



**Thrombin- vermittelte Regulation der Protease- aktivierten
Rezeptoren und des Sphingosin-1-Phosphat-Signalsystems**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Swen Ermler
aus Viersen

Düsseldorf, September 2011

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. Bernhard Rauch
Korreferent: Prof. Dr. Martin Beye

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2011

Abkürzungsverzeichnis**A**

A549	<i>human alveolar adenocarcinoma cell line</i>
A. dest	<i>Aqua destillata</i>
Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	<i>One-Way Analysis of Variance</i>
AP	Aktivierendes Peptid
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumpersulfat
AREs	AU-reiche Sequenzmotive

B

BSA	Bovines Serumalbumin
-----	----------------------

C

cDNA	<i>complementary DNA</i>
Ci	Curie

D

DMEM	Dulbecco's <i>modified Eagle</i> Medium
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELAV	<i>embryonic lethal abnormal vision</i>

F

FXa	Aktivierter Faktor X
-----	----------------------

FCS	Fetales Kälberserum
FcεR1	FC epsilon Rezeptor 1
FcγR1	FC gamma Rezeptor 1
G	
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H	
H	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperanzinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HuR	<i>human antigen R</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
I	
IgG	Immunglobulin G
Ip	Immunpräzipitation
K	
kDa	Kilodalton
L	
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LPA	Lipoprotein A
M	
m	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
O	
OD	optische Dichte
P	
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PDGF	platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvynilidenfluorid
Q	
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT.	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
S	
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMC	<i>smooth muscle cells</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SPHK-1	Sphingosin Kinase 1
SPHK-2	Sphingosin Kinase 2
T	
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TF	<i>tissue factor</i>
TM	Thrombomodulin
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Tween TM -20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat

TXA₂ Thromboxan A2

U

U *Unit*

üN über Nacht

UTR Untranslatierte Region

V

VEGF *vascular endothelial growth factor*

vsrc sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) *viral oncogene homolog (avian)*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Glatte Gefäßmuskelzellen (<i>vascular smooth muscle cells</i> , SMC).....	1
1.2 Atherosklerose.....	1
1.3 Thrombin	3
1.4 Hämostase und physiologische Bedeutung von Thrombin.....	3
1.5 Antikoagulanzen	5
1.6 Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs)	6
1.7 Sphingosinkinase	9
1.8 Sphingosin-1-Phosphat	10
1.9 Posttranskriptionelle Genregulation durch HuR	11
1.10 Zielsetzung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Substanzen	13
2.2 Puffer und Lösungen	14
2.3 Antikörper	15
2.4 Geräte und Materialien	16
2.5 Zellkultur.....	17
2.5.2 Isolierung und Kultivierung humaner glatter Gefäßmuskelzellen	17
2.6 Präparation von Gesamt-RNA aus SMC.....	18
2.6.2 Quantifizierung von RNA.....	18
2.7 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	19
2.7.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	19
2.8 siRNA-vermitteltes Gen- <i>silencing</i>	21
2.9 Zellfraktionierung	21
2.10 HuR-Translokationsstudie (<i>HuR-Shuttling</i>)	22
2.11 Immunpräzipitations (<i>Pull-down</i>)-PCR	22
2.12 Proteinbestimmung nach Bradford.....	23
2.13 Immunologische Nachweise von Proteinen.....	23
2.13.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	23
2.13.3 Proteinauftrennung mittels SDS-Page.....	24
2.13.4 Proteintransfer auf PVDF-Membranen	24
2.13.5 Immunodetektion (Westernblot)	24
2.13.6 Densitometrische Auswertung.....	25
2.13.7 <i>Strippen</i> von PVDF- Membranen	25

2.14 Durchflusszytometrie	26
2.15 Bestimmung der Migration - „Scratch-Assay“	26
2.16 Bestimmung der Proliferationsrate von humanen SMC.....	27
2.17 Bestimmung der DNA-Syntheserate von humanen SMC	27
2.18 Immunhistochemie.....	28
2.19 Öl Rot Färbung von Lipidablagerungen in Mauseorten	28
2.20 Statistik.....	29
3. Ergebnisse.....	30
3.1 SPHK-1 Expression in humanen Carotis Plaques.....	30
3.1.2 Thrombin induziert selektiv die Expression der SPHK-1 mRNA	32
3.1.3 Konzentrations- Wirkungsbeziehung der Thrombin-regulierten SPHK1 Regulation	34
3.1.4 Thrombin induzierte SPHK-1 Protein Expression.....	35
3.1.5 Die Induktion der SPHK-1 wird selektiv über den PAR-1 vermittelt	36
3.2 Überprüfung der SPHK-1 Expression in Plaques von murinen Aortenursprüngen	37
3.2.2 Einfluss von Dabigatran auf die SPHK-1 Expression in ApoE -/- Mäusen	38
3.3 Posttranskriptionelle Regulation der SPHK-1 durch mRNA-Stabilisierung	40
3.3.2 HuR Translokation	41
3.3.3 HuR Knockdown	42
3.3.4 Einfluss von HuR auf die SPHK-1 Expression.....	43
3.4 Einfluss von endogenem Thrombin auf die DNA Neusynthese in humanen SMC	45
3.4.2 Einfluss von Thrombin auf das Proliferationsverhalten von SMC im Hinblick auf die SPHK-1 Expression	47
3.4.3 Einfluss von Thrombin auf das Migrationsverhalten von humanen SMC	50
3.4.4 Einfluss von Dabigatran auf die Plaque Entwicklung in Mauseorten	52
3.5 Einfluss von S1P auf die mRNA Expression der PAR-Rezeptoren	53
3.5.2 Einfluss von S1P auf die Protein- und Oberflächenexpression von PAR-2.....	54
3.5.3 Einfluss von Thrombin auf die Regulation der PAR Rezeptoren.....	55
3.5.4 Einfluss von Thrombin auf die Regulation des PAR-2 Rezeptors	56
3.5.5 Einfluss der Thrombin induzierten SPHK-1 auf die PAR-2 Regulation	57
3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse	58
4. Diskussion	59
4.1 SPHK-1 Regulation durch Thrombin.....	59
4.2 Posttranskriptionelle Regulation der SPHK-1 durch mRNA Stabilisierung	62
4.3 Funktionelle Konsequenzen der Thrombininduzierten SPHK-1 Erhöhung in SMC	64
4.4 Einfluss von S1P auf die PAR Rezeptoren	66
4.5 Einfluss von Thrombin auf die PAR Rezeptoren	67

4.6. Ausblick	68
5. Zusammenfassung	70
6. Summary	71
7. Literaturverzeichnis	72
8. Veröffentlichungen	82
8.1 Kongressbeiträge	82
8.2 Publikationen in Fachzeitschriften.....	83
8.3 Auszeichnungen	83
9. Danksagung.....	84
10. Eidesstattliche Erklärung.....	85
11. Lebenslauf	86

1. Einleitung

1.1 Glatte Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells, SMC*)

SMC sind hochspezialisierte Zellen, deren wichtigste Funktion ihre Fähigkeit zur Kontraktion ist. Adulte ausdifferenzierte SMC weisen einen ruhenden Phänotyp auf (Owens, 1995). Erst nach einer Verletzung oder Exposition gegenüber einem entzündlichen Stimulus sind sie in der Lage in den sogenannten sekretorischen Phänotyp (s.u.) zu wechseln (Mack, 2011). Dieser zeichnet sich durch eine vermehrte Zellteilung (Proliferation) und die Fähigkeit zur Zellwanderung (Migration) aus. Durch Kontraktion und Relaxation beeinflussen die SMC den Gefäßdurchmesser und regulieren den Blutdruck in den Gefäßen. Der Großteil aller SMC im adulten Organismus liegt im kontraktiven Phänotyp vor. Bei der Neubildung von Gefäßen (Angiogenese), aber auch im Rahmen der Pathophysiologie von Gefäßerkrankungen spielt der sekretorische Phänotyp der SMC eine grundlegende Rolle (Owens *et al.*, 2004). Er ermöglicht eine erhöhte Proliferation, Migration sowie Produktion und Sekretion matrixbildender Komponenten und prokoagulatorische- als auch proinflammatorischer Substanzen. Dieser Phänotyp kann durch verschiedene Mediatoren induziert werden. Lange Zeit wurde angenommen, dass sich SMC uniform vom kontraktiven in den sekretorischen Zelltypen wandeln. Jedoch können SMC durch Differenzierung auch diverse intermediäre Phänotypen annehmen (Rensen *et al.*, 2007). Neben ihrer Funktion in der Angiogenese haben SMC des sekretorischen Phänotyps auch eine fundamentale Funktion in der Atherosklerose. Hier finden sie sich sehr häufig in atherosklerotischen Plaques (Ross, 1999). Wie Abb.1.1 zeigt, bilden SMC nach Gefäßverletzung die so genannte fibrotische Kappe, die den nekrotischen Kern abschirmt und das Plaque stabilisiert.

1.2 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine inflammatorische Erkrankung der Gefäße, die in ihrer Folge zu schwerwiegenden koronaren Erkrankungen bis hin zum plötzlichen Herztod führen kann. Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in den USA, Europa und in großen Teilen Asiens (Ross, 1999). Zahlreiche pathophysiologische Beobachtungen führten zur sogenannten *response to injury* Hypothese wobei als initialer Auslöser der Atherosklerose von einer endothelialen Dysfunktion ausgegangen wird. Hierbei handelt es sich um eine chemisch wie morphologisch messbare Störung der Endothelfunktion (Kelm *et al.*, 1999). Infolge dieser Störung erhöht sich die

Endothelzellpermeabilität und es folgt eine subendotheliale Migration von Monozyten und Leukozyten an den Ort der Läsion. Eine weitere Folge ist eine inflammatorische Infiltration der Gefäßwand durch Lipide und die Aktivierung von kontraktile SMC, welche ihren Phänotyp in Richtung sekretorische SMC verändern. Dies führt zur Entstehung eines atherosklerotischen Plaques. Durch eine fibröse Kappe wird dieses Plauegewebe von äußeren Einflüssen abgeschirmt und eine Adhäsion von Thrombozyten verhindert. Eine Verletzung am atherosklerotischen Plaque initiiert die Thrombinbildung und Plättchenadhäsion, was einen akuten Gefäßverschluss zur Folge haben kann (Abb.1.1) (Stary, 2000). Mögliche Ursachen der endothelialen Funktionsstörung und einer daraus resultierenden Atherosklerose umfassen erhöhtes und modifiziertes *Low Density Lipoprotein* (LDL); eine z.B. durch Zigarettenrauch verursachte, erhöhte Entstehung freier Radikale, Bluthochdruck und Diabetes mellitus; genetische Veränderungen; erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Plasma, humanpathogene Mikroorganismen und eine Vielzahl weiterer Faktoren (Ross, 1999).

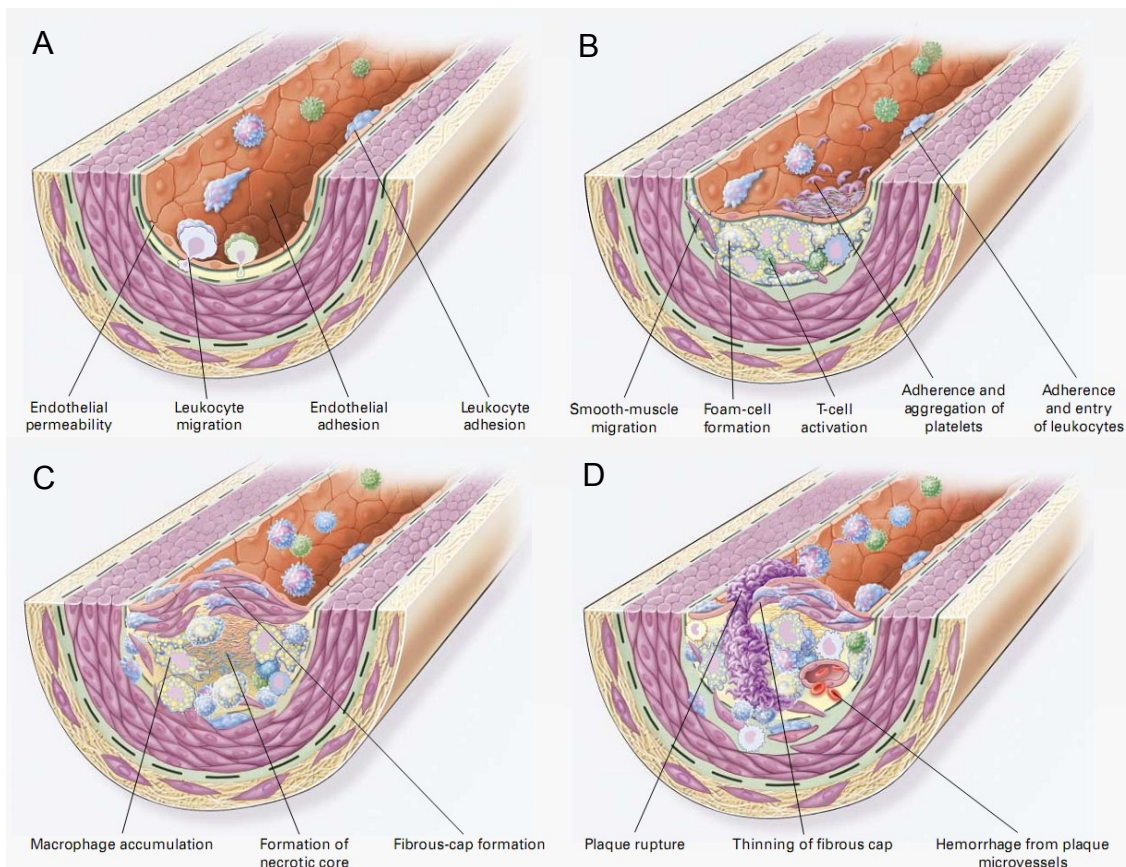


Abb 1.1 Entstehung der Atherosklerose

(A) Die Endotheliale Dysfunktion erhöht die Permeabilität für Lipoproteine, was die Einwanderung von Leukozyten begünstigt. **(B)** Während dieses Schrittes beginnt die Migration der SMC. T-Zellen werden aktiviert und Schaumzellen bilden sich. Schließlich kommt es zur Adhärenz und Aggregation von Thrombozyten. **(C)** Anhäufung von Makrophagen und Ausbildung einer fibrösen Kappe zur Abschirmung des nekrotischen Kerns. **(D)** Initiation der Thrombusbildung durch eine Ruptur an der fibrösen Kappe. (verändert nach Ross, 1999)

1.3 Thrombin

Thrombin ist eine Serinprotease die hauptsächlich an der Oberfläche zirkulierender Thrombozyten infolge proteolytischer Aktivierung des 72 kDa großen Zymogens Prothrombin gebildet wird. Prothrombin wird konstitutiv in der Leber synthetisiert und gelangt von dort in den Blutkreislauf (Patterson *et al.*, 2001). Aktives Thrombin spaltet Fibrinogen zu Fibrin, und wirkt unterstützend auf die Aktivierung einzelner Gerinnungsfaktoren ein. Thrombin ist das zentrale Enzym in der Blutgerinnung. In seiner aktivierten Form besitzt es eine Größe von 35 kDa. Neben seiner Wirkung als Protease in der Gerinnungskaskade besitzt Thrombin zusätzliche direkte Wirkungen auf verschiedene Zellen des vaskulären Systems. Insbesondere induziert Thrombin über die G-Protein-gekoppelten Protease-aktivierten-Rezeptoren (PAR)-1, -3 und -4 (siehe 1.6) die Proliferation und Migration (Newby *et al.*, 1999) von vaskulären SMC sowie die Aktivierung von Thrombozytenaktivierung (Brass, 2003).

1.4 Hämostase und physiologische Bedeutung von Thrombin

Die Hämostase ist eine regulierte Folge von Proteinspaltungen, wobei aus inaktiven Proenzymen (Zymogenen) durch limitierte Proteolyse aktive Enzyme gebildet werden. Eine intakte Hämostase ist ein lebenswichtiger Prozess, der durch Verletzungen entstandene Blutungen zum Stillstand bringt. Die gebildeten Enzyme, die aktiven Gerinnungsfaktoren, modifizieren im Laufe dieser Kaskade weitere Proteine (Abb. 1.2) (Furie *et al.*, 1988).

In der klassischen Vorstellung der Blutgerinnung werden die unterschiedlichen Gerinnungsfaktoren sequenziell aktiviert. Dies führt zu einer zur Entstehung eines Prothrombinase-Komplexes aus aktiviertem FX (FXa) und Faktor V (FVa), zum anderen zur erhöhten Bildung von Thrombin und folglich zur Fibrinpolymerisierung. Hierbei werden zwei Aktivierungswege, das intrinsische und extrinsische System unterschieden. Diese Vorstellung wurde vorwiegend von *in vitro* durchgeführten Untersuchungen abgeleitet, ist auf die Situation *in vivo* aber nur bedingt übertragbar (Artur-Aron Weber, 2006). Gegenwärtigen Vorstellungen zur Folge verläuft die Blutgerinnungskaskade in drei aufeinander folgenden Phasen: Initiierungsphase, Vorbereitungsphase und Propagationsphase (Monroe *et al.*, 2002).

Während des Prozesses der Hämostase bringt eine Verletzung der Gefäßwand Blutplasma in Kontakt mit TF- (*tissue factor*) tragenden Zellen (Monroe *et al.*, 2002). Dies führt in der

Initiierungsphase zu einer Interaktion von aktivem Faktor VII (FVIIa) mit dem in der Gefäßwand lokalisierten Gewebsthromboplastin (*tissue factor*). FVII wurde zuvor durch im Blut vorhandenem Ca^{2+} aktiviert, hat aber alleine eine sehr geringe katalytische Aktivität (Borensztajn *et al.*, 2008). Erst nach Gewebsverletzung und Freiwerden von Phospholipiden bilden TF und FVII einen Komplex und aktivieren Faktor X (FXa) und Faktor IX (FIXa) (Brummel *et al.*, 2002). FXa aktiviert wiederum FV und bildet mit diesem einen gegenüber Antithrombin geschützten Komplex, welcher zur Bildung kleiner Mengen Thrombin (Initiierungsphase) führt (Artur-Aron Weber, 2006). Diese Mengen sind jedoch ausreichend, um die Adhäsion von Thrombozyten an der verletzten Gefäßwand zu erhöhen und FV zu aktivieren (FVa) (Hoffman *et al.*, 2001). Zur Bildung eines Thrombus reicht die in diesem Stadium gebildete Menge Thrombin nicht aus. Durch Bindung an Kollagen wird bei adhärennten Thrombozyten die Sekretion von Thromboxan A_2 (TXA_2) und ADP induziert, die umliegende adhärennte Thrombozyten parakrin aktivieren (Vorbereitungsphase). Aktivierte Thrombozyten stellen im Vergleich zu inaktiven eine deutlich größere Oberfläche zur Verfügung (Schrör, 2008). Diese ermöglicht eine größere Oberflächenexpression des FV (Hoffman *et al.*, 2001), der durch Thrombin und FXa aktiviert wird. Dies führt schließlich zu einer effizienten Bildung von Thrombin und zur Bildung eines Thrombus (Propagationsphase). Somit ist Thrombin eine zentrale Protease in der Blutgerinnungskaskade und damit der Hämostase (Abb. 1.2). Von dem im Verlauf einer vollständigen Aktivierung der Blutgerinnungskaskade gebildeten Thrombins sind höchstens 5% für die prokoagulatorische Wirkung erforderlich. Weitere zelluläre Effekte des Thrombus können Thrombin aus dem Thrombus direkt zugeschrieben werden (Rosenkranz *et al.*, 2011). Der überwiegende Teil des Thrombins (> 95%) vermittelt direkte Signalwirkungen auf vaskuläre Zellen und wird gebildet, nachdem die Blutgerinnung abgeschlossen ist (Schrör *et al.*, 2010). Es wird davon ausgegangen, dass diese weitere Thrombinbildung der Gewebereparatur nach Gefäßverletzung dient. Es existieren zwei unterschiedliche Arten von Bindungsstellen für das an der Gefäßwand gebildete Thrombin; Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) und Thrombomodulin (TM). In SMC vom kontraktiven Phänotyp werden diese Rezeptoren nur sehr gering exprimiert. Nach Gefäßverletzung steigt die Expression jedoch deutlich an. In humanen SMC vermitteln PAR-1, PAR-3 und PAR-4 Thrombin-medierte Proliferation, Migrations- und Matrixbiosynthese, sowie die Erzeugung von entzündlichen und wachstumsfördernden Mediatoren (Pape *et al.*, 2008; Rauch *et al.*, 2004; Rauch *et al.*, 2010; Schrör *et al.*, 2010; Seasholtz *et al.*, 1999). Proliferation, Migration und Matrixsynthese von SMC sind Schlüsselereignisse der Atherosklerose und Gefäßremodellierung nach Verletzung. Über diese Mechanismen kann Thrombin zur Pathogenese von Gefäßkrankheiten direkt beitragen.

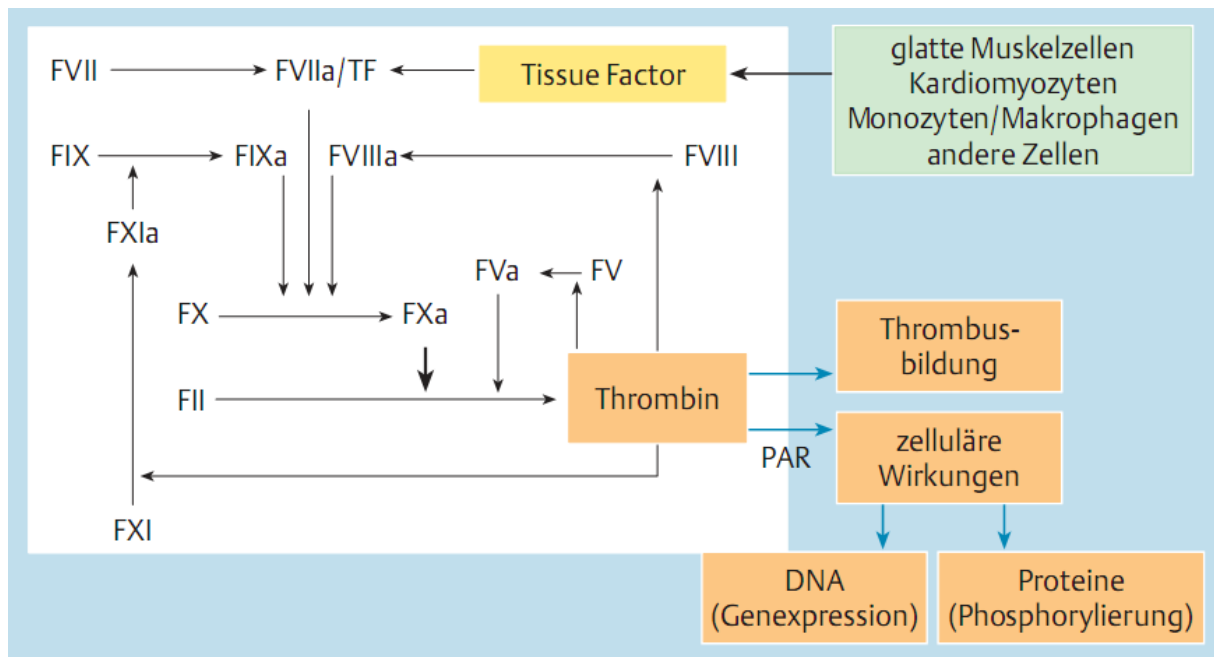


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Blutgerinnung (Schrör, 2008)

1.5 Antikoagulanzen

Zu den häufig genutzten Antikoagulanzen zählen unfraktionierte und fraktionierte Heparine, sowie Cumarin-Derivate. Diese Substanzklassen sind indirekte Koagulanzen. Heparine induzieren eine Konformationsänderung von Antithrombin, so dass dieses bis zu 1000fach effektiver arbeitet. Cumarin-Derivate blockieren die Epoxidreduktase im Vitamin-K-Zyklus. Auf diese Weise hemmen sie die Vitamin-K-abhängige Carboxylierung der Glutamyreste in der Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X. Die so entstehenden Gerinnungsfaktoren bleiben inaktiv, da sie Kalziumionen nicht mehr komplexieren können (Van Aken *et al.*, 2001). Obwohl ein breites Spektrum an Antikoagulanzen zur Verfügung steht, sind die meisten jedoch aufgrund ihrer geringen therapeutischen Breite und der schweren Kontrollierbarkeit nur bedingt für eine Langzeittherapie geeignet. Vitamin K Antagonisten werden über das Cytochrom P450 metabolisiert, was zu starken Interaktionen mit anderen Medikamenten oder Nahrungsmitteln führen kann. Weiterhin unterliegt der Abbau der Vitamin K Antagonisten genetischen Polymorphismen im Cytochrom System, was die Kontrollierbarkeit des Blutungsrisikos deutlich erschwert. Bei dem neuen direkten Thrombininhibitor *Dabigatran etexilate* (Pradaxa[®]) handelt es sich um eine so genannte *prodrug*, die erst durch eine Serumesterase zu Dabigatran verstoffwechselt wird. Dabigatran ist ein oraler, direkter, kompetitiver Thrombininhibitor mit einer Halbwertszeit von 12-17 h, der nach Verabreichung keine besondere Kontrolle verlangt. Dabigatran bindet an das aktive Zentrum von Thrombin

und unterbindet auf diese Weise die Blutgerinnung. Klinische Studien zeigen, dass Dabigatran ein deutlich geringeres Blutungsrisiko zeigt als Vitamin K Antagonisten (Abrams *et al.*, 2007; Stuart J. Connolly *et al.*, 2009)

1.6 Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs)

Die Entdeckung des ersten Thrombin Rezeptors und die Erkenntnis über dessen proteolytischer Aktivierung führte zur Beschreibung einer neuen Klasse G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (Patterson *et al.*, 2001). Die Effekte des Thrombins auf SMCs werden über diese Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) gesteuert. G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind membranständige Rezeptoren und gehören aufgrund ihrer sieben Zellmembran durchspannenden Domänen der Familie der heptahelikalen Rezeptoren an. Das G-Protein ist über die intrazelluläre Seite des Rezeptors an diesen gekoppelt (Heilker *et al.*, 2009). Die Aktivierung der Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) basiert auf dem Prinzip der proteolytischen Abspaltung des N-Terminus und Freilegung einer neuen terminalen Proteindomäne. Diese neu entstandene Domäne agiert als *tethered ligand* mit der zweiten extrazellulären Schleife des PAR (Abb.1.3). Nach Aktivierung werden die Rezeptoren der PAR Familie durch Endozytose internalisiert und anschließend in Lysosomen abgebaut (Trejo, 2003). Die Aktivierung der Protease-aktivierten Rezeptoren ist somit irreversibel (Coughlin, 1999). Es ist ebenso möglich die PAR Rezeptoren selektiv über synthetische Peptide zu aktivieren (AP), deren Sequenzen identisch zu der des jeweiligen *tethered ligand* sind (Macfarlane *et al.*, 2001). Diese Peptide binden ebenfalls an die zweite extrazelluläre Schleife des Rezeptors wodurch dieser angeschaltet wird. Die Art der Aktivierung steht im Gegensatz zu den klassischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, deren Liganden-Bindungen reversibel sind. Bei langanhaltender Stimulation und verminderter Neusynthese der PAR entsteht aufgrund der geringeren Dichte der Rezeptoren eine Desensibilisierung der Zellen gegenüber Thrombin.

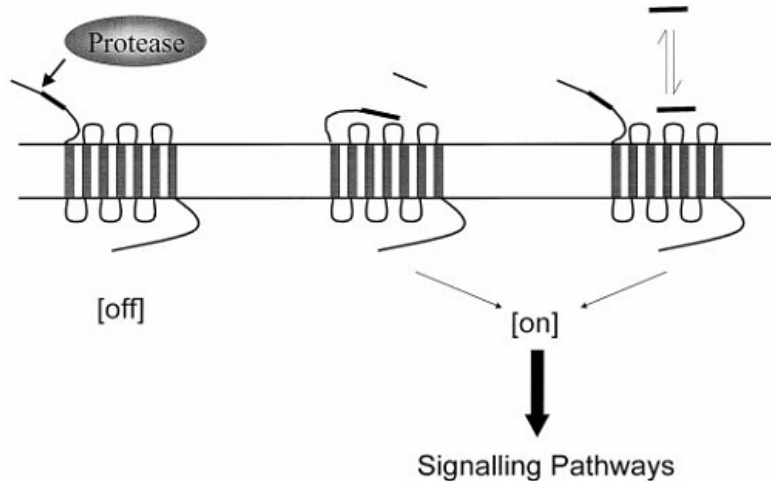


Abb. 1.3 Proteolytische-Aktivierung der Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR).

Durch proteolytische Abtrennung des N-Terminus wird der *tethered ligand* freigelegt und bindet an der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors. So wird dieser aktiviert und internalisiert. Der Rezeptor kann ebenfalls durch, dem *tethered ligand* entsprechende Peptide, aktiviert werden. (Macfarlane *et al.*, 2001)

Die Stimulation der PARs, bei Menschen vorwiegend des PAR-1, stellen den Hauptmechanismus der Thrombozytenaktivierung dar, jedoch spielen sie ebenfalls eine wichtige Rolle bei der gerinnungsunabhängigen Induktion von G-Protein- vermittelter Signaltransduktion in SMC. Bisher wurden vier verschiedene Isoformen der PAR-Rezeptoren unterschieden (PAR-1- PAR-4). PAR-1, PAR-3 und PAR-4 werden über Thrombin aktiviert. FXa aktiviert PAR-1 und PAR-2, während FVII/TF ausschließlich auf PAR-2 wirkt. Darüber hinaus wirken einige Trypsin-ähnliche Serin-Proteasen auf die PAR Rezeptoren. Von diesen Proteasen sind besonders die prokoalulatorisch wirkenden Protease Thrombin und FXa im Hinblick auf zelluläre Effekte von Bedeutung. Vergleichbares gilt für zelluläre Reaktionen bei inflammatorischen und mitogenen Prozessen nach Gefäßverletzung (Macfarlane *et al.*, 2001; Marutsuka *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2001) Die Expression der Protease aktivierten Rezeptoren in gesunden vaskulären SMC ist gering, sie wird jedoch bei Gefäßverletzung stark induziert (Schrör *et al.*, 2010). Somit ist die Regulation der PARs ein Kontrollpunkt für die Wirkung von Thrombin und FXa, dies bedeutet, dass PAR- beeinflussende Faktoren auch die koagulationsunabhängige Wirkung dieser beiden Gerinnungsfaktoren kontrollieren.

