



Expression und Funktion von P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) in humanen glatten Gefäßmuskelzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Daniela Bein

aus Solingen

Düsseldorf 2010

aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karsten Schrör
Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Januar 2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	12
2.1 Substanzen	12
2.2 Puffer und Lösungen	13
2.3 Antikörper	16
2.4 Synthetische Oligonukleotide	17
2.5 Geräte und Materialien	18
2.6 Zellkultur	19
2.6.1 Isolierung und Kultivierung humaner glatter Gefäßmuskelzellen	19
2.6.2 Kultivierung der monozytären Zelllinie U937	19
2.6.3 Kultivierung humaner embryonaler Nierenzellen	20
2.7 Zell-Vitaltest	20
2.8 Präparation, Analyse und Quantifizierung von Ribonukleinsäure	20
2.9 Polymerase-Kettenreaktion	21
2.9.1 Durchführung der semiquantitativen reversen Transkriptase-PCR	21
2.9.2 Analyse und Aufreinigung des reversen Transkriptase-PCR-Fragments	22
2.9.3 Die TaqMan®-Technologie	22
2.9.4 Durchführung der <i>realtime</i> PCR	22
2.10 Klonierung von humanem PSGL-1 in pBluescriptSK	23
2.11 Transformation der Ligationsprodukte in <i>E. coli</i>	24
2.11.1 Herstellung kompetenter <i>E. colis</i>	24
2.11.2 Transformation	25
2.12 DNA Plasmid-Präparation	25
2.12.1 DNA-Mini-Plasmid-Präparation	25
2.12.2 Restriktionsanalyse der Mini-Plasmid-Präparation	25
2.12.3 DNA-Midi-Plasmid-Präparation	26
2.12.4 Sequenzierung	26
2.13 Western-Blot	26
2.13.1 Herstellung von Proteinextrakten	26
2.13.2 Auftrennung der Proteine	26
2.13.3 Transfer der Proteine auf eine Membran/Semi-Dry-Western-Blot	27
2.13.4 Detektion und Visualisierung der Proteine	27
2.13.5 <i>Strippen</i> der Membran	28
2.13.6 Amidoschwarz-Färbung der Membran	28

2.14 Lentivirale Überexpression von PSGL-1 in SMC	28
2.14.1 Das Drei-Plasmid-System	28
2.14.2 Produktion der Lentiviren in HEK 293-Zellen	29
2.14.3 Bestimmung des Virustiter	29
2.14.4 Transduktion der SMC	30
2.14.5 Überprüfung der Transduktionseffizienz	30
2.15 Durchflusszytometrie	30
2.15.1 Extrazelluläre Markierung mit flurochromkonjugierten Antikörpern	31
2.15.2 Durchflusszytometrische Messung	31
2.16 Immunfluoreszenzmikroskopie	31
2.17 Statistik	32
3 Ergebnisse	33
3.1 Expression von PSGL-1 in SMC	33
3.1.1 Basale Expression der PSGL-1-mRNA in SMC	33
3.1.2 Expression von PSGL-1-Protein in SMC	34
3.2 Klonierung und Sequenzanalyse von humanen PSGL-1 aus venösen SMC	36
3.2.1 Klonierung von PSGL-1 in den Vektor pBluescriptSK	36
3.2.2 Sequenzanalyse von PSGL-1 aus SMC	36
3.3 Lentivirale Überexpression von PSGL-1 in SMC	39
3.3.1 Klonierung von PSGL-1 aus SMC in einen lentiviralen Expressionsvektor	39
3.3.2 Überprüfung der Transduktionseffizienz	40
3.3.3 Viabilität der SMC nach der Virus-Transduktion	41
3.3.4 Überprüfung der PSGL-1-mRNA-Expression	42
3.3.5 Überprüfung der PSGL-1-Protein-Expression	42
3.4 Untersuchungen zur Regulation von PSGL-1	44
3.4.1 Promotoranalyse von PSGL-1	44
3.4.2 Thrombin-induzierte PSGL-1-mRNA-Expression	44
3.4.3 Thrombin-induzierte PSGL-1-Protein-Expression	45
3.4.4 Einfluss von Thrombin-Rezeptor-aktivierenden Peptide auf die PSGL-1 Gen-Expression	47
3.4.5 Einfluss PAR-aktivierender Peptide auf die PSGL-1-Protein-Expression	48
3.4.6 Einfluss von PKC- und NFκB-Inhibitoren auf die Thrombin-induzierte PSGL-1- Expression	49
3.4.7 Einfluss von PKC- und NFκB-Inhibitoren auf die Thrombin-induzierte PSGL-1- Protein-Expression	50

3.5 Untersuchungen zur funktionellen Aktivität von PSGL-1	51
3.5.1 Überprüfung der PSGL-1-Oberflächen-Expression auf PSGL-1- überexprimierenden SMC	51
3.5.2 Überprüfung der funktionellen Domäne von PSGL-1 auf PSGL-1-überexprimierenden SMC mittels blockierendem Antikörper	52
3.5.3 Überprüfung der Bindung von PSGL-1 an seinen Interaktionspartner P-Selektin bei PSGL-1-überexprimierenden SMC	54
3.5.4 Thrombin-induzierte PSGL-1-Oberflächen-Expression	56
3.5.5 Überprüfung der PSGL-1/P-Selektin-Bindung an Thrombin-stimulierten SMC	57
3.5.6 Untersuchungen zur Lokalisation von PSGL-1 in Thrombin-stimulierten SMC	57
3.5.7 U 46619-induzierte Ausschleusung von PSGL-1 aus Thrombin-stimulierten SMC	60
4 Diskussion	64
5 Zusammenfassung	73
6 Summary	74
7 Literaturverzeichnis	75
8 Veröffentlichungen	82
9 Danksagung	83
10 Eidesstattliche Erklärung	84
11 Lebenslauf	85

Abkürzungsverzeichnis

ACD	<i>Acidic Citrate Dextrose</i>
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CMV	<i>human Cytomegalovirus</i>
CRD	<i>Carbohydrate Recognition Domain</i>
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxy-Ribonukleotidtriphosphate
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HEK	<i>human embryonic kidney cells</i>
HEPES	N-2-Hydroxyl-ethyl-piperazin-N'-ethansulfonsäure
HL	<i>Human Promyelocytic Leukemia Cells</i>
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
kb	Kilobasen
Le ^x	Lewissäure
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
Mn X	mittlere Fluoreszenzintensität
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MP	Mikropartikel
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NFκB	nuclear factor κB
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PAR-AP	PAR-aktivierendes Peptid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PSGL	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SFFV	<i>Spleen Focus-Forming Virus</i>
sLe ^x	Sialyl-Lewissäure
SMC	<i>smooth muscle cell</i> , glatte Gefäßmuskelzelle
SPN	Sialophorin
SQ 29,548	[1S-[1 α ,2 α (Z),3 α ,4 α]-7-[3-[[2-[(phenylamino)carbonyl]hydrazino]methyl]-7-oxabicyclo [2.2.1]hept-2-yl]-5-heptenoic acid
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCID ₅₀	<i>Tissue Culture Infective Dose 50</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TF	<i>tissue factor</i> , Gewebethromboplastin
TP	Thromboxan Rezeptor
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
Tyr-SO ₃	Tyrosinsulfat
TxA ₂	Thromboxan A ₂
U 46619	9,11-dideoxy-9 α ,11 α -methanoepoxy-prosta-5Z,13E-dien-1-oic acid
VSV-G	Vesikuläres Stomatitis Virus G-Protein

1 Einleitung

Glatte Gefäßmuskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) sind auf Grund ihrer Kontraktionsfähigkeit wichtige Regulatoren von Blutdruck und Organperfusion. In der Gefäßwand liegen über 90 % aller Gefäßmuskelzellen in einem kontraktilen Phänotyp vor, der für diese Funktionen erforderlich ist. Glatte Gefäßmuskeln können aber ihren Phänotyp auch in Richtung sekretorischer Zellen ändern. Durch verschiedene Stimuli wird diese phänotypische Modulation induziert, die ein Schlüsselereignis auch für die Entwicklung der Atherosklerose darstellt. Hier finden sich SMC des sekretorischen Typs vor allem in atherosklerotischen Plaques. Sie tragen nicht unwesentlich zu dessen Stabilität bei, sind aber auch Zellen, die aufgrund ihrer sekretorischen Leistungen zahlreiche Mediatoren freisetzen können. Hierzu gehören insbesondere prokoagulatorische und proinflammatorische Substanzen.

Die Atherosklerose ist eine chronisch-entzündliche Veränderung der Gefäßwand (Ross, 1999) und entwickelt sich im Laufe von Jahrzehnten. Sie hat zahlreiche Ursachen und führt am Ende nicht nur zu einer gestörten lokalen Durchblutung sondern auch zu einer erhöhten Gerinnungsneigung des Blutes. Klinisches Korrelat sind kardiovaskuläre Erkrankungen wie die koronare Herzerkrankung mit den akuten Komplikationen von Myokardischämie, Myokardinfarkt oder im schlimmsten Fall plötzlicher Herztod. Als initiales Ereignis bei der Entwicklung einer Atherosklerose wird eine endotheliale Dysfunktion angenommen, d.h. eine morphologisch und chemisch fassbare Störung der Endothelfunktion (Kelm & Strauer, 1999). Dabei wandelt sich das Endothel von einer Oberfläche, die vasodilatierende, antithrombotische, plättchenfunktionshemmende und profibrinolytische Faktoren freisetzt, in eine solche mit prothrombotischen, antifibrinolytischen und kontraktilen Eigenschaften. Mit anderen Worten, es kommt zum Verlust der endothelialen Schutzfunktion. Hinzu kommt eine erhöhte Endothelzellpermeabilität, erkennbar an der Transduktion von Makromolekülen und subendothelialer Migration von Monozyten und T-Zellen. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer entzündlichen Infiltration der Gefäßintima und –media mit Lipideinlagerung, Aktivierung und Proliferation von SMC und schließlich Bildung einer atherosklerotischen Plaque. Die Ausbildung einer fibrösen Kappe trennt das nekrotische Plauegewebe vom zirkulierenden Blut und verhindert eine Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten an den prokoagulatorischen Strukturen.

Läsionen atherosklerotischer Plaques mit nachfolgender Plaqueruptur initiieren die für akute Gefäßverschlüsse entscheidende Thrombinbildung und Plättchenaktivierung (Stary, 2000) (Abbildung 1-1). Zentraler Vorgang dabei ist die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade durch freigesetzten *tissue factor* (TF, CD 142, Gewebethromboplastin) aus Plaquematerial sowie zellulären Strukturen, insbesondere Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen. Dies bedeutet, dass im unmittelbaren zeitlichen Zusammenhang mit einer Plaqueruptur auch Thrombin gebildet und freigesetzt wird.

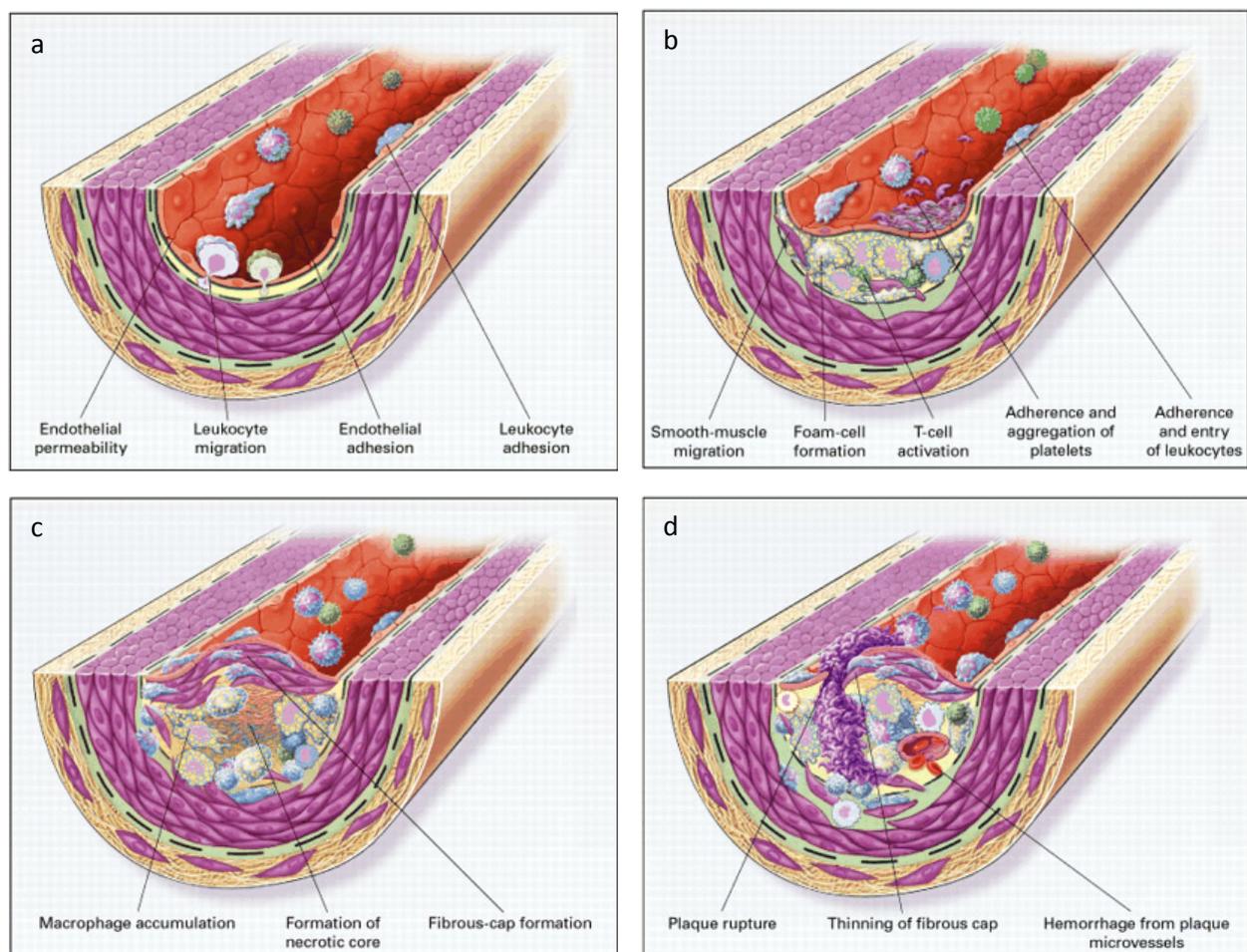


Abbildung 1-1 Ausbildung einer atherosklerotischen Plaque. (a) Eine beginnende endotheliale Dysfunktion führt zu ersten zellulären Ablagerungen auf dem Endothel. Die Permeabilität des Endothels für Lipoproteine ist erhöht und ermöglicht die Einwanderung und spätere Diapedese von Leukozyten. (b) Es kommt zur lokalen Akkumulation von Monozyten und aktivierten T-Lymphozyten, Lipidaufnahme und Ausbildung von Schaumzellen unter Bildung einer atherosklerotischen Plaque. SMC proliferieren und migrieren in die Plaque. (c) Die fibröse Kappe, welche die Plaque vom strömenden Blut trennt, schirmt deren nekrotischen Kern ab. (d) Rupturen an der fibrotischen Kappe initiieren die Thrombusbildung. (Ross, 1999, modifiziert)

Die SMC einer atherosklerotischen Plaque sind eine entscheidende Quelle nicht nur für TF sondern auch für die lokale Thrombinbildung (Bretschneider *et al.*, 2000). Am Anfang steht als unmittelbare Folge einer Endothelverletzung, z.B. im Plaquebereich, eine Interaktion von aktivem Faktor VII (FVIIa) mit TF. Dies führt zur Bildung von aktiviertem Faktor X (FXa), welcher aus Prothrombin kleine Mengen Thrombin (FIIa) bildet. Dieses Thrombin aktiviert über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) Thrombozyten, welche durch Bindung der Gerinnungsfaktoren V, VIII und XI an ihrer Oberfläche die Bildung größerer Thrombinmengen initiieren (Weber *et al.*, 2006). Dem Enzym Thrombin kommt hierbei sowohl bei koagulatorischen als auch entzündlichen bzw. Wundheilungsprozessen eine Schlüsselrolle zu (Schrör *et al.*, 2010). Letztere fanden im Gegensatz zu den koagulatorischen Thrombineffekten bisher wenig Beachtung, obwohl sie mindestens genauso bedeutsam sind. Schließlich ist durch die Bildung eines lokalen Thrombus zwar die Stelle der Gefäßwandverletzung abgedeckt und eine Blutung gestillt; zur Wiederherstellung der Blutversorgung ist jedoch eine Rekanalisierung des Thrombus durch Fibrinolyse erforderlich sowie die Einleitung von Reparaturprozessen um eine *restitutio ad integrum* zu erreichen. Es ist naheliegend, dass auch hierbei Thrombin eine Rolle spielt. Dies geschieht über Protease-aktivierte Rezeptoren (Coughlin, 2000, Trejo, 2003).

Von den PAR sind vier Subtypen bekannt: PAR1, PAR2, PAR3 und PAR4 (Vu *et al.*, 1991, Nystedt *et al.*, 1994, Ishihara *et al.*, 1997, Xu *et al.*, 1998). Mit Ausnahme von PAR2, welcher durch Trypsin aktiviert wird, werden alle anderen PAR durch Thrombin aktiviert. Die Mechanismen der Signaltransduktion wurden für PAR1 bisher am besten charakterisiert (Vu *et al.*, 1991). PAR1 bindet zur Signalweiterleitung an die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine. Dies hat die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (Coughlin, 2000) sowie des Transkriptionsfaktors NF κ B (*nuclear factor* κ B) zur Folge (Offermanns *et al.*, 1997). Alle PAR kommen sowohl in Endothelzellen als auch in SMC und in Thrombozyten vor. In Thrombozyten stellt die Aktivierung des PAR1 das stärkste Signal der Thrombozytenaktivierung dar. Ein weiterer potenter Thrombozyten-Aktivator ist das Thromboxan A₂ (TxA₂), welches hauptsächlich von den Thrombozyten selbst freigesetzt wird (FitzGerald *et al.*, 1987). Die Aktivierung der Thromboxan-Rezeptoren (TP), welche ebenfalls in Endothelzellen, SMC und Thrombozyten vorkommen, bewirkt eine synergistische Wirkung der Thrombin-induzierten Effekte (Paul *et al.*, 1999) (Abbildung 1-2). Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten sowie Endothelzellen und

SMC spielen sowohl für thrombotische und entzündliche Prozesse als auch für die natürliche Hämostase eine entscheidende Rolle (Siegel-Axel *et al.* 2006).

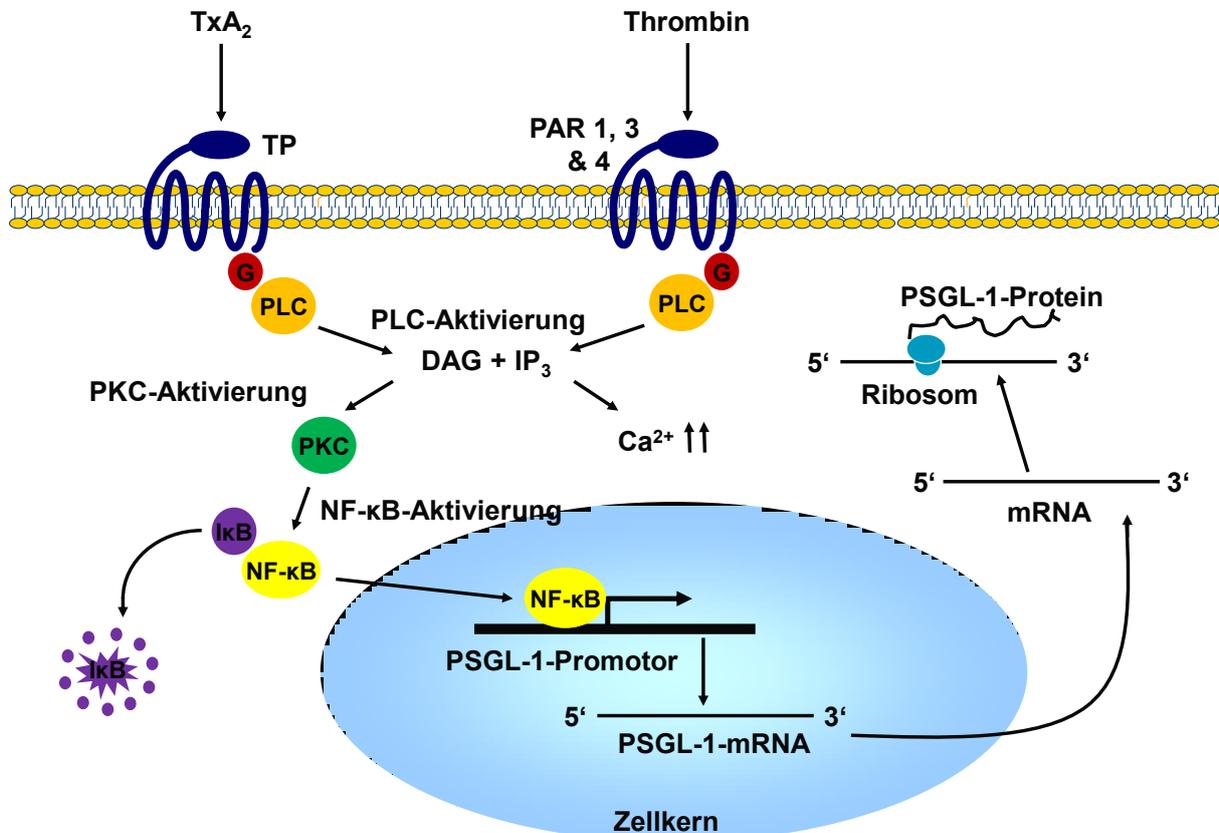


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung des Thrombin- und Thromboxan A₂ (TxA₂)-induzierten Signaltransduktionsweges. Sowohl die Thrombin-vermittelte Signalweiterleitung über PAR1, PAR3 und PAR4 als auch die TxA₂-vermittelte Signalweiterleitung über den Thromboxan-Rezeptor (TP) hat die Aktivierung der Phospholipase C (PLC), der Proteinkinase C (PKC) sowie von Transkriptionsfaktoren (z.B. nuclear factor κB, NFκB) zur Folge und resultiert in der Aktivierung spezifischer Gene. Die Aktivierung des Signalweges über die PAR und TP bewirkt eine synergistische Wirkung bei der Signalweiterleitung.

Die dazu erforderliche Adhäsion von Zellen an anderen Zelloberflächen wird durch eine Vielzahl von spezifischen Adhäsionsrezeptoren reguliert. Sowohl Leukozyten als auch Thrombozyten weisen membranständige Glykoproteine auf, welche die Interaktion von Thrombozyten untereinander, mit der subendothelialen Matrix, mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren und mit Endothelzellen oder Leukozyten vermitteln. Der Prozess der Leuko- und Thrombozytenadhäsion an verletzte Gefäßareale verläuft in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten und wird entscheidend über Selektine als Bindungspartner vermittelt: auf das erste Anhaften der Zellen

(*tethering*) folgt das Rollen (*rolling*) und schließlich die feste Adhäsion (*adhesion*) an die Gefäßwand (Frenette *et al.* 1998) (Abbildung 1-3).

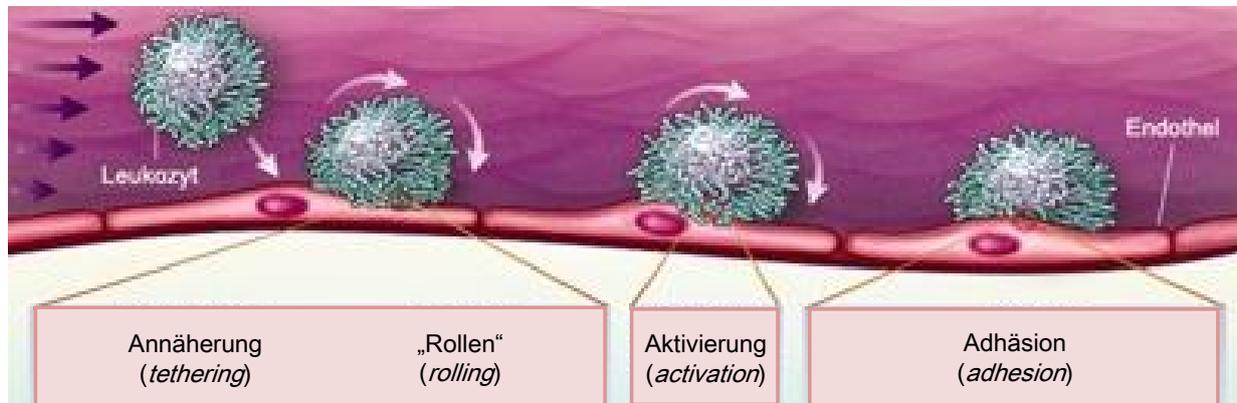


Abbildung 1-3 Der Annäherung bzw. dem Anhaften und dem Rollen von Leukozyten folgt deren Aktivierung und Bindung am Endothel. (Andrian *et al.*, 2000, modifiziert)

Selektine gehören zu der Familie der C-Typ Lektine. Das sind membrangebundene Proteine, die sowohl im vaskulären Endothel als auch in zirkulierenden Leukozyten exprimiert werden (Cummings, 1999). Selektine vermitteln den initialen lockeren Kontakt zwischen zirkulierenden Thrombozyten und dem Endothel (Subramaniam *et al.*, 1996). Alle Selektine sind Calcium (Ca^{2+})-abhängige Lektine, deren charakteristisches Merkmal eine hochkonservierte homologe Struktur in der Lektin- bzw. Kohlenhydraterkennungsdomäne (*Carbohydrate Recognition Domain*, CRD) am Amino(N)-Terminus ist, sowie eine übereinstimmende endotheliale Wachstumsfaktor (*Epidermal Growth Factor-like*, EGF-*like*)-ähnliche Domäne und eine Reihe von kurzen, sich wiederholenden regulatorischen Domänen, gefolgt von einer transmembranären und einer cytoplasmatischen Domäne (Abbildung 1-4). Bisher wurden drei verschiedene Selektine beschrieben: L(eukozytäres)-, E(ndotheliales)- und P(*latelet*, thrombozytäres)-Selektin. L-Selektin wird konstitutiv auf Leukozyten exprimiert und nach Aktivierung der Zellen von der Leukozytenoberfläche abgeschert. L-Selektin ist an der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen beteiligt. E-Selektin, das von zytokinaktivierten Endothelzellen exprimiert wird, vermittelt die Granulozytenadhäsion. P-Selektin wird konstitutiv in den α -Granula der Thrombozyten und in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert (Cummings, 1999). Auf der Oberfläche ruhender Endothelzellen und Thrombozyten wird P-Selektin nicht exprimiert (Furie *et al.*, 2004). Stimulation der Zellen führt jedoch zu einer raschen Freisetzung und Oberflächenexpression von P-Selektin auf beiden Zelltypen.

