



**Regulation der Sphingosin-Kinase 1 (SPHK1) durch den
aktivierten Gerinnungsfaktor X (FXa) und den Protease-
aktivierten Rezeptor 2 (PAR-2) in glatten
Gefäßmuskelzellen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andreas Böhm

aus

Rathenow

Düsseldorf, 2013

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

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

Referent: Prof. Dr. med. Bernhard H. Rauch

Korreferent: Prof. Prof. Dr. Joachim Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2013

Abkürzungsverzeichnis

A

A. dest	<i>Aqua destillata</i>
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	<i>One-Way Analysis of Variance</i>
AP	Aktivierendes Peptid
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumpersulfat
AREs	AU-reiche Sequenzmotive
aSMC	<i>aortic smooth muscle cells</i>

B

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

C

ca.	circa
CD 42	Glycoprotein Ib
CD 68	Cluster of Differentiation 68
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Ci	Curie
Ca ²⁺	zweiwertige Kalciumionen

D

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's <i>modified Eagle</i> Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

E

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor 3</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal related kinase</i>

F

FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FII/FIIa	Faktor II / aktivierter Faktor II

Abkürzungsverzeichnis

FV/FVa	Faktor V / aktivierter Faktor V
FVII/FVIIa	Faktor VII / aktivierter Faktor VII
FIX/FIXa	Faktor IX/ aktivierter Faktor IX
FX/FXa	Faktor X / Aktivierter Faktor X
FCS	Fetales Kälberserum
G	
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H	
h	Stunde
[³ H]	Tritium
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperanzinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
I	
IL6	Interleukin 6
IgG	Immunglobulin G
Ip	Immunpräzipitation
J	
JNK	c-Jun-N-terminalen Kinase
K	
kDa	Kilodalton
L	
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LPA	Lipoprotein A
M	
M-Aktin	Muskel-Aktin
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
m	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mM	Millimol
μM	Mikromol
nM	Nanomol
nmol/l	Nanomol/Liter

Abkürzungsverzeichnis

Myr PKI	myristoylated protein kinase A inhibitor
N	
n	Anzahl der Versuche
NGF	<i>nerv growth factor</i>
O	
OD	optische Dichte
P	
p	Wahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	Proteaseaktivierter Rezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R	
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMC	<i>smooth muscle cells</i>
SMCGM	<i>smooth muscle cell growth medium</i>
SMMHC	<i>smooth muscle myosin heavy chain</i>
Spn	Sphingosin
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SGPL	S1P-Lyase
SGPP1	S1P-Phosphatase-1

Abkürzungsverzeichnis

SGPP2	S1P-Phosphatase-2
SPHK-1	Sphingosin Kinase 1
SPHK-2	Sphingosin Kinase 2
T	
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TBST	Trisgepufferte Salzlösung mit Tween 20
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
TXA ₂	Thromboxan A2
U	
U	<i>Unit</i>
üN	über Nacht
UTR	Untranslatierte Region
V	
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vsrsc	sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) <i>viral oncogene homolog (avian)</i>

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	12
1.1 Atherosklerose	12
1.2 Homöostase des Gefäßsystems	13
1.3 Faktor Xa	15
1.4 Protease-aktivierte Rezeptoren	16
1.5 Sphingosinkinase	18
1.6 Sphingosin-1-Phosphat	19
1.7 Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen	22
2.2 Substanzen	23
2.3 Antikörper	24
2.4 Zellkultur	26
2.4.1 Isolation und Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen	27
2.5 Präparation und Analyse von RNA	27
2.5.1 Präparation von Gesamt-RNA aus SMCs	27
2.5.2 Quantifizierung von RNA	28
2.5.3 cDNA-Synthese	28

2.5.4 Real - Time PCR	29
2.5.4.1 Ansatz für die Real - Time PCR	30
2.6 Analyse von Proteinen	30
2.6.1 Western Blot-Verfahren.....	30
2.6.1.1 Isolierung von Proteinen aus SMCs.....	30
2.6.1.2 SDS - Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.6.1.3 Proteintransfer	31
2.6.1.4 Antikörper - Hybridisierung und Detektion	31
2.6.2 Prüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung	32
2.6.3 Proteinanalyse mittels Incell Western	32
2.7 Immunhistochemische Arbeiten	33
2.7.1. Vorbereitung der Versuchstiere und Organentnahme	33
2.7.2 Färbung von Aortenursprüngen mittels Diaminobenzidin	33
2.7.3 Fluoreszenzfärbung von Aortenursprüngen.....	34
2.8 Isolation von S1P	34
2.9 Lipidauftrennung	34
2.10 Herabregulation der SPHK1 mRNA durch spezifische siRNA.....	35
2.11 Rho A Pulldown Assay.....	35

2.12 Bestimmung der DNA-Neusynthese mittels [³H]Thymidin Inkorporationsassay	36
2.13 Migrationsbestimmung von SMC	36
2.14 Statistik.....	36
3. Ergebnisse	38
3.1 Expression der SPHK-1 in humanen Plaques	38
3.2 Expression von PAR-1 und PAR-2 in humanen Plaques	40
3.3 Nachweis von FX/FXa in humanen Atherektomie - Proben	41
3.4 Untersuchung eventueller Einblutungen in humanen Plaques	43
3.5 FXa induziert die Expression der SPHK1	44
3.6 FXa-Stimulation erhöht den intrazellulären S1P - Spiegel sowie die Freisetzung	47
3.7 Die Induktion der SPHK-1 durch FXa wird über die Aktivierung von PAR-1 und PAR-2 vermittelt.....	49
3.8 Einfluss von S1P auf die Expression von PAR-2 in aSMC.....	50
3.9 FXa induziert die SPHK-1 über Aktivierung Rho A und PKC abhängiger Signalwege	51
3.10 FXa-Stimulation erhöht die SPHK1 mRNA - Stabilität	54
3.11 Herabregulation der SPHK1 mittels RNA - Interferenz durch spezifische siRNA	55

3.12 Einfluss von FXa auf das Migrationsverhalten von aSMC in Verbindung mit SPHK-1 Expression.....	56
3.13 Inhibition des Rho A und PKC Signalweges verhindert die FXa vermittelte Migration von aSMC.....	58
3.14 Einfluss von PAR-2 auf die Migration von aSMC im Mausmodell	59
3.15 FXa vermittelte SPHK1 Induktion erhöht die Proliferationsrate von SMC.	60
3.16 Untersuchung der S1P abbauenden Enzyme	62
3.17 Zusammenfassung der Ergebnisse	64
4. Diskussion	65
4.1 Nachweis von FXa, SPHK1 und PARs im atherosklerotischen Plaque	66
4.2 Transkriptionelle Regulation der SPHK1 durch FXa	67
4.3 Induktion der Synthese und Freisetzung von S1P durch FXa	69
4.4 Wechselseitige Regulation von SPHK1/S1P und PARs	69
4.5 Intrazelluläre Signalwege der FXa - induziert Regulation der SPHK1	70
4.6 Funktionelle Bedeutung von SPHK1/S1P für zelluläre Wirkungen von FXa in der glatten Gefäßmuskelzelle.....	71
4.7 Untersuchung der S1P - abbauenden Enzyme	74
4.8 Ausblick.....	75
5. Zusammenfassung	76
6. Summary	77