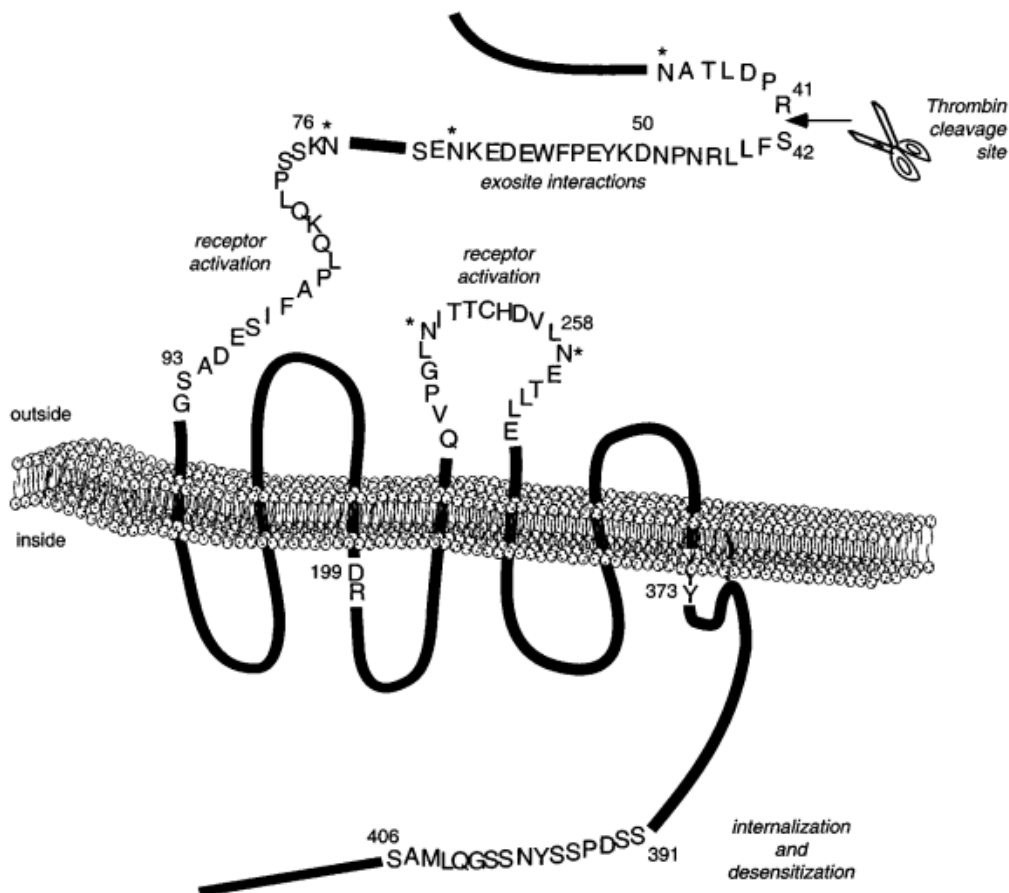


Abb. 1.4 Darstellung der Struktur und Aktivierung der PAR am Beispiel von PAR-1.

Sequenziert dargestellte Teilabschnitte zeigen wichtige Interaktionspunkte des Rezeptors welche der Aktivierung (extrazellulär) bzw. der Internalisierung und Abbau (intrazellulär) dienen. Mögliche N-Terminal gebundene Glykosylierungsstellen sind durch (*) markiert (O'Brien *et al.*, 2001).

Aktuelle Studien zeigen, dass Thrombin über PAR einen Einfluss auf die Regulierung der endothelialen Fenestration hat und folglich auf die endotheliale Permeabilität (Nobe *et al.*, 2005). Diese Funktion des Thrombins ist pathophysiologisch relevant, da durch eine erhöhte endotheliale Fenestration das Eindringen von Wachstumsfaktoren und Zytokinen in die Gefäßwand erleichtert wird. Dies kann Thrombose-assoziierte Reaktionen wie Ödeme und Entzündungsprozesse begünstigen (Feistritzer *et al.*, 2005)

Von den bisher charakterisierten Protease-aktivierten Rezeptoren sind die Signalwege des PAR-1 am besten beschrieben. Nach Aktivierung bindet PAR-1 an mindestens drei unterschiedliche Familien von G-Proteinen ($G_{12/13}$, G_q und G_i) und vermittelt auf diese Weise diverse Wirkungen auf Proliferation und Migration, sowie auf die extrazelluläre Matrix (Patterson *et al.*, 2001).

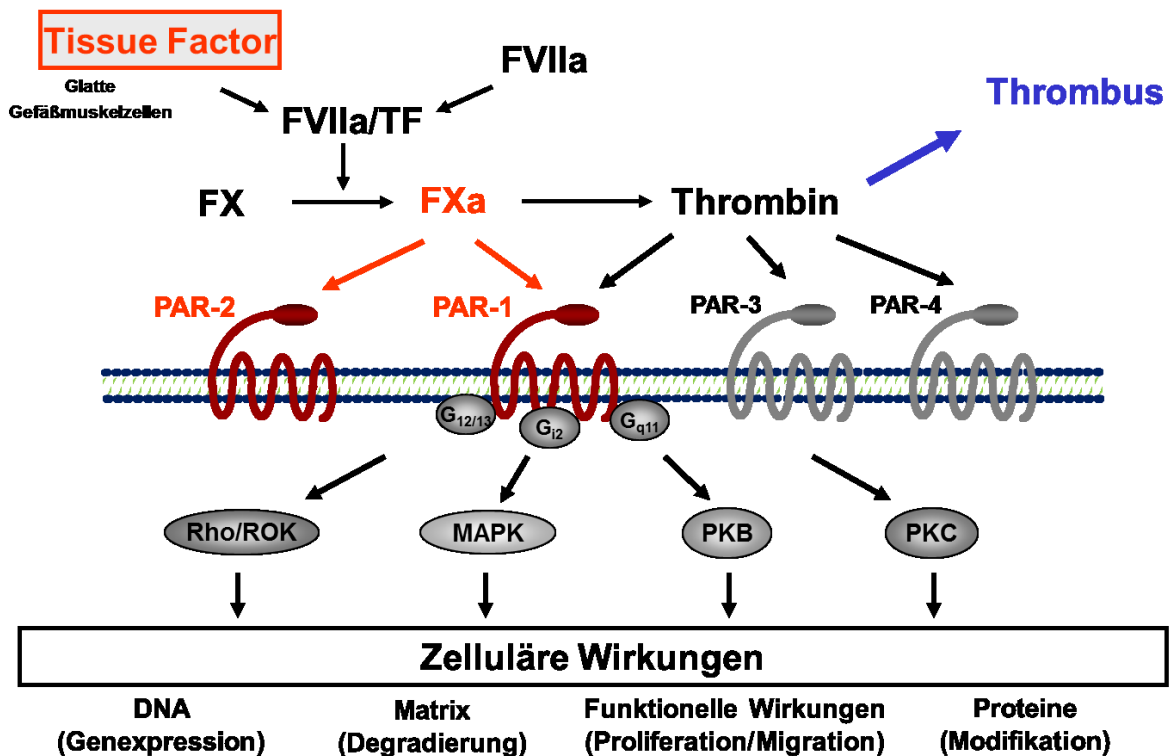


Abb. 1.5 Aktivierung und Signaltransduktion der Protease-aktivierten Rezeptoren durch Thrombin.

1.7 Sphingosinkinase

Es ist für Epithel (A549) und Endothelzellen (HUVEC) *in vitro* beschrieben, dass die Produktion von proinflammatorischen Faktoren durch Thrombin, Sphingosinkinase 1 (SPHK-1) abhängig ist und über den PAR-1 vermittelt wird (Billich *et al.*, 2009). Die SPHK liegt in zwei Isoformen vor (SPHK-1 und SPHK-2) (Maceyka *et al.*, 2005). Beide Enzyme haben in der Tumorgenese, Inflammation, vaskulären Erkrankungen sowie in diversen anderen Bereichen ein zunehmendes Interesse geweckt. Sphingosinkinasen gehören aufgrund Ihrer Eigenschaft der Sphingosin-1-Phosphat (S1P) Produktion und ihre akuten Regulation durch diverse Agonisten zu den so genannten Signalezymen (Wattenberg, 2010). Sie existieren ubiquitär in einer hochkonservierten Form. Der Aktivierungsmechanismus der Sphingosinkinasen durch verschiedene Agonisten ist in weiten Teilen unbekannt. In bestimmten Zelltypen führt eine Intrazelluläre Erhöhung des cAMP Spiegels oder eine PKC Aktivierung zu einer SPHK-1 Erhöhung. Einige biologische Stimuli, welche die Regulation der SPHK erhöhen, sind PDGF, *nerve growth factor*, vitamin D3 *epidermal growth factor* (EGF), TNF α , oder Fc ϵ R1, Fc γ R1, sowie LPA und Acetylcholin. Die Wirkung der jeweiligen Agonisten ist jedoch davon abhängig welche Rezeptoren die jeweilige Zielzelle exprimiert. Ebenso wichtig ist welche der beiden SPHK Isoformen gerade

am stärksten exprimiert wird (Olivera *et al.*, 1999; Olivera *et al.*, 2001). Des Weiteren bewirken gleiche Stimuli unterschiedliche Reaktionen der SPHK Isoformen. Erhöhte Salz Konzentrationen inhibieren die SPHK-1, während die SPHK-2 durch diese induziert wird. Umgekehrt verhält es sich bei Triton X100, welches die SPHK-1 induziert und die SPHK-2 Inhibiert (Liu *et al.*, 2000). Eine Überexpression der SPHK1 erhöht den Anteil an Zellen in der S-Phase des Zellzyklus, und fördert so den G1-S Phasenübergang, wodurch die Zeit bis zur Zellteilung verkürzt wird (Olivera *et al.*, 1997).

1.8 Sphingosin-1-Phosphat

Ein wichtiger Faktor bei der Regulierung der endothelialen Permeabilität ist das bioaktive Signallipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Indem S1P die Migration der Endothelzellen anregt und die Permeabilität verringert, verbessert es die Barrierefunktion des Endothels und hilft die vaskuläre Homöostase aufrecht zu erhalten (McVerry *et al.*, 2004). S1P wurde zuerst als Lysophospholipid Stoffwechselprodukt identifiziert, dessen Entstehung für die irreversible Metabolisierung von Sphingolipiden notwendig ist. Erst Jahre später wurde erkannt, dass es sich bei S1P um ein bioaktives Lysophospholipid handelt, welches mannigfaltige Zellantworten erregt (Maceyka *et al.*, 2005). S1P besteht aus dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin der mit Phosphorsäure verestert ist, es wird durch die Sphingosinkinase (SPHK) gebildet, von der zwei Isoformen (SPHK1 und SPHK2) beschrieben sind (Maceyka *et al.*, 2005). S1P ist ein Ligand für eine Klasse von fünf unterschiedlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die S1P Rezeptoren S1P₁₋₅ (Sanchez *et al.*, 2004). Durch Aktivierung dieser Rezeptoren werden neben der Regulierung der endothelialen Permeabilität eine große Anzahl weiterer Funktionen, wie z.B. Proliferation, Differenzierung, Migration sowie die Organisation des Zytoskelettes, der Angiogenese und entzündliche Reaktionen vermittelt (Abb.1.6.) (Anliker, 2004; Saba, 2004; Spiegel *et al.*, 2003). Zusätzlich zu den extrazellulären Effekten beschreiben einige Studien intrazelluläre Funktionen für S1P und für SPHK, z.B. für zelluläre Proliferation (Olivera *et al.*, 1999), Kalzium-Homöostase (zu Heringdorf *et al.*, 1998) und für die Verhinderung von Apoptose (Maceyka *et al.*, 2005; Olivera *et al.*, 2003). Für das Schicksal der Zelle ist das Verhältnis von S1P zu Ceramid von entscheidender Bedeutung, da Ceramid im Gegensatz zu S1P inhibierend auf das Zellwachstum wirkt und somit apoptotische Prozesse einleitet (Huwiler *et al.*, 2006). Neben der SPHK-1 dient die S1P Phosphatase ebenso als Regulator des intrazellulären S1P Gleichgewichts. Während die SPHK durch Phosphorylierung von Sphingosin S1P bildet, wird S1P durch S1P-Phosphatase dephosphoryliert und somit abgebaut (Johnson *et al.*, 2003).

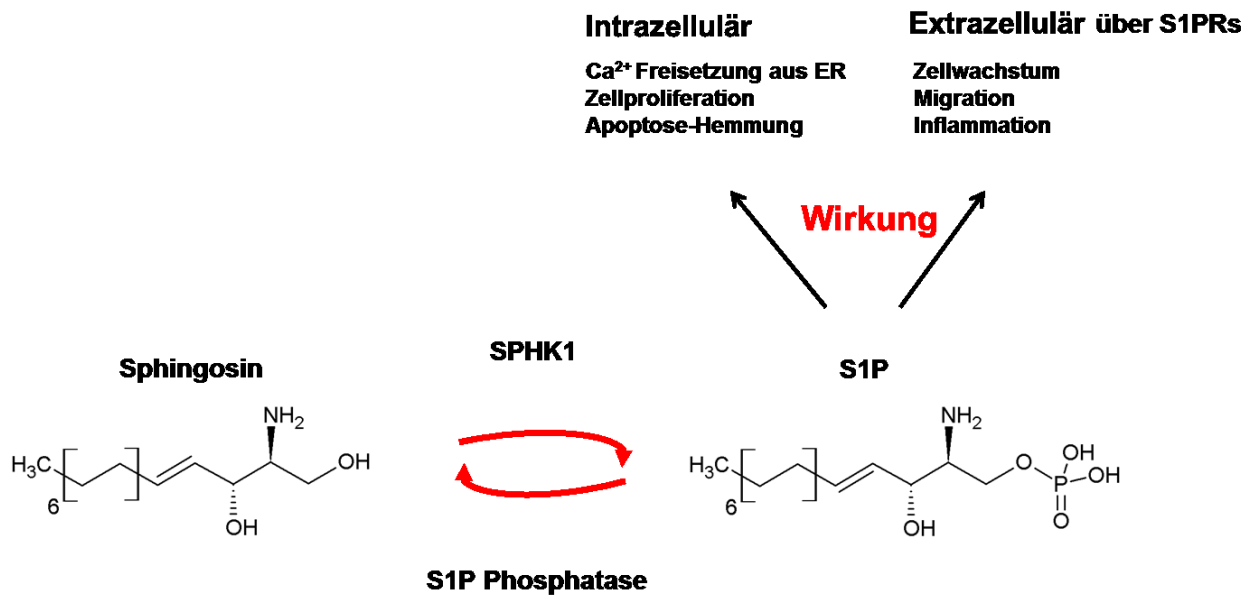


Abb. 1.6 Sphingolipid- Gleichgewicht (modifiziert nach (Le Stunff *et al.*, 2004)).

1.9 Posttranskriptionelle Genregulation durch Humanes Antigen R (HuR)

Ein unabdingbarer Faktor der Regulation eukaryotischer Gene ist der kontrollierte Abbau sowie die Stabilisierung von mRNA. Häufig wird der mRNA Abbau durch AU-reiche Elemente (ARE) in ihrer 3'untranslatierten Region vermittelt. Durch eine regulierte Stabilisierung und Degradation wird eine posttranskriptionelle Veränderung des Expressionsniveaus diverser eukaryotischer Proteine ermöglicht. Bisher wurden 3 unterschiedliche Klassen an AREs beschrieben. Klasse 1 AREs enthalten ein bis drei Kopien des Pentamers AUUUA, welche in AU- reichen Regionen verteilt sind. Sie finden sich hauptsächlich in Protoonkogenen. Klasse 2 AREs bestehen mindestens aus zwei Kopien eines Nonamer (UUAUUUA(U/A)(U/A), der ebenfalls in der AU-reichen Region eingebettet ist. Sie finden sich häufig in Zytokinen. Klasse 3 AREs fehlt das AUUUA Pentamer, jedoch wird der Abbau bzw. Stabilisierung über andere U-reiche Sequenzen vermittelt (Brennan *et al.*, 2001). HuR ist ein ubiquitär exprimiertes Protein welches selektiv an die AREs bindet und ARE enthaltene mRNAs stabilisiert. Es gehört zur den Hu-Proteinen der ELAV Familie (*embryonic lethal abnormal vision*). Ursprünglich wurde diese Familie RNA bindender Proteine in *Drosophila melanogaster* identifiziert, wo sie für die neurale Entwicklung zuständig sind. Das HuR Protein ist funktionell an der Stabilisierung einer umfangreichen Anzahl von Transkripten beteiligt, beispielsweise von verschiedenen Regulatoren des

Zellzyklus, von Cytokinen, Wachstumsfaktoren, Tumorsuppressor- und Protoonkogenen, sowie Regulationsenzymen von Apoptose und Entzündungsmediatoren (Doller *et al.*, 2008).

Sobue *et al.*, postulierte 2008 das *vsrc* transformierte NIH3T3 Zellen über HuR mRNA Stabilisierung eine erhöhte SPHK-1 Aktivität zeigten. Es wird vermutet, dass eine UUUU Sequenz am 3'Ende der 3'UTR als Bindestelle für HuR dient (Sobue *et al.*, 2008) Der überwiegende Teil des HuR ist im Zellkern lokalisiert, sein Transport ins Cytoplasma ist einer der wichtigsten Voraussetzungen für seinen protektiven Effekt auf mRNAs. Der Stimulus abhängige Transport von HuR zwischen Zellkern und Zytoplasma und umgekehrt wird als HuR *Shuttling* bezeichnet. Es ist ein kritischer Schritt in der HuR-kontrollierten mRNA Stabilisierung (Doller *et al.*, 2008).

1.10 Zielsetzung

Thrombin ist eine zentrale Protease in der Blutgerinnung, jedoch reichen 5% des gebildeten Thrombins aus um diese vollständig zu initiieren (Abb.1.2). Der Großteil des gebildeten Thrombins vermittelt über die Protease aktivierten Rezeptoren PAR-1, PAR-3, und PAR-4 zelluläre Wirkungen wie Matrix Degradierung, Genregulation, Proteinmodifikation sowie die Induktion von Proliferation und Migration in glatten Gefäßmuskelzellen (Abb.1.5). Die SPHK-1 fördert über die Bildung von S1P intrazellulär die Zellproliferation und reguliert extrazellulär über die S1P Rezeptoren die Zellmigration (Abb.1.6). Ein Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit war eine mögliche Wirkung von Thrombin auf die SPHK-1 Expression in Gefäßmuskelzellen. Dies sollte zunächst im Hinblick auf die Transkript- und Proteinexpression *in vitro* untersucht werden. Im Falle einer Induktion der SPHK-1 durch Thrombin sollte überprüft werden, ob eine posttranskriptionelle Stabilisierung der mRNA durch HuR stattfindet, wie es bereits in Tumorzellen gezeigt werden konnte (Sobue *et al.*, 2008). Weiterhin sollte geklärt werden welche funktionellen Konsequenzen eine thrombinvermittelte Regulation der SPHK-1 auf das Proliferations- und Migrationsverhalten der Gefäßmuskelzellen hat. Im Folgenden sollten die Auswirkungen des direkten Thrombininhibitors Dabigatran auf die SPHK-1 Expression und die Bildung von Atherosklerose im Mausmodell untersucht werden. Von weiterem Interesse war eine mögliche Regulierung der Thrombinrezeptoren PAR-1, PAR-3 und PAR-4 sowie des FXa Rezeptors PAR-2 durch S1P.

2. Material und Methoden

2.1 Substanzen

Tab. 2.1 Verwendete Substanzen und Komplettpakete

Substanzen	Hersteller
Actinomycin D	Merck, Darmstadt
Bisbemid H33258	Hoechst-Farbstoff, Calbiochem, San Diego, USA
Complete-Protease Inhibitor Cocktail (<i>Dabigatran etexilate</i>) Pradaxa®	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim
ECL Advance	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Hoechst 33342	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HuR siRNA sc-35619	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Humanes α -Thrombin	LOXO GmbH, Dossenheim
Hyperfilm™	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
PAR- aktivierende Peptide (1, 3 und 4)	Biosyntan, Berlin
Qiagen® OneStep RT-PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden Merck, Darmstadt
Ribojuice™	Merck, Darmstadt
SensiMix™ SYBR Kit	Bioline, Luckenwalde
SPHK-1 siRNA	Dharmacon
ON-TARGETplus SMARTpool	Lafayette, CO, USA
SPHK-1 Inhibitor	Cayman Europe, Tallinn, Estonia
Sphingosin-1-Phosphat	Echelon Biosciences Incorporated Salt Lake City, UT, USA
SYBR Green QuantiTect Primer Assays PAR-1: Hs_F2R_1_SG PAR-2: Hs_F2RL1_1_SG PAR-3: Hs_F2RL2_1_SG PAR-4: Hs_F2RL3_1_SG GAPDH: Hs_GAPDH_2_SG	Qiagen GmbH, Hilden
TaqMan® Gene Expression Assays Human: Hs99999905_m1 (GAPDH) Hs00184211_m1 (SPHK-1) Hs01016543_g1 (SPHK-2) Maus: Mm99999915_g1 (GAPDH) Mm00448841_g1 (SPHK-1)	Applied Biosystems, Darmstadt

Substanzen	Hersteller
[3H]-Thymidin	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems Darmstadt
Tri-Reagent	Sigma-Aldrich, München

2.2 Puffer und Lösungen

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden in höchster verfügbarer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Die aufgelisteten Lösungen wurden soweit nicht anders vermerkt mit entmaterialisiertem Wasser angesetzt.

Tab. 2.2 Puffer und Lösungen

Name:	Zusammensetzung:
Puffer A (<i>hypotonic homogenisation buffer</i>) 100 mL Lagern bei 4°C	10 mmol/l HEPES (pH 7.5) 10 mmol/l KCl 0.1 mmol/l EDTA 0.1 mmol/l EGTA Auffüllen mit dH ₂ O 1 Tab. <i>complete protease inhibitor cocktail</i> (vor gebrauch hinzufügen) + 1 mmol/L DTT + 1% PMSF (vor gebrauch hinzufügen)
Puffer B (<i>nuclear extract buffer</i>) 100 mL, Lagern bei 4°C	20 mmol/L HEPES (pH 7.5) 25 % glycerol 0.4 mol/l NaCl 1 mmol/l EDTA 1 mmol/l EGTA Auffüllen mit dH ₂ O 1 Tab. <i>complete protease inhibitor cocktail</i> (vor gebrauch hinzufügen) + 1 mmol/l DTT + 1% PMSF (vor gebrauch hinzufügen)
<i>Citric saline</i> (10X), Autoklavieren und bei 4°C lagern	1.35 mol/l Kalium Chlorid, .15 mol/l Natrium Citrat
Fixierlösung (Röntgenfilm)	1 % Kaliumdisulfid 20 % Natriumthiosulfat X 5 H ₂ O
Laemmli Puffer (2X)	125 mmol/l Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7.0), 100 mmol/l DTT, 20 % (v/v) Glycerol, 4 % (w/v) SDS, 0.002% +Bromophenol blau
1 x Laufpuffer (Western Blot)	190 mmol/l Glycin, 25 mmol/l Tris, pH 8,8 0,1 % (v/v) SDS
Salzarm- 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

Name:	Zusammensetzung:
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
PBS	137 mmol/l NaCl 2,7 mmol/l KCl 1,5 mmol/l KH ₂ PO ₄ 8,3 mmol/l Na ₂ HPO ₄
TBS-Puffer	10 mmol/l Tris/HCl, pH 7,4 150 mmol/l NaCl
TBS-T	TBS 0,1 % (v/v) Tween™20
TE-Puffer	10 mmol/l Tris/HCl, pH 7,5 1 mmol/l EDTA
Transferpuffer (Western Blot)	190 mmol/l Glycine, 25 mmol/l Tris, pH 8,5 20% (v/v) Methanol

2.3 Antikörper

Tab. 2.3 Verwendete Antikörper

Antikörper:	Hersteller:	Verdünnung:
Human SPHK-1 Maus monoklonaler Antikörper (M01), clone 1D6	Abnova Taipei City, Taiwan	1:1000 Western Blot 1:50 Immunhistochemie
β-actin (mouse mAb)	Sigma, Schnelldorf, Germany	1:50,000
SM-actin (Maus mAb for IHC, ICC)	DAKO, Hamburg, Germany	1:10
Ziege anti-Maus IgG, HRP konjugiert	Santacruz, Santa Cruz CA, USA	1:3000
HuR (3A2): sc-5261 (Maus monoklonaler AK)	Santacruz, Santa Cruz CA, USA	1:100
PAR-2 (SAM11) PE sc-13504, (PE-konjugiert, AK für Durchflusszytometrie)	Santacruz, Santa Cruz CA, USA	1:100
Normal mouse IgG: sc-2025 (Isotyp-Kontrolle für Pull- down-PCR)	Santacruz, Santa Cruz CA, USA	1:100
IgG1 (Maus)-PE Isotyp-Kontrolle für Durchflusszytometrie	Santacruz, Santa Cruz CA, USA	1:00
goat anti-mouse IgG-HRP SC-2005	Santacruz, Santa Cruz CA, USA	1:3000

2.4 Geräte und Materialien

Tab. 2.4. Verwendete Geräte und Materialien

Geräte:	Bezeichnung:	Hersteller:
Blot-Papier	Whatman-Papier	Schleicher und Schuell, Maidstone, England
Densitometer, Scanner	Molecular Imager GS-800 Calibrated Densitometer Quantity One® Version 4.4.1	Umax Systems GmbH, Willich Biorad, München
Durchflusszytometer	EPIC-XL	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Gelkammer	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Biorad, München
Gradienten-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
MilliQ	MilliQ® Biocell™	Millipore SAS, Frankreich
Mikroskop	Olympus Ix50 und Olympus CK2	Olympus Optical Co. LTD., Japan
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Photometer	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Power Supply	Power 300	Biorad, München
Plattenlesegerät	Microplate Reader Model 550	Biorad, München
PVDF Western Blotting Membranes	Immobilon-P Roche	Roche Diagnostics GmbH, Erlangen
Realtime PCR Light-Cycler	7300 Real Time PCR Systems	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterilbank	LaminAir HLB 2448 GS	Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf
Elektroblotter	PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Geräte:	Bezeichnung:	Hersteller:
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Sonifier® B-12	Branson Sonic Power Company, Danbury, CT, USA
UV-Lichtgerät	Olympus U-RFL-T	Olympus Optical Co. LTD., Japan
Wasser-Deionisierungsanlage	Millipore	Schwalbach, Deutschland
Zentrifuge	J2-HS Centrifuge Minifuge GL	Beckman Coulter, Krefeld Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf

2.5 Zellkultur

2.5.2 Isolierung und Kultivierung humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen (SMCs) des Menschen wurden durch Explant-Technik aus der *Arteria mammaria interna* (AM) oder *Vena saphena* (VS) isoliert (Braun et al., 1997). Die Präparate wurden von der Herzchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf, mit Genehmigung der Ethik-Kommission, der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität, sowie der Einwilligung des Spenders, zur Verfügung gestellt. Die Gefäße wurden der Länge nach geöffnet und in *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM, GibcoBRL, Rockville, MD, USA) gehalten. Das Endothel wurde durch behutsames abschaben mechanisch entfernt. Anschließend wurde vorsichtig die Media von der Adventitia entfernt und in etwa 1 mm große Segmente geschnitten. Diese wurden in 6well Kulturplatten in DMEM bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das Medium wurde alle 48 h durch frisches ersetzt. Innerhalb von ein bis zwei Wochen wuchsen die SMC aus den medialen Explantaten und proliferierten. Anhand seiner typischen „hill and valley“ Erscheinung und mittels *smooth muscle* (SM) Aktin Färbung konnte der vaskuläre SMC-Phänotyp in Primärkulturen bestätigt werden. Die Kultivierung erfolgte in DMEM supplementiert mit 15 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin, 1.9 mM L-Glutamin, 9.6 mM Natrium-Pyruvat und nicht-essentiellen Aminosäuren bei 37 °C unter Begasung mit 5 % CO₂. Für die Weiterkultivierung wurden die Zellen nach erreichter Konfluenz mit Trypsin/EDTA (0.05 % / 0.5 mM) passagiert. Für die einzelnen Versuche wurden in der Regel SMCs der Passage 3 - 10 (p3 – p10) verwendet, in Einzelfällen bis p12. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Zellen vor den akuten Experimenten einmal mit

PBS gewaschen und für 48 h in serumfreiem DMEM mit 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin inkubiert.

2.6 Präparation von Gesamt-RNA aus SMCs

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten SMCs erfolgte mittels Trizol (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe). Zu diesem Zweck wurden die Zellen direkt nach entfernen des Mediums in der Kulturschale durch Zugabe eines gebrauchsfertigen Phenol-Isothiozyanat-Gemisches (1 ml/10 cm², TriReagent (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)) lysiert. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT.) wurde das Lysat in autoklavierte Eppendorf-Gefäße überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt, aufgeschüttelt, 5 min bei RT. inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13). Von dem wässrigen Überstand wurden 450 µl abgenommen und die darin gelöste RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol für mindestens 30 min bei 4 °C ausgefällt. Nach anschließender Zentrifugation für 20 min (13000 rpm, 4 °C, Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde das erhaltene RNA-Pellet mit 800 µl Ethanol gewaschen und erneut 20 min. zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) Im Anschluss wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet, in Millipore-Wasser (22 µl) aufgenommen und anschließend im Schüttelinkubator unter kurzzeitiger Erwärmung (65 °C) 5 min gelöst. Die Proben wurden nach Zentrifugation entweder sofort quantifiziert oder bei -20 °C gelagert.

2.6.2 Quantifizierung von RNA

Die Konzentration und Reinheit der präparierten RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm in einem Nanodrop ND1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm und das von aromatischen Aminosäuren oder Phenol bei 280 nm liegt, bietet der Quotient aus beiden Absorptionswerten (ratio 260/280 nm) eine gute Abschätzung der RNA-Reinheit und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen. 1 OD_{260nm} = 40 µg/ml RNA.

2.7 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

RT-PCR Reaktionen wurden im PCR-Automaten Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf durchgeführt. Für alle gezeigten RT-PCR Experimente wurde ein One-Step RT-PCR-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Als interner Standard wurde die Genexpression des Enzyms Glycerol Aldehyd Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen. Für jeden RT-PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 25 µl) wurden 250 ng Gesamt-RNA eingesetzt.

2.7.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Für die durchgeführten Versuche wurden zwei unterschiedliche Technologien zur Ermittlung der Transkriptregulation verwendet.

Die TaqMan®-Technologie zeichnet sich durch eine spezifische Detektion der PCR Produkte aus. Eine fluoreszenzmarkierte Sonde (20-30 Nukleotide) bindet spezifisch an die zu untersuchende Sequenz. Der fluoreszierende Reporterfarbstoff (FAM, 6-Carboxyfluorescein) ist kovalent an das 5'-Ende der Sonde geknüpft. Die Fluoreszenz dieses Farbstoffs wird durch einen Quencher (TAMRA, 6-Carboxytetramethylrhodamin) am 3'-Ende der Sonde unterdrückt. Trifft die Ampli-Taq-DNA-Polymerase während der Expansionsphase auf die Sonde, so wird die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase aktiviert und die Sonde hydrolysiert. Durch diese Hydrolyse werden der Reporterfarbstoff und der Quencher räumlich getrennt. Das dabei gebildete Signal ist stark sequenzspezifisch. Unspezifisch gebundene Sondenmoleküle werden zwar verdrängt aber nicht hydrolysiert und zeigen keine Fluoreszenz.