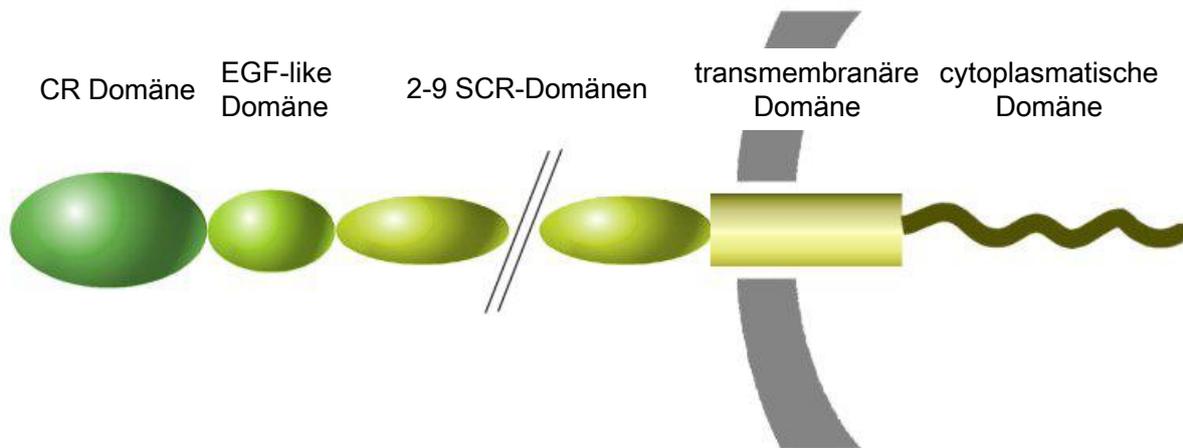


Abbildung 1-4 Die fünf Domänen der Selektine. (Quelle: sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/05H154/t2.pdf, modifiziert)

Der wichtigste Bindungspartner bzw. Rezeptor für P-Selektin ist P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1, CD 162) (Wilkins *et al.*, 1995) (Abbildung 1-5). PSGL-1 ist derzeit auch der am besten charakterisierte Selektin-Ligand: er bindet an alle drei bekannten Selektine, jedoch mit der höchsten Affinität an P-Selektin (Martins *et al.*, 2007). Die Interaktion von P-Selektin und PSGL-1 spielt eine zentrale Rolle bei der sekundären Hämostase und bei vaskulären Reparaturvorgängen und fördert die Anlagerung von Leukozyten an das Endothel. Eine Beteiligung von P-Selektin und PSGL-1 an Blutgerinnungsvorgängen wurde erstmals von Palabrica *et al.* (1992) gezeigt. 2003 untersuchten Falati *et al.* die über P-Selektin vermittelte Thrombusbildung und die Beteiligung von PSGL-1 *in vivo*. Hier vermittelt PSGL-1 durch Interaktion mit E- und P-Selektin das Rollen von Thrombozyten auf dem aktivierten Endothelmonolayer (Yang *et al.*, 1999). In einem Tiermodell wurde Wildtyp-, P-Selektin^{-/-}- und PSGL-1^{-/-}-Mäusen durch einen Laser eine Gefäßverletzung induziert und die Akkumulation von TF und Thrombozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie gemessen. Es kam bei den Wildtyp-Tieren nach der Gefäßverletzung zu einer schnellen Akkumulation von TF und Thrombozyten im Thrombus, bei den P-Selektin^{-/-}- und PSGL-1^{-/-}-Mäusen blieb diese weitgehend aus. Es kam jedoch zu einer Anheftung von Thrombozyten (Falati *et al.*, 2003). *Knock-out*-Mäuse, die ein unwirksames Gen für die PSGL-1-Codierung tragen, zeigten eine deutlich verspätete Reaktion auf entzündliche Prozesse sowie Neutrophilie und abnormes Leukozytenrollen (Yang *et al.*, 1999, Xia *et al.*, 2002). Die Infusion von Antikörpern gegen P-Selektin führte zu einer verringerten Fibrinablagerung im Thrombus. Die Interaktion von

PSGL-1 mit L-Selektin hingegen vermittelte das Anheften von Leukozyten an das aktivierte Endothel (Sperandio *et al.*, 2003).

PSGL-1 wurde erstmalig in neutrophilen Granulozyten und der myeloiden Zelllinie HL-60 als spezifischer Ligand von P-Selektin identifiziert (Moore *et al.*, 1992). Das humane PSGL-1 wird durch das *SELPLG*-Gen kodiert. Das Gen besteht aus einem Intron und 2 Exons, welche auf dem Chromosom 12q24 lokalisiert sind (Veldman *et al.*, 1995). Die gesamte kodierende Region ist auf Exon 2 lokalisiert. Mittlerweile ist bekannt, dass das *SELPLG*-Gen eine Vielzahl genetischer Polymorphismen aufweist. Verschiedene Arbeitsgruppen (Afshar-Kharghan *et al.*, 2001, Tregouet *et al.*, 2003, Barbaux *et al.*, 2010) haben diese untersucht und zahlreiche Varianten beschrieben.

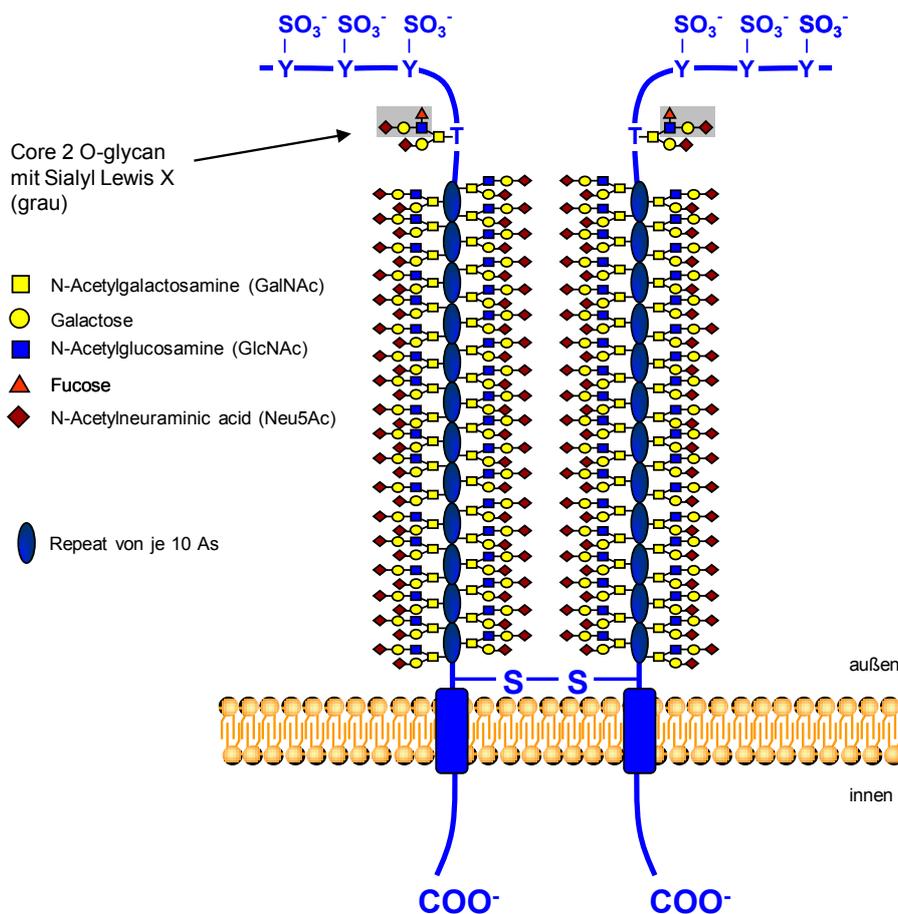


Abbildung 1-5 Proteinstruktur von PSGL-1. (Cummings, 1999, modifiziert)

PSGL-1 ist ein transmembranäres Typ-1-Protein variabler Länge. Es sind Formen mit 402 Aminosäuren (AS) (Sako *et al.*, 1993, Moore *et al.*, 1998) aus humanen promyelotischen HL-60-Zellen und 412 AS aus hämatopoetischen Zelllinien (Cummings *et al.*, 1999) beschrieben. Die Signalsequenz beider PSGL-1-Formen umfasst 18 AS und eine Schnittstelle aus einem Tetrapeptid (R-D-R-R, AS 38-41). Der N-Terminus des maturen Proteins beginnt somit bei AS 42 und bildet zusammen mit der Bindungsstelle für P-Selektin und den folgenden 15 bzw. 16 dekamerischen Repeats den extrazellulären Teil des Proteins (Sako *et al.*, 1993, Moore *et al.*, 1998, Cummings *et al.*, 1999). Ein einzelner Cysteinrest am Übergang zur transmembranären Domäne ist vermutlich für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich. Eine solche kovalente Dimerisierung von PSGL-1 ist jedoch nicht entscheidend für dessen Funktionalität. Substitution eines extrazellulären Cysteins gegen ein Alanin oder Serin führt nicht zu einer erkennbaren Beeinflussung der Bindungsaffinität zu P-Selektin. Vielmehr bildet das mutierte Protein nicht-kovalente dimere Proteine, die in der Lage sind immobilisiertes P-Selektin zu binden (Epperson *et al.*, 2000). Die hydrophobe transmembranäre Domäne von PSGL-1 umfasst 24 AS. Der cytoplasmatische Teil des Proteins besteht aus 70 AS. Jede der beiden extrazellulären PSGL-1-Domänen enthält 70 Serin- und Threoninreste, welche potentielle Zielstrukturen für O- und in Kombination mit Asparagin (Asn/X/Ser/Thr) für drei N-Glykosylierungen bieten. Die N-terminale Region beinhaltet die Bindungsstelle für die Selektine: an den Positionen 46, 48 und 51 gibt es sulfonierte Tyrosine (Sako *et al.*, 1993, Moore *et al.*, 1998, Cummings *et al.*, 1999, Smith *et al.*, 2004). Die räumliche Nähe dieser Sulfate, die an Tyrosinresten nahe der O-Glykosylierung mit einer core-2 (Gal β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc α 1-Ser/Thr)-verzweigten Sialyl-Lewissäure (sLe^x) vorkommen, ist entscheidend für die hohe Affinität der Interaktion zwischen PSGL-1 und seinen Bindungspartnern (Li *et al.*, 1996).

Anfänglich ging man davon aus, dass PSGL-1 auf Grund der vielen sLe^x-Antigene eine hohe Affinität zu P-Selektin aufweist (Norgard *et al.*, 1993). Die Expression von sLe^x allein ist aber nicht ausreichend für die Affinität der Bindung von PSGL-1 an seinen Interaktionspartner P-Selektin. Ausschlaggebend für die hohe Affinität sind vielmehr die sialylierten und fukosylierten core-2 O-Glykane (Li *et al.*, 1996) (Abbildung 1-6). Weitere Studien zeigten, dass zumindest eine Tyrosinsulfonierung an PSGL-1 erfolgen muss, um die Interaktion mit P-Selektin zu ermöglichen (Liu *et al.*, 1998, Rodgers *et al.*, 2001).

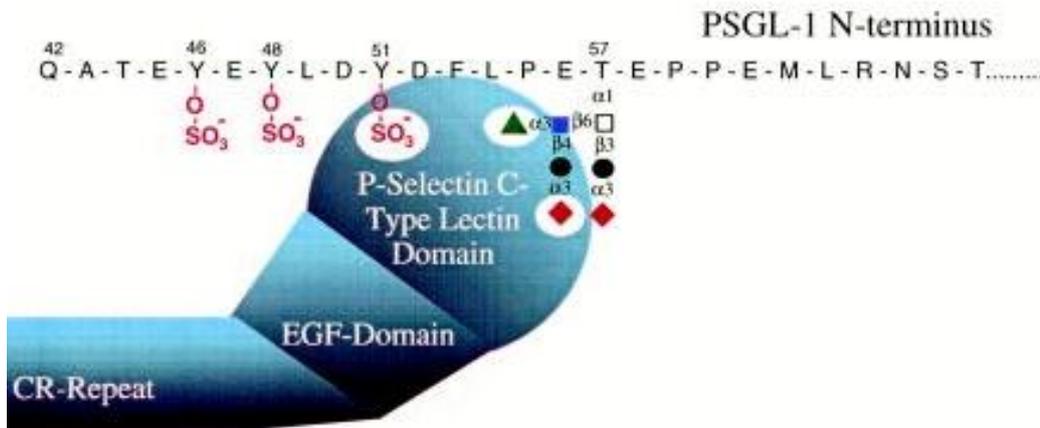


Abbildung 1-6 Interaktion zwischen der N-terminalen Domäne von PSGL-1 und humanem P-Selektin. Die Abbildung zeigt die funktionelle Region mit Tyrosinsulfatresten, Sialylsäure und den Fukoseresten des core-2 O-Glykans. (Cummings, 1999, modifiziert)

Zahlreiche Studien haben die Expression und Funktionalität von thrombozytärem und leukozytärem PSGL-1 untersucht. Dabei wurde u.a. gefunden, dass das Vorkommen von PSGL-1 keineswegs nur auf ein Transmembranprotein in diesen Zellen beschränkt ist. Insbesondere existiert PSGL-1 auch in löslicher Form (Croce *et al.*, 1998). Diese im Blut zirkulierende Variante ist vermutlich ein durch *shedding* entstandenes Produkt des nativen Transmembranproteins. Die dafür verantwortlichen Proteinasen sind bisher unbekannt, eine Beteiligung der β -Sekretase-1 wird vermutet (Lichtenthaler *et al.*, 2003).

Furie *et al.* (2004) diskutierten die Rolle von Mikropartikel (MP)-gebundenem PSGL-1, welches zusammen mit TF auf leukozytären MP vorkommt. Diese im Blut zirkulierenden MP tragen maßgeblich zur Akkumulation von PSGL-1 in nach Gefäßverletzung entstandenen Thromben bei. Dabei kommt es zur Konzentration von TF auf der Seite der Gefäßverletzung und Initiierung der Blutgerinnungskaskade.

Martins *et al.* (2007) zeigten neben der PSGL-1-mRNA- und -Protein-Expression auch dessen funktionelle Aktivität in humanen venösen und mikrovaskulären Endothelzellen von Gefäßen in der Vorhaut. Auch die Expression von PSGL-1 in der Endothelschicht von atherosklerotischen Koronararterien ist bekannt (Martins *et al.*, 2007) und seine Beteiligung an der Ausbildung entzündlicher Infiltrate bei diesen Läsionen wird vermutet. Diese Resultate lassen auf weitere Wirkungen von Selektinen und deren Liganden für die Entstehung von inflammatorischen Prozessen und/oder atherosklerotischen Veränderungen der Gefäßwand schließen.

Bis heute gibt es keine publizierten Daten zur PSGL-1-Expression in SMC. Die Expression von funktionell aktivem PSGL-1 in SMC könnten jedoch ebenfalls eine wichtige Rolle bei Entzündungsvorgängen spielen, z.B. im Zusammenhang mit dem Rollen und der Adhäsion von Monozyten und aktivierten Thrombozyten. Dies gilt vor allem dann, wenn z.B. nach Gefäßwandverletzung oder Plaqueruptur SMC in direkten Kontakt mit dem strömenden Blut kommen. Unter solchen Bedingungen könnte eine PSGL-1-Expression in SMC lokale Entzündungsvorgänge initiieren und unterhalten. Dies gilt auch für die Bildung atherosklerotischer Plaques. Ein weiterer Aspekt ist die Thrombose. Auch diese Folge einer Gefäßwandverletzung könnte durch PSGL-1 aus SMC nach Bindung von P-Selektin eingeleitet und gefördert werden, mit der Konsequenz der Adhäsion von zirkulierenden Leukozyten und/oder aktivierten Thrombozyten. Auf Grund der engen Verknüpfung dieser Vorgänge mit der lokalen Bildung und Wirkung von Thrombin wäre es auch wichtig zu wissen, ob Thrombin eine mögliche Expression von PSGL-1 in SMC reguliert. Dass Thrombin als ein die Plättchensekretion stimulierendes Agens auch die Freisetzung von P-Selektin fördert, ist seit langem bekannt (Ryan & Worthington, 1992). Auch führt Thrombin in SMC aus Koronararterien zu einer transkriptionellen Aufregulation von Thromboxanrezeptoren (Zucker *et al.*, 1998). Außerdem beeinflusst Thrombin auch die Funktion von SMC, insbesondere die sekretorischen Leistungen, wobei SMC auch selbst in der Lage sind Thrombin in erheblichen Mengen zu bilden und freizusetzen (Bretschneider *et al.*, 2000). Mehr als 95 % des Thrombins wird nach Abschluss der primären Gerinnungsvorgänge gebildet. Dies spricht ebenfalls für eine Beteiligung von Thrombin an postkoagulatorischen Vorgängen, wie z.B. den Reparaturprozessen der Gefäßwand nach Gefäßverletzung (Schrör *et al.*, 2010). Es ist naheliegend, dass bei diesen Vorgängen auch P-Selektin und seine Bindungspartner an der Gefäßwand, hier PSGL-1 auf glatten Muskelzellen, eine Rolle spielen können.

In der hier vorgelegten Arbeit wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Nachweis und Charakterisierung von PSGL-1 in SMC auf Gen- und Proteinebene
2. Virale Überexpression von PSGL-1 als Modell zum Studium von P-Selektin/PSGL-1-Interaktionen in SMC
3. Regulation der Expression von PSGL-1 in SMC unter prokoagulatorischen Bedingungen, hier nach Stimulation durch Thrombin
4. Funktionelle Charakterisierung von PSGL-1 in SMC

Als Referenzmodell für funktionell aktives PSGL-1 wurde eine Monozyten-Zelllinie (U937) gewählt. Frühere Arbeiten aus unserem Labor hatten gezeigt, dass diese Zellen massiv PSGL-1 exprimieren und dieses PSGL-1 für die Adhäsion der Monozyten an z.B. Endothelzellen essentiell ist (Stampfuss *et al.*, 2008).

2 Material und Methoden

2.1 Substanzen

Tabelle 2-1 Verwendete Substanzen und Komplettpakete

Substanzen	Hersteller
Calcein-AM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Calphostin c-Inhibitor	Enzo Lifescience GmbH, Lörrach
ECL advance	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
NFκB-Inhibitor	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
PAR-aktivierende Peptide (1, 3 und 4)	Biosynton, Berlin
rekombinantes, humanes P-Selektin	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Qiagen® OneStep RT-PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Restriktionsenzyme	Fermentas Life Sciences, Leon-Rot
Silika-Matrix (S5631)	Sigma-Aldrich, München
SQ 29,548	Cayman Chemical, USA
T4-DNA Ligase	Fermentas Life Sciences, Leon-Rot
TaqMan® Gene Expression Assays (Hs00356602_m1 (PSGL-1) und Hs99999905_m1 (GAPDH))	Applied Biosystems, Darmstadt
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
humanes α-Thrombin	American Diagnostica Inc., Stamford, CT, USA
Tri-Reagent	Sigma-Aldrich, München
U 46619	Cayman Chemical, USA

2.2 Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

Tabelle 2-2 *Verwendete Puffer und Lösungen*

Puffer bzw. Lösungen	Zusammensetzung
ACD (<i>Acidic Citrate Dextrose</i>)	85 mM Trisnatriumcitrat 65 mM Zitronensäure 111 mM Glukose
Amidoschwarz-Lösung	0,1 % Amidoschwarz 25 % Isopropanol 10 % Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärbelösung	25 % Isopropanol 10 % Essigsäure
Blaumarker (DNA-Elektrophorese)	30 % Glycerin in H ₂ O 0,05 % Xylencyanol
EDTA-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,5 150 mM NaCl 25 mM EDTA 1 g / l BSA
Fixierlösung (Röntgenfilm)	1 % Kaliumdisulfit 20 % Natriumthiosulfat x 5 H ₂ O
1 x Lämmli-Puffer (Laemmli, 1970)	62,5 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,0 50 mM DL-Dithiothreitol 10 % Glycerin 2 % SDS 0,001 % Bromphenolblau

1 x Laufpuffer (Western Blot)	190 mM Glycin 25 mM Tris, pH 8,8 0,1 % (v/v) SDS
LB-Agar	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 5 g NaCl 2% Agar ad 1 l H ₂ O
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O
Lösung I (Miniplasmid-Präparation)	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM EDTA
Lösung II (Miniplasmid-Präparation)	0,2 M NaOH 1,0 % SDS
Lösung III (Miniplasmid-Präparation)	2,55 M Kaliumacetat, pH 4,8
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,3 mM Na ₂ HPO ₄
50 x TAE-Puffer	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA ad 1 l H ₂ O

TB-Puffer	10 mM Hepes 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl 55 mM MnCl ₂
TBS	10 mM Tris/HCl, pH 7,4 150 mM NaCl
TBS-T	TBS 0,1 % (v/v) Tween™20
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM EDTA
Transferpuffer (Western Blot)	190 mM Glycin 25 mM Tris, pH 8,5 20 % (v/v) Methanol
Waschpuffer (Silika-Matrix)	50 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 2,5 mM EDTA 50 % EtOH

2.3 Antikörper

Tabelle 2-3 Im Immunoblot verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-PSGL-1 (KPL1, monoklonal) (Kat.-Nr. 556052)	BD Biosciences, Heidelberg	1:1000
Anti-PSGL-1 (KPL2, polyklonal) (Kat.-Nr. sc-18856)	Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, CA, USA	1:1000
Anti-PSGL-1 (H300, polyklonal) (Kat.-Nr. sc-20929)	Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, CA, USA	1:1000
Anti- β -Actin (monoklonal)	Sigma-Aldrich, München	1:10000

Tabelle 2-4 Im Immunoblot verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus IgG HRP (Wirt: Ziege, monoklonal)	Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, CA, USA	1:25000 (1:3000 für β -Actin)
Anti-Hase IgG HRP (Wirt: Ziege, monoklonal)	Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, CA, USA	1:25000

Tabelle 2-5 Zur Immunfluoreszenz eingesetzte Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-human PSGL-1-PE, CD 162	BD Biosciences	1:10
IgG1(Mouse)-PE	Beckman Coulter	1:10

2.4 Synthetische Oligonukleotide

Alle genutzten synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen.

Tabelle 2-6 Synthetische Oligonukleotide

Primer Name	Primer-Sequenz (5' nach 3')	Ziel (PSGL-1, # bzgl. ATG mit A=1)	Fragmentlänge (bp)
PSGL1 forward	GCGTGGGCTGGGACCTTGTC	-99 - -74	600
PSGL1 reverse	CGTGGCTGCTGGTGGAGTGG	507 - 488	
PSGL1 upstream	CCACTCCACCAGCAGCCACG	488 - 507	918
PSGL1 downstream	GGTTTCTCCACTTGCCCGTC	1406 - 1387	
XhoI PSGL1	AAA <u>ACTCGAG</u> CGGGACTGCCGCAG GGGGTG	-131 - -112	2110 und 1536
BamHI PSGL1	AAAAG <u>GATCC</u> CGCCTGCACTGGACCT GCAGT	1980 - 1961	

Schnittstellen innerhalb der Oligonukleotide:

Restriktionsenzyme	Basensequenz
BamHI	GGATCC
XhoI	CTCGAG

2.5 Geräte und Materialien

Tabelle 2-7 Verwendete Geräte und Materialien

Geräte und Materialien	Bezeichnung	Hersteller
Blot-Papier	Whatman-Papier	Schleicher und Schuell, Maidstone, England
Densitometer, Scanner	Molecular Imager GS-800 Calibrated Densitometer Quantity One® Version 4.4.1	Umax Systems GmbH, Willich BioRad, München
Gradienten-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
MilliQ	MilliQ® BioceI™	Millipore SAS, Frankreich
Mikroskop	Olympus IX50 und Olympus CK2	Olympus Optical Co. LTD., Japan
Photometer	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PVDF Western Blotting Membranes	Immobilon-P Roche	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Realtime PCR-Maschine	7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterilbank	LaminAir HLB 2448 GS	Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Sonifier® B-12	Branson Sonic Power Company, Danbury, CT, USA
UV-Licht-Gerät	Olympus U-RFL-T	Olympus Optical Co. LTD., Japan
Zellzählgerät	Countess™ Automated Cell Counter	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Zentrifuge	J2-HS Centrifuge Minifuge GL	Beckman Coulter, Krefeld Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf

2.6 Zellkultur

Die verwendeten Zellkulturmedien wurden von Gibco BRL Life Technologies (Invitrogen, Karlsruhe), die Zellkulturgefäße von den Firmen Becton-Dickinson (Heidelberg) und Greiner (Solingen) bezogen.

2.6.1 Isolierung und Kultivierung humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Die mittels Explant-Technik (Fallier-Becker & Rupp, 1990) aus der humanen *Vena saphena* isolierten glatten Gefäßmuskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) wurden als Monoschichtkulturen in SMC-Kulturmedium (Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit Zusatz von 1 x konzentrierten nicht essentiellen Aminosäuren, 200 mM L-Glutamin, 100 U / ml Penicillin G und 100 µg / ml Streptomycin, 100 mM Natrium-Pyruvat und 10 % fetalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS)) bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ (Heraeus CO₂-Auto-Zero, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) kultiviert. Im Abstand von 2-4 Tagen wurden Konfluenz und Morphologie der Zellen im Inversmikroskop (Olympus CK2) kontrolliert. Konfluente Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS mittels Trypsin/EDTA abgelöst (0,05 % / 0,5 mM) und passagiert. Die Versuche wurden mit den Passagen 4-10 durchgeführt.

Vor den jeweiligen Experimenten wurden die Zellen, soweit nicht anders vermerkt, zweimal mit PBS gewaschen und für zweimal 24 h in serumfreiem SMC-Kulturmedium inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der verschiedenen Stimuli in den angegebenen Konzentrationen und für die angegebenen Zeiten.

2.6.2 Kultivierung der monozytären Zelllinie U937

Die Kultivierung der U937-Zellen (1593, ATCC, LGC Promochem, Wesel) erfolgte in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Glutamax Medium, supplementiert mit 100 U / ml Penicillin G, 100 µg / ml Streptomycin und 10 % FCS. Die Suspensionszellen wurden bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Vor Experimenten wurden die Zellen fünf Minuten bei 1500 x g pelletiert.

2.6.3 Kultivierung humaner embryonaler Nierenzellen

Adhärenente humane embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*, HEK 293, ATCC, LGC Promochem, Wesel) wurden in DMEM mit Zusatz von 100 U / ml Penicillin G und 100 µg / ml Streptomycin und 10 % FCS zuzüglich 4,5 g / l Glukose kultiviert. Die Inkubationsbedingungen stimmten mit denen der SMC (siehe 2.6.1) überein.

2.7 Zell-Vitaltest

Die Überlebensrate der Zellen wurde an einem Zellzählgerät (Invitrogen, Karlsruhe) mittels Trypanblau-Färbung überprüft. Adhärenente Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS mit Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,5 mM) abgelöst, fünf Minuten bei 1500 x g pelletiert und mit Trypanblau im Verhältnis 1:2 gemischt. Im Zellzählgerät wurde der Anteil der vitalen Zellen nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \text{lebende Zellen} / (\text{tote Zellen} + \text{lebende Zellen}) * 100$$

2.8 Präparation, Analyse und Quantifizierung von Ribonukleinsäure

Die Präparation von Gesamt-Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) aus den Zellen erfolgte mittels TriReagent®. Es wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren. Die Präparation erfolgte in der Regel aus 6-Loch-Platten. Die so erhaltene RNA wurde in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm in einem Nanodrop-1000 (Pepqlab, Erlangen) photometrisch bestimmt.

2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird genutzt, um aus einem einzelnen Nukleinsäureabschnitt unter optimalen Bedingungen *in vitro* bis zu 10^{11} identische Moleküle zu synthetisieren.

2.9.1 Durchführung der semiquantitativen reversen Transkriptase-PCR

In der „*one-step*“ reversen Transkriptase (RT)-PCR wird die als Matrize eingesetzte mRNA zunächst mit genspezifischen Primern in cDNA umgeschrieben. Es schließt im selben Ansatz eine PCR mit denselben genspezifischen Primern an, um den synthetisierten cDNA-Abschnitt zu amplifizieren.

Die RT-PCR wurde unter Verwendung des OneStep RT-PCR Kit von Qiagen (Hilden) durchgeführt. Als interner Standard wurde die Expression des *housekeeping*-Gens GAPDH verwendet.

