



Faktor Xa-induzierte zelluläre Wirkungen durch Regulation des PAR-2-Rezeptors in humanen glatten Gefäßmuskelzellen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Klaus Jobi
aus Leverkusen

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. med. Karsten Schrör
Korreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.2010

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom
Ang II	Angiotensin II
ANOVA	<i>One-Way Analysis of Variance</i>
AP	Aktivierendes Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
AREs	AU-reiche Sequenzmotive
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CABG	Aortokoronare Bypasschirurgie
cDNA	<i>complementary DNA</i>
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
Ci	Curie
COX-2	Cyclooxygenase-2
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DCF-DA	2', 7'-Dichlorofluorescein Diacetat
DETC	<i>diethyldithiocarbamate</i>
DHE	Dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
ELAV	<i>embryonal lethal abnormal vision</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated protein kinase 1/2</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FXa	Aktivierter Faktor X
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperanzinyl)-ethansulfonsäure
HNS	<i>HuR-nucleo-cytoplasmic shuttling sequence</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hsp70	Hitzeschockprotein 70
HuR	<i>human antigen R</i>

IgG	Immunoglobulin G
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IL-6	Interleukin-6
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	Monozyten-Chemokin Protein-1
MI	Myokardinfarkt
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
OxLDL	<i>oxidized low density lipoprotein</i>
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMC	Glatte Gefäßmuskelzellen
SOD	Superoxiddismutase
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Tissue-Faktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan

TXA ₂	Thromboxan A ₂
Tween™-20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
UTR	Untranslatierte Region
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Pathogenese des vaskulären <i>Remodeling</i>	1
1.1.1. Problematik der Infarkttherapie	1
1.1.2. Hämostase und Thrombose	1
1.1.3. Inflammation bei der Restenose	2
1.1.4. Intimale Hyperplasie und Proliferation durch Atherosklerose	3
1.1.5. Unterschiede zwischen arteriellen und venösen Bypässen	3
1.2. FXa: Mehr als ein Gerinnungsfaktor	4
1.2.1. Thrombin-unabhängige Wirkungen von FXa	4
1.2.2. Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR)	5
1.2.3. PAR-aktivierte Signalwege	6
1.2.4. Expression und Funktion der FXa-Rezeptoren	6
1.3. Potentielle Rolle von NF-κB bei der PAR-Regulation	7
1.4. Post-transkriptionelle Mechanismen der Genregulation:	
mRNA-Stabilisierung	9
1.5. Bedeutung von oxidativem Stress für FXa/PAR-2	10
1.5.1. Reaktive Sauerstoffradikale (ROS)	10
1.5.2. Die NADPH-Oxidase	10
1.5.3. ROS in der vaskulären Pathogenese	11
1.6. Fragestellung der Arbeit	12
 2. Material und Methoden	 13
 2.1. Substanzen	 13
2.2. Antikörper	13
2.2.1. Primärantikörper	13
2.2.2. Sekundärantikörper	15
2.3. Puffer und Lösungen	15
2.4. Zellkultur	17
2.4.1. Isolation und Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen	17
2.5. Aufreinigung und Analyse von RNA	18
2.5.1. Aufreinigung von Gesamt-RNA aus SMC	18
2.5.2. Quantifizierung von RNA	18
2.5.3. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	19

2.6. Western Blot	19
2.7. Immunozytochemie	20
2.8. Durchflusszytometrie	21
2.9. Bestimmung der DNA-Syntheserate	21
2.10. siRNA-vermitteltes Gen-silencing	22
2.11. Detektion von intrazellulären, reaktiven Sauerstoffradikalen	22
2.11.1. 2', 7'-Dichlorofluorescein Diacetat (DCF-DA)	22
2.11.2. Dihydroethidium (DHE)	23
2.12. Zellfraktionierung und NF-κB-Translokationsstudie	23
2.13. Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)	24
2.14. HuR-Translokationsstudie (<i>HuR-Shuttling</i>)	25
2.15. Immunpräzipitations (<i>Pull-down</i>)-PCR	25
2.16. Statistik	26
 3. Ergebnisse	 27
 3.1. Regulation der FXa-Rezeptoren PAR-1 und PAR-2	 27
3.1.1. FXa induziert selektiv die Expression von PAR-2-mRNA	27
3.1.2. Passagieren der Zellen mittels Trypsin hat keinen Einfluss auf die FXa-induzierte PAR-2-Regulation	27
3.1.3. Konzentrations-Wirkungsbeziehung der FXa-regulierten PAR-2-Expression	28
3.1.4. Die FXa-induzierte Expression von PAR-2 ist unabhängig von Thrombin	29
3.1.5. FXa induziert die Expression von PAR-2-Protein	31
3.1.6. FXa induziert PAR-2-Oberflächenexpression	31
3.1.7. Einfluss der Zelldichte auf die FXa-vermittelte PAR-2-Regulation	32
3.2. Aktivierung von PAR-2 induziert ebenfalls die Expression von PAR-2	33
3.3. Funktionelle Konsequenzen der PAR-2-Induktion durch FXa	35
3.3.1. Verstärkte Mitogenese nach Hochregulation von PAR-2	35
3.3.2. Verstärkte Induktion von IL-6 nach FXa-induzierter PAR-2-Expression	35
3.4. NF-κB vermittelt die transkriptionelle Regulation von PAR-2 in SMC	36
3.5. Posttranskriptionelle Regulation von PAR-2 durch mRNA-Stabilisierung	39
3.6. Redox-vermittelte Signalgebung bei der Regulation von PAR-2	42
3.6.1. FXa induziert reaktive Sauerstoffradikale in SMC	42
3.6.2. Einfluss von FXa auf die Expression der NADPH-Oxidase	44
3.6.3. H ₂ O ₂ induziert eine ähnliche PAR-2-Expression wie FXa	47
3.6.4. Einfluss von Angiotensin II auf die PAR-2-Expression	50
3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse	51

4. Diskussion	53
4.1. FXa induziert selektiv die Expression von PAR-2	53
4.2. Funktionelle Konsequenzen der PAR-2-Induktion durch FXa	54
4.3. NF- κ B vermittelt die transkriptionelle Regulation von PAR-2 in SMC	54
4.4. Posttranskriptionelle Regulation von PAR-2 durch mRNA-Stabilisierung	55
4.5. Redoxvermittelte Signalgebung bei der Regulation von PAR-2	56
4.6. FXa induziert über die PAR-2-Regulation pathologische Effekte in SMC	58
4.7. Ausblick	60
5. Zusammenfassung	64
6. Summary	65
7. Literaturverzeichnis	66
8. Veröffentlichungen	76
8.1. Kongressbeiträge	76
8.2. Publikationen in Fachzeitschriften	77
9. Danksagung	78
10. Eidesstattliche Erklärung	80
11. Lebenslauf	81

1. Einleitung

1.1. Pathogenese des vaskulären *Remodeling*

1.1.1. Problematik der Infarkttherapie

Gefäßverschußkrankheiten tragen wesentlich zur Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt bei und werden bis 2020 das größte Gesundheitsproblem weltweit werden (Murray *et al.*, 1997).

Aortokoronare Bypasschirurgie (CABG) oder perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) sind die beiden interventionellen Verfahren zur Behandlung von akutem Myokardinfarkt (MI). Die klinischen Erfolge sind hierbei durch Thrombose und erneuten Gefäßverschluss innerhalb weniger Monate bis Jahre nach Intervention limitiert. Während des ersten Jahres nach der Bypass-Operation führt dies zu Engpässen bei bis zu 15% der venösen Präparate. Nach ein bis sechs Jahren beträgt die Verschußrate des Transplantats 1-2% pro Jahr und nach sechs bis zehn Jahren liegt sie bei 4% jährlich. Zehn Jahre nach dem Eingriff sind nur 60% der Transplantate noch durchgängig und nur 50% sind frei von signifikanter Stenose (Fitzgibbon *et al.*, 1996).

1.1.2. Hämostase und Thrombose

Beim akuten Koronarsyndrom (ACS), infolge von Plaqueruptur kommt es durch den Riss in der Gefäßwand zum Kontakt zwischen Blutkomponenten und Tissue-Faktor (TF)-tragenden wandständigen Zellen (Abb. 1) (Mackman *et al.*, 2007). Das inaktive Zymogen Faktor VII (FVII) (Borensztajn *et al.*, 2008) wird durch Ca^{2+} im Blut und Phospholipiden aus den geschädigten Zellmembranen aktiviert und bindet an TF auf der Oberfläche von Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen (SMC). Durch Komplexierung mit TF erlangt FVII schließlich seine vollständige katalytische Aktivität (FVIIa) (Hoffman *et al.*, 2001) und aktiviert Faktor IX (FIXa) sowie Faktor X (FXa) (Brummel *et al.*, 2002). FXa wird in seiner Wirkung durch Faktor V (FVa) verstärkt und kann aus Prothrombin (FII) geringe Mengen von Thrombin (FIIa) bilden (Hoffman *et al.*, 2001). Diese reichen jedoch nicht aus um die Thrombusbildung durch Überführung von Fibrinogen in Fibrin zu katalysieren. Das wenige Thrombin, welches auf TF tragenden Zellen generiert wird, ist aber ausreichend für die Aktivierung und Verstärkung der Adhäsion von Thrombozyten sowie um Faktor V zu aktivieren (Hoffman *et al.*, 2001). Die Bindung von Thrombozyten an Kollagen induziert zudem die Freisetzung von ADP und Thromboxan A_2 (TXA_2), die beide zusätzlich adherente Thrombozyten auf autokrine Weise aktivieren und somit die Thrombusbildung fördern. Während ihrer Aktivierung setzen Thrombozyten partiell aktivierten FV auf ihrer Oberfläche frei, welcher durch Thrombin oder FXa vollständig aktiviert wird (Hoffman *et al.*, 2001). Schließlich kommt es zur Bildung von ausreichenden Mengen von Thrombin und damit zur Abspaltung der Fibrinopeptide A und B von Fibrinogen, so dass aktives Fibrin polymerisieren und einen Thrombus in der

geschädigten Gefäßwand ausbilden kann (Mosesson, 2005). Durch verschiedene Proteasen wie Plasmin, kann durch Fibrinolyse der Thrombus wieder aufgelöst werden (Stassen *et al.*, 2004).

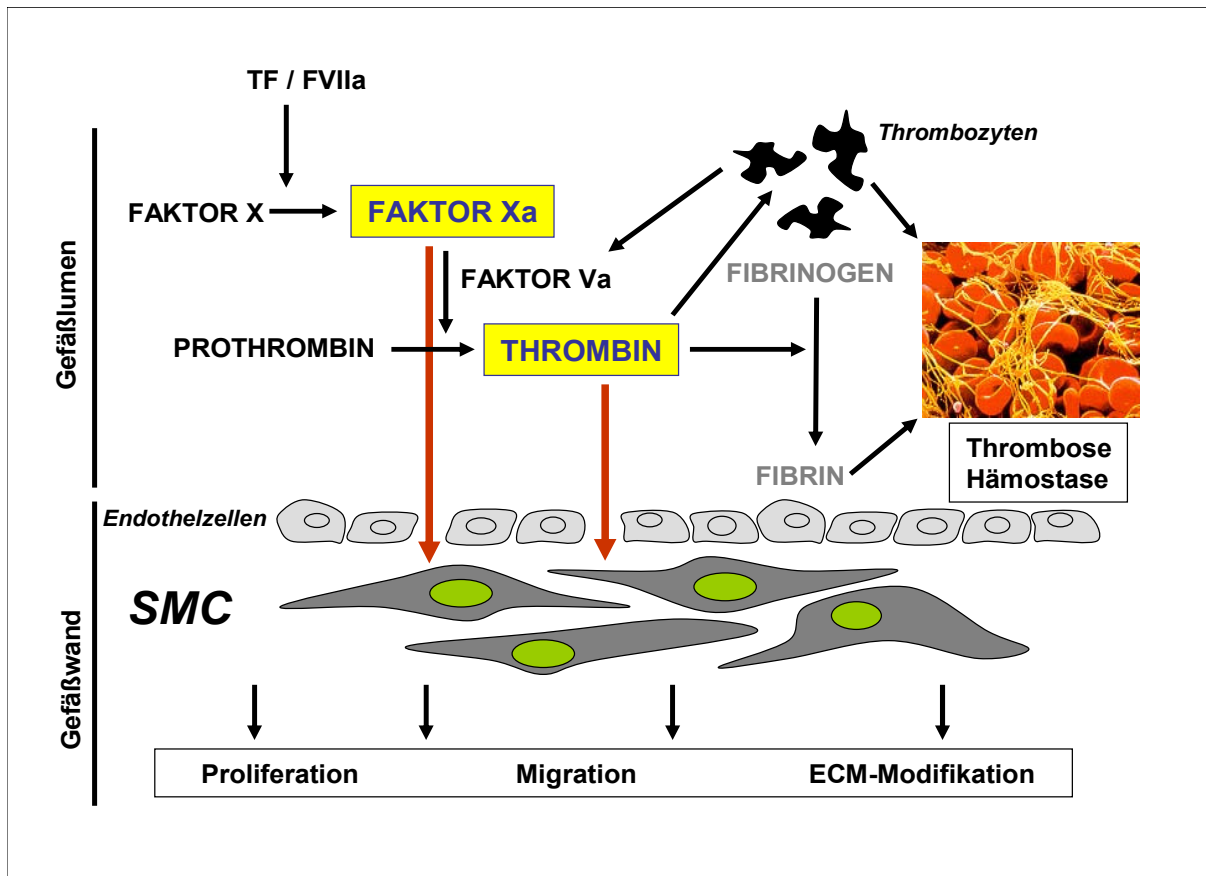


Abb.1: Blutgerinnungskaskade (vereinfacht)

Tissue Faktor (TF) und aktivierter FVIIa bilden einen Komplex um FX zu aktivieren. FXa bildet aus Prothrombin (FII) geringe Mengen Thrombin (FIIa), welches Fibrinogen zu Fibrin spaltet. Außerdem aktiviert Thrombin FV, der ein Kofaktor von FXa ist. SMC = Glatte Gefäßmuskelnzellen; ECM = Extrazelluläre Matrix

1.1.3. Inflammation bei der Restenose

Restenose kann als überschießender Wundheilungsprozess angesehen werden, welcher spezifisch im vaskulären Gewebe abläuft. Bildung einer Neointima und vaskuläres *Remodeling* sind inflammatorische Reaktionen, die durch Gefäßverletzung ausgelöst werden (Forrester *et al.*, 1991).

Koagulatorische und inflammatorische Signalwege sind eng miteinander verknüpft. Die Serinproteasen der Blutgerinnungskaskade fördern verschiedene proinflammatorische Reaktionen zuzüglich zu ihren Rollen in koagulatorischen und fibrinolytischen Prozessen. Beispielsweise löst Thrombin typische inflammatorische Reaktionen wie die Migration und Adhäsion von Leukozyten an das Endothel aus und induziert die Expression von inflammatorischen Genen wie z.B. Interleukin-6 (IL-6) in SMC (Kranzhofer *et al.*, 1996). IL-6 ist ein inflammatorisches und chemotaktisches Cytokin, welches zur Mitogenese und

Migration von SMC beiträgt (Wang *et al.*, 2003). Für FXa konnte ebenfalls die Förderung von inflammatorischen Reaktionen *in vivo* nachgewiesen werden (Cirino *et al.*, 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass FXa in endothelialen Zellen die Synthese der Cytokine IL-6, IL-8 und des Monozyten-Chemokins Protein-1 (MCP-1) sowie die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle für Neutrophile hervorruft (Senden *et al.*, 1998). Die inflammatorischen Effekte von FXa ähneln damit denen von Thrombin und tragen zur Proliferation und Migration von SMC und damit atherosklerotischen Prozessen bei.

1.1.4. Intimale Hyperplasie und Proliferation durch Atherosklerose

Intimale Hyperplasie wird als die Akkumulation von glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) und extrazellulärer Matrix (ECM) im intimalen Kompartiment definiert und ist die Hauptursache für Gefäßverschluss im ersten Jahr nach Bypasschirurgie (Davies *et al.*, 1995). Bypass-Operationen ziehen oft Gefäßverletzungen und damit Verlust des Endothels nach sich, was neben der Adhäsion von Thrombozyten und Neutrophilen, subendothelial liegende SMC für aktivierte Gerinnungsfaktoren und andere Blutkomponenten zugänglich macht. Aktivierte Thrombozyten und Monozyten sezernieren *platelet-derived growth factor* (PDGF) und andere Wachstumsfaktoren, die wichtige Mediatoren für Proliferation und Migration von SMC sind (Ross, 1993). Zusätzlich kommt es zu einer Dedifferenzierung der medialen SMC, von einem kontraktile zu einem „synthetischen“ Phänotyp, gefolgt von einer Migration in die Intima (Ross, 1993). Der phänotypische Wandel der SMC ist neben proliferativen und migratorischen Eigenschaften, ebenfalls mit der Sekretion von Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF oder *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und der Expression entsprechender Rezeptoren verknüpft (Bauriedel *et al.*, 1994). Ein bis zwei Wochen nach dem Eingriff kommt es zur Modifikation der ECM. Die dedifferenzierten SMC sezernieren Matrix-Proteine wie Tenascin, Fibronectin, Kollagene und Proteoglykane (Bauriedel *et al.*, 1994). Dies führt zur Ausbildung einer Neointima und Restenose.

Der wandständige Thrombus setzt hierbei zusätzlich große Mengen von Thrombin und FXa frei (Abendschein *et al.*, 2003; Ghigliotti *et al.*, 1998), die beide die Proliferation und Migration von SMC induzieren können (Bretschneider *et al.*, 2000; Rauch *et al.*, 2004; Rauch *et al.*, 2005).

1.1.5. Unterschiede zwischen arteriellen und venösen Bypässen

Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit arteriellem Bypass eine höhere Überlebensrate hatten, als solche mit venösem Bypass (Cameron *et al.*, 1996). Der Grund hierfür war, dass bei arteriellen Bypässen ein späteres Auftreten von Atherosklerose ein geringeres Problem darstellte, als bei Verwendung von venösen Präparaten und dass die besseren Überlebenschancen von Alter und Geschlecht unabhängig waren (Loop, 1996).

Bis zu 50% der venösen Bypässe sind zehn Jahre nach der Implantation verschlossen (Cameron *et al.*, 1996). Die höhere Verschlußrate venöser Bypässe beruht auf biochemischen und histologischen Unterschieden zu Bypässen arteriellen Ursprungs (Cox *et al.*, 1991). Im Vergleich zu SMC aus der *Arteria mammaria*, zeigt sich bei kultivierten SMC aus der *Vena saphena* eine unterschiedliche Genexpression, beispielsweise von proinflammatorischen Cytokinen oder *nuclear factor kappa B* (NF-κB)-Zielgenen, die mit Proliferation und Migration assoziiert sind und in venösen SMC aufreguliert werden, während sich in arteriellen Zellen eine Herabregulation zeigt (Deng *et al.*, 2006). Eine wichtige Rolle spielt zudem *oxidized low density lipoprotein* (OxLDL), ein Schlüsselfaktor der Atherosklerose (Ross, 1999). Somit induziert OxLDL in venösen SMC die Proliferation und Migration, während es diese bei arteriellen SMC hemmt (Deng *et al.*, 2006). Andererseits sind SMC aus venösen Präparaten wegen der leichteren Verfügbarkeit von besonderem Interesse.

1.2. FXa: Mehr als ein Gerinnungsfaktor

1.2.1. Thrombin-unabhängige Wirkungen von FXa

Innerhalb der Blutgerinnungskaskade hat FXa durch seine Thrombin-aktivierende Wirkung eine definierte Rolle. Für die nachfolgenden Prozesse der Wundheilung und des *Remodelings* wurde die Bedeutung von FXa vermutlich unterschätzt (Borensztajn *et al.*, 2008; Krupiczkoj *et al.*, 2008). In den letzten Jahren konnten direkte zelluläre, von Thrombin unabhängige Wirkungen nachgewiesen werden. Hierzu gehören u.a. die Migration und Proliferation von SMC, sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie PDGF, bFGF und die Synthese von ECM in SMC (Bretschneider *et al.*, 2000; Rauch *et al.*, 2002; Rauch *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang konnte auch die Beteiligung von FXa an mehreren Signalkaskaden nachgewiesen werden (Borensztajn *et al.*, 2008). Hierzu gehört die Aktivierung der Phospholipase C (PLC), intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisierung sowie die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) und verschiedenen Tyrosinkinasen, wie der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) (Monno *et al.*, 2001). In SMC konnte zudem die Phosphorylierung der *extracellular signal-regulated protein kinase 1/2* (ERK1/2) gezeigt werden (Bretschneider *et al.*, 2000; Kaiser, 2003) und u.a. in koronararteriellen Zellen, die Aktivierung von NF-κB (Hezi-Yamit *et al.*, 2005). Die FXa-vermittelte Phosphorylierung von MAP-Kinasen, wie ERK1/2 und JNK führt zur Induktion der Expression von inflammatorischen Cytokinen, wie IL-6, was zur Migration und Proliferation von SMC beiträgt (Borensztajn *et al.*, 2008). Inhibierung von FXa reduziert die Proliferation von vaskulären SMC sowie die Restenose nach Ballondilatation (Borensztajn *et al.*, 2008). Die FXa-vermittelte SMC-Proliferation ist somit ein weiterer Faktor, welcher die Bildung von intimaler Hyperplasie fördert.

1.2.2. Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR)

Die zellulären Wirkungen von FXa und Thrombin werden über eine Familie von G-Protein-gekoppelten, Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) vermittelt (Coughlin, 1999). Diese Rezeptoren werden in einer spezifischen Erkennungssequenz an ihrem extrazellulären N-Terminus proteolytisch gespalten, so dass ein verkürztes aminoterminal Ende entsteht. Dieses autoaktiviert den Rezeptor als *tethered ligand* („angebundener Ligand“) (Abb. 2). Kurze Peptide, die in ihrer Sequenz dem *tethered ligand* entsprechen, können daher als aktive Peptide (AP) die PARs direkt aktivieren, ohne dass eine proteolytische Spaltung erforderlich ist (Marutsuka *et al.*, 2005).

Bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren erfolgt die Deaktivierung bzw. Desensibilisierung sowohl auf Ebene der Transkription und RNA-Stabilität, als auch über Endozytose und lysosomalen Abbau (Tsao *et al.*, 2001). Aktivierter PAR-1 und PAR-2 werden internalisiert und anschließend überwiegend lysosomal abgebaut (Trejo, 2003).

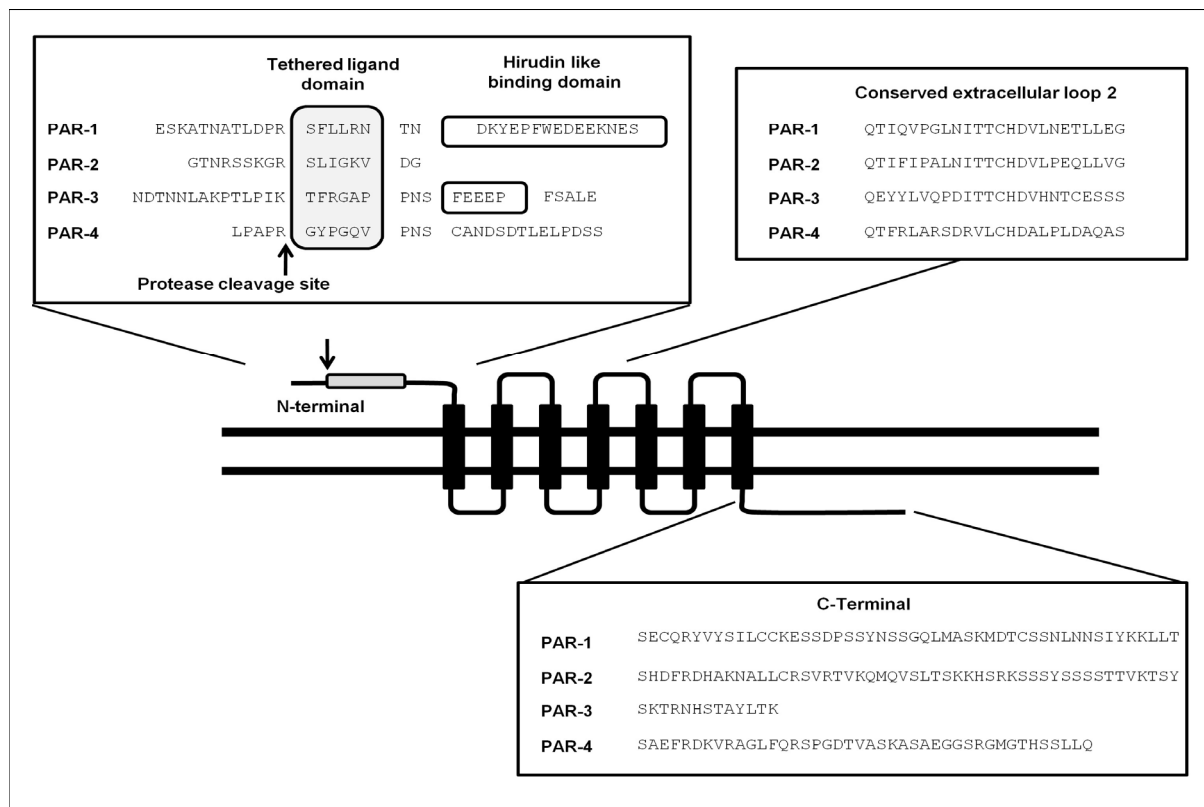


Abb. 2: Struktur der Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR)

Durch proteolytische Spaltung im extrazellulären N-Terminus entsteht der *tethered ligand*, welcher den jeweiligen PAR aktiviert. Sequenziert dargestellte Bereiche sind wichtig bei der Rezeptoraktivierung, Wechselwirkung mit Thrombin, Desensibilisierung und Signalweiterleitung (nach Macfarlane *et al.*, 2001).

Von den bis heute beschriebenen vier PARs werden PAR-1, PAR-3 und PAR-4 durch Thrombin aktiviert, während FXa neben PAR-1 auch PAR-2 aktiviert (Macfarlane *et al.*, 2001). Vor allem PAR-1 wird als der prototypische Thrombin-Rezeptor für die Migration, Mitogenese und Matrix-Synthese von SMC sowie das vaskuläre *Remodeling in vivo* gesehen

(Patterson *et al.*, 2001). PAR-2 wird neben FXa, durch die Proteasen Trypsin sowie Tryptase aktiviert. Außer bei SMC des kardiovaskulären Systems, ist PAR-2 in SMC der Bronchien, der Gallenblase, des Darmes und des Magens nachgewiesen worden (Macfarlane *et al.*, 2001).

1.2.3. PAR-aktivierte Signalwege

Der durch PAR-1 vermittelte Signalweg ist bisher am besten charakterisiert (Patterson *et al.*, 2001). Zur Weiterleitung des Signals ins Zellinnere bindet PAR-1 an drei verschiedene Familien von G-Proteinen: $G_{12/13}$, $G_{q/11}$ und $G_{i/o}$ (Patterson *et al.*, 2001). Auch für PAR-2 wurde eine G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion gezeigt (Macfarlane *et al.*, 2001; Traynelis *et al.*, 2007).

Für Thrombin ist außerdem beschrieben, dass Aktivierung des PAR-1 über den PKC/ Ca^{2+} -Signalweg zur Stimulation der vaskulären NADPH-Oxidase (Patterson *et al.*, 1999) und somit zur Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS), wie z.B. dem Superoxidanion (O_2^-) und dessen zell-permeablen Metaboliten H_2O_2 führt.

G-Protein-vermittelte Aktivierung untereinander vernetzter Signalwege, wie der PKC und den Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), induziert die Expression von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Wang *et al.*, 2004), bFGF (Rauch *et al.*, 2004) und *cAMP response element-binding protein* (CREB) (Tokunou *et al.*, 2001), als auch von inflammatorischen Genen wie IL-6 (Kranzhofer *et al.*, 1996).

Im Gegensatz zum Thrombin-vermittelten PAR-1-Signalweg sind die durch FXa aktivierten, PAR-2 abhängigen Signalwege noch weitgehend unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in Herzmuskelzellen und transfizierten Hautepithelzellen der PAR-2 an *stress-activated protein* (SAP)-Kinasen, JNK und p38 MAP-Kinasen gekoppelt ist (Macfarlane *et al.*, 2001) und dass in Epithelzellen eine PAR-2-vermittelte PKC- und ERK1/2-Aktivierung erfolgt (van der Merwe *et al.*, 2009). Durch Stimulation von PAR-2 konnte außerdem die Aktivierung von NF- κ B in SMC nachgewiesen werden (Bretschneider *et al.*, 1999). Ein durch FXa stimulierter PAR-2 könnte somit über diese Signalwege zu proinflammatorischen und prokoagulatorischen Wirkungen von SMC beitragen.

1.2.4. Expression und Funktion der FXa-Rezeptoren

Da FXa, ebenso wie Thrombin, PAR-1 aktiviert, wurde lange vermutet, dass beide Koagulationsfaktoren auch sehr ähnliche Wirkungen induzieren. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein (Borensztajn *et al.*, 2008).

Im gesunden Gefäß bzw. in kontraktile SMC ist PAR-2, im Gegensatz zum PAR-1, kaum detektierbar (Molino *et al.*, 1998). Bei Atherosklerose (Napoli *et al.*, 2004), Diabetes (Roviezzo *et al.*, 2005) und nach Gefäßverletzung (Damiano *et al.*, 1999) zeigt sich jedoch

eine erhöhte PAR-2-Expression. Zudem führt Deletion des PAR-2 zu einer reduzierten Neointimabildung *in vivo* (Tennant *et al.*, 2008). In aortalen Endothelzellen von spontan hypertensiven Ratten konnte außerdem eine Hochregulation von PAR-2 gezeigt werden, die möglicherweise auf oxidativen Stress zurückzuführen ist (Aman *et al.*, 2010). Insgesamt steht PAR-2 bei proliferativen Erkrankungen, wie z.B. vaskulärem *Remodeling*, Fibrose und Tumormetastasierung im Mittelpunkt (Borensztajn *et al.*, 2008).

Bisher sind die genauen Mechanismen, die zu einer Hochregulation von PAR-2 nach Gefäßverletzung führen, noch unbekannt. Möglicherweise könnte FXa selbst in einem Rückkopplungsmechanismus, die Expression von PAR-2 beeinflussen, so wie es für Thrombin und PAR-1, PAR-3 und PAR-4 in humanen Lungenfibroblasten gezeigt wurde (Sokolova *et al.*, 2005).

1.3. Potentielle Rolle von NF- κ B bei der PAR-Regulation

NF- κ B ist in praktisch allen Zelltypen gefunden worden und ist in die Aktivierung einer großen Zahl von Genen involviert, welche u.a. bei Infektionen und Entzündung aktiviert werden. Aktivierter NF- κ B wurde in SMC der Carotis nach Ballondilatation (Landry *et al.*, 1997) sowie in der Intima und Media von atherosklerotischen Gefäßabschnitten gefunden (Wilson *et al.*, 2002), was auch auf eine wichtige Rolle für die Entwicklung von atherosklerotischen Gefäßwandveränderungen schließen lässt.

In seiner aktiven DNA-bindenden Form, bildet NF- κ B ein Heterodimer, das sich aus verschiedenen Kombinationen der NF- κ B/Rel-Familie zusammensetzt. In Säugern wurden bisher fünf Rel-Proteine identifiziert: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), c-Rel, RelA (p65) und RelB (Karin *et al.*, 2000).

Die in Säugern vorkommenden Rel-Proteine unterscheiden sich in ihren transkriptionsaktivierenden Eigenschaften insofern, dass einzig p65/RelA und c-Rel potente Aktivierungsdomänen für die Transkription enthalten. Die p65:p50-Heterodimere wurden als erste Form von NF- κ B identifiziert und sind in den meisten Zelltypen am häufigsten vertreten. Die Bezeichnung NF- κ B wird somit meistens dazu verwendet, den p50:p65-Komplex zu beschreiben (Karin *et al.*, 2000). Nach derzeitigem Stand der Forschung, scheinen alle NF- κ B-Komplexe auf die gleiche Weise reguliert zu werden, d.h. hauptsächlich durch Interaktionen mit spezifischen Inhibitoren, den I κ Bs (Karin *et al.*, 2000).