Bei der SYBR Green Technologie hingegen, dient ein interkalierender Farbstoff zur Visualisierung des entstehenden Amplikons. Nach Anregung durch energiereiches UV-Licht wird Licht im sichtbaren energieärmeren Wellenlängenbereich emittiert (Fluoreszenz). Bei freiliegendem Farbstoff liegt eine sehr geringe Emission vor. Durch die Interkalierung des Farbstoffs in doppelsträngige DNA wird die Emission verstärkt SYBR Green™ besitzt eine Anregungswellenlänge von 497 nm und eine Emissionswellenlänge von 520 nm (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993). Da dieser Farbstoff an jeder doppelsträngigen DNA bindet, kann man nicht zwischen dem tatsächlichen Produkt und Artefakten unterscheiden. Primerdimere und andere Artefakte binden ebenfalls SYBR Green™ und zeigen einen unspezifischen Anstieg der Fluoreszenz. Aufgrund dessen ist eine klare Differenzierung zwischen Artefakt und Zielfragment notwendig. (Vandesompele *et al.*, 2002). Zu diesem Zweck wurde eine Schmelzpunktanalyse des PCR Produktes durchgeführt (Ririe *et al.*,

1997). Diese erfolgte durch das Erhitzen des Reaktionsgemisches in 1 °C Schritten, von 60 °C auf 95 °C und kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz. Die Schmelztemperatur doppelsträngiger DNA ist durch einen Abfall der Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes gekennzeichnet, da der interkalierenden Farbstoff von der einzelsträngigen DNA dissoziiert. Der Schmelzpunkt zeigt das spezifische zu erwartende Produkt. Produkte, und Artefakte haben unterschiedliche Schmelzpunkte. Durch diesen Sachverhalt gewinnt das System an Spezifität und ermöglicht es, ein spezifisches Produkt von Artefakten zu unterscheiden (Ririe *et al.*, 1997).

Die qPCR wurde in einem Zweischnitt-Protokoll durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die cDNA aus 0,5-1 µg RNA nach Angaben des Herstellers (High Capacity cDNA Archive Kit; Applied Biosystems, Darmstadt) synthetisiert. Die Synthese erfolgte in einem *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Hamburg). Die Detektion der cDNA wurde mit dem Sensi-Mix SYBR® Green Reagent (Quantace, London, UK) und QuantiTect® Primer Assays (Qiagen, Hilden, Deutschland) sowie mit TaqMan® Reagent und TaqMan® -Primer-Sonden (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) im 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Daten wurden mittels Sequence Detection Software v1.2.3. detektiert Die Expressionsniveaus des Zielgens wurden auf GAPDH normalisiert (Winer *et al.*, 1999). Regulatorische Effekte wurden ermittelt durch in Bezug setzen der stimulierten Proben zu ihrer jeweiligen Kontrolle. Trotz der verwendeten Stimulationsintervalle, änderte sich die Expression von GAPDH über den gesamten Zeitverlauf nicht, so dass es als geeignetes Kontroll-Gen in humanen SMC fungierte.

Die PCR erfolgte in Versuchsansätzen á 20 µl

TaqMan®		SYBR Green™	
10 µl	Mastermix	10 µl	Mastermix
1 µl	Assay Mix	2 µl	Primer
9 µl	Probe	8 µl	Probe

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

TaqMan®		SYBR Green™	
2 Minuten	50°C	2 Minuten	50
10 Minuten	95°C	10 Minuten	95
15 Sekunden	95°C	15 Sekunden	94
60 Sekunden	60°C	30 Sekunden	55
		30 Sekunden	72
		20 Sekunden	60
40 Zyklen		40 Zyklen	

2.8 siRNA-vermitteltes Gen-silencing

Für das Gen-silencing von HuR und SPHK-1 wurden subkonfluente SMC mit 30 nM Kontroll- und entsprechender, für das jeweilige Gen spezifischer siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; Dharmacon Lafayette, CO, USA) transfiziert. Für die Transfektion wurde Ribojuce™ Reagent (Merck, Darmstadt) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der Transfektionseffekt für SPHK-1 und HuR wurde mittels Western Blot validiert (Abs. 2.13.5). Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit dem jeweiligen Stimulus behandelt.

2.9 Zellfraktionierung

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 µl eiskaltem, hypotonischem Homogenisierungspuffer (Puffer A) durch vorsichtiges Pipettieren resuspendiert. Nachdem die Zellen für 15-20 min auf Eis „anschwellen“ konnten, wurden jeweils 10 µl 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 zytosolische Fraktionen genommen und die nukleären Pellets in 50 µl Puffer B 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 zytosolisches und nukleäres HuR durch Western Blots (Abs. 2.13.5) mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

2.10 HuR-Translokationsstudie (*HuR-Shuttling*)

Die zytosolische Akkumulation des mRNA-stabilisierenden HuR-Proteins als Maß für dessen Aktivierung, wurde mittels Western Blot (Abs. 2.13.5) von zytosolischen und gesamten zellulären Fraktionen ermittelt. SMC wurden mit 3 U/ml Thrombin (Loxo GmbH, Dossenheim,) stimuliert und nach Ablauf der Inkubationsintervalle erfolgte die Extraktion der zellulären Fraktionen, wie in Abs. 2.9 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. Zytosolisches HuR wurde auf HuR aus der entsprechenden gesamten zellulären Fraktion normalisiert.

2.11 Immunpräzipitations (*Pull-down*)-PCR

Die Bindung von HuR an die SPHK-1-mRNA wurde wie von Doller et al., 2008 beschrieben mittels Immunpräzipitations (*Pull-down*)-PCR untersucht. Glatte-Gefäßmuskelzellen wurden mit Thrombin (3 U/ml LOXO GmbH, Dossenheim) für die Dauer von 2 h stimuliert. Im Anschluss folgte die Extraktion der zytosolischen Fraktion, wie in Abs. 2.9 beschrieben. Die Proteinkonzentrationen aller Proben wurden mit Hilfe der Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, München, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers ermittelt. Anschließend wurden die zu untersuchenden Proben auf gleiche Konzentrationen verdünnt (300-500 µg/ml). Ein Aliquot jedes Ansatzes diente als „*Input*“-Kontrolle. Die Übrigen wurden auf 2 gleiche Volumina aufgeteilt und auf 1 ml mit Puffer A aufgefüllt. Zu beiden Eppies wurde eine Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim) und HuR- oder Maus IgG-Antikörper in einer Konzentration von 2 µg/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) und 2 h Inkubation bei 4°C wurden die IP-Proben für 60 Sek. bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets zuerst mit salzarmem und danach mit salzreichem Waschpuffer gewaschen. Der jeweilige Sepharose-Antikörper-Antigenkomplex wurde durch Zentrifugation für 60 Sek. bei 13000 rpm und 4°C gesammelt.

Im finalen Schritt wurde die RNA aus den „*Input*“-Kontrollen und 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 SPHK-1 Transkript mit Hilfe von Taqman Realtime PCR untersucht. Die IP-Proben dienten

zur Bestimmung der SPHK-1 Transkript- Expression und wurden auf die Menge an GAPDH-cDNA in den „Input“-Kontrollen normalisiert.

2.12 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinbestimmungen erfolgten mit einem modifizierten Assay nach Bradford (Bradford, 1976). Es wurden 5 µl Probe mit 195 µl Bradfordreagenz versetzt (1:5 in dH₂O verdünnt und filtriert), 15 min bei RT. inkubiert und anschließend bei 595 nm im Plattenlesegerät gemessen. Als Standard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe verwendet (Stock: 0,2 µg/µl; 0,4 µg- 4 µg)

2.13 Immunologische Nachweise von Proteinen

Zum immunologischen Nachweis wurden die Proteine zunächst in einer SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf eine PVDF-Immuno-Blot-Membran (Biorad) transferiert, somit immobilisiert und dann über einen indirekten Enzym-Immunoassay nachgewiesen.

2.13.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tab. 3.1 Zusammensetzung von 10 % SDS-Polyacrylamidgelen.

	Trenngel 10%	Sammelgel 5%
H ₂ O	4 ml	4,1 ml
30 % Acrylamid-Lösung	3,3 ml	1,0 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	---
1 M Tris-HCl, pH6,8	---	0,75 ml
10% (w/v) SDS	0,1 ml	0,06 ml
10% (w/v) APS	0,1 ml	0,06 ml
TEMED	0,004 ml	0,006 ml

2.13.3 Proteinauftrennung mittels SDS-Page

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinproben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem. Durch Komplexbildung der Proteine mit SDS wird infolge der negativen Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt. So wurden die Proteine während der Elektrophorese aufgrund ihres ähnlichen Masse/Ladungsverhältnisses nach ihrer Molekülgröße getrennt. Die Proteine wurden in einem Sammelgel (Tab. 3.1) fokussiert und anschließend in einem Trenngel (Tab. 3.1) ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 5-10 min bei 95 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gelapparatur „Mini-PROTEAN® Tetra Cell“ (Bio-Rad) in Elektrophorese-Laufpuffer durchgeführt. Dabei wurde, während sich die Proben im Sammelgel befanden, eine Spannung von 100 V angelegt, welche beim Übertritt der Proben ins Trenngel auf 200 V erhöht wurde.

2.13.4 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der *PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter*-Apparatur (Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) auf eine PVDF-Membran übertragen. Vor dem Transfer wurde die Membran für 1 min in Methanol (absolut), dann für 5 min in A. dest. und anschließend für 5 min in *Blotting Buffer* äquilibriert. Auch das Gel wurde für 5 min in *Blotting Buffer* äquilibriert. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran erfolgte von Kathode zu Anode im *Blotting Buffer* für 50 min bei 12 V, in einem Sandwich aus Whatmanpapieren welche zuvor ebenfalls in Transferpuffer getränkt wurden.

2.13.5 Immunodetektion (Westernblot)

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membranen wurden diese ÜN bei 4 C in TBST-Puffer mit 5 % (w/v) BSA geblockt. Alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschrte wurden bei RT und unter leichtem Schütteln durchgeführt. Zum immunologischen Nachweis der Proteine wurden die PVDF-Membranen zunächst für 10 min mit 15 ml TBST-Puffer gewaschen, anschließend für 1 h mit dem entsprechenden Erstantikörper inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurden die Membranen anschließend

dreimal 15 min in TBST-Puffer gewaschen. Danach wurden die Membranen mit dem entsprechenden Zweitantikörper-Enzym-Konjugat, verdünnt in TBST-Puffer, für 1 h inkubiert und erneut mit TBST-Puffer gewaschen (3×15 min). Die Proteine wurden mit Hilfe des ECL™ Advance Plus (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) nach Angaben des Herstellers detektiert. Bei dieser Methode wird das Substrat (Luminol) durch die Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper mittels H_2O_2 oxidiert. Die entstehende Chemilumineszenz wird durch Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm™ Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) visualisiert. Die entwickelten Röntgenfilme wurden mit einem GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad, München) eingescannt und anschließend mit Hilfe der Software Quantity One® (BioRad, München) ausgewertet.

2.13.6 Densitometrische Auswertung

Die densitometrische Auswertung von Immunoblot-Analysen Dokumentationen wurde mit Hilfe von Quantity One angefertigt. Dabei wurden die Intensitäten der detektierten Banden als optische Dichte pro mm^2 ermittelt und um den Hintergrund in direkter Nähe der detektierten Banden normiert. Anschließend wurde der Quotient aus den Bandenintensitäten der inkubierten Proben und den Bandenintensitäten der Lösemittelkontrolle gebildet und die Effekte als relative Werte der Kontrolle dargestellt. Die Signifikanz wurde mittels *One-way-ANOVA* ermittelt.

2.13.7 Strippen von PVDF- Membranen

Zur Detektion eines weiteren Proteins auf einer bereits mit Primär- und Sekundär-Antikörper umgesetzten Membran, wurden die PVDF-Membranen gestrippt. Dazu wurde die Membran entweder direkt nach der Chemilumineszenz Detektion für 10 min in TBST gewaschen oder bereits getrocknete Membranen wurden für 10 sek in Methanol geschwenkt und dann 10 min in TBST gewaschen. Anschließend wurden die Membranen 5 min in H_2O , 5 min. in 0,2 N NaOH und nochmals 5 min in H_2O geschwenkt. Am Ende der Reaktion wurde die Membran für 60 min in TBST-M blockiert und erneut mit den gewünschten Antikörpern umgesetzt (Abs. 2.13.5).

2.14 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Zelloberflächenexpression von PAR-2 wurden glatte Gefäßmuskelzellen in 6-Loch-Platten ausgesät und mit S1P (1 μ M) (Echelon Biosciences Incorporated Salt Lake City, UT, USA) 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 μ l PBS resuspendiert und mit 10 μ l Phycoerythrin (PE)-konjugiertem PAR-2- Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) für 15-30 min bei RT in Dunkelheit inkubiert.

Der als Isotyp-Kontrolle fungierende, PE-konjugierte Antikörper wurde eingesetzt um unspezifische Bindungen in der späteren Auswertung berechnen zu können. Die Isotyp-Kontrolle stammte somit aus der gleichen Spezies (Maus) und war am gleichen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wie der eingesetzte Antikörper.

Die durchflusszytometrische Analyse wurde an einem EPIC-XL Zytometer (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) durchgeführt. Die SMC-Populationen konnten anhand ihrer zellspezifischen Streulichteigenschaften (FSC: *Forward Scatter*, 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.

2.15 Bestimmung der Migration - „*Scratch-Assay*“

Die Zellmigration wurde in einem Mechanotransduktor-Assay (Weber et al., 2000) nachgewiesen. Glatte Gefäßmuskelzellen wurden bis zum Erreichen der Subkonfluenz kultiviert. Anschließend wurden sie in 24-Loch-Platten für 48 h durch Serumentzug synchronisiert. 15 min vor Beginn der Stimulation würden die Zellen, zur Unterdrückung der Zellproliferation, mit Hydroxyharnstoff (5 mM) behandelt. Im Anschluss wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze (1 ml) ein etwa 1 mm breiter Spalt in die Zellschicht gekratzt und das Medium durch frisches Hungermedium ersetzt. Nach Zugabe des zu untersuchenden Stimulus wurde die Einwanderung der Zellen in den Spalt über einen Zeitraum von 72 – 96 h

beobachtet. Zum Abstoppen des Versuches wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 5 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Nach Anfärben der Zellkerne mittels Bisbenzimid H33258 (Hoechst-Farbstoff, Calbiochem, San Diego, USA) wurde die Zellmigration fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Der Migrationskanal wurde an einem repräsentativen Ausschnitt fotografiert und die eingewanderten Zellen ausgezählt. Zur Auswertung wurde die Migration der unbehandelten Kontrolle als 100 % definiert und alle übrigen Messwerte relativiert (% KON). Bestimmung der Proliferation.

2.16 Bestimmung der Proliferationsrate von humanen SMC

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden in einer dichte von 2500 Zellen/cm² in 24-Loch-Platten ausgesät. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 h durch Serumentzug synchronisiert. Nach Zugabe des zu untersuchenden Stimulus wurde die Proliferation der Zellen über einen Zeitraum von 96 h beobachtet. Zum Abstoppen des Versuches wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 5 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Nach Anfärben der Zellkerne mittels Bisbenzimid H33258 (Hoechst-Farbstoff, Calbiochem, San Diego, USA) wurde die Zellzahl fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Die Gesamtzahl der Zellen eines repräsentativen Ausschnitts wurde fotografiert und ausgezählt. Der Versuch wurde in 24-Lochplatten durchgeführt und die behandelten sowie die unbehandelten Zellen wurden als Triplets gemessen. Zur Auswertung wurde die Gesamtzellzahl der unbehandelten Kontrolle als 100 % definiert und alle übrigen Messwerte relativiert (% KON).

2.17 Bestimmung der DNA-Syntheserate von humanen SMC

Die DNA-Syntheserate wurde mittels [³H]-Thymidin-Inkorporation, nach verändertem Protokoll (Rauch *et al.*, 2004) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden SMC, nach Erreichen 60%-80%iger Konfluenz, mit künstlichen Fibringerinnseln, in An- oder Abwesenheit von Hirudin, inkubiert und 20 h nach Stimulation mit [3H]-Thymidin (1 µCi/ml, Perkin Elmer, 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 Trichloressigsäure (TCA). Durch die darauffolgende Inkubation der Proben in 0.1M NaOH für 30 min bei 37°C wurde die DNA gelöst. Radioaktivität wurde durch Flüssig-Szintillationszählung im Szintillationsdetektor 6000IC (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) gemessen.

2.18 Immunhistochemie

Die angefertigten Immunfärbungen wurden an Paraffin- eingebetteten Sektionen von Mausherzen sowie an humanen Atherektomie Proben durchgeführt. Die 3 µm dicken Gewebsschnitte wurden in Xylol entparafinisiert, in Ethanol dehydriert und anschließend in PBS gewaschen. Die Endogene peroxidase Aktivität wurde mit 3% H₂O₂ in Methanol für 20 min in Dunkelheit bei RT blockiert. Die Antigene wurden mittels 0.1 mmol/L Natrium Citrat, mit 0.1 mol/l Citrat Säure (pH 6) bei 96 °C für 20 min demaskiert. Die Präparate wurden bei RT mit 10% FCS/ 1% BSA für 60 min geblockt. Im Anschluss folgte das Auftragen des Primär-Antikörpers gegen SPHK-1 in der Verdünnung von 1:50 in PBS/BSA üN bei 4°C. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurden die Membranen anschließend dreimal 5 min in PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Gewebsschnitte mit dem Zweitantikörper-Enzym-Konjugat in BSA/PBS verdünnt, für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert und im Anschluss nochmal dreimal 5 min gewaschen. Bei dieser Methode wird das Substrat (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) durch die Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper oxidiert, wobei sich ein braunes, in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln, unlösliches Präzipitat bildet.

2.19 Öl Rot Färbung von Lipidablagerungen in Mausearten

Der Nachweis von Plaques in Mausearten erfolgte durch die Öl-Rot-O-Färbung. Zu diesem Zweck wurden die Aorten zunächst mit einer PBS-Lösung gewaschen. Nach anschließender Entfernung von Adventitia- und Fettresten wurden die Aorten zunächst in 78 % Methanol (Merck, Darmstadt) gewaschen. Daraufhin erfolgte die eigentliche Färbung über 90 min in 900 µl Öl-Rot-O- Färbelösung (700 µl Öl-Rot-O, 200 µl 1 M NaOH). Zum Abschluss wurden die Aorten erneut in 78% Methanol (Merck, Darmstadt) für 10 min gewaschen. Nach der Färbung erkennbare Adventitia Reste wurde sorgfältig entfernt. Als Parameter für die Bestimmung des Ausmaßes der Atherosklerose wurde der Besatz der Aorta mit Lipiddepositionen (Plaquescore) quantifiziert. Die Auswertung des Plaquesbesatz wurde mit Hilfe der NIH-Freeware ImageJ 1.42q durchgeführt.

2.20 Statistik

Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Das Signifikanzniveau P für α wurde mit 0,05 festgelegt. Signifikante Unterschiede zwischen mehreren Versuchsgruppen (≥ 3) wurden mittels One-Way Analysis of Variance (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche überprüft. Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen wurden mittels ungepaartem oder gepaartem „*Student's t-Test*“ überprüft. Lineare Zusammenhänge einer metrischen abhängigen Variablen y von einer metrischen unabhängigen Variablen x wurden mittels linearer Regression bestimmt. Die Güte der Regression wurde anhand des Bestimmtheitsmaßes bewertet. Das Konfidenzintervall für den vorhergesagten Wert y wurde mit 95% festgelegt. Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit GraphPad Prism-Software (Version 5.00, GraphPad Software, San Diego, USA) oder Microsoft excel™ (Microsoft GmbH, Frankfurt).

3. Ergebnisse

3.1 SPHK-1 Expression in humanen Carotis Plaques

SPHK-1 und sein Produkt das S1P beeinflussen diverse Zellfunktionen die möglicherweise zur Entstehung von Atherosklerose beitragen können. Indem S1P die Migration der Endothelzellen anregt und die Permeabilität verringert, verbessert es die Barriere Funktion des Endothels und hilft die vaskuläre Homöostase aufrecht zu erhalten (McVerry *et al.*, 2004). Die SPHK liegt in zwei Isoformen vor, SPHK-1 und SPHK-2 (Maceyka *et al.*, 2005). Sowohl die SPHK-1 als auch die SPHK-2 haben in Zusammenhang mit vaskulären Erkrankungen zunehmendes Interesse geweckt. Sie gehören aufgrund ihrer Rolle bei der S1P Produktion und Regulation zu den so genannten Signalezymen (Wattenberg, 2010). Die Aktivierung der SPHK-1 durch diverse Agonisten ist weitestgehend unbekannt. In einigen Zelltypen führt eine intrazelluläre Erhöhung des cAMP Spiegels oder eine PKC Aktivierung zu einer Erhöhung der SPHK-1. (Olivera *et al.*, 1999; Olivera *et al.*, 2001). Zunächst sollte untersucht werden, ob die SPHK-1 in humanen aortalen Plaques nachgewiesen werden kann. Abb. 3.1 zeigt einen Querschnitt durch eine humane *Arteria carotis communis*. Diese wurden von der Gefäßchirurgie des Universitätsklinikum Düsseldorf nach einer Karotisendarterektomie zur Verfügung gestellt. Mithilfe immunhistochemischer Färbungen konnte die SPHK-1 Expression im Plaque Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 3.1 B). Der Paraffinschnitt zeigt eine deutliche Braunfärbung in diesem Bereich. In analogen Folgeschnitten wurde zum einen die Antikörperspezifität mit Hilfe von unspezifischen Kontroll-IgG überprüft (Abb.3.1 A), zum anderen im Plaquebereich befindliche SMC mit Hilfe vom M-Aktin nachgewiesen (Abb.3.1 C). Im Gegensatz zum Kontroll-IgG zeigen die SPHK-1 und M-Aktin gefärbten Paraffinschnitte eine deutliche Braun- bzw. Rotfärbung im Plaque Gewebe.

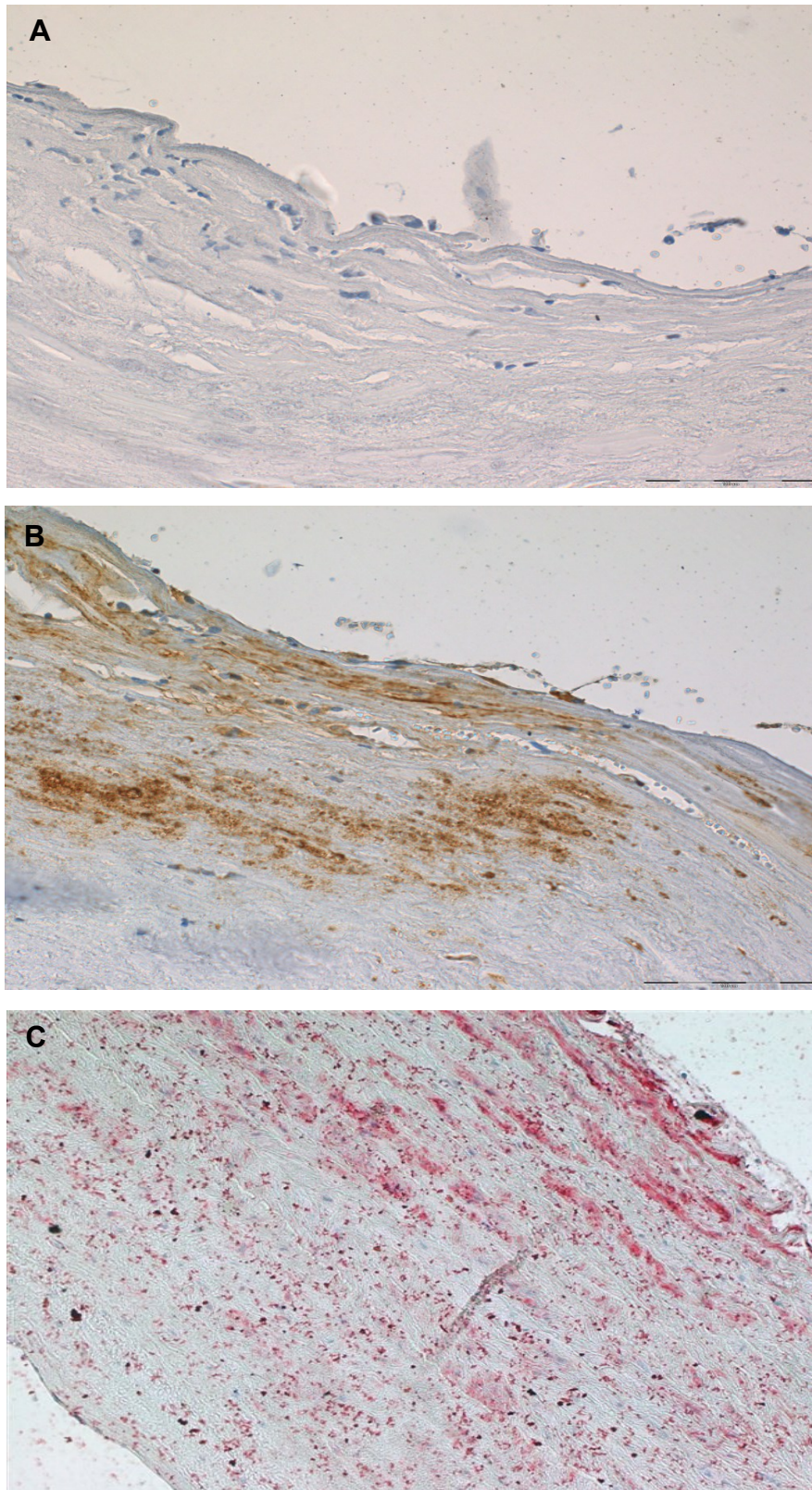


Abb 3.1. Immunohistochemische Färbungen humaner Carotis Plaques.

Abb. 3.1 A zeigt den Paraffinschnitt einer humanen Atherektomie-Probe im Bereich der fibrotischen Kappe, die immunohistochemisch mit unspezifischen IgG Kontroll Antikörper angefärbt wurde. Abb. 3.1 B zeigt einen folgeschnitt der mit einem SPHK-1 spezifischen Antikörper angefärbt wurde. Abb. 3.1 C zeigt einen weiteren *muscle* (M)-Aktin angefärbten Folgeschnitt. (Vergrößerung für 3.1 A und B 200fach, für 3.1 C 100fach)

3.1.2 Thrombin- induziert selektiv die Expression der SPHK-1 m-RNA

Nach Gefäßverletzung und Abschluss der Hämostase wirkt Thrombin weiterhin als mitogener und proliferativer Stimulus auf glatte Gefäßmuskelzellen (Rosenkranz *et al.*, 2011). Seine zellulären Effekte vermittelt Thrombin über die Protease aktivierten Rezeptoren PAR-1, PAR-3 und PAR-4. In dieser Arbeit wurde erstmals der direkte Einfluss von Thrombin auf die SPHK-1 Expression in glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. Für alle Experimente wurde eine Thrombinkonzentration von 3 U/ml (30 nM) eingesetzt, was der Konzentration entspricht, die Thrombin bei der Freisetzung aus gebildeten Thromben erreicht (Rosenkranz *et al.*, 2011). Im folgenden Versuch sollte die SPHK-1 und SPHK-2 Transkriptregulation nach Thrombinbehandlung im Zeitverlauf über 24 h detektiert werden. Zu diesem Zweck wurden SMC in 6 *well* Platten ausgesät und nach Erreichen von 90%iger Konfluenz für 48 h in serumfreien Medium weiterkultiviert. Anschließend wurden die unterschiedlichen *wells* zu verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 3 h, 6 h, 16 h, 24 h) mit Thrombin (3 U/ml) stimuliert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Im Anschluss an die Stimulation wurde die SPHK-1 Expression mit Taqman *Realtime* PCR quantifiziert. Als endogene Kontrolle diente GAPDH. Wie in Abb. 3.2 zu erkennen ist, zeigte sich für die SPHK-1 bereits 1 h nach Thrombinzugabe ein leichter Anstieg der Transkriptmenge. 3 h nach Stimulation mit Thrombin wurde im Mittel eine 2,8- fache und nach 6 h eine 3,6- fache signifikante Erhöhung der mRNA Konzentration im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen detektiert. 9 h nach Thrombinzugabe fällt die Transkriptmenge wieder stark ab bis diese nach 16 h wieder Kontrollniveau erreicht. Die unterschiedliche Anzahl an Versuchen ergab sich aus der Tatsache, dass nach Durchführung des Zeitverlaufs mit den Zeitpunkten 1 h, 3 h, 6 h, 16 h und 24 h für n=4 ein starker Abfall der Transkriptmenge von 6 h auf 16 h nach Thrombinbehandlung detektiert wurde. Es wurden weitere 4 Versuche in einem engerem Zeitrahmen von 1 h, 3 h, 6 h, 9 h und 12 h durchgeführt. Hierbei wurde analog zu den vorhergegangenen Versuchen verfahren. Somit ergaben sich für die Zeitpunkte 1 h, 3 h, und 6 h eine Zahl von n=8 Versuchen, wohingegen für die Zeitpunkte 9 h, 12 h, 16 h und 24 h eine Anzahl von n=4 Versuche durchgeführt wurden.

Im Gegensatz zu SPHK-1 konnte keine Thrombin-induzierte Regulation der SPHK-2 im Zeitverlauf beobachtet werden (Abb. 3.3).

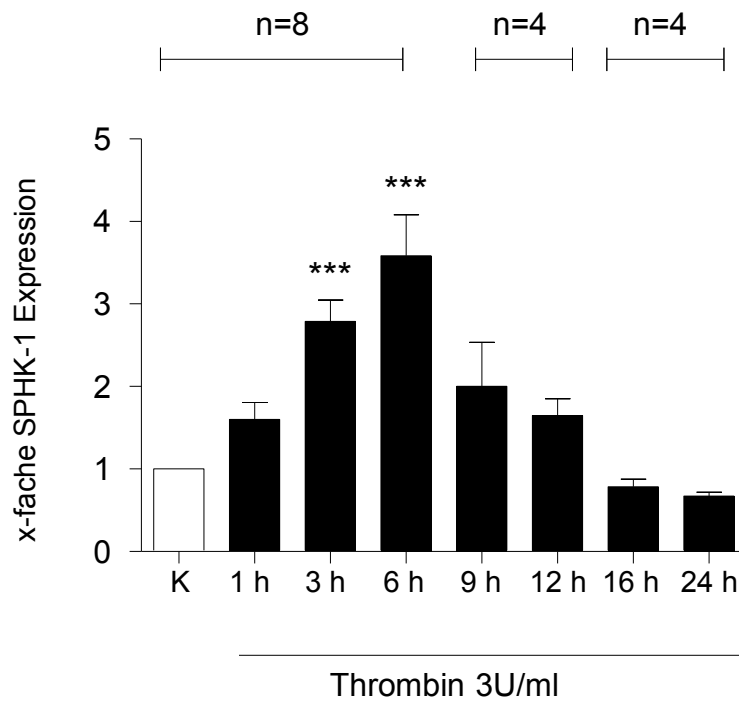


Abb. 3.2 Einfluss von Thrombin auf die SPHK-1 m-RNA Expression im Zeitverlauf.