RT-PCR-Ansatz:

250 ng RNA
 0,6 μ M upstream Primer: XhoI PSGL-1 (Stock 20 μ M)
 0,6 μ M downstream Primer: BamHI PSGL-1 1545 (Stock 20 μ M)
 1 x Q-Solution (5 x konzentriert)
 1 x Puffer (5 x konzentriert)
 0,4 mM dNTP-Mix (10 mM)
 1 x Enzym-Mix (25 x konzentriert)
 H₂O ad 50 μ l

Die RT-PCR-Bedingungen waren wie folgt:

Ablauf der reversen Transkriptase Reaktion	50 °C 30 min	
Aktivierung der Taq-Polymerase	95 °C 15 min	
Denaturierung der doppelsträngigen DNA	95 °C 1 min	} 33 Zyklen
<i>Annealing</i> / Hybridisierung der Primer	56 °C 1 min	
Synthese / Verlängerung der Kette	72 °C 2 min	
finale Synthese	72 °C 15min	

2.9.2 Analyse und Aufreinigung des RT-PCR-Fragments

Die RT-PCR-Proben wurden mit 1 x Blaumarker versetzt und in ethidiumbromidhaltigen, horizontalen 1 x TAE-Agarosegelen (0,8 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht (GelDoc XR, BioRad, München) aus dem TAE-Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden mit 1 ml Natriumiodid (6 Molar) und 30 µl Silika-Matrix (Glasmilch) 5 min bei 50 °C inkubiert und daraufhin 30 sec abzentrifugiert. Die Silika-Matrix wurde zweimal in 1 ml Waschpuffer gewaschen und dann in 20 µl TE resuspendiert. Nach erneuter 3-minütiger Inkubation bei 50 °C und Pelletierung befand sich die DNA im Überstand. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.9.3 Die TaqMan®-Technologie

Die TaqMan®-Technologie zeichnet sich durch eine spezifische Detektion der PCR-Produkte aus. Eine fluoreszenzmarkierte Sonde (20-30 Nukleotide), eingerahmt von zwei genspezifischen Primern, bindet an die zu amplifizierende Sequenz. Der fluoreszierende Reporterfarbstoff (z.B. FAM, 6-Carboxyfluorescein) ist kovalent an das 5'-Ende der Sonde geknüpft. Die Fluoreszenz dieses Farbstoffes wird durch einen Quencher (z.B. TAMRA, 6-Carboxytetramethylrhodamin) am 3'-Ende der Sonde unterdrückt. Trifft die Ampli-Taq-DNA-Polymerase während der Extensionsphase auf die spezifisch gebundene Sonde, so hydrolysiert die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase die Sonde und trennt Reporter- von Quencherfarbstoff. Unspezifisch gebundene Sonden werden nicht hydrolysiert, sondern verdrängt und führen zu keinem Fluoreszenzsignal.

2.9.4 Durchführung der *realtime* PCR

Die *realtime* PCR wurde in einem Zweischnitt-Protokoll durchgeführt. Im ersten Schritt wurde aus 1 µg RNA cDNA (*complementary* DNA) nach Angaben des Herstellers (High Capacity cDNA Archive Kit, Applied Biosystems, Darmstadt) synthetisiert. Die Synthese erfolgte in einem Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg).

Im zweiten Schritt erfolgte die PCR mit 20 ng cDNA im *realtime* PCR system 7300 (Applied Biosystems, Darmstadt). Die PCR wurde mit den TaqMan®-Assays Hs00356602_m1 (humanes PSGL-1) sowie Hs99999905_m1 (humane GAPDH, endogene Kontrolle) und TaqMan® Universal

PCR Master Mix durchgeführt. Alle Produkte wurden von Applied Biosystems, Darmstadt, bezogen. Die Daten wurden mittels Sequence Detection Software Version 1.2.3 erfasst.

Die Reaktionsansätze der PCR zur Amplifikation des DNA-Abschnittes setzen sich zusammen aus je:

10 µl Master Mix
 1 µl Taq-Man®-Assay (GAPDH oder PSGL-1)
 9 µl Probe

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

50 °C 2 min
 95 °C 10 min
 95 °C 15 sec } 40 Zyklen
 60 °C 60 sec }

2.10 Klonierung von humanem PSGL-1 in pBluescriptSK

Der gewählte pBluescriptSK-Vektor enthält das lacZ-Gen zur Blau-Weiß-Selektion und ein Ampicillin-Resistenz-Gen zur Antibiotika-Selektion erfolgreicher Transformanten.

Zuerst wurden sowohl das mittels RT-PCR (siehe 2.9.1) gewonnene DNA-Fragment (PSGL-1) als auch der Vektor (pBluescriptSK) mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI 1 h bei 37 °C verdaut.

Schneide-/Verdauansatz:

DNA-Fragment (PSGL-1) aus		pBluescriptSK	5 µg
RT-PCR-Ansatz			
10 x Puffer (Tango)	10 µl	10 x Puffer (Tango)	10 µl
XhoI (10 U / ml)	0,2 µl	XhoI (10 U / ml)	0,2 µl
BamHI (10 U / ml)	0,2 µl	BamHI (10 U / ml)	0,2 µl
H ₂ O ad 50 µl		H ₂ O ad 50 µl	

Daraufhin erfolgte die Auftrennung der Fragmente über ein TAE-gepuffertes Agarosegel (0,8 %) und deren Aufreinigung (siehe auch 2.9.2). Eluiert wurden die Fragmente in 20 µl TE-Puffer. Anschließend wurden DNA-Fragment und Vektor bei 15 °C über Nacht ligiert. Zwei weitere Ligationsansätze, von denen einer nur den Vektor enthielt und der andere den Vektor und die T4-Ligase, wurden zur Kontrolle durchgeführt.

Ligationsansätze á 20 µl:

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
pBluescript (geschnitten)	2 µl	2 µl	2 µl
PSGL-1-Fragment (geschnitten)	-	-	4 µl
T4-DNA Ligase	-	1 µl	1 µl
10 x Ligase Puffer	2 µl	2 µl	2 µl
H ₂ O	16 µl	15 µl	11 µl

2.11 Transformation der Ligationsprodukte in *E. coli*

2.11.1 Herstellung kompetenter *E. coli*s

E. coli (*Escherichia coli*) Bakterien wurden mit Calciumchlorid transformationskompetent gemacht. Durch den Überschuss an Calcium-Ionen wird die Permeabilität der Zellmembran erhöht und somit die Aufnahmefähigkeit der Zellen für Fremd-DNA gesteigert. Mit einer Kolonie des *E. coli* DH 10 B-Stammes wurde zunächst eine Vorkultur, daraus dann am Folgetag eine Hauptkultur in LB-Medium angeimpft. Nach Inkubation der Hauptkultur bei 37 °C für 3-4 Stunden wurden die Bakterien zehn Minuten bei 2300 x g sedimentiert. Das Bakterienpellet wurde in vorerst 1 ml TB-Puffer resuspendiert und dann wurden weitere 19 ml TB-Puffer hinzugegeben. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien für zehn Minuten bei 1500 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 3,5 ml TB-Puffer mit 280 µl DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert, für weitere zehn Minuten auf Eis inkubiert, á 200 µl aliquotiert und bei -80° C bis zur Verwendung gelagert.

2.11.2 Transformation

Pro Ligationsansatz wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen benötigt. Die Ligationsansätze 1-3 (siehe 2.10) wurden auf Eis zu den kompetenten Zellen pipettiert. Nach drei Minuten wurden die Ansätze einmal gemischt und für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein kurzer Hitzeschock (37 °C, 30 sec). Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Zellen für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Alle Ligationsansätze wurden fünf Minuten bei 3300 x g abzentrifugiert und in 50 µl LB-Medium resuspendiert. Der gesamte resuspendierte Ligationsansatz wurde auf ampicillinhaltige (100 µg / ml) Agarplatten mit X-Gal (40 µg / ml) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten bei 37 °C über Nacht erfolgte am nächsten Tag die Blau-Weiß-Selektion.

2.12 DNA Plasmid-Präparation

2.12.1 DNA-Mini-Plasmid-Präparation

Die Isolation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse wurde nach der Methode von Birnboim (Birnboim, 1983) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente eine am Vortag aus einer einzelnen Kolonie angeimpfte *E. coli*-Kultur, die bei 37 °C über Nacht in einem ampicillinhaltigen (100 µg / ml) LB-Medium inkubierte. Als nächstes wurden die Bakterienkulturen zehn Minuten bei 2300 x g zentrifugiert und die Zellpellets in 300 µl Lösung I resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl Lösung II wurden die Zellen lysiert. Nach Zugabe von 300 µl Neutralisationspuffer (Lösung III) und 4-maligem invertieren wurde ein weiteres Mal für zehn Minuten zentrifugiert (15700 x g, 4 °C). Die Überstände wurden in neue 1,5 ml Gefäße überführt und die darin enthaltenen Nukleinsäuren mit Ethanol ausgefällt und gewaschen. Nach einer weiteren zehnmütigen Zentrifugation (s.o.) wurde das DNA-Pellet in 30 µl TE resuspendiert.

2.12.2 Restriktionsanalyse der Mini-Plasmid-Präparation

Die Restriktionsanalyse nach der Mini-Plasmid-Präparation dient der Überprüfung der korrekten Insertion des Zielgens in den Vektor. Dazu wurde in drei Restriktionsansätzen das Plasmid mit den Restriktionsenzymen 1.) XhoI und BamHI, 2.) NotI und 3.) StuI (Fermentas Life Sciences) nach Herstellerangaben verdaut und in einem Agarosegel überprüft. Der richtige Klon wurde in einer Midi-Plasmid-Präparation vervielfältigt.

2.12.3 DNA-Midi-Plasmid-Präparation

Am Vortag der Präparation wurden 2 µl DNA einer überprüften, korrekten Mini-Plasmid-Präparation in *E. coli* transformiert (siehe auch 2.11.2). Mit dieser Vorkultur wurde nach der 45-minütigen Inkubation bei 37 °C eine *E. coli*-Kultur (in 50 ml LB-Medium) angeimpft. Diese inkubierte bei 37 °C über Nacht in ampicillinhaltigem (100 µg / ml) LB-Medium und diente als Ausgangsmaterial. Die Aufreinigung der Gesamt-DNA wurde mit Hilfe des Nucleobond®AX Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.12.4 Sequenzierung

Die DNA wurde zur Sequenzierung an die Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) geschickt und über die Primer M13rev und M13uni und XhoI PSGL-1 und BamHI PSGL-1 1545 sequenziert. Die Auswertung wurde mit CLUSTAL W (1.81) Multiple Sequence Alignments (<http://align.genome.jp/sit-bin/clustalw>) durchgeführt.

2.13 Western Blot

2.13.1 Herstellung von Proteinextrakten

Zur Gewinnung von Proteinen wurde nach Versuchsende das Nährmedium von den Zellen abgesaugt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in einfach konzentriertem Laemmli-Puffer für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellysate wurden in 1,5 ml Gefäße überführt, fünf Minuten bei 85 °C denaturiert und kurz sonifiziert. Die Proben wurden aliquotiert und bei -20 °C bis zur Western Blot-Analyse gelagert.

2.13.2 Auftrennung der Proteine

Die Auftrennung und Analyse der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Fling und Gregerson (Fling und Gregerson, 1986). Hierbei passieren die Proteine zuerst ein Sammelgel (5 %, pH 6,8), in welchem sie zu einer scharfen Bande fokussiert werden. Als Trenngelle (pH 8,8) wurden Acrylamid-Gradienten von 3-15 % verwendet. Dadurch können Proteine über einen größeren Massenbereich getrennt werden. Zur Überprüfung der aufgeladenen Proteinmengen wurden β-Actin-Kontrollen durchgeführt. Neben den Proteinproben wurden Molekulargewichts-Marker (PageRuler™

Prestained Protein Ladder, 11-170 kDa, Fermentas, St. Leon-Rot oder Precision Plus Protein™ Standards, 10-250 kDa, Bio-Rad, München) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte über 16-18 h bei 90 V (Hoefer SE 600 Series Vertical Slab Gel Unit, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA).

2.13.3 Transfer der Proteine auf eine Membran / *Semi-Dry*-Western Blot

Der Transfer der Proteine erfolgte auf PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membranen (Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA). Die Membranen wurden 30 sec in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer equilibriert. Das SDS-Gel und die Membran wurden aufeinander gelegt und luftblasenfrei zwischen jeweils drei Transferpuffer-getränkte Filterpapiere (Whatman-Papier) gebettet. Der Transfer erfolgte in einer *Semi-Dry*-Blot-Apparatur (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad, München) bei 10 V für 60 min.

2.13.4 Detektion und Visualisierung der Proteine

Nach dem Transfer wurden die Membranen für mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur (RT) in TBS-T mit 2 % ECL Advance Blocking Agent (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) inkubiert um freie Bindungsstellen abzusättigen und unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verringern.

Die auf den PVDF-Membranen immobilisierten Proteine wurden mit spezifischen Primärantikörpern detektiert. Listen der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie die jeweils eingesetzten Verdünnungen (in TBS-T in 2 % ECL Advance Blocking Agent) finden sich in den Tabellen 2-3 und 2-4. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in allen Fällen bei 4 °C über Nacht. Nachfolgend wurde die Membran dreimal für 15 min bei RT in TBS-T gewaschen und anschließend mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 1-2 h bei RT inkubiert. Um nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen, wurde die PVDF-Membran erneut dreimal für 15 min bei RT in TBS-T gewaschen. Zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers folgte eine Inkubation mit ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg). Die an den Sekundärantikörpern gebundene Peroxidase oxidiert das im ECL-Reagenz enthaltene Lumigen®-TMA-6. Die daraus resultierende Lichtemission konnte mittels Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham, Buckinghamshire, Großbritannien) detektiert werden. Die entwickelten Röntgenfilme wurden mit einem GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad, München) eingescannt und anschließend mit Hilfe der Software Quantity One® (BioRad, München) ausgewertet.

2.13.5 *Strippen* der Membran

Um eine proteinbeladene Membran mit einem oder mehreren weiteren Antikörpern zu analysieren, müssen die gebundenen Primär- und Sekundärantikörper der ersten Detektion entfernt werden (*strippen*). Dazu wurde die Membran mit Wasser gewaschen, dann mit 0,2 M NaOH inkubiert und ein weiteres Mal in Wasser gewaschen. Jeder dieser drei Schritte wurde über einen Zeitraum von fünf Minuten durchgeführt. Nach der *stripping*-Prozedur wurde die Membran für zwei bis drei Stunden in TBS-T mit 2 % ECL Advance Blocking Agent geblockt und anschließend über Nacht mit dem nächsten Primärantikörper inkubiert.

2.13.6 Amidoschwarz-Färbung der Membran

Nach der Belichtung des Röntgenfilms wurden die membrangebundenen Proteine auf der PVDF-Membran für zehn Minuten mit Amidoschwarz-Lösung angefärbt. Amidoschwarz bindet irreversibel an die immobilisierten Proteine auf der Membran. Es folgte eine Entfärbung des überschüssigen Farbstoffes für zweimal 10-15 min mittels Amidoschwarz-Entfärbelösung. Nach Entfernung des überschüssigen Farbstoffes wurden die Proteinbanden auf der PVDF-Membran sichtbar.

2.14 Lentivirale Überexpression von PSGL-1 in SMC

Der lentivirale Gentransfer stellt eine Möglichkeit dar, Gene von Interesse in Zellen überzuexprimieren.

2.14.1 Das Drei-Plasmid-System

Die lentivirale Produktion basiert aus Sicherheitsgründen auf einem Drei-Plasmid-System. Ein Plasmid codiert für das Verpackungssignal Ψ (pcZ VSV-G). Das G-Protein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) wurde zur Pseudotypisierung des Lentivirus verwendet. Von Pseudotypisierung spricht man, wenn das virale Kapsid in eine Virushülle (env) verpackt wird, die nicht der natürlichen Virushülle (HI-Virushülle) entspricht. Im Vergleich zur HIV-Hülle, die nur CD 4 positive Zellen, wie Makrophagen, Lymphozyten und Gliazellen infiziert, kann die Hülle des Vesikulären Stomatitis Virus fast jeden Zelltyp infizieren. Ein weiteres Plasmid dient als Helferplasmid (pCD NL-BH). Helferplasmide sind Plasmide, die nur strukturelle Komponenten für die Viruspartikel bereitstellen. Das Helferplasmid pCD NL-BH trägt codierende Sequenzen für *gag*

und *pol*, sowie für die Gene *vif*, *vpr*, *vpu* und *rev* und steht unter der Kontrolle des CMV (*human Cytomegalovirus*)-Promotors. Das dritte Plasmid dient als Transfervektor (pCL1 oder pCL6) für die Zielgene. In pCL1 wurde EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und in pCL6 wurde PSGL-1 unter einem konstitutiven SFFV (*spleen focus-forming virus*)-Promotor zwischen die LTR (*long terminal repeats*) kloniert. Die LTR werden für die Integration in das Genom der Zielzelle benötigt. Zusätzlich enthält der Transfervektor einige essentielle Viruselemente, wie z.B. das Verpackungssignal Ψ , welches notwendig ist, damit die Virus-mRNA in die neu gebildeten viralen Partikel inkorporiert werden kann.

2.14.2 Produktion der Lentiviren in HEK 293-Zellen

HEK 293-Zellen dienen als virusproduzierende Zelllinie. Die Transduktion der HEK 293-Zellen wurde mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI), einem Transfektionsreagenz, mit jeweils 5 μg der drei Plasmide VSV-G, NL-BH und pCL6 PSGL-1 durchgeführt. Auf dieselbe Art wurden Zellen mit einem pCL1 EGFP-Vektor zur Kontrolle transduziert. Nach einer Inkubationszeit von 16 h wurde das Kulturmedium (siehe 2.6.3) gewechselt und der CMV-Induktor Natriumbutyrat (10 mM) für weitere 6-8 h dazugegeben. Anschließend wurde das normale Wachstumsmedium gegen HEPES-gepuffertes Spezialmedium (IMDM, Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma-Aldrich) getauscht, um eine bessere Stabilität der Lentiviren zu erreichen. Alle Schritte erfolgten unter Benutzung von hitzeinaktiviertem FCS. Am nächsten Tag, frühestens aber 19 h Stunden nach dem letzten Mediumwechsel, wurden die virushaltigen Zellüberstände steril filtriert (45 μm Filter, Sartorius AG, Göttingen), um alle Überreste der Produzentenzellen zu entfernen, und aliquotiert. Die so gewonnenen Überstände wurden bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

2.14.3 Bestimmung des Virustiters

Der Virustiter (*tissue culture infective dose*, TCID_{50}) ist ein Maß für den Gehalt an infektiösen Partikeln. Die Virusmenge in einer Lösung wird grob abschätzbar, indem man von der Virussuspension eine Verdünnungsreihe (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} bis 10^{-9}) anfertigt. Die Virustiter-Bestimmung erfolgte in einem 4-fach Ansatz in 96-Loch-Platten. HEK 293-Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen / ml in die 96-Loch-Platten ausgesät. Es folgte eine Über-Nacht-Inkubation bei 37°C im CO_2 -Schrank bis zu einer Konfluenz von ca. 30 %. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium durch die Verdünnungsreihe des Inokulums (Virusüberstandes) der pEGFP-transduzierten Zellen ersetzt. Die Zellen wurden nun zwei bis drei Tage bei 37°C im CO_2 -

Schrank inkubiert, wobei einmal täglich das Kulturmedium gewechselt wurde. Am zweiten und dritten Tag wurden die Zellen mit einem Fluoreszenz-Lichtmikroskop unter UV-Licht-Bestrahlung auf EGFP-Expression hin untersucht. Die Verdünnung, bei der 50 % der Zellen EGFP exprimierten, entsprach der TCID₅₀. Aus der TCID₅₀ wurde die MOI (*Multiplicity of Infection*) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{MOI} = \text{TCID}_{50} / \text{Anzahl der Zellen}$$

2.14.4 Transduktion der SMC

Die Zielzellen wurden mit einer MOI von 10 transduziert. Zur Verbesserung der Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran wurde 10 µg / ml Protaminsulfat zugegeben. Nach einem Mediumwechsel am folgenden Tag und einer Wartezeit von fünf Tagen in Wachstumsmedium wurde die Transduktionseffizienz überprüft und bei positivem Befund die Zellen für weitere Versuche verarbeitet.

2.14.5 Überprüfung der Transduktionseffizienz

Die Transduktionseffizienz wurde an Hand der Zellen, die mit dem Kontrollplasmid pCL1-EGFP infiziert wurden, an einem Fluoreszenz-Lichtmikroskop (Olympus IX50 Mikroskop) unter UV-Licht-Bestrahlung bestimmt.

2.15 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie wird für die Detektion, das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von einzelnen Zellen in einem Flüssigkeitsstrom verwendet.

Mittels Durchflusszytometrie wird die Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen gemessen. Die Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung aneinandergereiht und an einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbei geleitet. Ein Photodetektor registriert die entsprechende Menge an Fluoreszenzsignalen. Diese verhalten sich proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers pro Zelle, somit wird eine Aussage, z.B. über die Expression von Oberflächenmolekülen möglich.

2.15.1 Extrazelluläre Markierung mit fluorchromkonjugierten Antikörpern

Die Markierung der Zellen mit primären fluorchromgekoppelten Antikörpern wurde in Suspension durchgeführt. Venöse SMC wurden mit Accutase (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) für 5 min bei 37° C abgelöst. Daraufhin wurden die Zellen fünf Minuten bei 2300 x g pelletiert und in 50 µl PBS resuspendiert. Der Nachweis von PSGL-1 erfolgte durch einen Phycoerythrin (PE)-konjugierten PSGL-1 Antikörper (CD 162, BD Biosciences, Heidelberg). 5 µl Antikörper wurden mit 50 µl Zellsuspension im Dunkeln inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 20-30 min. Um unspezifische Fluoreszenz auszuschließen, wurde eine sogenannte Isotyp-Kontrolle mit fluoreszenzmarkierten Immunglobulinen (IgG1(Mouse)-PE) durchgeführt. Die Isotyp-Kontrolle stammte aus der gleichen Spezies und war an den gleichen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wie der eingesetzte Antikörper.

2.15.2 Durchflusszytometrische Messung

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem EPICS XL (Beckman Coulter, Krefeld) durchgeführt. Die SMC-Zellpopulationen wurden an Hand ihrer Streulichteigenschaften eingegrenzt.

Die Detektion erfolgte bei logarithmischer Amplifikation. Es wurden je 5000 Zellen mit der System II-Software analysiert. Der Parameter „mittlere Fluoreszenzintensität“ (Mn X) wurde ausgewertet.

2.16 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die immunhistochemischen Nachweise wurden SMC auf 20 mm Deckgläschen ausgesät und 24 Stunden in Kulturmedium vermehrt. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für weitere 24 Stunden in serumfreien Medium inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen unbehandelt belassen (Kontrollzellen) und der andere Teil der Zellen mit Thrombin (3 U / ml, 24 h) stimuliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und die Zellen in eiskaltem Methanol fixiert (15 min). Anschließend wurden die SMC dreimal mit PBS gewaschen und mit einem PE-gekoppeltem PSGL-1 Antikörper (CD 162, BD Biosciences, Heidelberg) inkubiert (30 min bei RT, 1:500 in PBS). Daraufhin wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 (1 µg / ml) für eine Minute gegengefärbt. Die PSGL-1-überexprimierenden SMC wurden auf identische Weise präpariert.

Für den Nachweis von PSGL-1 auf der Zelloberfläche wurden die Zellen wie beschrieben behandelt und mit FITC (Fluorescein Isothiocyanat)-gekoppeltem, rekombinanten humanem P-Selektin inkubiert (30 min bei RT, 1:500). Die Präparate wurden mit Vectashield Antifade Mounting Medium® (Vector Laboratories, CA, USA) eingedeckt und mit handelsüblichem Nagellack versiegelt.

Die Detektion erfolgte an einem Axio Observer Z1 mit Apotome und die Auswertung wurde mit der Axio Vision 4.8-Software (beides Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt.

Die FITC-Koppelung des rekombinanten humanen P-Selektins (Prod # 561306, Calbiochem, CA, USA) wurde mit Hilfe des EZ-Label™ Fluorescein Isothiocyanate (FITC) Protein Labeling Kit (Prod # 53004, Thermo Scientific, IL, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.17 Statistik

Die Messdaten sind Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus n unabhängigen Experimenten. Das Signifikanzniveau P für α wurde mit 0,05 festgelegt. Um signifikante Unterschiede zwischen drei oder mehr Versuchsgruppen zu überprüfen, wurden die Daten mittels *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der GraphPad Prism-Software (Version 4.00, GraphPad Software, San Diego, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Expression von PSGL-1 in SMC

3.1.1 Basale Expression der PSGL-1-mRNA in SMC

Unter Verwendung spezifischer Primer wurde die Expression von PSGL-1 in SMC mittels *realtime* PCR untersucht. Die Genexpression von PSGL-1 in humanen SMC konnte an Hand dieser Primer zweifelsfrei nachgewiesen werden. Als Positivkontrolle wurde cDNA aus monozytären U937-Zellen eingesetzt, die nachweislich PSGL-1 exprimieren (Stampfuß *et al.*, 2008). Die Signale der endogenen Kontrolle (GAPDH) von U937-Zellen und SMC verliefen identisch. Für die Expression von PSGL-1 zeichnete sich ein deutlicher Mengenunterschied zwischen U937-Zellen und SMC ab; letztere exprimierten deutlich weniger PSGL-1 (Abbildung 3-1).

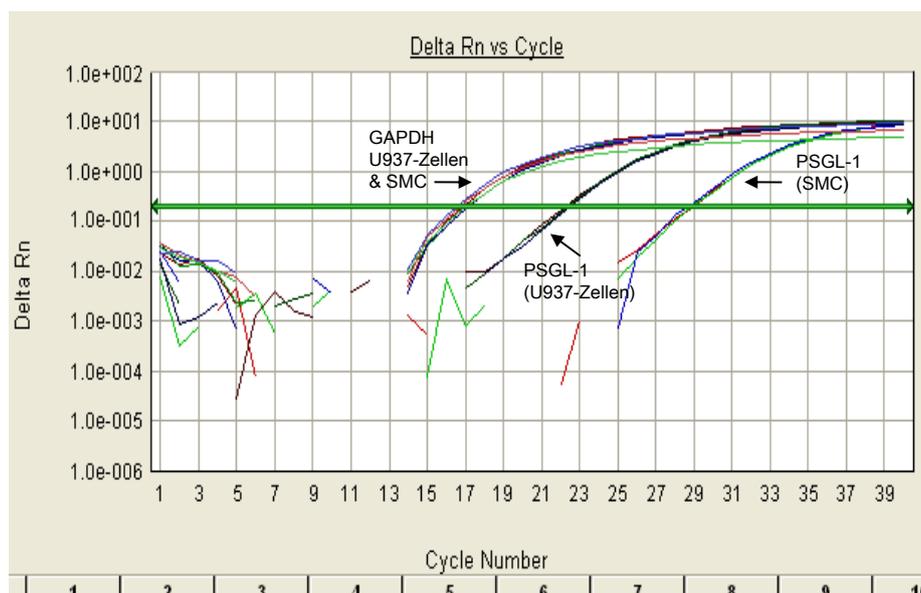


Abbildung 3-1 Bestimmung der basalen Expression von PSGL-1 in SMC. Die dargestellten Kurven zeigen die Amplifikationskurven von GAPDH (endogene Kontrolle), welche für U937-Zellen und SMC identisch verlaufen, und die Amplifikationskurven von PSGL-1 sowohl in U937-Zellen als auch in SMC. Anhand der Kurvenverläufe von PSGL-1 wird ein Mengenunterschied von PSGL-1 in den verglichenen Zelllinien offensichtlich. Die grüne Linie stellt den „threshold“ dar, welcher so gewählt wird, dass er den linearen Bereich der Amplifikationskurven kreuzt. Am „threshold“ wurden die *ct*(cycle threshold)-Werte abgelesen. Dargestellt ist ein repräsentatives Bildschirmfoto einer *realtime*-PCR aus $n=6$ unabhängigen Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis.

Nach Normalisierung der Signale auf GAPDH als endogene Kontrolle ergab sich für SMC eine PSGL-1-mRNA-Expression von 2 % im Vergleich zu U937-Zellen (Abbildung 3-2). Damit ist eine Basal-Expression zwar zweifelsfrei nachweisbar, aber im Vergleich zu U937-Zellen sehr gering.

