keine Hemmung von $G\alpha_i$ durch Pertussis Toxin (100 ng/ml) nach Stimulation der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren (in Kombination mit dem EPC Rezeptor) mit Thrombin, Faktor Xa und rhAPC sowie mit den rezeptorspezifischen Agonisten TFLLRNPNDK-NH2 und SLIGKV-OH nachweisen (vergleiche 4.4.4 und Abb. 4-61). Über eine

Beteiligung von $G\alpha_i$ an der Signaltransduktion Proteinase aktivierbarer Rezeptoren wird kontrovers diskutiert. Versuche mit Pertussis Toxin (20 ng/ml) an COS-7-Zellen ergaben keine Hemmung der SFLLR induzierten Luciferase Aktivität [94]. Daraufhin wurde die Vermutung geäußert, dass $G\alpha_{i/o}$ -Proteine nicht an der PAR 1 induzierten SRE Aktivierung beteiligt sind.

Ähnliche Ergebnisse zeigten Experimente an endothelialen HMEC-1-Zellen. Die Behandlung mit Pertussis Toxin (0,1 μ g/ml) und nachfolgende Stimulation mit Thrombin hatte keine Auswirkung auf die *Transendothelial Electrical Resistance* [93]. Andere Autoren berichten dagegen von einer Hemmung der Thrombin induzierten Steigerung der Membranpermeabilität in Endothelzellen durch Hemmung von $G\alpha_i$ mit Pertussis Toxin [168]. Die Aktivierung des Proteinase aktivierbaren Rezeptors 1 in Fibroblasten hemmt die cAMP-Bildung Pertussis Toxin sensitiv. Daraufhin wurde die Beteiligung eines G_i ähnlichen Proteins an der PAR 1 induzierten Signalvermittlung vorgeschlagen [218]. Die Thrombin vermittelte Hemmung der Adenylatcyclase wurde von einigen Autoren in Verbindung gebracht mit einer PAR 1 Rezeptor induzierten G_{i2} Aktivierung [219, 220]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Behandlung von PAR 2 transfizierten Zellen und Enterozyten mit Pertussis Toxin keine Hemmung der Signaltransduktionen ergab. Daraus wurde geschlossen, dass es zu keiner Aktivierung von $G\alpha_i$ -Proteinen durch den PAR 2-Rezeptor kommt [177]. Andere Veröffentlichungen beschreiben ein PTX sensitives Ca^{2+} *signaling* in *Xenopus Oozyten* induziert durch Trypsin. Aus diesen Ergebnissen wurde auf einen $G\alpha_o / G\alpha_i$ abhängigen Signaltransduktionsmechanismus ähnlich dem des PAR 1-Rezeptors geschlossen [221].

Unsere Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die dosisabhängige Hemmung von $G\alpha_{12/13}$ durch LSC nach Stimulation sowohl des Proteinase aktivierbaren Rezeptors 1 als auch des Proteinase aktivierbaren Rezeptors 2 in Kombination mit dem EPC Rezeptor mit den Serinproteinasen Thrombin, rhAPC und Faktor Xa sowie mit den synthetischen Peptiden TFLLRNPNDK-NH₂ und SLIGKV-OH zu signifikanten Verringerungen der SRE abhängigen Luciferase Aktivitäten führt (vergleiche Abb. 4-41 bis 4-48). Dies deutet auf eine Beteiligung von $G\alpha_{12/13}$ an der Signaltransduktion beider Proteinase aktivierbarer Rezeptoren hin. Der Proteinase aktivierbare Rezeptor 2 wird durch Thrombin nicht aktiviert (vergleiche Abb. 4-40) [222]. Die Stimulation der Rezeptorkombination PAR 2 + EPCR in Verbindung mit dem LSC Plasmid in verschiedenen Konzentrationen zeigte aus diesem Grund keine Steigerungen der SRE abhängigen Luciferase Aktivitäten in HEK293A-Zellen (vergleiche auch 5.1.5).

Die Beteiligung von $G\alpha_{12/13}$ an der Signaltransduktion des Proteinase aktivierbaren Rezeptors 1 wurde bereits in früheren Publikationen beschrieben. Die Aktivierung des PAR 1 Rezeptors in

Thrombozyten führte zu einer vermehrten Inkorporation des photoreaktiven GTP Analogons [α -³²P] GTP Azidoanilid in immunopräzipitierte G α 12 - und G α 13 - Proteine. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass der PAR 1 Rezeptor die heterotrimeren G Proteine G α 12 und G α 13 aktiviert [223]. Auch verhinderte die Injektion von Antikörpern gegen G α 12 die Thrombin induzierte DNA-Synthese in 1321N1 Astrozyten [224]. Ob und in welcher Funktion G α 12/13 eine Rolle in der PAR 2 vermittelten Signaltransduktion spielt, ist bis heute unklar [7, 11, 161a, 225].

Die Hemmung der Signaltransduktion der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 durch RGS2 ergaben signifikante Verringerungen der SRE abhängigen Luciferase Aktivitäten nach Stimulation mit den Serinproteinasen Thrombin, rhAPC und Faktor Xa sowie mit den PAR-spezifischen synthetischen Peptiden TFLLRNPNDK-NH₂ und SLIGKV-OH in HEK293-Zellen. Diese Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung des heterotrimeren G-Proteins G α q/11 an der Signaltransduktion Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 im SRE abhängigen Luciferase Assay schließen (vergleiche auch Abb. 4-49 bis 4-55). Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit den Veröffentlichungen anderer Autoren. Die Ermittlung der SRE abhängigen Luciferase Aktivitäten nach Stimulation von COS-7-Zellen mit SFLLR ergab signifikante Verringerungen der Luciferase Aktivitäten nach Überexpression von RGS2 [94]. Mikroinjektion von Antikörpern gegen G α q/11 in CCL-39-Zellen hemmte die PAR 1-vermittelte Kalzium-Mobilisierung [226]. Dieselben Antikörper hemmten die GTPase Aktivität in Thrombin stimulierten Thrombozyten-Membranen [227]. In aus transgenen, G q defizienten Mäusen gewonnenen Thrombozyten, war die Thrombin-stimulierte Phosphatidylinositol Hydrolyse gehemmt [228]. Eine direkte Interaktion zwischen PAR 1 und G q/11 sowie G i2 wurde durch Immunopräzipitation in Thrombin stimulierten menschlichen Neuroblastom SH-EP-Zellen dargestellt [229].

Über die Signaltransduktion des PAR 2-Rezeptors ist ebenso wie über eine evtl. Beteiligung des heterotrimeren G Proteins G α q/11 bislang noch wenig bekannt [10, 11, 61, 65, 93]. Es ist bekannt, dass Trypsin und PAR 2 Rezeptor spezifische Peptide die [³H] IP- und Ca²⁺ Bildung in zahlreichen Zelllinien stimulieren. Dies deutet auf eine Beteiligung von G q/11 bzw. Phospholipase C Isoformen an der Signaltransduktion des Proteinase aktivierbaren Rezeptors 2 hin [11, 61].

Die Koexpression von LSC mit RGS2 in HEK293-Zellen zeigte eine signifikante, annähernd vollständige Hemmung der Luciferase Aktivität im Vergleich zu den Einzeltransfektionen mit jeweils LSC bzw. RGS2 nach Stimulation der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 mit Thrombin, rhAPC und Faktor Xa (vergleiche auch Abb. 4-56 bis 4-60). Das gibt Anlass zu der

Vermutung, dass der überwiegende Teil der Signalverarbeitung der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 $G\alpha$ q/11- $G\alpha$ 12/13 vermittelt ist. Diese Vermutung wird in anderen Veröffentlichungen bestätigt. Dabei ergab die kombinierte Überexpression von RGS2 und RhoT19N (hemmt RhoA) eine nahezu komplette Hemmung der Luciferase Aktivität. Daraus wurde geschlussfolgert, dass der überwiegende Anteil der Signaltransduktion des PAR 1-Rezeptors über $G\alpha$ q bzw. $G\alpha$ 12/13-Rho verläuft [94].