7. Literaturverzeichnis.....	78
8. Veröffentlichungen	87
8.1 Fachzeitschriftenartikel.....	87
8.2 Kongressbeiträge	88
9. Danksagung	90
10. Eidesstattliche Erklärung.....	91
Lebenslauf.....	92

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose

Atherosklerose ist für die Hälfte aller Todesfälle von Erwachsenen in Industriestaaten verantwortlich (Gebbers 2007). Die Krankheit beginnt, ausgehend von der *response to injury* Hypothese mit einer Endothelialen Dysfunktion. Dabei handelt es sich um eine morphologisch auffällige Störung des Endothels, wodurch es zu einer Erhöhung der Endothelpermeabilität kommt.

Im weiteren Verlauf dieser Erkrankung kommt es zu einer lokalen Verdickung der Gefäßwand mit einhergehender Einlagerung von Low-Density-Lipoproteinen (LDL) (Ross and Glomset 1973) Dieses Stadium wird als Fatty Streak bezeichnet. Im Bereich des Endothelschadens kommt es im weiteren Verlauf der Erkrankung zu einer vermehrten Adhäsion von Makrophagen und Thrombozyten. Außerdem wird neben der Erhöhung der Endothelpermeabilität die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren initiiert. Charakteristisch für diese entzündlichen Prozesse sind eine lokal erhöhte Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen (SMC). Diese SMC bilden eine stabilisierende Kappe über der Verletzung (Intermediate Lesion). Die fortwährende Entzündung im verletzten Bereich führt zu einer weiteren Verstärkung der Einwanderung von Makrophagen und Lymphozyten aus dem Blut (Jonasson *et al.* 1986). Durch Aktivierung dieser Zellen kommt es zu einer deutlich erhöhten Expression und Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren (Libby *et al.* 1996). In Folge dieser Verstärkung kommt es zur Bildung eines nekrotischen Kerns und Vergrößerung der Verletzung (Advanced Complicated Lesion). Schreitet die Erkrankung weiter fort, kommt es zur Ausbildung eines instabilen fibrotischen Plaques. Dabei kann es zu einer Ruptur des Plaques, gefolgt von einer Thrombose im betroffenen Bereich kommen (Abb.1.1).

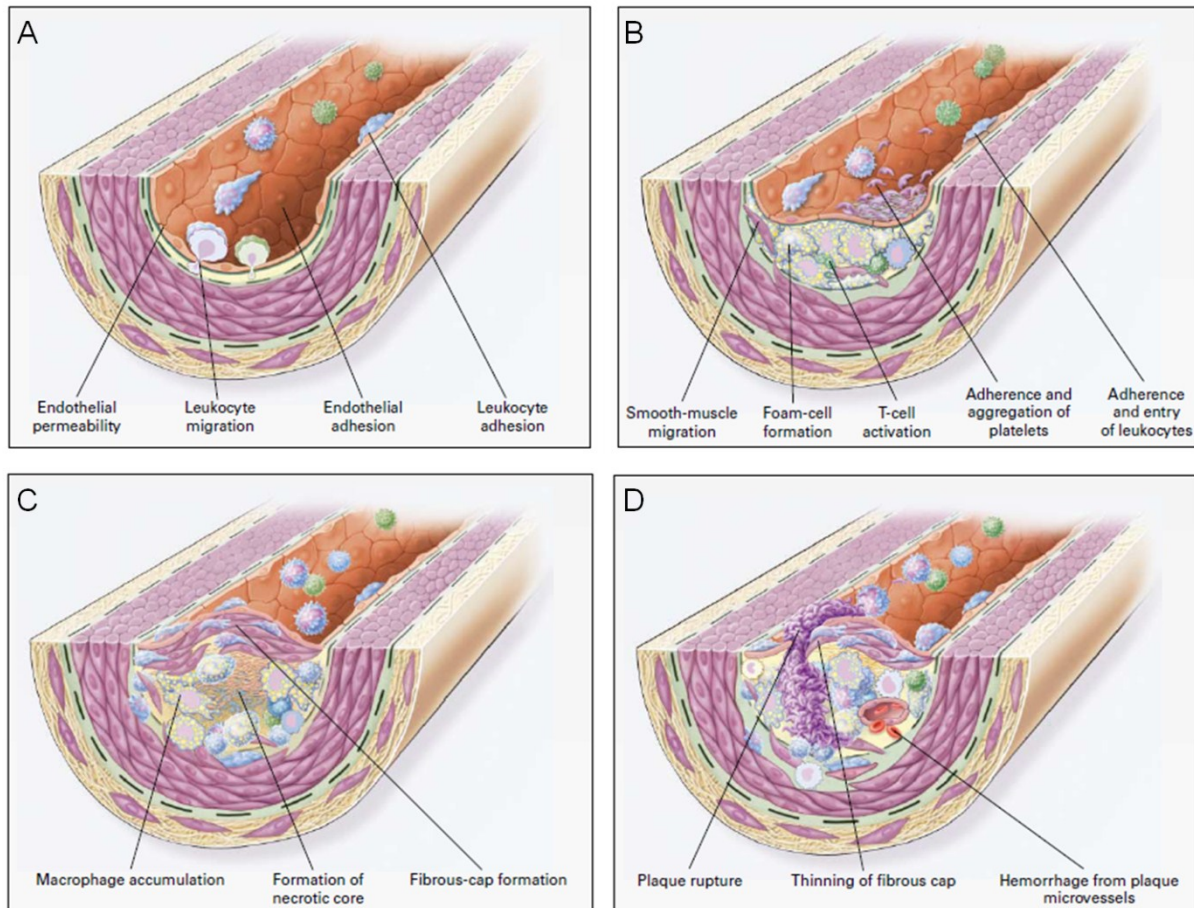


Abb.1.1 Atheroskleroseentstehung:

(A) Durch die endotheliale Dysfunktion wird die Permeabilität der Gefäßwand für Lipoproteine erhöht und so eine Leukozyteneinwanderung initiiert (Fatty Streak). **(B)** Die Intermediate Lesion zeichnet sich durch den Beginn der SMC-Migration und Aktivierung von T-Zellen sowie der Bildung von Schaumzellen aus. Des Weiteren kommt es zum Anheften und Aggregieren von Thrombozyten im Bereich der Verletzung. **(C)** In diesem Stadium, der Advanced Complicated Lesion kommt es zur Akkumulation von Makrophagen. Die SMC bilden die fibrotische Kappe, um den sich bildenden nekrotischen Kern vom Blutstrom abzuschirmen. **(D)** Durch weiteres Fortschreiten der Krankheit kommt es zur Entwicklung eines instabilen fibrotischen Plaques (nach Ross 1999)

1.2 Homöostase des Gefäßsystems

Durch eine Plaqueruptur oder eine anderweitige Verletzung eines Blutgefäßes kommt es zum Kontakt von Blutkomponenten mit Tissue-Faktor (TF)-exprimierenden Zellen der Gefäßwand (Abb.1.2) (Mackman, Tilley, and Key 2007). So kommt es im ersten, Initiierungsphase genannten, Abschnitt der Gerinnung zum Kontakt des inaktiven Zymogens Faktor VII (FVII) mit Ca^{2+} -Ionen und Phospholipiden der beschädigten Zellmembranen. Der so aktivierte Gerinnungsfaktor bildet dann einen Komplex mit Tissue Faktor auf der Oberfläche von SMC und erlangt seine

Einleitung

vollständige katalytische Aktivität (FVIIa) (Hoffman 2001). Dieser Komplex aktiviert im Folgenden Faktor IX (FIXa) sowie Faktor X (FXa) (Brummel *et al.* 2002). FXa, dessen Wirkung durch Faktor Va (FVa) verstärkt wird, kann seinerseits geringe Mengen Prothrombin (FIIa) aktivieren. Diese geringen Mengen an Thrombin reichen nicht aus, um die Thrombusbildung durch Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin zu katalysieren. Jedoch kommt es dadurch zur Aktivierung und Verstärkung der Adhäsion von Thrombozyten (Hoffman 2001). Durch den Kontakt mit Kollagen wird in den adherenten Thrombozyten die Ausschüttung von Thromboxan A₂ (TXA₂) und ADP induziert, wodurch weitere Thrombozyten in der Nähe aktiviert werden. Dieser Prozess wird als Vorbereitungsphase bezeichnet.

Aktiviert Thrombozyten initiieren weiterhin einen sogenannten *shape change* und setzen partiell aktivierten FV auf ihrer nun maßgeblich vergrößerten Oberfläche frei, der durch Thrombin oder auch FXa vollständig aktiviert wird (Hoffman 2001). So kommt es zur Bildung von ausreichenden Mengen Thrombin und damit zur Abspaltung der Fibrinopeptide A und B vom Fibrinogen. Das aktive Fibrin kann so polymerisieren und einen Thrombus an der geschädigten Gefäßwand bilden (Propagierungsphase) (Mosesson 2005).

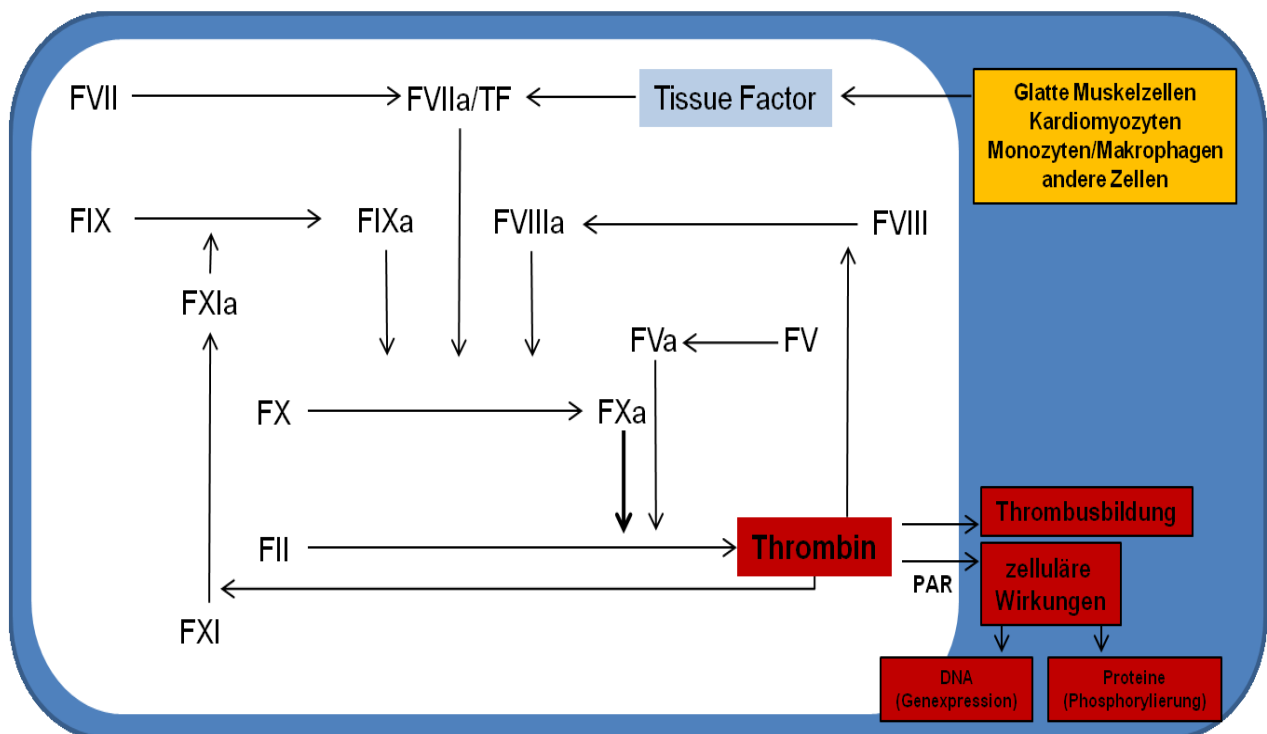


Abb.1 2 Ablauf der Blutgerinnung, schematisch (nach Schrör 2008)

1.3 Faktor Xa

Die Rolle von FXa, als Vitamin K abhängiges Plasmaprotein innerhalb der Gerinnungskaskade, ist seit langem bekannt. Jedoch wurde seine Bedeutung für die Prozesse der Wundheilung und des *Remodelings* weitgehend unterschätzt (Borensztajn *et al.* 2008). In den letzten Jahren konnten so zunehmend mehr direkte zelluläre, von Thrombin unabhängige, Wirkungen gezeigt werden. So führt eine Aktivierung durch FXa zu Migration und Proliferation von SMC sowie zur Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren wie FGF-2 und PDGF. Des Weiteren kommt es beispielsweise durch eine Modulation der Aktivität von Matrixmetalloproteinasen zur Modifikation der extrazellulären Matrix (Bretschneider *et al.* 2000; Rauch *et al.* 2004a). Hierüber besitzt FXa auch einen möglichen Einfluss auf die Morphologie einer atherosklerotischen Plaque.