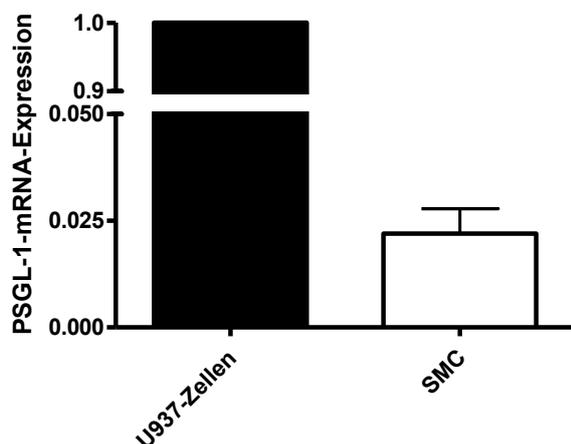


Abbildung 3-2 Vergleich der basalen PSGL-1-mRNA-Expression in SMC und U937-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM der SMC. Die PSGL-1-mRNA-Expression der U937-Zellen wurde auf 1 normiert; $n=6$ Experimente.

3.1.2 Expression von PSGL-1-Protein in SMC

Die basale Expression von PSGL-1-Protein in SMC-Zelllysaten wurde mittels Western Blot (Antikörper: α -PSGL-1 (KPL1)) überprüft. Für U937-Zellen als Positivkontrolle konnte das PSGL-1-Monomer (130 kDa) und das -Dimer (260 kDa) nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle dienten HEK 293-Lysate. HEK 293-Zellen exprimieren kein PSGL-1. Die für die SMC detektierten Proteinbanden stimmten weder mit dem PSGL-1-Monomer noch mit dem -Dimer überein (Abbildung 3-3).

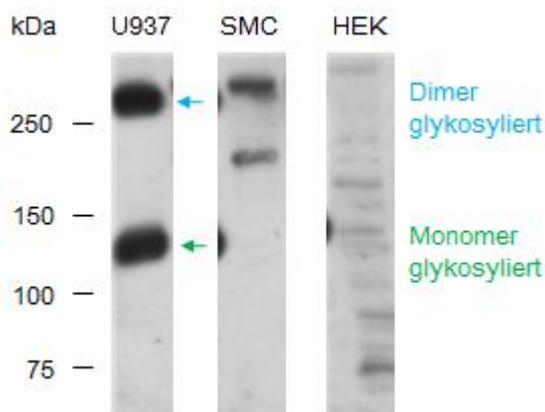


Abbildung 3-3 Expression von PSGL-1 in U937-Zellen (Positivkontrolle), SMC und HEK 293-Zellen (Negativkontrolle). Nur die U937-Zellen zeigten das PSGL-1-Monomer und -Dimer. Dargestellt ist ein repräsentatives Western Blot-Experiment aus $n=3$ Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen.

Eine anschließende durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von PSGL-1 auf SMC mit PE-konjugiertem PSGL-1-Antikörper war ebenfalls negativ. Im Gegensatz dazu zeigten die U937-Zellen die erwartete positive Reaktion (Abbildung 3-4).

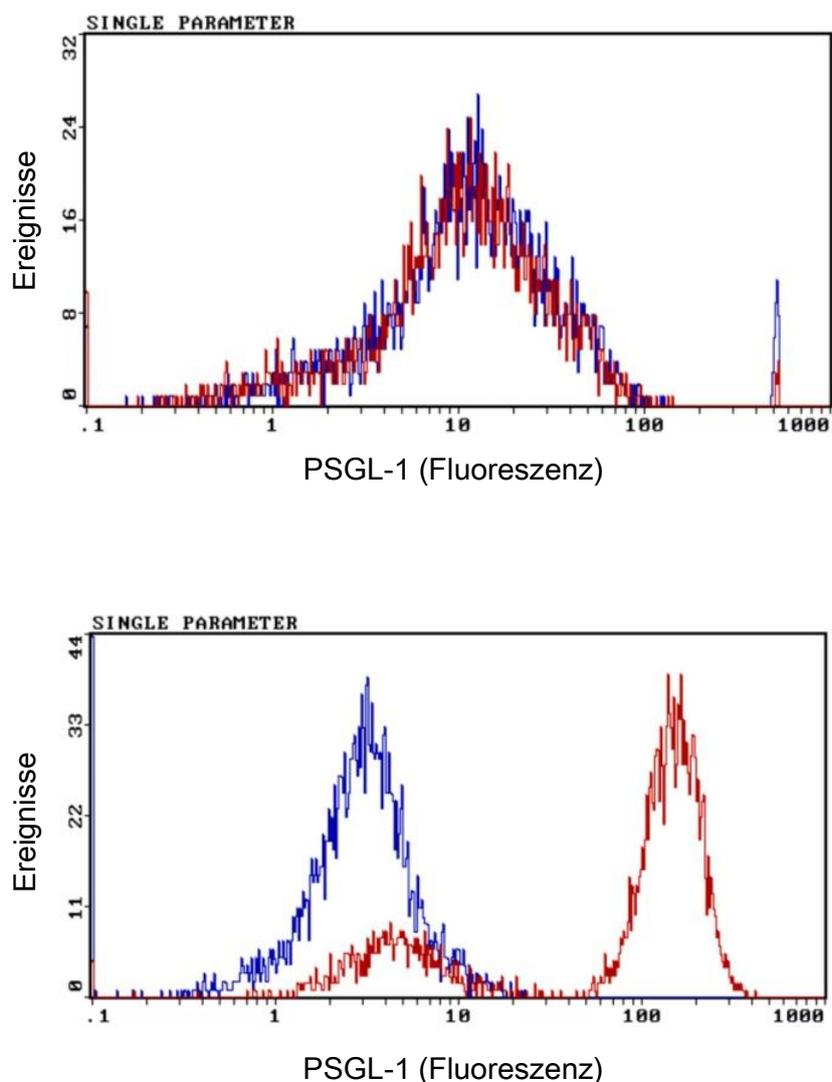


Abbildung 3-4 Durchflusszytometrische Bestimmung der PSGL-1-Expression α -PSGL-1-PE-markierter SMC (oben) und U937-Zellen (unten). Repräsentative Originalhistogramme aus $n=3$ Experimenten. Isotyp (blau), PSGL-1 (rot).

Demnach enthielten SMC das PSGL-1 Transkript. Der fehlende Nachweis von Protein und dessen Oberflächenexpression ist am ehesten durch die geringe Expression der mRNA und damit dem Detektionslimit der gewählten Methode zu erklären. Um zu untersuchen, ob SMC PSGL-1 posttranslational modifizieren können, um es als Protein zu exprimieren, wurde PSGL-1 aus SMC kloniert und anschließend viral überexprimiert.

3.2 Klonierung und Sequenzanalyse von humanem PSGL-1 aus venösen SMC

3.2.1 Klonierung von PSGL-1 in den Vektor pBluescriptSK

Der komplette offene Leserahmen von PSGL-1 wurde mittels zweier spezifischer Primer (XhoI PSGL1 und BamHI PSGL1 1545) aus mRNA venöser SMC kloniert und in den Vektor pBluescriptSK ligiert. Bei einem als Kontrolle dienenden Restriktionsverdau wurde die Größe des PSGL-1-Amplikons (1536 Basenpaare) überprüft. Dabei wurden zwei unterschiedlich große PSGL-1-Formen detektiert (Abbildung 3-5).

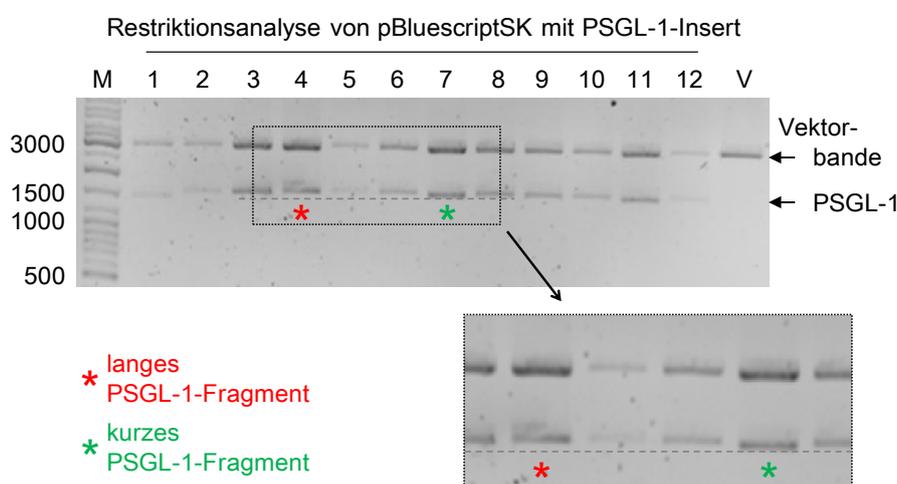


Abbildung 3-5 Restriktionsanalyse von pBluescriptSK mit dem PSGL-1-Insert aus SMC mit den Enzymen XhoI und BamHI. Es ergaben sich längere (roter Stern) und kürzere (grüner Stern) PSGL-1 Fragmente. (Mini-Plasmid-Präparation (MPP) # 4 = langes PSGL-1 Fragment, MPP # 7 = kurzes PSGL-1 Fragment, n=1.)

3.2.2 Sequenzanalyse von PSGL-1 aus SMC

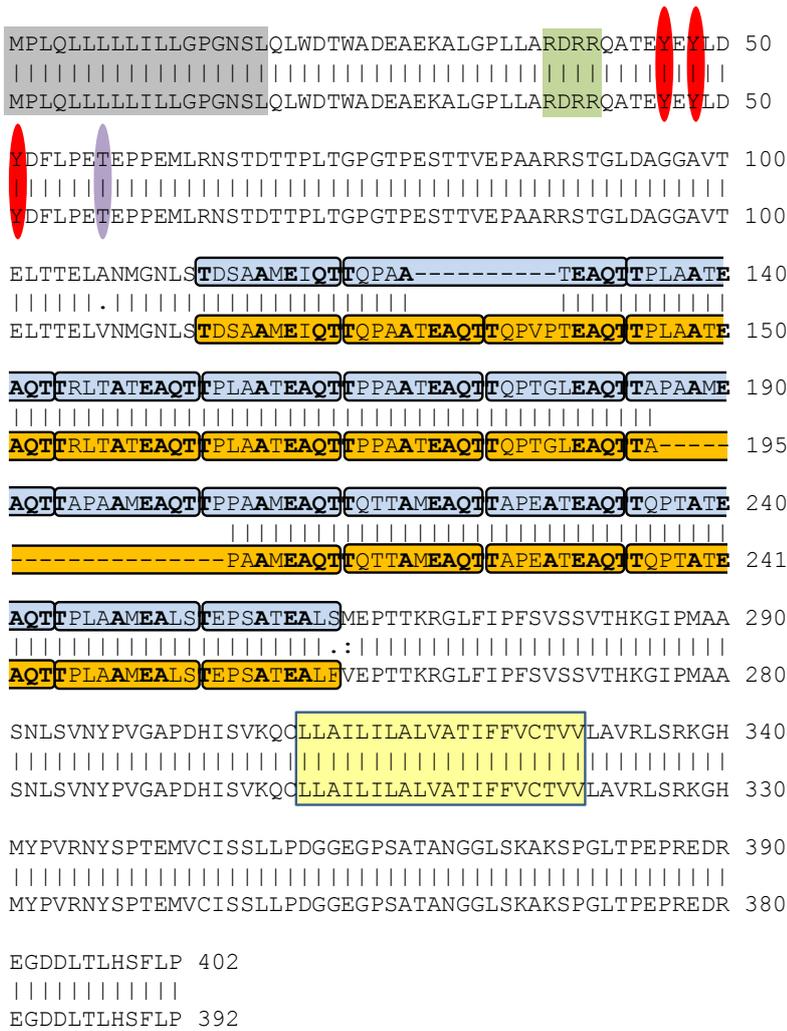
Sowohl die längere als auch die kürzere Form des humanen PSGL-1 aus SMC wurde sequenziert. Die Sequenz der längeren PSGL-1-Form (im Folgenden PSGL-1_[402] genannt) erwies sich zu 100 % homolog zu der veröffentlichten Sequenz (Wilkins *et al.*, 1995, Accession-Nr.: NM_003006), welche in translaterter Form für ein 402 AS-umfassendes Protein kodiert. Die Sequenzanalyse der kürzeren Form ergab in translaterter Form ein Protein aus 392 AS (im Folgenden PSGL-1_[392] genannt).

Die mathematische Analyse beider PSGL-1 Formen mit SAPS (*Statistical Analysis of Protein Sequences*, Brendel *et al.*, 1992) (Abbildung 3-6) gab neben der Lokalisierung und einem Vergleich der repetitiven Sequenzen (periodisches Element) Auskunft über die Anzahl der dekamerischen Repeats (Kopienzahl) und die darin enthaltenen Unterschiede (Fehler). Die repetitiven Sequenzen enthielten neben hochkonservierten Strukturen auch variable Strukturen (als Punkte dargestellt), bei denen die AS häufig wechseln. Abweichungen innerhalb der hochkonservierten Strukturen sind als Fehler dargestellt.

	Lokalisierung	periodisches Element	Kopienzahl	Fehler
PSGL-1 _[402]	114-263	T...A.EAQT	15	/0/-/-/-/1/-/0/1/2/2/
PSGL-1 _[392]	114-253	T...A.EAQT	14	/0/-/-/-/2/-/0/1/2/2/

Abbildung 3-6 SAPS Ergebnisse. Durch einen mathematischen Vergleich beider PSGL-1-Formen wurde die Position (Lokalisierung) der repetitiven Sequenzen im Protein ermittelt. Deren Vergleich (periodisches Element) ergab neben hochkonservierten auch variable AS. Die Punkte stellen Platzhalter für stark variierende AS dar (vergleiche Abbildung 3-7). Die Kopienzahl gibt die Wiederholungen der dekamerischen AS-Repeats an. Die Häufigkeit des Austauschs einer der konservierten AS wird unter Fehler angegeben. Beispiel: Die repetitiven Sequenzen von PSGL-1_[402] erstrecken sich über die AS 114-263. PSGL_[402] beinhaltet 15 dekamerische AS-Repeats (Kopienzahl). Threonin (T) ist immer die erste AS in den repetitiven Sequenzen (periodisches Element). Das Alanin (A) ist einmal durch eine andere AS substituiert (1 Fehler), usw.. Die Unterschiede bzw. Fehler der stark variierenden AS wurden nicht berechnet.

Durch einen Vergleich beider Sequenzen konnte gezeigt werden, dass PSGL-1_[402] 15 dekamerische Repeats beinhaltete und dass die zehn fehlenden AS von PSGL-1_[392] genau einem fehlenden dekamerischen Repeat entsprachen. Abbildung 3-7 stellt schematisch beide Formen von PSGL-1 dar. Um deutlich zu machen, an welchen Positionen die Unterschiede der dekamerischen AS-Repeats lagen, wurden die sich periodisch wiederholenden Elemente farblich markiert (blau = PSGL-1_[402], orange = PSGL-1_[392]). In welchem Repeat genau der Unterschied zwischen PSGL-1_[402] und PSGL-1_[392] lag, war nicht mit Sicherheit auszumachen, konnte aber auf die Bereiche der AS 129 bis 138 von PSGL-1_[392] oder der AS 186 bis 205 von PSGL-1_[402] eingegrenzt werden.



- Signalsequenz
- Konsensus-Spalt Sequenz (As 38-41)
- 20 AS Transmembrandomäne
- Sulfonierte Tyrosine (Y₄₆, Y₄₈, Y₅₁)
- sialyl Le^x Core 2 O-glycan (T₅₇)
- periodische Elemente PSGL-1_[402]
- periodische Elemente PSGL-1_[392]

Abbildung 3-7 Schematischer Vergleich der Aminosäuresequenzen von PSGL-1_[402] (obere Sequenz) und PSGL-1_[392] (untere Sequenz). Die ersten 114 AS beider PSGL-1 Sequenzen, die die Signalsequenz, die Konsensus-Spalt Sequenz sowie die sulfonierten Tyrosine und die Struktur des sialyl Le^x Core 2 O-glycan beinhalten, stimmen –abgesehen von einer AS an Position 107- überein. Die repetitiven Sequenzen beider PSGL-1 Formen beginnen bei AS 114. In den repetitiven Sequenzen (periodische Elemente) gibt es zwei potentielle Sequenzabschnitte, die den 10 AS umfassenden Unterschied beider PSGL-1 Formen beinhalten könnten. Die homologe AS-Sequenz, die sich den repetitiven Sequenzen anschließt, inklusive Transmembrandomäne und cytoplasmatischem Rest, hat nur eine unterschiedliche AS unmittelbar hinter den periodischen Sequenzen. (Alignment nach: Needleman & Wunsch, 1970.)

3.3.2 Überprüfung der Transduktionseffizienz

Die Transduktionseffizienz wurde an Hand der EGFP-Expression in SMC ermittelt (Abbildung 3-9) und diente zur Kontrolle der Methode.

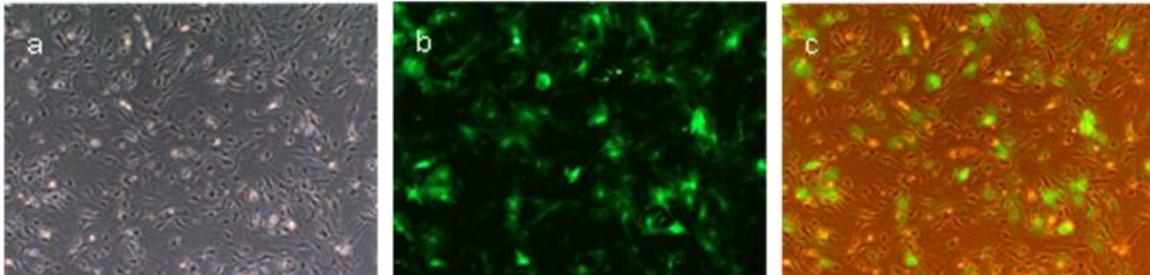


Abbildung 3-9 Expression von EGFP nach lentiviraler Einschleusung in SMC. Dargestellt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen von $n=6$ unabhängigen Versuchen. SMC (400x vergrößert) (a) unter Durchlicht, (b) unter UV-Licht-Bestrahlung und (c) bei Durchlicht und UV-Licht-Bestrahlung zu gleichen Teilen. Die erfolgreich lentiviral transduzierten SMC exprimieren EGFP.

Durch Auszählen der EGFP-exprimierenden Zellen ergab sich eine Transduktionseffizienz von ca. 33 % für EGFP (Abbildung 3-10). Dieser Wert wurde als Anhaltspunkt für die Effektivität der lentiviralen Transduktion eines Proteins in SMC angesehen.

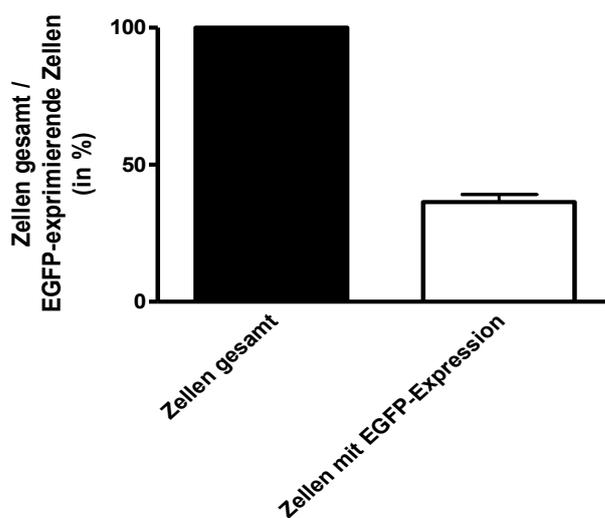


Abbildung 3-10 Bestimmung der Transduktionseffizienz an Hand der Expression von EGFP in SMC. Quantitative Auswertung von $n=6$ Experimenten.

3.3.3 Viabilität der SMC nach der Virus-Transduktion

Um zu klären, ob die Lebensfähigkeit (Viabilität) der SMC durch die Transduktion mit den virushaltigen Partikeln beeinträchtigt wurde, wurde deren Viabilität mit der nicht-transduzierter Zellen verglichen (Abbildung 3-11). Nach Trypanblau-Färbung wurde in einem Zellzählgerät der Anteil der vitalen Zellen bestimmt (siehe 2.7).

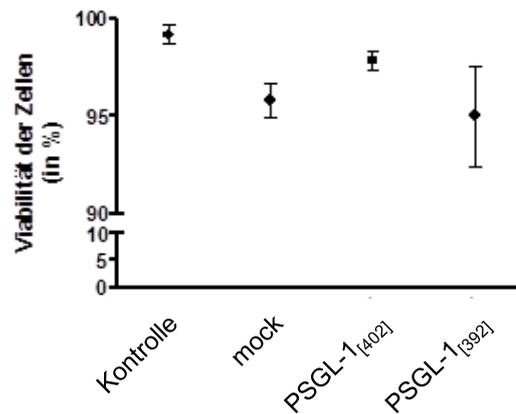


Abbildung 3-11 Einfluss der Virus-Transduktion auf die Viabilität der SMC. Als Kontrollzellen wurden nicht-transduzierte SMC eingesetzt. Die Messung erfolgte 5 Tage nach Transduktion der SMC. Quantitative Auswertung von $n=6$ unabhängigen Experimenten.

Die Transduktion der SMC mit virushaltigen Partikeln beeinträchtigte die Lebensfähigkeit der Zellen nicht. Die lentivirale Überexpression von PSGL-1 in SMC hat den Vorteil, dass größere Mengen von PSGL-1 zu weiteren Funktionsanalysen zur Verfügung stehen.

3.3.4 Überprüfung der PSGL-1-mRNA-Expression

Um nachzuweisen, dass die SMC nach der Transduktion mit PSGL-1-haltigen Viruspartikeln PSGL-1 überexprimieren, wurde die Zunahme der PSGL-1-mRNA-Expression über eine *realtime*-PCR-Bestimmung mit einem Taqman®-Assay für humanes PSGL-1 bestimmt (Abbildung 3-12). Die lentivirale Transduktion von PSGL-1_[402] und PSGL-1_[392] in SMC führte zu einer signifikanten Zunahme der PSGL-1-mRNA. Um einen Effekt der lentiviralen Transduktion auf die Expression von PSGL-1 auszuschließen, wurden mock-transduzierte SMC als Negativkontrollen eingesetzt.

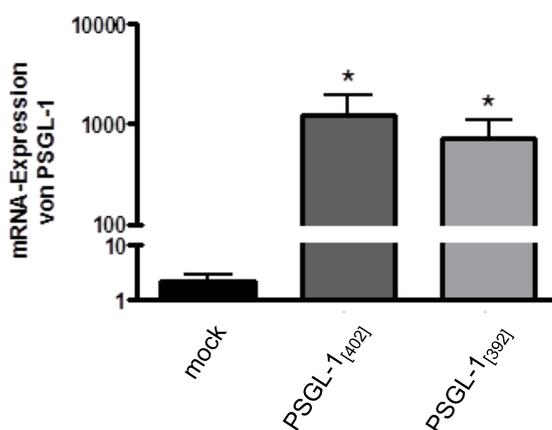


Abbildung 3-12 Nachweis der lentiviralen Überexpression von PSGL-1-mRNA in SMC mittels realtime PCR. Dargestellt ist die logarithmische Auswertung (Mittelwert \pm SEM) von $n=7$ Experimenten. * $p<0,05$ zu mock.

3.3.5 Überprüfung der PSGL-1-Protein-Expression

Im Folgenden war zu klären, ob die Virus-transduzierten SMC auch eine verstärkte Proteinexpression von PSGL-1 zeigen. Dazu wurden Zelllysate der PSGL-1_[402]- und der PSGL-1_[392]-überexprimierenden SMC im Western Blot untersucht. PSGL-1-Protein konnte mit drei verschiedenen Primärantikörpern in SMC nachgewiesen werden (Abbildung 3-13). In allen Fällen stimmte das Expressionsmuster von PSGL-1 aus SMC mit dem aus U937-Zellen (Positivkontrolle) überein. Der 10 AS umfassende Unterschied beider von SMC exprimierten PSGL-1-Formen wurde ebenfalls sichtbar. Des Weiteren war zu erkennen, dass die eingesetzten Primärantikörper ein unterschiedliches Bandenmuster detektierten. Die Laufhöhe der Proteinbanden in kDa ließ

vermuten, dass die beiden polyklonalen Primärantikörper (H300 und KPL2) sowohl die glykosylierte als auch die deglykosylierte dimere Form des Proteins erkannten. Der monoklonale Primärantikörper (KPL1) detektierte das glykosylierte Monomer und Dimer von PSGL-1.

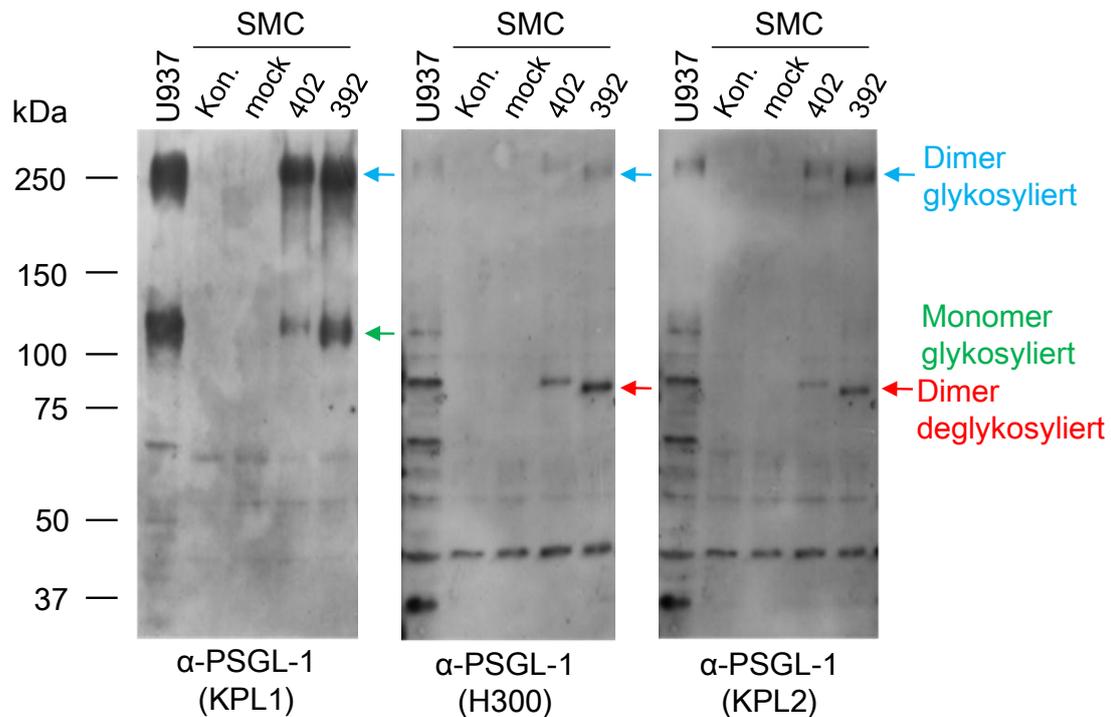


Abbildung 3-13 Nachweis der Expression von PSGL-1-Protein in U937-Zellen (U937; Positivkontrolle), in unbehandelten SMC (Kon.) sowie in mock-transduzierten (mock) und in PSGL-1-transduzierten SMC (402; PSGL-1_[402] und 392; PSGL-1_[392]). Die PSGL-1-überexprimierenden Zellen zeigten übereinstimmend mit den U937-Zellen das für PSGL-1 typische Expressionsmuster. Dargestellt ist ein repräsentatives Western Blot-Experiment aus $n=3$ Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen.

Diese Daten zeigten, dass SMC PSGL-1 auf mRNA-Ebene exprimieren und auch das Protein produzieren können.

Für alle folgenden Proteinnachweise mittels Western Blot wurde der monoklonale Primärantikörper KPL1 verwendet, da dieser unter den hier angewandten methodischen Bedingungen am empfindlichsten und am selektivsten war.