NF- κ B ist normalerweise im Cytoplasma als ein inaktiver, trimerer Komplex (p50:p65:I κ B) von unstimulierten Zellen lokalisiert. Beim klassischen NF- κ B-Signalweg (Abb. 3) induziert zelluläre Aktivierung durch Agonisten wie TNF- α , IL-1 oder Lipopolysaccharide (LPS), einen I κ B-Kinase-Komplex (IKK), I κ B zu phosphorylieren. Die anschließende Polyubiquitinierung sowie proteosomale Degradierung von I κ B führt zu freiem NF- κ B und dessen Translokation in den Zellkern, wo die Bindung an die NF- κ B-Erkennungssequenz und damit die Regulation

der Transkription des Zielgens erfolgt (Gilmore, 2006; Karin *et al.*, 2000). NF- κ B ist zudem ein redox-sensitiver Transkriptionsfaktor, wobei insbesondere H_2O_2 die nukleäre Translokation erhöht und somit zur Induktion von entsprechenden Zielgenen beiträgt (Griendling *et al.*, 2000). Ob PAR-2 eines dieser Gene ist, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

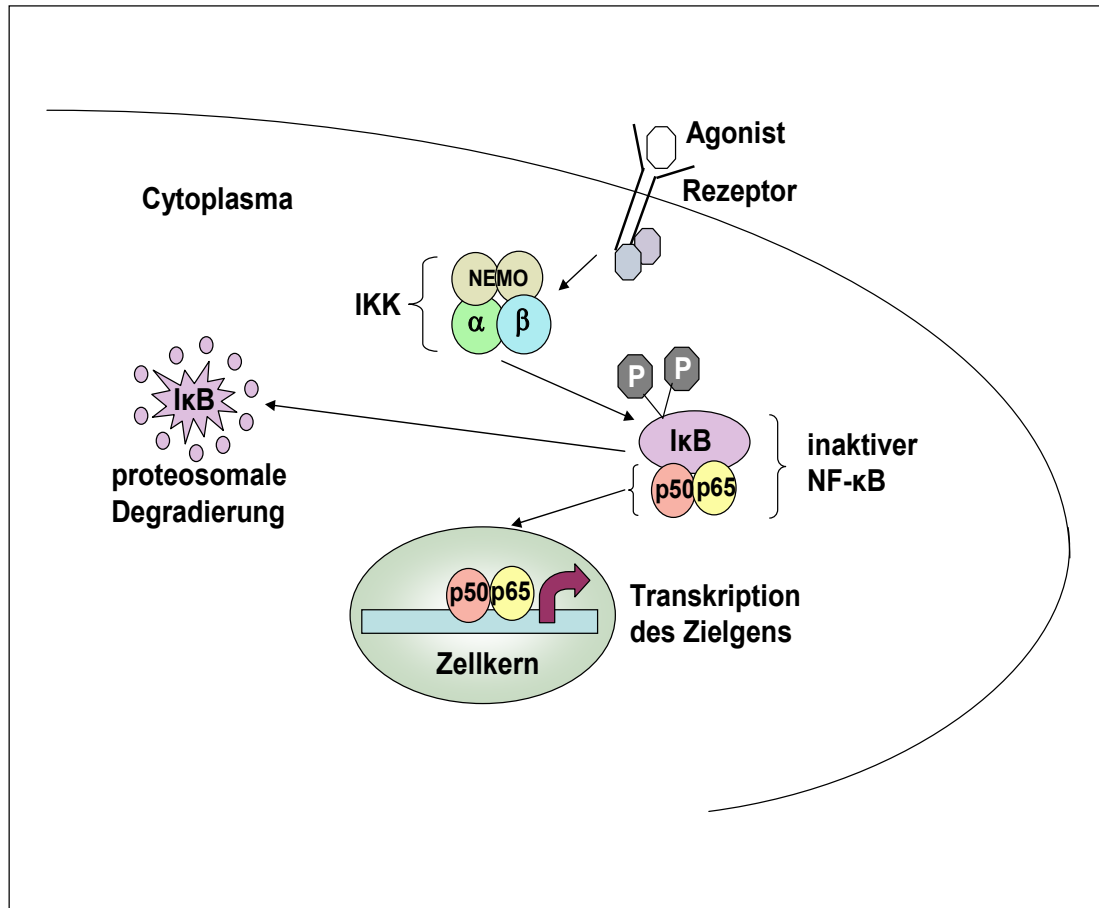


Abb. 3: NF- κ B-Signalweg

Durch Interaktion mit einem spezifischen Inhibitor (I κ B) werden NF- κ B-Dimere wie p50:p65 im Cytoplasma gehalten und bilden somit inaktive Trimere. Oft führt die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor auf der Zelloberfläche über Adapterproteine zur Rekrutierung eines I κ B-Kinase-Komplexes (IKK). Dieser besteht aus zwei sogenannten NEMO- und katalytischen Kinase-Untereinheiten (IKK α und/oder IKK β). IKK phosphoryliert I κ B an zwei Serinresten, was zur Ubiquitinierung und anschließenden proteosomalen Degradierung des Inhibitors führt, so dass der NF- κ B-Dimer freigesetzt wird. Der nun aktive Transkriptionsfaktor tritt in den Zellkern ein, um entsprechende Zielgene anzuschalten (modifiziert nach Gilmore, 2006).

1.4. Posttranskriptionelle Mechanismen der Genregulation: mRNA-Stabilisierung

Ein wichtiger Mechanismus für die Regulation der Expression vieler eukaryotischer Gene ist der kontrollierte Abbau von mRNA. Die regulierte Stabilisierung der mRNA auf der einen, und ihre Degradation auf der anderen Seite, ermöglichen die nachhaltige Korrektur des Expressionsniveaus, besonders von induzierbaren Genen mit kurzer Halbwertszeit. Durch die direkte Bindung von stabilisierenden Proteinfaktoren an AU-reiche Sequenzmotive (AREs) innerhalb der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der Ziel-mRNA, erfolgt somit die Stabilisierung des Transkripts. AREs werden in drei Klassen unterteilt, wobei Klassen I und II sich durch multiple Kopien des Pentanukleotids AUUUA auszeichnen, welche in Klasse III fehlen (Brennan *et al.*, 2001). Eine wichtige Gruppe von mRNA-stabilisierenden Proteinfaktoren sind die Hu-Proteine der *embryonal lethal abnormal vision* (ELAV)-Genfamilie. Das ubiquitär exprimierte *human antigen R* (HuR)-Protein ist über seine mRNA-stabilisierende Wirkung ein wichtiger Faktor bei der Genregulation von Cytokinen, Wachstumsfaktoren und entzündungsrelevanten Enzymen, wie z.B. TNF- α , VEGF und der induzierbaren Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Brennan *et al.*, 2001; Doller *et al.*, 2008a). Es wird in Tumoren, Neointima und restenotisierten venösen Bypässen hochreguliert (Pullmann *et al.*, 2005) und hat somit in verschiedenen Pathologien einen besonderen Stellenwert (Eberhardt *et al.*, 2007). Das HuR-Protein liegt überwiegend im Zellkern vor. Daher ist die Translokation von HuR zwischen Kern und Cytoplasma, das sogenannte *HuR-Shuttling*, Voraussetzung für den Schutz von mRNAs vor schnellem Abbau (Brennan *et al.*, 2001; Doller *et al.*, 2008a). Eine kontrollierte HuR-Translokation und somit Transport der stabilisierten mRNA, erfolgt möglicherweise phosphorylierungsabhängig über eine *HuR-nucleo-cytoplasmic shuttling sequence* (HNS) im HuR-Protein (Fan *et al.*, 1998). Doller *et al.* konnten zeigen, dass infolge der Angiotensin II-induzierten Aktivierung der membrangebundenen PKC und dem nachfolgenden Import von PKC in den Zellkern, HuR phosphoryliert wird, so dass es an COX-2-mRNA binden kann und schließlich mit dieser in das Cytoplasma exportiert wird (Doller *et al.*, 2008b).

Da sowohl eine FXa-, als auch eine PAR-2-vermittelte Aktivierung der PKC gezeigt werden konnte (Monno *et al.*, 2001; van der Merwe *et al.*, 2009) und HuR wiederum von der PKC aktiviert wird (Doller *et al.*, 2008b), wäre auch eine FXa-induzierte Aktivierung von HuR denkbar. Die Expression des humanen PAR-1 scheint zumindest nicht über eine posttranskriptionelle Stabilisierung der mRNA reguliert zu werden (Sokolova *et al.*, 2008). Eine Analyse des humanen PAR-2-Transkripts zeigte jedoch mehrere potentielle Erkennungsmotive (AREs der Klassen I und II) für stabilisierende Proteinfaktoren in der 3'-UTR (Abb. 4). Möglicherweise könnte somit eine HuR-vermittelte mRNA-Stabilisierung und selektive Regulation von PAR-2 vorliegen, welche durch FXa induziert wird.

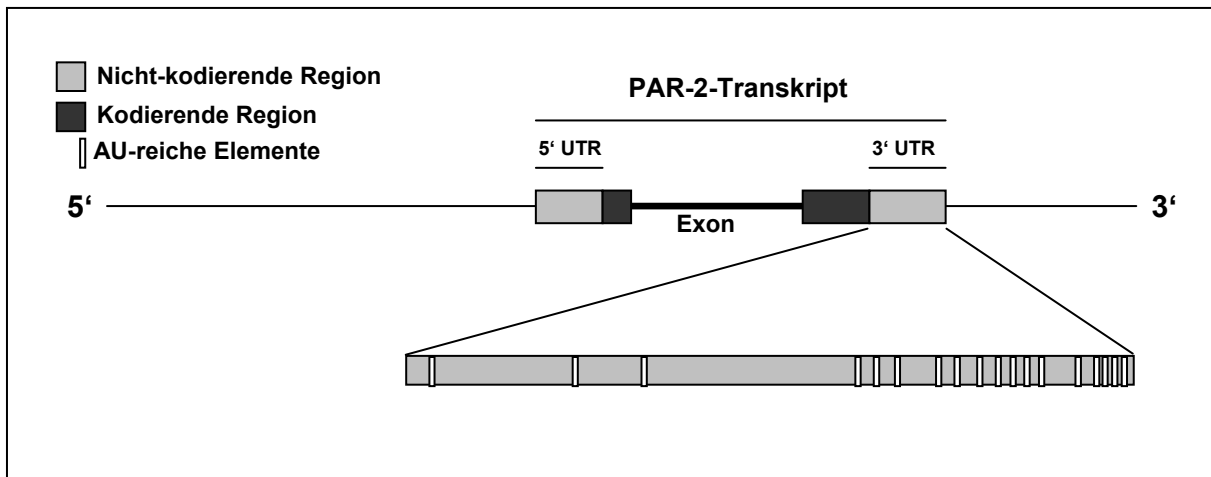


Abb. 4: Schematische Darstellung des humanen PAR-2-Transkripts

Mehrere AU-reiche Elemente (AREs) sind in der 3'-UTR vorhanden und könnten mögliche Bindungsstellen für das mRNA-stabilisierende Protein HuR darstellen.

1.5. Bedeutung von oxidativem Stress für FXa/PAR-2

1.5.1. Reaktive Sauerstoffradikale (ROS)

ROS fungieren als zelluläre Botenstoffe bei der Vermittlung von Apoptose, Zellwachstum und Genregulation. Oxidativer Stress resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen Bildung und dem Abbau von ROS, so dass es zu einem Überschuss an Sauerstoffradikalen kommt. Oxidativer Stress trägt zur Pathogenese von Thrombose, Atherosklerose, Hypertonie und Diabetes bei (Patterson *et al.*, 1999). Die Bildung von ROS verläuft über zelluläre Oxidasen, d.h. über die Cyklooxygenase, die Xanthinoxidase, die Lipoxygenasen, die Oxidasen der mitochondrialen Atmungskette und die NADPH-Oxidase.

1.5.2. Die NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase ist die wichtigste Quelle für ROS in der Gefäßwand (Lassegue *et al.*, 2001). Neben Thrombin sind vor allem das Angiotensin II (Ang II) (Griendling *et al.*, 1994) und Cytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (De Keulenaer *et al.*, 1998) potente Aktivatoren der NADPH-Oxidase. Endothelzellen, SMC, Fibroblasten sowie Monozyten und Makrophagen exprimieren eine NADPH-Oxidase, die unter pathophysiologischen Bedingungen vermehrt aktiviert wird (Vendrov *et al.*, 2007).

In SMC beinhaltet die NADPH-Oxidase die membrangebundenen katalytischen Untereinheiten p22phox und eine NOX-Isoform (Abb. 5). Während endotheliale Zellen NOX-1, NOX-2 und NOX-4 enthalten, exprimieren SMC die Isoformen NOX-1, NOX-4 und NOX-5 (Harrison *et al.*, 2003). Cytosolische Komponenten sind das kleine G-Protein Rac1 und p47phox (Brandes *et al.*, 2005).

Für die Aktivierung der NADPH-Oxidase sind zwei Ereignisse entscheidend: Der Austausch von GTP gegen GDP bei Rac1 und die Phosphorylierung von p47phox durch PKC, wodurch

die cytosolischen Untereinheiten schließlich mit dem Membrankomplex assemblieren und ein funktionsfähiges Enzym bilden. Das reduzierte Substrat NAD(P)H bindet an p22phox auf der cytosolischen Seite der Membran und setzt zwei Elektronen frei. In SMC nutzt das Enzym vorrangig NADH als Substrat (Patterson *et al.*, 1999). Die Elektronen werden auf zwei extrazelluläre Sauerstoffmoleküle auf der anderen Membranseite übertragen, so dass zwei Moleküle von Superoxidanion (O_2^-) entstehen. Diese beiden Moleküle können, als ein besonderes Merkmal der vaskulären NADPH-Oxidase, intrazellulär freigesetzt werden (Lassegue *et al.*, 2003). Das Superoxid konvertiert spontan zu dem stabileren Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder wird durch die Superoxiddismutase (SOD) zu diesem umgewandelt (Harrison *et al.*, 2003). H_2O_2 weist eine hohe Membranpermeabilität auf und kann in Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt sind, hohe mikromolare Konzentrationen erreichen (Li *et al.*, 2001).

1.5.3. ROS in der vaskulären Pathogenese

In vaskulären Zellen haben ROS direkte proliferative Effekte und sind wichtige Botenstoffe für die mitogene Wirkung von PDGF sowie die Thrombin-vermittelte Mitogenese (Patterson *et al.*, 1999). Hierbei spielt H_2O_2 eine besondere Rolle als zellulärer Botenstoff (Griendling *et al.*, 2000). Dieses Molekül kann Tyrosinkinasen aktivieren und Tyrosinphosphatasen inhibieren sowie die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2, p38 MAPK und JNK stimulieren (Harrison *et al.*, 2003).

Superoxid fördert zusätzlich die Atherogenese durch die Hemmung der protektiven Wirkung von *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF bzw. NO) und die Oxidation von Lipiden, besonders von LDL (Vendrov *et al.*, 2007). Eine weitere wichtige Wirkung von ROS ist zudem die veränderte Expression von Genen, die über die Aktivierung von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B, in die frühen Stadien von Atherosklerose involviert sind (Pueyo *et al.*, 2000).

Durch oxidativen Stress kann zudem die HuR-abhängige Stabilisierung von mRNA bei verschiedenen Genen posttranskriptionell moduliert werden (Abdelmohsen *et al.*, 2008; Kuwano *et al.*, 2008). So wurde z.B. für die Regulation der Expression von Hsp70 ein Signalweg postuliert, bei dem H_2O_2 die PKC aktiviert, welche HuR phosphoryliert, so dass dieses die entsprechende Ziel-mRNA bindet (Amadio *et al.*, 2008). Dies könnte eine frühe zelluläre Antwort auf oxidativen Stress darstellen.

Durch die H_2O_2 -vermittelte Aktivierung der PKC (Harrison *et al.*, 2003), die im Mittelpunkt verschiedener pathogener Signalwege steht, kann die PKC-abhängige NADPH-Oxidase durch die Produktion von Superoxid bzw. H_2O_2 eine sich selbst verstärkende Regulationsschleife vermitteln (Li *et al.*, 2001). Es gibt Hinweise, dass solch eine, durch ROS

induzierte, Regulationsschleife die Expression des PAR-1 regulieren kann (Herkert *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2001).

Ob FXa oxidative Effekte ausübt, und ob der PAR-2 in eine ähnliche ROS-abhängige Regulationsschleife wie der PAR-1 involviert ist, ist nicht bekannt. Zumindest in murinen Lymphozyten wird die ROS-Generierung durch Trypsin, eine Protease welche neben FXa ebenfalls PAR-2 aktiviert, induziert (Lim *et al.*, 2006). Ob eine derartige Induktion auch in humanen SMC stattfindet, wurde bisher nicht untersucht.

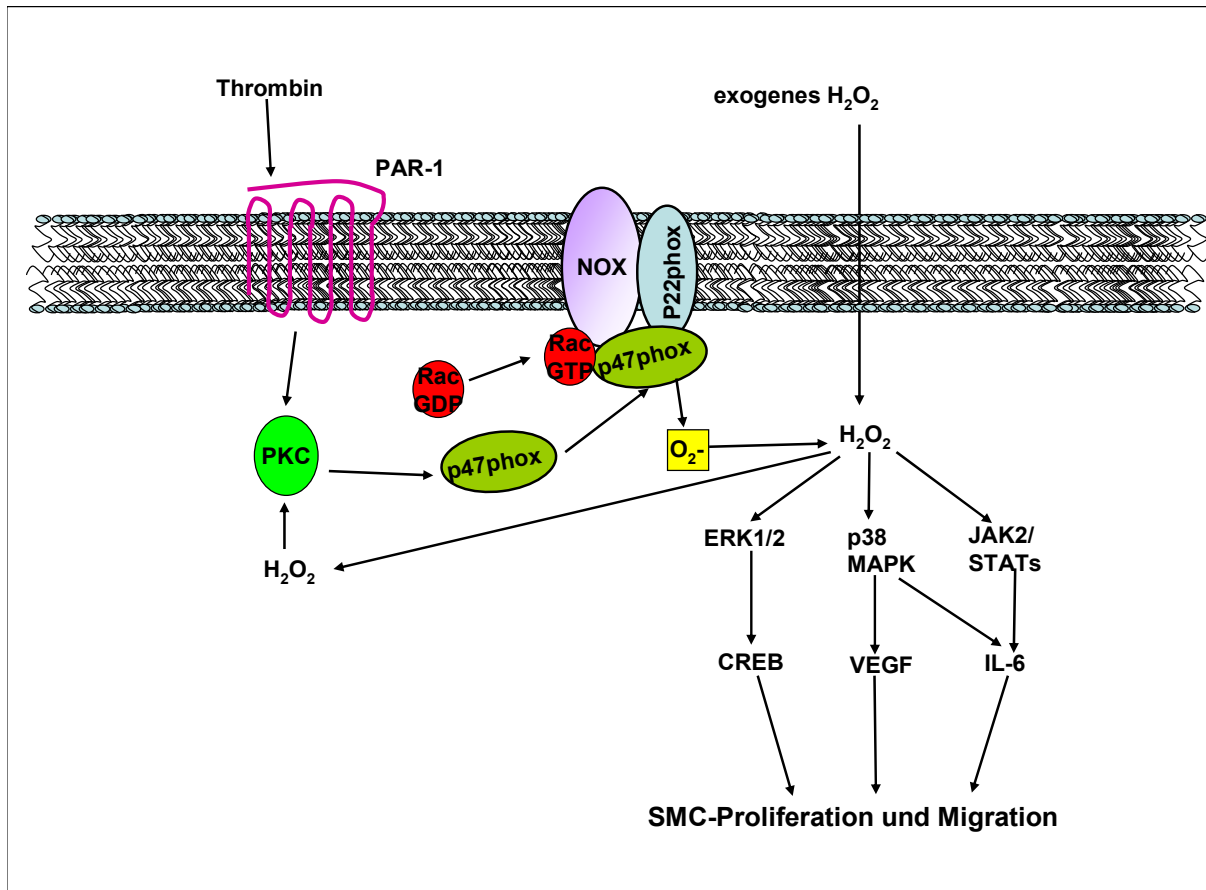


Abb. 5: Die NADPH-Oxidase als Effektor für die zellulären Wirkungen von Thrombin

Über Aktivierung der PKC und damit der NADPH-Oxidase, werden intrazelluläre ROS generiert, welche wichtige Mediatoren bei redox-abhängigen Signalwegen sind, die zum vaskulären *Remodeling* beitragen.

1.6. Fragestellung der Arbeit

Bezüglich der Wirkung und Regulation von PAR-1 und PAR-2 durch FXa in humanen venösen SMC ergeben sich daher folgende Fragestellungen:

1. Werden PAR-1 und PAR-2 reguliert?
2. Wie werden sie reguliert?
3. Welche zellulären Konsequenzen ergeben sich ?
4. Welche Rolle spielt oxidativer Stress?

2. Material und Methoden

2.1. Substanzen

Substanz	Wirkung	Hersteller
Actinomycin D (5 µg/mL)	Zytostatikum	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Argatroban (100 ng/µL)	Thrombininhibitor	Mitsubishi Pharma Düsseldorf, Deutschland
Angiotensin II (10 nM-1 µM)	Wachstumsfaktor	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bovines α-Thrombin (3 Units/mL)	Serinprotease	Dr. J. Stürzebecher †, Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin, Jena, Deutschland
Humaner FXa (30 nM)	Serinprotease	Kordia Life Sciences, Leiden, Niederlande
H ₂ O ₂ (100 µM)	Oxidativer Stimulus	Merck, Darmstadt, Deutschland
Katalase, aus Rinderleber (500 Units/mL)	Spaltet H ₂ O ₂ zu Sauerstoff und Wasser.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NF-κB activation inhibitor SN50 (100 nM)	NF-κB-Inhibitor	Calbiochem, San Diego, CA, USA
PAR-1AP (TFLLRN-NH ₂) (200 µM)	Synthetisches Hexapeptid PAR-1 Agonist	Biosynthan GmbH, Berlin, Deutschland
PAR-2AP (SLIGKV-NH ₂) (200 µM)	Synthetisches Hexapeptid PAR-2 Agonist	Biosynthan GmbH, Berlin, Deutschland

2.2. Antikörper

2.2.1. Primärantikörper

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
PAR-2 (N-19): sc-8206 (Ziegen polyklonaler AK)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:100
PAR-2 (SAM11): sc-13504 (Maus monoklonaler AK)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:100

PAR-2 (SAM11) PE sc-13504, (PE-konjugiert, AK für Durchflusszytometrie)	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:5
IgG1 (Mouse)-PE (Isotyp-Kontrolle für Durchflusszytometrie)	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich	1:5
Rabbit polyclonal to NOX-1 (ab55831) (Hasen polyklonaler AK)	Abcam, Cambridge, UK	1:100
Mox1 (H-15): sc-5821 (Ziegen polyklonaler AK)	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:100
NOX4 (H-300): sc-30141 (Hasen polyklonaler AK)	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:100
p47-phox (A-7): sc-17844 (Maus monoklonaler AK)	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:100
β -Aktin (Maus monoklonaler AK)	Sigma, Schnelldorf, Deutschland	1:10 000 – 1:20 000
HuR (3A2): sc-5261 (Maus monoklonaler AK)	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:100
Normal mouse IgG: sc-2025 (Isotyp-Kontrolle für <i>Pull- down</i> -PCR)	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:100
NF- κ B p65 (C-20): sc-372 (Hasen polyklonaler AK)	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:100
p-I κ B- α 39A1431: sc-52943 (Maus monoklonaler AK)	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:100
P44/42 MAP Kinase Antibody # 9102 (Maus monoklonaler AK)	Cell Signaling TECHNOLOGY, Danvers, MA, USA	1:1000
Phospho-p44/42 MAPK (Thr 202/Tyr 204) Antibody # 9101 (Maus monoklonaler AK)	Cell Signaling TECHNOLOGY, Danvers, MA, USA	1:1000

2.2.2. Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
goat anti-rabbit IgG-HRP SC-2004 (HRP-konjugiert)	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:3000
donkey anti-goat IgG-HRP SC-2020	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:3000
goat anti-mouse IgG-HRP SC-2005	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:3000
anti-rabbit IgG F(ab') ₂ Frag. (Cy3-konjugiert)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland	1:600

2.3. Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Lösungen wurden in höchster verfügbarer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Die nachfolgend aufgelisteten Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit entmineralisiertem Wasser hergestellt.

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
DMEM (Vollmedium)	DMEM 500mL: 5.5 mM Glukose, 15% FCS, 100 Units/mL Penizillin, 0.1 mg/mL Streptomycin, 1.9 mM L-Glutamin, 9.6 mM Natriumpyruvat
Elutions-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1% SDS, 50 mM NaHCO ₃
HEPES-Puffer	10 mM HEPES (pH 7.4), 145 mM NaCl, Na ₂ HPO ₄ 0.5 mM, Glukose 5.5 mM, MgSO ₄ 1 mM, CaCl ₂ 1.5 mM
Lämmli-Puffer (2x)	125 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7.0), 100 mM DTT, 20% Glycerin, 4% SDS, 0.002% Bromphenolblau
Laufpuffer	190 mM Glycin, 25 mM Tris (pH 8.5), 0.1% SDS
PBS/EDTA	0.1 mM EDTA in PBS

Puffer A (hypotonischer Homogenisierungspuffer, Lagerung bei 4°C)	10 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, + 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) und entsprechend H ₂ O dest., + 1 mM DTT, + 1% PMSF
Puffer C (nukleärer Extraktionspuffer, Lagerung bei 4°C)	20 mM HEPES (pH 7.5), 25% Glycerol, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, + 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) und entsprechend H ₂ O dest., + 1 mM DTT, + 1% PMSF
Quellpuffer	25 mM HEPES (pH 7.8), 1.5 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl, 0.1% NP40, + frisches PMSF, + frisches 1mM DTT, + 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) und entsprechend H ₂ O dest.
salzarmer Waschpuffer	50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20, 2 mM EDTA (pH 8.0), 2 mM EGTA, 0.1% SDS
salzreicher Waschpuffer	50 mM Tris/HCl (pH 7.4), 500 mM NaCl, 0.2% Tween 20, 2 mM EDTA (pH 8.0), 2 mM EGTA, 0.1% SDS
Sammelgel (5% für 2 Gele)	H₂O dest. 4.1mL 30% Acrylamid-Lösung 1 mL 1 M Tris/HCl (pH 6,8) 0.75 mL 10% SDS 60 µL 10% APS 60 µL TEMED 6 µL
Sonifizierungspuffer	50 mM HEPES (pH 7.8), 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X 100, 0.1% Na-Desoxycholat, 0.1% SDS, + frisches PMSF, + 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) und entsprechend H ₂ O dest.

TE	10 mM Tris/HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, + frisches PMSF, + 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) und entsprechend H ₂ O dest.
Transferpuffer (1x)	190 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% Methanol
Trenngel (10% für 2 Gele)	H₂O dest. 4 mL 30% Acrylamid-Lösung 3.3 mL 1.5 M Tris/HCl (pH 8,8) 2.5 mL 10% SDS 100 µL 10% APS 100 µL TEMED 4 µL
Trypsin-EDTA (1x), Lagerung bei -20°C	0.5 g/L Trypsin, 0.2g/L EDTA
TBS (10x)	1.5 M NaCl, 100 mM Tris/HCl (pH 7.4)
TBST (1x)	1xTBS + 0.1% Tween 20
TBST-BSA	1xTBST + 5% BSA
TBST-M	1xTBST + 5% Magermilchpulver
Zitratlösung (10x), autoklaviert, Lagerung bei 4°C	1.35 M Kaliumchlorid, 0.15 M Natriumzitat

2.4. Zellkultur

2.4.1. Isolation und Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen

Präparate der humanen *Vena saphena* wurden von der Herzchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf mit Genehmigung der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität und durch Einwilligung der Spender bereitgestellt. Vaskuläre SMC wurden durch die Explant-Technik nach Fallier-Becker (Fallier-Becker *et al.*, 1990) isoliert. Die Gefäße wurden der Länge nach geöffnet und in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM, GibcoBRL, Rockville, MD, USA) gehalten. Nach mechanischer Entfernung des Endothels durch behutsames Abkratzen, wurde die Media vorsichtig von der Adventitia entfernt und in etwa 1 mm große Segmente geschnitten. Diese wurden in 6-Loch-Kulturplatten in DMEM bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Vollmedium wurde alle 48 h gewechselt. Innerhalb von ein bis zwei Wochen wuchsen die SMC aus den medialen Explantaten und proliferierten. Der vaskuläre SMC-Phänotyp konnte in Primärkulturen durch sein typisches, sogenanntes „*hill and valley*“-Erscheinungsbild und Anfärbung von SM-Aktin festgelegt werden. Nach dem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (5 Min., Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und Zugabe von Vollmedium abgelöst. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 Min.) gesammelt, in frischem

Vollmedium resuspendiert und in Kulturplatten ausgesäht. Für die Experimente wurden vaskuläre SMC der Passagen 4-10 verwendet und durch Serumentzug (48-72 h) vor der Stimulation synchronisiert.

Zellkulturgefäße wurden von den Firmen BD (Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland) und Greiner Bio-One GmbH (Solingen, Deutschland) bezogen.

2.5. Aufreinigung und Analyse von RNA

2.5.1. Aufreinigung von Gesamt-RNA aus SMC

Die Präparation von Gesamt-RNA aus SMC erfolgte mit Hilfe von Trizol (TRI[®] Reagent, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Direkt nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen durch Zugabe von Trizol (1 mL/Well) lysiert. Nach einer Inkubation von 10 Min. bei Raumtemperatur (RT), wurde das Lysat in autoklavierte 1.5 mL Eppendorf-Gefäße überführt, 200 µL Chloroform hinzugegeben, aufgeschüttelt, 10 Min. bei RT inkubiert und anschließend 15 Min. bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Danach wurde von dem wässrigen Überstand 450 µL abgenommen und die darin enthaltene RNA durch Zugabe von 500µL Isopropanol für mindestens 15 Min. bei RT ausgefällt. Anschließend wurden die Proben bei 4°C für 30 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Pellets mit 1 mL 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut für 15 Min. bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschschriffs, wurde das Ethanol abgesaugt, die Pellets bei 37°C getrocknet, in 21 µL Milli-Q[®]-Wasser (Millipore, Bedford, MA, USA) aufgenommen und schließlich im Schüttelinkubator bei 65°C für 5 Min. gelöst. Die Proben wurden danach kurz zentrifugiert und entweder sofort quantifiziert oder bei -20°C gelagert.

2.5.2. Quantifizierung von RNA

Die Konzentration und Reinheit der RNA erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm mit dem Nanodrop[®] Spektrophotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland). Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm und von aromatischen Aminosäuren oder Phenol bei 280 nm liegt, ermöglicht der Quotient aus beiden Absorptionswerten (260/280 nm) eine gute Abschätzung der RNA-Reinheit und sollte zwischen 1.5 und 2 liegen. 1 OD₂₆₀ = 40 µg/mL RNA.

2.5.3. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die Analyse der Genexpression wurde mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wie beschrieben durchgeführt (Rosenkranz *et al.*, 2009). Es wurden 0.5-1 µg RNA mit dem cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Die Synthese wurde in einem Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Detektion des Expressionsniveaus der mRNA des Zielgens wurde mit dem Sensi-Mix SYBR® Green Reagent (Quantace, London, UK) und QuantiTect® Primer Assays (Qiagen, Hilden, Deutschland) im 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Expressionsniveaus des Zielgens wurden auf GAPDH mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Winer *et al.*, 1999) normalisiert. Regulatorische Effekte wurden gezeigt, indem die Werte der stimulierten Proben zu ihrer jeweiligen Kontrolle in Bezug gesetzt wurden. Trotz der verwendeten Stimulationsintervalle, änderte sich die Expression von GAPDH über den gesamten Zeitverlauf nicht, so dass es als geeignetes Haushaltsgen in humanen SMC fungierte.

2.6. Western Blot

Expressionsniveaus von Proteinen wurden mittels Western Blot detektiert. Hierfür wurden Zellen in 2xLämmli-Puffer lysiert und die Proben bis zur Western Blot-Analyse bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die enthaltenen Proteine für 5 Min. bei 90°C denaturiert und kurz gevortext. Auftrennung und Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Vor der Ladung der Proteine auf das 5%-ige Sammelgel, wurde das jeweilige Probenvolumen 10x in der Pipette hoch- und runtergezogen. Das sich unterhalb des Sammelgels befindende Trenngel, hatte eine Acrylamidkonzentration von 10%. Die Proteinauftrennung erfolgte für 60-90 Min. bei 150 V in einer entsprechenden Kammer für Gelelektrophorese (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad, München, Deutschland) unter der Verwendung von 1xLaufpuffer. Als Molekulargewichtsmarker fungierte ein vorgefärbter hochmolekularer Proteinstandard (~10-130 kDa, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Millipore, Bedford, MA, USA) übertragen. Hierfür wurde die Membran in Methanol aktiviert und danach, wie die Gele, in Transferpuffer überführt. Die Übertragung erfolgte in einer „Semi-Dry“-Blot-Kammer (Bio-Rad, München, Deutschland) bei 12 V für 50 Min.. Die Membran wurde anschließend für 1.5-4 h in TBST-M (5%) oder TBST-BSA (5%) inkubiert um unspezifisches Binden von Antikörpern an die proteinbindende Membran zu verhindern. Danach erfolgte die Inkubation mit Primärantikörper bei 4°C über Nacht.

Am nächsten Tag erfolgte nach 3x15 Min. Waschen mit 1xTBST, eine 1.5-3 h andauernde Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:3000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Nach erneutem 3x15 Min. Waschen wurden die Proteinbanden durch eine Luminol (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland) und H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland) enthaltende Lösung, bei der stets 1 µL H₂O₂ mit 3 mL Luminollösung gemischt wurde, sichtbar gemacht. Hierbei wurde das, als Substrat fungierende Luminol durch den Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper durch H₂O₂ oxidiert. Bei schwerer detektierbaren Proteinen wurde eine Chemilumineszenz mit Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA, USA) nach den Angaben des Herstellers erreicht. Durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK) wurde die Chemilumineszenz schließlich visualisiert.

Die entwickelten Röntgenfilme wurden mit einem GS-800 Calibrated Densitometer (Bio-Rad, München) eingescannt und mit der entsprechenden Software (Quantity One®, Bio-Rad, München) ausgewertet. Die Expression wurde auf β-Aktin normalisiert, nachdem die Membran mit 0.2 M NaOH für 5 Min. „gestrippt“, erneut mit entsprechenden Antikörpern inkubiert und entwickelt wurde.

2.7. Immunozytochemie

Auf 10 mm Deckgläschen ausgesäte, subkonfluente SMC wurden stimuliert und nach Ablauf der Inkubationszeit für den Stimulus mit Paraformaldehyd (4% in PBS) für 20 Min. bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation für 5 Min. in 0.1% Triton X-100 permeabilisiert und danach mit Primärantikörper für NOX-1 (1:100, Abcam, Cambridge, UK) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3x5 Min. mit PBS gewaschen und mit Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper (1:600, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für 1 h bei RT in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Zellen für 3x10 Min. und 3x5 Min. mit PBS gewaschen, worauf schließlich die Kernfärbung mit Hoechst-33342 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) für 20-30 Sek. und erneutes Waschen mit PBS (3x5 Min.) erfolgte. Fluoreszenzbilder wurden sofort mit der Colorview II Kamera und Soft Imaging System (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland) in Verbindung mit dem Olympus BX50 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) aufgenommen.

2.8. Durchflusszytometrie

Für die Analyse der Zelloberflächenexpression von PAR-2 wurden SMC in 6-Loch-Platten ausgesät und mit FXa (30 nM, Kordia Life Sciences, Leiden, Niederlande) stimuliert. Nach nicht-enzymatischer Ablösung der Zellen mit 1xZitrat (0.135 M Kaliumchlorid, 0.015 M Natriumzitrat) für 5-10 Min. bei 37°C wurden die Zellsuspensionen der verschiedenen Proben für 35 Sek. bei 5000 rpm zentrifugiert. Die resultierenden Zellpellets wurden jeweils in 50 µL PBS resuspendiert und mit 10 µL Phycoerythrin (PE)-konjugiertem PAR-2-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) für 15-30 Min. bei RT in Dunkelheit inkubiert.

Der als entsprechende Isotyp-Kontrolle fungierende, ebenfalls PE-konjugierte Antikörper (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich), wurde eingesetzt um unspezifische Bindungen in der späteren Auswertung berechnen zu können. Die Isotyp-Kontrolle stammte somit aus der gleichen Spezies (Maus) wie der PAR-2-Antikörper und war an den selben Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt.