Basierend auf diesen Befunden konnte für FXa die Beteiligung bzw. die Aktivierung verschiedener Signalwege gezeigt werden. Es kommt, je nach Zelltyp, zur Mobilisierung von intrazellulärem Ca^{2+} , Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und der Proteinkinase C (PKC) sowie der *mitogen-activated protein kinase* (MAPKs) oder auch der *extracellular-signal related kinase* (ERK) (Borensztajn, *et al.* 2008; Bretschneider *et al.* 2000) (Abb. 1.3). Die durch FXa vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen sowie ERK 1/2 und der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) führt dann zur Induktion der Expression inflammatorischer Zytokine, wie Interleukin 6 (IL6), wodurch SMC zur Proliferation und Migration angeregt werden. Studien konnten ferner zeigen, dass die FXa-Spiegel nach einer Gefäßverletzung bis zu 7 Tage im Bereich der Wunde erhöht sind und somit eine wichtige Rolle beim Fortschreiten des vaskulären Remodelings spielen (Borensztajn, *et al.* 2008).

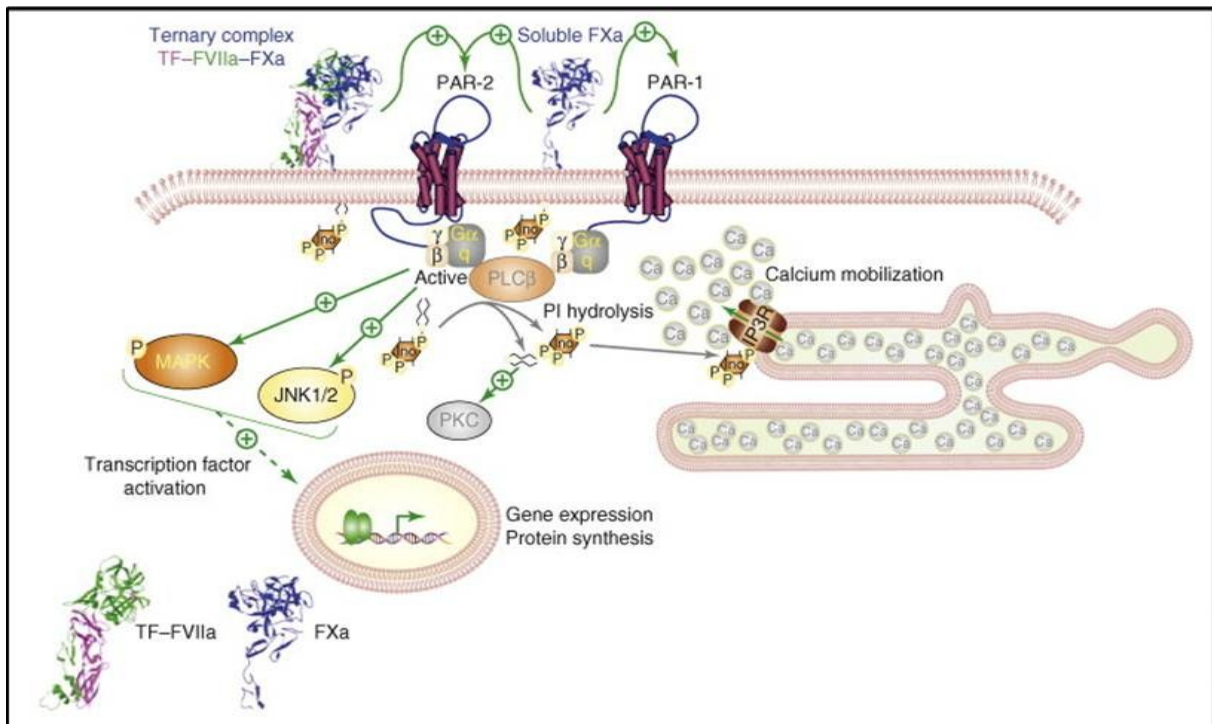


Abb.1 3: Effekte von Faktor Xa auf die Zellen der Gefäßwand.

Im Komplex mit Faktor VIIa und TF kommt es hauptsächlich zur Aktivierung des PAR-2-Rezeptors. Die lösliche Form des Faktors Xa hingegen bindet sowohl PAR-1 als auch PAR-2 (nach Borensztajn *et al.* 2008).

1.4 Protease-aktivierte Rezeptoren

Die beschriebenen zellulären Wirkungen von FXa werden über eine Reihe G-Protein-gekoppelter, Protease-aktiverter Rezeptoren (PAR) vermittelt (Coughlin 1999). Bei den PARs handelt es sich um membranständige Rezeptoren mit sieben die Membran durchspannenden Domänen. Somit gehören die PARs zur Gruppe der heptahelikalen Rezeptoren. Sie verfügen über eine N-terminale, spezifische Erkennungssequenz, an der sie proteolytisch gespalten werden. Dadurch entsteht ein verkürztes aminoterminal Ende, das in der Lage ist, als *tethered ligand* (angebundener Ligand) den Rezeptor zu aktivieren (Abb.1.4). Erst kürzlich wurde die räumliche Struktur des klassischen Thrombinrezeptors PAR-1 und die Bildung verschiedener von Antagonisten und Agonisten mittel Röntgenkristallographie dargestellt (Zhang *et al.* 2012). Für eine selektive Aktivierung dieser Rezeptorfamilie stehen kurze aktivierende Peptide (AP) zur Verfügung, die in ihrer Sequenz dem *tethered ligand* entsprechen. Diese sind in der Lage die PARs zu aktivieren, ohne dass eine proteolytische Spaltung erforderlich ist (Macfarlane *et al.* 2001) (Marutsuka *et al.* 2005).