3.4 Untersuchungen zur Regulation von PSGL-1

3.4.1 Promotoranalyse von PSGL-1

Zum Auffinden geeigneter Induktoren für eine Aufregulation von PSGL-1 wurde eine Promotoranalyse von PSGL-1 (www.genomatix.de, MatInspector/MatBase) durchgeführt. Dabei ergab sich, dass PSGL-1 u.a. eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF κ B (*nuclear factor κ B*) besitzt. Da bekannt ist, dass NF κ B nach Thrombin-Stimulation die Expression von Genen in SMC erhöht (Wittpoth, 1998), wurde humanes α -Thrombin als Induktor der Genregulation von PSGL-1 gewählt.

3.4.2 Thrombin-induzierte PSGL-1-mRNA-Expression

Die Kinetik der PSGL-1-Gen-Expression nach Stimulation durch humanes α -Thrombin wurde in SMC über einen Zeitraum von 48 h mittels *realtime* PCR untersucht. Thrombin (3 U/ml) bewirkte eine transiente Aufregulation der PSGL-1-Gen-Expression mit einem Maximum nach 24 h (Abbildung 3-14).

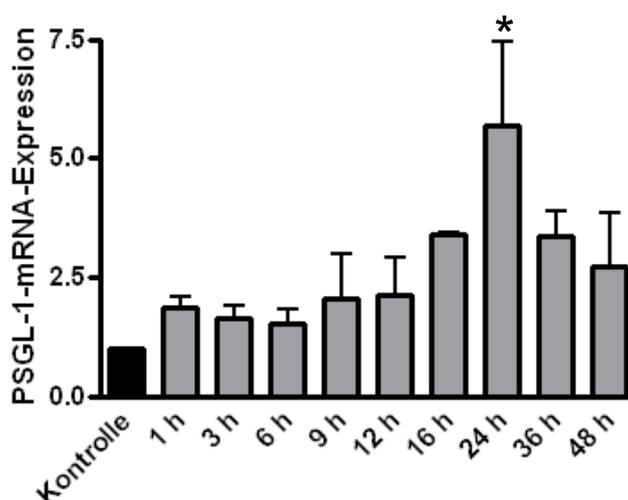


Abbildung 3-14 Zeitabhängige Induktion der PSGL-1-mRNA-Expression durch Thrombin (3 U/ml) in SMC. Dargestellt ist die quantitative Auswertung (Mittelwert \pm SEM) von $n=8$ unabhängigen Experimenten. * $p<0,001$ zur Kontrolle.

Diese Wirkung von Thrombin war konzentrationsabhängig. Mit steigenden Thrombin-Konzentrationen (0,1 – 10 U/ml, 24 h) nahm die Induktion der PSGL-1-mRNA zu. Dabei erwies sich eine Konzentration von 3 U/ml als optimal (Abbildung 3-15).

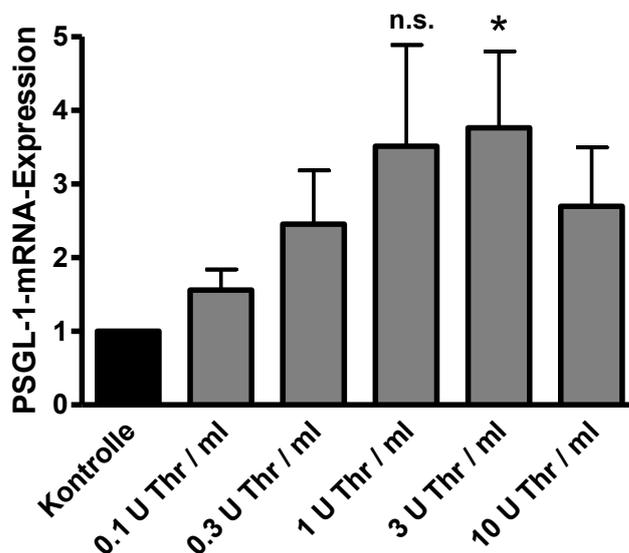


Abbildung 3-15 Konzentrationsabhängige Induktion der PSGL-1-Gen-Expression durch 24-stündige Thrombin-Stimulation (0,1 – 10 U/ml) in SMC. Dargestellt ist die quantitative Auswertung (Mittelwert ± SEM) von $n=4$ unabhängigen Experimenten. * $p<0,05$ zur Kontrolle, n.s.=nicht signifikant.

3.4.3 Thrombin-induzierte PSGL-1-Protein-Expression

Der durch Thrombin induzierte Anstieg der PSGL-1-mRNA-Expression in SMC zeigte sich auch translational als erhöhte Expression des PSGL-1-Proteins. Abbildung 3-16 zeigt das Western Blot-Ergebnis eines repräsentativen Experimentes. Eine basale Expression von PSGL-1-Protein in nicht-stimulierten Kontrollzellen war nicht detektierbar (siehe auch Abbildung 3-3), während eine Stimulation mit Thrombin (3 U/ml) nach 20 - 32 h eine deutliche Zunahme der PSGL-1-Protein-Expression bewirkte. Die statistische Auswertung der Versuche ergab eine signifikante, 3-fache Aufregulation der Protein-Expression. Ein Größenvergleich mit den überexprimierenden PSGL-1-Formen (PSGL-1_[402] und PSGL-1_[392]) ergab die Aufregulation der 402 AS umfassenden Form von PSGL-1-Protein in den Thrombin-stimulierten SMC. Eine Aufregulation für das Protein der kürzeren PSGL-1-Form konnte nicht gefunden werden. Auch das Monomer von PSGL-1 konnte für

das aufregulierte Protein nicht detektiert werden. Von den Zelllysaten der PSGL-1-überexprimierenden SMC (siehe auch Abbildung 3-13) wurde, um die Größe der Proteinbande des PSGL-1-Dimers genauer darstellen zu können, in diesen Experimenten nur ein geringeres Probenvolumen aufgetragen. Das Monomer ließ sich daher nicht mehr detektieren.

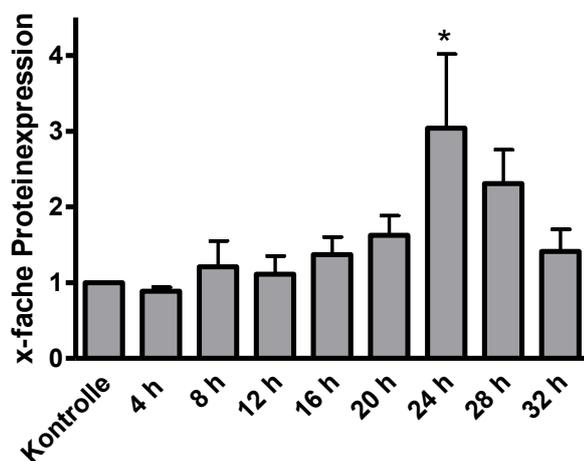
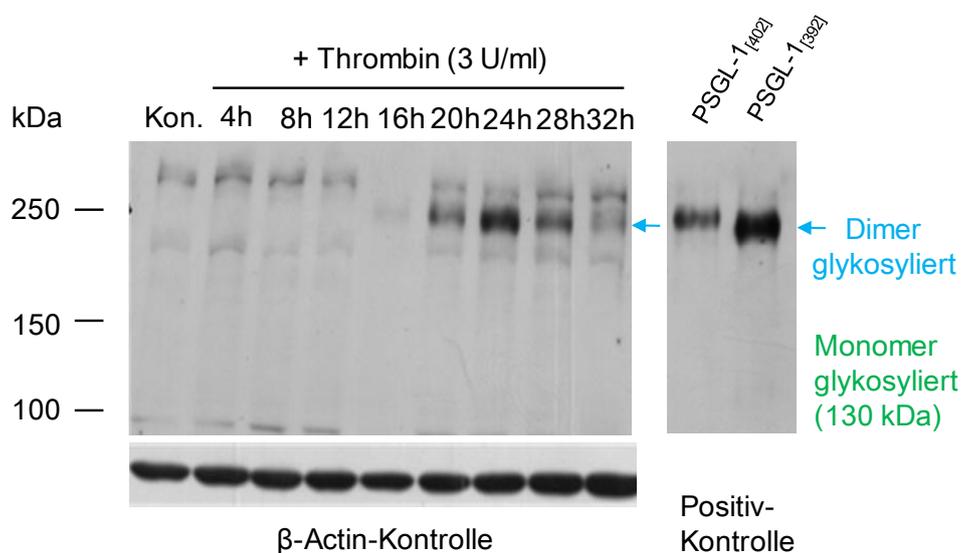


Abbildung 3-16 Einfluss von Thrombin auf die Expression des PSGL-1_[402]-Proteins in SMC. Dargestellt sind ein repräsentativer Western Blot (Antikörper: α -PSGL-1 (KPL1); oben) und die densitometrische Auswertung (unten) von $n=3$ unabhängigen Experimenten. * $p<0,05$ zur Kontrolle.

3.4.4 Einfluss von Thrombin-Rezeptor aktivierenden Peptiden (PAR-AP) auf die PSGL-1-Gen-Expression

Nach dem Nachweis der Expression und Aufregulation von PSGL-1 in SMC durch Thrombin wurde jetzt versucht den Subtyp der Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) zu ermitteln, der diese Effekte vermittelt. Dazu wurden selektive PAR-aktivierende Peptide (PAR-AP) verwendet. Hier zeigte sich, dass PAR1-AP (TFLLRN, 200 μ M) nach 24 h zu einer signifikanten Zunahme der PSGL-1-Gen-Expression führte, während PAR3-AP (TFRGAP, 200 μ M) ebenso wie PAR4-AP (AYPGQV, 200 μ M) keinen Effekt zeigten (Abbildung 3-17). Thrombin (3 U/ml, 24 h)-stimulierte SMC wurden in den Versuchen als Positivkontrolle verwendet. Bei diesen Versuchen fielen deutliche Unterschiede im Expressionsniveau der PSGL-1-mRNA in SMC nach 24-stündiger Stimulation mit Thrombin auf. Die Expression der PSGL-1-mRNA variiert zwischen 1,5- bis ca. 5-fach (vergleiche Abbildung 3-15, 3-17 und 3-19).

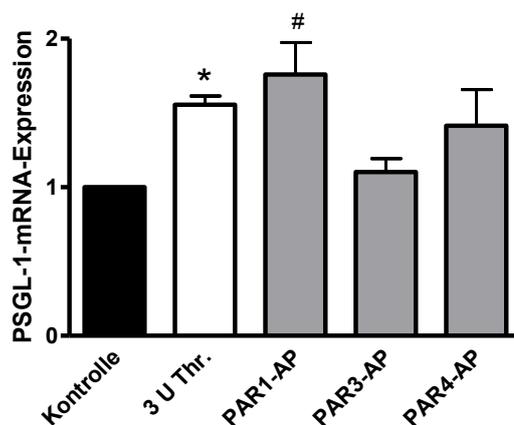


Abbildung 3-17 Einfluss der PAR-aktivierenden Peptide (PAR-AP) auf die PSGL-1-Gen-Expression in SMC nach 24 h. Unstimulierte SMC wurden als Kontrolle und Thrombin-stimulierte SMC (3 U/ml, 24 h) als Positivkontrolle eingesetzt. Dargestellt ist die quantitative Auswertung (Mittelwert \pm SEM) von $n=5$ unabhängigen Experimenten. * $p<0.05$ und # $p<0.01$ zur Kontrolle.

3.4.5 Einfluss PAR-aktivierender Peptide auf die PSGL-1-Protein-Expression

Im Folgenden wurde die Regulation von PSGL-1-Protein durch die PAR-aktivierenden Peptide mittels Western Blot untersucht. PSGL-1-Protein ließ sich trotz der deutlich aufregulierten Gen-Expression von PSGL-1 durch das PAR1-AP (TFLLRN, 200 μ M) nicht sicher detektieren. Ebenso wenig konnten Effekte des PAR3-AP (TFRGAP, 200 μ M) und des PAR4-AP (AYPGQV, 200 μ M) nachgewiesen werden (Abbildung 3-18). Thrombin (3 U/ml, 24 h)-stimulierte SMC wurden in den Versuchen als Positivkontrolle verwendet

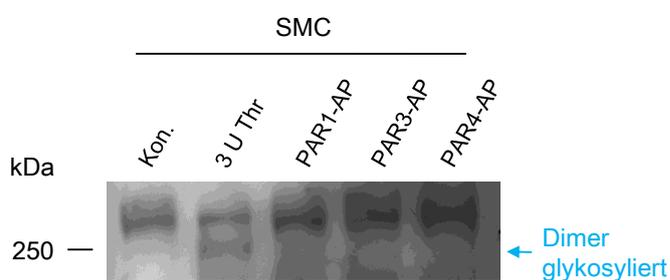


Abbildung 3-18 Einfluss der PAR-aktivierenden Peptide auf die PSGL-1-Protein-Expression in SMC. Nur die Thrombin-stimulierten Zellen zeigten das PSGL-1-Dimer. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

3.4.6 Einfluss von PKC- und NFκB-Inhibitoren auf die Thrombin-induzierte PSGL-1-Gen-Expression

Zur Klärung der Regulation der Transkription wurde zunächst die Signaltransduktion Thrombin- bzw. PAR1-mediierter Effekte untersucht. Dies geschah unter Verwendung spezifischer pharmakologischer Inhibitoren. Verwendet wurden der PKC-Inhibitor Calphostin c sowie ein NFκB-Inhibitor. Sowohl Calphostin c (200 nM) als auch der NFκB-Inhibitor (100 nM) hemmten die Thrombin-induzierte PSGL-1-mRNA-Expression in SMC vollständig (Abbildung 3-19). Die Hemmung der PSGL-1-Gen-Expression durch PKC- und NFκB-Inhibitoren zeigte ein Expressionsniveau, welches mit dem der basalen PSGL-1-Expression nahezu identisch war. Das sprach für NFκB- und G_q-vermittelte Signaltransduktion.

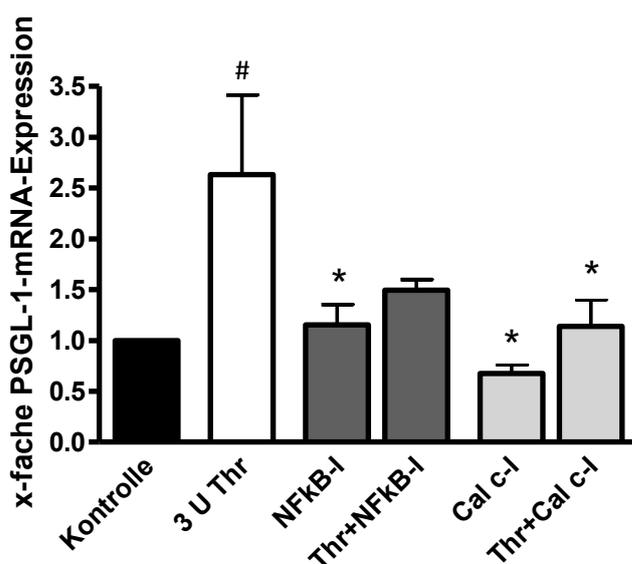


Abbildung 3-19 Beteiligung des PKC-Weges an der Regulation der PSGL-1-mRNA-Expression in SMC. Einfluss eines NFκB-Inhibitors (NFκB-I, 100 nM) und Calphostin c (Cal c, 200 nM) auf die Thrombin (Thr, 3 U/ml)-induzierte PSGL-1-Genregulation. Dargestellt ist die quantitative Auswertung (Mittelwert ± SEM) von n=3 Experimenten. *p<0,05 und #p<0.01 zur Kontrolle.

3.4.7 Einfluss von PKC- und NFκB-Inhibitoren auf die Thrombin-induzierte PSGL-1-Protein-Expression

Die Untersuchung der PKC- und NFκB-Inhibitoren auf die Thrombin-induzierte PSGL-1-Protein-Expression mittels Western Blot ergab ähnliche Ergebnisse. Eine Expression von PSGL-1-Protein konnte lediglich für die Thrombin (3 U/ml, 24 h)-stimulierten SMC gezeigt werden (Abbildung 3-20). Durch Hemmung von sowohl PKC als auch NFκB wurde die Aufregulation des PSGL-1-Proteins trotz Stimulation der Zellen mit Thrombin (3 U/ml, 24 h) unterdrückt. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der *realtime* PCR (vgl. Abschnitt 3.5.5) überein.

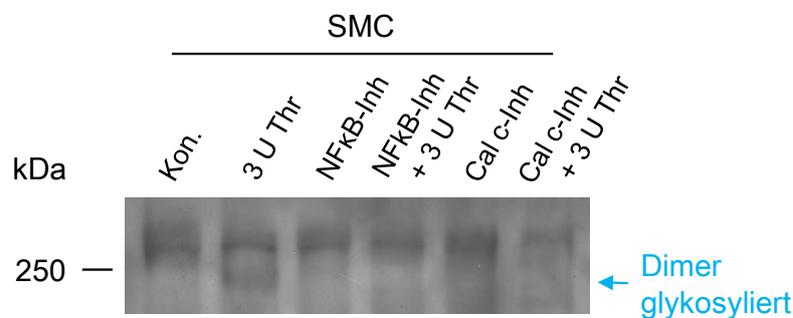


Abbildung 3-20 Einfluss des NFκB- und PKC-Inhibitors auf die PSGL-1-Protein-Expression in SMC. Nur bei den Thrombin (3 U/ml, 24 h)-stimulierten Zellen konnte das PSGL-1-Dimer detektiert werden. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (Antikörper: α-PSGL-1 (KPL1)) von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

3.5 Untersuchungen zur funktionellen Aktivität von PSGL-1

3.5.1 Überprüfung der PSGL-1-Oberflächen-Expression auf PSGL-1-überexprimierenden SMC

Nachdem eine Expression von PSGL-1-Protein in Zelllysaten überexprimierender und Thrombin-stimulierter SMC nachgewiesen war, wurde die Translokalisierung des Proteins auf der Zelloberfläche untersucht. Mittels durchflusszytometrischer Analysen mit einem PE-gekoppelten PSGL-1 Antikörper wurde die Expression von PSGL-1 auf der Zelloberfläche viral transduzierter SMC überprüft (Abbildung 3-21). Auf ca. 17 % der PSGL-1_[392]- und ca. 4 % der PSGL-1_[402]-viral-transduzierten Zellen war das Protein auf der Zelloberfläche nachweisbar. Diese Ergebnisse spiegeln den Mengenunterschied zwischen PSGL-1_[392]- und PSGL-1_[402]-mRNA (vgl. Abbildung 3-12) wider. Des Weiteren wird deutlich, dass SMC die Voraussetzungen besitzen, das Protein auf die Zelloberfläche zu transferieren.

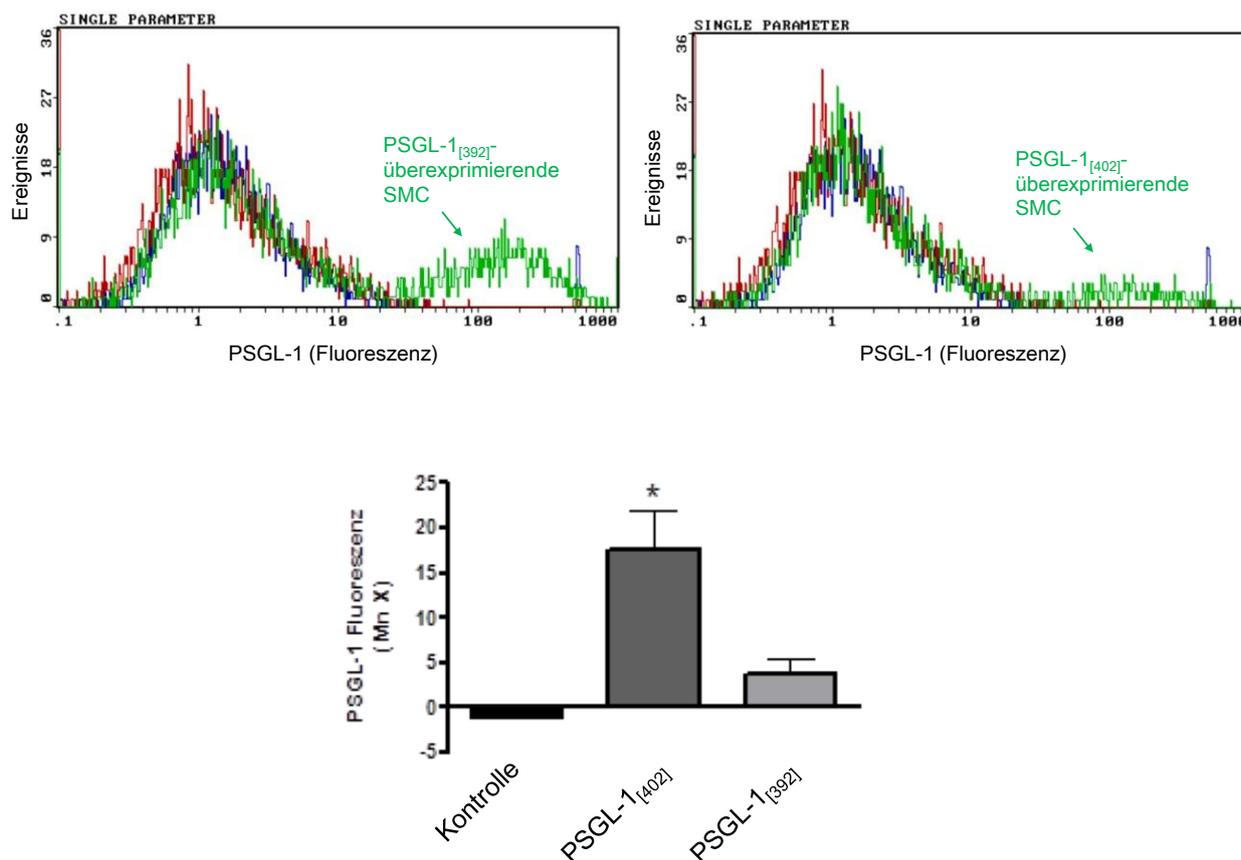


Abbildung 3-21 Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächen-Expression von PSGL-1 auf α -PSGL-1-PE-markierten SMC. Isotyp (blau), nicht-transduzierte SMC (rot; Kontrolle), PSGL-1_[392]- und PSGL-1_[402]-transduzierte SMC (grün; PSGL-1_[392] und PSGL-1_[402]). Gezeigt sind repräsentative Originalhistogramme (oben) und die quantitative Auswertung von n=4 unabhängigen Experimenten (unten). *p<0,01 zur Kontrolle.

3.5.2 Überprüfung der funktionellen Domäne von PSGL-1 auf PSGL-1-überexprimierenden SMC mittels blockierendem Antikörper

Die Konformation der Bindungsdomäne des überexprimierten PSGL-1 wurde durchflusszytometrisch mittels eines blockierenden Antikörpers (bAK; α -PSGL-1(KPL1)) überprüft, der an die funktionelle N-terminale Region des Glykoproteins bindet. Die Effekte des bAK wurden vorab an U937-Zellen validiert (Abbildung 3-22). Nach einer 30-minütigen Vor-Inkubation der Zellen mit dem bAK war keine PSGL-1-Oberflächen-Expression auf α -PSGL-1-PE markierten U937-Zellen mehr detektierbar.

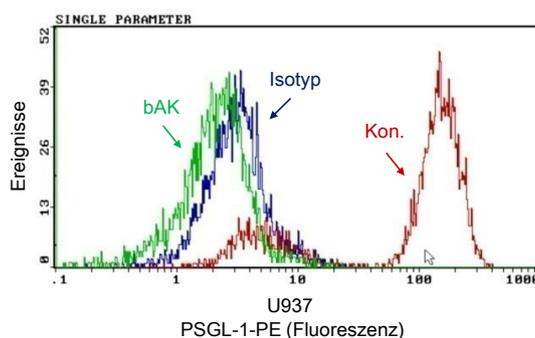


Abbildung 3-22 Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächen-Expression von PSGL-1 auf α -PSGL-1-PE markierten U937-Zellen. Isotyp (blau), unbehandelte U937-Zellen (rot; Kon.) und U937-Zellen nach 30-minütiger Vor-Inkubation mit einem blockierenden Antikörper (bAK) (grün; bAK). Dargestellt ist ein repräsentatives Originalhistogramm von $n=3$ unabhängigen Experimenten.

Anschließend wurden die Effekte des bAK an PSGL-1-überexprimierenden SMC überprüft. Abbildung 3-23 zeigt jeweils das Originalhistogramm eines repräsentativen Experiments. Es ist zu erkennen, dass nicht-transduzierte (3-23a) und mock-transduzierte (3-23b) SMC keine Oberflächenexpression von PSGL-1 zeigten. Folglich konnte auch der bAK keinen Effekt zeigen. Die PSGL-1-viral-transduzierten SMC (Abbildung 3-23c: PSGL-1_[402] und 3-23d: PSGL-1_[392]) zeigten jeweils eine deutliche Oberflächen-Expression von PSGL-1. In Anwesenheit des bAK war PSGL-1 nicht mehr detektierbar. Die statistische Auswertung der Versuche ergab eine vollständige Aufhebung der PSGL-1-Fluoreszenz (Abbildung 3-23e).

Damit konnte eine PSGL-1-Oberflächen-Expression in aus SMC auch nach Verwendung des blockierenden Antikörpers nachgewiesen werden.

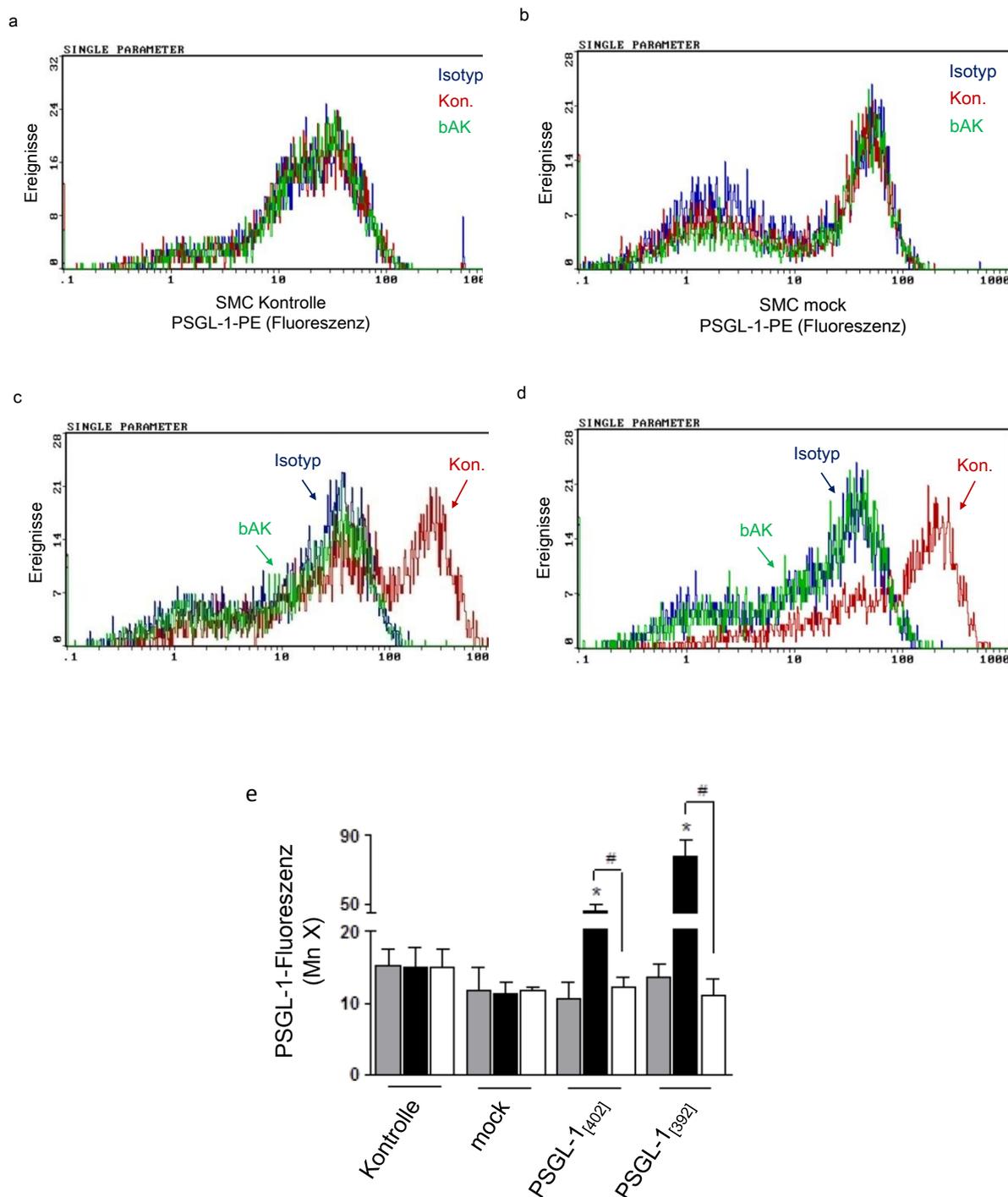


Abbildung 3-23 Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächen-Expression von PSGL-1 auf α -PSGL-1-PE markierten SMC. (a) Unbehandelte SMC (Kontrolle, Kon.), (b) mock-transduzierte SMC (mock), (c) PSGL-1_[402]-transduzierte SMC (PSGL-1_[402]) und (d) PSGL-1_[392]-transduzierte SMC (PSGL-1_[392]). Isotyp (blau), Kontrolle (rot) und nach 30-minütiger Inkubation mit einem blockierenden Antikörper (bAK) (grün). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Originalhistogramm und (e) die quantitative Auswertung (Isotyp-Kontrollen = grau, Zellen + α -PSGL-1-PE = schwarz, Zellen + α -PSGL-1-PE + bAK = weiß) von $n=3$ unabhängigen Experimenten. * $p<0,05$ zur Kontrolle, # $p<0,05$ Zellen + α -PSGL-1-PE zu Zellen + α -PSGL-1-PE + bAK.