Die Proben wurden mit 500 µL Waschpuffer gemischt und direkt in einem EPIC-XL Zytometer (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) analysiert. SMC-Populationen konnten anhand ihrer zellspezifischen Streulichteigenschaften, d.h. durch das sogenannte Vorwärtstreulicht (FSC: *Forward Scatter*) und das Seitwärtstreulicht (SSC: *Sidewards Scatter*) identifiziert werden. Die Detektion wurde bei logarithmischer Amplifikation durchgeführt. Es wurde jeweils die Fluoreszenz von 5000 Zellen mit der System II (3.0)-Software gemessen. Für die Quantifizierung wurde der Wert der „Mittleren Fluoreszenzintensität“ (Mn X) des Isotyps von dem Wert der Kontrolle und der jeweiligen stimulierten Probe abgezogen. Der jeweils resultierende Wert der stimulierten Proben wurde auf den Wert der Kontrolle normalisiert.

2.9. Bestimmung der DNA-Syntheserate

Die DNA-Syntheserate wurde mittels [³H]-Thymidin-Inkorporation, nach einem modifizierten Protokoll, wie beschrieben (Rauch *et al.*, 2004) bestimmt. Hierfür wurden subkonfluente SMC mit verschiedenen Stimulanzen inkubiert und 20 h danach mit [³H]-Thymidin (1 µCi/mL, PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) markiert. Nach 4-6 h wurden die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen, gefolgt von einer Inkubation von 2x2 Min. in 0.3 M Perchloroessigsäure. Durch die darauffolgende Inkubation der Proben in 0.1M NaOH für 30 Min. bei 37°C wurde die DNA solubilisiert. Die Radioaktivität wurde im Szintillationsdetektor 6000IC (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) gemessen.

2.10. siRNA-vermitteltes Gen-silencing

Für das Gen-silencing von PAR-1, PAR-2, HuR und NOX-1 wurden subkonfluente SMC mit 30 nM Kontrol- und entsprechender, für das jeweilige Gen spezifischer siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) transfiziert. Für die Transfektion wurde Oligofectamine™ Reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Für PAR-1, PAR-2 und HuR wurde der Transfektionseffekt auf mRNA-Ebene durch qPCR untersucht, wogegen für NOX-1 die Transfektion mittels Western Blot validiert wurde. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion stimuliert.

2.11. Detektion von intrazellulären, reaktiven Sauerstoffradikalen

2.11.1. 2', 7'-Dichlorofluorescein Diacetat (DCF-DA)

Die Bildung von intrazellulären, reaktiven Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*, ROS) wurde durch die Fluoreszenz des, für reaktive Sauerstoffspezies sensitiven, Fluoreszenzfarbstoffs 2', 7'-Dichlorofluorescein Diacetat (DCF-DA, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) gemessen. Hierfür wurden SMC in 96-Loch-Platten ausgesät und bei entsprechender Konfluenz schließlich stimuliert. Vor Ablauf der letzten 30 Min. der Stimulation wurden die Zellen mit 5 µM DCF-DA und 3 mM DETC (*diethyldithiocarbamate*, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) beladen und bei 37°C in Dunkelheit gehalten.

DCF-DA ist neutral und membrangängig, so dass es leicht durch Diffusion in die Zelle gelangt. Dort hydrolysiert es zu dem nichtfluoreszierenden, polaren DCFH, welches nicht mehr die Membran passieren kann und somit in der Zelle akkumuliert. Bei der intrazellulären Bildung von ROS wird DCFH zu dem fluoreszierenden 2', 7'-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert (Bae *et al.*, 1997). Außerdem ist DCF-DA nicht giftig, was ein deutlicher Vorteil gegenüber anderen Fluoreszenznachweisen ist. DETC ist ein Inhibitor der Superoxiddismutase und verhindert somit die Dismutation von O_2^- zu H_2O_2 während der Inkubation.

Nach Ablauf des Stimulationsintervalls wurden die Zellen mit PBS gewaschen und schließlich die intrazelluläre Fluoreszenz als Maß für die ROS-Bildung am Victor II Fluorimeter (PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) gemessen. Es wurde stets der Mittelwert von 6 Replikaten jeder Probengruppe bzw. jedes Stimulationszeitpunkts bei jedem Experiment genommen.

2.11.2. Dihydroethidium (DHE)

Zur Visualisierung der intrazellulären ROS-Bildung wurde Dihydroethidium (DHE, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verwendet. Hierfür wurden SMC in 6-Loch-Platten ausgesäht und bei entsprechender Konfluenz schließlich stimuliert. Für die ROS-Detektion wurde DHE in einer Konzentration von 5 μ M eingesetzt.

DHE ist wie DCF-DA ein membrangängiger Fluoreszenzfarbstoff und zeichnet sich im Gegensatz zu letzterem jedoch durch toxische Eigenschaften aus, was bei der Handhabung besonders zu beachten ist. Bei der Bildung von ROS wird DHE zu seinem fluoreszierenden Derivat oxidiert. Das resultierende Ethidium interkaliert im Zellkern schließlich mit der DNA (Saiki *et al.*, 1986).

Fluoreszenzbilder wurden sofort mit der Colorview II Kamera und Soft Imaging System (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland) in Verbindung mit dem Olympus BX50 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) aufgenommen.

2.12. Zellfraktionierung und NF- κ B-Translokationsstudie

Die Akkumulation von nukleärem NF- κ B und cytosolischem Phospho-I κ B- α wurde mittels Western Blot als Maß für die Aktivierung von NF- κ B ermittelt. SMC wurden mit FXa (30 nM, Kordia Life Sciences, Leiden, Niederlande) stimuliert und nach Ablauf der Inkubationsintervalle erfolgte die Extraktion der zellulären Fraktionen, wie beschrieben (Rauch *et al.*, 2000). Zum Sammeln der cytosolischen und nukleären Fraktionen wurden SMC in PBS gewaschen und mit 0.1 mM EDTA in PBS abgelöst. Anschließend wurden die Zellen gesammelt, für 2 Min. bei 6000 rpm zentrifugiert und in 200 μ L eiskaltem, hypotonischem Homogenisierungspuffer (Puffer A) durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert. Nachdem die Zellen für 15-20 Min. auf Eis „anschwellen“ konnten, wurden jeweils 10 μ L 1%-iges NP40 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) hinzugefügt und die Zellkerne durch „Scheren“ in einer 25-G Kanüle freigesetzt. Nach Zentrifugation für 10 Min. bei 4°C und 13 000 rpm wurden die resultierenden Überstände als cytosolische Fraktionen genommen und die nukleären Pellets in 50 μ L Puffer C resuspendiert. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mittels Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, München, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers ermittelt und alle Proben wurden anschließend auf einheitliche Konzentrationen verdünnt. Danach wurden schließlich cytosolischer und nukleärer NF- κ B p65 sowie cytosolischer Phospho-I κ B- α durch Western Blots mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

2.13. Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Unter Verwendung der Transfac®- und Genomatix-Datenbank (www.gene-regulation.com, www.genomatix.de) wurden bei der Sequenzanalyse des humanen PAR-2-Promotors (Accession number NM 005242) zwei Bindungsstellen für NF-κB gefunden.

Die spezifische Bindung von NF-κB im PAR-2-Promotor wurde in SMC, welche für 2 h mit FXa (30 nM, Kordia Life Sciences, Leiden, Niederlande) stimuliert wurden, durch eine modifizierte Chromatinimmunpräzipitations (ChIP)-Methode, wie beschrieben (Rosenkranz *et al.*, 2009) untersucht. Der 2 h-Intervall wurde gewählt, da sich hier in Vorversuchen die maximale Aktivierung von NF-κB durch FXa zeigte. Die SMC (jeweils 2xd100-Platten) wurden nach der Stimulation mit 1.5%-igem Formaldehyd bei RT für 20 Min. fixiert. Die chemische Kreuzvernetzung (*crosslinking*) der Transkriptionsfaktoren mit ihrer DNA-Bindungsstelle wurde durch Zugabe von 0.125 M Glycin abgestoppt. Die Zellen wurden anschließend gesammelt und für 5 Min. bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert. Die Zellen in den resultierenden Pellets wurden in Quellpuffer resuspendiert, für 20 Min. bei 4°C inkubiert und somit hypotonisch lysiert. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 2000 rpm und 4°C gesammelt. Nach Sonifizierung wurde das Chromatin durch Inkubation mit Protein G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) aufgereinigt, jeweils ein 20 µL-Aliquot von jedem Ansatz als „Input“-Kontrolle weggefroren und der Rest mit NF-κB p65-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) bei 4°C über Nacht immunpräzipitiert (IP). Die Chromatin-Antikörper-Komplexe der IP-Proben wurden durch Inkubation mit Protein G PLUS-Agarose bei 4°C über 6 h gesammelt und ausgiebig mit Sonifizierungspuffer, Puffer A, Puffer B und TE gewaschen. Die Protein-DNA-Komplexe wurden eluiert, Kreuzvernetzungen (*crosslinks*) nach Zugabe von 200 mM NaCl und anschließender Erhitzung bei 65°C über 5 h aufgehoben und mit Proteinase K (5 mg/mL, Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) behandelt. Die DNA wurde durch Extraktion in einem Mix aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol aufgereinigt und schließlich mit Ethanol präzipitiert.

Die aufgereinigte DNA fungierte in der anschließenden PCR als Matrize. Für die Amplifikation der beiden NF-κB-Bindungsstellen im PAR-2-Promotor wurde mit den NF-κB-spezifischen Primern 5'-CCTCTTGTGCTCCCCACCGC-3' (*forward*) und 5'-AAGCGGGTCGTGGTCTCCC-3' (*reverse*), eine Region von 196 bp amplifiziert, welche die erste der beiden NF-κB-Bindungsstellen beinhaltete. Eine 173 bp umfassende Region, welche die zweite NF-κB-Bindungsstelle enthielt, wurde mit den beiden Primern 5'-AAGGCAAGGGAGACCGACGAC-3' (*forward*) und 5'-CTTAGACTGCGGGAGCCGCC-3' (*reverse*) synthetisiert. Als Primer für die Negativkontrolle fungierten 5'-ATGTTGCCACTGGGGATCT-3' (*forward*) und 5'-TGCCAAAGCCTAGGGGAAGA-3' (*reverse*), welche in der 3'-UTR von GAPDH banden. Alle angegebenen Primer wurden von

Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) synthetisiert. Die Konditionen im Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) waren: 5 Zyklen bei 94°C/ 30 Sek., 72°C/ 60 Sek.; 5 Zyklen bei 94°C/ 30 Sek., 70°C/ 30 Sek., 72°C/ 60 Sek., darauf folgten 35 Zyklen 94°C/ 30 Sek., 58°C/ 30 Sek., 72°C/ 60 Sek.. Die PCR-Produkte wurden mit einem 1.7%-igen Agarose-/Ethidiumbromid-Gel nachgewiesen und unter UV-Licht visualisiert.

2.14. HuR-Translokationsstudie (*HuR-Shuttling*)

Die cytosolische Akkumulation des mRNA-stabilisierenden HuR-Proteins, als Maß für dessen Aktivierung, wurde mittels Western Blot von cytosolischen und gesamten zellulären Fraktionen ermittelt. SMC wurden mit FXa (30 nM, Kordia Life Sciences, Leiden, Niederlande) oder H₂O₂ (100 µM, Merck, Darmstadt, Deutschland) stimuliert und nach Ablauf der Inkubationsintervalle erfolgte die Extraktion der zellulären Fraktionen, wie in 2.12. beschrieben. Hierbei wurde vor dem letzten Zentrifugationsschritt ein Aliquot als Gesamtzelllysat entnommen. HuR aus der cytosolischen und gesamten zellulären Fraktion wurde mit dem entsprechenden Antikörper detektiert. Cytosolisches HuR wurde auf HuR aus der entsprechenden gesamten zellulären Fraktion, wo sich über den gesamten Zeitverlauf stets eine gleichmäßige Beladung zeigte, normalisiert.

2.15. Immunpräzipitations (*Pull-down*)-PCR

Die Bindung von HuR an die PAR-2-mRNA wurde wie beschrieben (Doller *et al.*, 2008a) mittels Immunpräzipitations (*Pull-down*)-PCR untersucht. SMC wurden mit FXa (30 nM, Kordia Life Sciences, Leiden, Niederlande) stimuliert und 2 h später erfolgte die Extraktion der cytosolischen Fraktion, wie in 2.12. beschrieben. Der 2 h-Intervall wurde gewählt, da sich hier in Vorversuchen die maximale Aktivierung von HuR durch FXa zeigte. Die Proteinkonzentrationen aller Proben wurden mittels Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, München, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers ermittelt und alle Proben wurden anschließend auf gleiche Konzentrationen verdünnt (300-500 µg/mL). Ein Aliquot von jedem Ansatz wurde als „*Input*“-Kontrolle genommen. Der Rest wurde auf 2 gleiche Volumina aufgeteilt und auf 1 mL mit Puffer A aufgefüllt. Zu jedem der beiden Eppies wurde eine Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Risch, Schweiz) und entweder HuR- oder Maus IgG-Antikörper, jeweils 2 µg pro mg Protein, gegeben. Die Immunpräzipitation (IP) dieser Proben verlief bei 4°C über Nacht. Nach Zugabe von Protein-G Sepharose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) für 2 h bei 4°C wurden die IP-Proben für 60 Sek. bei 13 000 rpm und 4°C zentrifugiert und die Pellets zuerst mit salzarmem und anschließend mit salzreichem Waschpuffer gewaschen. Der jeweilige

Sepharose-Antikörper-Antigenkomplex wurde schließlich durch Zentrifugation für 60 Sek. bei 13 000 rpm und 4°C sowie anschließendes Trocknen gesammelt.

Zuletzt wurde die RNA aus den „*Input*“-Kontrollen sowie den immunpräzipitierten HuR- und IgG-Proben aufgereinigt, mit RNase-free DNase1 (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) behandelt, in cDNA umgeschrieben und die Analyse der HuR-Bindung auf dem PAR-2-Transkript mittels qPCR untersucht. Die IP-Proben wurden auf PAR-2-Expression untersucht und auf die Expression von 18S-rRNA in den „*Input*“-Kontrollen normalisiert.

2.16. Statistik

Die Daten sind Mittelwerte $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von mindestens drei unabhängigen Einzelexperimenten und wurden auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Signifikanzunterschiede zwischen mehreren Versuchsgruppen wurden mittels *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche überprüft. Das Signifikanzniveau wurde als $P < 0.05$ festgelegt. Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit GraphPad Prism-Software (Version 5.0, GraphPad Software, San Diego, USA) und Microsoft Excel™ (Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland).

3. Ergebnisse

3.1. Regulation der FXa-Rezeptoren PAR-1 und PAR-2

3.1.1. FXa induziert selektiv die Expression von PAR-2-mRNA

Nach Gefäßverletzung und Abschluss der Hämostase wird FXa bis zu eine Woche weiter in der Gefäßwand gebildet (Abendschein *et al.*, 2003; Ghigliotti *et al.*, 1998). Die Mengen von FXa, die während dieses Zeitraums produziert werden, sind vergleichbar zu denen von Thrombin. Der direkte Einfluss von FXa auf die Expression seiner Rezeptoren PAR-1 und PAR-2 wurde hier erstmals untersucht. Für alle Experimente wurde eine FXa-Konzentration von 30 nM verwendet, was der Konzentration entspricht, die FXa bei Freisetzung aus gebildeten Thromben erreicht (Rauch *et al.*, 2002; Schrör *et al.*, 2010).

Die Expression von PAR-1 wurde auf Transkriptebene durch FXa nicht beeinflusst, wogegen sich für PAR-2-mRNA in SMC eine signifikante Induktion um das 1.7 ± 0.3 -fache nach 24 h zeigte ($n=5$, $*p<0.05$, Abb. 6).

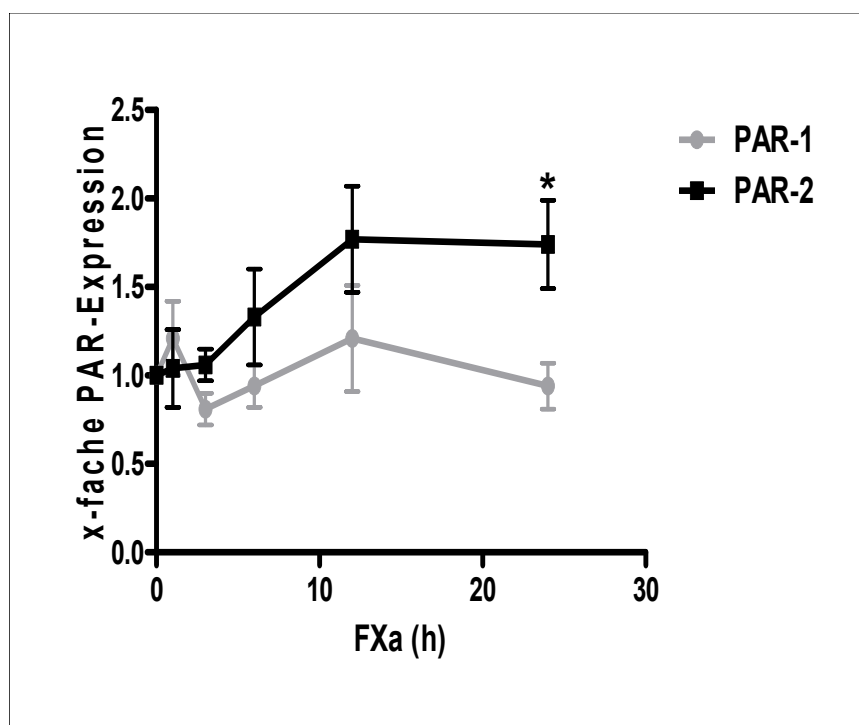


Abb. 6: Einfluss von FXa auf PAR-1- und PAR-2-mRNA-Expression
 Inkubation mit FXa (30 nM) über 1-24 h in humanen SMC ($*p<0.05$, jeweils $n=5$).

3.1.2. Passagieren der Zellen mittels Trypsin hat keinen Einfluss auf die FXa-induzierte PAR-2-Regulation

Da PAR-2 neben FXa, auch durch die Protease Trypsin aktiviert wird und die Zellen nach dem Erreichen der Konfluenz mit Trypsin-EDTA passagiert wurden, musste sichergestellt werden, dass der gezeigte FXa-Effekt nicht auf Trypsin beruht. Zum Vergleich wurden SMC parallel, aus gleicher Charge, nicht-enzymatisch mit 1xZitrat oder mit Trypsin-EDTA über drei Passagen (P1-P3) abgelöst. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen in jeder

Passage für 24 h mit oder ohne FXa (30 nM) inkubiert und die Expression von PAR-1- und PAR-2-mRNA untersucht. Beim Vergleich der PAR-2-Expression zwischen Zellen, die mit Trypsin und Zitrat abgelöst wurden, zeigte sich insgesamt über alle drei Passagen, dass der induktive FXa-Effekt in beiden Ansätzen stets vergleichbar war und somit nicht durch Trypsin beeinflusst wurde. PAR-1 zeigte auch hier insgesamt keine Änderung in der konstitutiven Expression (Abb. 7, jeweils n=2).

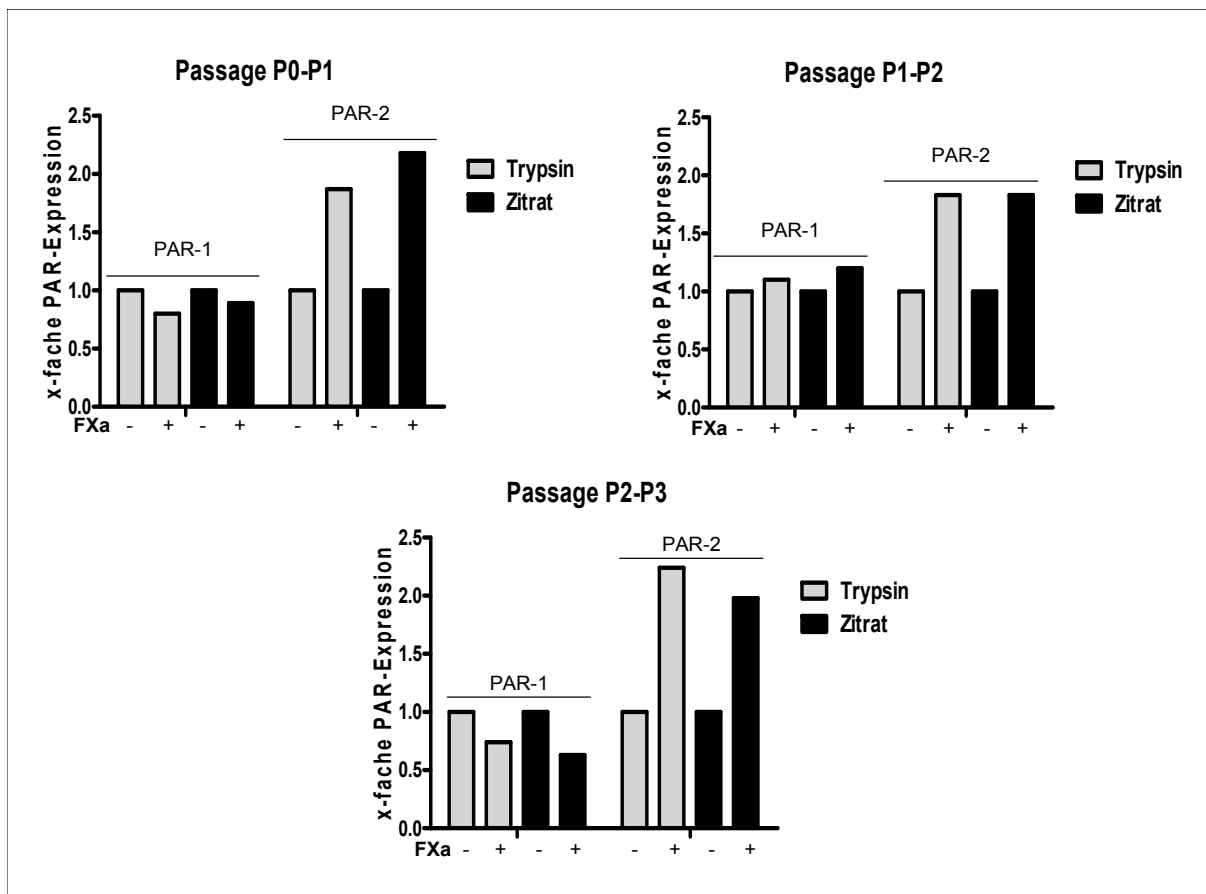


Abb. 7: Vergleich der mRNA-Expression von PAR-1 und PAR-2 zwischen SMC, die über drei Passagen mit Trypsin oder Zitrat abgelöst wurden

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen für 24 h +/- FXa (30 nM) inkubiert. Bezüglich der PAR-2-Expression zeigt sich über alle drei Passagen, dass der induktive FXa-Effekt nicht durch Trypsin beeinflusst wird. Für PAR-1 zeigt sich hierbei insgesamt keine Änderung in der konstitutiven Expression (jeweils n=2).

3.1.3. Konzentrations-Wirkungsbeziehung der FXa-regulierten PAR-2-Expression

Zudem wurde die PAR-1- und PAR-2-mRNA-Expression bei FXa-Konzentrationen von 1-100 nM untersucht. Während die PAR-1-Expression durch FXa nicht beeinflusst wurde, zeigte sich eine signifikante Aufregulation von PAR-2 bei einer FXa-Konzentration von 30 nM. Diese Konzentration wurde in allen weiteren Experimenten verwendet (jeweils n=5, *p<0.05, Abb. 8).

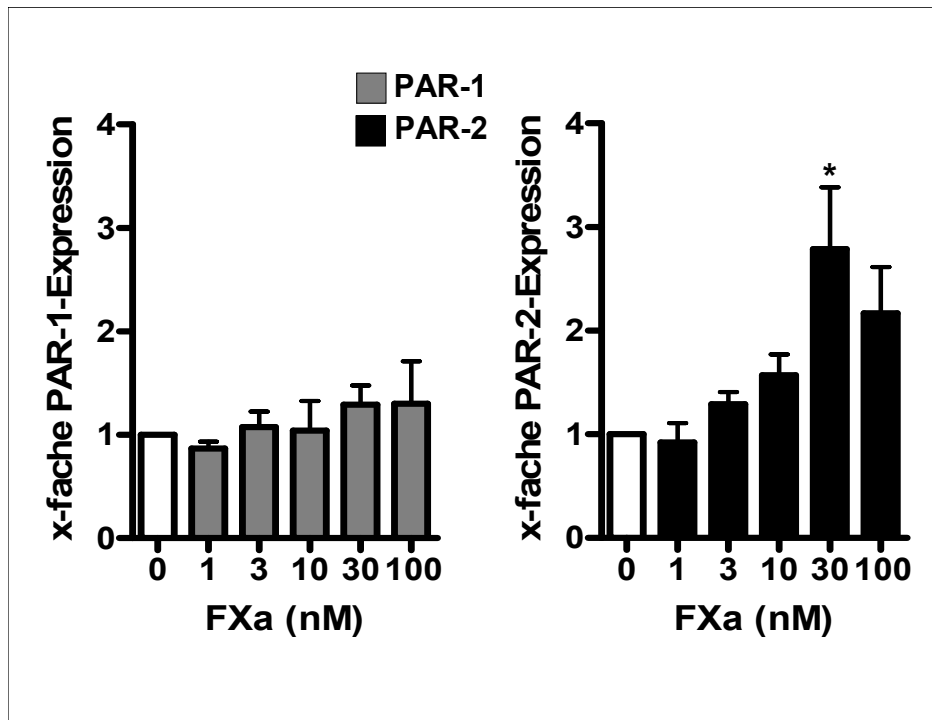


Abb. 8: Einfluss von verschiedenen FXa-Konzentrationen auf PAR-1- und PAR-2-mRNA-Expression

Die Inkubation von humanen SMC mit FXa (1-100 nM) erfolgte für 24 h (* $p < 0.05$, jeweils $n=5$).

3.1.4. Die FXa-induzierte Expression von PAR-2 ist unabhängig von Thrombin

Da FXa eine Induktion der PAR-2-Expression hervorrief, stellte sich die Frage, ob dies tatsächlich direkt durch FXa, oder indirekt durch eine FXa-induzierende Thrombinbildung hervorgerufen wurde. Hierfür wurden SMC mit FXa (30 nM) und/oder dem direkten Thrombininhibitor Argatroban (100 ng/uL) für 24 h inkubiert und die mRNA-Expression von PAR-2 untersucht (Abb. 9, $n=4$, * $p < 0.05$). Es zeigte sich, dass trotz der Inhibierung von Thrombin, der FXa-Effekt auf die PAR-2-Expression erhalten blieb und somit eine direkte Regulation durch FXa vorlag.

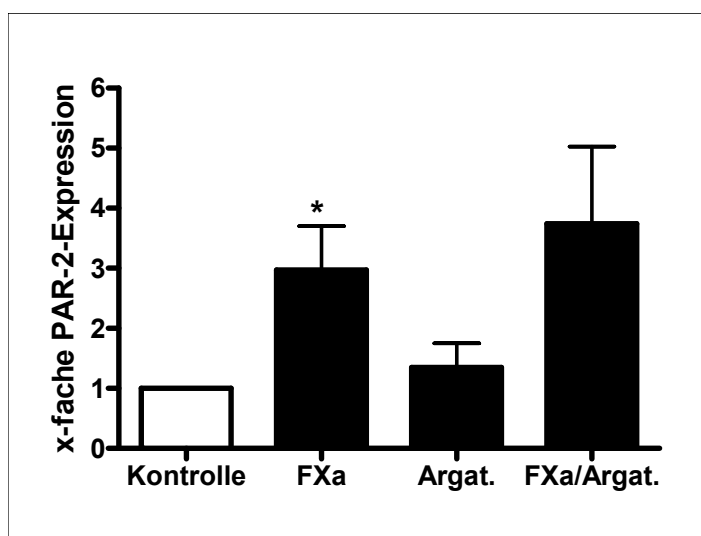


Abb. 9: Expression von PAR-2-mRNA bei Stimulation von SMC mit FXa und/oder Argatroban

Die Inkubation mit FXa (30 nM) und/oder Argatroban (100 ng/uL) erfolgte für 24 h (* $p < 0.05$, $n=4$).

Um zu untersuchen, ob die verwendete Konzentration von Argatroban ausreichte, um möglicherweise vorhandenes Thrombin vollständig zu inhibieren, wurden SMC für 30 Min. mit Argatroban (100 ng/uL) vorinkubiert und anschließend für 10 Min. mit Thrombin (3 U/mL) oder FXa (30 nM) stimuliert. FXa und Thrombin wurden somit in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt und die Zellen auf ERK1/2-Phosphorylierung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass in SMC, die nicht mit Argatroban vorbehandelt wurden, eine signifikante ERK1/2-Phosphorylierung durch Thrombin und FXa hervorgerufen wurde. In SMC, die mit dem Thrombininhibitor vorbehandelt wurden, blieb die FXa-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung vollständig erhalten, wogegen der Thrombin-Effekt aufgehoben wurde (Abb. 10, $n=4$, $*p<0.05$). Dies zeigt, dass die verwendete Argatrobankonzentration vollkommen ausreichend war, um potentiell *de novo* gebildetes Thrombin zu inhibieren und an möglichen weiteren Effekten zu hindern.

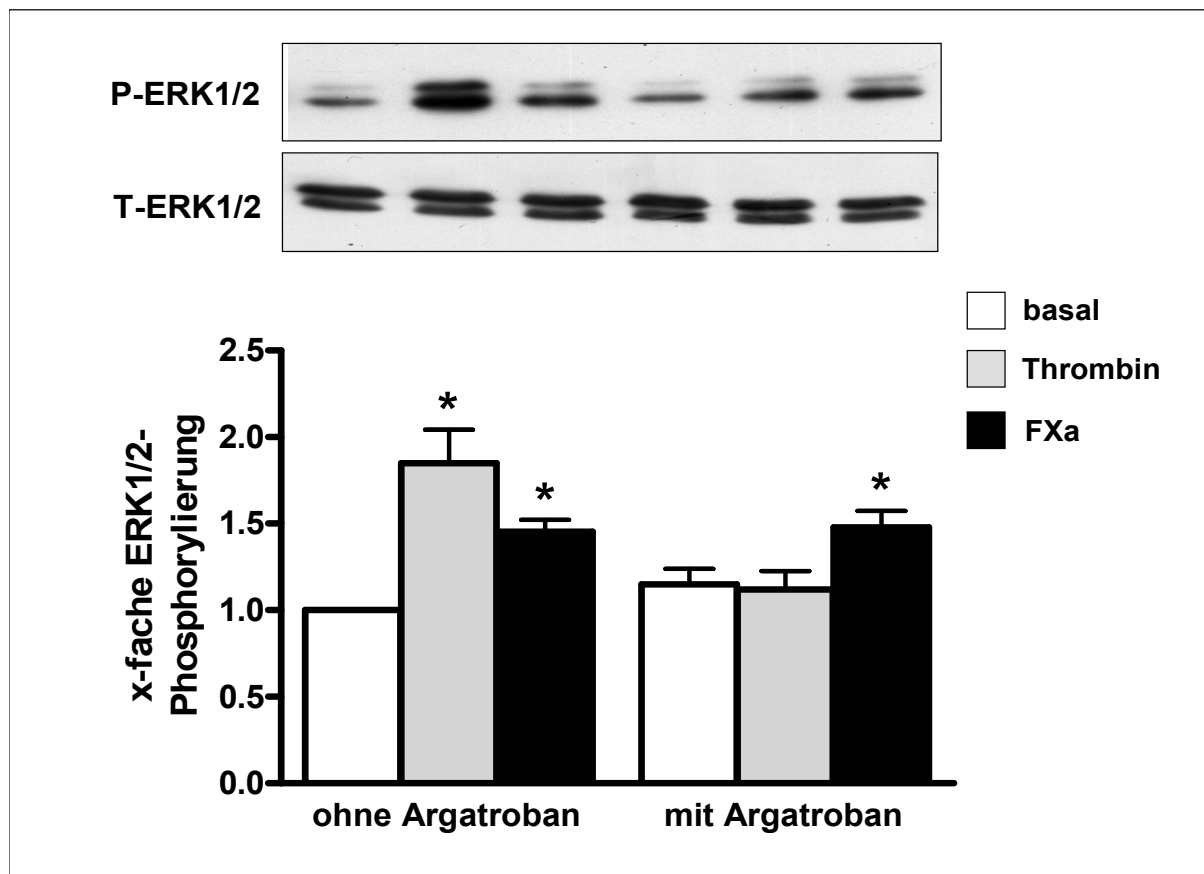


Abb. 10: Einfluss von Argatroban auf die Thrombin- und FXa-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung
SMC wurden für 30 Min. mit oder ohne Argatroban (100 ng/uL) vorinkubiert und anschließend für 10 Min. mit Thrombin (3 U/mL) oder FXa (30 nM) stimuliert. Die ERK1/2-Phosphorylierung wurde durch Western Blot detektiert und phosphoryliertes ERK1/2 (P-ERK1/2) auf gesamtes ERK1/2 (Total- bzw. T-ERK1/2) normalisiert ($*p<0.05$, $n=4$). Die verwendete Argatrobankonzentration ist vollkommen ausreichend, um die Thrombin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung zu inhibieren, wobei der signifikante FXa-Effekt nicht beeinflusst wird.

3.1.5. FXa induziert die Expression von PAR-2-Protein

Eine FXa-induzierte PAR-2-Expression konnte ebenfalls auf Proteinebene nachgewiesen werden. Hierbei erfolgte eine 3-fache signifikante Erhöhung der Expression von PAR-2-Protein bei 12, 24 und 48 h (n=5, *p<0.05, Abb. 11).