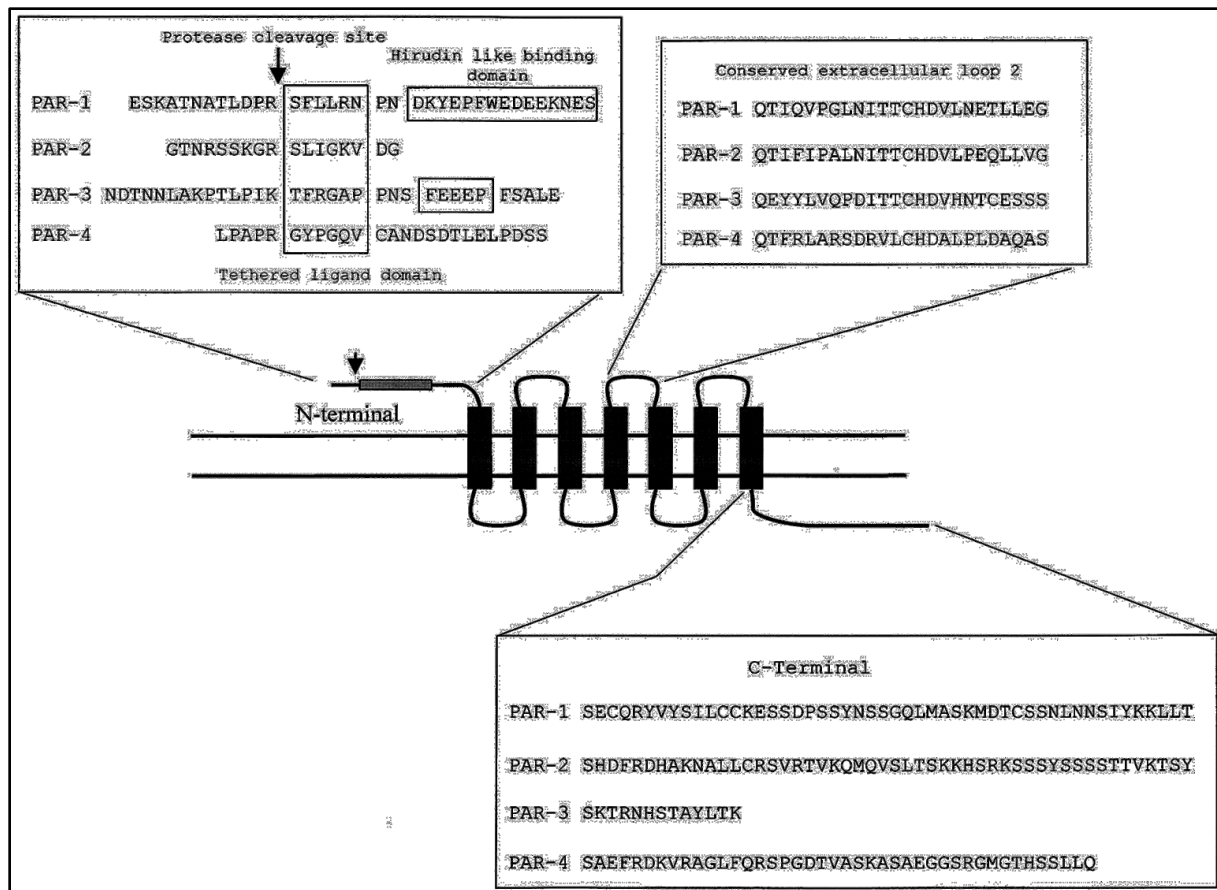


Abb.1 4: Strukturelle Eigenschaften der Protease-aktivierten Rezeptoren

Durch proteolytische Spaltung, z.B. nach Bindung von Thrombin oder FXa, entsteht am extrazellulären N-terminalen Ende der *tethered ligand*. Dieser aktiviert über eine Interaktion mit der zweiten Schleife den jeweiligen PAR (nach Macfarlane *et al.* 2001).

Die Deaktivierung dieser Rezeptoren erfolgt mittels Internalisierung und anschließendem Abbau in den Lysosomen. Somit ist die Aktivierung dieser Rezeptoren irreversibel (Coughlin 1999; Trejo 2003). Im Anschluss an die Internalisierung erfolgt eine rasche Translokation neuer PARs aus dem ER in die Plasmamembran (Chen *et al.* 2001). Diese Art der Rezeptoraktivierung und – Inaktivierung unterscheidet sich somit grundsätzlich von den gängigen G-Proteingekoppelten Rezeptoren, bei denen es zu einer reversiblen Ligandenbindung kommt. Es sind aktuell vier verschiedene PARs beschrieben, wobei Thrombin in der Lage ist, PAR-1, PAR-3 und PAR-4 zu aktivieren, während FXa sowohl PAR-1 als auch PAR-2 aktiviert (Macfarlane *et al.* 2001). Des Weiteren sind Trypsin und einige Trypsin-ähnlichen Serin-Proteasen in der Lage, die PARs zu aktivieren. Der Komplex aus FVII/TF wirkt hingegen ausschließlich auf den PAR-2. Von zentraler Bedeutung in Hinblick auf die zu erwartenden zellulären sowie inflammatorischen und mitogenen Effekte sind besonders die Proteasen Thrombin und FXa (Macfarlane *et al.* 2001;

Marutsuka *et al.* 2005). Die Expression der PARs in den SMC des Gefäßsystems ist relativ gering. Jedoch wird ihre Expression nach einer Verletzung stark erhöht, wodurch auch die zellulären Wirkungen von Thrombin und FXa verstärkt werden (Karsten Schrör *et al.* 2010).

Die Signalwege der PAR Rezeptoren sind zum Teil bekannt. So interagieren PAR-1 und PAR-2 mit verschiedenen G-Proteinen. Beide binden in ähnlichem Ausmaß an $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$. Des Weiteren bindet PAR-1, jedoch nicht PAR-2, an die G_0 und G_i Untereinheit (McCoy, Traynelis, and Hepler 2010a). PAR-2 hingegen ist in der Lage, nach Aktivierung auch G-Protein unabhängige Signalwege zu induzieren, unter anderem über die Rekrutierung des intrazellulären Adapterproteins β -Arrestin (Ishikawa *et al.* 2009). Trotz all dieser Befunde fehlt bis zum heutigen Tag ein umfassendes Verständnis der durch PAR-1 und PAR-2 induzierten Signalwege (McCoy, Traynelis, and Hepler 2010a).

1.5 Sphingosinkinase

Es ist für verschiedene Zelltypen, unter anderem Epithel und Endothelzellen, *in vitro* beschrieben, dass die Produktion proinflammatorischer Faktoren über PAR-1 vermittelt wird und Sphingosinkinase 1 (SPHK-1) abhängig ist (Billich *et al.* 2009). Die Sphingosinkinase liegt in zwei Isoformen vor. Beide Isoformen spielen eine Rolle in der Tumorgenese, Inflammation und bei der Progression vaskulärer Erkrankungen. SPHK-1 und SPHK-2 scheinen dabei zum Teil unterschiedliche Funktionen zu erfüllen. SPHK-1 stimuliert Zellproliferation und Überleben, wohingegen SPHK-2 eine Rolle in der Apoptose spielt (ter Braak *et al.* 2009). Beide Isoformen sind hochkonserviert und werden ubiquitär exprimiert. Aufgrund ihrer Fähigkeit, das Signallipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) zu bilden und ihrer Akutregulation durch verschiedene Agonisten zählen die SPHKs zu den sogenannten Signalezymen (Wattenberg 2010).