3.5.3 Überprüfung der Bindung von PSGL-1 an seinen Interaktionspartner P-Selektin bei PSGL-1-überexprimierenden SMC

Die Bindung von PSGL-1 an seinen Interaktionspartner P-Selektin wurde mittels FITC-konjugiertem, rekombinantem P-Selektin untersucht. Dazu wurden PSGL-1-überexprimierende SMC für 30 min mit FITC-gekoppeltem, rekombinantem P-Selektin inkubiert. Abbildung 3-24 zeigt jeweils eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines repräsentativen Experimentes. Es ist zu erkennen, dass die nicht-transduzierten (3-24a) SMC kein und die mock-transduzierten (3-24b) SMC kaum FITC-konjugiertes, rekombinantes P-Selektin gebunden hatten. Die PSGL-1-transduzierten (3-24c: PSGL-1_[392] und 3-24d: PSGL-1_[402]) SMC zeigten jeweils eine deutliche Bindung des FITC-konjugierten, rekombinanten P-Selektins. Die im oberen Teil des Bildes rot eingerahmten Ausschnitte zeigen jeweils einen yz-axialen Schnitt durch die Zelle; die im rechten Teil des Bildes blau eingerahmten Ausschnitte zeigen jeweils einen xz-axialen Schnitt durch die Zelle, um die Lokalisation der PSGL-1/P-Selektin-Bindung an der Zellmembran zu verdeutlichen.

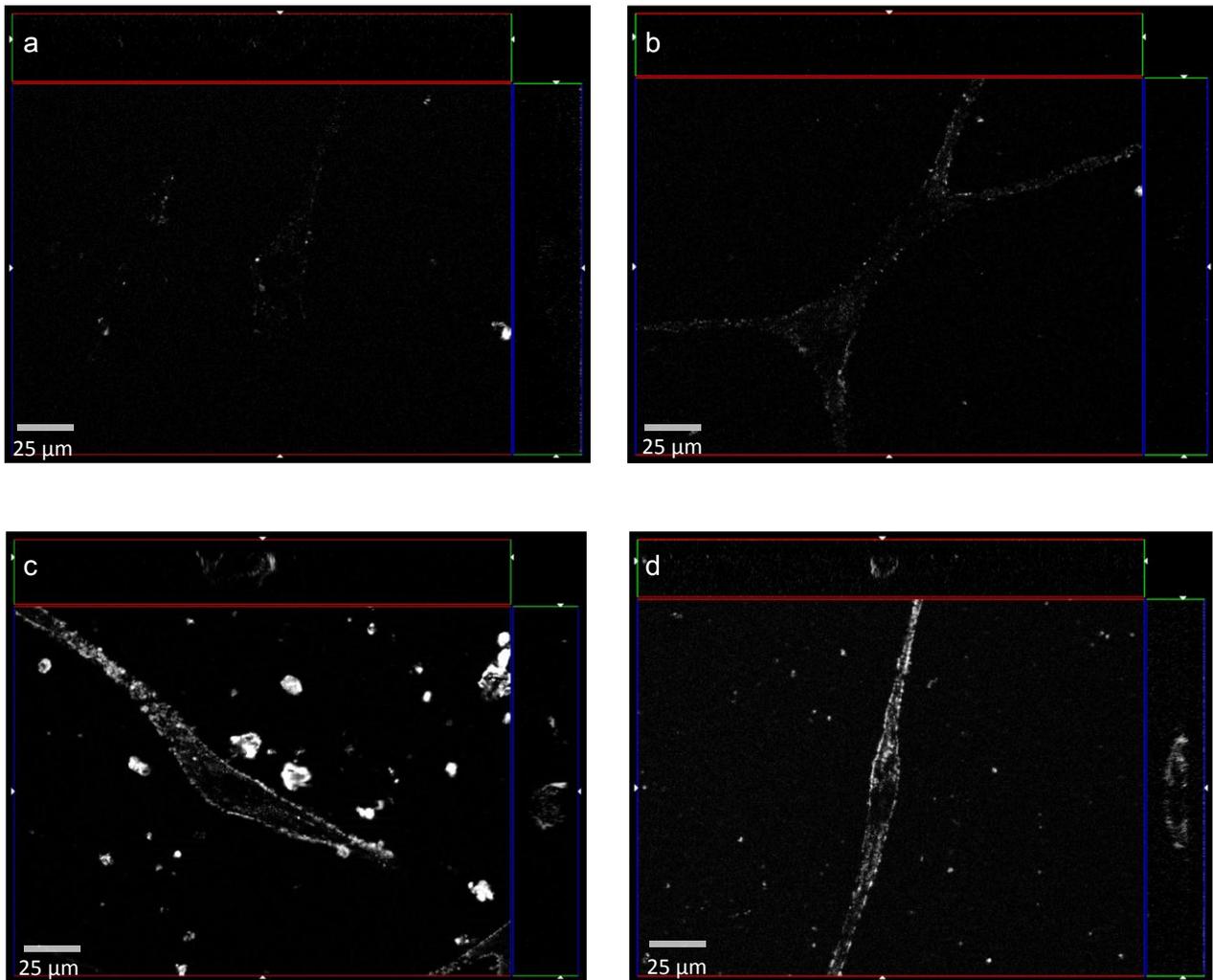


Abbildung 3-24 Histochemische Darstellung der PSGL-1/P-Selektin-Bindung an PSGL-1-überexprimierende SMC. Das gebundene FITC-gekoppelte, rekombinante P-Selektin erscheint in Form kleiner weißer Punkte an der Zellmembran der SMC. (a) Bei unbehandelten SMC konnte keine Bindung von P-Selektin an der Zelloberfläche detektiert werden. (b) An mock-transduzierten SMC wurde wenig P-Selektin an den Zellen gebunden. (c) An PSGL-1_[392]- und (d) PSGL-1_[402]-überexprimierenden SMC konnte deutlich die Bindung von P-Selektin an der Zelloberfläche der SMC gezeigt werden. Dargestellt ist eine für n=3 repräsentative mikroskopische Aufnahme.

Um die physiologische Relevanz von PSGL-1 in den Zellen zu analysieren, wurden im Folgenden Thrombin-stimulierte SMC untersucht.

3.5.4 Thrombin-induzierte PSGL-1-Oberflächen-Expression

Nachdem ein Thrombin-induzierter Anstieg von PSGL-1-mRNA und -Protein in SMC nachgewiesen war (Abschnitt 3.4.2 und 3.4.3), wurde die Expression von PSGL-1 auf der Zelloberfläche untersucht. Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben nach 24-stündiger Thrombin-Stimulation (3 U/ml) keinen Anstieg der PSGL-1-Oberflächen-Expression (Abbildung 3-25).

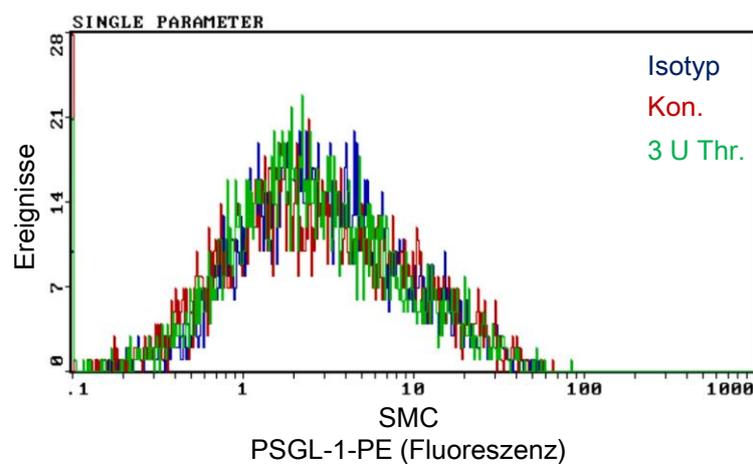


Abbildung 3-25 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächen-Expression von PSGL-1 auf α -PSGL-1-PE markierten SMC. Isotyp (blau), unbehandelte SMC (rot, Kon.) und nach 24-stündiger Stimulation mit Thrombin (grün, 3 U/ml Thrombin). Repräsentatives Originalhistogramm aus $n=3$ voneinander unabhängigen Versuchen.

Damit lässt sich zwar eine verstärkte Protein-Expression von PSGL-1 nach Thrombin-Stimulation nachweisen, aber keine Expression, d.h. Translokation an die Zelloberfläche.

3.5.5 Überprüfung der Bindung von PSGL-1 an seinen Interaktionspartner P-Selektin bei Thrombin-stimulierten SMC

Um zu klären, warum keine Expression von PSGL-1 auf der Zelloberfläche der Thrombin-stimulierten SMC detektiert werden konnte, wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellen angefertigt. Unbehandelte und Thrombin (3 U/ml, 24 h)-stimulierte SMC wurden 30 min mit FITC-gekoppeltem, rekombinantem P-Selektin inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 3-26 zeigen, dass weder bei den unbehandelten (3-26a) noch bei den Thrombin-

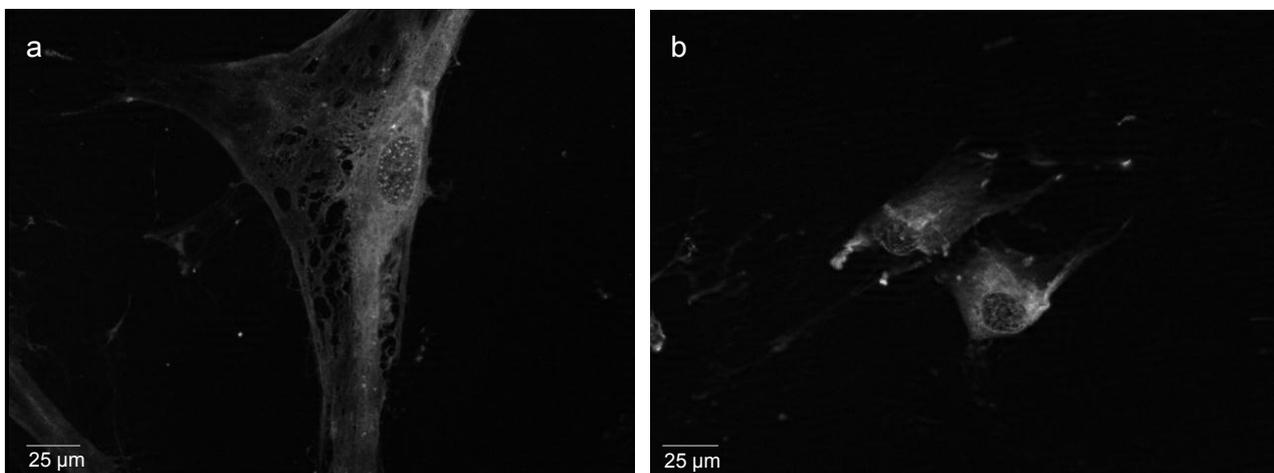


Abbildung 3-26 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von (a) unbehandelten und (b) Thrombin-stimulierten SMC nach 30-minütiger Inkubation mit FITC-gekoppeltem, rekombinantem P-Selektin. Eine Bindung von P-Selektin an PSGL-1 hatte nicht stattgefunden. Dargestellt ist jeweils eine für $n=3$ repräsentative mikroskopische Aufnahme.

3.5.6 Untersuchungen zur Lokalisation von PSGL-1 in Thrombin-stimulierten SMC

Zur Lokalisation von PSGL-1 wurden sowohl unbehandelte als auch Thrombin-stimulierte (3 U/ml, 24 h), permeabilisierte Zellen mit dem PE-gekoppelten PSGL-1 Antikörper inkubiert (30 min) und mikroskopisch analysiert (Abbildung 3-27). Dabei bestätigte sich, dass die unbehandelten SMC (Abbildung 3-27a) kaum PSGL-1-Protein exprimierten; in Anwesenheit von Thrombin wurde das Protein deutlich aufreguliert. Jedoch war PSGL-1 praktisch ausschließlich im Cytosol lokalisiert.

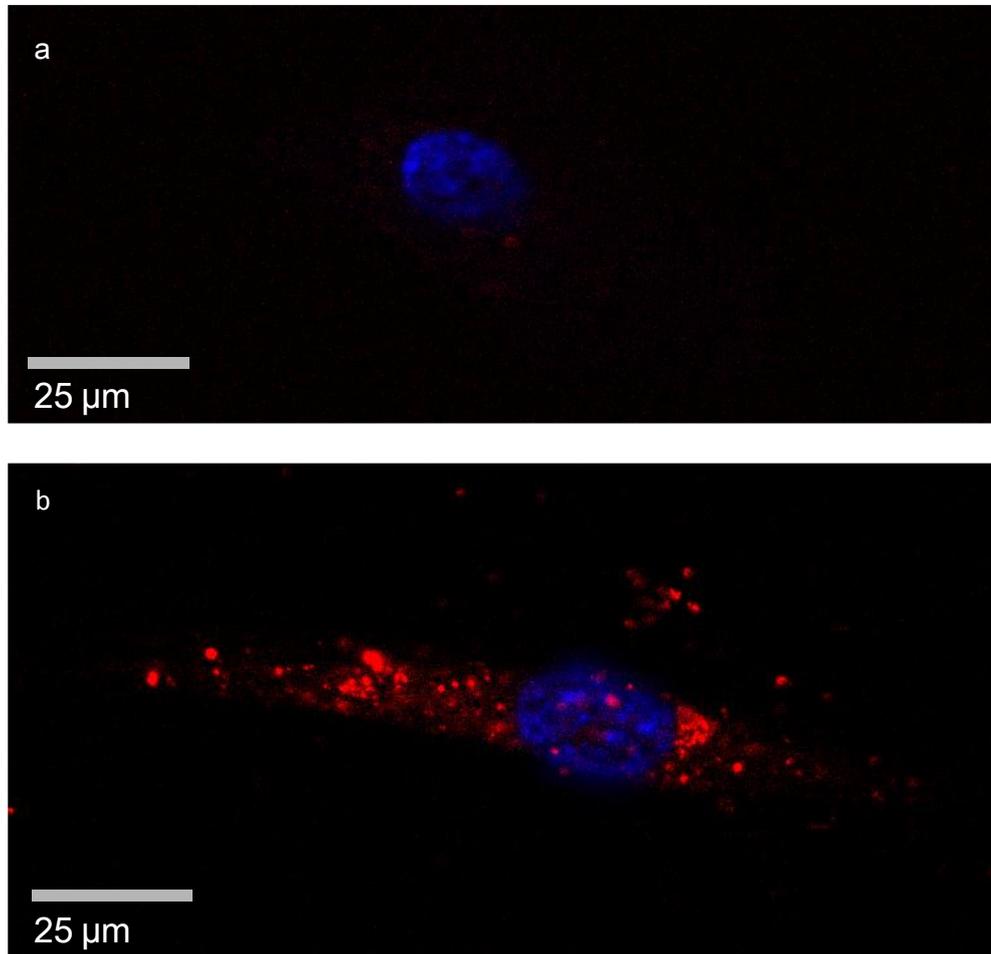


Abbildung 3-27 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation von PSGL-1 in permeabilisierten, α -PSGL-1-PE markierten SMC. (a) Die unbehandelten SMC exprimierten kaum PSGL-1-Protein. (b) Die Thrombin (3 U/ml, 24 h)-stimulierten SMC exprimierten PSGL-1-Protein, welches vor allem im Cytosol lokalisiert war. Dargestellt ist jeweils eine für $n=3$ repräsentative mikroskopische Aufnahme.

Um Aufschluss über die Funktionalität von PSGL-1 zu erhalten, wurden unbehandelte sowie Thrombin (3 U/ml, 24 h)-stimulierte SMC mit Methanol permeabilisiert, mit FITC-gekoppeltem, rekombinantem P-Selektin inkubiert (30 min) und mikroskopisch analysiert (Abbildung 3-28). An den unbehandelten SMC (Abbildung 3-28a) konnte keine Bindung von P-Selektin an PSGL-1

detektiert werden. Bei den Thrombin-stimulierten SMC hingegen konnte eine P-Selektin-Bindung an das intrazellulär vorliegende PSGL-1 nachgewiesen werden (Abbildung 3-28b).

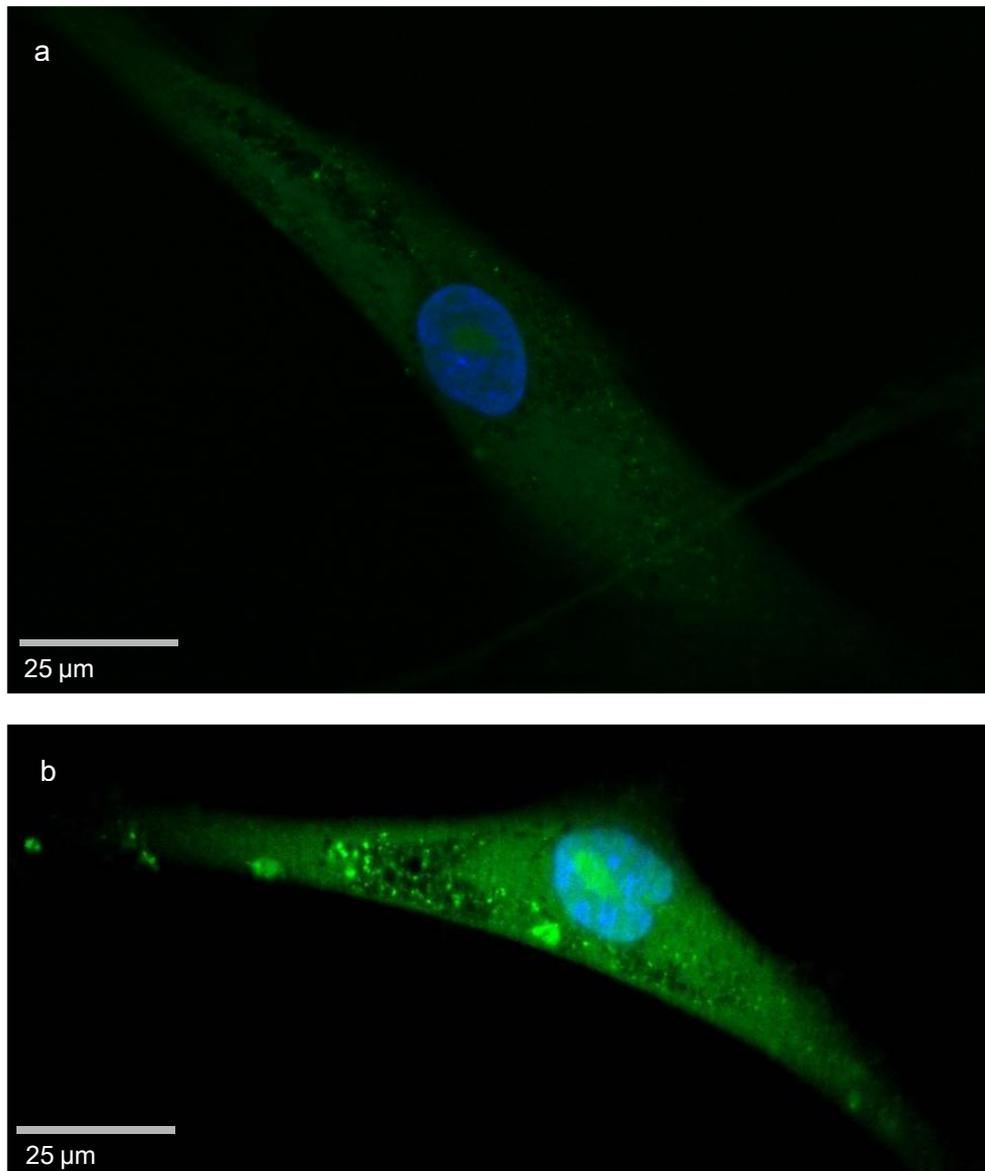


Abbildung 3-28 Bindung von FITC-gekoppeltem, rekombinantem P-Selektin an PSGL-1 in permeabilisierten SMC. (a) Unbehandelte SMC ohne Bindung von P-Selektin an PSGL-1. (b) Intrazellulär vorliegendes PSGL-1 der Thrombin (3 U/ml, 24 h)-stimulierten SMC mit P-Selektin-Bindung. Dargestellt ist jeweils eine für $n=3$ repräsentative mikroskopische Aufnahme.

Diese Ergebnisse zeigen, dass SMC funktionsfähiges PSGL-1 exprimieren können, welches mit P-Selektin interagieren kann. Thrombin bewirkte zwar eine Induktion von funktionsfähigem PSGL-1, dieses verblieb aber in der Zelle und wurde nicht an die Zellmembran transloziert.

3.5.7 U 46619-induzierte Ausschleusung von PSGL-1 aus Thrombin-stimulierten SMC

Um zu überprüfen, ob die Ausschleusung von PSGL-1 aus SMC an die Zelloberfläche einen Ko-Stimulus benötigt, wurden die SMC 18 h nach Thrombin-Stimulation (3 U/ml) für sechs Stunden mit dem Thromboxan A₂-Mimetikum U 46619 (3 µM) ko-stimuliert. Dieses wurde gewählt, weil Thromboxan-Mimetika auch über G_q Signale vermitteln und daher ein synergistischer Effekt mit Thrombin zu erwarten war. Auch hatte unser Labor früher gezeigt, dass Thrombin die Expression von Thromboxan-Rezeptoren (TP) in SMC aufreguliert (Zucker *et. al*, 1998), was eine Wirkungsverstärkung erwarten ließ. Daher wurden SMC mit FITC-gekoppeltem, rekombinantem P-Selektin inkubiert und mikroskopisch analysiert (Abbildung 3-29). Die zusätzliche Stimulation der SMC mit U 46619 hat neben der Veränderung der phänotypischen Zellform von spindel- (vgl. Abbildung 3-28b) zu sternförmig auch eine Ausschleusung von PSGL-1 auf die Zelloberfläche zur Folge.

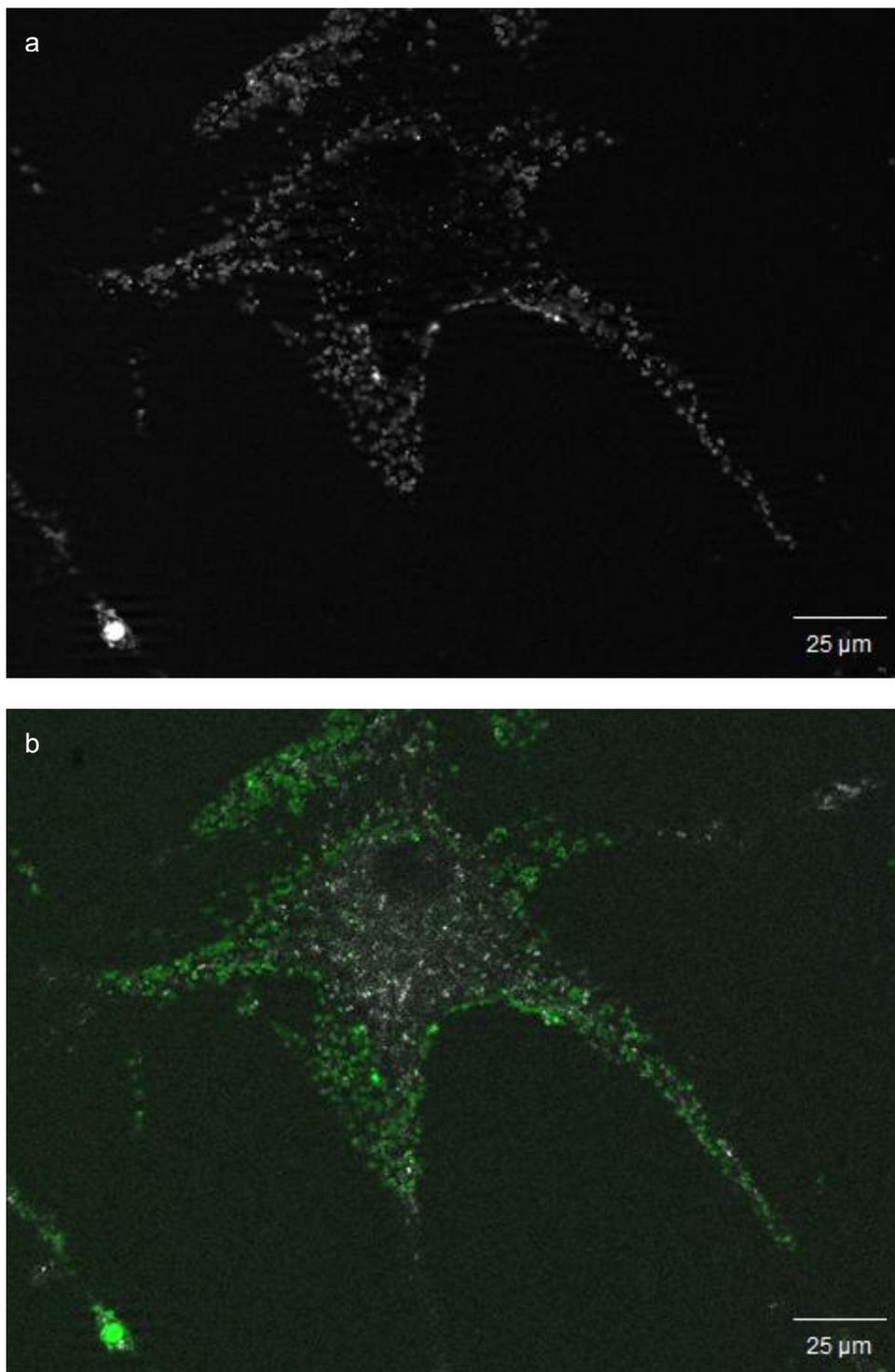


Abbildung 3-29 Nachweis der Bindung von FITC-gekoppeltem, rekombinantem P-Selektin an PSGL-1 auf SMC. Dargestellt ist eine glatte Gefäßmuskelzelle nach Stimulation mit Thrombin (3 U/ml, 24 h) und U 46619 (3 µM, 6 h). Durchlichtaufnahme (a): Die Form der Zelle hat sich von ursprünglich langgezogen, spindelförmig (vgl. Abbildung 3-28b) in sternförmig verändert, vermutlich Ausdruck einer Kontraktion. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (b): Durch die Ko-Stimulation der SMC mit Thrombin (3 U/ml, 24 h) und U 46619 (3 µM, 6 h) wurde PSGL-1 auf die Zelloberfläche ausgeschleust und konnte an seinen Interaktionspartner P-Selektin binden. Dargestellt ist eine für n=5 repräsentative mikroskopische Aufnahme.