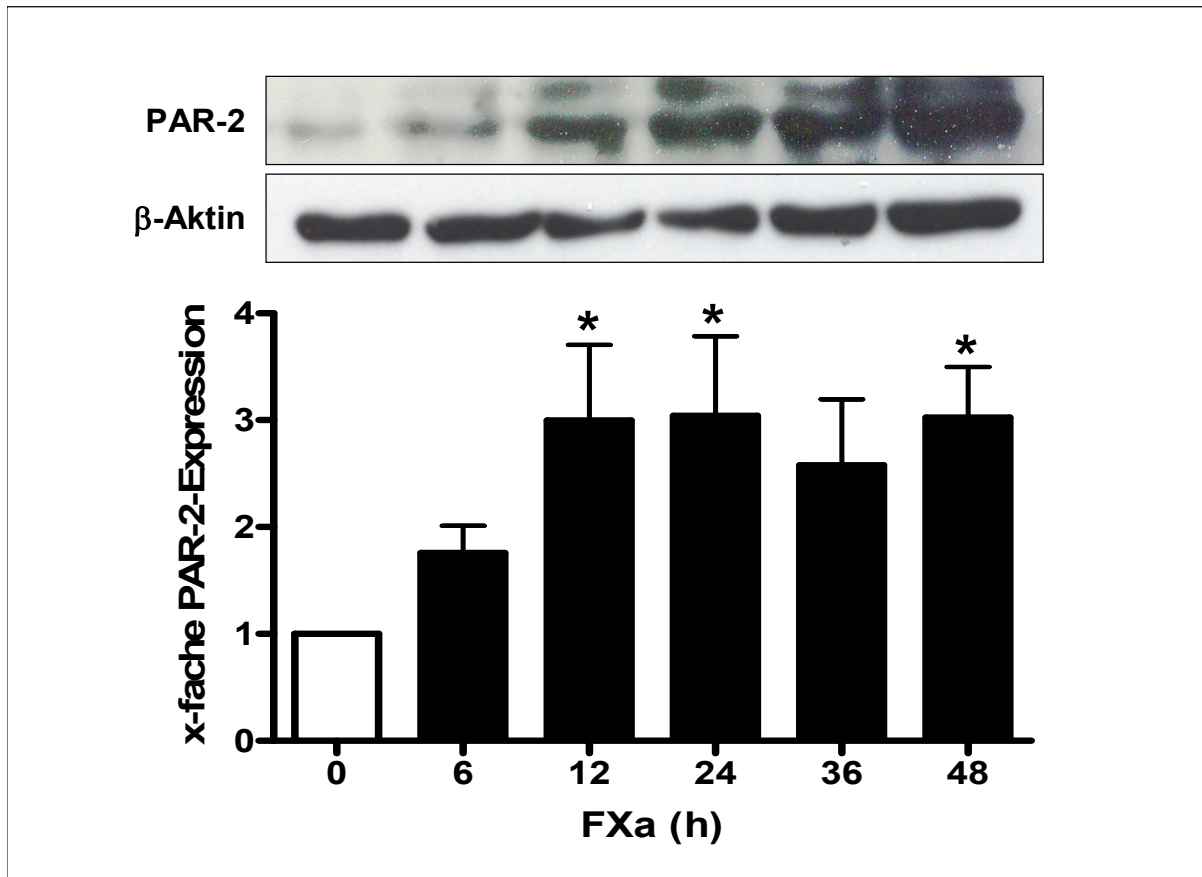


Abb. 11: Effekt von FXa auf PAR-2-Gesamtprotein

Die Inkubation von SMC mit FXa (30 nM) erfolgte über 6-48 h (*p<0.05, n=5).

3.1.6. FXa induziert PAR-2-Oberflächenexpression

Der Einfluss von FXa (30 nM) auf die Oberflächenexpression von PAR-2 wurde mittels Durchflusszytometrie auf SMC detektiert. Ein repräsentatives Originalhistogramm dieser Versuche ist in Abb. 12A gezeigt. Die deutlich erkennbare Rechtsverschiebung der 24 h-Stimulation auf der X-Achse entspricht hierbei einer vermehrten Menge an PAR-2 auf der Zelloberfläche. Infolge der FXa-Stimulation konnte ein Anstieg der PAR-2-Expression um ca. das 2-fache detektiert werden. Wie bei der FXa-stimulierten PAR-2-Expression auf mRNA- und Proteinebene, zeigte sich nach 24 h auch für die Oberflächenexpression des Proteins eine stabile, signifikante Induktion (n=5, *p<0.05, Abb. 12B). Dieses Zeitintervall wurde im Folgenden für eine FXa-Vorbehandlung zur PAR-2-Induktion in SMC und Untersuchung der funktionellen Auswirkungen dieser Regulation verwendet.

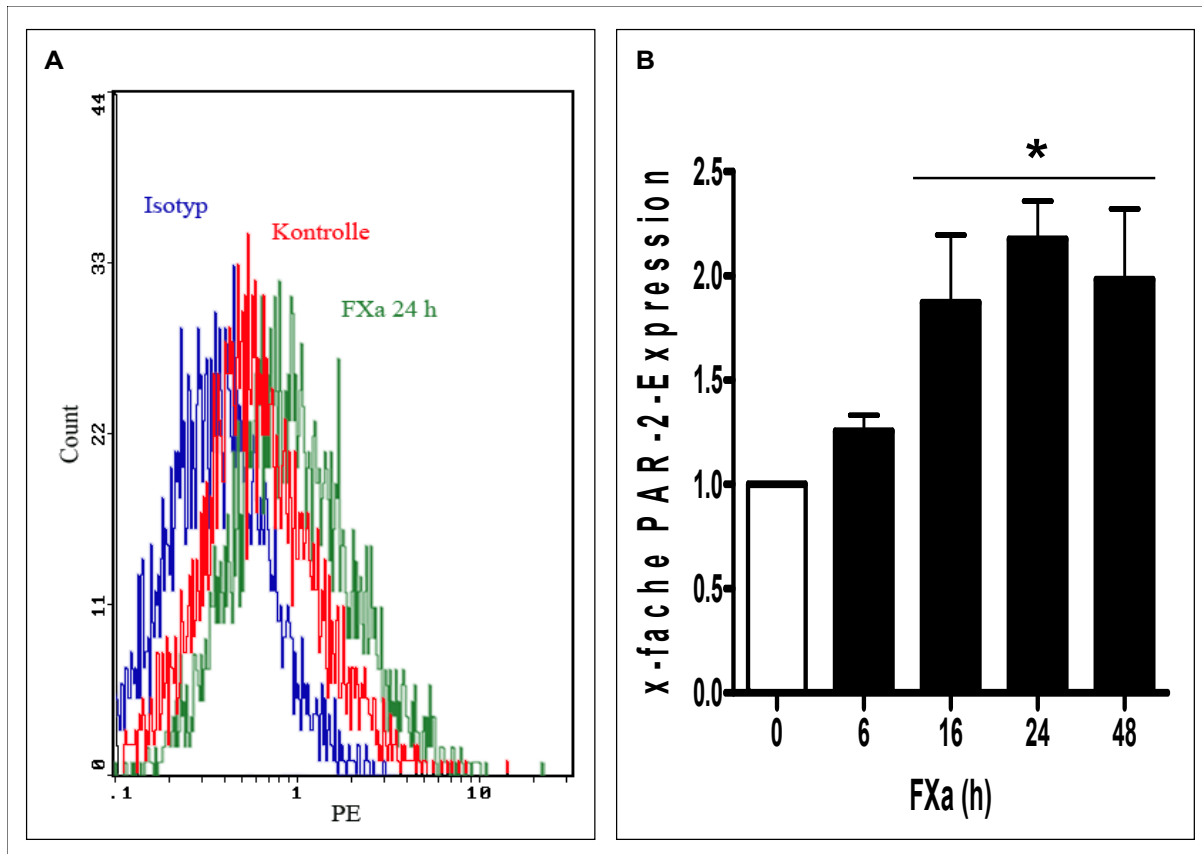


Abb. 12: Durchflusszytometrische Messung der PAR-2-Oberflächenexpression nach Inkubation mit FXa SMC wurden über 6-48 h mit FXa (30 nM) inkubiert. (A) Repräsentatives Histogramm: Isotyp (blau), Kontrolle (rot), FXa 24 h (grün). (B) Zusammenfassung der Daten über den gesamten Zeitverlauf (* $p < 0.05$, $n = 5$).

3.1.7. Einfluss der Zelldichte auf die FXa-vermittelte PAR-2-Regulation

Da die PAR-2-Expression besonders unter Bedingungen der SMC-Proliferation *in vivo* verstärkt wird (Damiano *et al.*, 1999; Napoli *et al.*, 2004), wurde der Einfluss der Zelldichte bezüglich der FXa-vermittelten PAR-2-Expression untersucht. Hierbei zeigte sich, dass je nach Zelldichte, die FXa-vermittelte Induktion auf das PAR-2-Transkript nach 24 h unterschiedlich stark ausgeprägt war. Die höchste Induktion von PAR-2 konnte in schwach konfluenten SMC detektiert werden, während in hochkonfluenten Zellen die Regulation geringer ausfiel ($n = 3$, * $p < 0.05$, Abb. 13). In verletzten Gefäßarealen, wo SMC sich eher im aktiv proliferierenden, als im kontraktile Zustand befinden, könnte somit eine stärkere PAR-2-Regulation stattfinden und die Hochregulation des Rezeptors *in vivo* erklären.

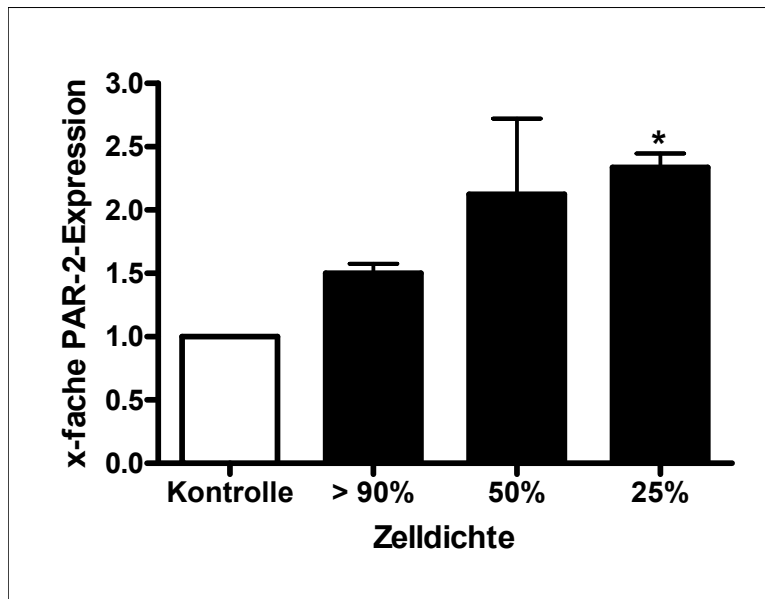


Abb. 13: Einfluss der Zelldichte von SMC auf die FXa-induzierte PAR-2-Expression

Die Zellen wurden für 24 h mit FXa (30 nM) inkubiert und auf PAR-2-mRNA-Expression untersucht (* $p < 0.05$, $n = 3$).

3.2. Aktivierung von PAR-2 induziert ebenfalls die Expression von PAR-2

Um zu untersuchen, ob die FXa-induzierte PAR-2-Expression über eine direkte Aktivierung von PAR-1 und/oder von PAR-2 hervorgerufen wird, wurden beide Rezeptoren selektiv über 48 h mit PAR-1AP (200 μ M) oder PAR-2AP (200 μ M) stimuliert und die Expression von PAR-2 auf Proteinebene untersucht. Hierbei zeigte sich, dass PAR-2 durch PAR-2-AP signifikant hochreguliert wurde, wogegen PAR-1AP keinen Einfluss auf die PAR-2-Expression hatte ($n = 4$, * $p < 0.05$, Abb. 14).

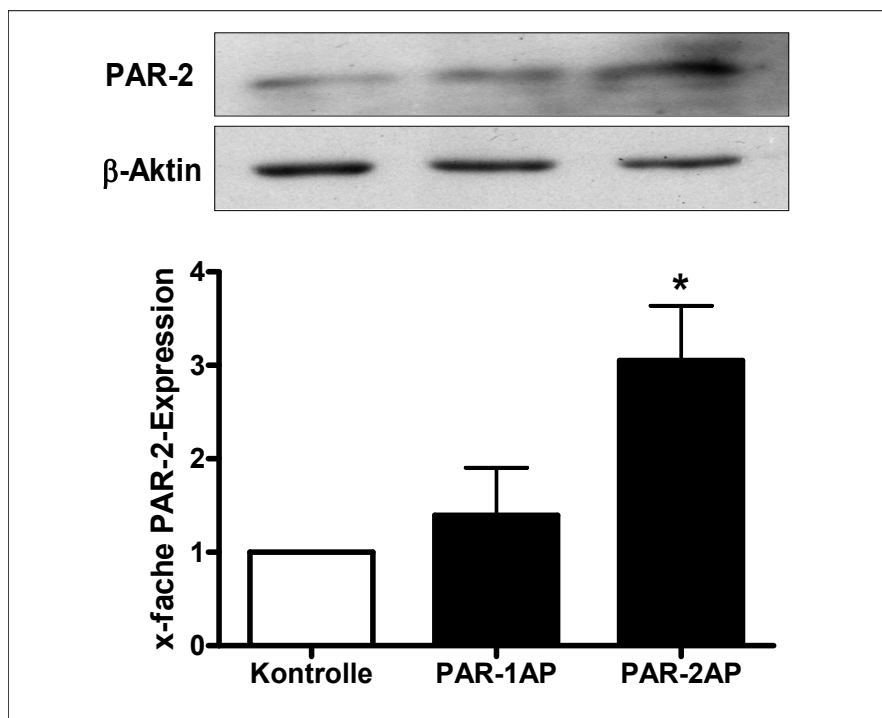


Abb. 14: Effekt von PAR-1AP und PAR-2AP auf PAR-2-Gesamtprotein

SMC wurden für 48 h mit PAR-1AP und PAR-2AP (jeweils 200 μ M) inkubiert (* $p < 0.05$, $n = 4$).

Zur weiteren Bestätigung, dass PAR-2 die regulatorischen Effekte von FXa vermittelt, wurden beide Rezeptoren durch spezifische siRNA herabreguliert. Hierbei zeigte sich, dass im Vergleich zu SMC, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, das mRNA-Expressionsniveau von PAR-1 und PAR-2 um über 60% reduziert wurde ($n=6$, $*p<0.05$, Abb. 15A). In Zellen, die mit Kontroll-siRNA transfiziert wurden, induzierte FXa (30 nM) die Expression von PAR-2-mRNA nach 24 h ($n=6$, $*p<0.05$, Abb. 15B). Dieser Effekt auf die PAR-2-Expression blieb auch erhalten, wenn SMC mit PAR-1-siRNA transfiziert wurden. Die Transfektion mit PAR-2-siRNA führte zu einer erheblichen Reduktion des basalen Expressionsniveaus von PAR-2-mRNA, was sich auch infolge der Stimulation mit FXa nicht änderte (gesamt $n=6$, $*p<0.05$, Abb. 15B). Dies zeigt insgesamt, dass FXa die PAR-2-Expression über einen direkten PAR-2-vermittelten Mechanismus induziert, und PAR-1 hierbei eine untergeordnete Rolle spielt.

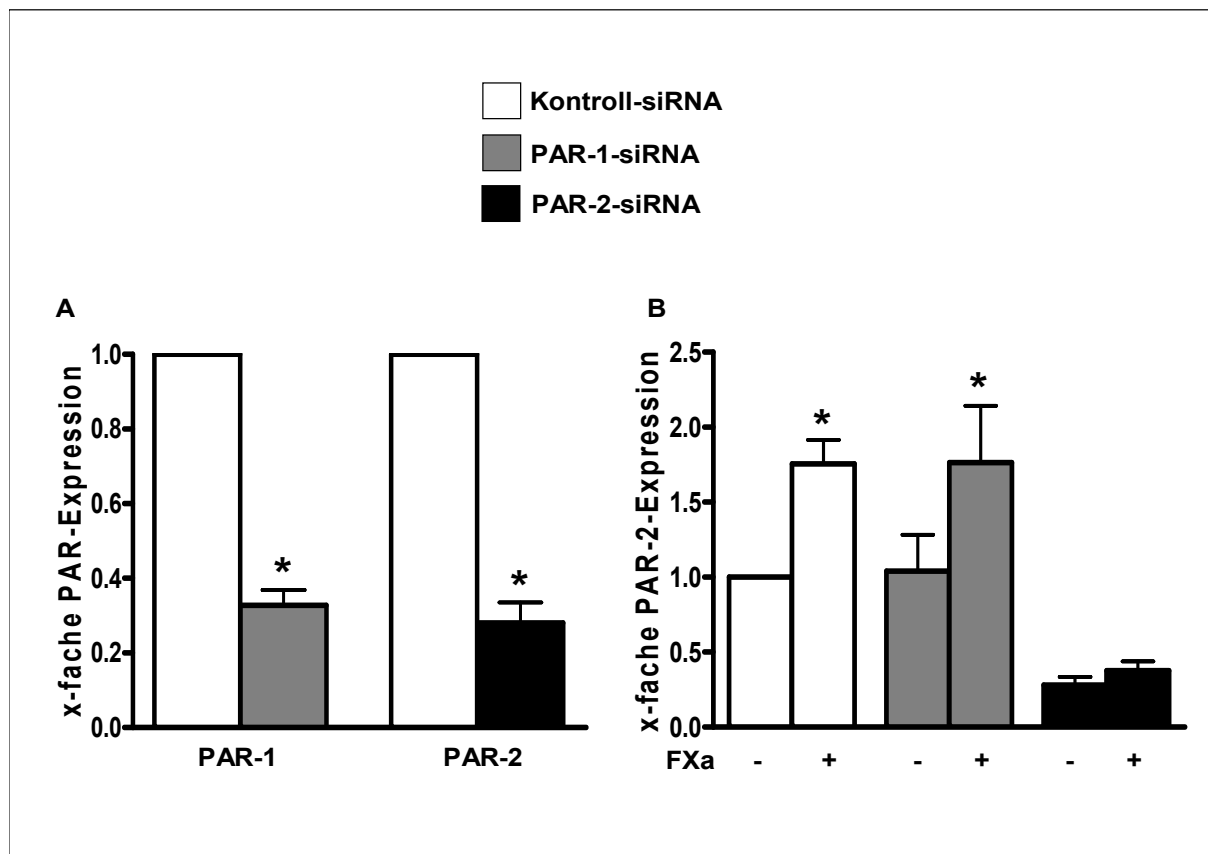


Abb. 15: Durch PAR-2-siRNA wird die FXa-induzierte PAR-2-Expression aufgehoben

(A) Einfluss auf die basale Expression von PAR-1- und PAR-2-mRNA infolge der Transfektion von SMC mit entsprechender siRNA ($*p<0.05$, $n=6$). (B) Effekt auf PAR-2-mRNA in SMC nach Inkubation +/- FXa (30 nM) für 24 h und anschließende Transfektion mit Kontroll-, PAR-1- oder PAR-2-siRNA ($*p<0.05$, $n=6$).

3.3. Funktionelle Konsequenzen der PAR-2-Induktion durch FXa

3.3.1. Verstärkte Mitogenese nach Hochregulation von PAR-2

In den folgenden Studien wurde untersucht, wie sich die PAR-2-Induktion, infolge einer FXa-Vorinkubation (30 nM) von 24 h, auf zelluläre Effekte von FXa und einer gezielten PAR-2-Aktivierung auswirkt. Hierfür wurde die DNA-Syntheserate durch [^3H]-Thymidin-Inkorporation ermittelt und die akute Stimulation mit FXa (30 nM, 24 h) und PAR-2AP (200 μM , 24h) untersucht. Nach Vorbehandlung mit FXa zeigte sich eine Verstärkung der akuten mitogenen Wirkung bei Stimulation mit PAR-2AP ($n=4$, $*p<0.05$, Abb. 16).

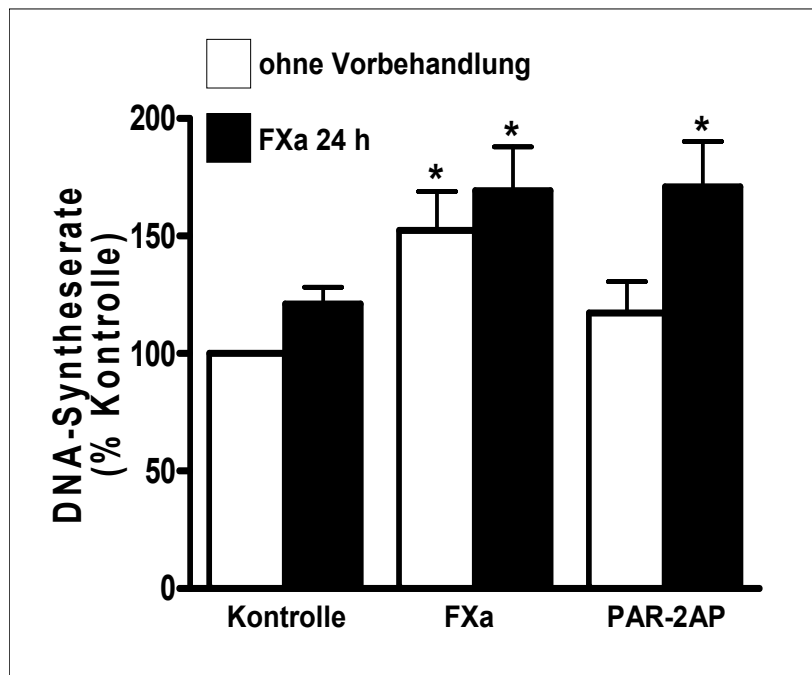


Abb. 16: Durch Vorbehandlung mit FXa erfolgt eine verstärkte Mitogenese

DNA-Syntheserate in SMC +/- 24 h Vorbehandlung mit FXa (30 nM) und akuter Stimulation von weiteren 24 h mit FXa (30 nM) und PAR-2AP (200 μM) ($*p<0.05$ relativ zur unstimulierten Kontrolle, $n=4$).

3.3.2. Verstärkte Induktion von IL-6 nach FXa-induzierter PAR-2-Expression

IL-6 ist ein inflammatorisches und chemotaktisches Cytokin, welches zur Mitogenese und Migration von SMC beiträgt (Kranzhofer *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2003). In endothelialen Zellen konnte gezeigt werden, dass FXa die Synthese von IL-6 induziert (Senden *et al.*, 1998). Für SMC ist dies bisher nicht bekannt.

In SMC induzierte FXa einen zeitabhängigen Anstieg der mRNA-Expression von IL-6 mit einer signifikanten 2-fachen Erhöhung nach 1.5-3 h. Nach 6 h entsprach die Konzentration des Transkripts von IL-6 nahezu wieder dem basalen Niveau der Kontrolle ($n\geq 4$, $*p<0.05$, Abb. 17A). Das Inkubationsintervall von 3 h wurde gewählt um die Auswirkung einer PAR-2-Induktion durch FXa-Vorbehandlung in SMC näher zu untersuchen. Hierbei wurden, wie in 3.3.1. beschrieben, Zellen einer FXa-Vorinkubation von 24 h unterzogen, um die PAR-2-Expression zu induzieren. Dies führte zu einer verstärkten Induktion von IL-6 nach akuter Stimulation mit FXa (30 nM, 3 h) oder PAR-2AP (200 μM , 3 h) ($n=4$, $*p<0.05$, Abb. 17B).

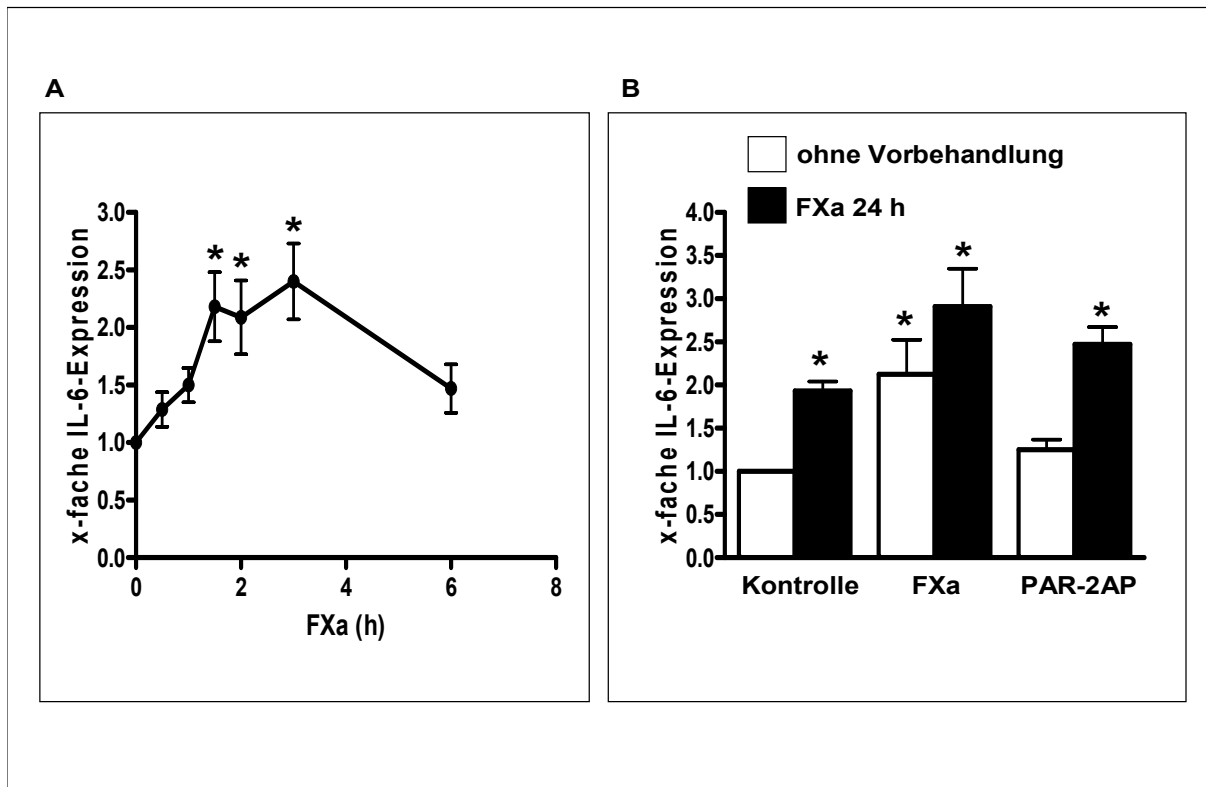


Abb. 17: FXa fördert die IL-6-Expression

(A) Einfluss von FXa (30 nM) auf IL-6-mRNA nach Inkubation von 0.5-6 h in SMC (* $p < 0.05$, $n \geq 4$). (B) IL-6-mRNA nach Vorbehandlung +/- FXa (30 nM, 24 h), gefolgt von akuter Stimulation mit FXa (30 nM, 3 h) oder PAR-2AP (200 μ M, 3 h) in SMC (* $p < 0.05$ relativ zur unstimulierten Kontrolle, $n = 4$).

3.4. NF- κ B vermittelt die transkriptionelle Regulation von PAR-2 in SMC

Die distalen Signalwege und Effektorsysteme, welche letztlich die Regulation von PAR-2 vermitteln, insbesondere die involvierten Transkriptionsfaktoren, sind bisher nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnten bei der Sequenzanalyse des humanen PAR-2-Promotors mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die nicht im Promotor des prototypischen PAR-1 vorhanden sind. Dies könnte die FXa-induzierte Expression von PAR-2 erklären. Von besonderem Interesse ist hierbei der Transkriptionsfaktor NF- κ B, für den im humanen PAR-2-Promotor zwei Bindungsstellen, 373 bp (CAGGGATTAACCC) und 522 bp (ACCGGGAAGCCCT) stromaufwärts des Startcodons gefunden wurden (Abb. 18). PAR-1 hingegen besitzt keine NF- κ B-Erkennungssequenz (Rosenkranz, unveröffentlichte Daten).

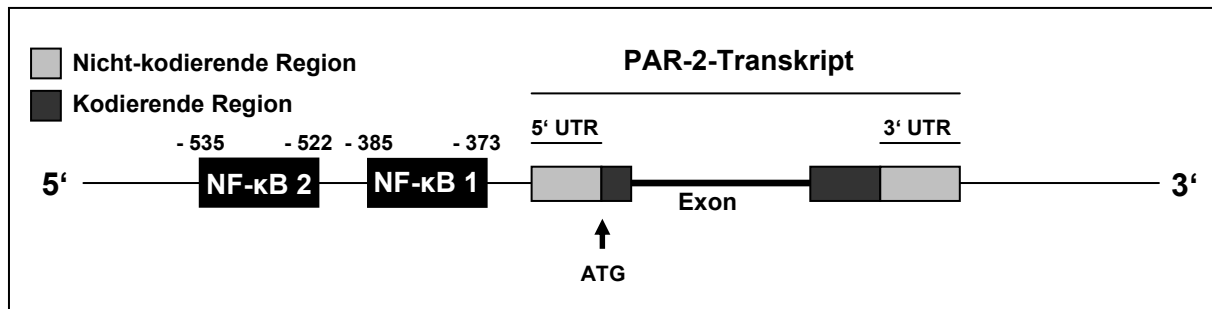


Abb. 18: Der PAR-2-Promotor beinhaltet zwei Bindungsstellen für NF-κB
 Identifiziert mit *promoter / transcription factor binding analysis*.

Die FXa-induzierte Aktivierung von NF-κB in SMC wurde mittels Akkumulation von nukleärem NF-κB und cytosolischem Phospho-IκB-α durch Western Blot ermittelt. Die Stimulation von SMC mit FXa (30 nM) induzierte eine zeitabhängige Akkumulation von phosphoryliertem, cytosolischem IκB-α bei 2-3 h (n=4, Abb. 19), welche von der Translokation der NF-κB-Untereinheit p65 vom Cytosol in den Zellkern begleitet wurde. Die Zunahme von nukleärem NF-κB erreichte bereits nach 2 h ein Maximum (n=4, *p<0.05, Abb. 19).

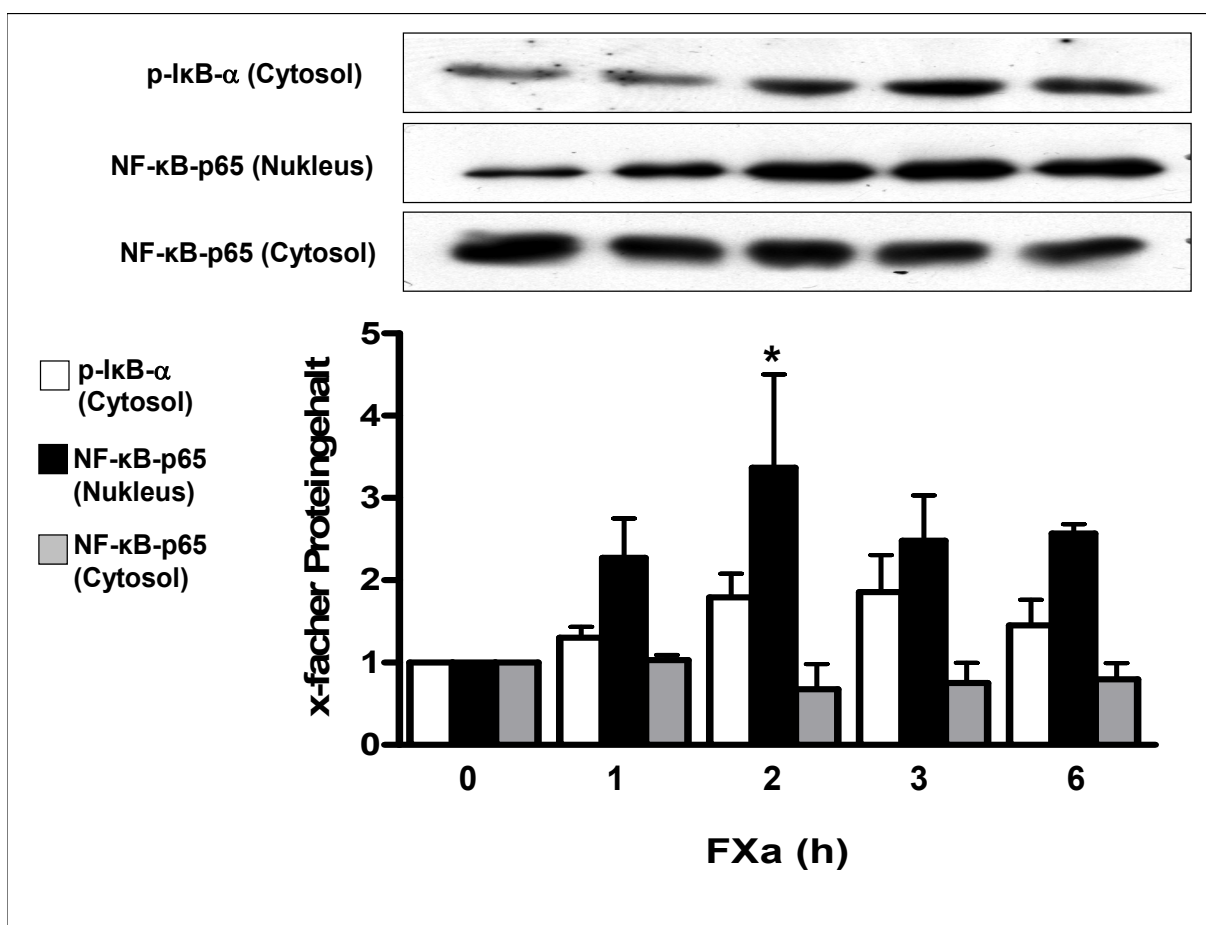


Abb. 19: FXa fördert die Akkumulation von nukleärem NF-κB-p65 und cytosolischem Phospho-IκB-α
 SMC wurden mit FXa (30 nM) über 1-6 h inkubiert (*p<0.05 relativ zur jeweiligen unstimulierten Kontrolle, n=4).

Ob FXa die Bindung von NF- κ B im PAR-2-Promotor induziert, wurde auch mittels Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) untersucht. Hierfür wurden SMC für 2 h mit FXa (30 nM) stimuliert, da sich zu diesem Zeitpunkt, die maximale Aktivierung von NF- κ B durch FXa zeigte. Das aufgereinigte Chromatin wurde mit Antikörpern gegen die NF- κ B-Untereinheit p65 immunpräzipitiert. Mit Hilfe von spezifischen Primern wurden die beiden Bindungsstellen von NF- κ B im PAR-2-Promotor amplifiziert. Für GAPDH-spezifische Primer wurden zur Kontrolle verwendet, um die Reinheit der ChIP-Proben zu ermitteln. Ein Teil des, vor der Immunpräzipitation gewonnenen, genomischen Materials fungierte als Positiv- oder „Input“-Kontrolle. Durch dieses Verfahren konnte bestätigt werden, dass FXa nach 2 h die Bindung von NF- κ B im humanen PAR-2-Promotor, an der zweiten Bindungsstelle (NF- κ B-2), 522 bp stromaufwärts des Startcodons verstärkt. Zudem konnte durch das Fehlen jeglichen Signals von GAPDH, das Ausbleiben einer Kontamination mit genomischer DNA in den für NF- κ B immunpräzipitierten Proben (NF- κ B-IP) nachgewiesen werden (repräsentativer Versuch, n=3, Abb. 20).