Grundsätzlich ist über den genauen Aktivierungsmechanismus der Sphingosinkinasen wenig bekannt. In einigen Zelltypen führt eine PKC-Aktivierung oder die Erhöhung des cAMP-Spiegels zu einer Induktion der SPHK-1. Ferner führen die Stimuli *nerv growth factor* (NGF), Vitamin D3, *epithelial growth factor* (EGF),

platelet derived growth factor (PDGF), TNF α , Lipoprotein A, Acetylcholin sowie eine Reihe weiterer Stimuli zur Induktion der SPHKs. Die Wirkung der jeweiligen Stimuli ist dabei vom vorliegenden Zelltyp und den jeweils exprimierten Rezeptoren abhängig. Weiterhin ist es wichtig, welche der beiden Isoformen in den entsprechenden Zellen am stärksten exprimiert wird (Olivera *et al.* 1999; Olivera and Spiegel 2001). Denn je nach vorherrschender Isoform können gleiche Stimuli unterschiedliche zelluläre Reaktionen hervorrufen. So kommt es durch erhöhte Salzkonzentration zur Inhibierung der SPHK-1 während die SPHK-2 induziert wird, wohingegen die Stimulation von Zellen *in vitro* mit Triton X 100 die SPHK-1 induziert und gleichzeitig zu einer Inhibierung der SPHK-2 führt.

Die SPHK-1 kann im Gegensatz zur SPHK-2 nach Stimulation mit bestimmten Agonisten nicht nur induziert werden. Vielmehr kommt es nach *in vitro* - Stimulation einiger Zelltypen mit Carbachol zu einer sehr schnellen, transienten Translokation der SPHK-1 in die Zellmembran. Interessanterweise sind die induzierenden Stimuli wie LPA und Thrombin dazu nicht in der Lage. Auch in diesem Fall ist der genaue Mechanismus nicht vollständig aufgeklärt (ter Braak *et al.* 2009).

1.6 Sphingosin-1-Phosphat

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) wurde zuerst als Lysophospholipid identifiziert, welches eine wichtige Rolle bei der irreversiblen Metabolisierung von Sphingolipiden spielt. Erst sehr viel später wurde die Wirkung von S1P als Signallipid mit unterschiedlichsten Funktionen entdeckt (Maceyka, Milstien, and Spiegel 2005). S1P besteht aus dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin, welcher durch die SPHK-1 und -2 mit Phosphorsäure verestert wird (Abb.1.5). Sphingosin-1-Phosphat (S1P), ein durch die Sphingosinkinase produziertes Signallipid, ist ein Ligand für eine Familie von 5 G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (S1P₁₋₅) (Sanchez and Hla 2004). S1P Rezeptoren regulieren eine Vielzahl von zellulären Reaktionen, wie zum Beispiel Proliferation, Differenzierung, Migration, Angiogenese, Reorganisation des Zytoskeletts und Entzündungsreaktionen (Spiegel and Milstien 2003; Olivera *et al.* 1999; Inoue *et al.* 2007). S1P kann seine zellulären Effekte über zwei unterschiedliche Wirkprinzipien entfalten. Es kann zur endo- oder parakrinen Aktivierung der membranständigen S1P-Rezeptoren führen. Weiterhin kann S1P

Einleitung

seine Wirkungen intrazellulär in Form eines *second messengers* entfalten und auf diesem Wege Einfluss auf die Kalzium-Homöostase sowie Proliferation und Apoptose nehmen (Meyer Zu Heringsdorf *et al.* 1998; Olivera *et al.* 1999; Olivera *et al.* 2003). Dabei ist besonders das Verhältnis von S1P zu Ceramid in der Zelle entscheidend, da Ceramid im Gegensatz zu S1P inhibierend auf das Zellwachstum wirkt und auf diesem Wege Apoptose begünstigt (Huwiler and Pfeilschifter 2006; Rauch *et al.* 2004a; Karsten Schrör *et al.* 2010). Weitere wichtige Enzyme im Metabolismus von S1P sind die S1P-Phosphatasen-2 und -2 (SGPP1/2). Sie dienen der Dephosphorylierung des S1P und somit dem Abbau bzw. der Rückbildung von S1P zu Sphingosin. Darüber hinaus existiert ein weiteres S1P abbauendes Enzym, die S1P-Lyase. Diese spaltet S1P in 2 Hexadecanal und Phosphoethanolamin und bewirkt damit einen terminalen Abbau von S1P (Bradley *et al.* 2011).

Von besonderem Interesse ist das S1P weiterhin aufgrund seiner Fähigkeit zur Beeinflussung der Endothelpermeabilität und somit der Gefäßhomöostase. S1P ist in der Lage, die Permeabilität des Endothels zu verringern und Endothelzellen zur Migration anzuregen. Dadurch kommt es zur Verbesserung der Barrierefunktion und dient somit der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase (McVerry and Garcia 2004).