Gezeigt wird die Zunahme der SPHK-1 mRNA Expression nach Thrombinbehandlung über 24 h. SMC wurden über einen Zeitraum von 1-24 h mit Thrombin (3 U/ml) inkubiert. Anschließend wurde mittels quantitativer Realtime PCR das mRNA Expressionsniveau der SPHK-1 gemessen. Als endogene Kontrolle diente GAPDH. Dargestellt sind n=4-n=8 unabhängige Versuche. (* $p < 0.05$, jeweils n=4-8).

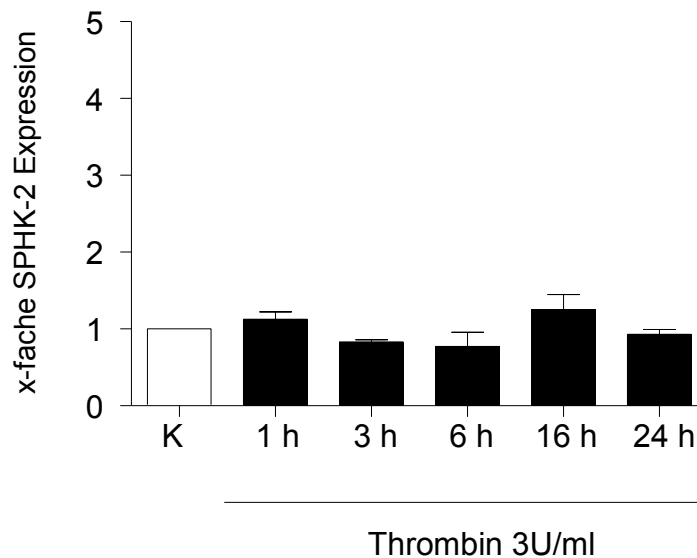


Abb. 3.3 Einfluss von Thrombin auf die SPHK-2 m-RNA Expression im Zeitverlauf

Abgebildet wird die SPHK-2 mRNA Expression nach Thrombinbehandlung über 24 h. SMC wurden über einen Zeitraum von 1-24 h mit Thrombin (3 U/ml) inkubiert. Anschließend wurde mittels quantitativer Realtime PCR das mRNA Expressionsniveau der SPHK-2 gemessen. Als endogene Kontrolle diente GAPDH. Dargestellt sind n=4 unabhängige Versuche (* $p < 0.05$, jeweils n=4).

3.1.3 Konzentrations- Wirkungsbeziehung der Thrombin- regulierten SPHK1 Regulation

Von weiterem Interesse war ein Zusammenhang zwischen SPHK-1 Induktion und eingesetzter Thrombinkonzentration. Für diesen Versuch wurden SMC in 6 *well* Platten ausgesät und nach Erreichen 90%iger Konfluenz mit steigenden Thrombinkonzentrationen von 0,1 - 10 U/ml über 6 h inkubiert (Abb. 3.4). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Der Zeitrahmen wurde anhand der vorhergehenden Ergebnisse festgelegt, in welchen die SPHK-1 6 h nach Thrombinstimulation am stärksten induziert wurde (Abb. 3.2). Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels Realtime PCR quantifiziert. Beim Einsatz von 0,1 U/ml Thrombin konnte keine Steigerung der SPHK-1 Expression gemessen werden, jedoch zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 0,3 U/ml Thrombin eine signifikante Erhöhung der SPHK-1 mRNA im Mittel auf das 2-fache im Vergleich zu den unbehandelten SMC. Auch beim Einsatz von 1 U/ml Thrombin wurde eine 2-fache Induktion detektiert. Der stärkste Anstieg wurde nach Stimulation mit 3 U/ml Thrombin über 6 h gemessen. Für alle weiteren Versuche wurde diese Konzentration verwendet.

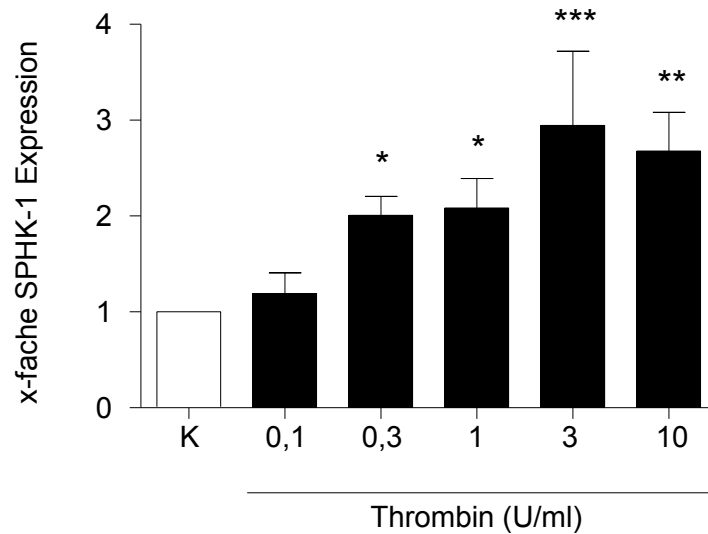


Abb. 3.4 Einfluss unterschiedlicher Thrombinkonzentrationen auf die SPHK-1-mRNA-Expression

Die Inkubation von humanen SMC mit Thrombin (0,1-10 U/ml) erfolgte für 6 h. Anschließend wurde mittels quantitativer Realtime PCR das mRNA Expressionsniveau der SPHK-1 gemessen. Als Endogene Kontrolle diente GAPDH (* $p < 0.05$, jeweils $n=4$).

3.1.4 Thrombin- induzierte SPHK-1 Protein Expression

Als nächstes wurde untersucht, ob sich die Thrombin- induzierte SPHK-1 Transkript-erhöhung auch translational durch eine gesteigerte SPHK-1 Proteinexpression bestätigen lässt. Für diesen Versuch wurden SMC in 6 *well* Platten ausgesät und nach Erreichen ihrer Konfluenz für 48 h in Hungermedium weiterkultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Thrombin über einen Gesamtzeitraum von 24 h zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 h, 3 h, 6 h, 16 h, 24 h) stimuliert. Die Proteinmenge wurde mittels Westernblot detektiert. Abb. 3.5 A zeigt einen repräsentativen Westernblot, der die Expressionssteigerung der SPHK-1 nach Zugabe von Thrombin zeigt. Als Kontrolle diente β -Aktin. Die zugehörige quantitative Auswertung ist in Abb.3.5 B dargestellt. Die detektierten SPHK-1 Banden wurden bei der Auswertung gegen β -Aktin normalisiert. Ein Anstieg des SPHK-1 Proteins wurde bereits 1 h und 3 h nach Thrombinstimulation detektiert. Die statistische Auswertung der Versuche ergab eine signifikante Erhöhung des SPHK-1 Proteins 6 h nach Behandlung mit Thrombin auf das 2-fache im Mittel und nach 16 h auf das 3-fache der Basalexpression. SMC die über 24 h Stunden mit Thrombin behandelt wurden zeigten ebenfalls eine signifikante Erhöhung der SPHK-1 Proteinmenge, die jedoch wieder auf das 2 fache des Kontrollniveaus abfällt.

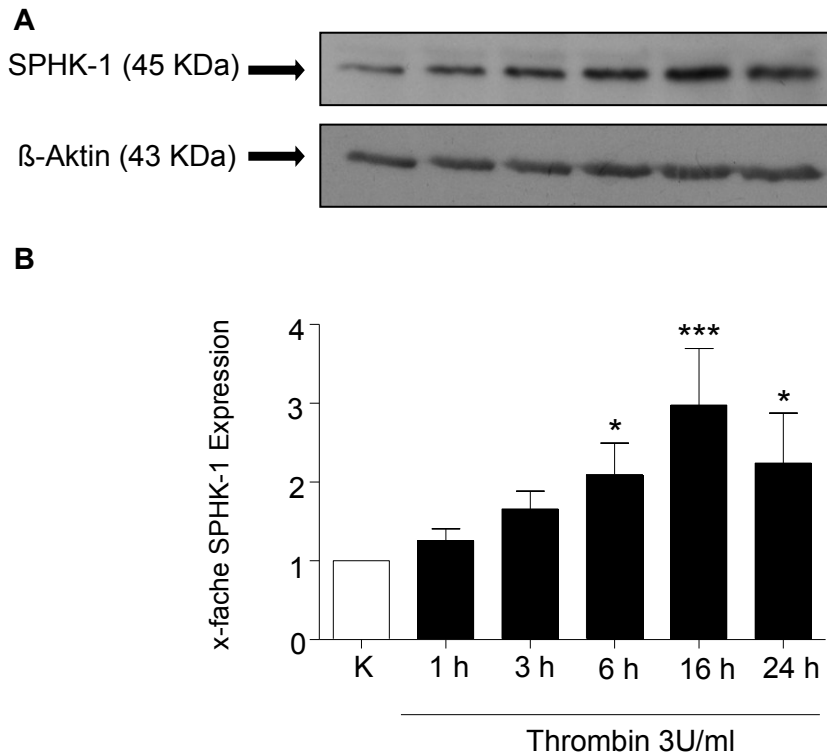


Abb. 3.5 Einfluss von Thrombin auf die SPHK-1 Protein Expression.

A: Repräsentativer Westernblot mit zugehöriger β-Aktin Kontrolle. Dargestellt ist die SPHK-1 Proteinexpression nach Thrombininkubation. B: Quantitative Auswertung der Westernblots. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte SMC eingesetzt. Die Inkubation mit Thrombin (3U/ml) erfolgte in humanen SMC in einem Zeitverlauf über 1-24h. Die SPHK-1 wurde gegen β-Aktin normalisiert (* $p < 0.05$, $n=7$).

3.1.5 Die Induktion der SPHK-1 wird selektiv über den PAR-1 vermittelt

Aufgrund der Tatsache, dass die SPHK-1 transkriptional und translational selektiv durch Thrombin- induziert wird wurde als Nächstes untersucht welcher der drei bekannten Thrombin Rezeptoren diesen Effekt vermittelt. Nach Erreichen 90%iger Konfluenz mit anschließendem 48 h Serumentzug wurden SMC in 6 *well* Platten mit synthetischen Peptiden stimuliert, welche selektiv die Thrombin Rezeptoren PAR-1, PAR-3 und PAR-4 aktivieren. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte, als Positivkontrolle Thrombin (3 U/ml) stimulierte SMC. Die Stimulation erfolgte über 6 h. Nach RNA Isolierung wurde die SPHK-1 Expression mittels Real Time PCR quantifiziert (Abb. 3.6). Hierbei zeigte sich beim Einsatz von PAR-1 aktivierenden Peptiden (TFLLRN, 200 μM), eine im Vergleich zur unbehandelten

Kontrolle, signifikante Steigerung des SPHK-1 Transkriptes im Mittel auf das 2,95-fache. Die Positivkontrolle zeigte ebenfalls eine auf das 3,2-fache signifikant verstärkte SPHK-1 Expression. Die Aktivierung von PAR-3 mittels PAR-3-AP (TFRGAP, 200 μ M) und PAR-4 durch PAR-4-AP (AYPGQV 200 μ M) führte zu keiner detektierbaren Regulierung des SPHK-1 Transkriptes.

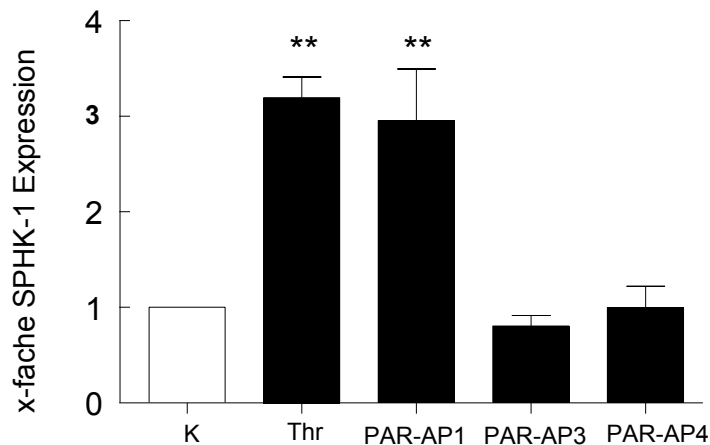


Abb. 3.6 Einfluss von PAR-aktivierenden Peptiden (PAR-AP) auf die SPHK-1 mRNA Expression

Dargestellt ist die SPHK-1 mRNA Expression nach Stimulation mit PAR aktivierenden Peptiden (PAR-AP1, PAR-AP2, und PAR-AP3). Als Negativkontrolle wurden unbehandelte SMC eingesetzt, als Positivkontrolle Thrombinbehandelte (3 U/ml) Zellen. Die Inkubation erfolgte über 6 h in humanen SMC. Anschließend wurde mittels quantitativer Realtime PCR das mRNA Expressionsniveau der SPHK-1 gemessen. Als endogene Kontrolle diente GAPDH (* $p < 0.05$, jeweils $n = 3$).

3.2 Überprüfung der SPHK-1 Expression in Plaques von murinen Aortenursprüngen

Um die Bedeutung der SPHK-1 bei der Entstehung von Atherosklerose zu klären, wurde zunächst die Expression der SPHK-1 in einem Tiermodell untersucht. Apolipoprotein E defiziente Mäuse (ApoE(-/-)) entwickeln Atherosklerose unter Einfluss einer fettreichen Diät. Abb. 3.7 zeigt ein Plaque im Aortenursprung einer ApoE defizienten Maus. Zur Überprüfung der Antikörperspezifität wurde ein analoger Folgeschnitt mit einem Kontroll IgG behandelt (Abb. 3.7 A). Im Gegensatz zum Kontroll IgG zeigt der SPHK-1 angefärbte Paraffinschnitt eine deutliche Braunfärbung im Bereich der fibrotischen Kappe (Abb 3.7 B)

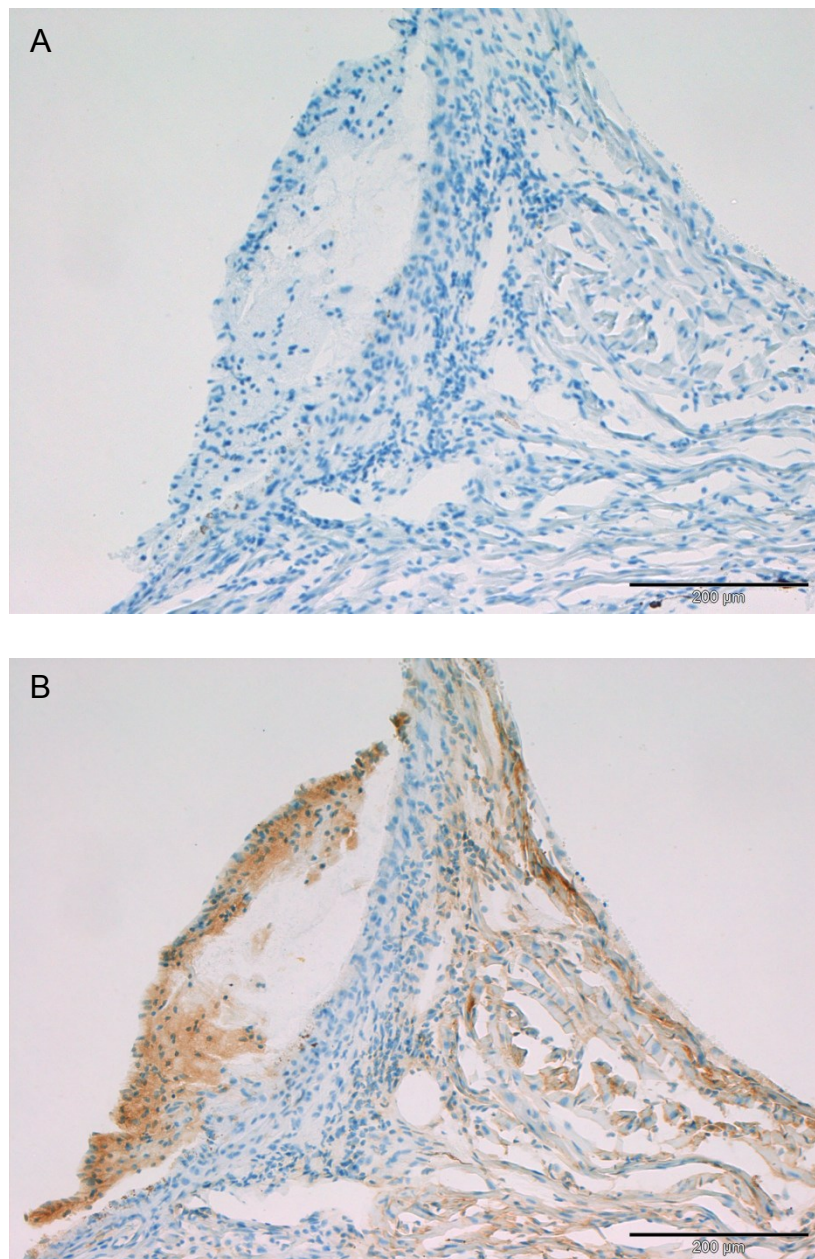


Abb. 3.7 SPHK-1 Expression in murinen aortalen Plaques

Dargestellt sind repräsentative, gefärbte Paraffinschnitte von murinen aortalen Plaques im Aortenursprung ApoE defizienter Mäuse mit A Kontroll IgG und B SPHK-1 Antikörper.

3.2.2 Einfluss von Dabigatran auf die SPHK-1 Expression in ApoE ^{-/-} Mäusen

Da Thrombin die SPHK-1 Expression in SMC reguliert und diese in atherosklerotischen Plaques vorhanden ist, sollte untersucht werden, ob durch die Hemmung von Thrombin *in vivo* eine Veränderung der SPHK-1 Regulation detektiert werden kann. Für diesen Versuch wurden ApoE defiziente Mäuse über einen Zeitraum von 6 Monaten mit *dabigatran*

etixilate angereichertem Futter (10 mg/g Futter) gefüttert. *Dabigatran etixilate* ist eine inaktive Vorstufe von Dabigatran, die durch eine Serumesterase zu Dabigatran verstoffwechselt wird. Dabigatran ist ein direkter, oral verabreichter Thrombininhibitor mit einer Halbwertszeit von 12-17 h der nach Verabreichung keine besondere Kontrolle bedarf. Es bindet an das aktive Zentrum von Thrombin und unterbindet auf diese Weise die Blutgerinnung (Paris Abrams, 2007; Stuart J. Connolly *et al.*, 2009). Als Kontrolle dienten Tiere, die über den gleichen Zeitraum Standardfutter erhielten. Nach 6 monatiger Fütterung wurden die Tiere getötet und die Aorten entnommen. Im Folgenden wurde RNA aus den Mauseorten isoliert und anschließend mittels quantitativer Realtime PCR die SPHK-1 Expression detektiert. Die SPHK-1 Expression reduzierte sich im Vergleich zu den Kontrolltieren im Mittel auf 48,73 % (Abb. 3.8).

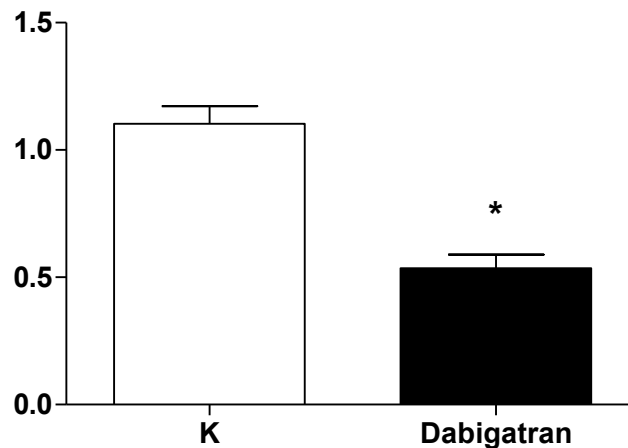


Abb.3.8 Einfluss von Dabigatran auf SPHK-1 Expression im Mausmodell

Gezeigt ist die Herabregulierung der SPHK-1 mRNA Expression nach 6 monatiger Fütterung von ApoE defizienten Mäusen mit Dabigatran versetztem Futter (10 mg *dabigatran etixilate* /g Futter) Nach Tötung der Tiere wurden die Aorten entnommen und mRNA isoliert. Anschließend wurde mittels quantitativer Realtime PCR das mRNA Expressionsniveau der SPHK-1 gemessen. Als endogene Kontrolle diente GAPDH. Dargestellt sind n=3 unabhängige Versuche. (* $p < 0.05$, jeweils n=3).

3.3 Posttranskriptionelle Regulation der SPHK-1 durch mRNA-Stabilisierung

Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen spielen neben der klassischen transkriptionellen Regulation eine bedeutende Rolle. Ein wichtiger Faktor der posttranskriptionellen Regulation ist das *human antigen R* (HuR) (Christine M. Misquitta, 2001). HuR stabilisiert mRNA durch Bindung an AU-reiche Elemente der 3'untranslatierten Region des Transkriptes. Auch die SPHK-1 kann nach Überexpression posttranskriptionell stabilisiert werden, obwohl sie keine klassische Bindestelle für HuR im nicht translatierten Bereich der SPHK-1 besitzt. Vielmehr wird als möglicher Bindungspartner für HuR am SPHK-1 Transkript das Tetramer UUUU beschrieben (Sobue *et al.*, 2008). Die selektive Regulation der SPHK-1 durch Thrombin könnte somit teilweise über RNA-Stabilisierung erklärt werden. Als erstes wurde untersucht ob Thrombin die Stabilität des SPHK-1 Transkript steigert. Hierfür wurden Zellen mit Actinomycin D vorbehandelt. Actinomycin ist ein Zytostatikum, das mit der DNA interkaliert und die Neusynthese von mRNA verhindert. Nach 30 minütiger Inkubation von unbehandelten, konfluenten und über 48 h in Hungermedium kultivierten SMC mit Actinomycin D (5 µg/ml), zeigte sich für die SPHK-1, nach Quantifizierung des Transkriptes mittels Real Time PCR, eine Halbwertszeit von 2 h (Abb. 3.9). SMC, die nach Actinomycin D Inkubation mit Thrombin (3 U/ml) behandelt wurden, zeigten einen zeitlich verzögerten Abbau. Nach 2 h Thrombinbehandlung konnte ein signifikanter Unterschied zu den nicht behandelten Kontrollzellen, entsprechend einer mRNA Stabilisierung, gezeigt werden. Unbehandelte SMC wiesen zu diesem Zeitpunkt bereits eine um 50 % reduzierte Expression des SPHK-1 Transkriptes auf, während mit Thrombin inkubierte Zellen noch Kontrollniveau zeigten. Nach 3 h konnte bei den stimulierten SMC 70 % der ursprünglichen SPHK-1 Transkriptmenge detektiert werden. Die unbehandelten SMC zeigten hingegen nur noch ca. 45 % der Ausgangsmenge. Nach 8 h Inkubationsdauer sind es nur noch 35 %. Die Transkriptmenge an SPHK-1 in Thrombin-stimulierten SMC zeigte trotz Actinomycin D Inkubation selbst nach 8 h noch ca. 50 % des Kontrollwertes.

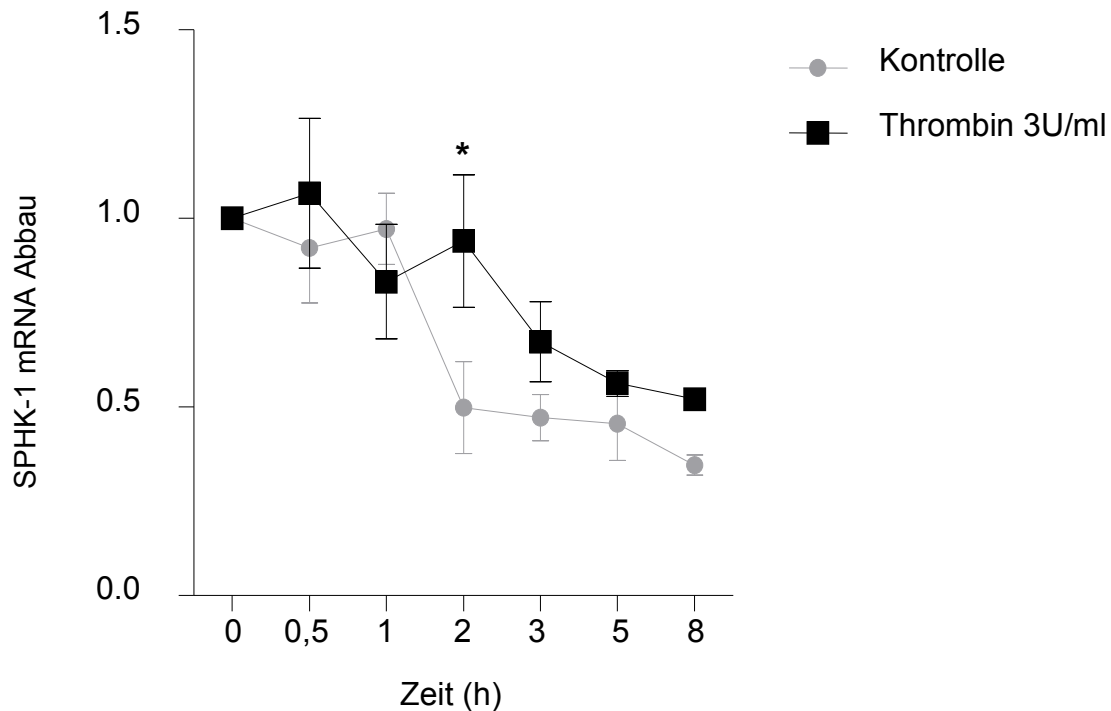


Abb 3.9 Einfluss von Thrombin auf die Halbwertszeit der SPHK-1-mRNA

Dargestellt ist die Halbwertszeit der SPHK-1-mRNA in SMC nach Vorbehandlung mit Actinomycin D über 30 min (5 µg/ml) und anschließender Inkubation mit Thrombin (3 U/ml) 0-8h. Ohne Inkubation mit Thrombin beträgt die Halbwertszeit der SPHK-1 ca. 2 h. Bei Stimulation mit Thrombin wird der Abbau von SPHK-1-mRNA jedoch signifikant verlangsamt. (* $p < 0.05$, jeweils $n=4$).

3.3.2 HuR Translokation

HuR ist ein ubiquitär exprimiertes, mRNA stabilisierendes Protein, das vor allem in verletzten und atherosklerotischen Gefäßen hochreguliert ist (Pullmann *et al.*, 2005). Der überwiegende Anteil an HuR ist im Zellkern lokalisiert. Eine Voraussetzung für einen möglichen schützenden Effekt auf ARE-reiche Transkripte ist sein Transport (*HuR Shuttling*) in das Zytoplasma (Doller *et al.*, 2008). Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob nach Thrombinbehandlung ein *HuR Shuttling* vom Zellkern in das Zytoplasma stattfindet. Zu diesem Zweck wurden konfluente und über 48 h in Hungermedium kultivierte SMC im Zeitverlauf über 24 h (0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 16 h, 24 h) mit Thrombin (3 U/ml) stimuliert. Anschließend wurde die zytosolische Zellfraktion extrahiert und ein Aliquot Gesamtzelllysat der jeweiligen Probe als Kontrolle entnommen. Mittels Westernblot konnte schließlich die Akkumulation von HuR im Zytosol detektiert werden. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Anstieg des im Zytosol befindlichen HuR bereits nach 1 h im Mittel auf das 2,3-fache der

ursprünglichen Proteinmenge. Nach 3 h konnte ein Anstieg auf das 3,3-fache und nach 6 h auf das 2,9-fache der Ursprungsmenge nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurde zytosolisches HuR auf Gesamt HuR normiert. Es zeigte sich eine Translokation von HuR in das Zytosol, jedoch kein Anstieg der HuR gesamt Proteinmenge (Abb. 3.10).

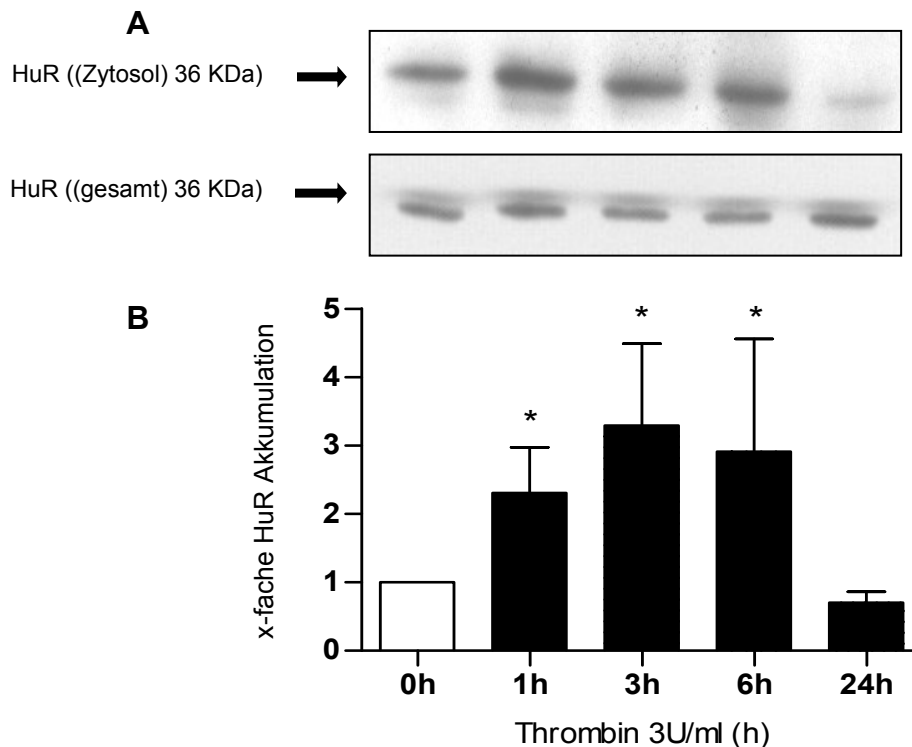


Abb. 3.10 Einfluss von Thrombin auf die zytosolische HuR Anreicherung

A: Repräsentativer Westernblot der die Akkumulation von HuR im Zytosol zeigt. Als Kontrolle diente die Gesamt HuR. **B:** Quantitative Auswertung der Westernblots. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte SMC eingesetzt. Die Inkubation mit Thrombin (3U/ml) erfolgte in humanen SMC im Zeitverlauf über 1-24h (* $p < 0.05$, $n = 3$).