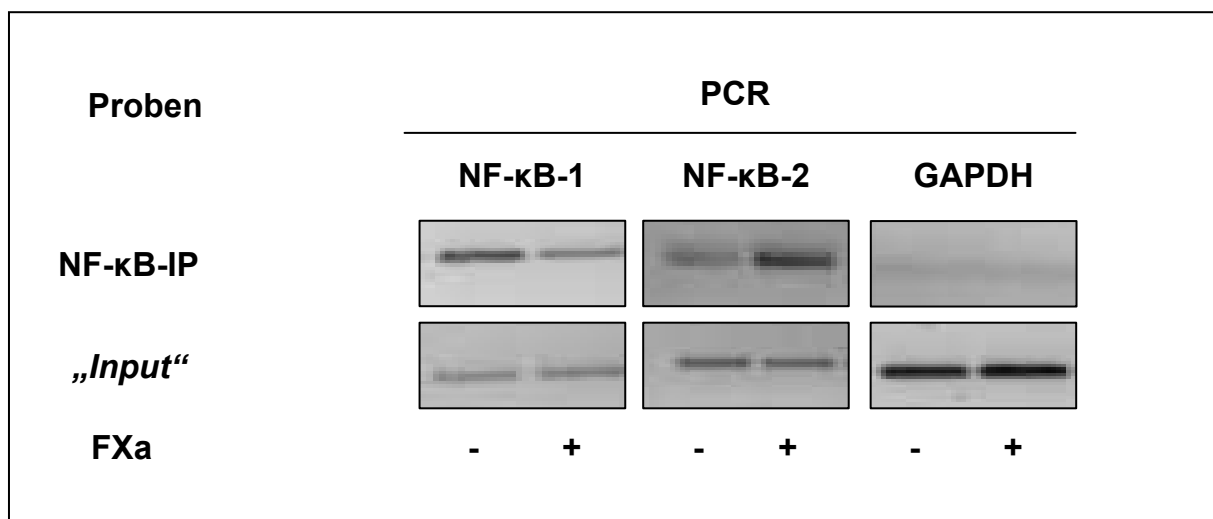


Abb. 20: FXa induziert die Bindung von NF- κ B an der zweiten Bindungsstelle im PAR-2-Promotor

FXa (30 nM, 2 h) stimuliert die Bindung von NF- κ B an einer der beiden für NF- κ B gefundenen Bindungsstellen (NF- κ B-2), 522 bp stromaufwärts des Startcodons, im humanen PAR-2-Promotor. Die „Input“-Proben indizieren das gesamte genomische Chromatin und fungieren als Positivkontrollen, während die IP-Proben, das für NF- κ B immunpräzipitierte Chromatin zeigen. Das Fehlen von Banden in der PCR für GAPDH bestätigt, dass die Proben frei von jeglicher Verunreinigung mit genomischer DNA sind (repräsentativer Versuch, n=3).

Dementsprechend unterdrückte ein Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung, die durch FXa (30 nM, 24 h) stimulierte Induktion von PAR-2-Protein (n=5, *p<0.05, Abb. 21). Insgesamt zeigt dies, dass FXa NF- κ B aktiviert und schließlich die Bindung des Transkriptionsfaktors im humanen PAR-2-Promotor induziert, um die Expression von PAR-2 auf zu regulieren.

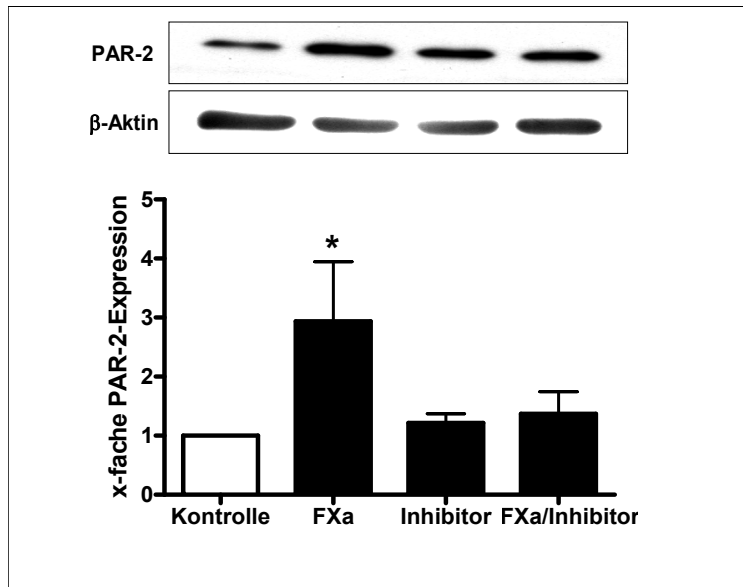


Abb. 21: Einfluss eines NF-κB-Inhibitors auf die FXa-induzierte Expression von PAR-2-Gesamtprotein
SMC wurden für 24 h mit FXa (30 nM) und/oder einem Inhibitor der NF-κB-Aktivierung (100 nM) inkubiert (* $p < 0.05$, $n = 5$).

3.5. Posttranskriptionelle Regulation von PAR-2 durch mRNA-Stabilisierung

Neben transkriptionellen Regulationsmechanismen spielt eine posttranskriptionelle mRNA-Stabilisierung ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Expression diverser Gene. Hierbei ist das *human antigen R* (HuR)-Protein, auch bekannt als ELAV1 (*embryonal lethal abnormal vision 1*), der bekannteste mRNA-stabilisierende Faktor (Misquitta *et al.*, 2001). Da das PAR-2-Transkript mehrere HuR-Bindungsstellen aufweist (Abb. 4), wäre eine Beteiligung von HuR auch bei der PAR-2-Regulation denkbar. PAR-1 hingegen scheint nicht über posttranskriptionelle mRNA-Stabilisierung reguliert zu werden (Sokolova *et al.*, 2008)(Rosenkranz *et al.*, 2010, in Revision). Die selektive Induktion von PAR-2 in FXa-stimulierten SMC könnte somit zum Teil über differentielle mRNA-Stabilisierung erklärt werden.

Actinomycin D ist ein Transkriptionsinhibitor, welcher die Neusynthese von mRNA verhindert, so dass der Abbau bzw. die Halbwertszeit der mRNA des jeweiligen Gens detektiert werden kann. Bei einer Vorbehandlung von SMC mit Actinomycin D (5 µg/mL, für 30 Min.) zeigte sich für PAR-1 eine Halbwertszeit von ca. 4 h (Abb. 22A), während die Hälfte des PAR-2-Transkripts bereits nach ca. 2 h abgebaut war (Abb. 22B, beide $n = 4$). Nach Stimulation mit FXa (30 nM) von 1-8 h blieb die Halbwertszeit von PAR-1-mRNA unverändert (Abb. 22A), während der Abbau des PAR-2-Transkripts verlangsamt wurde (Abb. 22B, beide $n = 4$). Dies zeigt eine signifikante mRNA-Stabilisierung von PAR-2 durch FXa nach 2 h (* $p < 0.05$).

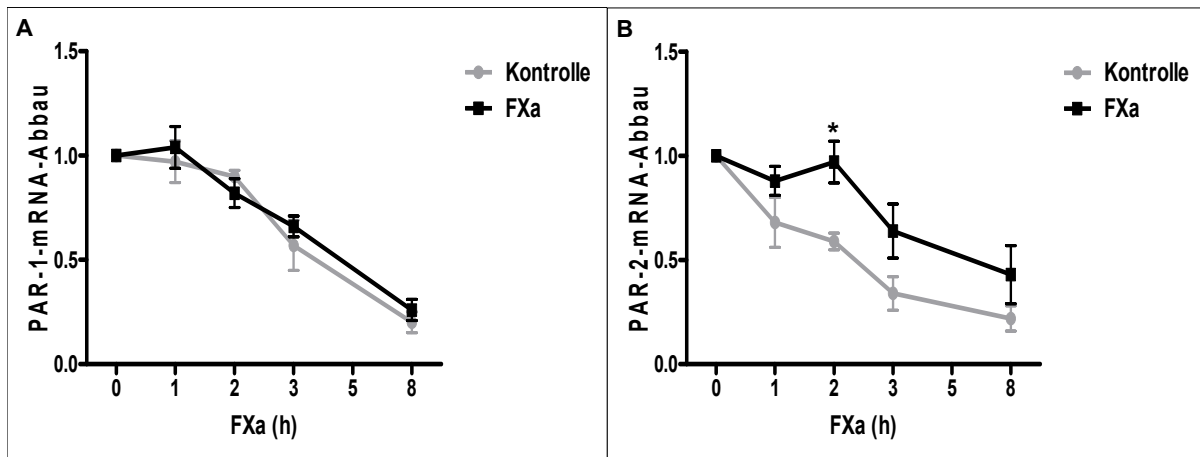


Abb. 22: Einfluss von FXa auf die Halbwertszeit von PAR-1- und PAR-2-mRNA

Halbwertszeit von (A) PAR-1- und (B) PAR-2-mRNA in SMC, bei Vorbehandlung von 30 Min. mit Actinomycin D (5 µg/mL) und anschließender Inkubation +/- FXa (30 nM) von 1-8 h. Ohne den Einfluss von FXa beträgt die Halbwertszeit von PAR-1 ca. 4 h und von PAR-2 ca. 2 h. Bei Stimulation mit FXa wird der Abbau von PAR-2-mRNA jedoch signifikant verlangsamt, während sich für PAR-1 keine Änderung in der Halbwertszeit zeigt (* $p < 0.05$, jeweils $n = 4$).

In Übereinstimmung damit zeigte sich bei Stimulation von SMC mit FXa (30 nM) über 1-6 h auch eine signifikante Akkumulation von cytosolischem HuR bei 2 h, was für eine FXa-vermittelte Translokation bzw. Aktivierung von nukleärem HuR spricht ($n = 5$, * $p < 0.05$, Abb. 23).

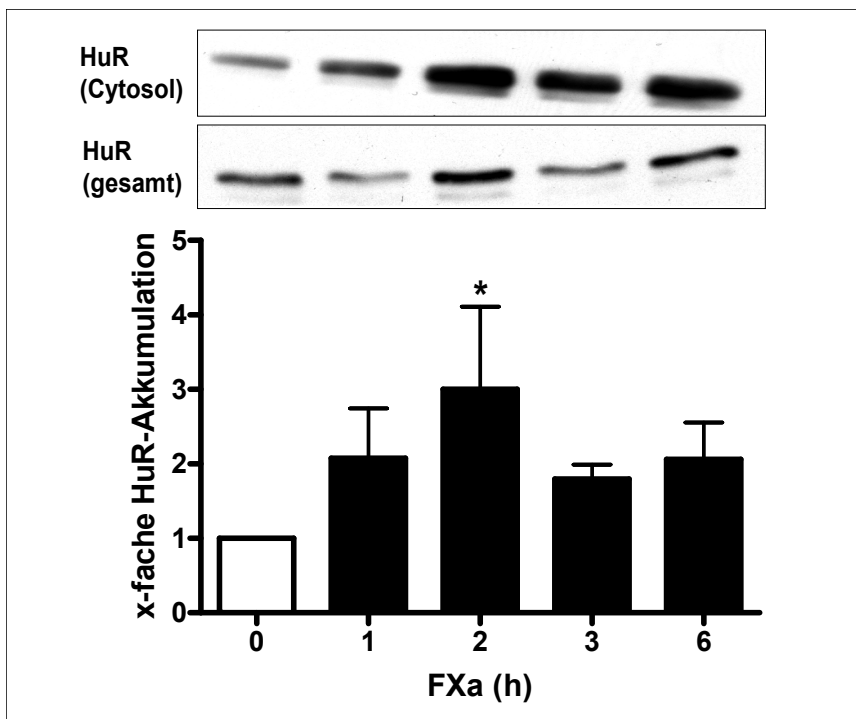


Abb. 23: Einfluss von FXa auf die Akkumulation von cytosolischem HuR

SMC wurden 1-6 h mit FXa (30 nM) inkubiert. HuR wurde durch Western Blot detektiert und cytosolisches HuR auf gesamtes HuR normalisiert (* $p < 0.05$, $n = 5$).

In SMC konnte die HuR-Expression auf Transkriptebeine durch Transfektion mit entsprechender siRNA um 50% gegenüber den Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, reduziert werden ($n=5$, $*p<0.05$, Abb. 24A). Der FXa-induzierte Effekt auf die Expression von PAR-2-mRNA ging hierbei in den Zellen verloren ($n=5$, $*p<0.05$, Abb. 24B).

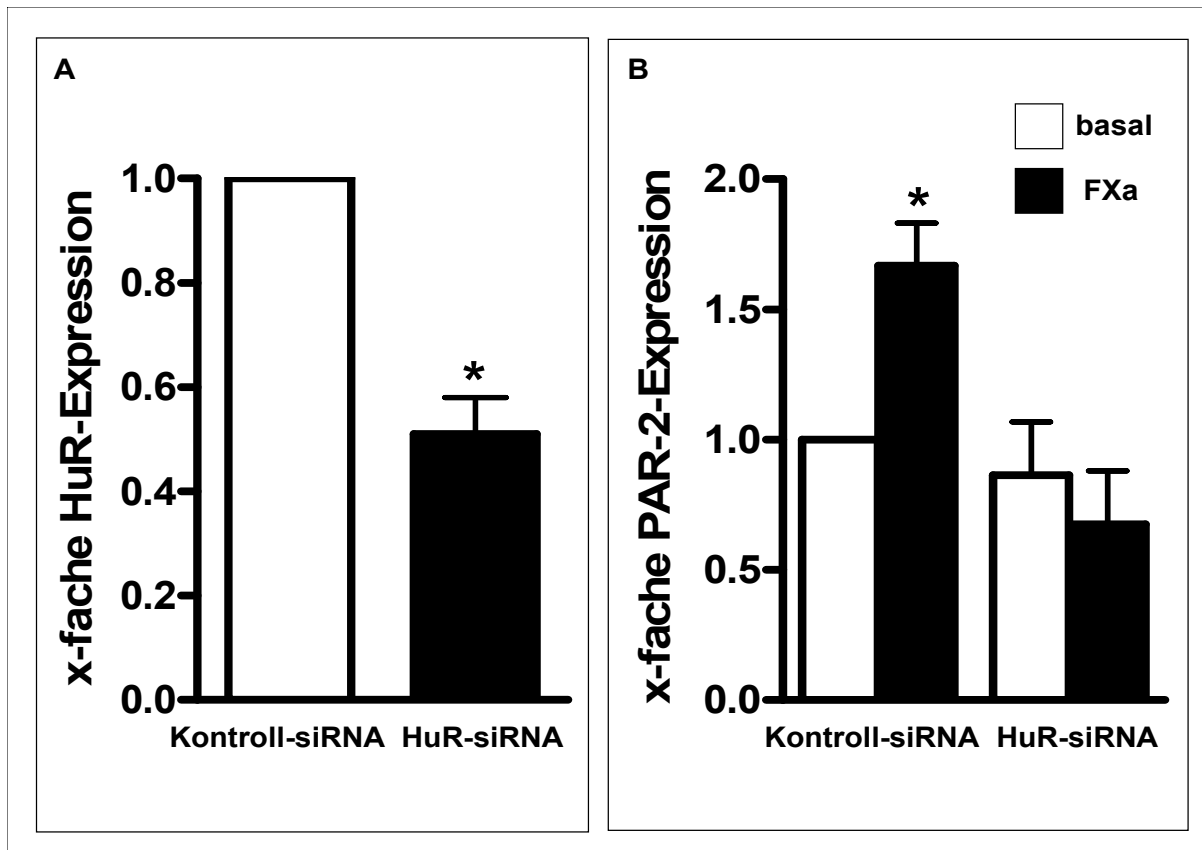


Abb. 24: Effekt von HuR auf die FXa-induzierte PAR-2-Expression

Einfluss von HuR-siRNA in SMC auf (A) die basale Expression von HuR ($*p<0.05$, $n=5$) und (B) das basale Expressionsniveau von PAR-2-mRNA und bei Stimulation mit FXa (30 nM) ($*p<0.05$, $n=5$).

Die potentielle Bindung von HuR an das PAR-2-Transkript und der mögliche Einfluss von FXa (30 nM) auf diese Interaktion, wurde mittels Immunpräzipitations (*Pull-down*)-PCR untersucht. Hierfür wurden SMC für 2 h mit FXa stimuliert, da bei dieser Inkubationsdauer in Vorversuchen und wie in Abb. 23 gezeigt, die Aktivierung von HuR durch FXa maximal war. Die Menge an cytosolischer PAR-2-mRNA, die mittels des, auch für die Western Blots verwendeten, HuR-Antikörpers immunpräzipitiert wurde (HuR-IP), zeigte in FXa-stimulierten Zellen einen Anstieg um nahezu das 10-fache ($n=6$, $*p<0.05$, Abb. 25). Für die cytosolische PAR-2-mRNA, die mit dem Maus IgG-Antikörper immunpräzipitiert wurde (IgG-IP), zeigte sich nach der *Pull-down*-PCR nur ein sehr geringes, kaum zu detektierendes Expressionsniveau, was eine sehr geringe, unspezifische Immunpräzipitation indiziert. FXa vermittelt somit nach einer Inkubation von 2 h die nukleäre Translokation von HuR, was eine Bindung und damit einen schützenden Effekt am PAR-2-Transkript zu haben scheint.

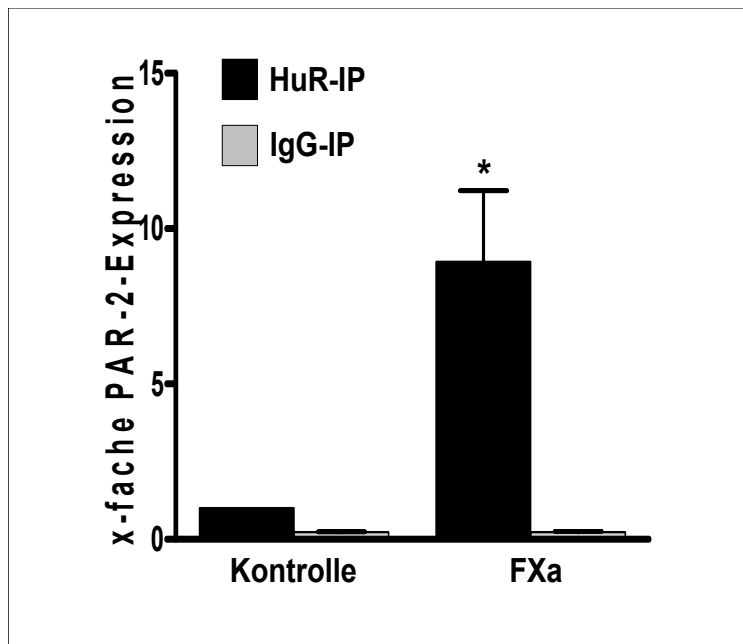


Abb. 25: Einfluss von FXa auf die Bindung von HuR an das PAR-2-Transkript

Die Bindung von HuR an das PAR-2-Transkript und der mögliche Einfluss von FXa (30 nM, 2 h) hierbei, wurde mittels Immunpräzipitations (Pull-down)-PCR untersucht. Für die cytosolische PAR-2-mRNA, die mit dem Maus IgG-Antikörper immunpräzipitiert wurde (IgG-IP), zeigt sich ein kaum zu detektierendes Expressionsniveau. Die Menge an cytosolischer PAR-2-mRNA, die durch den HuR-Antikörper immunpräzipitiert wurde (HuR-IP), zeigt in FXa-stimulierten SMC einen nahezu 10-fachen Anstieg (* $p < 0.05$, $n=6$).

3.6. Redox-vermittelte Signalgebung bei der Regulation von PAR-2

Die bisher gezeigten Ergebnisse zeigen eine Beteiligung von NF- κ B und HuR in der FXa-induzierten PAR-2-Regulation. Beide Faktoren werden in verschiedenen Zellen infolge von oxidativem Stress aktiviert (Amadio *et al.*, 2008; Kuwano *et al.*, 2008; Pueyo *et al.*, 2000). Da es zudem Hinweise gibt, dass eine, durch ROS induzierte, Regulationsschleife die Expression des PAR-1 regulieren kann (Herkert *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2001), stellt sich somit die Frage, ob FXa über oxidativen Stress auch die Expression von PAR-2 beeinflusst.

3.6.1. FXa induziert reaktive Sauerstoffradikale in SMC

Durch Aktivierung von PAR-1 induziert Thrombin über den PKC/ Ca^{2+} -Signalweg die Stimulation der vaskulären NADPH-Oxidase (Patterson *et al.*, 1999), die die wichtigste Quelle für reaktive Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS) in der Gefäßwand ist (Lassegue *et al.*, 2001). ROS sind bedeutende Botenstoffe für die Thrombin-vermittelte Mitogenese (Patterson *et al.*, 1999) und die Regulation von Genen, die über die Aktivierung von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B, in die frühen Stadien von Atherosklerose involviert sind (Pueyo *et al.*, 2000).

Durch die Detektion der DCF-DA-Fluoreszenz konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von SMC mit FXa (30 nM) zu einem Anstieg in der intrazellulären ROS-Bildung führte. Hierbei konnte eine signifikante Bildung von ROS zuerst bei 1 h und 3 h, und später nach 24 h detektiert werden ($n=5$, * $p < 0.05$, Abb. 26).

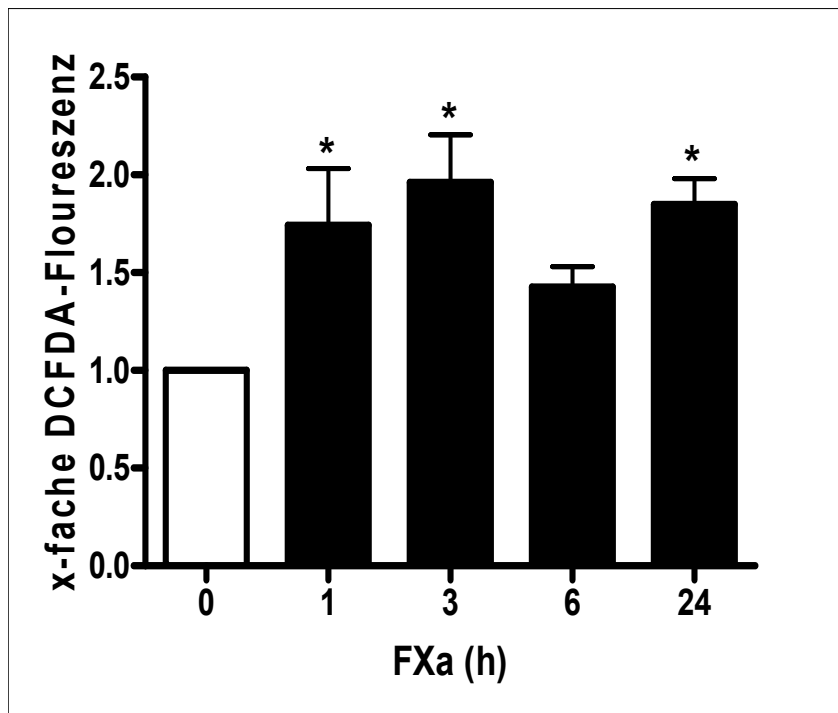


Abb. 26: FXa (30 nM) induziert ROS in SMC

Nachweis mittels DCF-DA-Fluoreszenz und auf die Fluoreszenz der unstimulierten Kontrollzellen normalisiert (n=5, *p<0.05).

Vermutlich ist der frühe Anstieg der ROS-Bildung auf eine direkte Aktivierung der NADPH-Oxidase zurückzuführen. Der späte sekundäre Effekt erfolgte wahrscheinlich über eine vermehrte Expression der NADPH-Oxidase und somit der basalen ROS-Freisetzung.

Ein optischer Nachweis für die Generierung von ROS durch FXa konnte auch mittels der DHE-Fluoreszenz nach einer 24 h-Inkubation mit FXa (30 nM) erbracht werden (n=3, Abb. 27). Für die weitere Untersuchung, wie PAR-1 und PAR-2 an den oxidativen Effekten von FXa beteiligt sind, wurden SMC mit PAR-1AP (200 μ M) oder PAR-2AP (200 μ M), nach oder ohne FXa-Vorbehandlung, akut für 30 Min. stimuliert. Hierbei zeigte sich bei Zellen, die nicht mit FXa vorinkubiert wurden, eine starke Induktion der intrazellulären ROS-Bildung durch Aktivierung des PAR-1, aber nicht des PAR-2. Nach 24 h-Vorbehandlung mit FXa, zu welchem Zeitpunkt eine Hochregulation des PAR-2 beobachtet werden konnte, war der oxidative Effekt von PAR-2 dagegen verstärkt (Abb. 27).

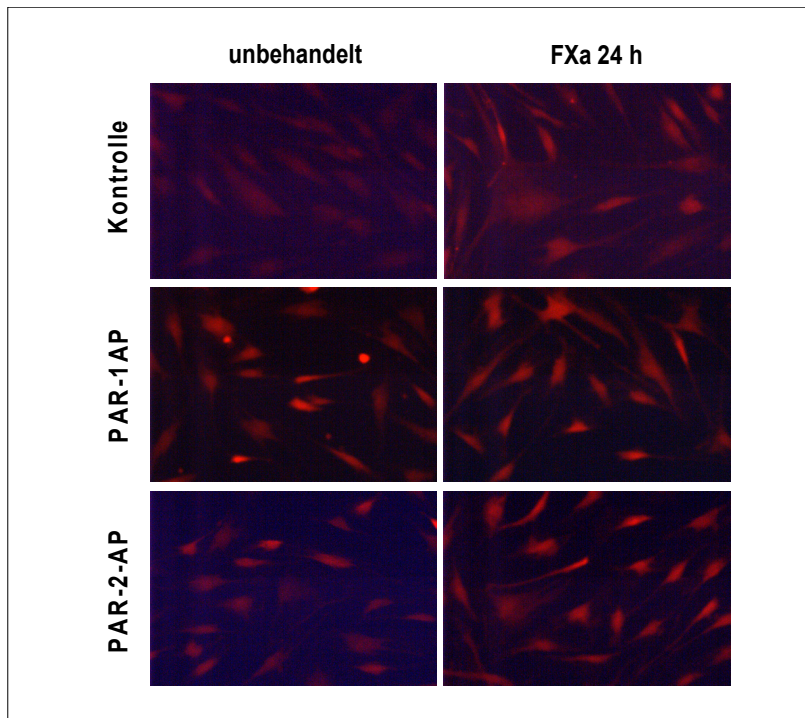


Abb. 27: Nachweis der ROS-Bildung in SMC mittels DHE-Fluoreszenz

Die Zellen wurden mit PAR-1AP (200 μ M) oder PAR-2AP (200 μ M) und +/- FXa-Vorinkubation von 24 h stimuliert. Die ROS-Bildung ist in den Zellen, die 24 h mit FXa (30 nM) inkubiert wurden, gegenüber den unstimulierten Kontrollzellen deutlich erhöht. Bei Stimulation mit PAR-2AP zeigt sich nur in Kombination mit FXa ein deutlicher oxidativer Effekt (repräsentativer Versuch, n=3).

3.6.2. Einfluss von FXa auf die Expression der NADPH-Oxidase

Die NADPH-Oxidase enthält in SMC jeweils eine der membrangebundenen katalytischen NOX-Isoformen NOX-1, NOX-4 oder NOX-5 (Harrison *et al.*, 2003). Für NOX-1 konnte nach Gefäßverletzung *in vivo* und bei de-Differenzierung kultivierter SMC eine erhöhte Expression nachgewiesen werden, während sich für NOX-4 unter diesen Bedingungen insgesamt eine Herabregulation zeigte (Clempus *et al.*, 2007; Szocs *et al.*, 2002). Während NOX-4 konstitutiv geringe Mengen von Sauerstoffradikalen produziert, die als zelluläre Botenstoffe agieren und die Differenzierung von SMC aufrechterhalten, ist NOX-1 normalerweise kaum vorhanden, bildet in geschädigtem Gewebe jedoch pathophysiologisch relevante Mengen von ROS und ist am proliferativen *Remodeling* beteiligt (Fortuno *et al.*, 2005).

Nach der Stimulation mit FXa (30 nM) in Inkubationsintervallen von 1-6 h, zeigte sich für NOX-4 auf Transkriptebene die Tendenz einer Herabregulation, welche aber nicht signifikant war (n=4, Abb. 28).

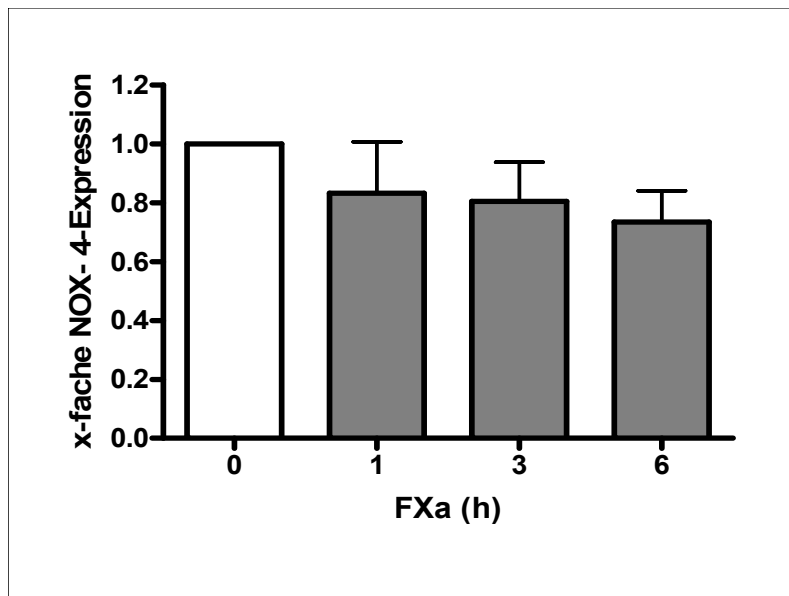


Abb. 28: Einfluss von FXa auf NOX-4-mRNA

SMC wurden über 1-6 h mit FXa (30 nM) inkubiert (n=4).

Im Gegensatz zur NOX-4-Expression zeigte sich für NOX-1 bereits nach 1 h eine deutliche, fast 4-fache Hochregulation auf Ebene der mRNA, deren Konzentration nach 3 h schon wieder auf Kontrollwerte gesunken war (n=4, *p<0.05, Abb. 29A). Auf Proteinebene erfolgte eine FXa-vermittelte signifikante Erhöhung der Expression von NOX-1 um das 3-fache nach 24 h (n=7, *p<0.05, Abb. 29B).

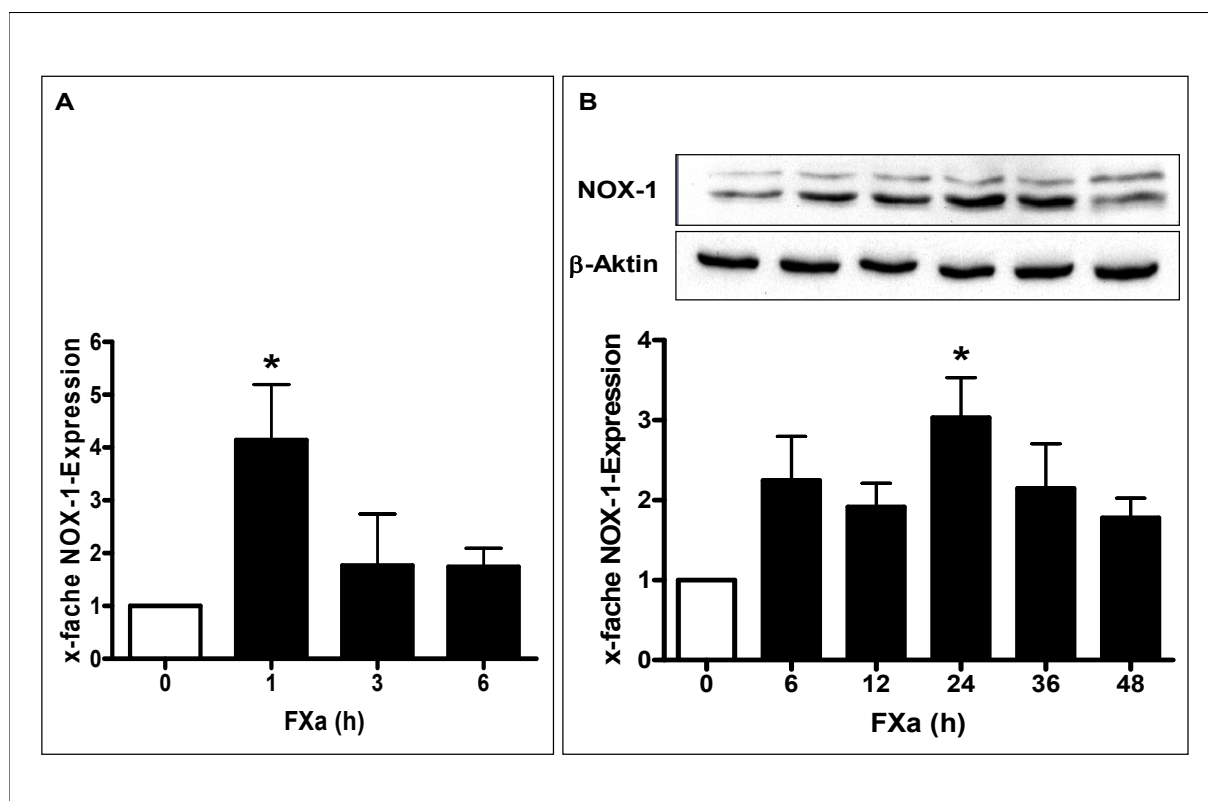


Abb. 29: Einfluss von FXa auf die NOX-1-Expression

(A) Effekt von FXa (30 nM) auf NOX-1-mRNA nach Inkubation von 1-6 h in SMC (*p<0.05, n=4). (B) Einfluss von FXa (30 nM) auf NOX-1-Gesamtprotein nach Inkubation von 6-48 h in SMC (*p<0.05, n=7).

Die FXa-vermittelte Induktion von NOX-1 konnte auch optisch durch Immunfluoreszenz mittels Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper und Kernfärbung mit Hoechst-Farbstoff nach einer 24 h-Inkubation mit FXa (30 nM) gezeigt werden (n=2, Abb. 30).