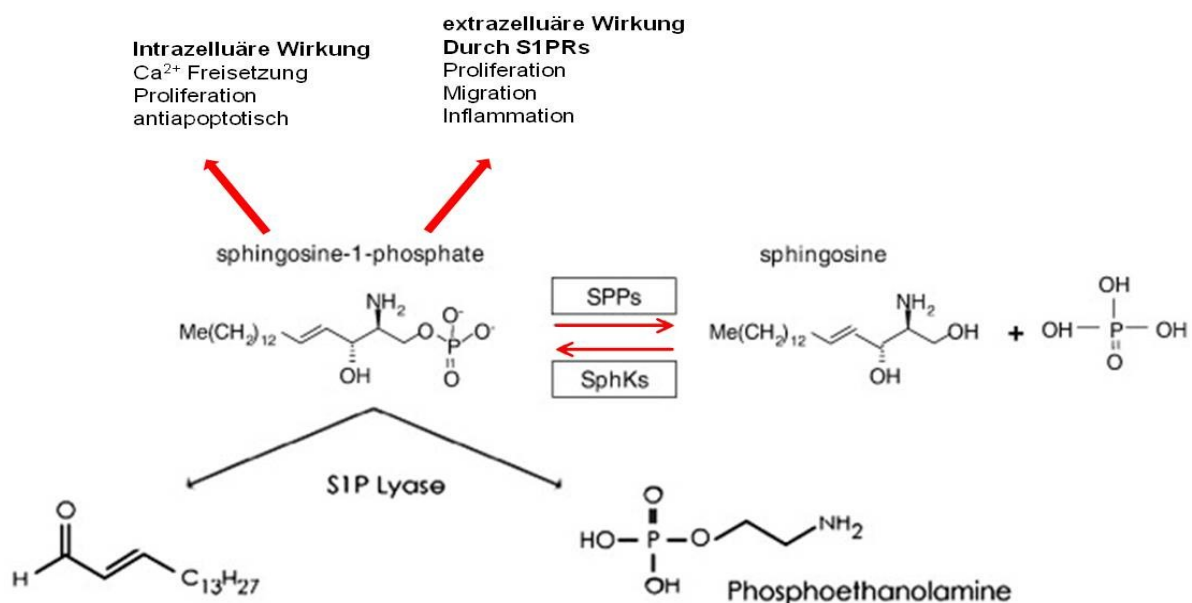


Abb.1 5: S1P-Generierung und Stoffwechsel

S1P wird durch Phosphorylierung von Sphingosin durch die SPHKs erzeugt. Durch die S1P-Phosphatasen (SGPP) kommt es zur Dephosphorylierung von S1P und die S1P-Lyase erzeugt aus S1P 2 Hexadecanal und Phosphoethanolamin (nach Bradley *et al.* 2011).

1.7 Zielsetzung

Faktor Xa ist zum einen als zentrale Protease in der Gerinnungskaskade bekannt. Darüber hinaus wirkt FXa auch über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (PAR-1, PAR-2) als Wachstumsfaktor und Zytokin auf glatte Gefäßmuskelzellen. So führt die Aktivierung durch FXa zu Migration und Proliferation von SMC sowie zur Freisetzung verschiedener Wachstumsfaktoren und Modifikation der extrazellulären Matrix (Abb. 1.3). Durch diese Hämostase- und Thrombin unabhängigen Wirkungen kann es zu Progression der Atherosklerose und Restenose nach Gefäßverletzung beitragen.

Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit ist die mögliche Wirkung von FXa auf die Expression der SPHK1 in aortalen glatten Gefäßmuskelzellen (aSMC) und die damit verbundene, verstärkte Produktion der Signallipids S1P sowie die daraus resultierenden Einflüsse auf das Proliferations- und Migrationsverhalten der aSMC. Ferner sollte untersucht werden, ob eine Induktion der SPHK-1 durch FXa auch zu einer verstärkten Freisetzung von S1P führt. Dies sollte zunächst in Hinblick auf die Transkript- und Proteinexpression der SPHK-1 *in vitro* untersucht werden. Im Falle einer SPHK-1-Induktion durch FXa sollten die zu Grunde liegenden Signalwege näher untersucht und charakterisiert werden. Weiterhin sollte der Einfluss von FXa auf das Proliferations- und Migrationsverhalten nach einer Verletzung untersucht werden. Von weiterem Interesse war eine mögliche Regulation der FXa Rezeptoren PAR-1 und PAR-2 durch S1P. Aufgrund der möglichen Rollen in der Progression der Atherosklerose sollte mittels immunhistochemischer Methoden das Vorhandensein von FXa und der SPHK-1 in den SMCs von atherosklerotischen Plaques von Mäusen und Menschen untersucht werden.

2. Material und Methoden

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in höchster verfügbarer Reinheit von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Coomassie Brilliant-Blau R-250 wurde von Bio-Rad (München) bezogen. Die in Tab. 2 aufgelisteten Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit entmineralisiertem Wasser hergestellt.

2.1 Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen

Antigenretrivallösung	0,1 M Natriumcitrat
Blaumarker (10x)	30% Glycerol, 0.04% Bromphenolblau
Blockierlösung	10% FCS, 1% BSA in TBS
Blot-Puffer	190 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol
HBE-Puffer	25 mM Hepes (ph 7,5), 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 15 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1% Triton X 100
Laemmli-Puffer (2x)	100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (pH 7.0), 100 mM DL-Dithiothreitol, 20% (v/v) Glycerin, 4% (m/v) SDS, 0.002% Bromphenolblau
Lauf-Puffer	190 mM Glycin, 25 mM Tris, 0.1% (m/v) SDS
Lipidlyse Puffer	155 mM NH_4CL , 1 mM EDTA, 10 mM KHCO_3
Paraformaldehydlösung 4%	96 % H_2O (ph 8), 4 % Paraformaldehyd
PBS	137 mM NaCl, 9.6 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 (pH 7.4)

Material und Methoden

Sammelgelpuffer	0.5 mM Tris/HCl (pH 6.8)
TBS 1 (10x)	100 mM Tris/HCl, 1.5 mM NaCl (pH 7.4)
TBS 2	50 mM Tris/HCl (pH 7,6)
TBST	100 mM Tris/HCl, 1.5 mM NaCl (pH 7.4), 0,1% Tween 20
TBST-M TBST	5% (m/v) Milchpulver
TBST-M advanced	2% (m/v) advanced blocking reagent
Trenngelpuffer	1.5 mM Tris/HCl (pH 8.8)
Wasserstoffperoxidlösung 3%	97% Methanol, 3 % H ₂ O ₂

2.2 Substanzen

Die in der Arbeit verwendeten Substanzen und Fertigkits sind unter Angabe des Herstellers in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Substanz / Kit	Hersteller
Actinomycin D	Merck (Darmstadt)
Aquatex	Merk (Darmstadt)
ECL Advance	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
Hoechst 33342	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Humanes α -Thrombin	Enzo Life Sciences (Lörrach)
Hyperfilm TM	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
LiCOR InCell Western Kit	LiCOR, Bad Homburg
MAP Kinase Inhibitor (PD98059)	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
myristoylated protein kinase A inhibitor (Myr-PKI)	Calbiochem (San Diego, CA, USA)

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas Life Sciences (St. Leon-Rot)
PAR- aktivierende Peptide (1: TFLLRN und 2: SLIGKV)	Biomedical Research Centre (BMFZ), (Düsseldorf); Biosynthan (Berlin)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich (Hamburg)
PKC Inhibitor (GF109203X)	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
RAC-1 Inhibitor (NSC23766)	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
TaqMan® Gene Expression Master Mix (4369016)	Life Technologies (Darmstadt)
Rho-Kinase Inhibitor (Y-27632)	Cayman Chemicals (AnnArbor, Michigan, USA)
Ribojuice™	Merck (Darmstadt)
Rottlerin	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
SPHK-Inhibitor (SKI)	Cayman Chemicals (AnnArbor, Michigan, USA)
SPHK-1 siRNA ON-TARGETplus SMARTpool	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)
[³ H]Sphingosine	Perkin Elmer (Rodgau)
Qiagen® OneStep RT-PCR Kit	Qiagen GmbH (Hilden)