Um nachzuweisen, dass die Expression von PSGL-1 auf der Oberfläche der SMC auf den Effekt des U 46619 zurückzuführen ist, wurde der Thromboxan A₂-Rezeptor-Antagonist SQ 29,548 eingesetzt. Die SMC wurden für insgesamt 24 h mit Thrombin (3 U/ml) stimuliert. Nach 18-stündiger Inkubationszeit wurde der SQ 29,548 (1 µM) zugefügt und 30 Minuten später wurden die SMC zusätzlich mit U 46619 (3 µM) stimuliert. Nach insgesamt 24 h wurden die Zellen mit FITC-gekoppeltem, rekombinantem P-Selektin markiert und mikroskopisch analysiert. Zur Kontrolle dienten Thrombin (3 U/ml, 24 h)-stimulierte SMC (Abbildung 3-30).

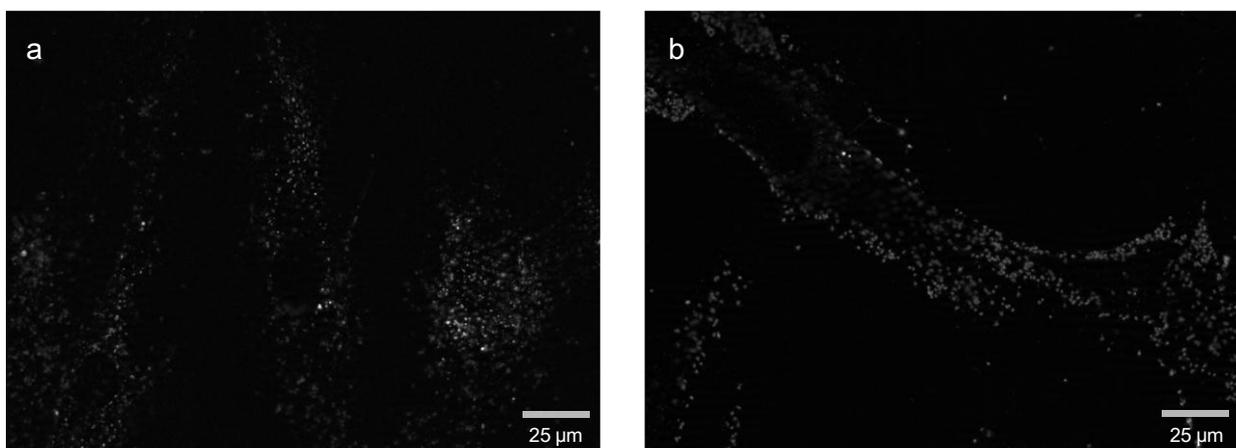


Abbildung 3-30 Aufhebung der PSGL-1-Expression an der Zelloberfläche durch SQ 29,548. (a) Thrombin (3 U/ml, 24 h)-stimulierte SMC zeigten keine Bindung von FITC-gekoppeltem, rekombinantem P-Selektin auf der Zelloberfläche. (b) Die Ko-Stimulation der SMC von Thrombin (3 U/ml, 24 h) und SQ 29,548 (1 µM, 6 h), gefolgt von U 46619 (3 µM) 30 min später, ließ –verglichen mit den Thrombin-stimulierten SMC- keinen Unterschied der PSGL-1-Expression auf SMC erkennen. Dargestellt ist eine für n=4 repräsentative mikroskopische Aufnahme.

Die Ko-Inkubation der SMC mit Thrombin (3 U/ml, 24 h) und dem Thromboxan A₂-Mimetikum U 46619 (3 µM, 6 h) führte zur Expression von PSGL-1 auf der Oberfläche der SMC. Dieser Effekt wurde durch den Thromboxan A₂-Rezeptor-Antagonisten SQ 29,548 (1 µM) unterdrückt. Somit konnte gezeigt werden, dass die Ausschleusung von PSGL-1 auf die Zelloberfläche der SMC nach Ko-Stimulation der Zellen mit U 46619 möglich war.

In durchflusszytometrischen Messungen, für die die SMC ebenfalls mit Thrombin (3 U/ml, 24 h) und U 46619 (3 μ M, 6 h und 5,5 h) stimuliert wurden, konnte keine Expression von PSGL-1 auf der Oberfläche von α -PSGL-1-PE markierten SMC gemessen werden. Somit konnte auch der inhibitorische Effekt des SQ 29,548 (1 μ M, 6 h) auf die Ausschleusung der SMC (siehe auch Seite 62) nicht gezeigt werden (Abbildung 3-31).

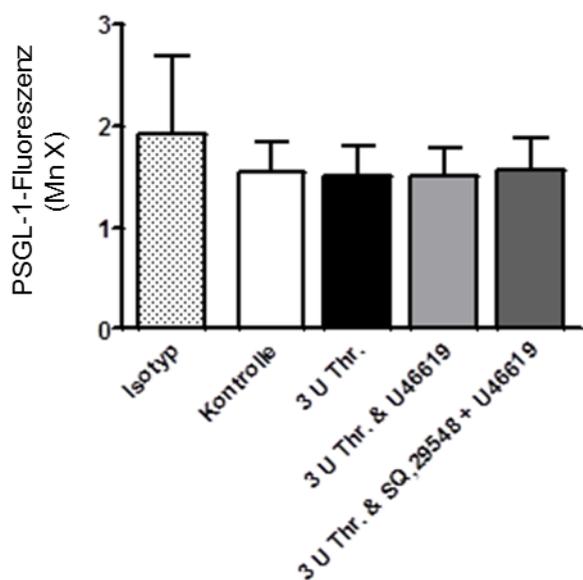


Abbildung 3-31 Durchflusszytometrische Analyse zur Oberflächen-Expression von PSGL-1 auf SMC. PSGL-1 konnte weder auf den unstimulierten (Kontrolle) noch auf den Thrombin (3 U Thr)-stimulierten SMC nachgewiesen werden. Auch durch Ko-Stimulation der Thrombin-stimulierten Zellen mit U 46619 (3 μ M) konnte PSGL-1 nicht auf den SMC detektiert werden; somit konnte auch der inhibitorische Effekt durch SQ 29,548 (1 μ M) nicht gezeigt werden. Dargestellt ist die quantitative Auswertung von $n=7$ unabhängigen Experimenten.

SMC exprimieren demnach funktionell aktives PSGL-1. Das kann durch Thrombin-Stimulation signifikant aufreguliert werden, wird aber nicht an die Zelloberfläche transloziert. Das Thromboxan A₂-Mimetikum (U 46619) als Ko-Stimulans induziert die Ausschleusung von PSGL-1 an die Zelloberfläche. Die Oberflächen-Expression von PSGL-1 auf SMC konnte dennoch an Hand durchflusszytometrischer Messungen nicht detektiert werden. Jedoch konnte die Expression von PSGL-1 auf der Zelloberfläche nach Ko-Stimulation der zuvor Thrombin-stimulierten SMC mit U 46619 an Hand fluoreszenz-mikroskopischer Aufnahmen zweifelsfrei nachgewiesen werden. Eine Erklärung dieser differenten Befunde ist schwierig.

4 Diskussion

Eine Expression von funktionell aktivem PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1) ist vor allem für Leukozyten und Thrombozyten bekannt. Auch heute befassen sich die meisten Untersuchungen zu Expression, Regulation und Funktion von PSGL-1 mit Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Als Interaktionspartner von P-Selektin, welches auf aktiviertem Endothel und aktivierten Thrombozyten exprimiert wird, vermittelt PSGL-1 die Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelzellen sowie Leuko- und Thrombozyten (Moore, 1998). In diesem Zusammenhang wird PSGL-1 eine wichtige Funktion bei der Adhäsion von Zellen während inflammatorischen Prozessen zugeschrieben (Cummings, 1999). Neben der Expression von PSGL-1 in hämatopoetischen Zellen fanden Laszik *et al.* (1996) auch eine Expression von PSGL-1 in nicht-hämatopoetischen Zellen, z.B. den Epithelzellen der Eileiter, den Langerhans-Zellen in der Haut und den Kupffer-Sternzellen in der Leber. Verglichen mit Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimierten nicht-hämatopoetische Zellen PSGL-1 allerdings nur in sehr geringen Mengen. Die funktionelle Bedeutung von PSGL-1 in nicht-hämatopoetischen Zellen wurde in diesen Arbeiten nicht weiter überprüft (Laszik *et al.*, 1996). Erst kürzlich wurden Expression und Funktionalität von PSGL-1 in Endothelzellen sowie auf Endothelzellen atherosklerotischer Läsionen nachgewiesen. Obwohl auch hier nur verhältnismäßig geringe Mengen von PSGL-1 gefunden wurden, konnte für PSGL-1 eine Beteiligung an der Rekrutierung von Mono- und Thrombozyten nachgewiesen werden (Martins *et al.*, 2007). Studien über die Expression oder gar Funktionalität von PSGL-1 in glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) liegen bisher nicht vor. Es ist daher nicht bekannt, ob PSGL-1 in SMC nach Kontakt mit dem strömenden Blut, z.B. bei einer Gefäßverletzung oder atherosklerotischen Gefäßwandschädigung zur Rekrutierung von Mono- und Thrombozyten und damit letztlich den Heilungsprozessen beiträgt.

Zur Klärung dieser Frage wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Expression von PSGL-1 in humanen SMC untersucht. Dabei gelang es erstmals, das Vorkommen von PSGL-1 nachzuweisen. Als erstes wurde eine Expression von PSGL-1 auf mRNA-Ebene gefunden. Ein Vergleich der basalen Expression des PSGL-1-Transkriptes aus SMC mit der der monozytären Zelllinie U937, die als Referenzsystem verwendet wurde (Stampfuss *et al.*, 2008), zeigte, dass SMC unter Ruhebedingungen deutlich weniger PSGL-1 exprimieren als U937-Zellen – nur etwa

2 %. Eine konstitutive Proteinexpression, die für U937-Zellen eindeutig vorhanden war, konnte für SMC nicht nachgewiesen werden. Es lag daher nahe, dass der Grund für den fehlenden Proteinnachweis in der zu geringen Genexpression von PSGL-1 zu suchen war. Alternativ war auch denkbar, dass verschiedene Transkripte der mRNA für PSGL-1 bei Monozyten und SMC existieren können und nicht alle auch zu einer Translation in ein Protein befähigt sind.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde daher die mRNA aus SMC kloniert. Dabei ergaben sich bei einer Restriktionsanalyse tatsächlich zwei PSGL-1-Isoformen mit 392 bzw. 402 Aminosäuren (AS): PSGL-1_[392] und PSGL-1_[402]. Beide PSGL-1-Formen wurden sequenziert. Die Sequenzanalyse für PSGL-1_[402] ergab eine 100 %ige Homologie zur bekannten PSGL-Sequenz in HL-60-Zellen (Sako *et al.*, 1993, Accession-Nr.: NM_003006). Die Nukleotidsequenz von PSGL-1_[402] kodierte für ein Protein von 402 AS mit 15 *Repeating Units*, die jeweils 10 AS enthalten. Die Analyse für PSGL-1_[392] ergab eine Nukleotidsequenz, welche für ein Protein aus 392 AS kodierte und nur 14 statt 15 dekamerische Repeats umfasste. In welchem dekamerischen Repeat der Unterschied zwischen PSGL-1_[402] und PSGL-1_[392] lag, war nicht sicher festzustellen, konnte aber auf zwei potentiell in Frage kommende Bereiche eingegrenzt werden (Abbildung 3-7).

Dass unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche PSGL-1-Formen exprimieren, ist bekannt. Neben der 15 dekamerische AS-Repeats umfassenden PSGL-1-Form aus HL-60-Zellen (Sako *et al.*, 1993) und monozytären U937-Zellen, wurde auch eine PSGL-1-Form aus Zellen der humanen Plazenta und humanen neutrophilen Granulozyten beschrieben, die 30 zusätzliche Nukleotide enthielt. Diese waren in der Region des zweiten dekamerischen Repeats lokalisiert und umfassten somit 16 dekamerische AS-Repeats (Veldman *et al.*, 1995). In Lymphozyten wurde das Vorkommen von PSGL-1 mit einer variablen Form von dekamerischen AS-Repeats (Tandem-Repeats) beschrieben: es fanden sich Polymorphismen mit 14, 15 und 16 Tandem-Repeats (Afshar-Kharghan *et al.*, 2001). Von HEK-Zellen ist bekannt, dass diese zwei Kopien der 16 dekamerischen AS-Repeats umfassenden PSGL-1 Form beinhalten, jedoch auf Grund der fehlenden Möglichkeiten für die posttranslationalen Modifikationen, PSGL-1-Protein nicht exprimieren können. Ohne die Ko-Transfektion von $\alpha(1,3/1,4)$ Fucosyltransferase (3/4FT) können HEK-Zellen das PSGL-1-Protein nicht exprimieren (Barboux *et al.*, 2010). Gleiches gilt für COS-Zellen: ohne die zusätzliche Transfektion mit 3/4FT waren COS-Zellen nicht in der Lage, das Protein zu synthetisieren. Des Weiteren fehlen ihnen die Voraussetzungen zur Synthese von Lewissäure (Le^x) oder Sialyl-Lewissäure (sLe^x), welche unabdingbarer Bestandteil für die Bindung

des Selektinliganden an P-Selektin sind (Sako *et al.*, 1993). Western Blots zur Protein-Detektion von PSGL-1 in SMC ergaben ein Bandenmuster, welches sich erheblich von dem der als Positivkontrolle verwendeten U937-Zellen als auch von dem der als Negativkontrolle eingesetzten HEK 293-Zellen unterschied. Insgesamt konnte daher eine PSGL-1-Protein-Expression mit diesen Versuchen weder gezeigt noch ausgeschlossen werden.

Wahrscheinliche Erklärung für den fehlenden Nachweis einer Proteinsynthese war das relativ niedrige Expressionsniveau der PSGL-1-mRNA in SMC, so dass die Expression des Proteins evtl. unterhalb der Nachweisgrenze lag. Alternativ war auch denkbar, dass SMC nicht über die translationalen/posttranslationalen Modifikationsmöglichkeiten verfügen, um aus der mRNA das funktionsfähige Protein zu synthetisieren. Zur Prüfung dieser Hypothesen wurden in einem lentiviralen System beide in den SMC gefundenen PSGL-1-Formen überexprimiert. Der Vergleich von nicht-transduzierten Kontrollzellen und virus-transduzierten SMC ergab keinen Einfluss der Lentiviren auf die Viabilität der Zellen, ebenso war die basale Expression von PSGL-1 nicht beeinflusst. Die Proteinproben der PSGL-1-überexprimierenden Zellen ergaben dagegen im Western Blot ein Bandenmuster, welches mit dem der U937-Zellen und bereits publizierten Ergebnissen anderer Autoren übereinstimmte (Matsumoto *et al.*, 2007). Auch auf der Zelloberfläche konnte PSGL-1 nach Überexpression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass SMC neben dem PSGL-1 Transkript auch über die notwendigen Voraussetzungen zur posttranskriptionellen und posttranslationalen Modifikation von PSGL-1 verfügen, einschließlich dessen Transduktion zur Zelloberfläche.

Dies ließ vermuten, dass die PSGL-1-Expression in SMC dynamisch reguliert werden kann und dass vielleicht entsprechende Agonisten existieren, die unter natürlichen Bedingungen diese Regulation vermitteln. Eine Aufregulation des Proteins würde funktionell eine verstärkte P-Selektinbindung und biochemisch einen Nachweis des Proteins ermöglichen. In der Literatur wurde sowohl eine Ab- als auch eine Aufregulation von PSGL-1 beschrieben. Davenpeck *et al.* (2000) postulierten eine Abnahme der PSGL-1-Expression auf der Zelloberfläche PAF (*Platelet Activating Factor*)- und PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate)-aktivierter Neutrophiler innerhalb von Minuten. Frühere Untersuchungen unseres Labors (Stampfuss *et al.*, 2008) zeigten ein vollständiges Verschwinden der PSGL-1-Oberflächenexpression auf apoptotischen humanen Monozyten. 2009 fanden Almulki *et al.* eine Aufregulation von PSGL-1 auf Leukozyten nach einer Endotoxin-induzierten Uveitis. Martins *et al.* (2007) beschrieben erstmals die PSGL-1-Expression

in Endothelzellen, konnten jedoch keine Regulation von PSGL-1 nach Thrombin-Stimulation feststellen. In SMC wurden allerdings eine Reihe von Genen identifiziert, die durch Thrombin aufreguliert wurden (Stenina, 2003, Kaber *et al.*, unpubl.).

In dieser Arbeit wurde Thrombin als Stimulus gewählt, um die mögliche Agonist-induzierte Regulation von PSGL-1 zu untersuchen. Inkubation von SMC mit humanem α -Thrombin über einen Gesamtzeitraum von 48 h führte zu einer deutlichen Aufregulation der PSGL-1-Gen-Expression mit einem Maximum nach 24 h. Dies führte auch zu einer gesteigerten Expression von PSGL-1-Protein: nach 16-stündiger Inkubation der Zellen mit humanem α -Thrombin war erstmalig PSGL-1-Protein in SMC im Western Blot detektierbar und erreichte 24 Stunden nach Thrombingabe ein Maximum. Danach nahm der PSGL-1-Proteingehalt in den Zellen wieder ab. Das aufregulierte PSGL-1-Protein entsprach der PSGL-1_[402]-Form. Ein Anstieg der PSGL-1_[392]-Expression durch Thrombin-Stimulation wurde nicht gesehen. Dies ist möglicherweise darauf zurück zu führen, dass diese Isoform von den Zellen weniger häufig exprimiert wird: nur vier von insgesamt 12 überprüften Proben aus der Klonierung ergaben die 392 AS-umfassende PSGL-1-Form (Abbildung 3-5). Damit ist zweifelsfrei gezeigt, dass PSGL-1 in humanen SMC durch Thrombin reguliert wird und der Grund für den fehlenden Proteinnachweis unter Ruhebedingungen sehr wahrscheinlich die geringe konstitutive Expression ist.

Damit stellte sich jetzt die Frage, über welchen Protease-aktivierten Rezeptor (PAR) diese Thrombin-induzierte transkriptionelle Aufregulation von PSGL-1 zustande kommt. Thrombin entfaltet seine zellulären Wirkungen über die Aktivierung von PAR (Coughlin, 2000). Die Expression und Funktionalität des PAR1 (Kanthou *et al.*, 1995a), des PAR3 (Bretschneider *et al.*, 2003) und des PAR4 (Bretschneider *et al.*, 2001) war in SMC der humanen *Vena saphena* bereits nachgewiesen worden. In SMC-reichen Regionen atherosklerotischer Plaques findet sich eine signifikante Expression der Thrombinrezeptoren und die verletzungsbedingte Aufregulation der PAR in SMC erfolgt innerhalb von wenigen Stunden (Schrör *et al.*, 2010). Eine mögliche Beteiligung der Thrombin-Rezeptoren an der Aufregulation von PSGL-1 wurde an Hand spezifischer PAR-aktivierender Peptide (AP) untersucht. Die PAR-AP entsprechen der zugehörigen Sequenz des jeweiligen Liganden und aktivieren direkt die einzelnen PAR-Subtypen (Vu *et al.*, 1991, Faruqi *et al.*, 2000). Die Induktion der PSGL-1-mRNA in SMC wurde über PAR1-AP vermittelt, was sich in einer signifikanten Expressionszunahme der PSGL-1-mRNA zeigte. Die Effekte von PAR3- und PAR4-AP auf die PSGL-1-Gen-Expression waren marginal.

Auffällig waren hier deutliche Unterschiede im Expressionsniveau der PSGL-1-mRNA in SMC nach Stimulation mit Thrombin (vergleiche Abbildung 3-14, 3-17 und 3-19). Diese sind möglicherweise methodisch bedingt. Die SMC wurden jeweils aus der *Vena saphena* verschiedener Patienten, die einen Bypass erhielten, präpariert. Genauere Angaben über die Spender (z.B. Geschlecht, Alter, Krankheiten, Medikationen etc.) waren aus Datenschutzgründen nur unvollständig zu erhalten. Ob dies die Ursache des unterschiedlichen Expressionsniveaus der PSGL-1-mRNA war, konnte nicht überprüft werden. Eine zu der Gen-Expression korrelierende PAR1-AP vermittelte Zunahme von PSGL-1-Protein wurde jedenfalls nicht gefunden. Auch hier lag das Expressionsniveau von PSGL-1 wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze.

Stimulation der PAR durch Thrombin führt zur Aktivierung verschiedener distaler Signaltransduktionswege. Die Signaltransduktion über G_q lässt eine Signalweiterleitung über den Phospholipase C (PLC) – Inositoltriphosphat (IP3) – Proteinkinase C (PKC) – Weg erwarten, was auch gezeigt wurde (Hirano und Kanaide, 2003). Des Weiteren ist bekannt, dass Thrombin verschiedene Transkriptionsfaktoren, darunter auch NF κ B, aktiviert (Nakajima *et al.*, 1994, Edmead *et al.*, 1999). NF κ B ist ein pleiotroper Regulator vieler Gene, der die 5'-GGGGAGTTTTCCC-3'-Sequenz erkennt. Diese Sequenz wurde in einer Promotoranalyse, die über www.genomatrix.de durchgeführt wurde, für PSGL-1 gefunden. Zum Nachweis einer Beteiligung von PKC und NF κ B an dieser Thrombin-induzierten Signaltransduktion, wurden ein NF κ B Inhibitor (NF κ B-I) und der PKC Inhibitor Calphostin c (Cal c) verwendet. Die Inhibitoren allein beeinflussten die basale Expression von PSGL-1 nicht. Dagegen kam es aber zu einer signifikanten Hemmung der Aufregulation der PSGL-1-mRNA 24 h nach Thrombin-Stimulation. Bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren und Thrombin verblieb die PSGL-1-mRNA-Expression auf dem Niveau der Basal-Expression. In parallelen Western Blot Experimenten konnte eine PSGL-1-Protein-Expression erwartungsgemäß nur in den Thrombin-stimulierten Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung der PKC und von NF κ B als wichtige distale Signalmoleküle der Thrombin-induzierten Stimulation der Gen-Expression von PSGL-1 schließen. Dies schließt natürlich die Beteiligung weiterer Signalwege nicht aus.

Nachdem eine Regulation der PSGL-1-Expression in SMC nachgewiesen war, wurde abschließend untersucht, ob diese aufregulierten P-Selektin Bindungsstellen auch tatsächlich mehr P-Selektin binden. Schon vor zwanzig Jahren wurde PSGL-1 in myeloiden HL-60-Zellen als spezifischer Interaktionspartner für P-, L- und E-Selektin beschrieben. Moore *et al.* (1998)

untersuchten, ob PSGL-1 die Adhäsion von Leukozyten an P-Selektin beeinflusst. In einem Flusskammer-Modell konnten sie unter Verwendung eines blockierenden Antikörpers (Anti-PSGL-1 mAB, PL1) zeigen, dass PSGL-1 für die Adhäsion der Neutrophilen an die CHO-Zellen erforderlich ist. Außerdem zeigten sie, dass das Rollen der Neutrophilen auf den P-Selektin-exprimierenden CHO-Zellen durch die Infusion des blockierenden Antikörpers PL1 in die Flusskammer inhibiert wurde. *In vivo*-Versuche an Ratten bestätigten diese Ergebnisse und belegten damit die funktionelle Interaktion von PSGL-1 und P-Selektin unter physiologischen Bedingungen (Moore *et al.*, 1998). Eine Interaktion von PSGL-1 und P-Selektin ist sowohl für die Blutgerinnung (Palabrica *et al.*, 1992) als auch die Thrombogenese belegt (Falati *et al.*, 2003). Sie führt in verletzten Gefäßarealen zur Adhäsion und später zu Thrombozyten/Leukozyten-Aggregaten und ist damit auch Initialereignis einer durch Plaqueruptur ausgelösten Thrombusbildung beim akuten Koronarsyndrom (Kehrel *et al.*, 2008).

Die Thrombin-induzierte Zunahme der Expressionssteigerung von PSGL-1-Protein sowie die ebenfalls nachgewiesene Proteintranslokation bei den lentiviral transduzierten Zellen sollten auch zu einer Zunahme des Oberflächenproteins nach Thrombin-Stimulation führen. Eine solche Expression von PSGL-1 auf der Zelloberfläche konnte durchflusszytometrisch jedoch trotz intensiven Bemühens nicht nachgewiesen werden. Eine ungenügende Sensitivität der Durchflusszytometrie als Meßmethode ist unwahrscheinlich. Auch eine fehlende Transportmöglichkeit aus dem Cytosol zur Zellmembran ist auszuschließen, da durchflusszytometrische Analysen an PSGL-1-überexprimierenden SMC zeigten, dass sowohl die kurze als auch die lange Form des Liganden auf der Oberfläche exprimiert wurden. Schließlich wurde ein spezifischer, blockierender PSGL-1-Antikörper (Snapp *et al.*, 1998) eingesetzt, um Aufschluss über die Bindungsmöglichkeit der N-terminalen Region zu erhalten, die die Bindungsdomäne für die Interaktion von PSGL-1 und P-Selektin enthält. Die Effektivität dieses blockierenden Antikörpers (bAK) wurde zunächst an U937-Zellen validiert. Durch 30-minütige Vor-Inkubation der PSGL-1-überexprimierenden Zellen mit bAK konnte die Oberflächen-Expression beider PSGL-1-Formen auf α -PSGL-1-PE-markierten SMC nicht mehr detektiert werden. Diese, mit denen der U937-Zellen korrelierenden Ergebnisse, lassen darauf schließen, dass die Bindungsdomäne von PSGL-1 in SMC die Voraussetzungen erfüllt, um eine Bindung mit einem Interaktionspartner einzugehen. Um im Folgenden die Funktionalität von PSGL-1 in SMC weiter zu untersuchen, wurden PSGL-1-überexprimierende Zellen mit FITC-konjugiertem, rekombinantem P-

Selektin inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert (Daten nicht gezeigt). Es konnten jedoch, trotz der scheinbar funktionsfähigen Bindungsdomäne des PSGL-1 in SMC, keine Hinweise auf eine Interaktion von P-Selektin und PSGL-1 detektiert werden. Das detektierte Fluoreszenzsignal der unbehandelten und der PSGL-1-überexprimierenden SMC war identisch. Bereits 1995 demonstrierten Vachino *et al.*, dass PSGL-1 auf ruhenden T- und B-Lymphozyten verhältnismäßig wenig P-Selektin bindet. Bei Aktivierung der Zellen kam es allerdings zu einer signifikant erhöhten P-Selektin-Bindung, jedoch ohne dass sich die PSGL-1-Oberflächen-Expression erhöhte. Die Aktivität von zwei Glykosyltransferasen war nach der Zellaktivierung deutlich gesteigert: die Fucosyltransferase, die die Strukturen der sialylierten Lewissäure generiert und die Core-2-Transferase (Vachino *et al.*, 1995). Martins *et al.* (2007) zeigten in durchflusszytometrischen Analysen, dass ausschließlich stimulierte Endothelzellen die Thrombozytenadhäsion unterstützten. Auf Grund dieser Aussagen wurden sowohl unbehandelte als auch Thrombin-stimulierte SMC mit FITC-konjugiertem, rekombinatem P-Selektin inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte auch bei diesen Experimenten eine Interaktion von P-Selektin und PSGL-1 nicht nachgewiesen werden.