Sowohl die Aktivierung der $G\alpha$ 12/13-Subfamilie durch den PAR 1-Rezeptor als auch infolgedessen die Aktivierung des SRE (Serum Response Element) durch RhoA sind hinlänglich bekannt [61, 197] und werden durch unsere Ergebnisse untermauert. Diese zeigten im G-Lisa ein Maximum der RhoA Aktivierung in HUVEC nach Stimulation mit Thrombin (1 U/ml) schon nach ca. 1 Minute (vergleiche auch Abb. 4-62). Im Pulldown Assay wurden diese Ergebnisse bestätigt (siehe auch Abb. 4-63a und b). Andere Autoren veröffentlichten ähnliche Ergebnisse, die aus Pulldown Assays in HUVECs gewonnen wurden [172]. Dabei ergab die Stimulation der HUVECs sowohl mit PAR 1 - als auch mit PAR 2 - spezifischen Peptiden einen deutlichen Anstieg der RhoA-Aktivität. Andere Veröffentlichungen beschreiben die Aktivierung von Rho GTP nach Stimulation von HUVEC mit PAR 1-spezifischem Peptid als stark, hingegen nach Stimulation mit PAR 2-spezifischem Peptid als schwach [92].

Die Überexpression von EFC3 ergab signifikante vollständige Hemmungen der Luciferase Aktivitäten nach Stimulation der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 in Kombination mit dem EPC Rezeptor mit den Serinproteinasen Thrombin, rhAPC und Faktor Xa sowie mit TFLLRNPNDK-NH2 und SLIGKV-OH (vergleiche auch Abb. 4-64 und 4-65). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Signalvermittlung beider Proteinase aktivierbarer Rezeptoren im SRE abhängigen Luciferase Assay Rho vermittelt ist. Bestätigt werden unsere Ergebnisse durch andere Publikationen, die eine Hemmung der SFLLR induzierten SRE abhängigen Luciferase Aktivität nach Überexpression einer dominant negativen Form von RhoA (RhoT19N) in COS-7-Zellen beschreiben [94]. Versuche mit dem C3-Transferase Toxin aus *Clostridium botulinum* (hemmt RhoA-C) an Endothelzellen ergaben eine Hemmung der Thrombin induzierten Steigerung der Membranpermeabilität [200]. Weitere Veröffentlichungen beschreiben eine Rho GTP bzw. Rho Kinase abhängige PAR 1-vermittelte Steigerung der Membranpermeabilität in Endothelzellen [92, 93, 172].

Ein „downstream“ Effektor von RhoA ist die RhoAbhängige Kinase ROCK [165]. Die Hemmung dieser Kinase durch Y-27632 (10 μ M) in COS-7-Zellen führte nach der Beschreibung einiger

Autoren zu einem fast vollständigen Absinken der SRE abhängigen Luciferase Aktivität nach Stimulation mit SFLLR. [94]. Dabei wurde diese Hemmung als vergleichbar mit der bei Einsatz des dominant negativen Rho beschrieben. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Rho vermittelte SRE Aktivierung durch SFLLRN vollständig abhängig ist von ROCK [94]. In unseren Versuchen ergab die Stimulation der mit der Rezeptorkombination PAR 1 + EPCR transfizierten und mit Y-27632 (30 μ M) vorbehandelten HEK293T-Zellen mit SFLLRNPNDK-NH₂ eine signifikante Verringerung der Luciferase Aktivität (vergleiche Abb. 4-66). Die Stimulation der Rezeptorkombination PAR 2 + EPCR mit rhAPC und SLIGKV-OH führte ebenfalls nach Behandlung der Zellen mit Y-27632 zu signifikanten Abnahmen der Luciferase Aktivitäten (vergleiche Abb. 4-67). Dabei ergab keiner unserer Versuche eine komplette Hemmung der Luciferase Aktivität nach Behandlung der HEK293T-Zellen mit Y-27632. Das legt die Vermutung nahe, dass die Signaltransduktion der Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 in HEK293T-Zellen zu einem gewissen Teil RhoA/ROCK vermittelt ist, dass jedoch die Aktivierung des SRF zum Teil auch direkt durch RhoA erfolgt. Andere Autoren berichten ebenfalls von einer reduzierten SRF abhängigen Promotor Aktivität nach Behandlung der Zellen mit Y-27632 (10 μ M) [151]. Experimente mit Y-27632 (10 μ M) an NIH3T3-Zellen (menschliche colorektale Tumorzelllinie) zeigten keine Hemmung der SRE Aktivierung im *RNAse Protection Assay* [230].

Die Behandlung von HUVECs mit TcdB Toxin, das selektiv die kleinen GTPasen Rho, Rac und CDC42 hemmt, ergab eine ausgeprägte Hemmung der PAR 2- und PAR 1-vermittelten Exozytose nach Stimulation mit PAR 1- bzw. PAR 2-spezifischen Peptiden [92]. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass Rho GTPasen eine wichtige Rolle in der PAR vermittelten Exozytose spielen. Die Behandlung der HUVECs mit dem C3-Exotoxin erbrachte jedoch keine Hemmung der PAR 2-Peptid vermittelten Exozytose. Auch die Hemmung der Rho Kinase ROCK mit Y-27632 (10 μ M) bzw. H-7 funktionierte nicht. Im Gegensatz dazu bewirkte die Behandlung der HUVECs (10 μ M) mit Y-27632 und Stimulation mit PAR 1 spezifischem Peptid eine markante Abschwächung der Zellpermeabilität. Diese Daten weisen darauf hin, dass die PAR vermittelte Exozytose RhoGTPase unabhängig ist. Für die TcdB Toxin verursachte Hemmung müssen andere Mitglieder der Rho GTPase Familie (z.B Cdc42) verantwortlich sein [92].

6 Zusammenfassung / Summary

6.1 Zusammenfassung

Die Serinproteinasen a) aktiviertes Protein C (APC), b) Thrombin und c) Faktor Xa kommen ubiquitär in Prokaryonten und Eukaryonten vor und wirken mit bei der Homöostase, der Fibrinolyse, der Blutgerinnung und beim Proteinverdau. Desweiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der G-Protein gekoppelten Proteinase aktivierbaren Rezeptoren.

Nach den positiven Ergebnissen aus der *PROWESS* Studie (Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis), die zeigten, dass APC die Mortalität bei schwerer Sepsis reduzierte, wurden dem APC neben den antikoagulativen auch antiinflammatorische Wirkungen zugeschrieben. Diese direkten antiinflammatorischen Wirkungen des APC wurden bisher jedoch nur *in vitro* nachgewiesen. Neuere Studien zweifeln diese protektiven Wirkungen an. Demgegenüber wirken Thrombin, als Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade, und Faktor Xa, ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Blutgerinnung, proinflammatorisch und prokoagulativ. Dabei ist bisher nicht bekannt, wie APC antiinflammatorische Effekte über den Proteinase aktivierbaren Rezeptor 1 (PAR1) steuert, während Thrombin bzw. Faktor Xa über denselben Rezeptor proinflammatorische Wirkungen hervorrufen. Über eine Beteiligung des Proteinase aktivierbaren Rezeptors 2 (PAR 2) bzw. des Sphingosin-1-Phosphat Rezeptors (S1P1) an diesen „protektiven versus destruktiven“ Effekten ist bisher ebenfalls wenig bekannt. Die weitere Erforschung und Aufklärung dieser molekularen Wirkungsmechanismen ist von großer Bedeutung für das pathophysiologische Verständnis des Sepsisgeschehens und damit einhergehend für die Therapie der Sepsis.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten nach Etablierung des SRE abhängigen Luciferase Assays die bisher bekannten molekularen Mechanismen der APC-, Thrombin- bzw. Faktor Xa-Wirkungen in HEK293A-Zellen nachgestellt bzw. neue Mechanismen und mögliche Unterschiede in der molekularen Wirkungsweise aufgedeckt werden. Das Hauptaugenmerk war dabei auf die heterotrimeren G-Proteine $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_i$ sowie auf die Rho GTPase Rho bzw. die Rho abhängige Kinase ROCK gerichtet.