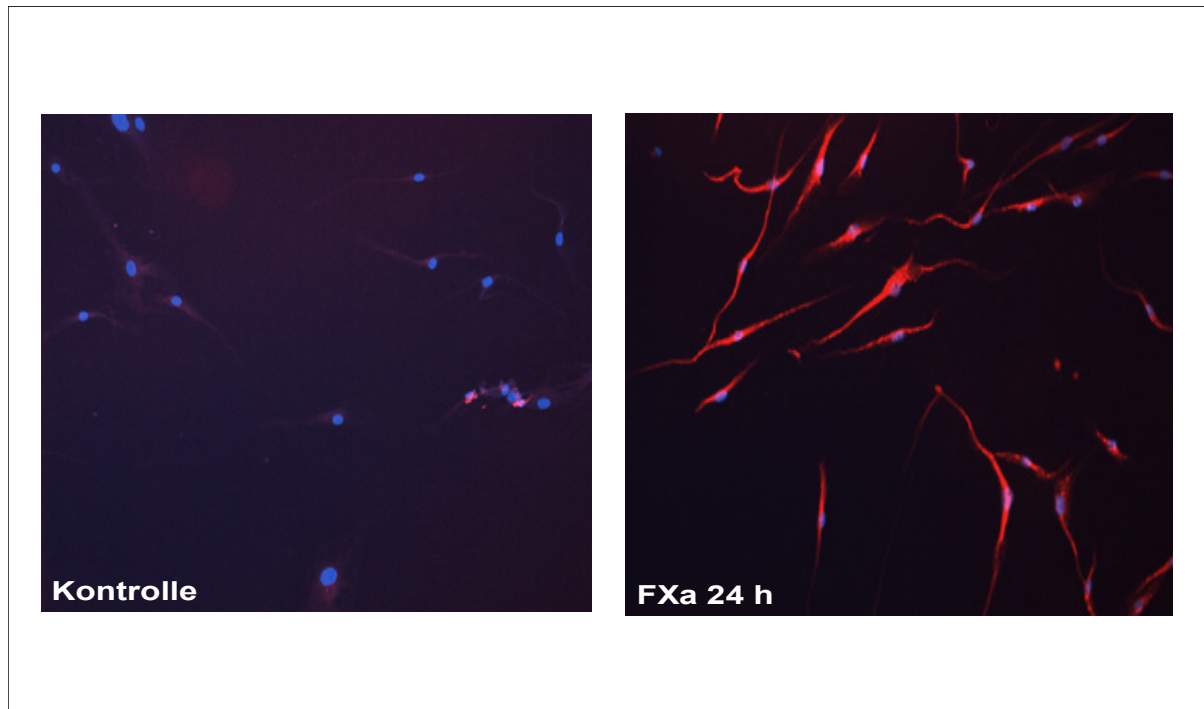


Abb. 30: NOX-1-Immunfluoreszenz von SMC nach Stimulation mit FXa (30 nM) für 24 h

Dargestellt ist die Computer-generierte Überlagerung von NOX-1 (Cy3, rot) und Kernfärbung (Hoechst-33342, blau), 100-fache Vergrößerung. Repräsentativ aus n=2 unabhängigen Versuchen.

Um die Rolle dieser NOX-1-Induktion bezüglich der FXa-vermittelten Regulation der PAR-2-Expression zu untersuchen, wurde NOX-1 mit entsprechender siRNA in der Proteinexpression um ca. 60% herabreguliert (n=4, *p<0.05, Abb. 31A). In Zellen, die mit NOX-1-siRNA transfiziert wurden, zeigte sich eine Aufhebung des FXa-induktiven Effekts auf die PAR-2-Proteinexpression (n=4, *p<0.05, Abb. 31B).

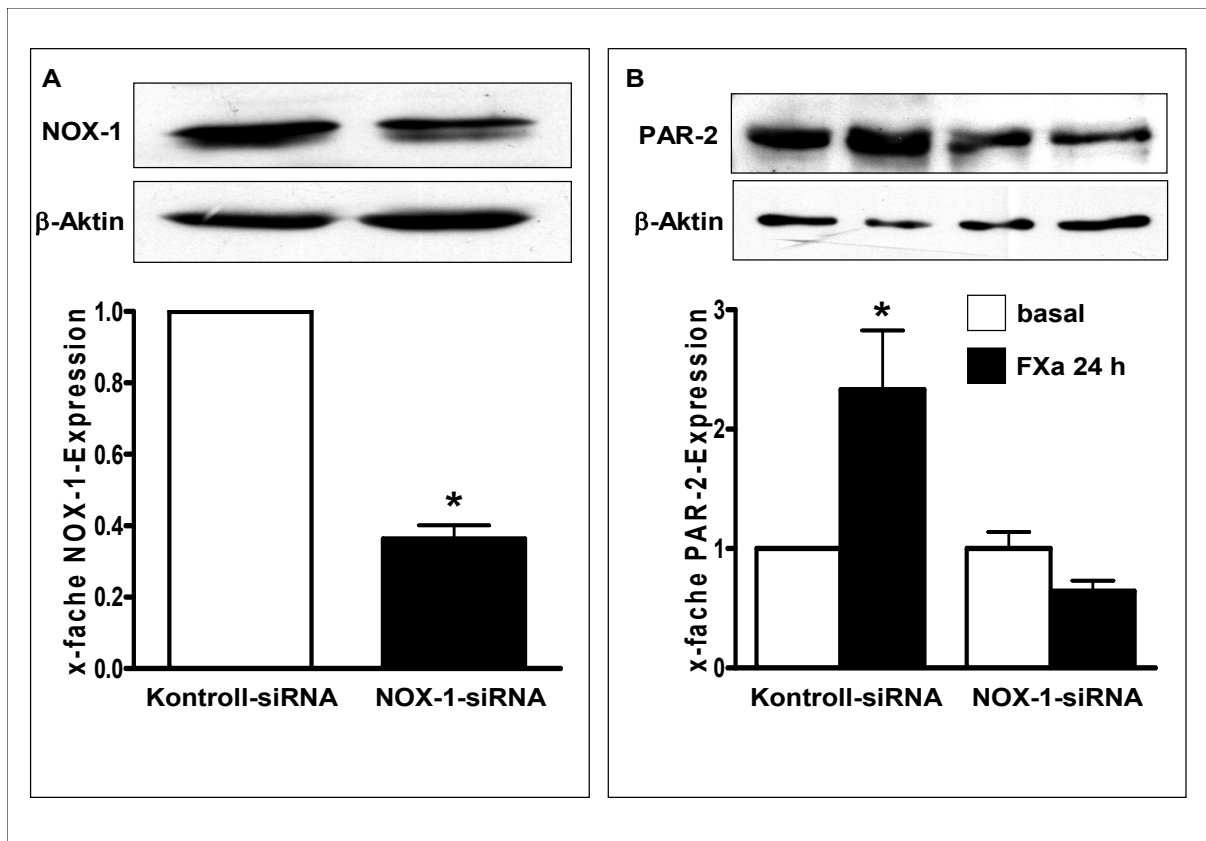


Abb. 31: Funktion von NOX-1 für die FXa-induzierte PAR-2-Expression

(A) Basale Expression von NOX-1-Protein nach der Transfektion von SMC mit entsprechender siRNA (* $p < 0.05$, $n = 4$). (B) Effekt auf PAR-2-Gesamtprotein nach Inkubation +/- FXa (30 nM) von 24 h und anschließender Transfektion mit Kontroll- und NOX-1-siRNA in SMC (* $p < 0.05$, $n = 4$).

3.6.3. H_2O_2 induziert eine ähnliche PAR-2-Expression wie FXa

Das von der NADPH-Oxidase gebildete Superoxid wird spontan zu dem stabileren Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder wird durch die Superoxiddismutase (SOD) zu diesem metabolisiert (Harrison *et al.*, 2003). In Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt sind, kann H_2O_2 , welches eine hohe Membranpermeabilität aufweist, mikromolare Konzentrationen erreichen (Li *et al.*, 2001).

Exogenes H_2O_2 (100 μM) führte in humanen SMC zu einer signifikanten Translokation von HuR in das Cytosol (* $p < 0.05$, $n = 4$, Abb. 32A) und induzierte die Expression von PAR-2-mRNA nach 6-12 h. PAR-1 hingegen, wie für FXa gezeigt (3.1.1.), wurde nicht reguliert (jeweils $n = 6$, * $p < 0.05$, Abb. 32B).

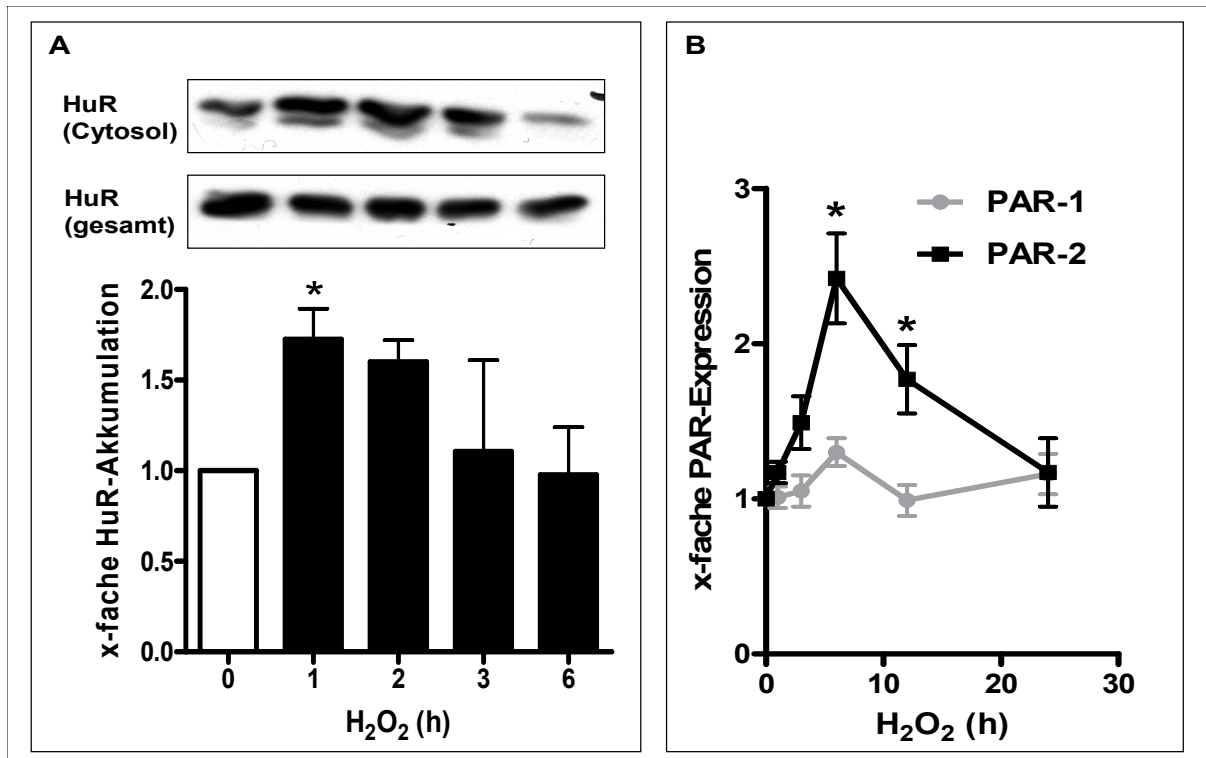


Abb. 32: Einfluss von H₂O₂ auf die PAR-2-Expression

(A) Effekt von H₂O₂ (100 µM) auf die Akkumulation von cytosolischem HuR in SMC nach Inkubation über 1-6 h, detektiert durch Western Blot und auf gesamtes HuR normalisiert (*p<0.05, n=4). (B) Einfluss von H₂O₂ (100 µM) auf PAR-1- und PAR-2-mRNA nach einer Inkubation von 1-24 h in SMC (*p<0.05, jeweils n=6).

Auf Proteinebene erfolgte eine H₂O₂-vermittelte signifikante Erhöhung der Expression von PAR-2 bei 6 und 24 h (n=6, *p<0.05, Abb. 33).

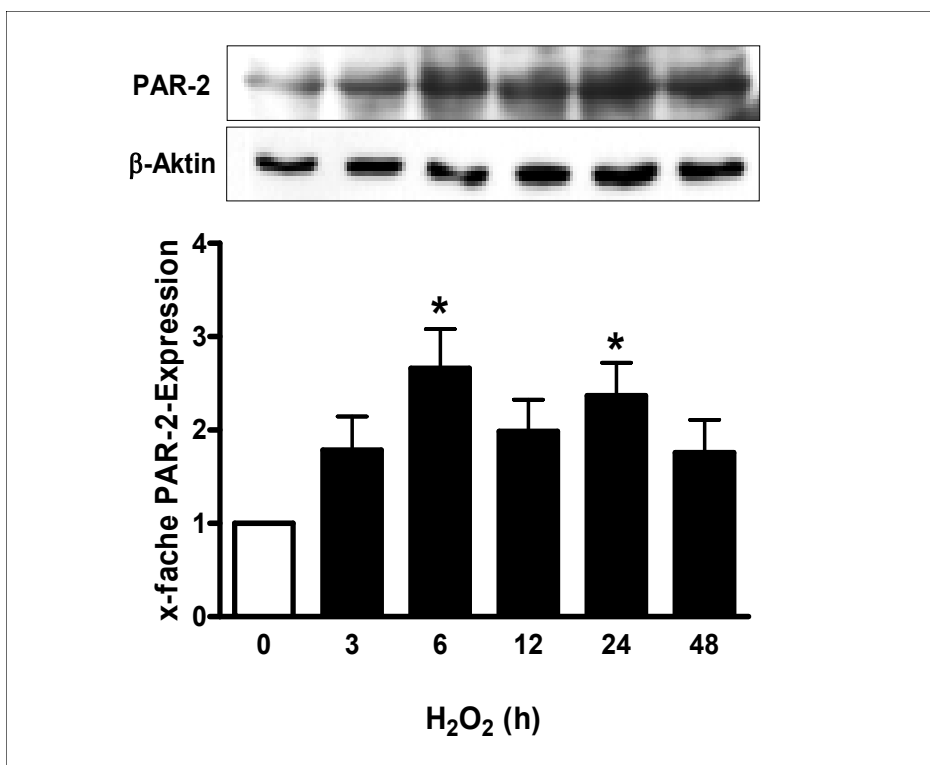


Abb. 33: Effekt von H₂O₂ auf PAR-2-Gesamtprotein

SMC wurden über 3-48 h mit H₂O₂ (100 µM) inkubiert (*p<0.05, n=6).

Bei 48 h-Stimulationen von SMC mit Katalase (500 U/mL), die H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff spaltet, wurde der FXa-vermittelte Effekt auf die Proteinexpression von PAR-2 aufgehoben ($n=4$, $*p<0.05$, Abb. 34).

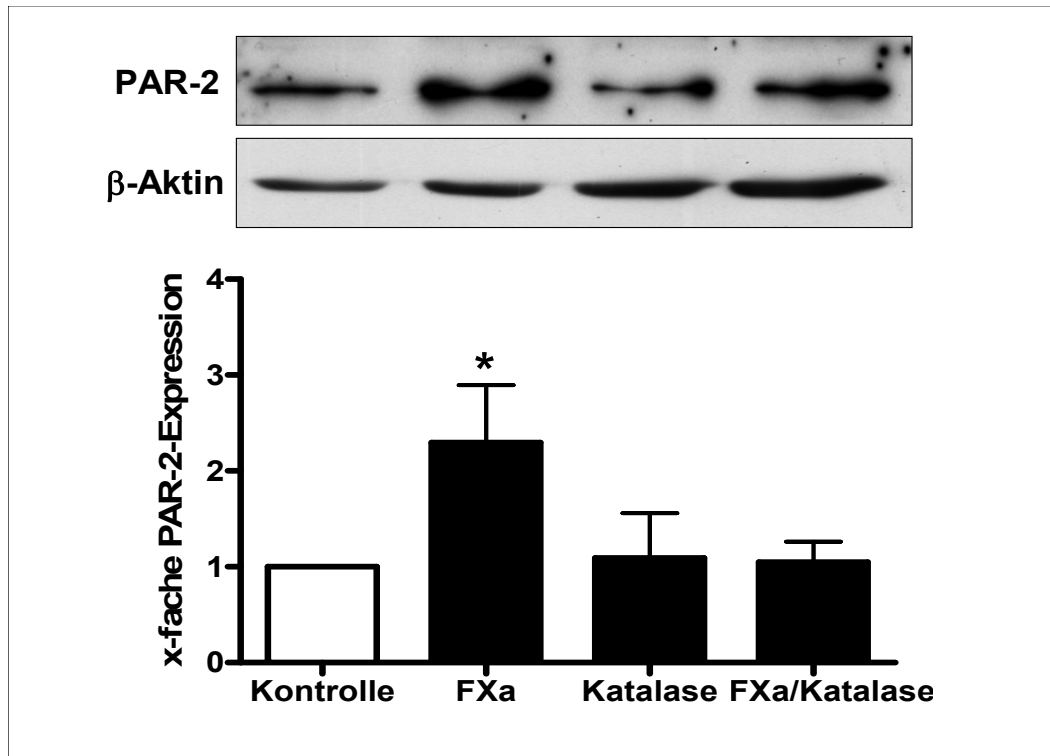


Abb. 34: Einfluss von Katalase auf die FXa-induzierte Expression von PAR-2-Gesamtprotein
SMC wurden für 48 h mit FXa (30 nM) und/oder Katalase (500 U/mL) inkubiert. ($*p<0.05$, $n=4$).

Die H_2O_2 -induzierte PAR-2-Expression wurde schließlich auf funktioneller Ebene untersucht. Nach einer 24 h-Vorbehandlung mit H_2O_2 (100 μ M) wurden SMC akut mit FXa (30 nM) oder PAR-2AP (200 μ M) stimuliert, und der Einfluss auf die Proliferation detektiert.

Die DNA-Syntheserate wurde durch [3H]-Thymidin-Inkorporation im Hinblick auf akute Stimulationen von 24 h mit FXa und PAR-2AP untersucht. Ähnlich wie bei den Proliferationsstudien mit einer FXa-Vorinkubation von 24 h, zeigten sich hierbei bei den akuten Stimulationen die stärksten mitogenen Effekte, wo SMC zusätzlich mit H_2O_2 für 24 h vorinkubiert und die PAR-2-Expression somit verstärkt wurde ($n=4$, $*p<0.05$, Abb. 35).

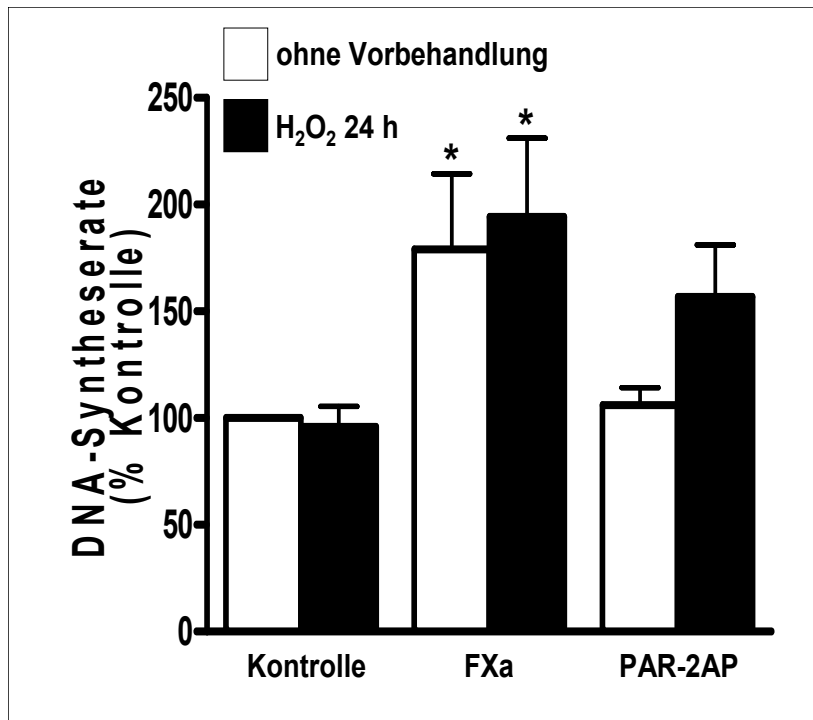


Abb. 35: Durch Vorbehandlung mit H₂O₂ erfolgt eine verstärkte Mitogenese

DNA-Syntheserate in SMC +/- 24 h Vorbehandlung mit H₂O₂ (100 µM) und akuter Stimulation von weiteren 24 h mit FXa (30 nM) und PAR-2AP (200 µM) (*p<0.05 relativ zur unstimulierten Kontrolle, n=4).

Damit konnte gezeigt werden, dass FXa ROS in SMC induziert und dass dies von einer Hochregulation der katalytischen NOX-1-Untereinheit der NADPH-Oxidase induziert wird, die für die FXa-vermittelte PAR-2-Expression wichtig ist. Zudem induziert H₂O₂, das Produkt der NADPH-Oxidase, eine Expression von PAR-2, die ähnlich zum FXa-Effekt ist. Ebenso wie FXa vermittelt H₂O₂ in SMC zudem proliferative Effekte, bei denen PAR-2 involviert zu sein scheint.

3.6.4. Einfluss von Angiotensin II auf die PAR-2-Expression

Im Folgenden wurde untersucht, ob auch Aktivatoren der H₂O₂-produzierenden NADPH-Oxidase, eine Aufregulation der PAR-2-Expression hervorrufen.

Als ein potenter Aktivator der NADPH-Oxidase gilt insbesondere Angiotensin II (Ang II) (Griendling *et al.*, 1994). SMC wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Ang II (10 nM, 100 nM, 1 µM) inkubiert und die Expression von PAR-1 und PAR-2 auf mRNA-Ebene untersucht. Entgegen den Erwartungen zeigte sich jedoch selbst bei einer Ang II-Konzentration von 1 µM keine signifikante Regulation der beiden FXa-Rezeptoren (n=3-4, Abb. 36).

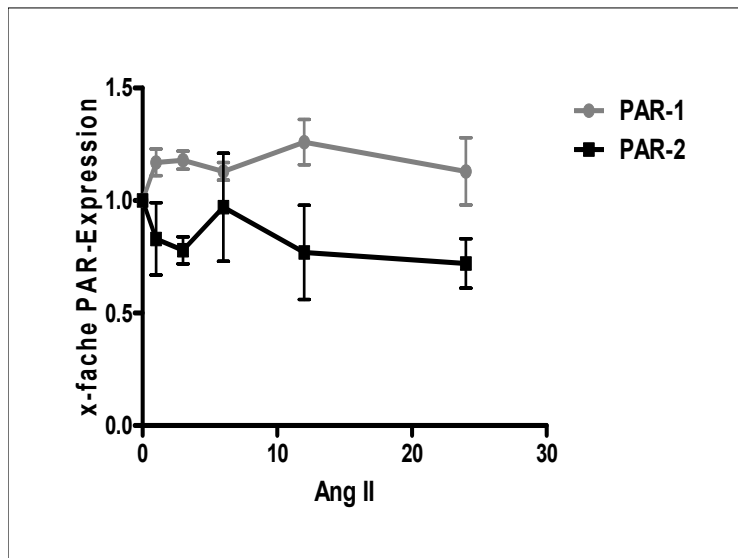


Abb. 36: Effekt von Angiotensin II auf PAR-1- und PAR-2-mRNA
 SMC wurden über 1-24 h mit Angiotensin II (1 μ M) inkubiert (n=3-4).

3.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

FXa (30 nM) induzierte die Expression von PAR-2-mRNA, nicht aber die von PAR-1. Bei der Aufregulation von PAR-2 handelte es sich um einen spezifischen FXa-Effekt, der weder durch das Passagieren der Zellen mit Trypsin, noch durch den Thrombininhibitor Argatroban beeinflusst wurde. Bei der verwendeten Argatroban-Konzentration wurde die durch Thrombin induzierte ERK1/2-Phosphorylierung vollständig aufgehoben, während der FXa-Effekt diesbezüglich signifikant erhalten blieb. Thrombin wurde hierbei in einer äquimolaren Konzentration zu FXa eingesetzt. Die FXa-induzierte PAR-2-Expression war konzentrationsabhängig und bei einer FXa-Konzentration von 30 nM maximal. Außerdem war der FXa-Effekt in schwach konfluenten Zellen am deutlichsten. Neben der gesteigerten mRNA-Expression von PAR-2, konnte eine signifikante Induktion durch FXa sowohl auf Proteinebene, als auch bezüglich der Oberflächenexpression nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PAR-2, seine eigene Expression induziert und dass PAR-1 bei der durch FXa hervorgerufenen PAR-2-Expression keine Rolle spielt.

Die FXa-induzierte PAR-2-Aufregulation ging mit einer verstärkten Mitogenese und IL-6-Expression in SMC einher. Bei der Untersuchung der regulatorischen Mechanismen der verstärkten PAR-2-Expression zeigte sich, dass im humanen PAR-2-Promotor, im Gegensatz zu PAR-1, zwei Bindungsstellen für NF- κ B vorhanden sind. Durch FXa wurde dementsprechend NF- κ B aktiviert und dessen Bindung in der zweiten Bindungsstelle verstärkt. Außerdem konnte die FXa-induzierte PAR-2-Expression durch einen Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung vollständig aufgehoben werden. Bezüglich posttranskriptioneller Mechanismen konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu PAR-1, die Halbwertszeit des

PAR-2-Transkripts signifikant durch FXa erhöht wird. Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass FXa das mRNA-stabilisierende Protein HuR aktiviert und dessen Bindung an PAR-2-mRNA verstärkt, bei der charakteristische Bindungsmotive für HuR nachgewiesen werden konnten. Außerdem verhinderte die Herabregulation der endogenen HuR-Expression durch siRNA die FXa-induzierte Aufregulation von PAR-2.

Erstmals konnte zudem gezeigt werden, dass durch FXa die Bildung von ROS in SMC induziert wird. Stimulation mit FXa führte zu einer signifikanten Aufregulation der NOX-1-Untereinheit der NADPH-Oxidase. Durch siRNA konnte gezeigt werden, dass NOX-1 für die FXa-induzierte PAR-2-Aufregulation von kritischer Bedeutung ist. Die wichtige Rolle von oxidativem Stress für die PAR-2-Regulation wurde außerdem darin deutlich, dass H_2O_2 ebenfalls HuR aktivierte, PAR-2 auf mRNA- und Proteinebene induzierte und die Mitogenese bei PAR-2-Aktivierung verstärkte. Durch Katalase konnte zudem die, durch FXa induzierte, Expression von PAR-2 aufgehoben werden. Ein weiterer Stimulus der NADPH-Oxidase, das Ang II führte entgegen den Erwartungen nicht zu einer Regulation von PAR-2.

4. Diskussion

Der Schlüsselbefund der vorliegenden Arbeit ist, dass FXa die Expression seines Rezeptors PAR-2 in humanen SMC induziert, während der prototypische Rezeptor PAR-1 in seiner Expression unverändert bleibt. Bei der FXa-induzierten PAR-2-Regulation ist die NADPH-Oxidase involviert, sowie weitere Effektoren, wie der oxidative Botenstoff H_2O_2 , der Transkriptionsfaktor NF- κ B und das mRNA-stabilisierende Protein HuR. Diese Signalkaskade scheint vorwiegend durch die Aktivierung des PAR-2 selbst in Gang zu kommen.

4.1. FXa induziert selektiv die Expression von PAR-2

FXa wird nach Gefäßverletzung und Abschluss der Hämostase bis zu eine Woche weiter in der Gefäßwand gebildet (Abendschein *et al.*, 2003; Ghigliotti *et al.*, 1998). Während dieses Zeitraums wird FXa in ähnlich großen Mengen wie Thrombin produziert. Neben der Aktivierung von Prothrombin, induziert FXa, unabhängig von Thrombin, zudem Proliferation, Synthese der extrazellulären Matrix und Expression von inflammatorischen Genen in SMC (Bretschneider *et al.*, 2000; Bretschneider *et al.*, 2001; Rauch *et al.*, 2002; Rauch *et al.*, 2004). SMC befinden sich in der Media der beschädigten Gefäßwand und sind durch den Verlust von Endothel für Blutkomponenten zugänglich. Allgemein werden solche zellulären Effekte von FXa dem prototypischen Rezeptor PAR-1 zugeschrieben, jedoch wird zunehmend auch dem PAR-2, der im Gegensatz zum PAR-1, nicht durch Thrombin aktiviert wird, eine zentrale Rolle in diesen Prozessen zugeordnet (Borensztajn *et al.*, 2008; Krupiczojc *et al.*, 2008). Nach Gefäßverletzung und bei *Remodeling* ist die Expression von PAR-2 erhöht (Damiano *et al.*, 1999; Napoli *et al.*, 2004). Die Mechanismen dieser Hochregulation sind bisher noch unklar.

Bei der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PAR-2 in SMC durch seinen Liganden FXa, sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene induziert wird und dass funktionell aktiver PAR-2 an die Zelloberfläche transloziert wird. Zudem wird PAR-2, durch die Stimulation mit FXa, in schwach konfluenten bzw. proliferierenden SMC stärker induziert, als in konfluenten Zellen. Diese Beobachtung passt zu der verstärkten PAR-2-Expression in verletzten Gefäßarealen *in vivo* (Damiano *et al.*, 1999; Napoli *et al.*, 2004), wo SMC sich eher im aktiv proliferierenden, als im ruhenden Zustand befinden.

Der induktive FXa-Effekt auf die PAR-2-Expression bleibt auch in Gegenwart des direkten Thrombininhibitors Argatroban erhalten. Die verwendete Argatroban-Konzentration reicht zudem aus, um die Thrombin-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung vollständig zu inhibieren, während der FXa-Effekt diesbezüglich signifikant erhalten bleibt. Da Thrombin hierbei in einer äquimolaren Konzentration zu FXa eingesetzt wurde, spricht dies insgesamt dafür, dass FXa direkt und nicht indirekt, über Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin, seine

PAR-2-regulatorische Wirkung ausübt. Durch gezielte Aktivierung des PAR-2 mit PAR-2AP kann zudem die durch FXa hervorgerufene PAR-2-Expression nachgeahmt werden, während Inkubation mit PAR-1AP keinen Effekt hat. Außerdem wird durch Transfektion von SMC mit PAR-2-siRNA, die FXa-induzierte Expression von PAR-2 aufgehoben, wogegen bei Verwendung von PAR-1-siRNA, der FXa-Effekt erhalten bleibt. Da PAR-1 in seiner Expression zudem nicht durch FXa reguliert wird, impliziert dies insgesamt, dass die gezeigte Hochregulation des PAR-2, spezifisch durch FXa, über eine direkte Aktivierung von PAR-2 induziert wird. Eine FXa-vermittelte Aktivierung von PAR-1 spielt hierbei eine untergeordnete Rolle bzw. ist nicht bekannt.

4.2. Funktionelle Konsequenzen der PAR-2-Induktion durch FXa

Die FXa-induzierte PAR-2-Expression ist mit verschiedenen zellulären Effekten verknüpft. Infolge einer Inkubation mit FXa von 24 h, bei der die stabilste Hochregulation von PAR-2 bezüglich mRNA-, Protein- und Oberflächenexpression beobachtet wird, sind die mitogenen Effekte bei einer Aktivierung des PAR-2 mit PAR-2AP am stärksten. Dies zeigt, dass erst durch die Vorstimulation des PAR-2 mit FXa im Endeffekt genug PAR-2 auf der Zelloberfläche exprimiert wird, so dass über einen nachgeschalteten Signalweg eine entsprechend starke zelluläre Antwort generiert werden kann.

Als eine weitere zelluläre Konsequenz der PAR-2-Induktion durch FXa kann eine verstärkte Expression des inflammatorischen Cytokins IL-6 auf mRNA-Ebene detektiert werden. IL-6 wird bei Plaqueruptur in großen Mengen freigesetzt und ist ein wichtiger Mediator bei der Proliferation und Migration von SMC (Deng *et al.*, 2006; Seino *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2003). Bei der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass infolge einer 24 h-Vorinkubation von SMC mit FXa, die Induktion von IL-6 nach akuter Stimulation mit FXa oder PAR-2AP verstärkt ist. Somit zeigt sich, dass auch in diesem Fall zuerst ausreichend PAR-2 durch FXa induziert werden muss, um einen deutlichen Effekt durch die nachfolgende PAR-2-Aktivierung zu erzielen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die anhaltende FXa-Aktivität in der Nähe der Gefäßverletzung, die lokale inflammatorische und proliferative Antwort durch eine Vorwärtsregulation des PAR-2 verstärkt.

4.3. NF- κ B vermittelt die transkriptionelle Regulation von PAR-2 in SMC

In dieser Arbeit wurde auch die Bedeutung von NF- κ B für die PAR-2-Regulation untersucht. Aktivierter NF- κ B wird sowohl in SMC der Halsschlagader nach Ballondilatation (Landry *et al.*, 1997), als auch in der Intima und Media von atherosklerotischen Gefäßabschnitten gefunden (Wilson *et al.*, 2002), was auf eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Atherosklerose schließen lässt. Zur verstärkten Aktivierung von NF- κ B kommt es auch während einer venösen Bypass-Operation (Hinokiyama *et al.*, 2006). Zusammen mit der

Endothelschädigung, die den Zugang von FXa zu den darunterliegenden SMC ermöglicht, könnte dies bereits direkt nach der Verletzung, die PAR-2-Expression beeinflussen. Die Sequenzanalyse des humanen PAR-2-Promotors zeigt zwei Bindungsstellen für NF- κ B, die 373 bp (Bindungsstelle 1) und 522 bp (Bindungsstelle 2) stromaufwärts des Startcodons lokalisiert sind. Dagegen sind im PAR-1-Promotor keine NF- κ B-Bindungsstellen vorhanden, was die Regulation von PAR-2 durch FXa zum Teil erklären könnte.

Die FXa-induzierte Aktivierung von NF- κ B kann durch die zeitabhängige Akkumulation von phosphoryliertem I κ B und durch die Translokation von NF- κ B-p65 vom Cytosol in den Zellkern nachgewiesen werden. Die Translokation von NF- κ B-p65 ist nach 2 h-Inkubation mit FXa maximal. Dies passt zu einem früheren Befund unserer Arbeitsgruppe, bei dem das PAR-1/PAR-2-aktivierende Peptid SFLLRN, die Translokation von NF- κ B in SMC aus humanen Koronararterien, ebenfalls nach 2 h maximal induzierte (Bretschneider *et al.*, 1999).