3.3.3 HuR *Knockdown*

Zur Bestätigung des Einflusses vom Thrombininduziertem HuR *Shuttling* auf die SPHK-1 Expression, wurde HuR mittels spezifischer siRNA herabreguliert. In SMC konnte die HuR Expression auf Proteinebene mit HuR spezifischer siRNA auf 50 % reduziert werden. Als Kontrolle dienten mit unspezifischer Kontroll siRNA transfizierte SMC. Die HuR Proteinexpression wurde mittels Western Blot detektiert und auf die β -Aktin Expression, als internen Standard, normalisiert (Abb. 3.11). Nach bestätigter Funktionalität der HuR siRNA wurde in einem folgenden Versuch die SPHK-1 Expression nach HuR *knockdown* gemessen (Abb. 3.12).

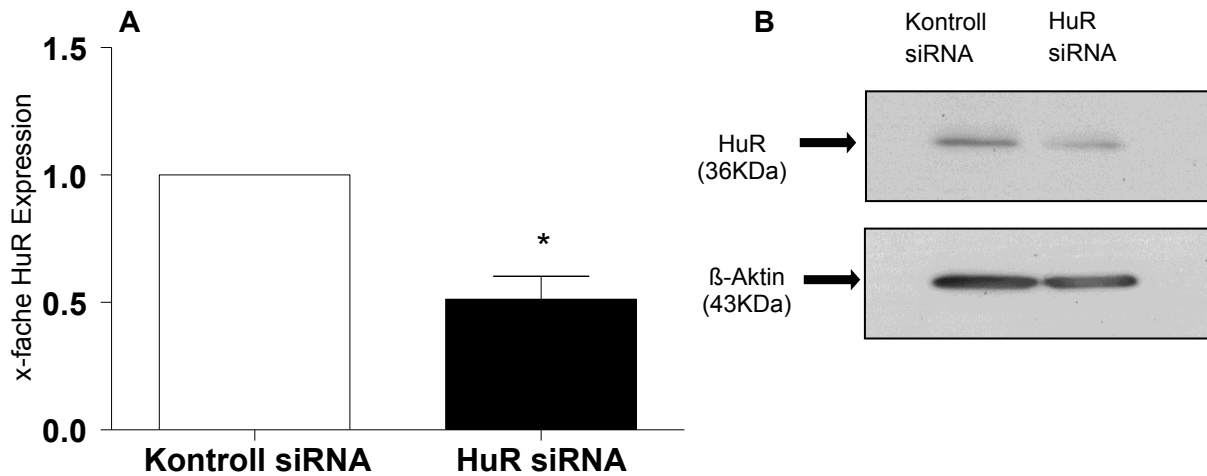


Abb. 3.11 Reduktion von HuR mit HuR siRNA

SMC wurden mit Kontroll siRNA und HuR siRNA transfiziert. Anschließend wurden mittels Westernblot die HuR Expression detektiert **A**: Quantitative Auswertung der Westernblots (* $p < 0.05$, $n = 3$) **B**: Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von $n = 3$ Experimenten (* $p < 0.05$, $n = 3$).

3.3.4 Einfluss von HuR auf die SPHK-1 Expression

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in humanen SMC, die HuR Proteinexpression mittels spezifischer siRNA reduziert werden konnte, sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen HuR Regulation und Thrombin- induzierter SPHK-1 Expression geklärt werden. Zu diesem Zweck wurde die HuR Expression in SMC mit siRNA herabreguliert und anschließend die SPHK-1 Induktion nach Thrombinstimulation untersucht. Als Kontrolle dienten mit unspezifischer Kontroll siRNA transfizierte Zellen. SMC wurden nach Erreichen 60 %iger Konfluenz transfiziert. Anschließend wurden die Zellen über 48 h in Hungermedium weiterkultiviert und über einen Zeitraum von 6 h mit Thrombin (3 U/ml) stimuliert. Nach RNA Isolierung und Durchführung einer quantitativen Realtime PCR ergab sich für die Kontroll siRNA transfizierten SMC eine Transkripterhöhung der SPHK-1 auf das 2,12-fache der unstimulierten Kontrolle. Mit HuR siRNA transfizierte SMC zeigten eine im Vergleich dazu signifikant geringere SPHK-1 Induktion auf das 1,5-fache der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.12).

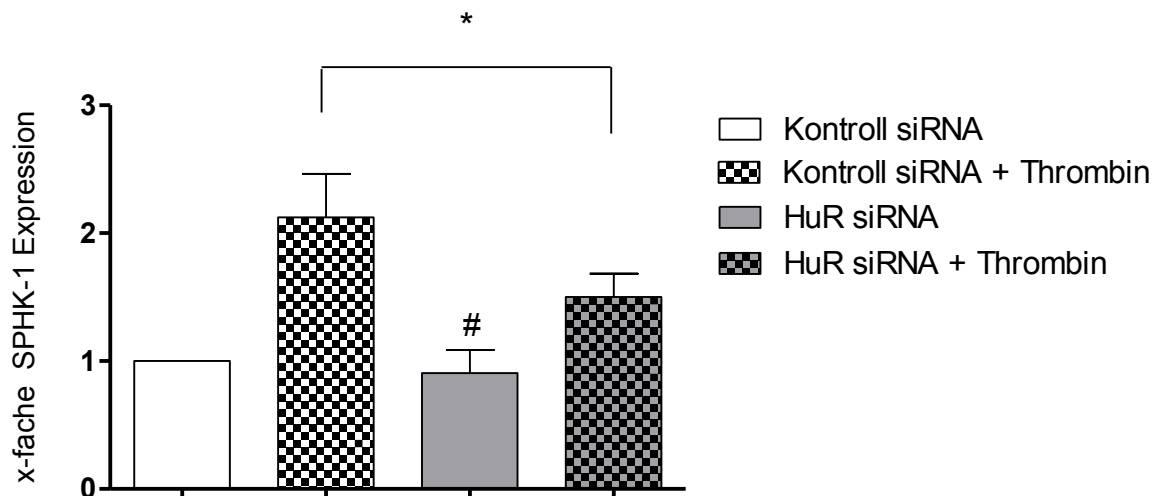


Abb. 3.12 Einfluss von HuR auf die Thrombin- induzierte SPHK-1 Expression

Dargestellt ist der Einfluss von Thrombin auf die SPHK-1 Expression nach vorhergehender Herabregulation der HuR mit siRNA in SMC. Mit unspezifischer siRNA transfizierte SMC dienten als Kontrolle. Es wurde in beiden Fällen sowohl die basale Expression der SPHK-1 als auch die Expression nach 6 h Inkubation mit Thrombin (3 U/ml) gemessen (3 U/ml) (* $p < 0.05$, $n = 4$).

Eine mögliche Stabilisierung der SPHK-1 durch die Bindung von HuR an das SPHK-1 Transkript und der potenzielle Einfluss von Thrombin auf diese Reaktion sollte mittels Immunopräzipitations (*Pull-down*)-PCR geklärt werden. Für diese Versuche wurden SMC, in D100 Schalen bis zur Konfluenz kultiviert, anschließend über 48 h unter Serumentzug weiterkultiviert. Im Folgenden wurden die SMC für einen Zeitraum von 3 h mit Thrombin stimuliert. Die Inkubationsdauer ergab sich aus dem in Abs. 3.3.2 beschriebenen Versuch, der zu diesem Zeitpunkt die stärkste Translokation von HuR in das Zytoplasma, nach Thrombinstimulation, zeigte (Abb. 3.10). Die Menge an HuR gebundener SPHK-1 mRNA im Zytosol von behandelten SMC stieg im Mittel auf das 5,7 fache an. Es zeigte sich, dass die Menge an zytosolischer SPHK-1 mRNA nach Zugabe von Thrombin, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, auf das 5,7 fache anstieg. Die mittels Maus IgG Antikörper präzipitierte mRNA war kaum detektierbar, was eine unspezifische Immunopräzipitation ausschließt und die beobachtete Steigerung validiert. Zusammenfassend kann gesagt werden das Thrombin auf die HuR Translokation in SMC wirkt und einen maximalen Effekt nach 3 h Inkubationsdauer bewirkt.

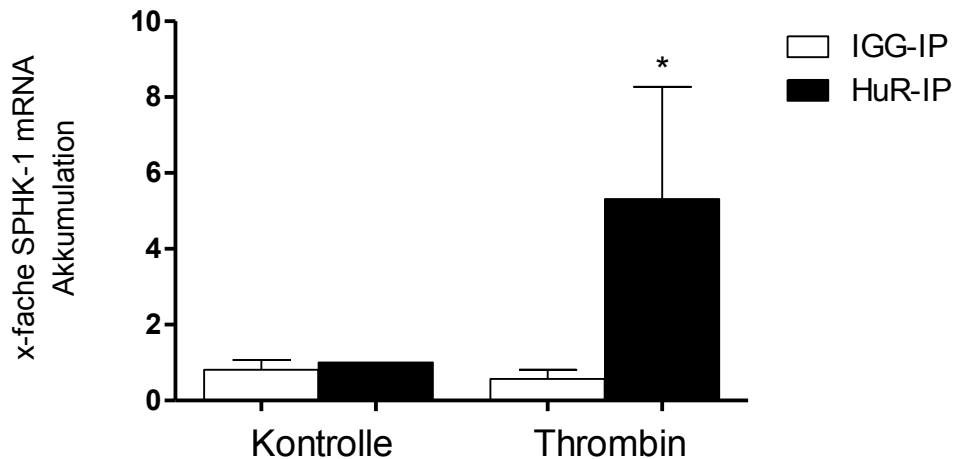


Abb. 3.13 Einfluss von Thrombin auf die SPHK-1 Transkript-Stabilisierung durch HuR

Die Bindung von HuR an das Transkript der SPHK-1 und der potenzielle Einfluss von Thrombin (3 U/ml) auf diese Stabilisierung wurde mittels Immunopräzipitations PCR untersucht. Die zytosolische PAR-2-mRNA, die mit dem Maus IgG-Antikörper immunpräzipitiert wurde (IgG-IP), zeigte ein sehr geringes Expressionslevel. Die immunpräzipitierte Transkriptmenge der SPHK-1 zeigt nach Stimulation mit Thrombin einen Anstieg auf das ca. 5,7-fache (* $p < 0.05$, $n=4$).

3.4 Einfluss von endogenem Thrombin- auf die DNA Neusynthese in humanen SMC

Im Anschluss an den Nachweis, dass Thrombin das SPHK-1 Transkript sowie das SPHK-1 Protein selektiv über den PAR-1 Rezeptor reguliert, wurde untersucht ob die Thrombin vermittelte Regulation der SPHK-1 eine Wirkung auf die zellulären Funktionen der SMC hat. Zur Kontrolle des Einflusses von endogenem Thrombin auf die Mitogenese von SMC in der Zellkultur wurden *in vitro* Fibringerinnsel generiert. Zu diesem Zweck wurde rekalkifiziertes Plasma von gesunden Spendern, bis zur Bildung eines Gerinnsels, bei 37°C inkubiert. Die so entstandenen Gerinnsel wurden in An- oder Abwesenheit von Hirudin auf SMC gegeben. Hirudin ist ein Thrombin Inhibitor, der 15 min vor Zugabe des künstlichen Thrombus auf die Zellen gegeben wurde. Die durch den *Clot* induzierte DNA- Synthese wurde mit Hilfe von [³H] Thymidin Einbau detektiert (Abs. 2.17). Wie Abb. 3.14 zeigt wurde nach Zugabe des künstlichen *Clots* die DNA- Synthese auf das 18-fache erhöht. Bei vorhergehender 15-minütiger Inkubation der SMC mit Hirudin und anschließender Zugabe des *Clots* wurde ein signifikant verminderter Anstieg der DNA- Neusynthese gemessen. Hirudin alleine zeigt keinen Einfluss auf die DNA- Synthese bei SMC.

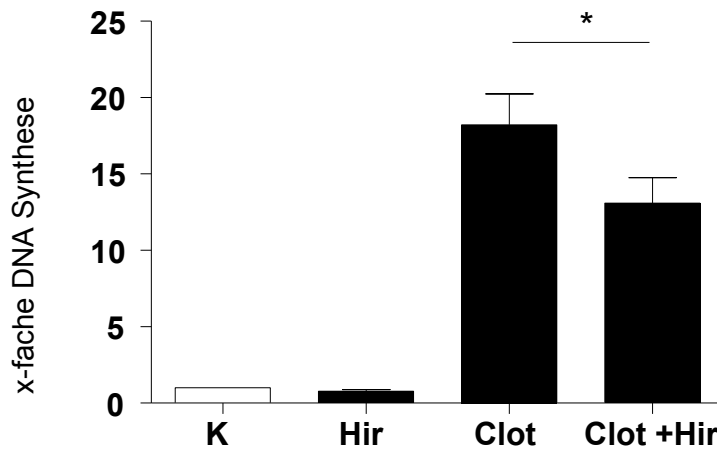


Abb. 3.14 Wirkung von endogenem Thrombin auf die Proliferation von SMC

Dargestellt ist der detektierte Anstieg des [³H]-Thymidin Einbaus nach Zugabe künstlich erzeugter Gerinnsel in SMC. Verglichen wurde die DNA- Neusynthese mit und ohne vorherige Inkubation der Zellen mit Hirudin. Der Einsatz von Hirudin senkt die durch den Thrombus induzierte DNA-Synthese signifikant. Hirudin alleine hat keine Wirkung auf die Proliferationsrate der SMC. (*p<0.05, jeweils n=6).

Zur Klärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Induktion der SPHK-1 durch Thrombin und einer damit verbundenen Proliferationssteigerung von SMC wurde im Hinblick auf weiterführende Versuche versucht die SPHK-1 Expression in SMC mit Hilfe von SPHK-1 siRNA zu reduzieren. Die Funktionalität der SPHK-1 spezifischen siRNA in SMC wurde mittels Westernblot überprüft. SMC wurden nach Erreichen 60 %iger Konfluenz mit SPHK-1 siRNA und Kontroll siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen über 48 h in Hungermedium weiterkultiviert. Aus anschließenden Westernblot-Analysen ergab sich im Vergleich zur Kontrolle eine Reduktion der SPHK-1 Protein-Expression auf ca. 50 % (Abb. 3.15). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, sowie Zellen die mit unspezifischer Kontroll siRNA transfiziert wurden.

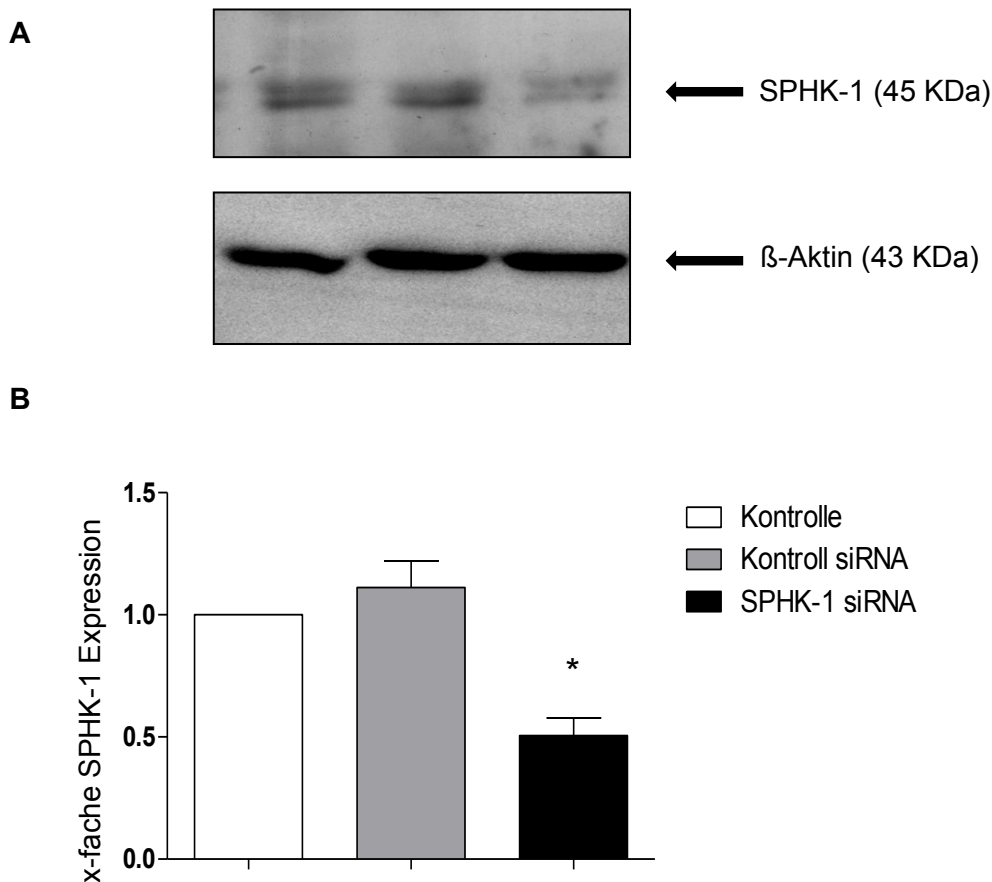


Abb. 3.15 Funktionalität SPHK-1 spezifischer siRNA auf die Proteinexpression der SPHK-1 in SMC

A: Repräsentativer Westernblot mit zugehöriger β -Aktin Kontrolle. Dargestellt ist die SPHK-1 Proteinexpression nach Transfektion mit spezifischer SPHK-1 siRNA. B: Quantitative Auswertung der Westernblots. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte, sowie mit Kontroll- siRNA transfizierte SMC eingesetzt (* $p < 0.05$, $n = 5$).

3.4.2 Einfluss von Thrombin auf das Proliferationsverhalten von SMC im Hinblick auf die SPHK-1 Expression

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob die Herabregulation der SPHK-1 Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten von SMC hat. Weiterhin wurde der Einfluss von Thrombin auf das Proliferationsverhalten der SMC im Hinblick auf die SPHK-1 Expression untersucht. Der Versuch zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens wurde wie in Abs. 2.16 beschrieben durchgeführt. Die Anzahl der Zellen wurde für jeden Versuch mit dem *Freeware* Programm *ImageJ* ausgezählt und quantitativ ausgewertet. Die Auswertung der durchgeführten Versuche (Abb. 3.16) ergab eine signifikant erhöhte Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

nach Stimulation mit Thrombin 3 U/ml im Vergleich zu unbehandelten SMC. In Abb. 3.17 sind repräsentative, mikroskopische Aufnahmen der angefärbten SMC dargestellt. Nach Einsatz von unspezifischer siRNA zeigte sich kein Unterschied der gezählten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Sowohl basal als auch nach Thrombinstimulation konnte eine signifikante Abweichung der Anzahl an SMC ausgeschlossen werden. Nach Transfektion von Gefäßmuskelzellen mit SPHK-1 spezifischer siRNA zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der basalen Proliferationsrate, die nach Stimulation mit Thrombin wieder Kontrollniveau erreicht. Gleichermaßen verhielt es sich nach Einsatz eines SPHK-1 Inhibitors. Die Zugabe von Thrombin führte in diesem Fall nicht zu einer verstärkten Proliferation. Die basale Proliferation blieb unverändert.

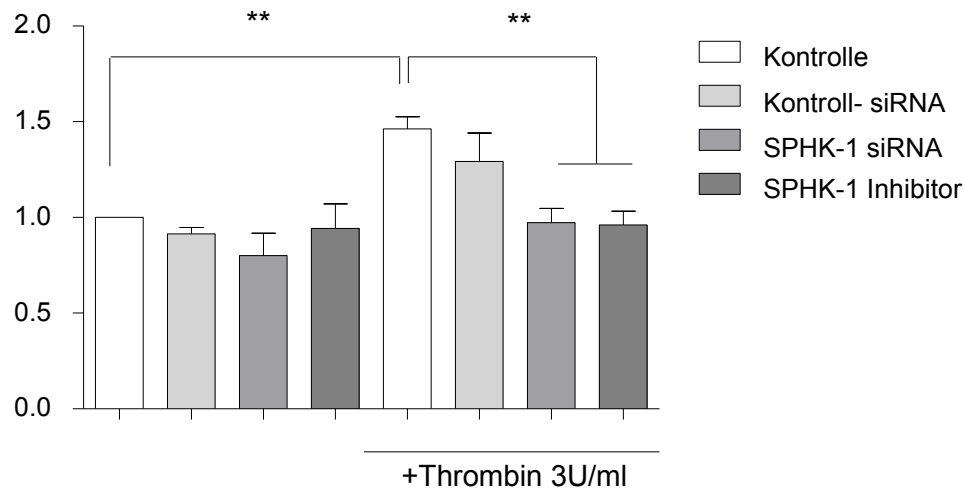


Abb. 3.16 Einfluss von Thrombin und SPHK-1 auf das Proliferationsverhalten von SMC

Dargestellt ist die quantitative Auswertung des in 3.4.2 beschriebenen Proliferationsversuchs. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte SMC eingesetzt, als Positivkontrolle Thrombin (3U/ml) stimulierte Zellen. Die Inkubation erfolgte über 96 h in 24 *well* Platten. Die Zellzahl wurde pro Versuch in Tripletts bestimmt und der Mittelwert für die quantitative Auswertung genutzt (* $p < 0.05$, $n = 4$).

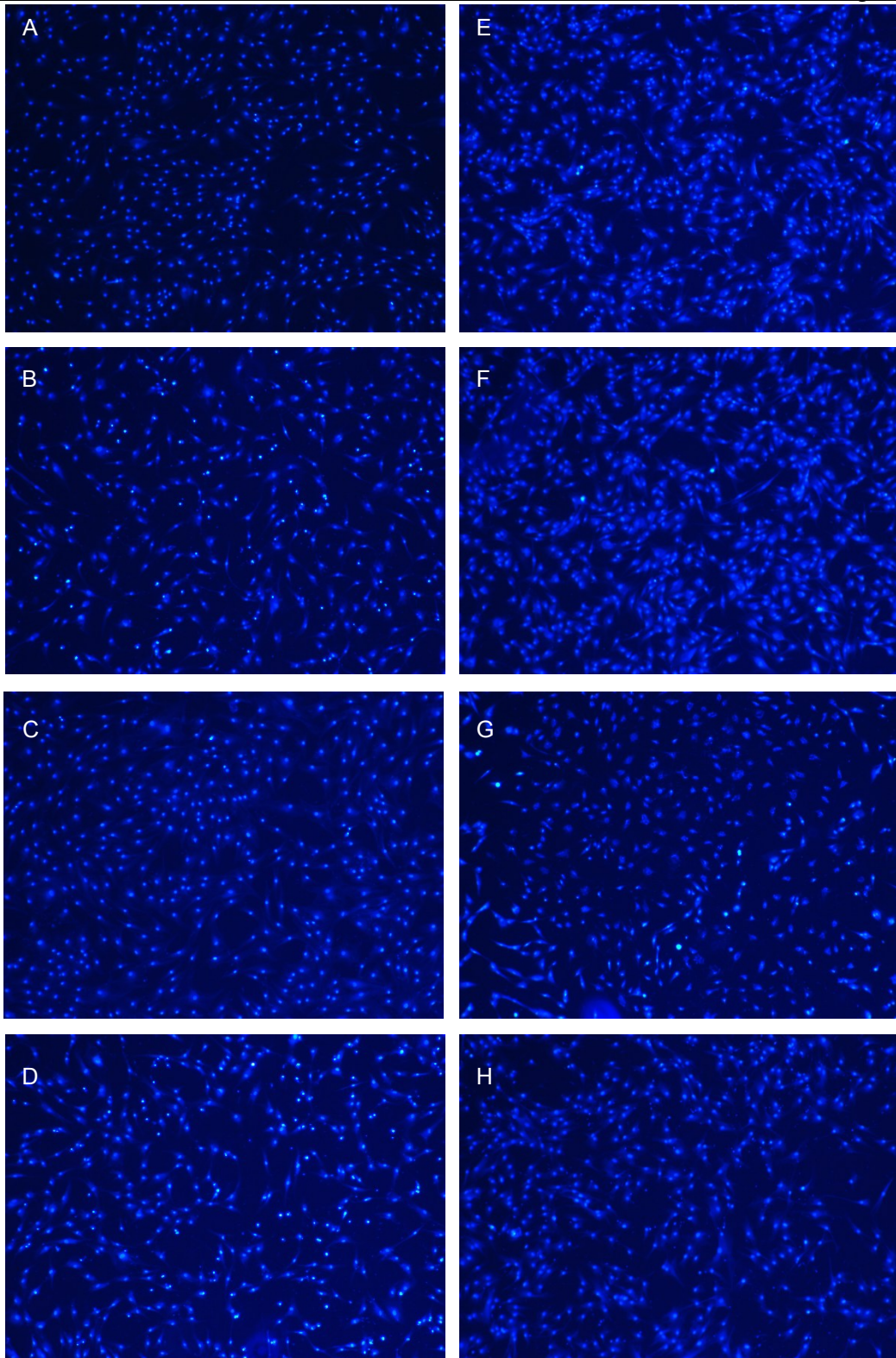


Abb. 3.17 Einfluss von Thrombin und SPHK-1 auf das Proliferationsverhalten von SMC. Dargestellt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen des in Abschnitt 3.4.2 beschriebenen Versuchs. Die SMC wurden mit einer Dichte von 2500 Zellen/cm² ausgesät und mit Hoechst gefärbt. A=Kontrolle, B=Kontroll siRNA, C=SPHK-1 siRNA, D=SPHK-1 Inhibitor E=Kontrolle+Thrombin, F=Kontroll siRNA+Thrombin, G=SPHK-1 siRNA+ Thrombin H=SPHK-1 Inhibitor+Thrombin.

3.4.3 Einfluss von Thrombin auf das Migrationsverhalten von humanen SMC

Nachdem gezeigt werden konnte, dass zwischen SPHK-1 Expression und Thrombin-induzierter Proliferation ein Zusammenhang besteht, wurde untersucht ob die SPHK-1 am Thrombin-induzierten Anstieg der Migration beteiligt ist. Hierzu diente ein sogenannter *Scratch-Assay* (Abs. 2.15) (Artur-Aron Weber, 2000). Für diesen Versuch wurden SMC in 24 *well* Platten ausgesät. Nach Erreichen 60%iger Konfluenz wurden die Zellen transfiziert und über 48 h in Serum freien Medium weiterkultiviert. Anschließend wurde *in vitro* eine künstliche Wunde in einer *monolayer* Zellschicht venöser SMC erzeugt. Die Migration der Zellen in die künstliche Wunde wurde in Gegenwart eines Proliferationsinhibitors (5 mmol/L Hydroxyharnstoff) beobachtet. Die Hemmung der SPHK-1 führte zu keiner detektierbaren Veränderung des basalen Migrationsverhaltens der SMC. Abb. 3.18 zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen des durchgeführten Versuchs. Die Anzahl an migrierten Zellen wurde für jeden Versuch mit *ImageJ* ausgezählt. Die quantitative Auswertung der durchgeführten Versuche ergab wie in Abb. 3.19 zu erkennen, eine erhöhte Migration in allen mit Thrombin-stimulierten Proben. Sowohl mit SPHK-1 siRNA transfizierte SMC, als auch mit SPHK-1 Inhibitor behandelte Zellen zeigten eine im Mittel um den Faktor 2 signifikant erhöhte Migration im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Auch beide Positivkontrollen zeigten das gleiche Ergebnis wie die behandelten Proben.

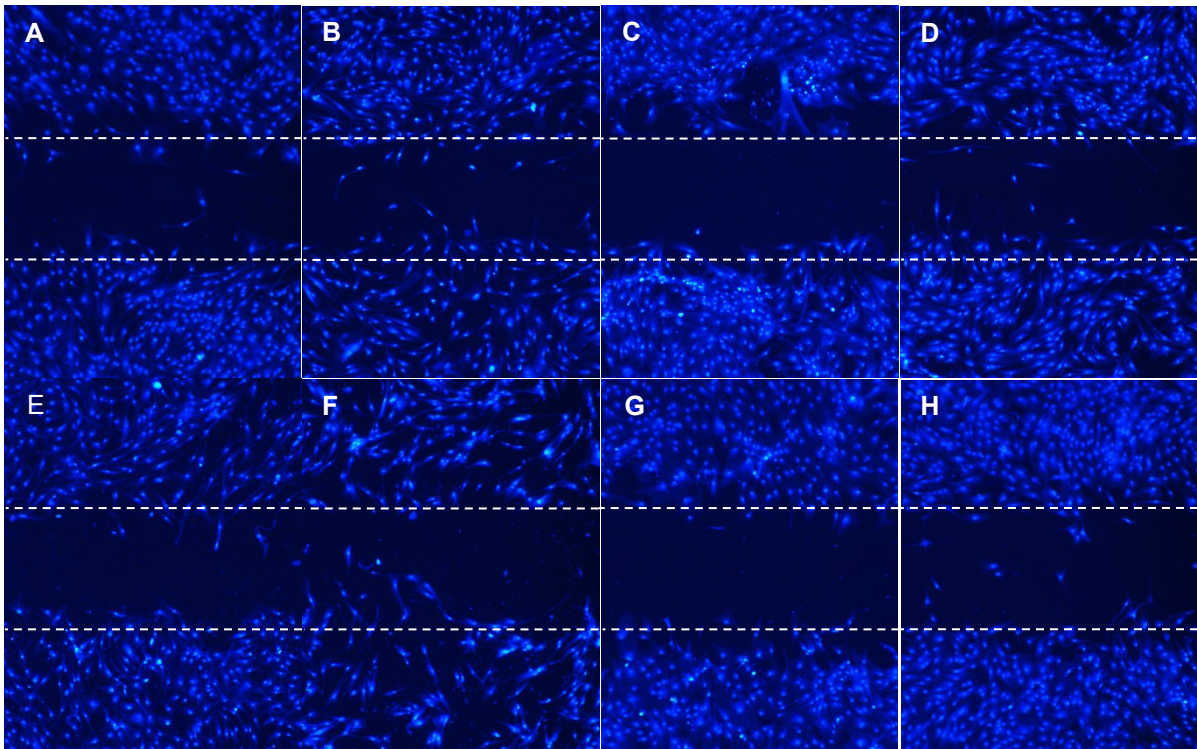


Abb. 3.18 Einfluss von Thrombin und SPHK-1 auf das Migrationsverhalten von SMC.

Dargestellt sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen des in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Versuchs. Die Inkubation erfolgte nach 48 h Serumentzug und Transfektion über weitere 96 h in 24 *well* Platten. Die Zellzahl innerhalb des *scratch* wurde pro Versuch in Triplets bestimmt und der Mittelwert für die quantitative Auswertung genutzt. A=Kontrolle, B=Kontrolle+ Thrombin, C=Kontroll siRNA, D=Kontroll siRNA+ Thrombin, E=SPHK-1 siRNA, F=SPHK-1 siRNA+Thrombin, G=SPHK-1 Inh., H=SPHK-1 Inhibitor+Thrombin.