In unseren Versuchen konnten wir in mit den Proteinase aktivierbaren Rezeptoren 1 und 2 transfizierten HEK293A-Zellen dosis- und zeitabhängige Steigerungen der Luciferase Aktivitäten durch die Serinproteinasen rhAPC, Thrombin und Faktor Xa sowie durch die PAR aktivierenden Peptide TFLLRNPNDK-NH₂ und SLIGKV-OH feststellen.

Die Kostimulationen von rhAPC mit Thrombin bzw. Faktor Xa im Luciferase Assay an HEK293T-Zellen ergaben im Gegensatz zur bisher in der Literatur vertretenen Meinung der protektiven APC Wirkung dosisabhängige und zeitunabhängige „additive Effekte“ der Agonisten. Bezüglich des Rezeptor *signalings* konnten im Rahmen dieser Arbeit im Luciferase-Assay an HEK293T-Zellen keine Unterschiede von APC gegenüber Thrombin bzw. Faktor Xa aufgedeckt werden. Die verschiedenen Experimente zur Hemmung der jeweiligen heterotrimeren G-Proteine bzw. Rho/ROCK ergaben, dass die Serinproteinasen rhAPC, Thrombin und Faktor Xa über $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_{q/11}$ und Rho/ROCK wirken, nicht jedoch über $G\alpha_i$.

Weitere *in vitro* bzw. *in vivo* Untersuchungen bezüglich einer „protektiven APC Wirkung“ müssen klären, ob die hier vorgeschlagenen Mechanismen *in vivo* bedeutsam sind.

6.2 Summary

The serine proteinases a) APC, b) Thrombin and c) Faktor Xa can be found ubiquitous in prokaryotes and eukaryotes and exert distinct functions in homeostasis, fibrinolysis, blood coagulation and protein digest. Furthermore APC, Thrombin and Faktor Xa play an important role by activating G-Protein coupled Proteinase Activated Receptors.

After it has been shown within the *PROWESS-Study* (Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis) that APC decreases the mortality of severe sepsis, APC was characterized as not only anti-coagulant but as also anti-inflammatory. However, direct anti-inflammatory properties of APC were only shown *in vitro*. Recent studies challenge these anti-inflammatory effects of APC. In contrast to these protective properties of APC the properties of both Thrombin and Faktor Xa as important key enzymes in the blood coagulation cascade are pro-inflammatory and pro-coagulant. It is not known how APC exerts anti-inflammatory effects through the Proteinase Activated Receptor 1, while Thrombin and Faktor Xa exert pro-inflammatory properties through the same receptor. Furthermore the significance of Proteinase Activated Receptor 2 as well as Sphingosin-1-Phosphate Receptor in this ‘protective versus destructive’ process is also not known.

Further investigation and enlightenment of these molecular functions are very important to understand the pathophysiological pathways in sepsis and sepsis treatment.

After the establishment of a SRE constrained *Luciferase Assay* the focus of this study was to identify molecular mechanisms of APC, Thrombin and Factor Xa on HEK293A cells and to show possible differences in the signaling pathways. The main focus was dedicated to the heterotrimeric G proteins G α 12/13, G α q/11 and G α i as well as to Rho GTPase Rho and the Rho associated Kinase ROCK.

In the present experiments it was shown that Proteinase Activated Receptors 1 and 2 transfected HEK293A cells increase *Luciferase activity* time- and dose-dependently by stimulation with the serine proteinases rhAPC, Thrombin, Factor Xa and the PAR-activating peptides TFLLRNPNDK-NH₂ and SLIGKV-OH. This is in contradiction to the opinion represented in the literature about APC acting as an only protective agent. We could show dose-dependent, but time-independent additive effects of these agonists.

With respect to the receptor signaling no functional differences between the respective serine proteinases were found. In several heterotrimeric G protein and Rho/ROCK restrain tests it was shown that the serine proteinases rhAPC, Thrombin and Factor Xa promote signaling through G α 12/13, G α q/11 und Rho/ROCK, while G α i signaling was not involved.

Further *in vitro* and *in vivo* research concerning the protective properties of APC are needed to clarify the *in vivo* relevance of these proposed pathways.

7 Publikationen

7.1 Eigene Publikation

Veröffentlichung in Vorbereitung:

Contribution of G_{12/13}, G_{q11} and G_i proteins and small GTP binding protein Rho to proteinase activated receptor signaling induced by activated protein C, factor Xa and thrombin.

Volker Liebe, **Klaudia Blödorn**, Susanne Lutz, Martin Borggreffe, Joachim Schmidt, Guenther Huhle, Thomas Wieland, Martina Brueckmann

7.2 Allgemeines Literaturverzeichnis

1. Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 1991;60:653-688.
2. Baldwin JM. Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6(2):180-190.
3. Birnbaumer L, Birnbaumer M. Signal transduction by G proteins: 1994 edition. *J Recept Signal Transduct Res* 1995;15(1-4):213-252.
4. Watson SA. The G protein linked receptor facts book. (Eds.) ed.: Academic Press, London, 1994.
5. Rinderknecht H. Activation of pancreatic zymogens. Normal activation, premature intrapancreatic activation, protective mechanisms against inappropriate activation. *Dig Dis Sci* 1986;31(3):314-321.
6. Barrett AJ RN, Woessner JF. Proteolytic enzymes: nomenclature and classification. *Handbook of proteolytic enzymes*. New York: Academic Press, 1998.
7. Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N et al. Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr Rev* 2005;26(1):1-43.
8. Neurath H, Walsh KA. Role of proteolytic enzymes in biological regulation (a review). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73(11):3825-3832.
9. Walsh PN, Ahmad SS. Proteases in blood clotting. *Essays Biochem* 2002;38:95-111.
10. Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 1998;274(6 Pt 1):C1429-1452.
11. Ossovskaya VS, Bunnett NW. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 2004;84(2):579-621.
12. Brass LF, Molino M. Protease-activated G PCoupled receptors on human platelets and endothelial cells. *Thromb Haemost* 1997;78(1):234-241.
13. Grand RJ, Turnell AS, Grabham PW. Cellular consequences of thrombin-receptor activation. *Biochem J* 1996;313 (Pt 2):353-368.
14. Hollenberg MD. Protease-mediated signalling: new paradigms for cell regulation and drug development. *Trends Pharmacol Sci* 1996;17(1):3-6.
15. Slofstra SH, ten Cate H, Spek CA. Signal transduction induced by activated protein C: no role in protection against sepsis? *Trends Mol Med* 2006;12(8):374-381.
16. Kisiel W. Human plasma protein C: isolation, characterization, and mechanism of activation by alpha-thrombin. *J Clin Invest* 1979;64(3):761-769.
17. Esmon CT. The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 1989;264(9):4743-4746.
18. Fukudome K, Esmon CT. Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor. *J Biol Chem* 1994;269(42):26486-26491.
19. Fukudome K, Kurosawa, S., Stearns-Kurosawa, D. J., He, X., Rezaie, A. R., Esmon, C. T. The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor. *J Biol Chem* 1996;271(29):17491-17498.
20. Laszik Z, Mitro, A., Taylor, F. B., Jr., Ferrell, G., Esmon, C. T. Human protein C receptor is present primarily on endothelium of large blood vessels: implications for the control of the protein C pathway. *Circulation* 1997;96(10):3633-3640.
21. Esmon CT. Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor. *Crit Care Med* 2004;32(5 Suppl):S298-301.
22. Ye X, Fukudome, K., Tsuneyoshi, N., Satoh, T., Tokunaga, O., Sugawara, K., Mizokami, H., Kimoto, M.,. The endothelial cell protein C receptor (EPCR) functions as a primary receptor for protein C activation on endothelial cells in arteries, veins, and capillaries. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259(3):671-677.
23. Taylor FB, Jr., Stearns-Kurosawa, D. J., Kurosawa, S., Ferrell, G., Chang, A. C., Laszik, Z., Kosanke, S., Peer, G., Esmon, C. T. The endothelial cell protein C receptor aids in host defense against *Escherichia coli* sepsis. *Blood* 2000;95(5):1680-1686.