Damit stellt sich die Frage nach den Ursachen. An Hand immunhistochemischer Untersuchungen von PSGL-1-überexprimierenden SMC nach Inkubation mit FITC-konjugiertem, rekombinatem P-Selektin konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Interaktion von PSGL-1 mit P-Selektin stattgefunden hat. Das P-Selektin hatte an das PSGL-1-Protein auf der Zelloberfläche der SMC gebunden (Abbildung 3-24). Identische Versuche wurden an Thrombin-stimulierten SMC durchgeführt, jedoch konnte hierbei keine Bindung von P-Selektin an PSGL-1 auf der Zelloberfläche detektiert werden. Deshalb wurde im Folgenden die Lokalisation von PSGL-1 in Thrombin-stimulierten, permeabilisierten und α -PSGL-1-PE-markierten SMC überprüft. Dabei zeigte sich, dass das aufregulierte Protein fast ausschließlich intrazellulär vorlag und nicht an die Zelloberfläche transferiert wurde. Eine Inkubation ebenfalls Thrombin-stimulierter, permeabilisierter SMC mit FITC-gekoppeltem, rekombinatem P-Selektin ergab ein identisches Ergebnis: PSGL-1 verblieb innerhalb der SMC. Dies belegt, dass SMC funktionstüchtiges PSGL-1 exprimieren und Thrombin zwar die Aufregulation des Proteins bewirkt, jedoch als alleiniger Stimulus zu schwach ist, um das gebildete Protein an die Zelloberfläche zu transferieren. Möglicherweise bedarf es einer Ko-Stimulation der bereits Thrombin-stimulierten Zellen durch weitere Agonisten.

Hierfür bot sich Thromboxan A₂ an, z.B. in Form des Mimetikums U 46619. Auch Thromboxan aktiviert den PLC/IP3/PKC-Signalweg über eine Bindung an G_q. Frühere Arbeiten unseres Labors hatten gezeigt, dass eine Stimulation von SMC mit Thrombin die Thromboxan-Rezeptoren (TP) glatter Gefäßmuskelzellen des Rindes aufregulierten und dies mit einer gesteigerten Funktionalität, erkennbar an der Phosphorylierung von Substratproteinen und erhöhter Mitogenese, einhergeht (Zucker *et al.*, 1998). Eine solche Ko-Stimulation eines Thromboxan A₂-Mimetikum mit Thrombin wirkt auch in Thrombozyten synergistisch mit Thrombin (Paul *et al.*, 1999). Darüber hinaus steigert U 46619 auch den Ca²⁺-Influx in die Zellen, ein Vorgang, der das Ausschleusen von PSGL-1 aus der Zelle unterstützen könnte. Obwohl in durchflusszytometrischen Messungen auch nach zusätzlicher Stimulation der SMC die Detektion von PSGL-1 nicht gelang, vermutlich auf Grund zu geringer Oberflächen-Expression von PSGL-1, zeigten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, dass P-Selektin an PSGL-1 auf der Zelloberfläche gebunden hatte (Abbildung 3-29). Dass die Ausschleusung von PSGL-1 auf U 46619 beruhte, konnte mit Hilfe des TP-Antagonisten SQ 29,548 gezeigt werden. In dessen Anwesenheit wurde PSGL-1 nicht mehr an die Zelloberfläche transferiert.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit erstmals die Expression von PSGL-1 in glatten Gefäßmuskelzellen sowie dessen Aufregulation durch Thrombin gezeigt werden. Auch eine Ausschleusung von PSGL-1 an die Zelloberfläche nach Ko-Stimulation von Thrombin und U 46619 wurde gezeigt sowie dessen Funktionalität anhand der Bindung von P-Selektin. Warum ein durchflusszytometrischer Nachweis von PSGL-1 auf der intakten äußeren Zellmembran auch nach Thrombin-Stimulation nicht gelang, ist offen und Gegenstand weiterer Arbeiten. Diese Untersuchungen sollten auch noch weitere Einzelheiten zum Mechanismus der Aufregulation und der Translokation von PSGL-1 an die Zelloberfläche sowie dessen Funktionalität aufklären.

Ausblick

Funktionell aktiver PSGL-1 in SMC könnte an der Entstehung von Entzündungsreaktionen und/oder atherosklerotischen Gefäßwandschäden beteiligt sein. Mechanische Schädigungen des Endothels, wie sie z.B. bei einer perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie, einem Verfahren um verengte Herzkranzgefäße zu erweitern und akute Koronarverschlüsse zu behandeln, unvermeidbar sind, führen zu einer Freilegung des Subendothels mit seinen SMC und erlauben ihren Kontakt mit dem zirkulierenden Blut. Die Aufregulation des Selektinliganden nach Bildung größerer Thrombinmengen, wie sie nach Gefäßverletzung und Thrombosen vorkommen (Schrör, 2008), würde diese Vorgänge unterstützen. An den aufregulierten PSGL-1 könnte mehr P-Selektin binden und damit die Thrombozyten-/Leukozyteninteraktion an der Verletzungsstelle fördern. Daher wäre es auch interessant zu wissen, inwiefern sich die PSGL-1-Expression durch andere inflammatorische Stimuli (z.B. TNF α , IL-1 β , u.a.) regulieren lässt und über welchen Signaltransduktionsweg dies vermittelt wird. Erste Hinweise für distale Signalwege konnten in der Arbeit bereits erbracht werden. Auch gilt es zu klären, in wie weit der initiale Kontakt zwischen PSGL-1 und P-Selektin zur zellinternen Weiterleitung inflammatorischer Signale, z. B. zur Sekretion von Cytokinen, zur Aktivierung von Zellen oder zu deren Transmigration beiträgt. Neuere Studien geben Hinweise, dass der Interaktion von PSGL-1 mit E-Selektin eine Rolle in der Wundheilung zukommt. Möglicherweise könnte das auch für PSGL-1 aus SMC zutreffen. Damit wird diese Interaktion auch zunehmend pharmakologisch unter dem Gesichtspunkt der Entwicklung neuer Antithrombotika interessant.

5 Zusammenfassung

P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) ist derzeit der am besten charakterisierte Selektinligand. An ihn binden alle drei bisher bekannten Selektine, P(*latelet*, thrombozytäres)-Selektin mit der höchsten Affinität. PSGL-1 wird konstitutiv auf der Zelloberfläche von Thrombozyten und Leukozyten exprimiert. In inflammatorischen Prozessen und bei der Hämostase vermittelt PSGL-1 sowohl Interaktionen zwischen Leukozyten als auch zwischen Leuko- und Thrombozyten und Endothelzellen. *In vivo*-Studien zeigen, dass leukozytäres PSGL-1 das Rollen der Leukozyten über E(ndotheliales)- und P-Selektin auf aktivierten Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) initiiert.

Hier wurde erstmals die Expression von PSGL-1 in humanen SMC untersucht. PSGL-1 wurde aus SMC kloniert und charakterisiert. Eine Sequenzanalyse ergab, dass SMC Transkripte für zwei PSGL-1-Formen enthalten, die einen Unterschied von 30 Basenpaaren (bp) aufweisen. Diese 30 bp umfassen eine von insgesamt 15 repetitiven Sequenzen und haben keinerlei Einfluss auf die Funktionalität von PSGL-1.

PSGL-1 wurde durch humanes α -Thrombin transient aufreguliert und erreichte nach 24 Stunden ein Maximum. Die Thrombin-medierte Signalweiterleitung über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) wurde mittels PAR-aktivierender Peptide (PAR-AP) 1, 3 und 4 untersucht. Dabei zeigte sich, dass vor allem das PAR1-AP eine vermehrte PSGL-1-mRNA-Expression induzierte; bei der distalen Signalweiterleitung der Aufregulation waren die PKC und der Transkriptionsfaktor NF κ B beteiligt.

Eine lentivirale Überexpression von SMC-eigenem PSGL-1 in SMC ergab, dass SMC über alle notwendigen translationalen und posttranslationalen Modifikationsmöglichkeiten verfügen, um PSGL-1 an die Zelloberfläche zu transferieren. Mittels blockierendem Antikörper und FITC-konjugiertem, rekombinantem P-Selektin konnte die Bindungsfähigkeit von PSGL-1 in SMC nachgewiesen werden. Die Anreicherung von PSGL-1 in Thrombin-stimulierten Zellen wurde vorwiegend intrazellulär lokalisiert. Erst durch Ko-Stimulation der SMC mit dem Thromboxan A₂-Mimetikum U 46619 konnte die Ausschleusung von PSGL-1 an die Zelloberfläche gezeigt werden.

Die Expression und Bindungsfähigkeit von PSGL-1 in SMC suggerieren eine Beteiligung der SMC an der Rekrutierung von Leuko- und Thrombozyten bei Gefäßverletzungen sowie der Entstehung von atherosklerotischen Plaques. Daher sollte PSGL-1 aus SMC als wichtiger Mitspieler bei der Entstehung von inflammatorischen Prozessen und Artherosklerose in Betracht gezogen werden.

6 Summary

P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is the best characterized selectin ligand. It binds all three selectins, with the highest affinity for P(latelet)-selectin. PSGL-1 is constitutively expressed at the surface of platelets and most types of leukocytes. It plays a critical role in inflammatory responses and in hemostasis by mediating leukocyte-leukocyte and leukocyte-endothelial interactions. In particular, PSGL-1 controls leukocyte rolling over E(ndothelial)-selectin and P-selectin on activated endothelial cells and smooth muscle cells (SMC).

To date, the potential of PSGL-1 expression and function on vascular SMC has not been described.

This work provides the first evidence that PSGL-1 is expressed on venous SMC derived from human saphenous vein.

PSGL-1 from SMC was cloned and characterized. Analysis of the DNA-sequence identified transcripts of two PSGL-1-isoforms in SMC, showing a difference in 30 basepairs (bp), containing one of a total of 15 repeating units. The functional region of PSGL-1 does not differ between the two forms.

PSGL-1 was transiently upregulated in human SMC by human α -thrombin, with the highest induction after 24 h of stimulation. Thrombin signaling mediated by protease-activated receptors (PARs) was examined with PAR-activating peptides (AP) for PAR1, PAR3 and PAR4. PSGL-1-mRNA-regulation was predominantly mediated through PAR1. PAR3- and PAR4-AP had no significant effect on PSGL-1-mRNA-expression. PKC signaling and the transcription factor NF κ B could be shown to participate in the thrombin-stimulated upregulation of PSGL-1.

Using a model to overexpress PSGL-1 in SMC showed that these cells contain all apparatus for posttranslational modifications required to transfer PSGL-1 to the cell surface. To determine the functionality of PSGL-1 on SMC, a blocking antibody and FITC-labeled recombinant P-selectin were used. These studies demonstrated P-Selectin binding to thrombin-stimulated SMC. Accumulation of PSGL-1 in thrombin-stimulated SMC was observed mainly in the cytosol, suggesting that thrombin can induce PSGL-1 transcription but is insufficient to initiate the transfer of PSGL-1 to the cell surface.

Expression and functionality of PSGL-1 on SMC suggest a potential role in the recruitment of inflammatory cells to the lesion as well as in formation of atherosclerotic plaques. Therefore PSGL-1 could represent as an important participant in the onset of inflammation and atherosclerosis.

7 Literaturverzeichnis

Andrian UH, Mackay CR. T-Cell Function and Migration. *N Engl J Med* 2000; 343: 1020-34.

Afshar-Kharghan V, Diz-Küçükkaya R, Ludwig EH, Marian AJ, Lopéz JA. Human polymorphism of P-selectin glycoprotein ligand 1 attributable to variable numbers of tandem decameric repeats in the mucinlike region. *Blood* 2001; 97: 3306-3307.

Almulki L, Noda K, Amini R, Schering A, Garland RC, Nakao S, Nakazawa T, Hisatomi T, Thomas KL, Masli S, Hafezi-Moghadam A. Surprising up-regulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) in endotoxin-induced uveitis. *FASEB J* 2009; 23(3): 929-39.

Barboux S, Poirier O, Pincet F, Hermand P, Tiret L, Deterre P. The adhesion by P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) couple is stronger for shorter PSGL-1 variants. *J Leuk Bio* 2010; 87: 1-7.

Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth Enzymol* 1983; 100: 243-255.

Brendel V, Bucher P, Nourbakhsh IR, Blaisdell E, Karlin S. Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc Natl Akad Sci* 1992; 89: 2002-2006.

Bretschneider E, Braun M, Fischer A, Wittpoth M, Glusa E, Schrör A. Factor Xa Acts as a PDGF-Independent Mitogen in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Thromb Haemost* 2000; 84: 499-505.

Bretschneider E, Kaufmann R, Braun M, Nowak G, Glusa E, Schör K. Evidence for functionally active protease-activated receptor-4 (PAR-4) in human vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 1441-1446.

Bretschneider E, Spanbroek R, Lotzer K, Habenicht AJ, Schör K. Evidence for functionally active protease-activated receptor-3 (PAR-3) in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 2003; 90: 704-709.

Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 11023-11027.

- Coughlin SR. Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature* 2000; 407: 258-264.
- Croce K, Freedman SJ, Furie BC, Furie B. Interaction between soluble P-selectin and soluble P-selectin glycoprotein ligand 1: equilibrium binding analysis. *Biochemistry* 1998; 37: 16472-16480.
- Cummings RD. Structure and function of the selectin ligand PSGL-1. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 519-528.
- Davenpeck KL, Brummet ME, Hudson SA, Mayer RJ, Bochner BS. Activation of human leukocytes reduces surface P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD 162) and adhesion to P-selectin in vitro. *Journal of Immunology* 2000; 165: 2764-2772.
- Edmead C, Kanthou C, Benzakour O. Thrombin Activates Transcription Factors Sp1, NF- κ B, and CREB: Importance of the Use of Phosphatase Inhibitors during Protein Extraction for the Assessment of Transcription Factor DNA-Binding Activities. *Analytical Biochemistry* 1999; 275: 180-186.
- Epperson TK, Patel KD, McEver RP, Cummings RD. Noncovalent Association of P-selectin Glycoprotein Ligand-1 and minimal Determinants for Binding to P-selectin. *J Biol Chem* 2000; 275: 7839-7853.
- Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1. *J Exp Med* 2003; 197: 1585-1598.
- Fallier-Becker P, Rupp J. Smooth muscle cells from rabbit aorta. In: cell culture techniques in heart and vessel research. *Piper HM ed. New York: Springer Verlag* 1990: 274-270.
- Faruqi TR, Weiss EJ, Shapiro MJ, Huang W, Coughlin SR. Structure-Function Analysis of Protease-activated Receptor 4 Tethered Ligand Peptides. *J Biol Chem* 2000; 275: 19728-19734.
- FitzGerald GA, Pedersen AK, Patrono C. Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation* 1983; 67: 1174-1177.
- Fling SP, Gregerson DS. Peptide and Protein Molecular Weight Determination by Electrophoresis Using a High-Molarity Tris Buffer System without Urea'. *Analytical Biochemistry* 1986; 155: 83-88.

- Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, et al. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood* 1998; 91: 1318-24.
- Furie B, Furie BC. Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation. *TRENDS in Molecular Medicine* 2004; 10 171-178.
- Hirano K, Kanaide H. Role of Protease-activated Receptors in the Vascular System. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10: 211-225.
- Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature (Lond)* 1997; 386: 502-506.
- Kanthou C, Benzakour O, Patel G, Deadman J, Kakkar VV, Lupu F. Thrombin receptor activating peptide (TRAP) stimulates mitogenesis, c-fos, and PDGF-A gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 1995a; 74: 1340-1347.
- Kehrel BE. Blutplättchen Biochemie und Physiologie. *Hämostaseologie* 2008; 5: 189-298.
- Kelm M, Strauer BE Endothelial dysfunction. Therapeutic and prognostic issues. *Internist (Berl)* 1999; 40: 1300-7.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- Laszik Z, Jansen PJ, Cummings RD, Tedder TF, McEver RP, Moore KL. P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood* 1996; 88: 3010-3020.
- Li F, Wilkins PP, Crawley S, Weinstein J, Cummings RD, McEver RP. Post-translational Modifications of Recombinant P-selectin Glycoprotein Ligand-1 for Binding to P- and E-selectin. *J Biol Chem* 1996; 271: 3255-3264.
- Lichtenthaler SF, Dominguez DI, Westmeyer GG, Reiss K, Haass C, Saftig P, De Strooper B, Seed B. The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* 2003; 278: 48713-48719.

- Liu WJ, Ramachandran V, Kang J, Kishimoto TK, Cummings RD, McEver RP. Identification of N-terminal Residues on P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 required for Binding of P-selectin. *J Biol Chem* 1998; 237: 7078-7087.
- Martins Da Costa P, Garcia-Vallejo JJ, van Thienen JV, Fernandez-Borja M, van Gils JM, Beckers C, Horrevoets AJ, Hordijk PL, Zwaginga JJ. P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1023-1029.
- Matsumoto M, Shigeta A, Furukawa Y, Tanaka T, Miyasaka M, Hirata T. CD43 Collaborates with P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 to Mediate E-Selectin-Dependent T Cell Migration into Inflamed Skin. *J Immunol* 2007; 178: 2499-2506.
- Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DL, Cummings RD, Varki A, McEver RP. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD 62) on myeloid cells. *J Cell Biol* 1992; 118: 445-456.
- Moore KL. Structure and Funktion of P-Selektin Glycoprotein Ligand-1. *Leukemia and Lymphoma* 1998; 29: 1-15.
- Nakajima T, Kitajima I, Shin H, Takasaki I, Shigeta K, Abeyama K, Yamashita Y, Tokioka T, Soejima Y, Maruyama I. Involvement of NF-kappa B activation in thrombin-induced human vascular smooth muscle cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204: 950-8.
- Needleman SB, Wunsch CD. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* 1970; 48: 443-453.
- Norgard KE, Moore KL, Diaz S, Stults NL, Ushiyama S, McEver RP, Cummings RD, Varki A. Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 1993; 268: 12764-12774.
- Nystedt S, Emilsson IE, Wahlested C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 9208-9212.
- Offermanns S, Mancino V, Revel JP, Simon MI. Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Gα13 deficiency. *Science* 1997; 275: 533-536.
- Offermanns S, Toombs CF, Hu YH, Simon MI. Defective platelet activation in Gαq deficient mice. *Nature* 1997; 389: 183-186.

- Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992; 359: 848-851.
- Paul BZS, Jin J, Kunapuli SP. Molecular Mechanism of Thromboxane A₂-induced Platelet Aggregation. *J Biol Chem* 1999; 274: 29108-29114.
- Rodgers SD, Camphausen RT, Hammer DA. Sialyl Lewis^x-Mediated, PSGL-1-Independent Rolling Adhesion on P-Selectin. *Biophysical Journal* 2000; 79:694-706.
- Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
- Ryan US and Worthington RE. Cell-cell contact mechanisms. *Immunology* 1992; 4: 33-37.
- Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean K, Ahern TJ, Furie B, Cumming D, Larsen GR. Expression Cloning of a Functional Glycoprotein Ligand for P-Selectin. *Cell* 1993; 75: 1179-1186.
- Schrör K. Das Gerinnungssystem im reperfundierten Koronarbett. *DMW Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2008; 133 (12): 579-581.
- Schrör K, Bretschneider E, Fischer K, Fischer JW, Pape R, Rauch BH, Rosenkranz AC, Weber AA. Thrombin receptors in vascular smooth muscle cells – function and regulation by vasodilatory prostaglandins. *Thromb Haemost* 2010; 103 1-7.
- Siegel-Axel D, Langer H, Lindemann S, Gawaz M. Die Rolle von Thrombozyten bei Entzündungs- und Atheroskleroseprozessen. *Med Klin* 2006; 101: 467-75.
- Smith MJ, Smith BRE, Lawrence MB, Snapp K. Functional Analysis of the Combined Role of the o-linked Branching Enzyme Core 2 β 1-6-n-Glucosaminyltransferase and dimerization of P-selectin Glycoprotein Ligand-1 in Rolling on P-selectin. *J Biol Chem* 2004; 279: 21984-21991.
- Snapp KR, Ding H, Atkins K, Warnke R, Luscinskas FW, Kansas GS. A novel P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Monoclonal Antibody Recognizes an Epitope within the Tyrosine Sulfate Motif of Human PSGL-1 and Blocks Recognition of Both P- and L-Selectin. *Blood* 1998; 91: 154-164.

- Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, Ley K. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med* 2003; 197: 1355-1363.
- Stampfuss JJ, Censarek P, Fischer JW, Kaber G, Rauch BH, Freidel K, Fischer U, Schulze Osthoff K, Grosser T, Grandoch M, Schrör K, Weber AA. Complete Downmodulation of P-Selectin Glycoprotein Ligand in Monocytes Undergoing Apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1375-1378.
- Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1177-8.
- Stenina OI. Regulation of Gene Expression in Vascular Cells by Coagulation Proteins. *Current Drug Targets* 2003; 4: 143-158.
- Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, et al. Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood* 1996; 87: 1238-42.
- Tregouet DA, Barbaux S, Poirier O, Blankenberg S, Bickel C, Escolano S, Rupprecht HJ, Meyer J, Cambien F, Tiret L. SELPLG gene polymorphism in relation to plasma SELPLG levels and coronary artery disease. *Ann Hum Genet* 2003; 67: 504-511.
- Trejo J. Protease-Activated Receptors: New Concepts in Regulation of G Protein-Coupled Receptor Signaling and Trafficking. *Perspectives in Pharmacology* 2003; 307: 437-442.
- Vachino G, Chang XJ, Veldman GM, Kumar R, Sako D, Fouser LA, Berndt MC, Cumming DA. P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Is the Major Counter-receptor for P-Selectin on Stimulated T Cells and Is Widely Distributed in Non-functional Form on Many Lymphocytic Cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 21966-21974.
- Veldman GM, Bean KM, Cumming DA, Eddy RL, Sait SNJ, Shows TB. Genomic Organization and Chromosomal Localization of the Gene Encoding Human P-selectin Glycoprotein Ligand. *J Biol Chem* 1995; 270: 16470-16475.
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991; 64: 1057-1068.

- Weber AA, Hohlfeld T, Schrör K. Pharmakologie der Blutgerinnung. *Biospektrum* 2006; 12: 35-38.
- Wilkins PP, Moore KL, McEver RP, Cummings RD. Tyrosine Sulfation of P-selectin Glycoprotein Ligand-1 is required for High Affinity Binding to P-selectin. *J Biol Chem* 1995; 270: 22677-22680.
- Wittpoth M. Einfluß von vasodilatierenden Prostaglandinen auf die mitogene Signaltransduktion in glatten Gefäßmuskelzellen. Inaugural-Dissertation, Düsseldorf 1998.
- Xia L, Sperandio M, Yago T, McDaniel JM, Cummings RD, Pearson-White S, Ley K, McEver RP. P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J Clin Invest* 2002; 109: 939-950.
- Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6642-6646.
- Yang J, Hirata T, Croce K, Merrill-Skolof G, Tchernychev B, Williams E, Flaumenhaft r, Furie BC, Furie B. Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med* 1999; 190: 1769-1782.
- Yang J, Furie BC, Furie B. The Biology of P-Selectin Glycoprotein Ligand-1: Ist Role as a Selectin Counterreceptor in Leukozyte-Endothelial and Leukozyte-Platelet Interaction. *Thromb Haemost* 1999; 81: 1-7.
- Zucker TP, Bönisch D, Muck S, Weber AA, Bretschneider E, Glusa E, Schrör K. Thrombin-induced Mitogenesis in Coronary Artery Smooth Muscle Cells Is Potentated by Thromboxane A₂ and Involves Upregulation of Thromboxane Receptor mRNA. *Circulation* 1998; 97: 589-595.

8 Veröffentlichungen

Publikationen in Fachzeitschriften

Stampfuss JJ, Censarek P, Bein D, Schrör K, Grandoch M, Naber C, Weber AA. Membrane environment rather than tissue factor expression determines thrombin formation triggered by monocytic cells undergoing apoptosis. *J Leuk Bio* 2008; 83: 1379-1381.

Kongressbeiträge

Bein D, Weber AA, Schrör K, Censarek P. P-selectin glycoprotein ligand-1-independent transfer of tissue factor to platelets.

New Drugs in Cardiovascular Reseach. Joint Meeting of the German Societies for Pharmacology and Clinical Pharmacology and the British Pharmacological Society. Dresden (Mai 2009).

Bein D, Weber AA, Schrör K, Censarek P. Smooth muscle cells are a potential source of tissue factor on platelets. *Hämostasologie* 29 (2009).

53. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung. Wien (Februar 2009).

9 Danksagung

Lieber Herr Professor Schrör, ich danke Ihnen herzlich für die Betreuung dieser Arbeit, ganz besonders in den letzten Wochen vor der Dissertationsschrift. Durch konstruktive Gespräche und zahlreiche Ratschläge durfte ich in den vergangenen drei Jahren viel von Ihren Erfahrungen lernen. Ihre Zuversicht hat mich -trotz manchem Rückschlag- ermutigt, immer erwartungsvoll nach vorne zu sehen. Ich freue mich sehr, Sie meinen Doktorvater nennen zu dürfen. Herzlichen Dank!

Lieber Herr Professor Willbold, ich freue mich sehr, dass Sie das Korreferat übernommen haben und danke Ihnen vielmals. Auch für das Vertrauen, das Sie mir und Herrn Professor Schrör damit entgegengebracht haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Liebe Petra (Censarek), ich danke dir vielmals für hilfreiche Ratschläge und Anregungen und für dein Engagement bei der Durchsicht meines Manuskriptes, ebenso wie für die Finanzierung des Projektes.

Liebe Petra (Kuger), dir gebührt mein ganz besonderer Dank. Dein wertvoller Erfahrungsschatz in allen labortechnischen Belangen sowie deine experimentelle Unterstützung halfen mir so manch kniffliges Problem in den Griff zu bekommen. Deine aufmunternden Worte konnten mich immer wieder motivieren. Ich danke dir für deine großzügige Hilfsbereitschaft. Ich habe sehr gerne mit dir zusammen gearbeitet.

Liebe Frau Lohmann und liebe Frau Montag, vielen herzlich Dank für die Organisation des gesamten Institutslebens. Ohne Ihre Unterstützung bei allen organisatorischen Problemen wäre ich sicherlich zeitweise im Chaos versunken. Durch Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft sowie Ihre mentale Unterstützung werden Sie zum Herz des Instituts. Vielen Dank.

Liebe Kerstin, liebe Frau Reupert und liebe Beate, ich danke euch ganz herzlich für eure experimentelle Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Auch für die netten Gespräche und „Dienstbesprechungen“, welche bei Wind und Wetter an der frischen Luft gehalten wurden, möchte ich mich aufrichtig bedanken. Es war sehr schön.

Bei allen Kollegen bedanke ich mich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, ebenso für viele wertvolle Anregungen und Diskussionen. Lieber Gernot, lieber Sören, einen ganz lieben Dank auch für eure Unterstützung.

Einen ganz besonders dicken Dank möchte ich meinen lieben Eltern und meiner lieben Schwester Simona aussprechen. Eure Unterstützung und euer Rückhalt haben einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich bin euch sehr dankbar, dass ihr immer an mich geglaubt habt und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standet. Meinen herzlichen Dank.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorschrift selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe, und dass diese Doktorschrift an keiner anderen Fakultät eingereicht worden ist.

Düsseldorf, den

CURRICULUM VITAE VON DANIELA BEIN



geboren am 19. Juli 1977 in Solingen

BERUFLICHER WERDEGANG

- 10/2007-heute Universitätsklinikum Düsseldorf
 Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
 Promotion (unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör)
- 10/2006–06/2007 Städt. Gymnasium in Leichlingen
 Vertretungsstelle als Lehrerin für den Biologieunterricht
 02/2007 XLab Göttingen, Fortbildung für Lehrkräfte

HOCHSCHULAUFBILDUNG

- 10/2000-06/2006 Studium der Biologie, Diplom
 ab 4/2001 Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
 10/2000-3/2001 Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt

BERUFSAUSBILDUNG UND –WEG

- 05/2000-09/2000 Fa. Trade Agency Albanus, Leichlingen
 beschäftigt als Industriekauffrau
- 08/1997-03/2000 Fa. Kronenberg GmbH & Co. KG, Leichlingen
 Ausbildung zur Industriekauffrau

SCHULAUFBILDUNG

- 1987-1997 Städt. Gymnasium, Leichlingen
- 1983-1987 Gemeinschaftsgrundschule Uferstraße, Leichlingen