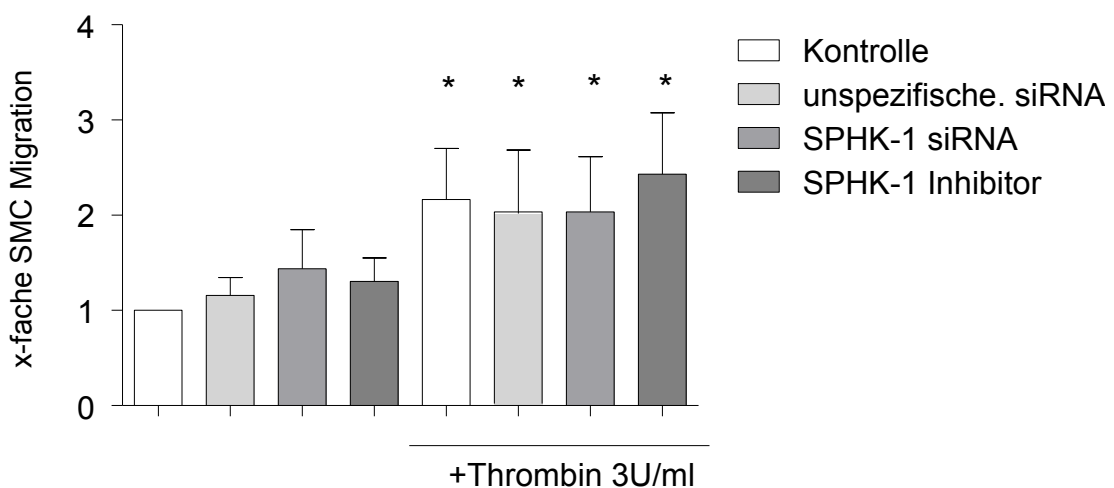


Abb. 3.19 Einfluss von Thrombin und SPHK-1 auf das Migrationsverhalten von SMC.

Quantitative Auswertung des in Abschnitt 3.4.3 erläuterten Migrationsversuchs. Der Versuch wurde durchgeführt wie in 2.15 beschrieben. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte SMC eingesetzt, als Positivkontrolle Thrombin (3 U/ml) behandelte Zellen. Beide Gruppen wurden mit unspez. siRNA, Die Inkubation erfolgte über 96 h in 24 *well* Platten (* $p < 0.05$, $n = 5$).

3.4.4 Einfluss von Dabigatran auf die Plaque Entwicklung in Maus Aorten

Da in den bisher beschriebenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass Thrombin sowie die SPHK-1 synergistisch an der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen beteiligt sind und die SPHK-1 Expression in Mauseorten nach Verfütterung des Thrombininhibitors Dabigatran auf 50% reduziert ist, sollte im Folgenden geklärt werden, welchen Einfluss Dabigatran (10 mg /g Futter) auf die Plaqueentwicklung ApoE defizienter Mäuse hat. Für diesen Versuch wurden Mäuse über einen Zeitraum von 6 Monaten mit Dabigatran versetztem Futter behandelt. Im Alter von 6 Monaten wurden die Tiere getötet und die Aorten entnommen. Diese wurden mittels Öl-Rot gefärbt und die Plaque besetzte Fläche vermessen. Die Auswertung wurde mit dem *NIH Freewareprogramm ImageJ 1,42q* ® durchgeführt. Die Summe der vermessenen Plaqueflächen wurde als prozentualer Anteil auf die Gesamtfläche der Aorten bezogen. Es zeigte sich eine im Mittel um 35% signifikant verminderte Plaqueentwicklung bei Dabigatran gefütterten Tieren im Vergleich zu Tieren, die über den gleichen Zeitraum Kontrollfutter verabreicht bekamen.

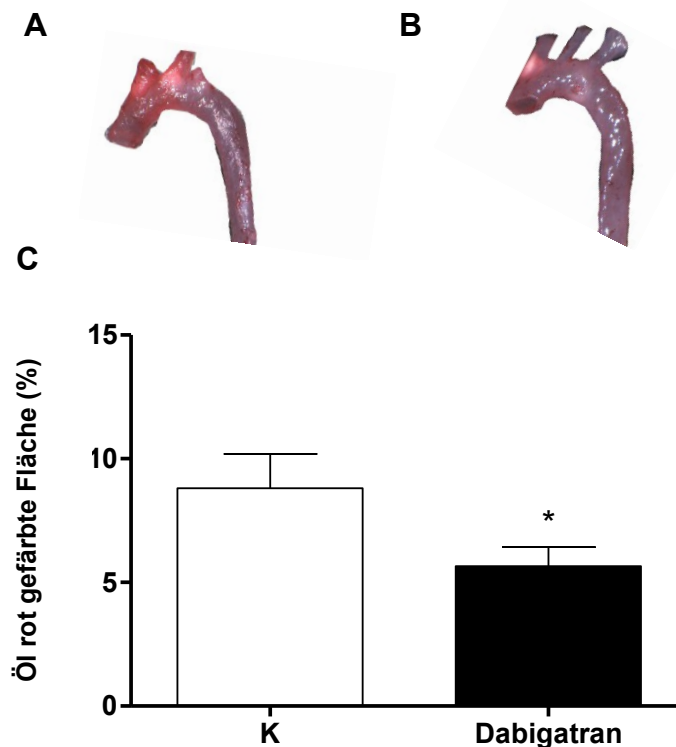


Abb. 3.16 Einfluss von Dabigatran auf die Plaque Entwicklung im Mausmodell

ApoE defiziente Mäuse wurden über 6 Monate mit Dabigatran versetztem Futter (10 mg *dabigatran etixilate* /g Futter) gefüttert. Anschließend wurden die Tiere getötet und die Aorten entnommen. Diese wurden Öl-Rot gefärbt (**B**). Als Kontrolle dienten ebenfalls 6 Monate alte ApoE defiziente Tiere, welche jedoch ausschließlich mit Standardfutter versorgt wurden (**A**); die Größe der Plaques quantitativ ausgewertet (**C**) (* $p < 0.05$, $n = 9-10$).

3.5 Einfluss von S1P auf die mRNA Expression der PAR-Rezeptoren

Das durch die SPHK-1 gebildete S1P dient als zellulärer Mediator (Spiegel, 2002) in SMC. Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob die Thrombin- induzierte SPHK-1 und die damit verbundene erhöhte Menge an S1P einen rückwirkenden Einfluss auf die PAR Rezeptoren hat. Es wurde eine mögliche Regulation, der Thrombinrezeptoren PAR-1, PAR-3, und PAR-4, sowie des zur gleichen Rezeptorfamilie gehörenden FXa Rezeptor PAR-2, nach Thrombinbehandlung *in vitro* untersucht. Zu diesem Zweck wurden SMC in 6 *well* Platten kultiviert und nach 48 h Weiterkultivierung in serumfreien Medium im Zeitverlauf über 24 h für die Zeitpunkte (1 h, 3 h, 6 h, 16 h, 24 h) mit S1P 1 μ M stimuliert. Nach Quantifizierung mittels Realtime PCR zeigte sich für PAR-2 zeigte eine transiente Induktion mit einem signifikanten Maximum 6 h nach Stimulation mit S1P. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine um das 3-fache erhöhte Transkriptmenge detektiert (Abb.3.17 B). Die Regulation von PAR-1, PAR-3 und PAR-4 zeigte zu keinen Zeitpunkt, nach Zugabe von S1P, einen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle. (Abb. 3.17 A,C,D)

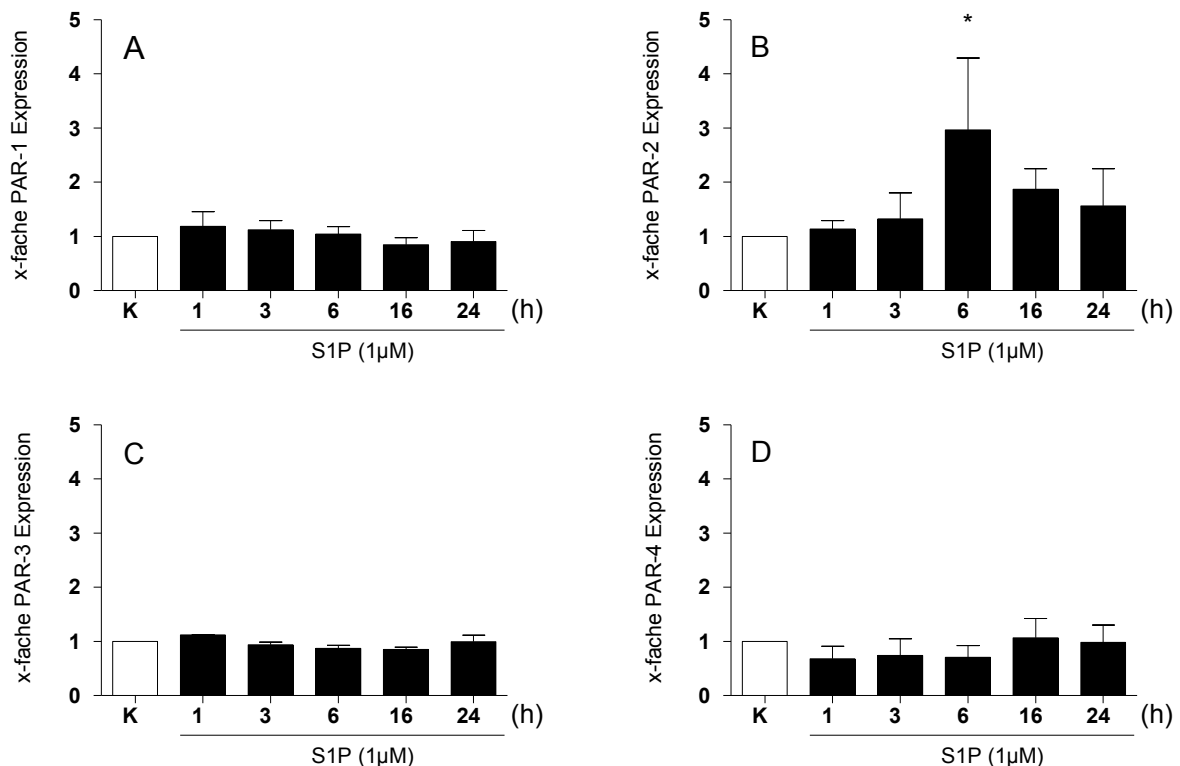


Abb. 3.17 Regulation der PAR-Rezeptoren nach Stimulation mit S1P (1 μ M)

Gezeigt wird die Regulation der PAR Rezeptoren PAR-1 (A), PAR-2 (B), PAR-3 (C), und PAR-4 (D) im Zeitverlauf über 24 h nach Stimulation mit S1P. SMC wurden über einen Zeitraum von 1-24h mit S1P (1 μ M) inkubiert. Anschließend wurde mittels quantitativer Realtime PCR das mRNA Expressionsniveau der PAR Rezeptoren detektiert. Als endogene Kontrolle diente GAPDH. Dargestellt sind sind n=3-5 unabhängige Versuche (* p <0.05, jeweils n=3-5).

3.5.2 Einfluss von S1P auf die Protein und Oberflächenexpression von PAR-2

Von weiterem Interesse war, ob sich die S1P- induzierte PAR-2 Transkriptregulation auch translational auf die Protein und Oberflächenexpression des Rezeptors auswirkt. Mittels Westernblot und Durchflusszytometrie wurde die PAR-2 Protein- und Oberflächenexpression nach Thrombinstimulation (3 U/ml) ermittelt. In beiden Versuchen wurden SMC in 6 *well* Platten ausgesät und nach Erreichen 90%iger Konfluenz in serumfreiem Medium für 48 h weiterkultiviert. Anschließend wurden die SMC im Zeitverlauf über 24 h für die Zeitpunkte (1 h, 3h, 6 h, 16 h und 24 h) mit S1P (1 μ M) stimuliert. Mittels Westernblot wurde eine transiente Erhöhung des PAR-2 Gesamt-Proteins mit einem signifikanten Maximum um das 1,8-fache 6 h nach Stimulation mit S1P detektiert. 24 h nach Zugabe von S1P fällt die Gesamtmenge wieder auf das 1,4-fache des Kontrollniveaus ab (Abb. 3.18 A). Im Durchflusszytometer konnte ebenfalls eine Erhöhung der PAR-2 Oberflächenexpression detektiert werden. Nach quantitativer Auswertung der durchgeführten Versuche wurde nach 16 h Stimulation die 1,9 fache Menge an PAR-2, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, auf der Zelloberfläche detektiert (3.18 B).

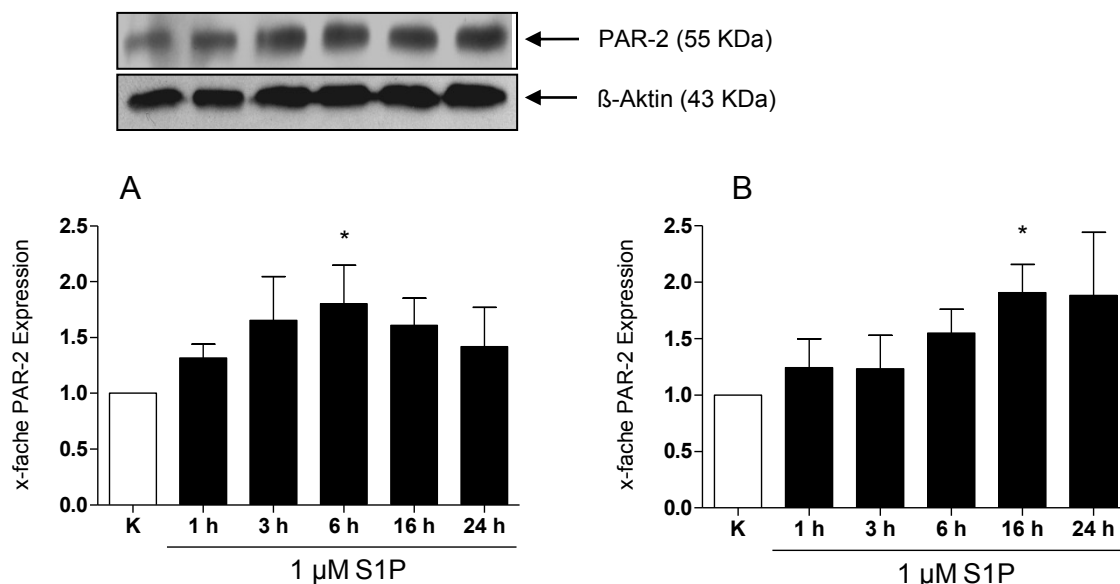


Abb. 3.18 PAR-2 Gesamt-Protein (A) und Oberflächen- Expression (B) nach Stimulation mit S1P (1 μ M)

A: PAR-2 Proteinexpression im Zeitverlauf über 24h. Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot und die densitometrische Auswertung von n=8 Experimenten (*p<0.05, n=8). B: PAR-2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächen-Expression von PAR-2 im Zeitverlauf über 24h und die quantitative Auswertung von n=5 Experimenten (*p<0.05, n=5).

3.5.3 Einfluss von Thrombin auf die Regulation der PAR Rezeptoren

Um zu klären, ob Thrombin analog zu S1P ebenfalls einen Einfluss auf die Expression der PAR Rezeptoren hat, wurden in 6 *well* Platten kultivierte SMC, nach 48 h Serumentzug im Zeitverlauf, über 24h (1h, 3 h, 6 h, 16 h, 24 h) mit Thrombin (3 U/ml) inkubiert. Anschließend wurde eine mögliche daraus resultierende Transkriptregulation der unterschiedlichen Rezeptoren mittels Real Time PCR quantifiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte SMC. Nach quantitativer Auswertung der Daten zeigte sich für den PAR-1 eine signifikante thrombininduzierte Transkriptreduktion 16 h und 24 h nach Stimulation auf das 0,7-fache des Kontrollwertes (Abb.3.19 A). Der PAR-3 zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion nach 16 h und 24 h Inkubationsdauer (Abb.3.19 C). Eine Thrombin vermittelte Regulation des PAR-4 konnte nicht detektiert werden (Abb.3.19 D). Für PAR-2 wurde eine signifikante Erhöhung der Transkriptmenge auf das ca. 1,7-fache 16 h und 24 h nach Stimulation mit Thrombin (3 U/ml) detektiert (Abb.3.19 B)

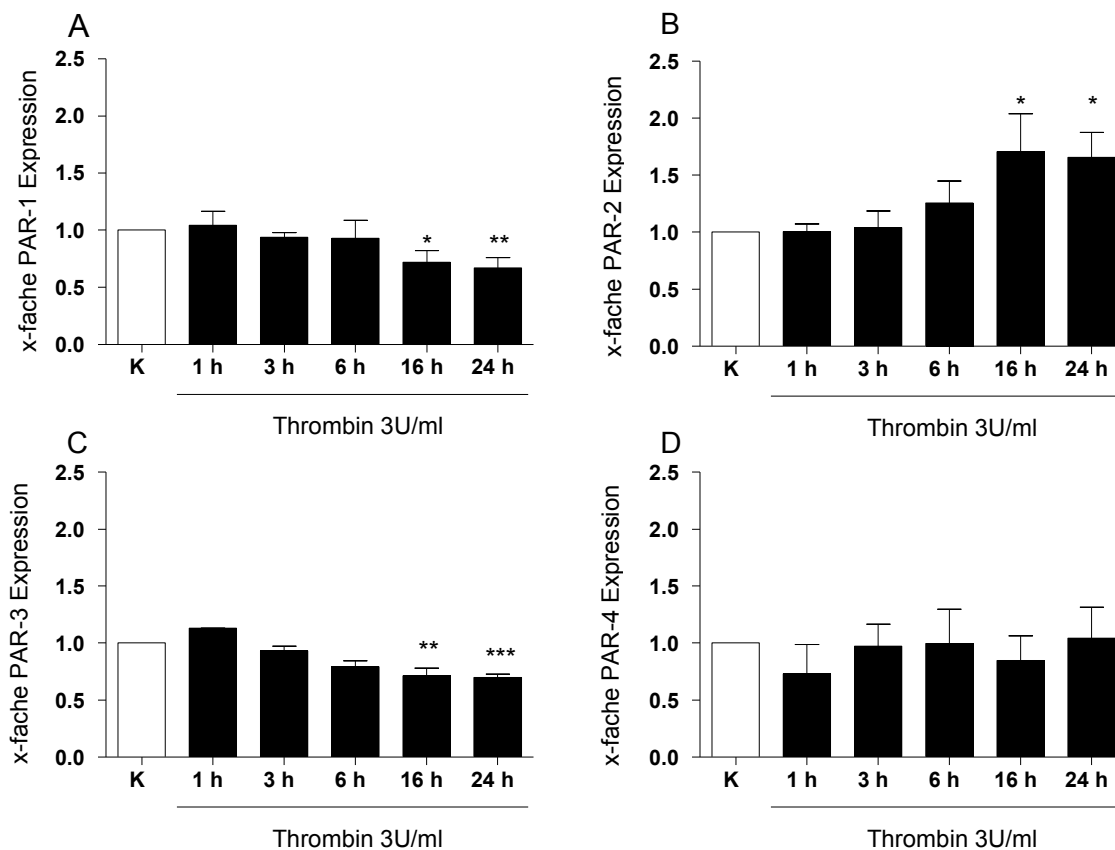


Abb.3.19 Regulation der PAR-Rezeptoren nach Stimulation mit Thrombin (3 U/ml)

A: Einfluss von Thrombin auf die PAR-1 (A), PAR-2 (B), PAR-3 (C), PAR-4 (D) mRNA Expression (* $p < 0.05$, $n = 3-4$ für alle Versuche).

3.5.4 Einfluss von Thrombin auf die Regulation des PAR-2 Rezeptors

Nachdem gezeigt wurde konnte, dass Thrombin das Transkript von PAR-2 signifikant reguliert, wurde als nächstes untersucht ob sich diese Regulation auf Proteinebene bestätigt. Zu diesem Zweck wurden in 6 *well* Platten kultivierte SMC nach 48 h Serumentzug im Zeitverlauf über 24h (1 h, 3 h, 6 h, 16 h, 24 h) mit Thrombin (3 U/ml) stimuliert. Anschließend wurde mittels Westernblot die Proteinexpression ermittelt. Es ergab sich nach quantitativer Analyse von n=5 Versuchen eine signifikante Erhöhung der PAR-2 Proteinmenge 16-24 h nach Stimulation um das 2,3 und 2,4-fache des Kontrollwertes. Zwischen 1h und 6h nach Stimulation zeigte sich eine tendenzielle nicht signifikante transiente Erhöhung des PAR-2. Als Kontrolle dienten unbehandelte SMC (Abb. 3.20).

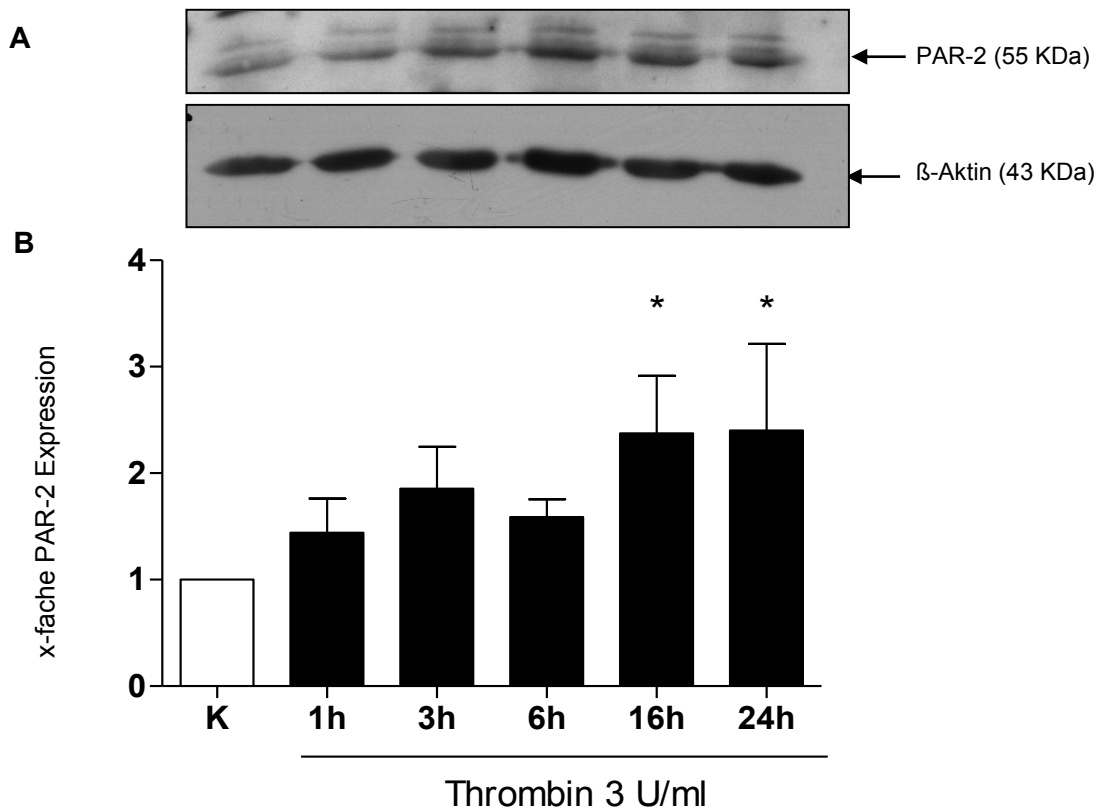


Abb.3.20 Einfluss von Thrombin auf die PAR-2 Protein Expression im Zeitverlauf.

A: Repräsentativer Westernblot mit zugehöriger β -Aktin Kontrolle. Dargestellt ist die PAR-2 Proteinexpression nach Stimulation mit Thrombin (3 U/ml) im Zeitverlauf. B: Quantitative Auswertung der Westernblots. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte, sowie mit Kontroll- SMC eingesetzt (* $p < 0.05$, n=5).

3.5.5 Einfluss der Thrombin- induzierten SPHK-1 auf die PAR-2 Regulation

Nachdem der Einfluss von Thrombin und S1P auf die PAR-2 Expression gezeigt werden konnte, sollte geklärt werden ob ein direkter Zusammenhang zwischen thrombininduzierter SPHK-1 Expression, des dadurch erhöhten S1P Gehalts, sowie der PAR-2 Expression besteht. Zu diesem Zweck wurden SMC mit SPHK-1 siRNA transfiziert und die PAR-2 Expression nach Thrombinbehandlung mittels Westernblot detektiert und quantifiziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte, sowie mit Kontroll-siRNA transfizierte SMC. Die Thrombinstimulation erfolgte über 16 h, da zu diesem Zeitpunkt die stärkste PAR-2 Induktion detektiert wurden ist. In beide Kontrollen zeigte sich nach Thrombininkubation eine 1,9 fache, signifikante Erhöhung der PAR-2 Proteinexpression. In SPHK-1-siRNA transfizierten Zellen konnte nach Thrombinbehandlung keine Veränderung der PAR-2 Expression detektiert werden (Abb. 3.21).

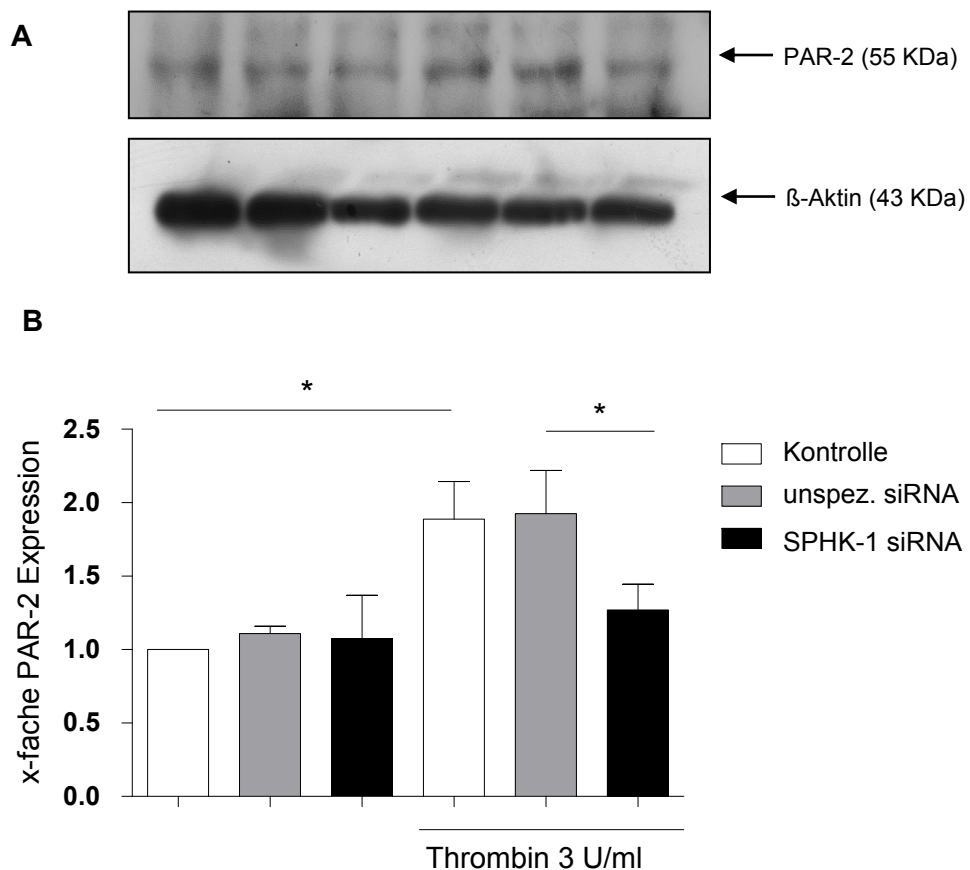


Abb.3.21 Einfluss der Thrombin- induzierten SPHK-1 auf die PAR-2 Protein Expression

SMC wurden mit Kontroll siRNA und SPHK-1 siRNA transfiziert. Anschließend wurden mittels Westernblot mögliche regulationsunterschiede gemessen. Dies wurde sowohl mit thrombinstimulierten SMC als auch mit nicht stimulierten Zellen durchgeführt. Die Thrombinstimulation erfolgte über 16 h. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot aus n=3 Experimenten (A) sowie die zugehörige quantitative Auswertung (B) (*p<0.05, n=3).

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte für glatte Gefäßmuskelzellen erstmals gezeigt werden, dass die SPHK-1 selektiv über den PAR-1 Rezeptor durch Thrombin- induziert wird. Dies konnte sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene bestätigt werden. Auf die SPHK-2- Regulation hat Thrombin keinen Einfluss. An der Induktion beteiligt ist das HuR Protein. Die Regulation von SPHK-1 erfolgt über posttranskriptionelle Stabilisierung der SPHK-1 mRNA durch HuR. Es konnte nachgewiesen werden, dass Thrombin die Bindung von HuR an SPHK-1 mRNA sowie das cytosolische *shuttling* dieses Komplexes induziert und somit das Transkript stabilisiert. Thrombinbehandelte SMC zeigten im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen ein erhöhtes Proliferations- und Migrationsverhalten, jedoch konnte nur für die erhöhte Proliferation der Zellen ein direkter Zusammenhang zwischen Thrombin- und SPHK-1 detektiert werden. Eine durch Thrombin- induzierte Migrationserhöhung steht somit nicht in Zusammenhang mit der SPHK-1 Expression. Weiterhin konnte durch die Fütterung von Dabigatran, an ApoE defiziente Mäuse, eine Reduzierung der Plaquebildung im Aortenursprung detektiert werden, die mit einer Reduktion der SPHK-1 einherging. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Thrombin die SPHK-1 anteilig über posttranskriptionelle Stabilisierung reguliert, war von weiterem Interesse, ob durch die erhöhte Expression der SPHK-1 die Thrombinrezeptoren PAR-1, PAR-3 und PAR-4, sowie der FXa Rezeptor PAR-2 durch das gebildete Signallipid S1P, rückwirkend reguliert werden. Nach Durchführung entsprechender Versuche ergab sich, das S1P ausschließlich auf die PAR-2 Rezeptoren einen induzierenden Effekt zeigte. Dies konnte sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene bestätigt werden. Die übrigen PAR Rezeptoren zeigten nach S1P Behandlung keine Regulationsunterschiede. Es wurde weiterhin nachgewiesen, dass Thrombin einen Effekt auf die PAR-2 Rezeptorenregulation hat. Dies konnte sowohl auf Transkript als auch auf Proteinebene bestätigt werden. Weiterhin konnte geklärt werden, dass diese Regulation durch Inhibierung der SPHK-1 mit siRNA ausbleibt.

4. Diskussion

Der Schlüsselbefund der vorliegenden Arbeit ist die Induzierung der SPHK-1 in glatten Gefäßmuskelzellen durch Thrombin, sowie der damit verbundenen selektiven Wirkung auf die Zellproliferation. Die durch Thrombin-induzierte Zellmigration wird nicht von der SPHK-1 Expression beeinflusst. Bei der Regulation der SPHK-1 durch Thrombin ist das Human-Antigen R (HuR) involviert. HuR reguliert die SPHK-1 posttranskriptional über RNA Stabilisierung. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Thrombin den PAR-2 Rezeptor über das durch die SPHK-1 gebildete S1P sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene reguliert. In ApoE-defizienten Mäusen wurde durch den Einsatz des Thrombininhibitors Dabigatran eine im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant geringere SPHK-1 Expression und geringere Plaque Bildung in den Aorten gezeigt.