24. Riewald M, Petrovan, R. J., Donner, A., Mueller, B. M., Ruf, W. Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 2002;296(5574):1880-1882.
 25. Feistritzer C, Schuepbach, R. A., Mosnier, L. O., Bush, L. A., Di Cera, E., Griffin, J. H., Riewald, M., Protective signaling by activated protein C is mechanistically linked to protein C activation on endothelial cells. *J Biol Chem* 2006;281(29):20077-20084.
 26. Riewald M, Ruf W. Protease-activated receptor-1 signaling by activated protein C in cytokine-perturbed endothelial cells is distinct from thrombin signaling. *J Biol Chem* 2005;280(20):19808-19814.
 27. Ruf W. Protease-activated receptor signaling in the regulation of inflammation. *Crit Care Med* 2004;32(5 Suppl):S287-292.
 28. Feistritzer C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR 1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation. *Blood* 2005;105(8):3178-3184.
 29. Finigan JH, Dudek, S. M., Singleton, P. A., Chiang, E. T., Jacobson, J. R., Camp, S. M., Ye, S. Q., Garcia, J. G. Activated protein C mediates novel lung endothelial barrier enhancement: role of sphingosine 1-phosphate receptor transactivation. *J Biol Chem* 2005;280(17):17286-17293.
 30. Esmon CT. The anticoagulant and anti-inflammatory roles of the protein C anticoagulant pathway. *J Autoimmun* 2000;15(2):113-116.
 31. Bajzar L, Nesheim ME, Tracy PB. The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent. *Blood* 1996;88(6):2093-2100.
 32. Bernard GR, Vincent, J. L., Laterre, P. F., LaRosa, S. P., Dhainaut, J. F., Lopez-Rodriguez, A., Steingrub, J. S., Garber, G. E., Helterbrand, J. D., Ely, E. W., Fisher, C. J., Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001;344(10):699-709.
 33. Gruber A, Griffin JH. Direct detection of activated protein C in blood from human subjects. *Blood* 1992;79(9):2340-2348.
 34. Okajima K, Koga S, Kaji M, Inoue M, Nakagaki T, Funatsu A et al. Effect of protein C and activated protein C on coagulation and fibrinolysis in normal human subjects. *Thromb Haemost* 1990;63(1):48-53.
 35. Dreyfus M, Magny JF, Bridey F, Schwarz HP, Planche C, Dehan M et al. Treatment of homozygous protein C deficiency and neonatal purpura fulminans with a purified protein C concentrate. *N Engl J Med* 1991;325(22):1565-1568.
 36. Conard J, Bauer KA, Gruber A, Griffin JH, Schwarz HP, Horellou MH et al. Normalization of markers of coagulation activation with a purified protein C concentrate in adults with homozygous protein C deficiency. *Blood* 1993;82(4):1159-1164.
 37. Miletich J, Sherman L, Broze G, Jr. Absence of thrombosis in subjects with heterozygous protein C deficiency. *N Engl J Med* 1987;317(16):991-996.
 38. Vervloet MG, Thijs LG, Hack CE. Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemost* 1998;24(1):33-44.
 39. Heeb MJ, Espana F, Griffin JH. Inhibition and complexation of activated protein C by two major inhibitors in plasma. *Blood* 1989;73(2):446-454.
 40. Marlar RA, Kressin DC, Madden RM. Contribution of plasma proteinase inhibitors to the regulation of activated protein C in plasma. *Thromb Haemost* 1993;69(1):16-20.
 41. Scully MF, Toh, C. H., Hoogendoorn, H., Manuel, R. P., Nesheim, M. E., Solymoss, S., Giles, A. R. Activation of protein C and its distribution between its inhibitors, protein C inhibitor, alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin, in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1993;69(5):448-453.
 42. Mizutani A, Okajima, K., Uchiba, M., Noguchi, T. Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood* 2000;95(12):3781-3787.
 43. Isobe H, Okajima, K., Harada, N., Liu, W., Okabe, H. Activated protein C reduces stress-induced gastric mucosal injury in rats by inhibiting the endothelial cell injury. *J Thromb Haemost* 2004;2(2):313-320.
 44. Bajzar L, Jain, N., Wang, P., Walker, J. B., Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor: not just an inhibitor of fibrinolysis. *Crit Care Med* 2004;32(5 Suppl):S320-324.
-

45. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem* 1995;270(24):14477-14484.
 46. Hesselvik JF, Malm, J., Dahlback, B., Blomback, M., Protein C, protein S and C4b-binding protein in severe infection and septic shock. *Thromb Haemost* 1991;65(2):126-129.
 47. Brueckmann M, Marx A, Weiler HM, Liebe V, Lang S, Kaden JJ et al. Stabilization of monocyte chemoattractant protein-1-mRNA by activated protein C. *Thromb Haemost* 2003;89(1):149-160.
 48. Brueckmann M, Hoffmann, U., De Rossi, L., Weiler, H. M., Liebe, V., Lang, S., Kaden, J. J., Borggreffe, M., Haase, K. K., Huhle, G., Activated protein C inhibits the release of macrophage inflammatory protein-1-alpha from THP-1 cells and from human monocytes. *Cytokine* 2004;26(3):106-113.
 49. Bizios R, Lai, L., Fenton, J. W., 2nd, Malik, A. B., Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J Cell Physiol* 1986;128(3):485-490.
 50. Drake WT, Lopes, N. N., Fenton, J. W., 2nd, Issekutz, A. C., Thrombin enhancement of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha induced polymorphonuclear leukocyte migration. *Lab Invest* 1992;67(5):617-627.
 51. Grey ST, Tsuchida, A., Hau, H., Orthner, C. L., Salem, H. H., Hancock, W. W., Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester. *J Immunol* 1994;153(8):3664-3672.
 52. Schmidt-Supprian M, Murphy, C., While, B., Lawler, M., Kapurniotu, A., Voelter, W., Smith, O., Bernhagen, J., Activated protein C inhibits tumor necrosis factor and macrophage migration inhibitory factor production in monocytes. *Eur Cytokine Netw* 2000;11(3):407-413.
 53. Brueckmann M, Hoffmann, U., Dvortsak, E., Lang, S., Kaden, J. J., Borggreffe, M., Haase, K. K., Drotrecogin alfa (activated) inhibits NF-kappa B activation and MIP-1-alpha release from isolated mononuclear cells of patients with severe sepsis. *Inflamm Res* 2004;53(10):528-533.
 54. Joyce DE, Gelbert, L., Ciaccia, A., DeHoff, B., Grinnell, B. W., Gene expression profile of antithrombotic protein c defines new mechanisms modulating inflammation and apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276(14):11199-11203.
 55. Zeng W, Matter WF, Yan SB, Um SL, Vlahos CJ, Liu L. Effect of drotrecogin alfa (activated) on human endothelial cell permeability and Rho kinase signaling. *Crit Care Med* 2004;32(5 Suppl):S302-308.
 56. Bar-Shavit R, Benezra, M., Sabbah, V., Bode, W., Vlodavsky, I., Thrombin as a multifunctional protein: induction of cell adhesion and proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;6(2):123-130.
 57. Naldini A, Carney DH, Bocci V, Klimpel KD, Asuncion M, Soares LE et al. Thrombin enhances T cell proliferative responses and cytokine production. *Cell Immunol* 1993;147(2):367-377.
 58. Clohisy DR, Erdmann JM, Wilner GD. Thrombin binds to murine bone marrow-derived macrophages and enhances colony-stimulating factor-1-driven mitogenesis. *J Biol Chem* 1990;265(14):7729-7732.
 59. Kahan C, Seuwen K, Meloche S, Pouyssegur J. Coordinate, biphasic activation of p44 mitogen-activated protein kinase and S6 kinase by growth factors in hamster fibroblasts. Evidence for thrombin-induced signals different from phosphoinositide turnover and adenylylcyclase inhibition. *J Biol Chem* 1992;267(19):13369-13375.
 60. Graham DJ, Alexander JJ. The effects of thrombin on bovine aortic endothelial and smooth muscle cells. *J Vasc Surg* 1990;11(2):307-312; discussion 312-303.
 61. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53(2):245-282.
 62. Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. *British journal of Haematology* 2005;130:653-661.
 63. Esmon CT. Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. *Trends Immunol* 2004;25(10):536-542.
 64. Bogatcheva NV, Garcia JG, Verin AD. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67(1):75-84.
 65. Morris DR, Ding Y, Ricks TK, Gullapalli A, Wolfe BL, Trejo J. Protease-activated receptor-2 is essential for factor VIIa and Xa-induced signaling, migration, and invasion of breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;66(1):307-314.
-