Die ChIP-Analyse von SMC, die für 2 h mit FXa inkubiert wurden, zeigt eine verstärkte Bindung von NF- κ B an der Bindungsstelle 2, wogegen sich für die Bindungsstelle 1 keine Interaktion mit NF- κ B detektieren ließ. Der Sequenzvergleich beider Bindungsstellen zeigt, dass sich in unmittelbarer Nähe zur Bindungsstelle 2, Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren der SMAD-Familie und für Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie befinden. Sowohl SMAD, als auch GATA sollen in redoxabhängiger Gentranskription involviert sein (Imagawa *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 2005), was wiederum dazu passt, dass NF- κ B in seiner Aktivität durch H₂O₂ moduliert wird (Griendling *et al.*, 2000). Des Weiteren wird durch einen Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung zudem die FXa-induzierte PAR-2-Expression in SMC komplett aufgehoben, was insgesamt eine entscheidende Rolle für NF- κ B und dessen Bindung in der Bindungsstelle 2 bei der Regulation von PAR-2 durch FXa impliziert. Möglicherweise erklärt eine geringere PAR-2-Regulation und Funktion zum Teil den schützenden Effekt einer NF- κ B-Inhibition durch sogenannte 'decoy'-cis-Elemente, nach Gefäßverletzung *in vivo* (Yamasaki *et al.*, 2003).

4.4. Posttranskriptionelle Regulation von PAR-2 durch mRNA-Stabilisierung

Neben der transkriptionellen Regulation, wurden auch mögliche posttranskriptionelle Regulationsmechanismen hinsichtlich der PAR-2-Expression untersucht. Das mRNA-stabilisierende Protein HuR bindet an AU-reiche Elemente in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der Ziel-mRNA, während diese aus dem Zellkern ins Cytosol transportiert wird (Doller *et al.*, 2008a; Misquitta *et al.*, 2001). Die 3'-UTR des humanen PAR-2 besitzt mehrere solcher AU-reichen Elemente, die durch HuR gebunden werden können. Dagegen scheint PAR-1 nicht über posttranskriptionelle mRNA-Stabilisierung reguliert zu werden (Sokolova *et al.*, 2008). Dies gibt somit einen ersten Hinweis, dass die selektive Induktion von PAR-2 in

FXa-stimulierten SMC, zum Teil über differentielle mRNA-Stabilisierung vonstatten gehen könnte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das PAR-2-Transkript in Gegenwart des Transkriptioninhibitors Actinomycin D einem schnelleren Verfall unterliegt, als PAR-1-mRNA. FXa verlangsamt die Degradation der mRNA von PAR-2, jedoch nicht von PAR-1, wobei der stabilisierende Effekt auf PAR-2 nach 2 h am stärksten ist. Zum gleichen Zeitpunkt induziert FXa eine ausgeprägte Translokation von HuR ins Cytosol, was einer Aktivierung von HuR durch FXa entspricht. Außerdem kann durch Immunpräzipitations (*Pull-down*)-PCR gezeigt werden, dass durch FXa, die Bindung von HuR an PAR-2-mRNA verstärkt wird. Der FXa-Effekt bezüglich der mRNA-Expression von PAR-2 wird zudem durch Transfektion von SMC mit HuR-siRNA vollständig aufgehoben. Im Hinblick auf einen FXa-PAR-2-Signalweg scheint FXa somit über Aktivierung des PAR-2, das HuR-Protein zu aktivieren, so dass dieses an PAR-2-mRNA bindet und während der Translokation ins Cytosol vor Abbau schützt. Somit können bei anhaltender FXa-Stimulation von jedem Transkript ausreichende Mengen an PAR-2-Protein gebildet werden, während im nicht-pathologischen Hintergrund das PAR-2-Transkript schnell wieder abgebaut wird und die basale PAR-2-Expression auf einem niedrigen Niveau bleibt. HuR, das bei Atherosklerose, Neointimabildung und Restenose von venösen Bypässen gefunden wird (Pullmann *et al.*, 2005), könnte daher dazu dienen, die lokalen Wirkungen von FXa zu steigern bzw. die mögliche Bedeutung von PAR-2, als einen durch FXa regulierten Rezeptor in vaskulärer Pathologie hervorzuheben.

4.5. Redoxvermittelte Signalgebung bei der Regulation von PAR-2

Oxidativer Stress ist eng mit Thrombose, Atherosklerose, intimaler Hyperplasie und einer veränderten vaskulären Genexpression verknüpft (Herkert *et al.*, 2004; Patterson *et al.*, 1999; West *et al.*, 2001). Sowohl NF- κ B, als auch HuR werden in verschiedenen Zellen infolge von oxidativem Stress aktiviert (Amadio *et al.*, 2008; Kuwano *et al.*, 2008; Pueyo *et al.*, 2000). Eine aktuelle Studie deutet zudem darauf hin, dass oxidativer Stress, höchstwahrscheinlich durch Aktivierung der NADPH-Oxidase, die Expression von PAR-2 in aortalen Endothelzellen von Ratten steigert (Aman *et al.*, 2010). Die NADPH-Oxidase ist die wichtigste Quelle für reaktive Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS) in der Gefäßwand (Lassegue *et al.*, 2001) und wird durch Thrombin über den PAR-1/PKC-Signalweg aktiviert (Patterson *et al.*, 1999). Von einem oxidativen Effekt durch FXa wurde bisher nicht berichtet und konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden. Mittels DCF-DA-Fluoreszenz, kann ein fast 2-facher Anstieg der ROS-Bildung durch Stimulation mit FXa nach 1-3 h detektiert werden, was wahrscheinlich auf eine direkte Aktivierung der NADPH-Oxidase zurückzuführen ist. Nach 24 h-Stimulation mit FXa wird ein zweiter Anstieg bei der

Generierung von intrazellulären ROS in SMC gemessen. Dieser späte sekundäre Effekt erfolgt wahrscheinlich über eine zunehmende Expression der NADPH-Oxidase und somit der basalen ROS-Produktion. Die Bildung von ROS durch FXa kann ebenfalls mittels DHE-Fluoreszenz gezeigt werden. Hierfür wurden SMC ebenfalls mit FXa für 24 h vorinkubiert, um die PAR-2-Expression zu induzieren und die resultierende Bildung von ROS im Hinblick auf akute Stimulationen mit PAR-1AP und PAR-2AP zu untersuchen. Während sich bei SMC ohne FXa-Vorbehandlung eine Verstärkung der Fluoreszenz mit PAR-1AP zeigt, kann bei Zellen, die mit FXa vorstimuliert wurden, eine intensive ROS-Produktion infolge der akuten PAR-2-Stimulation gezeigt werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die NADPH-Oxidase über Aktivierung des PAR-1, ein basales Niveau von ROS produziert, während im pathologischen Zustand, d.h. bei ansteigender Konzentration von FXa, der PAR-2 induziert wird und durch dessen Aktivierung die Konzentration von ROS schließlich zunimmt.

Um die Expression der NADPH-Oxidase unter Einfluss der Stimulation mit FXa zu untersuchen, wurde die Regulation von Untereinheiten der NADPH-Oxidase gemessen, die für die ROS-Produktion in SMC von zentraler Bedeutung sind. SMC exprimieren die katalytischen Untereinheiten NOX-1 und NOX-4, wobei letztere für die physiologische Isoform gehalten wird, die konstitutiv geringe Mengen an ROS produziert und für die Aufrechterhaltung des differenzierten SMC-Phänotyps verantwortlich ist (Clempus *et al.*, 2007). Dagegen wird NOX-1 nach Gefäßverletzung *in vivo* und bei de-Differenzierung kultivierter SMC hochreguliert (Clempus *et al.*, 2007; Szocs *et al.*, 2002). Bei der Untersuchung der Regulation von NOX-4 in SMC zeigt sich, dass die mRNA-Expression kaum durch FXa beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu wird NOX-1 durch FXa deutlich in der Expression induziert. Auf mRNA-Ebene zeigt sich infolge der Inkubation mit FXa ein fast 4-facher Anstieg nach 1 h und auf Proteinebene eine 3-fache Erhöhung der Expression nach 24 h. Eine durch FXa induzierte Hochregulation von NOX-1 kann zudem auch mittels Immunofluoreszenz auf SMC nachgewiesen werden. Des Weiteren kann durch die Transfektion von SMC mit siRNA gegen NOX-1 die FXa-induzierte PAR-2-Expression vollständig aufgehoben werden. Dies ist ein erster Hinweis dafür, dass die ROS-produzierende NADPH-Oxidase, und hierbei insbesondere die katalytische NOX-1-Untereinheit, für die FXa-induzierte Hochregulation des PAR-2 wichtig ist.

Von der NADPH-Oxidase gebildetes Superoxid wird spontan zu dem stabileren H₂O₂ umgesetzt. Dieses und andere ROS fungieren als wichtige zelluläre Botenstoffe bei der Aktivierung von Effektoren, wie MAP-Kinasen und Transkriptionsfaktoren, wie NF-κB (Griendling *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2003). Darüberhinaus ist bekannt, dass durch die H₂O₂-vermittelte Aktivierung der PKC (Harrison *et al.*, 2003), die PKC-abhängige NADPH-Oxidase durch die Produktion von Superoxid bzw. H₂O₂ eine sich selbst verstärkende

Regulationsschleife vermitteln kann (Li *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass H_2O_2 , wie FXa, die PAR-2-Expression auf mRNA- und Proteinebene in SMC induziert, wogegen bei der konstitutiven Expression von PAR-1 keine Regulation zu erkennen ist. Trotz Hinweisen, dass eine durch ROS induzierte Regulationsschleife, die Expression von PAR-1 regulieren kann (Herkert *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2001), ist der hier gezeigte Befund im Einklang mit der aktuellen Studie von Aman *et al.* (Aman *et al.*, 2010), bei der gezeigt wird, dass bei oxidativem Stress endothelialer PAR-2, jedoch nicht PAR-1 hochreguliert wird. In humanen SMC führt exogenes H_2O_2 zu einer signifikanten Translokation von HuR in das Cytosol, so dass auch in diesem Fall ein ähnlicher Effekt wie durch FXa vermittelt wird.

Durch Katalase, ein Enzym, welches H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff spaltet, kann zudem der induktive FXa-Effekt auf die PAR-2-Expression aufgehoben werden. Dementsprechend führt eine Vorstimulation mit H_2O_2 von 24 h zu einem verstärkten proliferativen Effekt bei Aktivierung von PAR-2 in SMC. Wie beim mitogenen Effekt durch FXa wird somit deutlich, dass auch in diesem Fall zuerst ausreichend PAR-2 synthetisiert werden muss, damit durch die darauffolgende Aktivierung des Rezeptors, ein entsprechender zellulärer Effekt stattfinden kann. Insgesamt zeigt sich somit, dass H_2O_2 bei der FXa-induzierten PAR-2-Expression als sekundärer Botenstoff wichtig ist. Hierbei spielt möglicherweise auch das HuR eine bedeutende Rolle, da H_2O_2 die Translokation des mRNA-stabilisierenden Faktors in humanen SMC stimuliert.

Um zu untersuchen, ob auch andere bekannte Induktoren von oxidativem Stress die PAR-2-Expression, ähnlich wie FXa beeinflussen, wurden SMC mit dem potenten Aktivator der NADPH-Oxidase, Angiotensin II (Ang II) stimuliert (Griendling *et al.*, 1994). Entgegen den Erwartungen induziert Ang II jedoch keine signifikante Regulation des PAR-2. Für die selektive PAR-2-Regulation scheinen somit nur hochspezifische, durch FXa induzierte, oxidative Mechanismen eine Rolle zu spielen, so dass unspezifische oxidative Effekte anderer Stimuli keinen Einfluss zu haben scheinen.

4.6. FXa induziert über die PAR-2-Regulation pathologische Effekte in SMC

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass PAR-2, im Gegensatz zu PAR-1, dynamisch durch FXa in SMC reguliert wird. Dies ist im Einklang mit der bekannten Induktion von PAR-2 bei Gefäßverletzung und Atherosklerose *in vivo* (Damiano *et al.*, 1999; Napoli *et al.*, 2004). Da sowohl NF- κ B, als auch HuR in Atherosklerose verstärkt exprimiert werden (Pullmann *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2002) und beide Faktoren durch FXa aktiviert werden, lässt sich insgesamt auf einen durch FXa induzierten Signalweg schließen (Abb. 37), der infolge der Aktivierung und verstärkten Hochregulation von PAR-2 in verschiedenen pathologischen Effekten von SMC mündet.

Da sowohl eine FXa-, als auch eine PAR-2-vermittelte Aktivierung der PKC bekannt ist (Monno *et al.*, 2001; van der Merwe *et al.*, 2009), aktiviert FXa über PAR-2 vermutlich zuerst die PKC und schließlich die NADPH-Oxidase, um somit die Produktion von ROS in SMC zu steigern. Infolge der FXa-Stimulation wird die katalytische NADPH-Oxidase-Untereinheit NOX-1 außerdem verstärkt exprimiert. Durch das vermehrte Auftreten des Enzyms in der Zellmembran kommt es auch nach 24 h zu einer gesteigerten intrazellulären ROS-Konzentration, nachdem die erste Phase der ROS-Bildung bereits abgeklungen ist. Die gebildeten ROS und hierbei besonders das H₂O₂ fungieren dann als sekundäre Botenstoffe bei der Induktion von verschiedenen Genen. Durch H₂O₂ werden Transkriptionsfaktoren wie NF-κB aktiviert (Griendling *et al.*, 2000), so dass dessen Translokation in den Zellkern erfolgt. Hier bindet NF-κB an der zweiten Bindungsstelle im PAR-2-Promotor und mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren aus der SMAD- und GATA-Familie erfolgt schließlich die verstärkte Transkription von PAR-2. Durch H₂O₂ wird zudem die membrangebundene PKC aktiviert, welche nach dem Import in den Zellkern, HuR phosphoryliert (Amadio *et al.*, 2008; Doller *et al.*, 2008b), so dass dieses an AU-reiche Sequenzen innerhalb der 3'-UTR der inzwischen synthetisierten PAR-2-mRNA binden kann und somit die Stabilisierung des Transkripts erfolgt. Nach dem Transport der PAR-2-mRNA ins Cytoplasma, erfolgt eine intensive Translation, welche durch die vorhergehende HuR-Stabilisierung und damit Verlängerung der Halbwertszeit des Transkripts ermöglicht wird. Schließlich kommt es zu einer verstärkten Expression des PAR-2-Rezeptors in der Membran, so dass infolge des fortwährenden FXa-Stimulus eine entsprechend starke zelluläre Antwort, wie die Hochregulation von IL-6 und die Proliferation von SMC erfolgen kann.

Durch die anhaltende Freisetzung von FXa aus dem Thrombus, könnte somit eine sich selbst verstärkende, über PAR-2 vermittelte Regulationsschleife vorliegen, welche inflammatorische und proliferative Effekte nach Gefäßverletzung vermittelt und entschieden zum vaskulären *Remodeling* beiträgt. Dies kann u.a. damit belegt werden, dass Deletion des PAR-2 zu einer reduzierten Neointimabildung *in vivo* führt (Tennant *et al.*, 2008) und dass besonders PAR-2 bei proliferativen Veränderungen, wie z.B. Tumormetastasierung im Mittelpunkt steht, während PAR-1 hierbei möglicherweise eine untergeordnete Rolle spielt (Borensztajn *et al.*, 2008; Versteeg *et al.*, 2008).

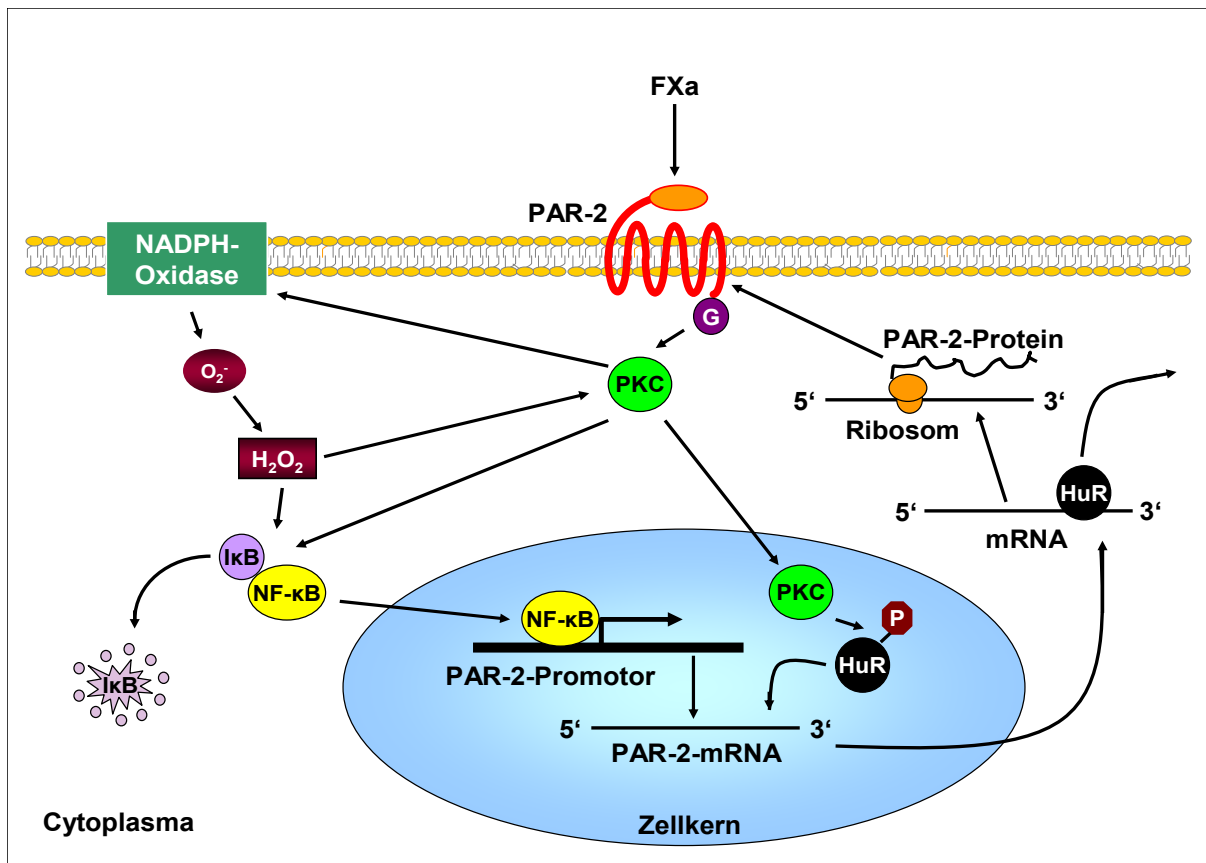


Abb. 37: FXa induziert die Expression von PAR-2 in humanen SMC durch Aktivierung des PAR-2 über eine sich selbst verstärkende Regulationsschleife

Neben der NADPH-Oxidase sind hierbei weitere Effektoren, wie der oxidative Botenstoff H_2O_2 , der Transkriptionsfaktor NF- κ B und das mRNA-stabilisierende Protein HuR involviert.

4.7. Ausblick

Da FXa nach Gefäßverletzung in großen Mengen, langanhaltend gebildet wird (Abendschein *et al.*, 2003; Ghigliotti *et al.*, 1998) und das Potential hat, spezifisch die Expression und zelluläre Aktivität von PAR-2 zu induzieren, könnte der FXa-PAR-2-Signalweg eine zentrale Rolle bei kardiovaskulärem *Remodeling* und Atherosklerose spielen. Für FXa wird dies dadurch bestätigt, dass die Inhibierung dieses Koagulationsfaktors die Proliferation von vaskulären SMC sowie die Restenose nach Ballondilatation reduziert (Borensztajn *et al.*, 2008). Eine PAR-2-Regulation scheint im gesunden Gefäß keine Rolle zu spielen, da PAR-2 im gesunden Gefäß bzw. in kontraktilen SMC kaum detektierbar ist (Molino *et al.*, 1998), bei Atherosklerose (Napoli *et al.*, 2004) sowie Gefäßverletzung (Damiano *et al.*, 1999) jedoch hochreguliert wird und eine Deletion des Rezeptors zu einer reduzierten Neointima *in vivo* führt (Tennant *et al.*, 2008).

Da bei der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass FXa eigene Effekte in SMC induziert und der FXa-Effekt nicht durch den Thrombininhibitor Argatroban beeinflusst wird, stellt sich die Frage, wie sich antikoagulatorische Therapien mit Thrombininhibitoren, bei persistierender FXa-Aktivität auswirken. Im Gegensatz zu Heparinen, die Antithrombin als

Kofaktor benötigen und auch FXa hemmen (Bretschneider *et al.*, 2001), blockieren direkte Thrombininhibitoren die proteolytische Aktivität von Thrombin, ohne die Wirkung von FXa zu beeinflussen (Schrör, 2005). Direkte Thrombininhibitoren stammen entweder aus natürlichen Quellen, wie Hirudin oder werden synthetisch hergestellt, wie Bivalirudin, Argatroban und Dabigatran. Das seit Frühjahr 2008 zugelassene Dabigatran ist hierbei der erste orale synthetische Thrombininhibitor. Alle vier direkten Thrombininhibitoren können sowohl freies, als auch thrombusgebundenes Thrombin hemmen (Nowak, 2009). In einer Studie der *Direct Thrombin Inhibitor Trialists' Collaborative Group* an 35970 Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) oder perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) zeigte sich, dass im Vergleich zu Heparin, Hirudin und Bivalirudin, nicht jedoch Argatroban zu einer Verminderung von Todesfällen und Myokardinfarkten führten (2002). Ähnlich wie Heparin, führte jedoch auch Hirudin zu einer Zunahme schwerer Blutungen, was wahrscheinlich auf die quasi irreversible, hochaffine Bindung an Thrombin und die entsprechend lange Wirkungsdauer zurückzuführen ist (Schrör, 2005). Von besonderem Interesse ist daher die Entwicklung von selektiven, direkten Inhibitoren gegen FXa, da die FXa-vermittelte Thrombinbildung im Thrombus fortgesetzt sowie durch Heparine nicht inhibiert wird und sich die Wirkung von FXa-Inhibitoren somit auf den Ort der FXa- bzw. Thrombinbildung, den Prothrombinasekomplex im Thrombus konzentriert (Prager *et al.*, 1995; Schrör, 2006). Durch die Fokussierung der inhibitorischen Wirkung auf den Thrombus ist zudem eine Störung der Hämostase und damit Verlängerung der Blutungszeit wie bei Heparinen oder Hirudin nicht in gleichem Maße zu erwarten. Der bisher am weitesten entwickelte, oral verfügbare und klinisch zugelassene FXa-Inhibitor ist Rivaroxaban. Da Patienten mit ACS neben der aktivierten Thrombozytenaggregation auch eine thrombusstabilisierende Fibrinaktivierung aufweisen, sind sie eine besonders wichtige Zielgruppe für neue orale Antikoagulantien. Dosisfindungs-(Phase-II-)Studien haben für mehrere Substanzen noch keine einheitliche Risikoreduktion zeigen können. Dies hängt mit den unterschiedlichen Dosierungen der Testsubstanzen, der Kombination mit Thrombozytenaggregationshemmern und damit einhergehenden, bis zu 2-fach erhöhten Blutungsraten zusammen (Völler *et al.*, 2010). Die Phase-II-ATLAS-ACS-TIMI-46-Studie zeigte, dass bei Patienten mit ACS, die Behandlung mit Rivaroxaban, durch Wiederherstellung des Blutflusses, eine relative Risikoreduktion von 21% für den primären Wirksamkeitsendpunkt (Tod, MI, Schlaganfall oder Ischämie) und eine statistisch signifikante Risikoreduktion von 31% für den sekundären Endpunkt (Tod, MI oder Schlaganfall) bewirkte. Bei Patienten, die neben ihrer thrombozytenaggregationshemmenden Therapie mit Rivaroxaban behandelt wurden, traten dosisabhängige, klinisch signifikante Blutungsereignisse auf (Mega *et al.*, 2009). In einer klinischen Phase-III-Studie zeigte Rivaroxaban, im Vergleich zu Heparin (Enoxaparin), eine höhere Wirksamkeit bei der Vorbeugung von venösen Thromboembolien bei

Kniegelenkersatzoperationen. Zwischen beiden Therapien gab es zudem keinen signifikanten Unterschied beim Auftreten von größeren Blutungen (Perzborn *et al.*, 2007). Im Hinblick auf die Verhinderung des kombinierten Endpunkts (Beinvenenthrombosen und Mortalität), wies Rivaroxaban beim Vergleich mit Enoxaparin zudem eine höhere Wirksamkeit auf als Dabigatran. Für Apixaban, einen weiteren direkten oralen FXa-Inhibitor, konnte nach Kniegelenkersatz ebenfalls der Effektivitätsnachweis erbracht und ein Zulassungsantrag für die Prophylaxe von venösen Thromboembolien gestellt werden. Da auch für Apixaban eine Zunahme an Blutungsereignissen bei steigender Dosierung festgestellt werden konnte (Lassen *et al.*, 2007), wird der Stellenwert der neuen oralen Antikoagulanzen bei der Behandlung von ACS so lange unklar bleiben, bis die Ergebnisse der Phase-III-ATLAS-ACS-TIMI-51-Studie publiziert werden, welche den prophylaktischen Einsatz von Rivaroxaban untersucht (Völler *et al.*, 2010). In einem Kaninchenmodell konnte bereits gezeigt werden, dass Apixaban und Rivaroxaban bei gleichwertigen antithrombotischen Dosierungen, im Vergleich zu Dabigatran, weniger Blutungen aufweisen und dass alle drei Antikoagulanzen in der Vorbeugung und Behandlung von Venenthrombosen gleich wirksam sind (Wong *et al.*, 2009). Eine mögliche Erklärung für das stärkere Auftreten von Blutungen durch Dabigatran könnte sein, dass durch Apixaban und Rivaroxaban, die bereits vorhandene Thrombinkonzentration nicht beeinflusst wird und dass durch die beiden reversiblen FXa-Inhibitoren nicht die gesamte Thrombinproduktion unterdrückt wird. Die hieraus resultierenden geringen Mengen von Thrombin könnten ausreichen, um den hochaffinen PAR-1 auf Thrombozyten zu aktivieren und die Hämostase bis zu einem gewissen Grad zu erhalten.

Da FXa, unabhängig von Thrombin, u.a. inflammatorische und proliferative Prozesse in vaskulären Zellen fördert, sollte untersucht werden, wie sich die Verwendung von direkten FXa-Inhibitoren wie Rivaroxaban im Vergleich zu Thrombininhibitoren auf diese zellulären Effekte auswirkt. Hierbei wären neben klinischen Studien insbesondere experimentelle Modelle der Gefäßverletzung von Interesse. Ein Beispiel hierfür ist das Mausmodell von Sata (Sata *et al.*, 2000), bei welchem das intraluminale Einführen eines Drahtes in die Oberschenkelarterie zu Endothelverlust und bereits nach einer Woche zur Ausbildung einer Neointima führt. In diesem Modell könnte beispielsweise untersucht werden wie sich eine Behandlung mit Rivaroxaban, im Vergleich zu Argatroban, auf verschiedene Parameter wie intimale Hyperplasie, die Expression von inflammatorischen Markern oder der PAR-Rezeptoren auswirkt. Ein weiteres Einsatzgebiet für die neuen FXa-Hemmstoffe ist die Tumormetastasierung. Dies wird u.a. durch eine Studie belegt, bei der ein FXa-Inhibitor die Tumormetastasierung bereits bei solchen Konzentrationen dämpft, bei denen nur wenige antikoagulatorische Effekte auftreten (Banke *et al.*, 2005).

Beim Einsatz von Inhibitoren gegen Thrombin und/oder FXa müssten außerdem noch die Auswirkungen auf das Thrombomodulin-Protein-C-(TM-PC-)System berücksichtigt werden, da dieses durch seine antikoagulatorischen Eigenschaften die Hämostase mitmoduliert. Aktiviertes Protein C (aPC) spaltet die beiden Kofaktoren FVa und FVIIIa, so dass es zu einer Abnahme der prokoagulatorischen Kofaktoraktivitäten kommt (Dahlback *et al.*, 2005; Esmon, 2003). Zudem vermittelt aPC u.a. antiinflammatorische Effekte. Hierbei spielen PAR-1 und der, bei der aPC-abhängigen PAR-1-Aktivierung als Korezeptor fungierende EPCR (Endothelialer Protein C Rezeptor) eine wesentliche Rolle (Riewald *et al.*, 2002). Die Aktivierung von PC erfolgt durch Thrombomodulin (TM), das zuvor Thrombin bindet und dessen prokoagulatorischen Eigenschaften inhibiert (Esmon, 2003). Eine zusätzliche Aktivierung von PC erfolgt außerdem durch den konstitutiv, auch auf der Oberfläche von glatten Muskelzellen exprimierten EPCR, der PC bindet und dessen räumliche Anordnung zum gebundenen TM-Thrombin-Komplex optimiert (Bretschneider *et al.*, 2007). Da Thrombin für die Aktivierung von PC durch Thrombomodulin essentiell ist, könnte bei der Verwendung verschiedener Antikoagulantien das TM-PC-System empfindlich gestört werden. Eine Störung des TM-PC-Systems steht u.a. in engem Zusammenhang mit venösen Thrombosen und Thromboembolien (Dahlback, 1999). Aufgrund der zentralen Rolle von Thrombin beim TM-PC-System, würde ein gezielter Einsatz von selektiven, direkten FXa-Inhibitoren wahrscheinlich das geringste Risiko darstellen.

Ein weiteres wichtiges Gebiet zur Untersuchung des FXa-PAR-2-Signalweges könnten fibroproliferative Lungenerkrankungen sein, welche mit Wundheilungsstörungen assoziiert sind. PAR-2 wird gemeinsam mit PAR-1 in zahlreichen Zelltypen exprimiert, welche sich in der Lunge befinden oder nach Verletzung der Lungenflügel rekrutiert werden (Jesmin *et al.*, 2007; Miotto *et al.*, 2002). PAR-2 wird durch Trypsin, Mastzelltryptase und Trypsin-ähnliche Proteasen aktiviert und kann die Proliferation von humanen Lungenfibroblasten vermitteln (Akers *et al.*, 2000; Matsushima *et al.*, 2006). Die genaue Rolle des Rezeptors in fibroproliferativen Lungenerkrankungen ist noch unklar, obwohl PAR-2 in Asthma und Entzündungen der Luftröhre impliziert wird (Ebeling *et al.*, 2005; Schmidlin *et al.*, 2002). In einer neueren Studie konnte zudem eine gesteigerte Expression von FXa bei Lungenfibrose festgestellt werden (Scotton *et al.*, 2009). Die potentielle Regulation des pulmonaren PAR-2 durch FXa und seine Effektoren sind in diesem Zusammenhang noch unerforscht.

Die Auswirkungen von FXa-Hemmstoffen nach inhalativer Applikation auf Asthma ist ebenfalls noch unbekannt. Studien mit inhalativen Heparinen zeigen bei Asthmatikern lokale antiinflammatorische Effekte (Diamant *et al.*, 2000; Ragazzi *et al.*, 1995). Die lokale Behandlung mit FXa-Hemmstoffen könnte folglich einen neuen therapeutischen Ansatz bei asthmatischen und proliferativen Lungenerkrankungen darstellen.

5. Zusammenfassung

Aktivierter Faktor X (FXa) induziert unabhängig von Thrombin die Proliferation, Synthese der extrazellulären Matrix und Expression von inflammatorischen Genen in glatten Gefäßmuskelzellen (SMC). Diese zellulären Effekte werden über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR)-1 und PAR-2 vermittelt, wobei PAR-2, im Gegensatz zu PAR-1, nicht durch Thrombin aktiviert wird. PAR-2 zeigt nach Gefäßverletzung und bei Atherosklerose eine erhöhte Expression.

Erstmals konnte gezeigt werden, dass die PAR-2-Expression durch FXa in SMC induziert wird und dass dies mit einer verstärkten Induktion von Interleukin-6 sowie der SMC-Proliferation bei PAR-2-Aktivierung einhergeht. Der induktive FXa-Effekt bleibt auch in Gegenwart des direkten Thrombininhibitors Argatroban erhalten und wird über PAR-2 vermittelt, während PAR-1 hierbei keine Bedeutung hat.

Die FXa-induzierte PAR-2-Expression ist z.T. auf Aktivierung von NF- κ B und dessen Bindung im PAR-2-Promotor zurückzuführen. Im PAR-1-Promotor sind keine NF- κ B-Bindungsstellen vorhanden, was die selektive Wirkung von FXa auf die PAR-2-Expression erklären könnte. Ebenfalls führt FXa zur Stabilisierung von PAR-2-, jedoch nicht von PAR-1-mRNA. Dies wird über Aktivierung des mRNA-stabilisierenden *human antigen R* (HuR)-Proteins und dessen verstärkter Bindung an PAR-2-mRNA vermittelt. Dementsprechend wird die FXa-induzierte PAR-2-Expression durch Transfektion von SMC mit HuR-siRNA vollständig aufgehoben.

Sowohl NF- κ B, als auch HuR werden infolge von oxidativem Stress aktiviert, was wiederum eng mit Thrombose, Atherosklerose, intimaler Hyperplasie und einer veränderten vaskulären Genexpression verknüpft ist. Die NADPH-Oxidase ist die wichtigste Quelle für reaktive Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS) in der Gefäßwand.

Es konnte gezeigt werden, dass FXa die Aktivität der NADPH-Oxidase und Expression der katalytischen NOX-1-Untereinheit induziert, und dass NOX-1-siRNA die FXa-induzierte PAR-2-Expression vollständig aufhebt. Zudem steigert exogenes H₂O₂, ähnlich wie FXa, die PAR-2-Expression und verstärkt dessen proliferative Wirkung in SMC. Die induktive Wirkung von FXa auf PAR-2 wird durch das H₂O₂-spaltende Enzym Katalase verhindert.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die durch FXa hervorgerufene Regulation von PAR-2 durch Aktivierung der NADPH-Oxidase, NF- κ B und HuR vermittelt wird. Es könnte somit ein durch FXa spezifisch induzierter Signalweg vorliegen, der infolge der Aktivierung und verstärkten Hochregulation von PAR-2 zu proliferierenden Gefäßwandveränderungen beiträgt.

6. Summary

Activated factor X (FXa) induces proliferation, synthesis of extracellular matrix and expression of inflammatory genes in smooth muscle cells (SMC) independently of thrombin. Such actions are attributed to the protease-activated receptors (PAR)-1 and PAR-2, whereas PAR-2 unlike PAR-1 is not activated by thrombin. PAR-2 expression increases markedly in settings of vascular injury and atherosclerosis.