4.1 SPHK-1 Regulation durch Thrombin

Der Großteil des gebildeten Thrombin (>95%) entsteht im Anschluss an die Hämostase (Schrör *et al.*, 2010). Es ist daher nicht überraschend, dass das zentrale Protein der Blutgerinnung auch profunde Effekte auf praktisch jeden Aspekt der Gefäßwandbiologie hat, einschließlich Regulierung des vaskulären Tonus, Proliferation und Migration von SMC, bei der Gefäßentwicklung; sowie in Athero- und Angiogenese (Patterson *et al.*, 2001; Rauch *et al.*, 2010). Thrombin vermittelt seine zellulären Effekte über die Protease-aktivierten Rezeptoren PAR-1, PAR-3, und PAR-4. Nach Aktivierung binden die PAR an bis zu drei G-Proteine und vermitteln über diese ihre zellulären Effekte (Rauch *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2002). S1P, ein durch die SPHK-1 gebildetes Signallipid, reguliert sowohl die zelluläre Migration (Hait *et al.*, 2006) als auch die Proliferation (Spiegel, 2002). Die Wirkung von Thrombin auf die SPHK-1 wurde bisher ausschließlich in der humanen Lungenkarzinomzelllinie (A549) und in der Nabelschnurendothelzelllinie (HUVEC) beschrieben (Billich *et al.*, 2009). Billich postulierte sowohl für A549 als auch für HUVEC eine über den PAR-1 vermittelte transiente Induzierung der SPHK-1.

Da gezeigt werden konnte, dass in humanen Atherektomie-Proben die SPHK-1 Expression in den SMC sehr stark ausgeprägt ist (Abb. 3.1) und neben Endothelzellen auch die migrierten SMC zur Stabilisierung des Plaques beitragen, stellte sich die Frage, ob Thrombin Migration und Proliferation der SMC teilweise über eine Induktion der SPHK-1 vermittelt. Es zeigte sich analog zu den Daten von Billich *et al.*, 2009 für Endothelzellen, ebenfalls eine

transiente Induktion der SPHK-1. In der vorliegenden Arbeit wurde eine maximale Induktion der SPHK-1 mRNA 6 h nach Thrombin Stimulation gemessen (Abb. 3.2). Dieser Effekt war nach 16 h jedoch vollständig normalisiert.

Im Vergleich zur SPHK-1 zeigte sich bei der SPHK-2 nach Thrombinbehandlung kein Unterschied in der Transkriptregulation (Abb. 3.3). Dies passt zur entgegengesetzten Funktion der beiden Isoformen. Im Gegensatz zur SPHK-1, die Wachstum und Überleben der Zellen fördert, führt eine erhöhte Expression der SPHK-2 zur Induktion von Apoptose, und einer verminderten Zellproliferation (Liu, 2003). Neben der erhöhten Transkription der SPHK-1 durch Thrombin konnte auch eine zeitlich verzögerte signifikant gesteigerte SPHK-1 Proteinexpression mittels Westernblot detektiert werden (Abb. 3.5). Hierbei zeigte sich die stärkste Induktion erst 16 h nach Zugabe von Thrombin. Wie auch andere physiologische Agonisten zeigte sich die Wirkung von Thrombin auf die SPHK-1 konzentrationsabhängig in einem transienten Verlauf. So konnte bereits eine geringe Konzentration von Thrombin (0,3 U/ml) eine leichte Induktion der SPHK-1 bewirken. Ein Maximum wurde bei 3 U/ml Thrombin detektiert. Beim Einsatz von 10 U/ml Thrombin war die detektierte SPHK-1 Induktion wieder leicht regressiv (Abb. 3.4). Die hervorgerufenen Antworten der Zielzelle, durch die vorherrschende Thrombinkonzentration, sind entscheidend für eine funktionierende vaskuläre Homöostase (Ishii *et al.*, 1993). Es ist bekannt das Thrombin über PAR-1 Aktivierung einen bimodularen Effekt auf die Endothelpermeabilität hat und dieser auch konzentrationsabhängig ist. So wirkt Thrombin in niedrigen Konzentrationen (pM) schützend auf die Endothelpermeabilität und stört diese erst in hohen Konzentrationen (nM) (Bae *et al.*, 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass niedrige Konzentration von Thrombin oder auch von PAR-1 AP signifikante antiinflammatorische Funktionen bewirken. Hohe Konzentration von Thrombin oder PAR-1 AP wirken hingegen inflammatorisch (Bae *et al.*, 2009). Letztgenanntes könnte in Bezug auf die hier gezeigten Ergebnisse von Bedeutung sein. So tritt Thrombin in gesunden Gefäßen nicht in Kontakt mit SMC, da es vom Endothel abgeschirmt wird. Erst durch Gefäßverletzung oder bei einer endothelialen Dysfunktion gelangt Thrombin an die Gefäßmuskelzellen (Wojta *et al.*, 1993). In diesem Fall wirken hohe Konzentrationen an Thrombin auf die Endothelzellpermeabilität und ermöglichen so erst den Kontakt zu den SMC. Die endotheliale Dysfunktion ist ein entscheidender Faktor bei der Entstehung von Inflammationen (Kelm *et al.*, 1999).

Ferner ist die PAR Expression in kontraktilen Gefäßmuskelzellen sehr gering. Sie wird jedoch nach Gefäßverletzung deutlich induziert. PAR-1, PAR-2 und PAR-3 vermitteln Thrombin- induzierte Migration, Proliferation sowie die Matrix Biosynthese und die Synthese von inflammatorischen und Wachstums fördernden Mediatoren (Schrör *et al.*, 2010). Angesichts der Tatsache, dass die SPHK-1 durch Thrombin Zeit und

konzentrationsabhängig reguliert wird, stellte sich die Frage über welchen der drei beschriebenen Thrombin Rezeptoren die Induktion der SPHK-1 vermittelt wird. Um dies zu zeigen, wurden in dieser Arbeit spezifische PAR aktivierender Peptide eingesetzt. Es zeigte sich nach Einsatz des PAR-1 aktivierenden Peptids, dass die Induktion der SPHK-1 nachgeahmt werden konnte (Abb.3.6). PAR-3 und PAR-4 aktivierende Peptide zeigten keinen induzierenden Effekt auf die SPHK-1 Expression (Abb. 3.6). Dies passt dazu, dass PAR-1 in SMC der am stärksten exprimierte Thrombin Rezeptor ist und im Vergleich zu PAR-3 und PAR-4 am einfachsten aktiviert werden kann (Schrör *et al.*, 2010). Die leichte Aktivierbarkeit des PAR-1 könnte auch die signifikante Induktion der SPHK-1 bei relativ niedrigen Konzentrationen von Thrombin erklären.

Weiterhin konnte in murinen aortalen Plaques eine deutlich höhere Menge SPHK-1 detektiert werden als in der darunter liegenden Intima (Abb. 3.7). Der Grund für die verstärkte SPHK-1 Expression der im Plaque Bereich lokalisierten Muskelzellen, liegt vermutlich an der beschriebenen Thrombin vermittelten Steigerung der Endothelpermeabilität (van Nieuw Amerongen *et al.*, 1998). Nach Öffnung des Endothels gelangt Thrombin an die SMC und induziert die SPHK-1 über den PAR-1. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die SPHK-1 in SMC durch Thrombin selektiv über den PAR-1 Rezeptor induziert wird war von weiterem Interesse ob die Hemmung von Thrombin einen Einfluss auf die SPHK-1 Expression im Tiermodell zeigt. Zu diesem Zweck konnte neben der beschriebenen Regulationsveränderung der SPHK-1 *in vitro*, in Aorten ApoE defizienter Mäuse, die über einen Zeitraum von 6 Monaten mit Dabigatran (10 mg/g) versetztem Futter gefüttert wurden, nachgewiesen werden, dass die SPHK-1 Regulation um ca. 50% geringer ist als in Tieren welche mit Dabigatran freiem Futter gefüttert wurden. Dies impliziert ebenfalls einen Einfluss von Thrombin auf die SPHK-1 Expression, jedoch kann dieser nicht auf die SMC reduziert werden, da in Mausearten neben SMC auch große Mengen an Endothelzellen und Fibroblasten vorkommen. Die Reduktion der SPHK-1 in den Mausearten ging mit einer Verminderung der Plaque Fläche einher, was wiederum für eine Reduzierung der SPHK-1 in glatten Muskelzellen spricht, da SMC in hohem Maße an der Plaque- Bildung und Stabilisierung beteiligt sind (Abb. 1.1). Durch die Herabsetzung der SPHK-1 Expression scheint die Plaque Bildung zwar beeinträchtigt zu sein, jedoch besteht die Gefahr, dass bei einer schwerwiegenden Verletzung nicht ausreichend Thrombin zur Verfügung steht, um die SPHK-1 in SMC zu aktivieren. Dieser Umstand kann einen erheblichen Nachteil im Hinblick auf die Gefäßreparatur zur Folge haben. Weiterhin bleibt die Gefahr bestehen, dass ein Plaque, welches unter Einfluss des Thrombininhibitors gebildet wird, einen deutlichen Stabilitätsverlust aufweist. Die entstandene fibrotische Kappe könnte aufgrund der geringen Anzahl migrierter SMC deutlich dünner und instabiler sein, was die Gefahr eines Herzinfarkts oder Schlaganfalls deutlich erhöhen könnte.

Im Gegensatz hierzu konnte in einer klinischen Studie aus dem Jahr 2009 gezeigt werden, dass Patienten mit Vorhofflimmern, die Dabigatran in einer Dosierung von 110 mg erhalten haben, die gleichen Raten von Schlaganfällen und systemischen Embolien zeigten wie Warfarinbehandelte Patienten (Connolly *et al.*, 2009). Im Vergleich zur Warfarinbehandlung wiesen die Patienten jedoch weniger schwere Blutungen auf. Bei einer Dosierung von 150 mg zeigten sich niedrigere Raten von Schlaganfällen und Embolien im Vergleich zu Warfarin, jedoch war dies mit einer ähnlich hohen Rate an schweren Blutungen assoziiert (Connolly *et al.*, 2009). Im Hinblick auf die bereits beschriebenen Daten könnte die hohe Konzentration von Dabigatran mit einer drastischen Verminderung der Zellproliferation und Migration in Zusammenhang stehen. So könnte in diesem speziellen Fall die Wundheilung in den Gefäßen deutlich vermindert sein und in Folge dessen eine Einblutung erleichtert werden. Ein weiterer Vorteil des Dabigatrans ist seine Metabolisierung. Es wird nicht wie Warfarin über das P450 System, sondern von Dabigatranetexilat über Plasma Esterasen in die aktive Form, Dabigatran, metabolisiert. Dabigatran bindet hochspezifisch an Gerinnsel gebundenes und freies Thrombin. Es weist weiterhin eine vorhersagbare Pharmakogenetik auf, die eine sichere orale Dosierung ermöglicht (Stangier *et al.*, 2008).

4.2 Posttranskriptionelle Regulierung der SPHK-1 durch mRNA Stabilisierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in tumorigenisierten embryonalen Maus Fibroblasten die SPHK-1 durch HuR stabilisiert wird, (Sobue *et al.*, 2008) war von Interesse ob die SPHK-1 durch Thrombin in SMC ebenfalls posttranskriptionell über HuR reguliert werden kann. HuR bindet an AU-reiche Elemente der 3'untranslatierten Region der mRNA und wird mit dieser gemeinsam aus dem Zellkern transportiert (Doller *et al.*, 2008; Misquitta *et al.*, 2001). Die SPHK-1 besitzt keine klassische Bindungsstelle für HuR jedoch wird vermutet, dass HuR an einem Uracil Tetramer in der untranslatierten 3'Region des Transkriptes bindet (Sobue *et al.*, 2008). Zuerst wurde die SPHK-1 Transkriptreduktion im Zeitverlauf unter Einfluss von Actinomycin D beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass das SPHK-1 Transkript in glatten Gefäßmuskelzellen einem schnelleren Verfall unterliegt, wenn die Zellen nicht mit Thrombin behandelt wurden. Der stärkste gemessene Unterschied wurde 3 Stunden nach Versuchsbeginn detektiert.

Zur gleichen Zeit wurde eine Zunahme an cytosolischem HuR, nach Thrombinbehandlung, gemessen und durch den Einsatz von HuR spezifischer siRNA wurde die Thrombininduzierte SPHK-1 Regulation deutlich vermindert. Mit Hilfe von Immunopräzipitationen (*pull-down*) PCR wurde nachgewiesen, dass Thrombin die Bindung von HuR an die SPHK-1 mRNA vermittelt.

Auf diese Weise können bei anhaltender Induktion der SPHK-1 durch Thrombin ausreichende Mengen an SPHK-1 gebildet werden, während in Abwesenheit von Thrombin das Transkript schneller abgebaut wird. Die HuR Expression ist in proliferativen vaskulären Erkrankungen wie Intima Hyperplasie und neointimaler Proliferation im atherosklerotischen Plaque sowie bei der Restenose von venösen Bypässen erhöht (Pullmann *et al.*, 2005). Die Aktivierung der SPHK-1 steht im Zusammenhang mit Migration, Aktivierung, Differenzierung, Proliferation und Überleben von aktivierten SMC (Francy *et al.*, 2007). Eine posttranskriptionelle Regulation der SPHK-1 durch HUR könnte insofern eine wichtige Rolle bei Gefäßkrankheiten haben.

Ist die Induktion der SPHK-1 einerseits beim Auftreten einer Wunde aufgrund ihrer proliferationsfördernden Eigenschaften von Vorteil, so ist andererseits ihre Aktivierung bei pathogenen Erkrankungen, die aus einer Hyperproliferation von SMC resultieren, wie Atherosklerose, von Nachteil. Die Ergebnisse diese Arbeit lassen einen Zusammenhang zwischen Thrombin, HuR und SPHK-1 vermuten. Die beschriebene Überexpression von HuR in einigen Krankheitsbildern könnte bei einer Aktivierung durch Thrombin und einer daraus resultierenden Translokation von HuR in das Cytosol noch deutlich mehr SPHK-1 Transkript stabilisieren. Dies hätte eine Erhöhung der SPHK-1 mit dem gleichen pathologischen Hintergrund zur Folge. Folgeschwer kommt noch hinzu das die PAR-Rezeptoren in SMC nach Endothelverletzung stark aufreguliert werden (Schrör *et al.*, 2010) und so Thrombin eine noch stärker Wirkung auf die HuR Translokation hat.

Es wäre von daher wichtig die SPHK-1 Stabilisierung in entarteten Zellen zu verhindern, da der beschriebene Effekt von HuR und SPHK-1 synergistisch erscheint. Dass die SPHK-1 nach Thrombinstimulation in SMC nicht ausschließlich posttranskriptionell stabilisiert wird liegt möglicherweise daran, dass die SPHK-1 auch nach PKC und ERK Aktivierung induziert wird und Thrombin sowohl PKC und ERK aktiviert (Serrano-Sanchez *et al.*, 2008; Webb *et al.*, 1993) Es wäre aber durchaus möglich mit neuen Methoden das unkontrollierte proliferieren von Zellen verhindern. Gerade in Anbetracht der Tatsache, dass die Expression der SPHK-1 über Akkumulation der eigenen mRNA deutlich verstärkt wird, könnte man als Strategie auch im Hinblick auf Krebsbehandlungen siRNA oder SPHK-1 Inhibitoren als Behandlungsstrategie in Betracht ziehen (Sobue *et al.*, 2008).

4.3 Funktionelle Konsequenzen der Thrombininduzierten SPHK-1 Erhöhung in SMC

Zusammen mit Apoptose sind sowohl die Proliferation als auch die Migration von SMC für die Pathogenese der Atherosklerose unabdingbar (Rudijanto, 2007). Auch in der vorliegenden Arbeit sollte der Zusammenhang zwischen Thrombin und SPHK-1 in Bezug auf Proliferation und Migration geklärt werden.

Zunächst sollte in einem Kontrollversuch untersucht werden, ob die in dieser Arbeit genutzten SMC *in vitro* durch endogenes Thrombin hinsichtlich Ihrer Mitogenese beeinflusst werden. Mit Hilfe des Einbaus von [³H] Thymidin konnte, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, bestätigt werden, dass die DNA- Neusynthese in den humanen SMC durch künstliche Gerinnsel deutlich gesteigert ist. Diese durch das Gerinnsel erhöhte Mitogenese sinkt jedoch signifikant bei vorheriger Inkubation der Zellen mit dem Thrombininhibitor Hirudin. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits in Abschnitt 4.1 beschriebenen Daten hinsichtlich der Plaque Bildung in den Mäusen. Der im Tierversuch genutzte Thrombininhibitor Dabigatran führte zu einer signifikant geringeren Plaque Fläche in Aorten von 6 Monate alten Tieren. Das impliziert ebenfalls eine geringere Proliferation der Zellen. Nachdem es gelungen ist die SPHK-1 mittels siRNA auf ca. 50% herabzuregulieren, wurde in einem weiteren Versuch untersucht wie sich das Proliferationsverhalten der SMC *in vitro* unter Einsatz von SPHK-1 siRNA sowie eines SPHK-1 Inhibitors im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen verändert. Es wurde nachgewiesen, dass der Einsatz von SPHK-1 siRNA, sowie des SPHK-1 Inhibitors keinen Unterschied im Proliferationsverhalten der SMC im Vergleich zu unbehandelten Zellen *in vitro* bewirkt. Wurden die Zellen jedoch stimuliert so zeigte sich eine signifikante Zunahme der Zellproliferation der unbehandelten SMC während die zuvor mit SPHK-1 siRNA und SPHK-1 Inhibitor behandelten Zellen hier keine Steigerung zeigten. Im Rahmen des *in vitro* Versuch war es nicht möglich die Gesamtanzahl der SMC durch Einsatz der SPHK-1 siRNA zu verringern noch einen Unterschied im Phänotyp der Zellen zu erkennen. Diese Daten passen zu bereits publizierten Ergebnissen, welche besagen, dass sich in SPHK-1 Knockout Mäusen keine phänotypischen Unterschiede zum Wildtyp finden (Allende *et al.*, 2004). Sie sind entwicklungsfähig, fruchtbar und zeigen keine offensichtlichen Abnormitäten. Weiterhin konnte selbst bei einem Knockout der SPHK-1 diese zwar im Wesentlichen, jedoch nie vollständig reduziert werden, was für das Vorhandensein mehrerer Sphingosinkinasen spricht (Allende *et al.*, 2004). Wurden die SMC jedoch mit Thrombin stimuliert, so zeigte sich nur bei den unbehandelten, sowie bei den mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen eine Induktion der Proliferation. Mit SPHK-1 siRNA und SPHK-1 Inhibitor behandelte SMC zeigte diese Induktion nicht. Dies wiederum spricht deutlich dafür, dass nur die SPHK-1 durch Thrombin aktiviert wird. Diese Ergebnisse sind

auch im Hinblick auf die unterschiedlichen Funktionen der SPHK-1 und SPHK-2 nachzuvollziehen. Während die SPHK-1 die Proliferation der SMC fördert, begünstigt die SPHK-2 die Induzierung von Apoptose in den SMC. Neben der Proliferation ist auch die vaskuläre Migration ein sehr wichtiger Prozess im Zusammenhang mit Gewebereparatur nach Gefäßverletzung. Eine zu starke Migration fördert jedoch auch die Verengung der Gefäße. Es ist bereits bekannt, dass Thrombin *in vitro* die Migration erhöht und *in vivo* an der Gewebereparatur beteiligt ist. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen Thrombin, SPHK-1 und SMC Migration besteht. *In vitro* wurde dies mit Hilfe des *wound-scratch Assay* untersucht (2.17) (Weber *et al.*, 2000). Hierbei konnte gezeigt werden, dass Thrombin die Migration der SMC induziert, dies aber vollkommen unabhängig von der SPHK-1 Expression geschieht. Der Einsatz von SPHK-1 siRNA sowie der Einsatz eines spezifischen Inhibitors der SPHK-1 zeigten keinen Einfluss auf die SMC Migration. Auch nach Behandlung der Zellen mit Thrombin und der dadurch injizierten Induktion der Migration konnte kein Unterschied zwischen SPHK-1 siRNA transfizierten SMC und Kontroll SMC detektiert werden. Dass die Induktion der SPHK-1 in SMC nicht in Zusammenhang mit der Migration der Zellen steht, kann unter anderem daran liegen das unterschiedliche S1P Rezeptoren auf den glatten Gefäßmuskellzellen exprimiert werden. Von insgesamt fünf bisher beschriebenen S1P Rezeptoren finden sich in glatten Gefäßmuskellzellen der S1P1, S1P2 und der S1P3 Rezeptor. Diese zeigten unterschiedliche Funktionen durch S1P vermittelte Aktivierung. S1P stimuliert in glatten Gefäßmuskellzellen die Migration der Zellen über den S1P1 Rezeptor (Allende *et al.*, 2002). Mit Hilfe von S1P Antagonisten wurde von anderen Arbeitsgruppen bereits bestätigt, dass bestimmte S1P Rezeptor Subtypen die phänotypische Modulation der SMC unterschiedlich regulieren. Bei einer Reaktion auf eine akute Verletzung der Carotis bei Ratten konnte eine transient erhöhte S1P1/S1P3 Rezeptor Expression gemessen werden, während die Expression des S1P2 Rezeptors reduziert war und erst 7 bis 10 Tage nach Verletzung anstieg (Wamhoff *et al.*, 2008) Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nach Inhibierung des S1P2 Rezeptors die S1P induzierte Proliferation potenziert wurde (Wamhoff *et al.*, 2008). Vermutlich führt das nach Thrombin Inkubation gebildete S1P ausschließlich über intrazelluläre Wege zur einer Erhöhung der Proliferation. Der genaue Signalweg, sowie Zellinterne Ziele für S1P sind noch weitestgehend unbekannt (Berdyshev *et al.*, 2011). Bekannt ist, dass S1P die Ca^{2+} Freisetzung in den Zellen begünstigt (Van Brocklyn *et al.*, 1998), während sie durch Sphingosin verhindert wird. Durch das Aktivieren der SPHK-1 kommt es somit zu einer vermehrten Umwandlung von Sphingosin zu S1P. Dies hat wiederum eine erhöhte Kalzium Freisetzung zur Folge. Die Kalzium Freisetzung durch S1P verläuft zum einen über die Membranständigen S1P Rezeptoren, über diese wird PLC aktiviert und Kalzium mobilisiert

Zum anderen konnte auch nachgewiesen werden das S1P unabhängig von PLC die Kalziumfreisetzung initiiert (Mattie *et al.*, 1994), obwohl am Endoplasmatischen Retikulum keine S1P Rezeptoren identifiziert werden konnten (Spiegel *et al.*, 2003). Darüber hinaus wurde gezeigt das S1P auch bei Hefen und höheren Pflanzen, die keine S1P Rezeptoren exprimieren, den Kalzium Spiegel reguliert (Birchwood *et al.*, 2001; Ng *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, dass S1P eine universelle Rolle bei den intrazellulären Signalwegen der Kalzium-Regulation hat.

Jüngste Berichte deuten auf eine Interaktion von S1P und den Histondeacetylasen 1 und 2 in Brustkrebszellen hin. Diese bezieht sich jedoch auf die S1P Produktion die durch die SPHK-2 gefördert wird und ist unabhängig vom SPHK-1 Signalweg (Hait *et al.*, 2009). Die in dieser Publikation beschriebene Verbindung von S1P und Histondeactetylasen deutet auf eine durch die SPHK-2 induzierte erhöhte Proliferation hin. Dies wird jedoch kontrovers diskutiert da die SPHK-2 in anderen Publikationen in Zusammenhang mit Apoptose gebracht wird (Liu *et al.*, 2003; Maceyka *et al.*, 2005). Auch die in dieser Arbeit induzierte Proliferationserhöhung durch Thrombin ist SPHK-2 unabhängig, da diese im Gegensatz zur SPHK-1 nicht durch Thrombin reguliert wird

4.4 Einfluss von S1P auf die PAR Rezeptoren

Im Hinblick auf den Einfluss von Thrombin auf die SPHK-1 sollte in dieser Arbeit im Umkehrschluss untersucht werden ob S1P einen Einfluss auf die Expression der Thrombinrezeptoren hat. Neben den Thrombinrezeptoren PAR-1, PAR-3, und PAR-4 wurde auch der PAR-2, der ebenfalls zu den Protease aktivierten Rezeptoren gehört jedoch nicht von Thrombin aktiviert wird hinsichtlich einer möglichen Regulation durch S1P untersucht. Es ergab sich für den PAR-2 eine transiente Steigerung der Transkriptmenge nach Stimulation mit S1P im Zeitverlauf mit einem signifikanten Maximum nach 6 h (Abb. 3.17b). Ein Einfluss von S1P auf die Thrombinrezeptoren PAR-1, PAR-3 und PAR-4 konnte jedoch nicht gezeigt werden (Abb. 3.17a, c, d). Die Induktion des PAR-2 konnte auf Proteinebene bestätigt werden, auch hier wurde eine transiente Steigerung des Gesamtproteins detektiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde diese Daten bestätigt, die Oberflächenexpression stieg nach S1P Stimulation ebenfalls signifikant an. In gesunden kontraktile Gefäßmuskelzellen wird eine solche Regulation des PAR-2 keine bedeutende Rolle zu Teil werden, da die Menge an FXa in gesunden Gefäßmuskelzellen sehr gering ist. Nach Gefäßverletzung steigt die Menge an gebildetem FXa in gleichem Maße wie Thrombin an und bleibt in der Gefäßwand bis zu einer Woche detektierbar, während Thrombin nach künstlicher Gefäßverletzung nur für 72 h

in der Gefäßwand detektiert werden konnte (Abendschein *et al.*, 2003; Ghigliotti *et al.*, 1998). Neben seiner koagulatorischen Funktion als Gerinnungshemmer, wirkt FXa analog zu Thrombin auf die Matrixsynthese sowie auf die Proliferation von SMC (Rauch, 2002; Rauch *et al.*, 2004). Im Hinblick auf das Vorhandensein und die lang anhaltende Bildung von FXa in der Gefäßwand nach einer Verletzung, würde eine Regulation des PAR-2 durch S1P die Koagulationsunabhängige Wirkung von FXa durch Bereitstellung einer größeren Anzahl an Rezeptoren noch verstärken. Für den PAR-2 ist weiterhin beschrieben das er in Endothelzellen nach Aktivierung mit FXa der Thrombin bedingten Erhöhung der Endothelzellpermeabilität entgegenwirkt (Feistritzter *et al.*, 2005).

4.5 Einfluss von Thrombin auf die PAR Rezeptoren

In Bezug auf den in Abschnitt 4.1 beschriebenen Sachverhalt war von weiterem Interesse, ob ein Zusammenhang zwischen Thrombin- induzierter SPHK-1 Regulation und S1P Wirkung auf den PAR-2 besteht. Zu diesem Zweck wurden zunächst SMC mit Thrombin im Zeitverlauf stimuliert und die Expression des PAR-2 gemessen. Zeitgleich wurde auch eine mögliche Wirkung von Thrombin auf den PAR-1 PAR-3 und PAR-4 untersucht. Es ergab sich für den PAR-1 und den PAR-3 eine Herabregulation des Transkriptes. Beim PAR-4 konnten, nach Zugabe von Thrombin, im Zeitverlauf keine Expressionsunterschiede detektiert werden. Die Reduktion von PAR-1 und PAR-3 ist vermutlich eine Folge von Rezeptordesensibilisierung bei langanhaltender Stimulation. Der PAR-4 Rezeptor wird auf SMC in nur sehr geringen Mengen exprimiert und hat von allen Thrombinrezeptoren die geringste Bindungsaffinität zu Thrombin (Schrör *et al.*, 2010).

Im Gegensatz zu den Thrombin aktivierten PAR Rezeptoren wurde beim PAR-2 16 h und 24 h nach Zugabe von Thrombin eine Transkriptionserhöhung gemessen. Ebenso konnte eine Zunahme des PAR-2 Gesamtproteins im Westernblot gezeigt werden. Mit Hilfe von SPHK-1 spezifischer siRNA sollte als nächstes geklärt werden inwieweit die SPHK-1 an der Thrombin- induzierten PAR-2 Regulation beteiligt ist. Nach Einsatz von SPHK-1 siRNA konnte keine Induktion des PAR-2 durch Thrombinbehandlung detektiert werden. In SMC führt eine induzierende Regulation des PAR-2 über Thrombin auf funktioneller Ebene vermutlich zu einer autokrinen Verstärkung der Zellproliferation und Migration.

Durch Bereitstellung einer größeren Menge von PAR-2 Rezeptoren besteht auf diese Weise eine größere Angriffsfläche für FXa, welcher in SMC durch Aktivierung inflammatorischer Gene ebenfalls Proliferation und Migration von SMC erhöht (Rauch, 2002). Die Rolle von FXa wird für verschiedene Zelltypen sehr unterschiedlich beschrieben (Borensztajn *et al.*,

2008). So wirkt FXa beispielsweise in Karzinomen über PAR-1 inhibierend auf die Zellmigration durch LIMK1 vermittelte cofilin Deaktivierung (Borensztajn *et al.*, 2010). Da FXa der Thrombin- induzierten Verstärkung der Endothelpermeabilität entgegenwirkt (Feistritzer *et al.*, 2005), wäre es in diesem Zusammenhang von Interesse ob Endothelzellen nach Öffnung des Endothels durch Thrombin, über SPHK-1 vermittelter PAR-2 Induktion diesem Effekt entgegenwirken. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die FXa vermittelte Schließung des Endothels durch einen SPHK-1 Inhibitor unterbunden werden kann (Rauch, unveröffentlicht). Auf diese Weise wäre es den Endothelzellen auf autokrine Weise möglich der durch Thrombin erzeugten Steigerung der endothelialen Permeabilität, durch Bereitstellung von PAR-2 Rezeptoren entgegenwirken. Dieser Effekt wird durch eine Erhöhung der FXa Expression nach Gefäßverletzung (Damiano *et al.*, 1999) möglicherweise noch verstärkt.