66. Feistritzer C, Lenta R, Riewald M. Protease-activated receptors-1 and -2 can mediate endothelial barrier protection: role in factor Xa signaling. *J Thromb Haemost* 2005;3(12):2798-2805.
 67. Gajdusek C, Carbon S, Ross R, Nawroth P, Stern D. Activation of coagulation releases endothelial cell mitogens. *J Cell Biol* 1986;103(2):419-428.
 68. Senden NH, Jeunhomme TM, Heemskerk JW, Wagenvoort R, van't Veer C, Hemker HC et al. Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol* 1998;161(8):4318-4324.
 69. Nicholson AC, Nachman RL, Altieri DC, Summers BD, Ruf W, Edgington TS et al. Effector cell protease receptor-1 is a vascular receptor for coagulation factor Xa. *J Biol Chem* 1996;271(45):28407-28413.
 70. Schaeffer P, Mares AM, Dol F, Bono F, Herbert JM. Coagulation factor Xa induces endothelium-dependent relaxations in rat aorta. *Circ Res* 1997;81(5):824-828.
 71. Taylor FB, Chang AC, Peer G, Li A, Ezban M, Hedner U. Active site inhibited factor VIIa (DEGR VIIa) attenuates the coagulant and interleukin-6 and -8, but not tumor necrosis factor, responses of the baboon to LD100 *Escherichia coli*. *Blood* 1998;91(5):1609-1615.
 72. Camerer E, Kataoka H, Kahn M, Lease K, Coughlin SR. Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor Xa signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* 2002;277(18):16081-16087.
 73. Camerer E, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(10):5255-5260.
 74. Riewald M, Ruf W. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(14):7742-7747.
 75. Bono F, Schaeffer P, Herault JP, Michaux C, Nestor AL, Guillemot JC et al. Factor Xa activates endothelial cells by a receptor cascade between EPR-1 and PAR-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(11):E107-112.
 76. Hollenberg MD, Compton SJ. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2002;54(2):203-217.
 77. Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K. The 7 TM G-PCoupled receptor target family. *ChemMedChem* 2006;1(8):761-782.
 78. Schertler GF, Villa C, Henderson R. Projection structure of rhodopsin. *Nature* 1993;362(6422):770-772.
 79. Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768(4):794-807.
 80. Gether U, Kobilka BK. G PCoupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 1998;273(29):17979-17982.
 81. Wonerow P, Schoneberg T, Schultz G, Gudermann T, Paschke R. Deletions in the third intracellular loop of the thyrotropin receptor. A new mechanism for constitutive activation. *J Biol Chem* 1998;273(14):7900-7905.
 82. Gershengorn MC, Osman R. Minireview: Insights into G PCoupled receptor function using molecular models. *Endocrinology* 2001;142(1):2-10.
 83. Baneres JL, Martin A, Hullot P, Girard JP, Rossi JC, Parello J. Structure-based analysis of GPCR function: conformational adaptation of both agonist and receptor upon leukotriene B4 binding to recombinant BLT1. *J Mol Biol* 2003;329(4):801-814.
 84. Pin JP, Kniazeff J, Goudet C, Bessis AS, Liu J, Galvez T et al. The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. *Biol Cell* 2004;96(5):335-342.
 85. DeLean A, Lefkowitz RJ. Dihydroergocryptine binding and alpha-adrenoreceptors in smooth muscle. *Nature* 1980;283(5742):109-110.
 86. Weiss JM, Morgan PH, Lutz MW, Kenakin TP. The cubic ternary complex receptor-occupancy model. III. resurrecting efficacy. *J Theor Biol* 1996;181(4):381-397.
 87. Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem* 1993;268(7):4625-4636.
 88. Riobo NA, Manning DR. Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G12 family. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26(3):146-154.
 89. Snabaitis AK, Muntendorf A, Wieland T, Avkiran M. Regulation of the extracellular signal-regulated kinase pathway in adult myocardium: differential roles of G(q/11), Gi and G(12/13)
-

- proteins in signalling by alpha1-adrenergic, endothelin-1 and thrombin-sensitive protease-activated receptors. *Cell Signal* 2005;17(5):655-664.
90. Brown JH, Del Re DP, Sussman MA. The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res* 2006;98(6):730-742.
- 91a. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 2005;3(8):1800-1814.
- 91b. Nystedt S EK, Larsson AK, Strombeck B, Sundelin J. Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *Eur J Biochem* 1995;232(84-89).
- 91c. Xu WF AH, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching, A GT, Davie EW, Foster DC. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6642-6646.
92. Klarenbach SW, Chipiuk A, Nelson RC, Hollenberg MD, Murray AG. Differential actions of PAR 2 and PAR 1 in stimulating human endothelial cell exocytosis and permeability: the role of Rho-GTPases. *Circ Res* 2003;92(3):272-278.
93. McLaughlin JN, Shen L, Holinstat M, Brooks JD, Dibenedetto E, Hamm HE. Functional selectivity of G protein signaling by agonist peptides and thrombin for the protease-activated receptor-1. *J Biol Chem* 2005;280(26):25048-25059.
94. De Vries L, Palmier C, Finana F, Le Grand B, Perez M, Cussac D. Pharmacological characterization of protease activated receptor-1 by a serum responsive element-dependent reporter gene assay: major role of calmodulin. *Biochem Pharmacol* 2006;71(10):1449-1458.
95. Wetschurack N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 2005;85(4):1159-1204.
96. McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP, Willard FS. G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(5):551-577.
97. Offermanns S, Laugwitz KL, Spicher K, Schultz G. G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(2):504-508.
98. Morris AJ, Malbon CC. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 1999;79(4):1373-1430.
99. Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S46-55.
100. Clapham DE, Neer EJ. G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:167-203.
101. Bunemann M, Hosey MM. G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J Physiol* 1999;517 (Pt 1):5-23.
102. Bernstein G, Blank JL, Jhon DY, Exton JH, Rhee SG, Ross EM. Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell* 1992;70(3):411-418.
103. Siderovski DP, Hessel A, Chung S, Mak TW, Tyers M. A new family of regulators of G-PCoupled receptors? *Curr Biol* 1996;6(2):211-212.
104. Koelle MR, Horvitz HR. EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. *Cell* 1996;84(1):115-125.
105. Druey KM, Blumer, K. J., Kang, V. H., and Kehrl, J. H. Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature* 1996;379:742-746.
106. Wieland T, Mittmann C. Regulators of G-protein signalling: multifunctional proteins with impact on signalling in the cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 2003;97(2):95-115.
107. Dietzel C, Kurjan J. Pheromonal regulation and sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* SST2 gene: a model for desensitization to pheromone. *Mol Cell Biol* 1987;7(12):4169-4177.
108. Dohlman HG, Song J, Ma D, Courchesne WE, Thorner J. Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with Gpa1 (the G-protein alpha subunit). *Mol Cell Biol* 1996;16(9):5194-5209.
109. Siderovski DP, Willard FS. The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int J Biol Sci* 2005;1(2):51-66.
110. Dohlman HG, Thorner J. RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 1997;272(7):3871-3874.
-