This study shows for the first time that FXa induces PAR-2 expression in SMC and thereby enhances induction of interleukin-6 and DNA synthesis in response to PAR-2-activation. The stimulatory action of FXa is retained in the presence of the direct thrombin-inhibitor argatroban and is mediated through activation of PAR-2, whereas PAR-1 has no role in this regard.

The regulatory action of Fxa on PAR-2 expression requires the activation of NF- κ B and its binding to the PAR-2 promotor. There are no NF- κ B binding sites in the promoter of PAR-1, which could explain the selective action of FXa on PAR-2 expression. In addition FXa slows the degradation of PAR-2 mRNA while decay of PAR-1 mRNA is not affected. This is attributed to activation of the mRNA stabilising protein human antigen R (HuR) and its enhanced binding to PAR-2 mRNA. Accordingly, siRNA against HuR completely abolishes the stimulatory effect of FXa on mRNA expression of PAR-2.

Both NF- κ B as well as HuR are activated in response to oxidative stress in numerous cell types. Oxidative stress is closely connected with thrombosis, atherosclerosis, intimal hyperplasia and altered vascular gene expression. NADPH oxidase is the most important source of reactive oxygen species (ROS) in the vascular wall.

FXa is shown here to induce activity of NADPH oxidase in SMC and to increase expression of the catalytic subunit NOX-1. Accordingly PAR-2 induction by FXa is completely abolished by NOX-1 siRNA. Moreover H₂O₂, similar to FXa, increases PAR-2 expression and enhances the mitogenic action of the receptor. The inductive effect of FXa on PAR-2 expression is abolished by the H₂O₂-disrupting enzyme catalase.

In all, these findings show that regulation of PAR-2 by FXa is mediated through activation of NADPH oxidase, NF- κ B and HuR. Thus sustained exposure of SMC to FXa is likely to induce a specific signalling pathway leading to augmented PAR-2 expression and activity relevant for the pathologic effects at SMC.

7. Literaturverzeichnis

- ABDELMOHSEN, K., KUWANO, Y., KIM, H.H. & GOROSPE, M. (2008). Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence. *Biol Chem*, **389**, 243-55.
- ABENDSCHEIN, D.R., YANG, L.Y., CHUN, J., CHO, D., SCHERRER, D. & ST PIERRE, J. (2003). Prolonged procoagulant activity on overstretch-injured coronary arteries in pigs. *J Thromb Haemost*, **1**, 836-42.
- AKERS, I.A., PARSONS, M., HILL, M.R., HOLLENBERG, M.D., SANJAR, S., LAURENT, G.J. & MCANULTY, R.J. (2000). Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **278**, L193-201.
- AMADIO, M., SCAPAGNINI, G., LAFORENZA, U., INTRIERI, M., ROMEO, L., GOVONI, S. & PASCALE, A. (2008). Post-transcriptional regulation of HSP70 expression following oxidative stress in SH-SY5Y cells: the potential involvement of the RNA-binding protein HuR. *Curr Pharm Des*, **14**, 2651-8.
- AMAN, M., HIRANO, M., KANAIDE, H. & HIRANO, K. (2010). Upregulation of Proteinase-Activated Receptor-2 and Increased Response to Trypsin in Endothelial Cells after Exposure to Oxidative Stress in Rat Aortas. *J Vasc Res*, **47**, 494-506.
- BAE, Y.S., KANG, S.W., SEO, M.S., BAINES, I.C., TEKLE, E., CHOCK, P.B. & RHEE, S.G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*, **272**, 217-21.
- BANKE, I.J., ARLT, M.J., MUELLER, M.M., SPERL, S., STEMBERGER, A., STÜRZEBECKER, J., AMIRKHOSRAVI, A., MORODER, L. & KRÜGER, A. (2005). Effective inhibition of experimental metastasis and prolongation of survival in mice by a potent factor Xa-specific synthetic serine protease inhibitor with weak anticoagulant activity. *Thromb Haemost*, **94**, 1084-93.
- BAURIEDEL, G., KANDOLF, R., WELSCH, U. & HÖFLING, B. (1994). Mechanismen der Restenosierung nach Angioplastie. *Z Kardiol*, **83 Suppl 4**, 31-41.
- BORENSZTAJN, K., PEPPELENBOSCH, M.P. & SPEK, C.A. (2008). Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends Mol Med*, **14**, 429-40.
- BRANDES, R.P. & KREUZER, J. (2005). Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res*, **65**, 16-27.
- BRENNAN, C.M. & STEITZ, J.A. (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci*, **58**, 266-77.
- BRETSCHNEIDER, E., BRAUN, M., FISCHER, A., WITTPOTH, M., GLUSA, E. & SCHRÖR, K. (2000). Factor Xa acts as a PDGF-independent mitogen in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost*, **84**, 499-505.

- BRETSCHNEIDER, E., KAUFMANN, R., BRAUN, M., WITTPOTH, M., GLUSA, E., NOWAK, G. & SCHRÖR, K. (1999). Evidence for proteinase-activated receptor-2 (PAR-2)-mediated mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, **126**, 1735-40.
- BRETSCHNEIDER, E. & SCHRÖR, K. (2001). Cellular effects of factor Xa on vascular smooth muscle cells--inhibition by heparins? *Semin Thromb Hemost*, **27**, 489-93.
- BRETSCHNEIDER, E., UZONYI, B., WEBER, A.A., FISCHER, J.W., PAPE, R., LOTZER, K. & SCHRÖR, K. (2007). Human vascular smooth muscle cells express functionally active endothelial cell protein C receptor. *Circ Res*, **100**, 255-62.
- BRUMMEL, K.E., PARADIS, S.G., BUTENAS, S. & MANN, K.G. (2002). Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood*, **100**, 148-52.
- CAMERON, A., DAVIS, K.B., GREEN, G. & SCHAFF, H.V. (1996). Coronary bypass surgery with internal-thoracic-artery grafts--effects on survival over a 15-year period. *N Engl J Med*, **334**, 216-9.
- CIRINO, G., CICALA, C., BUCCI, M., SORRENTINO, L., AMBROSINI, G., DEDOMINICIS, G. & ALTIERI, D.C. (1997). Factor Xa as an interface between coagulation and inflammation. Molecular mimicry of factor Xa association with effector cell protease receptor-1 induces acute inflammation in vivo. *J Clin Invest*, **99**, 2446-51.
- CLEMPUS, R.E., SORESCU, D., DIKALOVA, A.E., POUNKOVA, L., JO, P., SORESCU, G.P., SCHMIDT, H.H., LASSEGUE, B. & GRIENDLING, K.K. (2007). Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 42-8.
- COUGHLIN, S.R. (1999). How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11023-7.
- COX, J.L., CHIASSON, D.A. & GOTLIEB, A.I. (1991). Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries. *Prog Cardiovasc Dis*, **34**, 45-68.
- DAHLBACK, B. (1999). Activated protein C resistance and thrombosis: molecular mechanisms of hypercoagulable state due to FVR506Q mutation. *Semin Thromb Hemost*, **25**, 273-89.
- DAHLBACK, B. & VILLOUTREIX, B.O. (2005). The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett*, **579**, 3310-6.
- DAMIANO, B.P., D'ANDREA, M.R., DE GARAVILLA, L., CHEUNG, W.M. & ANDRADE-GORDON, P. (1999). Increased expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in balloon-injured rat carotid artery. *Thromb Haemost*, **81**, 808-14.
- DAVIES, M.G. & HAGEN, P.O. (1995). Pathophysiology of vein graft failure: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, **9**, 7-18.
- DE KEULENAER, G.W., ALEXANDER, R.W., USHIO-FUKAI, M., ISHIZAKA, N. & GRIENDLING, K.K. (1998). Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J*, **329** (Pt 3), 653-7.

- DENG, D.X., SPIN, J.M., TSALENKO, A., VAILAYA, A., BEN-DOR, A., YAKHINI, Z., TSAO, P., BRUHN, L. & QUERTERMOUS, T. (2006). Molecular signatures determining coronary artery and saphenous vein smooth muscle cell phenotypes: distinct responses to stimuli. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 1058-65.
- DIAMANT, Z. & PAGE, C.P. (2000). Heparin and related molecules as a new treatment for asthma. *Pulm Pharmacol Ther*, **13**, 1-4.
- DOLLER, A., AKOOL EL, S., HUWILER, A., MÜLLER, R., RADEKE, H.H., PFEILSCHIFTER, J. & EBERHARDT, W. (2008a). Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase Cdelta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA. *Mol Cell Biol*, **28**, 2608-25.
- DOLLER, A., PFEILSCHIFTER, J. & EBERHARDT, W. (2008b). Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cell Signal*, **20**, 2165-73.
- DTITC GROUP (2002). Direct thrombin inhibitors in acute coronary syndromes: principal results of a meta-analysis based on individual patients' data. *Lancet*, **359**, 294-302.
- EBELING, C., FORSYTHE, P., NG, J., GORDON, J.R., HOLLENBERG, M. & VLIAGOFTIS, H. (2005). Proteinase-activated receptor 2 activation in the airways enhances antigen-mediated airway inflammation and airway hyperresponsiveness through different pathways. *J Allergy Clin Immunol*, **115**, 623-30.
- EBERHARDT, W., DOLLER, A., AKOOL EL, S. & PFEILSCHIFTER, J. (2007). Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther*, **114**, 56-73.
- ESMON, C.T. (2003). The protein C pathway. *Chest*, **124**, 26S-32S.
- FALLIER-BECKER, P., RUPP, J., FINGERLE, J. & BETZ, E. (1990). Smooth muscle cells from rabbit aorta. In *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*. ed Piper, H. pp. 247-270. Berlin/Heidelberg/New York: Springer Verlag.
- FAN, X.C. & STEITZ, J.A. (1998). HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15293-8.
- FITZGIBBON, G.M., KAFKA, H.P., LEACH, A.J., KEON, W.J., HOOPER, G.D. & BURTON, J.R. (1996). Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J Am Coll Cardiol*, **28**, 616-26.
- FORRESTER, J.S., FISHBEIN, M., HELFANT, R. & FAGIN, J. (1991). A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol*, **17**, 758-69.
- FORTUNO, A., SAN JOSE, G., MORENO, M.U., DIEZ, J. & ZALBA, G. (2005). Oxidative stress and vascular remodelling. *Exp Physiol*, **90**, 457-62.
- GHIGLIOTTI, G., WAISSBLUTH, A.R., SPEIDEL, C., ABENDSCHEIN, D.R. & EISENBERG, P.R. (1998). Prolonged activation of prothrombin on the vascular wall after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 250-7.

- GILMORE, T.D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, **25**, 6680-4.
- GRIENDLING, K.K., MINIERI, C.A., OLLERENSHAW, J.D. & ALEXANDER, R.W. (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **74**, 1141-8.
- GRIENDLING, K.K., SORESCU, D., LASSEGUE, B. & USHIO-FUKAI, M. (2000). Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 2175-83.
- HARRISON, D.G., CAI, H., LANDMESSER, U. & GRIENDLING, K.K. (2003). Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, **4**, 51-61.
- HERKERT, O., DIEBOLD, I., BRANDES, R.P., HESS, J., BUSSE, R. & GORLACH, A. (2002). NADPH oxidase mediates tissue factor-dependent surface procoagulant activity by thrombin in human vascular smooth muscle cells. *Circulation*, **105**, 2030-6.
- HERKERT, O., DJORDJEVIC, T., BELAIBA, R.S. & GORLACH, A. (2004). Insights into the redox control of blood coagulation: role of vascular NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the thrombogenic cycle. *Antioxid Redox Signal*, **6**, 765-76.
- HEZI-YAMIT, A., WONG, P.W., BIEN-LY, N., KOMUVES, L.G., PRASAD, K.S., PHILLIPS, D.R. & SINHA, U. (2005). Synergistic induction of tissue factor by coagulation factor Xa and TNF: evidence for involvement of negative regulatory signaling cascades. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 12077-82.
- HINOKIYAMA, K., VALEN, G., TOKUNO, S., VEDIN, J.B. & VAAGE, J. (2006). Vein graft harvesting induces inflammation and impairs vessel reactivity. *Ann Thorac Surg*, **82**, 1458-64.
- HOFFMAN, M. & MONROE, D.M., 3RD (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*, **85**, 958-65.
- IMAGAWA, S., YAMAMOTO, M., UEDA, M. & MIURA, Y. (1996). Erythropoietin gene expression by hydrogen peroxide. *Int J Hematol*, **64**, 189-95.
- JESMIN, S., GANDO, S., ZAEDI, S. & SAKURAYA, F. (2007). Differential expression, time course and distribution of four PARs in rats with endotoxin-induced acute lung injury. *Inflammation*, **30**, 14-27.
- KAISER, B. (2003). DX-9065a, a direct inhibitor of factor Xa. *Cardiovasc Drug Rev*, **21**, 91-104.
- KARIN, M. & BEN-NERIAH, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*, **18**, 621-63.
- KRANZHOFFER, R., CLINTON, S.K., ISHII, K., COUGHLIN, S.R., FENTON, J.W., 2ND & LIBBY, P. (1996). Thrombin potently stimulates cytokine production in human vascular smooth muscle cells but not in mononuclear phagocytes. *Circ Res*, **79**, 286-94.
- KRUPICZOJC, M.A., SCOTTON, C.J. & CHAMBERS, R.C. (2008). Coagulation signalling following tissue injury: focus on the role of factor Xa. *Int J Biochem Cell Biol*, **40**, 1228-37.

- KUWANO, Y., KIM, H.H., ABDELMOHSEN, K., PULLMANN, R., JR., MARTINDALE, J.L., YANG, X. & GOROSPE, M. (2008). MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90. *Mol Cell Biol*, **28**, 4562-75.
- LANDRY, D.B., COUPER, L.L., BRYANT, S.R. & LINDNER, V. (1997). Activation of the NF-kappa B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Pathol*, **151**, 1085-95.
- LASSEGUE, B. & CLEMPUS, R.E. (2003). Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **285**, R277-97.
- LASSEGUE, B., SORESCU, D., SZOCS, K., YIN, Q., AKERS, M., ZHANG, Y., GRANT, S.L., LAMBETH, J.D. & GRIENDLING, K.K. (2001). Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*, **88**, 888-94.
- LASSEN, M.R., DAVIDSON, B.L., GALLUS, A., PINEO, G., ANSELL, J. & DEITCHMAN, D. (2007). The efficacy and safety of apixaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, as thromboprophylaxis in patients following total knee replacement. *J Thromb Haemost*, **5**, 2368-75.
- LI, W.G., MILLER, F.J., JR., ZHANG, H.J., SPITZ, D.R., OBERLEY, L.W. & WEINTRAUB, N.L. (2001). H(2)O(2)-induced O(2) production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J Biol Chem*, **276**, 29251-6.
- LIM, S.Y., TENNANT, G.M., KENNEDY, S., WAINWRIGHT, C.L. & KANE, K.A. (2006). Activation of mouse protease-activated receptor-2 induces lymphocyte adhesion and generation of reactive oxygen species. *Br J Pharmacol*, **149**, 591-9.
- LOOP, F.D. (1996). Internal-thoracic-artery grafts. Biologically better coronary arteries. *N Engl J Med*, **334**, 263-5.
- MACFARLANE, S.R., SEATTER, M.J., KANKE, T., HUNTER, G.D. & PLEVIN, R. (2001). Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*, **53**, 245-82.
- MACKMAN, N., TILLEY, R.E. & KEY, N.S. (2007). Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 1687-93.
- MARUTSUKA, K., HATAKEYAMA, K., YAMASHITA, A. & ASADA, Y. (2005). Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, **12**, 1-8.
- MATSUSHIMA, R., TAKAHASHI, A., NAKAYA, Y., MAEZAWA, H., MIKI, M., NAKAMURA, Y., OHGUSHI, F. & YASUOKA, S. (2006). Human airway trypsin-like protease stimulates human bronchial fibroblast proliferation in a protease-activated receptor-2-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **290**, L385-95.
- MEGA, J.L., BRAUNWALD, E., MOHANAVELU, S., BURTON, P., POULTER, R., MISSELWITZ, F., HRICAK, V., BARNATHAN, E.S., BORDES, P., WITKOWSKI, A., MARKOV, V., OPPENHEIMER, L. & GIBSON, C.M. (2009). Rivaroxaban versus placebo in patients with

- acute coronary syndromes (ATLAS ACS-TIMI 46): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet*, **374**, 29-38.
- MIOTTO, D., HOLLENBERG, M.D., BUNNETT, N.W., PAPI, A., BRACCIONI, F., BOSCHETTO, P., REA, F., ZUIN, A., GEPPETTI, P., SAETTA, M., MAESTRELLI, P., FABBRI, L.M. & MAPP, C.E. (2002). Expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in central airways of smokers and non-smokers. *Thorax*, **57**, 146-51.
- MISQUITTA, C.M., IYER, V.R., WERSTIUK, E.S. & GROVER, A.K. (2001). The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology. *Mol Cell Biochem*, **224**, 53-67.
- MOLINO, M., RAGHUNATH, P.N., KUO, A., AHUJA, M., HOXIE, J.A., BRASS, L.F. & BARNATHAN, E.S. (1998). Differential expression of functional protease-activated receptor-2 (PAR-2) in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 825-32.
- MONNO, R., GRANDALIANO, G., FACCIO, R., RANIERI, E., MARTINO, C., GESUALDO, L. & SCHENA, F.P. (2001). Activated coagulation factor X: a novel mitogenic stimulus for human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*, **12**, 891-9.
- MOSESSON, M.W. (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*, **3**, 1894-904.
- MURRAY, C.J. & LOPEZ, A.D. (1997). Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, **349**, 1498-504.
- NAPOLI, C., DE NIGRIS, F., WALLACE, J.L., HOLLENBERG, M.D., TAJANA, G., DE ROSA, G., SICA, V. & CIRINO, G. (2004). Evidence that protease activated receptor 2 expression is enhanced in human coronary atherosclerotic lesions. *J Clin Pathol*, **57**, 513-6.
- NGUYEN, K.T., FRYE, S.R., ESKIN, S.G., PATTERSON, C., RUNGE, M.S. & MCINTIRE, L.V. (2001). Cyclic strain increases protease-activated receptor-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **38**, 1038-43.
- NOWAK, G. (2009). Neue Antikoagulanzen der sekundären Hämostase - Anti-IIa-Inhibitoren. *Hamostaseologie*, **29**, 256-9.
- PATTERSON, C., RUEF, J., MADAMANCHI, N.R., BARRY-LANE, P., HU, Z., HORAIST, C., BALLINGER, C.A., BRASIER, A.R., BODE, C. & RUNGE, M.S. (1999). Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, **274**, 19814-22.
- PATTERSON, C., STOUFFER, G.A., MADAMANCHI, N. & RUNGE, M.S. (2001). New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology. *Circ Res*, **88**, 987-97.
- PERZBORN, E., KUBITZA, D. & MISSELWITZ, F. (2007). Rivaroxaban. A novel, oral, direct factor Xa inhibitor in clinical development for the prevention and treatment of thromboembolic disorders. *Hamostaseologie*, **27**, 282-9.
- PRAGER, N.A., ABENDSCHEIN, D.R., MCKENZIE, C.R. & EISENBERG, P.R. (1995). Role of thrombin compared with factor Xa in the procoagulant activity of whole blood clots. *Circulation*, **92**, 962-7.

- PUEYO, M.E., GONZALEZ, W., NICOLETTI, A., SAVOIE, F., ARNAL, J.F. & MICHEL, J.B. (2000). Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 645-51.
- PULLMANN, R., JR., JUHASZOVA, M., LOPEZ DE SILANES, I., KAWAI, T., MAZAN-MAMCZARZ, K., HALUSHKA, M.K. & GOROSPE, M. (2005). Enhanced proliferation of cultured human vascular smooth muscle cells linked to increased function of RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*, **280**, 22819-26.
- RAGAZZI, E. & CHINELLATO, A. (1995). Heparin: pharmacological potentials from atherosclerosis to asthma. *Gen Pharmacol*, **26**, 697-701.
- RAUCH, B.H., BRETSCHNEIDER, E., BRAUN, M. & SCHRÖR, K. (2002). Factor Xa releases matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) from human vascular smooth muscle cells and stimulates the conversion of pro-MMP-2 to MMP-2: role of MMP-2 in factor Xa-induced DNA synthesis and matrix invasion. *Circ Res*, **90**, 1122-7.
- RAUCH, B.H., MILLETTE, E., KENAGY, R.D., DAUM, G. & CLOWES, A.W. (2004). Thrombin- and factor Xa-induced DNA synthesis is mediated by transactivation of fibroblast growth factor receptor-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **94**, 340-5.
- RAUCH, B.H., MILLETTE, E., KENAGY, R.D., DAUM, G., FISCHER, J.W. & CLOWES, A.W. (2005). Syndecan-4 is required for thrombin-induced migration and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **280**, 17507-11.
- RAUCH, B.H., WEBER, A., BRAUN, M., ZIMMERMANN, N. & SCHRÖR, K. (2000). PDGF-induced Akt phosphorylation does not activate NF-kappa B in human vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *FEBS Lett*, **481**, 3-7.
- RIEWALD, M., PETROVAN, R.J., DONNER, A., MUELLER, B.M. & RUF, W. (2002). Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science*, **296**, 1880-2.
- ROSENKRANZ, A.C., RAUCH, B.H., FREIDEL, K. & SCHRÖR, K. (2009). Regulation of protease-activated receptor-1 by vasodilatory prostaglandins via NFAT. *Cardiovasc Res*, **83**, 778-84.
- ROSS, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, **340**, 115-26.
- ROSS, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, **362**, 801-9.
- ROVIEZZO, F., BUCCI, M., BRANCALEONE, V., DI LORENZO, A., GEPPETTI, P., FARNETI, S., PARENTE, L., LUNGARELLA, G., FIORUCCI, S. & CIRINO, G. (2005). Proteinase-activated receptor-2 mediates arterial vasodilation in diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 2349-54.
- SAIKI, I., BUCANA, C.D., TSAO, J.Y. & FIDLER, I.J. (1986). Quantitative fluorescent microassay for identification of antiproliferative compounds. *J Natl Cancer Inst*, **77**, 1235-40.
- SATA, M., MAEJIMA, Y., ADACHI, F., FUKINO, K., SAIURA, A., SUGIURA, S., AOYAGI, T., IMAI, Y., KURIHARA, H., KIMURA, K., OMATA, M., MAKUUCHI, M., HIRATA, Y. & NAGAI, R. (2000).

- A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol*, **32**, 2097-104.
- SATO, M., KAWAI-KOWASE, K., SATO, H., OYAMA, Y., KANAI, H., OHYAMA, Y., SUGA, T., MAENO, T., AOKI, Y., TAMURA, J., SAKAMOTO, H., NAGAI, R. & KURABAYASHI, M. (2005). c-Src and hydrogen peroxide mediate transforming growth factor-beta1-induced smooth muscle cell-gene expression in 10T1/2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 341-7.
- SCHMIDLIN, F., AMADESI, S., DABBAGH, K., LEWIS, D.E., KNOTT, P., BUNNETT, N.W., GATER, P.R., GEPPETTI, P., BERTRAND, C. & STEVENS, M.E. (2002). Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *J Immunol*, **169**, 5315-21.
- SCHRÖR, K. (2006). Hämostase und Antithrombotika. *Hämostaseologie*, **26**, 104-5.
- SCHRÖR, K. (2005). Hämostaseologie. *Internist*, **46**, 873-881.
- SCHRÖR, K., BRETSCHNEIDER, E., FISCHER, K., FISCHER, J.W., PAPE, R., RAUCH, B.H., ROSENKRANZ, A.C. & WEBER, A.A. (2010). Thrombin receptors in vascular smooth muscle cells - function and regulation by vasodilatory prostaglandins. *Thromb Haemost*, **103**, 884-90.
- SCOTTON, C.J., KRUPICZOJC, M.A., KÖNIGSHOFF, M., MERCER, P.F., LEE, Y.C., KAMINSKI, N., MORSE, J., POST, J.M., MAHER, T.M., NICHOLSON, A.G., MOFFATT, J.D., LAURENT, G.J., DERIAN, C.K., EICKELBERG, O. & CHAMBERS, R.C. (2009). Increased local expression of coagulation factor X contributes to the fibrotic response in human and murine lung injury. *J Clin Invest*, **119**, 2550-63.
- SEINO, Y., IKEDA, U., IKEDA, M., YAMAMOTO, K., MISAWA, Y., HASEGAWA, T., KANO, S. & SHIMADA, K. (1994). Interleukin 6 gene transcripts are expressed in human atherosclerotic lesions. *Cytokine*, **6**, 87-91.
- SENDEN, N.H., JEUNHOMME, T.M., HEEMSKERK, J.W., WAGENVOORD, R., VAN'T VEER, C., HEMKER, H.C. & BUURMAN, W.A. (1998). Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells. *J Immunol*, **161**, 4318-24.
- SOKOLOVA, E., GRISHINA, Z., BÜHLING, F., WELTE, T. & REISER, G. (2005). Protease-activated receptor-1 in human lung fibroblasts mediates a negative feedback downregulation via prostaglandin E2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **288**, L793-802.
- SOKOLOVA, E., HARTIG, R. & REISER, G. (2008). Downregulation of protease-activated receptor-1 in human lung fibroblasts is specifically mediated by the prostaglandin E receptor EP2 through cAMP elevation and protein kinase A. *FEBS J*, **275**, 3669-79.
- STASSEN, J.M., ARNOUT, J. & DECKMYN, H. (2004). The hemostatic system. *Curr Med Chem*, **11**, 2245-60.
- SZOC, K., LASSEGUE, B., SORESCU, D., HILENSKI, L.L., VALPPU, L., COUSE, T.L., WILCOX, J.N., QUINN, M.T., LAMBETH, J.D. & GRIENDLING, K.K. (2002). Upregulation of Nox-

- based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **22**, 21-7.
- TENNANT, G.M., WADSWORTH, R.M. & KENNEDY, S. (2008). PAR-2 mediates increased inflammatory cell adhesion and neointima formation following vascular injury in the mouse. *Atherosclerosis*, **198**, 57-64.
- TOKUNOU, T., ICHIKI, T., TAKEDA, K., FUNAKOSHI, Y., IINO, N. & TAKESHITA, A. (2001). cAMP response element-binding protein mediates thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 1764-9.
- TRAYNELIS, S.F. & TREJO, J. (2007). Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. *Curr Opin Hematol*, **14**, 230-5.
- TREJO, J. (2003). Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *J Pharmacol Exp Ther*, **307**, 437-42.
- TSAO, P., CAO, T. & VON ZASTROW, M. (2001). Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **22**, 91-6.
- VAN DER MERWE, J.Q., MOREAU, F. & MACNAUGHTON, W.K. (2009). Protease-activated receptor-2 stimulates intestinal epithelial chloride transport through activation of PLC and selective PKC isoforms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **296**, G1258-66.
- VENDROV, A.E., HAKIM, Z.S., MADAMANCHI, N.R., ROJAS, M., MADAMANCHI, C. & RUNGE, M.S. (2007). Atherosclerosis is attenuated by limiting superoxide generation in both macrophages and vessel wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 2714-21.
- VERSTEEG, H.H., SCHAFFNER, F., KERVER, M., ELLIES, L.G., ANDRADE-GORDON, P., MUELLER, B.M. & RUF, W. (2008). Protease-activated receptor (PAR) 2, but not PAR1, signaling promotes the development of mammary adenocarcinoma in polyoma middle T mice. *Cancer Res*, **68**, 7219-27.
- VÖLLER, H., ALBAN, S. & WESTERMANN, D. (2010). Neue orale Antikoagulantien: Werden sie die Vitamin-K-Antagonisten verdrängen? *Der Internist*, **Sep 2**. [Epub ahead of print].
- WANG, Z., CASTRESANA, M.R. & NEWMAN, W.H. (2004). Reactive oxygen species-sensitive p38 MAPK controls thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, **36**, 49-56.
- WANG, Z. & NEWMAN, W.H. (2003). Smooth muscle cell migration stimulated by interleukin 6 is associated with cytoskeletal reorganization. *J Surg Res*, **111**, 261-6.
- WEST, N., GUZIK, T., BLACK, E. & CHANNON, K. (2001). Enhanced superoxide production in experimental venous bypass graft intimal hyperplasia: role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 189-94.
- WILSON, S.H., BEST, P.J., EDWARDS, W.D., HOLMES, D.R., JR., CARLSON, P.J., CELERMAJER, D.S. & LERMAN, A. (2002). Nuclear factor-kappaB immunoreactivity is present in human coronary plaque and enhanced in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis*, **160**, 147-53.

- WINER, J., JUNG, C.K., SHACKEL, I. & WILLIAMS, P.M. (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem*, **270**, 41-9.
- WONG, P.C., CRAIN, E.J., WATSON, C.A. & XIN, B. (2009). Favorable therapeutic index of the direct factor Xa inhibitors, apixaban and rivaroxaban, compared with the thrombin inhibitor dabigatran in rabbits. *J Thromb Haemost*, **7**, 1313-20.
- YAMASAKI, K., ASAI, T., SHIMIZU, M., AOKI, M., HASHIYA, N., SAKONJO, H., MAKINO, H., KANEDA, Y., OGIHARA, T. & MORISHITA, R. (2003). Inhibition of NFkappaB activation using cis-element 'decoy' of NFkappaB binding site reduces neointimal formation in porcine balloon-injured coronary artery model. *Gene Ther*, **10**, 356-64.

8. Veröffentlichungen

8.1. Kongressbeiträge

Jobi K., Dangwal S., Rauch B., Schrör K., Rosenkranz A.C.

Modulation of NADPH oxidase subunit mRNA expression by activated factor X and high glucose in human vascular smooth muscle cells

Hämostaseologie **28** (2008)

52. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Wiesbaden, Februar 2008

Jobi K., Rauch B., Schrör K., Rosenkranz A.C.

Activated factor X (FXa) alters NADPH oxidase subunit expression in human vascular smooth muscle cells

Naunyn-Schmiedeberger's Archives of Pharmacology **377** Suppl 1 (2008)

49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 2008

Jobi K., Rauch B., Schrör K., Rosenkranz A.C.

Pro-oxidant action of activated factor X (FXa) in human vascular smooth muscle cells

Hämostaseologie **29** (2009)

53. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Wien, Februar 2009 (Nominiert unter den 8 besten Postern in der Kategorie *basic research*)

Dangwal S., **Jobi K.**, Rauch B., Schrör K., Rosenkranz A.C.

Increased expression of protease-activated receptor-4 in human vascular smooth muscle cells in response to high glucose

Naunyn-Schmiedeberger's Archives of Pharmacology **379** Suppl 1 (2009)

50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 2009

Jobi K., Rauch B., Schrör K., Rosenkranz A.C.

Pro-oxidant action of activated factor X (FXa) in human vascular smooth muscle cells

Naunyn-Schmiedeberger's Archives of Pharmacology **379** Suppl 1 (2009)

50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 2009

Jobi K., Rauch B., Schrör K., Rosenkranz A.C.

Activated factor X induces oxidative stress in human vascular smooth muscle cells

New Drugs in Cardiovascular Research

Joint Meeting of the German Societies for Pharmacology and Clinical Pharmacology and the British Pharmacological Society, Dresden, Mai 2009

Jobi K., Rauch B., Schrör K., Rosenkranz A.C.

Redox-dependent regulation of human protease-activated receptor-2 by activated factor X

Naunyn-Schmiedeberger's Archives of Pharmacology **381** Suppl 1 (2010)

51. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, März 2010

8.2. Publikationen in Fachzeitschriften

Jobi K., Rauch B., Freidel F., Schrör K., Rosenkranz A.C.

Redox-dependent regulation of human protease-activated receptor-2 by activated factor X
(Eingereicht zur Veröffentlichung)

Rosenkranz A.C., Dangwal S., **Jobi K.**, Rauch B., Doller A., Eberhardt W., Schrör K.

Redox-dependent regulation of vascular protease-activated receptor 4 via the mRNA stabilising protein HuR

(Manuskript in Vorbereitung)

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich herzlich für die anregenden Diskussionen und Ratschläge, welche eine zielgerichtete Durchführung der Promotion gewährleisteten. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme an verschiedenen Kongressen und die damit verbundene großzügige Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Peter Proksch danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Frau Dr. Anke C. Rosenkranz möchte ich herzlich dafür danken, dass sie stets bereit war Fragen jeglicher Art zu beantworten und nie die Geduld mit mir verloren hat. Durch ihre freundliche und fachliche Unterstützung war eine erfolgreiche Durchführung der Promotion gewährleistet.

Herrn PD Dr. Bernhard Rauch danke ich für die stets freundliche Unterstützung in methodischen sowie theoretischen Fragen.

Frau Kerstin Freidel danke ich besonders für ihre freundliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor. Für die stetige Hilfsbereitschaft in experimentellen Fragen möchte ich zudem Frau Bärbel Reupert danken.

Frau Petra Kuger danke ich für die freundliche technische Assistenz sowie die Unterstützung beim Erstellen von Abbildungen.

Frau Beate Weyrauther danke ich für die stetige Versorgung mit Zellen und ihre fortwährende Hilfsbereitschaft bei Zellkultur-Experimenten.

Frau Erika Lohmann und Frau Karin Montag möchte ich für die freundliche Unterstützung in organisatorischen Belangen, besonders im Hinblick auf die verschiedenen Dienstreisen danken.

Allen Kollegen danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Institut, die stetige Hilfsbereitschaft und die diversen lustigen Abende außerhalb des Instituts.

Meinen Eltern danke ich für ihre fortwährende Unterstützung sowie für die Regulation von Faktoren bezüglich meines Haushalts.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie der Forschungskommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

10. Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den 19.11.2010

11. Lebenslauf**Person:**

Name: Klaus Jobi
Geburtsdatum: 17.08.1979
Geburtsort: Leverkusen

Promotion:

Seit 04/2007 Promotion unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör
Inhaltliche Betreuung durch Frau Dr. Anke C. Rosenkranz
am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie,
Universitätsklinikum Düsseldorf

Studium:

10/2000-01/2007 Studium der Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität zu Köln
Diplomarbeit: Molekulargenetische Analyse der Segmentierung in der
mittelamerikanischen Wanderspinnne *Cupiennius salei*

Geleistete Dienste:

08/1999-06/2000 Zivildienst im Evangelischen Tagungs- und Freizeitzentrum
Hasensprungmühle in Leichlingen

Schule:

1990-1999 Gymnasium und Abitur am Städtischen Gymnasium in Leichlingen
1989-1990 Gemeinschaftsgrundschule Uferstraße in Leichlingen
1986-1989 Gemeinschaftsgrundschule Theodor Fontane in Leverkusen