4.6. Ausblick

Thrombin besitzt neben seiner zentralen Rolle bei der Blutgerinnung, viele weitere regulatorische Aktivitäten, welche in Zusammenhang mit Entzündungen, Allergien, Tumor-Wachstum, Metastasierung, Apoptose und Gewebsremodellierung stehen (Bae *et al.*, 2009). Der erste Hinweis für die Rolle von Thrombin in Bezug auf inflammatorische Wirkungen entstammt der Beobachtung, dass Hirulog, ein Hirudinderivat, Karrageen induzierte Pfotenödeme bei Ratten vermindert (Cirino *et al.*, 2000). Da Thrombin nach Gefäßverletzung mit SMC in Kontakt tritt und über Aktivierung des PAR-1 befähigt ist die SPHK-1 Expression in SMC zu erhöhen könnte eine Verbindung von Thrombin und dem S1P Signalsystem von zentraler Bedeutung bei kardiovaskulärer Gefäßremodulierung Angiogenese und Atherosklerose sein. Gerade im Hinblick auf die Entwicklung und Vermarktung neuer direkter Thrombininhibitoren müssen mögliche koagulationunabhängige Wirkungen von Thrombin diskutiert werden. Aufgrund Ihrer einfachen Darreichungsform und der guten praktischen Handhabung hinsichtlich *compliance* und Laborkontrollen sind direkte Thrombininhibitoren von weitreichendem Interesse. Jedoch wurde der erste direkte orale Thrombininhibitor (Ximelagatran) 2006 wegen Lebertoxizität vom Markt genommen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist Dabigatran in Deutschland bereits zur Prophylaxe nach Hüft-und Kniegelenk Operationen zugelassen. Beim bisherigen Standard Heparin treten durch die Subkutane Applikation häufig Hämatome auf und es besteht das Risiko einer Thrombozytopenie (HIT) (Warkentin *et al.*, 2003). Dabigatran wurde in eine Studie aus dem Jahr 2009 mit Warfarin hinsichtlich der Anwendung bei akuten venösen Thromboembolien verglichen (Schulman *et al.*, 2009). Hierbei stellte sich heraus, dass die Wirkung von Dabigatran der von Warfarin in

Ihrer Effektivität ähnelt und sich auch das Nebenwirkungsprofil gleicht. Ein wichtiger Vorteil Dabigatrans ist jedoch das Wegfallen von Laborkontrollen. Durch das Verabreichen von Dabigatran wird die Zellmigration und Proliferation vermindert. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich verminderter SPHK-1 Expression und vor allem anhand der Plaque Bildung gezeigt werden. Andererseits könnte die Wundheilung oder aber die Stabilität der gebildeten Plaques vermindert sein, da eine reduzierte Menge mobilisierter SMC sich gegebenenfalls auf die Stabilität der fibrotischen Kappe auswirkt. Bestätigt sich die signifikante Verminderung der SPHK-1 Expression durch Dabigatran in weiteren Gewebstypen so wäre die Anwendung von Dabigatran möglicherweise bei Hyperproliferativen Zellerkrankungen indiziert.

Die Angiogenese ist eine entscheidende Komponente für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren. Mehrere Phasen dieses Prozesses, wie Migration, Proliferation, Morphogenese und vaskuläre Stabilisierung sind für ein optimales Tumorwachstum über eine gewisse Größe hinaus benötigt (Shida *et al.*, 2008). Ein Antiangiogener Ansatz zur Krebsbekämpfung wurde durch die Entwicklung von Bevacizumab einem Anti-VEGF-Antikörper, welcher bei fortgeschrittenem Darmkrebs mit herkömmlichen Chemotherapeutika eingesetzt wird, ermöglicht (Shida *et al.*, 2008). Auch S1P ist ein sehr starker angiogener Faktor und induziert die Zellmigration wesentlich stärker als VEGF oder HGF und fördert so die Bildung von Blutgefäßen (Liu *et al.*, 2001). Auch gibt es bereits einen Anti-S1P Antikörper der im Tierversuch erfolgreich Tumor assoziierte Angiogenese verhindern konnte (Visentin *et al.*, 2006). In diesem Zusammenhang wäre die direkte Inhibierung der SPHK-1 eine mögliche weitere alternative. Es gibt bisher noch keine klinischen Anwendungen für SPHK-1 Inhibitoren, jedoch wird aufgrund der Akkumulation von SPHK-1 bei Cancerogenen Erkrankungen bereits die Applikation von SPHK-1 Inhibitoren als Möglichkeit der Behandlung in Betracht gezogen (Sobue *et al.*, 2008). Weiterhin wäre es vorstellbar, dass bei langfristiger Behandlung mit Dabigatran die indirekte Inhibierung der SPHK-1 das S1P/Sphingosin/Ceramid Gleichgewicht in Richtung Sphingosin und Ceramid verlagert, welches die Zellen Apoptose induzieren lässt.

5. Zusammenfassung

Thrombin induziert in glatten Gefäßmuskelzellen des Menschen (SMC) koagulationsunabhängige Wirkungen wie Proliferation und Migration, die Synthese von inflammatorischen Faktoren, sowie der extrazellulären Matrix. Die zellulären Effekte Thrombins werden über die Protease-aktivierten Rezeptoren PAR-1, PAR-3 und PAR-4 vermittelt. PAR-2, ein weiterer Protease aktivierter Rezeptor, wird nicht über Thrombin sondern über einen weiteren Gerinnungsfaktor (FXa) aktiviert. Sphingosinkinasen (SPHK) sind Proteine, die über Regulation des Ceramid/Sphingosin/S1P Gleichgewichts ebenfalls das Zellschicksal beeinflussen. Es existieren zwei Isoformen der SPHK (SPHK-1 und SPHK-2). Diese wandeln durch Phosphorylierung Sphingosin in S1P um. Im Gegensatz zum Sphingosin fördert S1P Zellproliferation und Migration. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Thrombin, in vaskulären SMC die SPHK-1, nicht jedoch die SPHK-2 reguliert. Im Verlauf über 24 h wurde eine transiente zeit- und konzentrationsabhängige Expressionssteigerung auf Transkript- und Proteinebene beobachtet. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Expressionssteigerung über den PAR-1 Rezeptor vermittelt wird. Die Aufregulation der SPHK-1 durch Thrombin war an einer erhöhten Proliferationsrate *in vitro* jedoch nicht an der Migration der SMC beteiligt. Eine siRNA-vermittelte Reduktion der SPHK-1 Expression hemmte die Thrombin-induzierte Proliferation. Die stimulierende Wirkung von Thrombin auf die Zellmigration blieb hiervon ungerührt. Die Regulation der SPHK-1 war anteilig vermittelt durch *human antigen R* (HuR) initiierte Transkript-Stabilisierung. Die Beteiligung von HuR an der SPHK-1 mRNA Stabilisierung konnte mittels Pulldown PCR nachgewiesen werden. Ferner konnte *in vivo* gezeigt werden, dass eine langfristige Behandlung von ApoE-defizienten Mäusen mit dem direkten Thrombininhibitor Dabigatran eine Verminderung der SPHK-1 Expression in den Mauseorten zu Folge hat. Im Vergleich zu Kontrollieren wiesen die Aorten nach Dabigatran Fütterung eine signifikant verminderte Plaquerfläche auf. Darüber hinaus übte das von der SPHK-1 gebildete S1P einen stimulierenden Effekt auf die Expression des Rezeptors PAR-2 aus. Sowohl HuR als auch PAR-2 und SPHK-1 werden nach Gefäßverletzung und bei Atherosklerose verstärkt exprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurde Thrombin als zentraler Regulator dieses Signalsystems identifiziert. Zusammengefasst induziert Thrombin über Aktivierung von PAR-1 eine HUR vermittelte Stabilisierung und Akkumulation der SPHK-1 mRNA in SMC. Hieraus resultieren eine erhöhte Proteinexpression der SPHK-1 und verstärkte intrazelluläre S1P Bildung. Eine zukünftige Einflussnahme auf die S1P-vermittelten proentzündlichen und proliferativen Wirkungen von Thrombin bietet einen möglichen neuartigen Ansatz in der Behandlung von Gefäßerkrankungen wie Restenose und Atherosklerose.

6. Summary

In human SMC, thrombin induces coagulation-independent effects like proliferation and migration, the synthesis of inflammatory factors, and extracellular matrix biosynthesis. The cellular effects of thrombin are mediated through protease- activated receptors (PAR-1, PAR-3, and PAR-4). PAR-2 is activated by FXa, but not by thrombin.

Critical regulators of cell function are sphingosine kinases, which regulate the ceramid/sphingosine/S1P balance. Two isoforms of SPHK (SPHK-1 and SPHK-2) have been referred. By converting sphingosine to S1P via phosphorylation SPHK-1 promotes proliferation and migration of smooth muscle cells (SMC). Expression of SPHK-1 but not SPHK-2 protein and transcript is increased by Thrombin in a time and concentration dependent manner in human SMC. This effect was shown to be mediated via PAR-1. In vitro up-regulation of SPHK-1 led to a significant increase of proliferation but not migration of SMC Accordingly thrombin- induced proliferation, but not migration, could be inhibited by SPHK-1 siRNA. Furthermore, it was determined that the regulation of SPHK-1 is mediated partially through human antigen R (HuR)- mediated transcript stabilization. The involvement of HuR on SPHK-1 stabilization could be detected via pull-down PCR. Additional it was shown in vivo that long term treatment of ApoE deficient mice with the thrombin inhibitor dabigatran led to a SPHK-1 transcript reduction in mouse aortas. Compared to control mice the aortas of dabigatran fed animals also showed a significantly decreased plaque area.

The SPHK-1 formed product (S1P) shows an inductive effect on PAR-2 receptors. However thrombin alone also has a minor impact on PAR-2 transcription level. HuR, PAR-2 and SPHK-1 are highly expressed in vascular injury and atherosclerosis, and thrombin is likely to be a new factor supporting this. Thrombin mediates the translocation of HuR via PAR-1 that has an accumulation and stabilization of SPHK-1 mRNA as consequence. A resulting increase of SPHK-1 protein level produces higher amounts S1P in SMC which in turn upregulates the PAR-2. In this way thrombin can augment the actions of FXa via PAR-2, ultimately strengthens vascular proliferation further. A future influence on the S1P-mediated proinflammatory and proliferative effects of thrombin, provides a possible novel approach for the treatment of vascular diseases such as restenosis and atherosclerosis.

7. Literaturverzeichnis

Abendschein DR, Yang LY, Chun J, Cho D, Scherrer D, St Pierre J (2003). Prolonged procoagulant activity on overstretch-injured coronary arteries in pigs. *J Thromb Haemost* **1**(4): 836-842.

Abrams P, Marzella N (2007). Dabigatran (Rendix): A Promising New Oral Direct Thrombin Inhibitor. *P&T* **32**(5): 271-275.

Allende ML, Proia RL (2002). Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochimica et biophysica acta* **1582**(1-3): 222-227.

Allende ML, Sasaki T, Kawai H, Olivera A, Mi Y, van Echten-Deckert G, *et al.* (2004). Mice Deficient in Sphingosine Kinase 1 Are Rendered Lymphopenic by FTY720. *Journal of Biological Chemistry* **279**(50): 52487-52492.

Anliker B (2004). Lysophospholipid G Protein-coupled Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **279**(20): 20555-20558.

Artur-Aron Weber HOKaKS (2000). Platelet-Derived Microparticles Stimulate Coronary Artery Smooth Muscle Cell Mitogenesis by a PDGF-Independent Mechanism. *Thrombosis Research* **98**: 461-466.

Artur-Aron Weber TH, Karsten Schrör (2006). Pharmakologie der Blutgerinnung. *Biospektrum* **1**.

Bae J-S, Kim Y-u, Park M-K, Rezaie AR (2009). Concentration dependent dual effect of thrombin in endothelial cells via Par-1 and Pi3 Kinase. *Journal of Cellular Physiology* **219**(3): 744-751.

Bae JS, Yang L, Manithody C, Rezaie AR (2007). The ligand occupancy of endothelial protein C receptor switches the protease-activated receptor 1-dependent signaling specificity of thrombin from a permeability-enhancing to a barrier-protective response in endothelial cells. *Blood* **110**(12): 3909-3916.

Berdyshev EV, Gorshkova I, Usatyuk P, Kalari S, Zhao Y, Pyne NJ, *et al.* (2011). Intracellular S1P generation is essential for S1P-induced motility of human lung endothelial cells: role of sphingosine kinase 1 and S1P lyase. *PloS one* **6**(1): e16571.

Billich A, Urtz N, Reuschel R, Baumruker T (2009). Sphingosine kinase 1 is essential for proteinase-activated receptor-1 signalling in epithelial and endothelial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**(7): 1547-1555.

Birchwood CJ, Saba JD, Dickson RC, Cunningham KW (2001). Calcium influx and signaling in yeast stimulated by intracellular sphingosine 1-phosphate accumulation. *The Journal of biological chemistry* **276**(15): 11712-11718.

Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA (2010). Coagulation Factor Xa inhibits cancer cell migration via LIMK1-mediated cofilin inactivation. *Thromb Res* **125**(6): e323-328.

Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA (2008). Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends in molecular medicine* **14**(10): 429-440.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254.

Brass LF (2003). Thrombin and platelet activation. *Chest* **124**(3 Suppl): 18S-25S.

Brennan CM, Steitz JA (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* **58**(2): 266-277.

Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG (2002). Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* **100**(1): 148-152.

Christine M. Misquitta VRI, Eva S. Werstiuk and Ashok K. Grover (2001). The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology. *Molecular and Cellular Biochemistry* **224**: 53-67.

Cirino G, Napoli C, Bucci M, Cicala C (2000). Inflammation-coagulation network: are serine protease receptors the knot? *Trends Pharmacol Sci* **21**(5): 170-172.

Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, Eikelboom J, Oldgren J, Parekh A, et al. (2009). Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* **361**(12): 1139-1151.

Coughlin SR (1999). How the protease thrombin talks to cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(20): 11023-11027.

Damiano BP, D'Andrea MR, de Garavilla L, Cheung WM, Andrade-Gordon P (1999). Increased expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in balloon-injured rat carotid artery. *Thrombosis and haemostasis* **81**(5): 808-814.

Doller A, Pfeilschifter J, Eberhardt W (2008). Signalling pathways regulating nucleo-cytoplasmic shuttling of the mRNA-binding protein HuR. *Cellular signalling* **20**(12): 2165-2173.

Feistritzer C, Lenta R, Riewald M (2005). Protease-activated receptors-1 and -2 can mediate endothelial barrier protection: role in factor Xa signaling. *J Thromb Haemost* **3**(12): 2798-2805.

Francy JM, Nag A, Conroy EJ, Hengst JA, Yun JK (2007). Sphingosine kinase 1 expression is regulated by signaling through PI3K, AKT2, and mTOR in human coronary artery smooth muscle cells. *Bba-Gene Struct Expr* **1769**(4): 253-265.

Furie B, Furie BC (1988). The molecular basis of blood coagulation. *Cell* **53**(4): 505-518.

Ghigliotti G, Waissbluth AR, Speidel C, Abendschein DR, Eisenberg PR (1998). Prolonged activation of prothrombin on the vascular wall after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(2): 250-257.

Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, Singh SK, *et al.* (2009). Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* **325**(5945): 1254-1257.

Hait NC, Bellamy A, Milstien S, Kordula T, Spiegel S (2006). Sphingosine Kinase Type 2 Activation by ERK-mediated Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **282**(16): 12058-12065.

Heilker R, Wolff M, Tautermann CS, Bieler M (2009). G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach. *Drug discovery today* **14**(5-6): 231-240.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* **10**(4): 413-417.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**(9): 1026-1030.

Hoffman M, Monroe DM, 3rd (2001). A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and haemostasis* **85**(6): 958-965.

Huwiler A, Pfeilschifter J (2006). Altering the sphingosine-1-phosphate/ceramide balance: a promising approach for tumor therapy. *Curr Pharm Des* **12**(35): 4625-4635.

Ishii K, Hein L, Kobilka B, Coughlin SR (1993). Kinetics of thrombin receptor cleavage on intact cells. Relation to signaling. *J Biol Chem* **268**(13): 9780-9786.

Johnson KR, Johnson KY, Becker KP, Bielawski J, Mao C, Obeid LM (2003). Role of human sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular sphingosine-1-phosphate levels and cell viability. *The Journal of biological chemistry* **278**(36): 34541-34547.

Kelm M, Strauer BE (1999). Endotheliale Dysfunktion Therapeutische und prognostische Relevanz. *Der Internist* **40**(12): 1300-1307.

Le Stunff H, Milstien S, Spiegel S (2004). Generation and metabolism of bioactive sphingosine-1-phosphate. *J Cell Biochem* **92**(5): 882-899.

Liu F, Verin AD, Wang P, Day R, Wersto RP, Chrest FJ, *et al.* (2001). Differential regulation of sphingosine-1-phosphate- and VEGF-induced endothelial cell chemotaxis. Involvement of G(ialpha2)-linked Rho kinase activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**(6): 711-719.

Liu H (2003). Sphingosine Kinase Type 2 Is a Putative BH3-only Protein That Induces Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **278**(41): 40330-40336.

Liu H, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, Kono K, Poulton S, *et al.* (2000). Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. *The Journal of biological chemistry* **275**(26): 19513-19520.

Liu H, Toman RE, Goparaju SK, Maceyka M, Nava VE, Sankala H, *et al.* (2003). Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **278**(41): 40330-40336.

Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, *et al.* (2005). SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. *The Journal of biological chemistry* **280**(44): 37118-37129.

Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R (2001). Proteinase-activated receptors. *Pharmacological reviews* **53**(2): 245-282.

Mack CP (2011). Signaling mechanisms that regulate smooth muscle cell differentiation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**(7): 1495-1505.

Marutsuka K, Hatakeyama K, Yamashita A, Asada Y (2005). Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **12**(1): 1-8.

Mattie M, Brooker G, Spiegel S (1994). Sphingosine-1-phosphate, a putative second messenger, mobilizes calcium from internal stores via an inositol trisphosphate-independent pathway. *The Journal of biological chemistry* **269**(5): 3181-3188.

McVerry BJ, Garcia JG (2004). Endothelial cell barrier regulation by sphingosine 1-phosphate. *J Cell Biochem* **92**(6): 1075-1085.

Misquitta CM, Iyer VR, Werstik ES, Grover AK (2001). The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology. *Molecular and cellular biochemistry* **224**(1-2): 53-67.

Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR (2002). Platelets and thrombin generation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **22**(9): 1381-1389.

Newby AC, Zaltsman AB (1999). Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovascular research* **41**(2): 345-360.

Ng CK, Carr K, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* **410**(6828): 596-599.

Nobe K, Sone T, Paul RJ, Honda K (2005). Thrombin-induced force development in vascular endothelial cells: contribution to alteration of permeability mediated by calcium-dependent and -independent pathways. *Journal of pharmacological sciences* **99**(3): 252-263.

O'Brien PJ, Molino M, Kahn M, Brass LF (2001). Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene* **20**(13): 1570-1581.

Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, *et al.* (1999). Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. *J Cell Biol* **147**(3): 545-558.

Olivera A, Romanowski A, Rani CS, Spiegel S (1997). Differential effects of sphingomyelinase and cell-permeable ceramide analogs on proliferation of Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochimica et biophysica acta* **1348**(3): 311-323.

Olivera A, Rosenfeldt HM, Bektas M, Wang F, Ishii I, Chun J, *et al.* (2003). Sphingosine kinase type 1 induces G12/13-mediated stress fiber formation, yet promotes growth and survival independent of G protein-coupled receptors. *J Biol Chem* **278**(47): 46452-46460.

Olivera A, Spiegel S (2001). Sphingosine kinase: a mediator of vital cellular functions. *Prostaglandins & other lipid mediators* **64**(1-4): 123-134.

Owens GK (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological reviews* **75**(3): 487-517.

Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews* **84**(3): 767-801.

Pape R, Rauch BH, Rosenkranz AC, Kaber G, Schror K (2008). Transcriptional inhibition of protease-activated receptor-1 expression by prostacyclin in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**(3): 534-540.

Paris Abrams aNM (2007). Dabigatran (Rendix):A Promising New Oral Direct Thrombin Inhibitor. *P&T* **32**(5): 271-275.

Patterson C, Stouffer GA, Madamanchi N, Runge MS (2001). New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology. *Circ Res* **88**(10): 987-997.

Pullmann R, Jr., Juhaszova M, Lopez de Silanes I, Kawai T, Mazan-Mamczarz K, Halushka MK, *et al.* (2005). Enhanced proliferation of cultured human vascular smooth muscle cells linked to increased function of RNA-binding protein HuR. *The Journal of biological chemistry* **280**(24): 22819-22826.

Rauch BH (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. *Circulation Research* **90**(10): 1122-1127.

Rauch BH, Millette E, Kenagy RD, Daum G, Clowes AW (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**(3): 340-345.

Rauch BH, Rosenkranz AC, Ermler S, Bohm A, Driessen J, Fischer JW, *et al.* (2010). Regulation of functionally active P2Y₁₂ ADP receptors by thrombin in human smooth muscle cells and the presence of P2Y₁₂ in carotid artery lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(12): 2434-2442.

Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ (2007). Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation* **15**(3): 100-108.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical biochemistry* **245**(2): 154-160.

Rosenkranz AC, Schror K, Rauch BH (2011). Direct inhibitors of thrombin and factor Xa attenuate clot-induced mitogenesis and inflammatory gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* **106**(3).

Ross R (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* **340**(2): 115-126.

Rudijanto A (2007). The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta medica Indonesiana* **39**(2): 86-93.

Saba JD (2004). Point-Counterpoint of Sphingosine 1-Phosphate Metabolism. *Circulation Research* **94**(6): 724-734.

Sanchez T, Hla T (2004). Structural and functional characteristics of S1P receptors. *Journal of Cellular Biochemistry* **92**(5): 913-922.

Schrör K (2008). Das Gerinnungssystem im reperfundierten Koronarbett. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* **133**(12): 579-581.

Schrör K, Bretschneider E, Fischer K, Fischer JW, Pape R, Rauch BH, *et al.* (2010). Thrombin receptors in vascular smooth muscle cells - function and regulation by vasodilatory prostaglandins. *Thrombosis and haemostasis* **103**(5): 884-890.

Schulman S, Kearon C, Kakkar AK, Mismetti P, Schellong S, Eriksson H, *et al.* (2009). Dabigatran versus warfarin in the treatment of acute venous thromboembolism. *N Engl J Med* **361**(24): 2342-2352.

Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD, Brown JH (1999). Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res* **84**(10): 1186-1193.

Serrano-Sanchez M, Tanfin Z, Leiber D (2008). Signaling Pathways Involved in Sphingosine Kinase Activation and Sphingosine-1-Phosphate Release in Rat Myometrium in Late Pregnancy: Role in the Induction of Cyclooxygenase 2. *Endocrinology* **149**(9): 4669-4679.

Shida D, Takabe K, Kapitonov D, Milstien S, Spiegel S (2008). Targeting SphK1 as a new strategy against cancer. *Curr Drug Targets* **9**(8): 662-673.

Sobue S, Murakami M, Banno Y, Ito H, Kimura A, Gao S, *et al.* (2008). v-Src oncogene product increases sphingosine kinase 1 expression through mRNA stabilization: alteration of AU-rich element-binding proteins. *Oncogene* **27**(46): 6023-6033.

Spiegel S (2002). Sphingosine 1-Phosphate, a Key Cell Signaling Molecule. *Journal of Biological Chemistry* **277**(29): 25851-25854.

Spiegel S, Milstien S (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**(5): 397-407.

Stangier J, Stahle H, Rathgen K, Roth W, Shakeri-Nejad K (2008). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dabigatran etexilate, an oral direct thrombin inhibitor, are not affected by moderate hepatic impairment. *Journal of clinical pharmacology* **48**(12): 1411-1419.

Stary HC (2000). Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **20**: 1177-1178.

Stuart J. Connolly MD, Michael D. Ezekowitz, M.B., Ch.B., D.Phil., Salim Yusuf, F.R.C.P.C., D.Phil., , John Eikelboom MD, Jonas Oldgren, M.D., Ph.D., Amit Parekh, M.D., Janice Pogue, M.Sc., Paul A. Reilly, Ph.D., , Ellison Themeles BA, Jeanne Varrone, M.D., Susan Wang, Ph.D., Marco Alings, M.D., Ph.D., Denis Xavier, M.D., , Jun Zhu MD, Rafael Diaz, M.D., Basil S. Lewis, M.D., Harald Darius, M.D., Hans-Christoph Diener, M.D., Ph.D., , Campbell D. Joyner MD, Lars Wallentin, M.D., Ph.D., and the RE-LY Steering Committee and Investigators (2009). Dabigatran versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation. *The New England Journal of Medicine* **361**(12): 1139-1151.

Trejo J (2003). Protease-activated receptors: new concepts in regulation of G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **307**(2): 437-442.

- Van Aken H, Bode C, Darius H, Diehm C, Encke A, Gulba DC, *et al.* (2001). Anticoagulation: the present and future. *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* **7**(3): 195-204.
- Van Brocklyn JR, Lee MJ, Menzeleev R, Olivera A, Edsall L, Cuvillier O, *et al.* (1998). Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *The Journal of cell biology* **142**(1): 229-240.
- van Nieuw Amerongen GP, Draijer R, Vermeer MA, van Hinsbergh VW (1998). Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin: role of protein kinases, Calcium, and RhoA. *Circ Res* **83**(11): 1115-1123.
- Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F (2002). Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. *Analytical biochemistry* **303**(1): 95-98.
- Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG, *et al.* (2006). Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* **9**(3): 225-238.
- Wamhoff BR, Lynch KR, Macdonald TL, Owens GK (2008). Sphingosine-1-phosphate receptor subtypes differentially regulate smooth muscle cell phenotype. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**(8): 1454-1461.
- Wang H, Ubl JJ, Stricker R, Reiser G (2002). Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *American journal of physiology. Cell physiology* **283**(5): C1351-1364.
- Warkentin TE, Greinacher A (2003). Heparin-induced thrombocytopenia and cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* **76**(6): 2121-2131.
- Wattenberg BW (2010). Role of sphingosine kinase localization in sphingolipid signaling. *World journal of biological chemistry* **1**(12): 362-368.
- Webb ML, Taylor DS, Molloy CJ (1993). Effects of thrombin receptor activating peptide on phosphoinositide hydrolysis and protein kinase C activation in cultured rat aortic smooth muscle cells: evidence for "tethered-ligand" activation of smooth muscle cell thrombin receptors. *Biochemical pharmacology* **45**(8): 1577-1582.

Weber A, Koppen HO, Schror K (2000). Platelet-derived microparticles stimulate coronary artery smooth muscle cell mitogenesis by a PDGF-independent mechanism. *Thrombosis research* **98**(5): 461-466.

Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Analytical biochemistry* **270**(1): 41-49.

Wojta J, Gallicchio M, Zoellner H, Hufnagl P, Last K, Filonzi EL, *et al.* (1993). Thrombin stimulates expression of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 in cultured human vascular smooth muscle cells. *Thrombosis and haemostasis* **70**(3): 469-474.

zu Heringdorf DM, Lass H, Alemany R, Laser KT, Neumann E, Zhang C, *et al.* (1998). Sphingosine kinase-mediated Ca²⁺ signalling by G-protein-coupled receptors. *The EMBO journal* **17**(10): 2830-2837.

8. Veröffentlichungen

8.1 Kongressbeiträge

Swen Ermler, Andreas Böhm, Anke C. Rosenkranz, Karsten Schrör, Bernhard H. Rauch; Thrombin induces expression of sphingosine kinase-1 (SPHK-1) in human vascular smooth muscle cells via the mRNA stabilising protein HuR and its inhibition by dabigatran reduces vascular SPHK-1 expression and atherosclerotic burden in vivo.

Circulation November 2011 123 (Meeting Abstract Supplement)

Swen Ermler, Andreas Böhm, Anke C. Rosenkranz, Karsten Schrör, Bernhard H. Rauch Factor-Xa-induced mitogenesis and migration require sphingosine kinase activity and sphingosin-1-phosphate formation in human vascular smooth muscle cells.

55th Annual Meeting of the Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH), Wiesbaden 2011

Swen Ermler, Andreas Böhm

The activated coagulation factor X regulates S1P signaling.

DFG SPP PostDoc and PhD student meeting 2008

Ermler, S; Bohm, A; Rosenkranz, A; et al.

Regulation of sphingosine kinase-1 expression by factor-Xa - Role for mitogenesis and migration of human vascular smooth muscle cells.

77th Annual Meeting on German-Society-for-Experimental-and-Clinical- Pharmacology-and-Toxicology, 2011

Frankfurt, GERMANY

Ermler, S; Boehm, A; Rosenkranz, AC; et al.

Title: Factor-Xa induces expression of sphingosinekinase-1 in human vascular smooth muscle cells.

50th Annual Meeting of the Deutsche-Gesellschaft-fur-Experimentelle-und-Klinische-Pharmakologie-und-Toxikologie, 2009

Mainz, GERMANY

8.2 Publikationen in Fachzeitschriften

Bernhard H. Rauch, Anke C. Rosenkranz, **Sven Ermler**, Andreas Böhm, Julia Driessen, Jens W. Fischer, Atsuhiko Sugidachi, Joseph A. Jakubowski, Karsten Schrör (2010) Regulation of Functionally Active P2Y₁₂ ADP Receptors by Thrombin in Human Smooth Muscle Cells and the Presence of P2Y₁₂ in Carotid Artery Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010; 30: 2434-2442

8.3 Auszeichnungen

Best Abstract

55th Annual Meeting of the **Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH)**, Wiesbaden 2011

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Rauch, für die Möglichkeit meine Promotion im Rahmen des DFG Schwerpunktprogramms „Sphingolipids and disease“ durchführen zu können, danken. Weiterhin bedanke ich mich herzlich für die anregenden Diskussionen und Ratschläge sowie für die Betreuung und Finanzierung der Arbeit und für die Möglichkeit der Teilnahme an diversen Kongressen.

Herrn Prof. Dr. Martin Beye danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Pharmakologie und Klinischer Pharmakologie der Universitätsklinik Düsseldorf und für seine freundliche und fachliche Unterstützung.

Frau Dr. Anke C. Rosenkranz möchte ich für ihre wertvollen Ratschläge im richtigen Moment und für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit herzlich danken.

Frau Kerstin Freidel, Frau Petra Kuger und Frau Bärbel Reupert danke ich für die freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft in praktischen Fragen.

Bei Frau Beate Weyrauther bedanke ich mich für die Hilfestellung in der Zellkultur und einen steten verlässlichen Nachschub an Zellen.

Frau Erika Lohmann und Frau Karin Montag möchte ich für ihre ständige und freundliche Hilfsbereitschaft in organisatorischen Dingen danken.

Allen Freunden und Kollegen, insbesondere Frau Anja Flößer und Herrn Andreas Böhm, danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die gemeinsame Zeit sowie für den einen oder anderen Grillabend.

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 19.09.2011

11. Lebenslauf

Person:

Name: Swen Ermiler
Geburtsdatum: 24.04.1978
Geburtsort: Dülken

Promotion:

Seit 08/2007 Promotion unter Leitung von Herrn Professor Dr. Bernhard Rauch am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Studium:

10/2000-12/2006 Studium der Biologie an der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Diplomarbeit unter Leitung von Dr. Frank Rosenau am Institut für Molekulare Enzymtechnologie im Forschungszentrum Jülich zum Thema: Einfluss ausgewählter Mutationen auf die Funktion der Lipase-spezifischen Foldase aus *Pseudomonas aeruginosa*
10/1998-04/2000 Studium der Biologie an der Christian- Albrechts Universität zu Kiel

Geleistete Dienste:

07/1997-04/1998 Wehrdienst in der Nassau-Dietzkaserne (Budel/Niederlande) beim I./LwAusbRgt 1

Schule:

1995-1997 Albertus Magnus Gymnasium in Dülken
1988-1995 Städtisches-Gymnasium in Dülken
1984-1988 Paul Weyers Grundschule Dülken