111. Mittmann C, Chung CH, Hoppner G, Michalek C, Nose M, Schuler C et al. Expression of ten RGS proteins in human myocardium: functional characterization of an upregulation of RGS4 in heart failure. *Cardiovasc Res* 2002;55(4):778-786.
 112. Willars GB. Mammalian RGS proteins: multifunctional regulators of cellular signalling. *Semin Cell Dev Biol* 2006;17(3):363-376.
 113. Wieland T, Chen CK. Regulators of G-protein signalling: a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of signalling via heterotrimeric G proteins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999;360(1):14-26.
 114. Berman DM, Wilkie TM, Gilman AG. GAIP and RGS4 are GTPase-activating proteins for the Gi subfamily of G protein alpha subunits. *Cell* 1996;86(3):445-452.
 115. Tesmer JJ, Berman DM, Gilman AG, Sprang SR. Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* 1997;89(2):251-261.
 116. Mukhopadhyay S, Ross EM. Rapid GTP binding and hydrolysis by G(q) promoted by receptor and GTPase-activating proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(17):9539-9544.
 117. Hollinger S, Hepler JR. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 2002;54(3):527-559.
 118. Riddle EL, Schwartzman RA, Bond M, Insel PA. Multi-tasking RGS proteins in the heart: the next therapeutic target? *Circ Res* 2005;96(4):401-411.
 119. Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB et al. Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G PCoupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* 1999;274(48):34483-34492.
 120. Heximer SP, Watson N, Linder ME, Blumer KJ, Hepler JR. RGS2/G0S8 is a selective inhibitor of Gqalpha function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(26):14389-14393.
 121. Kozasa T. [Regulation of G protein-mediated signaling pathways by RGS proteins]. *Seikagaku* 1998;70(12):1418-1422.
 122. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 1993;366(6456):643-654.
 123. Herrmann C, Nassar N. Ras and its effectors. *Prog Biophys Mol Biol* 1996;66(1):1-41.
 124. Donaldson JG, Klausner RD. ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6(4):527-532.
 125. Weis K. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 2003;112(4):441-451.
 126. Hall A. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* 1994;10:31-54.
 127. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002;420(6916):629-635.
 128. Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 2000;348 Pt 2:241-255.
 129. Ellis S, Mellor H. The novel Rho-family GTPase rif regulates coordinated actin-based membrane rearrangements. *Curr Biol* 2000;10(21):1387-1390.
 130. Vignal E, De Toledo M, Comunale F, Ladopoulou A, Gauthier-Rouviere C, Blangy A et al. Characterization of TCL, a new GTPase of the rho family related to TC10 and Cdc42. *J Biol Chem* 2000;275(46):36457-36464.
 131. Wherlock M, Mellor H. The Rho GTPase family: a Rac to Wrchs story. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 2):239-240.
 132. Burridge K, Wennerberg K. RhoAnd Rac take center stage. *Cell* 2004;116(2):167-179.
 133. Wennerberg K, Der CJ. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 2004;117(Pt 8):1301-1312.
 134. Rossman KL, Sondek J. Larger than Dbp: new structural insights into RhoA activation. *Trends Biochem Sci* 2005;30(4):163-165.
 135. Mackay DJ, Hall A. Rho GTPases. *J Biol Chem* 1998;273(33):20685-20688.
 136. Sander EE, Collard JG. Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer* 1999;35(9):1302-1308.
 137. Kjoller L, Hall A. Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* 1999;253(1):166-179.
 138. Aktories K, Wegner A. Mechanisms of the cytopathic action of actin-ADP-ribosylating toxins. *Mol Microbiol* 1992;6(20):2905-2908.
-

139. Just I, Fritz G, Aktories K, Giry M, Popoff MR, Boquet P et al. Clostridium difficile toxin B acts on the GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem* 1994;269(14):10706-10712.
 140. Popoff MR, Chaves-Olarte E, Lemichez E, von Eichel-Streiber C, Thelestam M, Chardin P et al. Ras, Rap, and Rac small GTP-binding proteins are targets for Clostridium sordellii lethal toxin glucosylation. *J Biol Chem* 1996;271(17):10217-10224.
 141. Sehr P, Joseph G, Genth H, Just I, Pick E, Aktories K. Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry* 1998;37(15):5296-5304.
 142. Sekine A, Fujiwara M, Narumiya S. Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 1989;264(15):8602-8605.
 143. Just I, Selzer J, Wilm M, von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. Glucosylation of Rho proteins by Clostridium difficile toxin B. *Nature* 1995;375(6531):500-503.
 144. Just I, Selzer J, Hofmann F, Green GA, Aktories K. Inactivation of Ras by Clostridium sordellii lethal toxin-catalyzed glucosylation. *J Biol Chem* 1996;271(17):10149-10153.
 145. Aktories K, Rosener S, Blaschke U, Chhatwal GS. Botulinum ADP-ribosyltransferase C3. Purification of the enzyme and characterization of the ADP-ribosylation reaction in platelet membranes. *Eur J Biochem* 1988;172(2):445-450.
 146. Worthylake RA, Lemoine S, Watson JM, Burrige K. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol* 2001;154(1):147-160.
 147. Worthylake RA, Burrige K. RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem* 2003;278(15):13578-13584.
 148. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996;273(5272):245-248.
 149. Chrzanowska-Wodnicka M, Burrige K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 1996;133(6):1403-1415.
 150. Hill CS, Wynne J, Treisman R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 1995;81(7):1159-1170.
 151. Liu HW, Halayko AJ, Fernandes DJ, Harmon GS, McCauley JA, Kocieniewski P et al. The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29(1):39-47.
 152. Cachero TG, Morielli AD, Peralta EG. The small GTP-binding protein RhoA regulates a delayed rectifier potassium channel. *Cell* 1998;93(6):1077-1085.
 153. Yatani A, Irie K, Otani T, Abdellatif M, Wei L. RhoA GTPase regulates L-type Ca²⁺ currents in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(2):H650-659.
 154. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992;70(3):401-410.
 155. Sells MA, Knaus UG, Bagrodia S, Ambrose DM, Bokoch GM, Chernoff J. Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* 1997;7(3):202-210.
 156. Manser E, Huang HY, Loo TH, Chen XQ, Dong JM, Leung T et al. Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol Cell Biol* 1997;17(3):1129-1143.
 157. Zheng Y. Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci* 2001;26(12):724-732.
 - 158a. Lamarche N, Hall A. GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet* 1994;10(12):436-440.
 - 158b. Olofsson B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* 1999;11(8):545-554.
 159. Compton SJ, Renaux B, Wijesuriya SJ, Hollenberg MD. Glycosylation and the activation of proteinase-activated receptor 2 (PAR(2)) by human mast cell tryptase. *Br J Pharmacol* 2001;134(4):705-718.
 160. Compton SJ, Sandhu S, Wijesuriya SJ, Hollenberg MD. Glycosylation of human proteinase-activated receptor-2 (hPAR 2): role in cell surface expression and signalling. *Biochem J* 2002;368(Pt 2):495-505.
 - 161a. Traynelis SF, Trejo J. Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. *Curr Opin Hematol* 2007;14(3):230-235.
-

- 161b. Kouklis P, Konstantoulaki M, Vogel S, Broman M, Malik AB. Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function. *Circ Res* 2004;94(2):159-166.
 162. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 2006;86(1):279-367.
 163. Marin V, Farnarier C, Gres S, Kaplanski S, Su MS, Dinarello CA et al. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in thrombin-induced endothelial chemokine production and leukocyte recruitment. *Blood* 2001;98(3):667-673.
 164. Bhattacharyya R, Wedegaertner PB. Characterization of G alpha 13-dependent plasma membrane recruitment of p115RhoGEF. *Biochem J* 2003;371(Pt 3):709-720.
 165. Benitah SA, Valeron PF, Lacal JC. ROCK and nuclear factor-kappaB-dependent activation of cyclooxygenase-2 by Rho GTPases: effects on tumor growth and therapeutic consequences. *Mol Biol Cell* 2003;14(7):3041-3054.
 166. Vouret-Craviari V, Boquet P, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E. Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function. *Mol Biol Cell* 1998;9(9):2639-2653.
 167. Manolopoulos VG, Fenton JW, 2nd, Lelkes PI. The thrombin receptor in adrenal medullary microvascular endothelial cells is negatively coupled to adenylyl cyclase through a Gi protein. *Biochim Biophys Acta* 1997;1356(3):321-332.
 168. Vanhauwe JF, Thomas TO, Minshall RD, Tiruppathi C, Li A, Gilchrist A et al. Thrombin receptors activate G(o) proteins in endothelial cells to regulate intracellular calcium and cell shape changes. *J Biol Chem* 2002;277(37):34143-34149.
 169. English D, Welch Z, Kovala AT, Harvey K, Volpert OV, Brindley DN et al. Sphingosine 1-phosphate released from platelets during clotting accounts for the potent endothelial cell chemotactic activity of blood serum and provides a novel link between hemostasis and angiogenesis. *Faseb J* 2000;14(14):2255-2265.
 170. Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT et al. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest* 2001;108(5):689-701.
 171. Riewald M, Kravchenko VV, Petrovan RJ, O'Brien PJ, Brass LF, Ulevitch RJ et al. Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1. *Blood* 2001;97(10):3109-3116.
 172. Vouret-Craviari V, Grall D, Van Obberghen-Schilling E. Modulation of Rho GTPase activity in endothelial cells by selective proteinase-activated receptor (PAR) agonists. *J Thromb Haemost* 2003;1(5):1103-1111.
 173. Adelstein RS, Conti MA, Pato MD. Regulation of myosin light chain kinase by reversible phosphorylation and calcium-calmodulin. *Ann N Y Acad Sci* 1980;356:142-150.
 174. Stull JT, Lin PJ, Krueger JK, Trehwella J, Zhi G. Myosin light chain kinase: functional domains and structural motifs. *Acta Physiol Scand* 1998;164(4):471-482.
 175. Majumdar M, Seasholtz TM, Goldstein D, de Lanerolle P, Brown JH. Requirement for Rho-mediated myosin light chain phosphorylation in thrombin-stimulated cell rounding and its dissociation from mitogenesis. *J Biol Chem* 1998;273(17):10099-10106.
 176. Majumdar M, Seasholtz TM, Buckmaster C, Toksoz D, Brown JH. A rho exchange factor mediates thrombin and Galpha(12)-induced cytoskeletal responses. *J Biol Chem* 1999;274(38):26815-26821.
 177. DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD, Bunnnett NW. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol* 2000;148(6):1267-1281.
 178. Bretschneider E, Uzonyi B, Weber AA, Fischer JW, Pape R, Lotzer K et al. Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor. *Circ Res* 2007;100(2):255-262.
 179. Ruf W, Dorfleutner A, Riewald M. Specificity of coagulation factor signaling. *J Thromb Haemost* 2003;1(7):1495-1503.
 180. Mosnier LO, Griffin JH. Inhibition of staurosporine-induced apoptosis of endothelial cells by activated protein C requires protease-activated receptor-1 and endothelial cell protein C receptor. *Biochem J* 2003;373(Pt 1):65-70.
-

181. Guo H, Liu D, Gelbard H, Cheng T, Insalaco R, Fernandez JA et al. Activated protein C prevents neuronal apoptosis via protease activated receptors 1 and 3. *Neuron* 2004;41(4):563-572.
 182. Mosnier LO, Gale AJ, Yegneswaran S, Griffin JH. Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity. *Blood* 2004;104(6):1740-1744.
 183. Xue M, Campbell D, Sambrook PN, Fukudome K, Jackson CJ. Endothelial protein C receptor and protease-activated receptor-1 mediate induction of a wound-healing phenotype in human keratinocytes by activated protein C. *J Invest Dermatol* 2005;125(6):1279-1285.
 184. Macias WL, Yan SB, Williams MD, Um SL, Sandusky GE, Ballard DW et al. New insights into the protein C pathway: potential implications for the biological activities of drotrecogin alfa (activated). *Crit Care* 2005;9 Suppl 4:S38-45.
 185. Ludeman MJ, Kataoka H, Srinivasan Y, Esmon NL, Esmon CT, Coughlin SR. PAR 1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin. *J Biol Chem* 2005;280(13):13122-13128.
 186. McDonnell MW, Simon MN, Studier FW. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* 1977;110(1):119-146.
 187. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-685.
 188. Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV, Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 1967;28(5):815-820.
 189. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52(11):2745-2756.
 190. Coletti D. Full Product Review: Dual-Glo Luciferase Assay System from Promega 2007.
 191. Stables J, Scott S, Brown S, Roelant C, Burns D, Lee MG et al. Development of a dual glow-signal firefly and Renilla luciferase assay reagent for the analysis of G-protein coupled receptor signalling. *J Recept Signal Transduct Res* 1999;19(1-4):395-410.
 192. Ren XD, Schwartz MA. Determination of GTP loading on Rho. *Methods Enzymol* 2000;325:264-272.
 193. Benard V, Bokoch GM. Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase activation by affinity methods. *Methods Enzymol* 2002;345:349-359.
 194. Shi CS, Sinnarajah S, Cho H, Kozasa T, Kehrl JH. G13alpha-mediated PYK2 activation. PYK2 is a mediator of G13alpha -induced serum response element-dependent transcription. *J Biol Chem* 2000;275(32):24470-24476.
 195. Lin K, Wang D, Sadee W. Serum response factor activation by muscarinic receptors via RhoA. Novel pathway specific to M1 subtype involving calmodulin, calcineurin, and Pyk2. *J Biol Chem* 2002;277(43):40789-40798.
 196. Post GR, Collins LR, Kennedy ED, Moskowitz SA, Aragay AM, Goldstein D et al. Coupling of the thrombin receptor to G12 may account for selective effects of thrombin on gene expression and DNA synthesis in 1321N1 astrocytoma cells. *Mol Biol Cell* 1996;7(11):1679-1690.
 197. Mao J, Yuan H, Xie W, Simon MI, Wu D. Specific involvement of G proteins in regulation of serum response factor-mediated gene transcription by different receptors. *J Biol Chem* 1998;273(42):27118-27123.
 198. Sorensen SD, Nicole O, Peavy RD, Montoya LM, Lee CJ, Murphy TJ et al. Common signaling pathways link activation of murine PAR-1, LPA, and S1P receptors to proliferation of astrocytes. *Mol Pharmacol* 2003;64(5):1199-1209.
 199. Wu SQ, Minami T, Donovan DJ, Aird WC. The proximal serum response element in the Egr-1 promoter mediates response to thrombin in primary human endothelial cells. *Blood* 2002;100(13):4454-4461.
 200. van Nieuw Amerongen GP, Draijer R, Vermeer MA, van Hinsbergh VW. Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin: role of protein kinases, calcium, and RhoA. *Circ Res* 1998;83(11):1115-1123.
 201. Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Hung DT, Rose J, Vu TK et al. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem* 1992;267(19):13146-13149.
-

202. Blackhart BD, Emilsson K, Nguyen D, Teng W, Martelli AJ, Nystedt S et al. Ligand cross-reactivity within the protease-activated receptor family. *J Biol Chem* 1996;271(28):16466-16471.
 203. Liaw PC, Mather T, Oganessian N, Ferrell GL, Esmon CT. Identification of the protein C/activated protein C binding sites on the endothelial cell protein C receptor. Implications for a novel mode of ligand recognition by a major histocompatibility complex class I-type receptor. *J Biol Chem* 2001;276(11):8364-8370.
 204. O'Brien PJ, Prevost N, Molino M, Hollinger MK, Woolkalis MJ, Woulfe DS et al. Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR 1 include the transactivation of PAR 2 by thrombin-cleaved PAR 1. *J Biol Chem* 2000;275(18):13502-13509.
 205. Vu TK HD, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991;64:1057-1068.
 206. Major C.D. RJS, Claudia K. Derian, Patricia Andrade-Gordon. Extracellular Mediators in Atherosclerosis and Thrombosis: Lessons from Thrombin Receptor Knockout Mice *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:931-939
 207. Dömötör E. BO, Griffin J.H., Yula d., Fukudome k., Zlokovich B.V. Activated protein C alters cytosolic calcium flux in human brain endothelium via binding to endothelial protein C receptor and activation of protease activated receptor-1. *Blood* 2003;101, Nr.12:4797-4800.
 208. Papapetropoulos A, Piccardoni P, Cirino G, Bucci M, Sorrentino R, Cicala C et al. Hypotension and inflammatory cytokine gene expression triggered by factor Xa-nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(8):4738-4742.
 209. Camerer E, Rottingen, J. A., Gjernes, E., Larsen, K., Skartlien, A. H., Iversen, J. G., Prydz, H., Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the egr-1 gene. *J Biol Chem* 1999;274(45):32225-32233.
 210. Mosnier LO, Zlokovic BV, Griffin JH. The cytoprotective protein C pathway. *Blood* 2007;109(8):3161-3172.
 211. Taylor FB, Jr., Chang A, Hinshaw LB, Esmon CT, Archer LT, Beller BK. A model for thrombin protection against endotoxin. *Thromb Res* 1984;36(2):177-185.
 212. Taylor FB, Jr., Chang AC, Peer GT, Mather T, Blick K, Catlett R et al. DEGR-factor Xa blocks disseminated intravascular coagulation initiated by *Escherichia coli* without preventing shock or organ damage. *Blood* 1991;78(2):364-368.
 213. Esmon CT. Is APC activation of endothelial cell PAR 1 important in severe sepsis?: No. *J Thromb Haemost* 2005;3(9):1910-1911.
 214. Ruf W. Is APC activation of endothelial cell PAR 1 important in severe sepsis?: Yes. *J Thromb Haemost* 2005;3(9):1912-1914.
 215. Bae JS, Yang L, Rezaie AR. Receptors of the protein C activation and activated protein C signaling pathways are colocalized in lipid rafts of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(8):2867-2872.
 216. Shimizu T, Nishihira J, Watanabe H, Abe R, Honda A, Ishibashi T et al. Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells. *J Biol Chem* 2004;279(14):13729-13737.
 217. Ko FN, Yang YC, Huang SC, Ou JT. Coagulation factor Xa stimulates platelet-derived growth factor release and mitogenesis in cultured vascular smooth muscle cells of rat. *J Clin Invest* 1996;98(6):1493-1501.
 218. Hung DT, Wong YH, Vu TK, Coughlin SR. The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 1992;267(29):20831-20834.
 219. Kanthou C, Kanse SM, Kakkar VV, Benzakour O. Involvement of pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins in alpha-thrombin signalling on cultured human vascular smooth muscle cells. *Cell Signal* 1996;8(1):59-66.
 220. Swift S, Sheridan PJ, Covic L, Kuliopulos A. PAR 1 thrombin receptor-G protein interactions. Separation of binding and coupling determinants in the galpha subunit. *J Biol Chem* 2000;275(4):2627-2635.
 221. Schultheiss M, Neumcke B, Richter HP. Endogenous trypsin receptors in *Xenopus* oocytes: linkage to internal calcium stores. *Cell Mol Life Sci* 1997;53(10):842-849.
-

222. Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(20):9208-9212.
223. Offermanns S, Schultz G. What are the functions of the pertussis toxin-insensitive G proteins G12, G13 and Gz? *Mol Cell Endocrinol* 1994;100(1-2):71-74.
224. Aragay AM, Collins LR, Post GR, Watson AJ, Feramisco JR, Brown JH et al. G12 requirement for thrombin-stimulated gene expression and DNA synthesis in 1321N1 astrocytoma cells. *J Biol Chem* 1995;270(34):20073-20077.
225. Cocks TM, Moffatt JD. Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends Pharmacol Sci* 2000;21(3):103-108.
226. Baffy G, Yang L, Raj S, Manning DR, Williamson JR. G protein coupling to the thrombin receptor in Chinese hamster lung fibroblasts. *J Biol Chem* 1994;269(11):8483-8487.
227. Benka ML, Lee M, Wang GR, Buckman S, Burlacu A, Cole L et al. The thrombin receptor in human platelets is coupled to a GTP binding protein of the G alpha q family. *FEBS Lett* 1995;363(1-2):49-52.
228. Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI. Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* 1997;389(6647):183-186.
229. Ogino Y, Tanaka K, Shimizu N. Direct evidence for two distinct G proteins coupling with thrombin receptors in human neuroblastoma SH-EP cells. *Eur J Pharmacol* 1996;316(1):105-109.
230. Sahai E, Ishizaki T, Narumiya S, Treisman R. Transformation mediated by RhoA requires activity of ROCK kinases. *Curr Biol* 1999;9(3):136-145.

8 Anhang

8.1 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der – Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis – niedergelegt sind, eingehalten.“

Gundelsheim, den 03.02.2008

Kludia Blödorn

8.2 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Borggreffe, der mir ermöglicht hat, an der von ihm geleiteten I. Medizinischen Klinik der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg, meine Promotionsarbeit anzufertigen.

Besonders möchte ich mich bei Frau PD Dr. Martina Brückmann bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Promotionsarbeit neben meiner Tätigkeit als praktische Tierärztin anzufertigen, und die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Volker Liebe für sein unermüdliches Engagement, mit mir das Thema meiner Promotionsarbeit zu erarbeiten.

Bedanken für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich ebenfalls beim Institut für Pharmakologie und Toxikologie Mannheim der Universität Heidelberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Wieland.

Für die hilfreiche praktische sowie theoretische Unterstützung dieser Arbeit möchte ich mich ebenfalls bei Frau Dr. Susanne Lutz bedanken.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Roth, der sich nicht scheute, mich als Doktorandin zu betreuen und mir immer sehr freundlich und hilfsbereit zur Seite stand.

Ebenfalls danken möchte ich auch Herrn Dr. Siegfried Lang, der mich bei der Durchführung der Experimente tatkräftig unterstützt hat.

Mein herzlicher Dank gilt auch den beiden medizinisch bzw. biologisch technischen Assistenten, Frau Claudia Liebetrau sowie Herr Joachim Schmidt, die eine hervorragende Hilfe bei der Arbeit im Labor waren.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Vorgängerin Frau Dr. Adriane Schulze Nahrup für die vielen hilfreichen Informationen.

Ein herzliches Dankeschön für die wunderbare Zusammenarbeit an meine lieben Kolleginnen Caro und Xenia.

Vielen Dank an Arnd, der immer für mich da war.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meinen Eltern für die vorbehaltlose Unterstützung in jeder Hinsicht.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5274-9



9 17 8 3 8 3 5 11 9 5 2 7 4 4 1