2.3 Antikörper

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper sind unter Angabe der zugehörigen Applikationen und der eingesetzten Verdünnungen in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Antikörper	Applikation	eingesetzte Verdünnung
α-smooth muscle actin (Abcam 5694)	Immunhistologie	1:200
β Aktin (Sigma A5441)	Immunhistologie	1:200
	Western Blot	1:5000

Material und Methoden

β Aktin (abcam 8229)	Immunhistologie	1:400
FXa, (Abcam ab61361)	Immunhistologie	1:200
	Western Blot	1:500
FXa (Abcam ab61389)	Immunhistologie	1:100
FXa (Abcam ab110138)	Immunhistologie	1:200
M-Actin (Pierce MA1-744)	Immunhistologie	1:100
Par2 (Santa Cruz sc135004)	Immunhistologie	1:400
SMMHC (Abcam ab82541)	Immunhistologie	1:200
Smoothelin (Abcam ab 8969)	Immunhistologie	1:200
SPHK1 (Abcam ab16491)	Immunhistologie	1:100
	Western Blot	1:400
SPHK1 (Abgent AP7237c)	Immunhistologie	1:50
	Western Blot	1:200
	InCell Western	1:500
TF (American Diagnostica 4501)	Immunhistologie	1:400
goat anti mouse HRP (Santa Cruz 2005)	Immunhistologie	1:400
	Western Blot	1:30000
goat anti rabbit HRP (Santa Cruz sc 2004)	Immunhistologie	1:400
	Western Blot	1:30000

goat anti mouse IRDye 800CW (LiCOR 926- 32210)	InCell Western	1:500
donkey anti mouse Alexa Fluor 488 (Abcam ab150105)	Immunhistologie	1:500
donkey anti sheep Alexa Fluor 488 (Abcam ab150177)	Immunhistologie	1:500
rabbit anti mouse Alexa Fluor 568 (life technologies A-11061)	Immunhistologie	1:500
rabbit anti goat Alexa Fluor 568 (life technologies A-11079)	Immunhistologie	1:500
donkey anti mouse Alexa Fluor 488 (Abcam ab150061)	Immunhistologie	1:500
goat anti rabbit Alexa Fluor 568 (life technologies A-21069)	Immunhistologie	1:500

2.4 Zellkultur

Die für die Zellkulturmedien verwendeten Substanzen wurden von Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe), Zellkulturgefäße von den Firmen Becton-Dickinson (Heidelberg) und Greiner (Solingen), sowie Smooth Muscle Cell Growth Medium (SMCGM) von der Firma Promocell bezogen.

2.4.1 Isolation und Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen (SMCs) des Menschen wurden durch Explant-Technik aus der Aorta isoliert. Dabei handelte es sich um Aortenproben, die vom Klinikum Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurden. Die Kultivierung erfolgte in SMCGM (Provitro, Deutschland) 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 Untersuchungen wurden Zellen der Passage 2 - 10 verwendet.

2.5 Präparation und Analyse von RNA

2.5.1 Präparation von Gesamt-RNA aus SMCs

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten SMCs erfolgte nach der Trizol-Methode (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe). Hierzu wurden die Zellen direkt nach Abnahme des Mediums in der Kulturschale durch Zugabe eines 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, ausgeschüttelt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend 10 min zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13). Von dem wässrigen Überstand wurden ca. 450 µl abgenommen und die darin gelöste RNA durch Zugabe von Isopropanol (500 µl) für mindestens 2 Stunden bei 4 °C ausgefällt. Nach anschließender Zentrifugation für 20 min (13000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13) wurde das erhaltene RNA-Pellet in 800 µl Ethanol gewaschen und anschließend erneut für 20 min zentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13). Das RNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet, in Wasser (22µl) 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.

2.5.2 Quantifizierung von RNA

Die Konzentration und Reinheit der präparierten RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm in einem Nanodrop - Spectrometer (Thermo Scientific, Wilmington; USA) 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.

2.5.3 cDNA-Synthese

Zum Transkriptionachweis wurde die gesamte RNA mittels retroviraler reverser Transkriptase (RT) in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese cDNA diente bei der nachfolgenden Real Time PCR als Matrize. Für diesen Vorgang wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems benutzt. Der Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese wurde in 0,5 ml PCR Reaktionsgefäßen auf Eis pipettiert. Die einzusetzende Menge an RNA wurde für jede Probe so berechnet, dass nach Ablauf der cDNA Synthese 700 ng cDNA in einem 20 µl Gesamtansatz (Tab. 2) vorlagen. Die PCR wurde in dem PCR-Automaten *Mastercycler Gradient* der Firma Eppendorf durchgeführt (Tab. 3).

Tabelle 2: Ansatz für die cDNA Synthese

RT buffer (10 fach)	2µl
Random Primer	2µl
MulitScribe Polymerase	1µl
dNTP's (25 fach)	0,8 µl
Proben RNA	variabel
H ₂ O	variabel

Tabelle 3: Ablauf der cDNA – Synthese

Schritte	Temperatur in °C	Dauer in min.
Anlagerung der Oligonucleotide	25	10
Umschreiben von RNA in DNA	37	120
Inaktivierung der reversen Transkriptase	85	5
Probenkühlung bis zur weiteren Verarbeitung	4	∞

2.5.4 Real – Time PCR

Realtime PCR nutzt einen Lightcycler (7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems; Foster City, USA) mit der Möglichkeit der Echtzeit- (Real-Time) Fluoreszenz-Detektion. Dadurch ist es möglich, die Amplifikation einer Nukleinsäure während des Laufes zu beobachten. Das ermöglicht die Quantifizierung der Ausgangsmenge, das heißt die Quantifizierung von mRNA (cDNA) und DNA, welche proportional zur Fluoreszenzintensität ist. Des Weiteren ist die Typisierung von Proben mittels einer Schmelzpunktanalyse möglich. Der Lightcycler weist die Fluoreszenz in drei getrennten Kanälen nach. Die Quantifizierung des akkumulierten PCR Produkts erfolgt durch Fluoreszenzmessungen DNA bindender TaqMan Sonden. Diese Sonden bestehen aus kurzen, einsträngigen RNA – Molekülen mit einer zum Zielgen komplementären Sequenz. Ferner befinden sich an der Sonde ein Reporter – Fluoreszenzfarbstoff sowie ein Quencher. Bei der Anlagerung an die Ziel - DNA entfernen sich Quencher und Reporterfarbstoff voneinander und ein Fluoreszenzsignal wird sichtbar. Der Lightcycler misst am Ende eines jeden Elongationsschnittes die Gesamtfluoreszenz in der Probe und somit die Zunahme an PCR-Produkten. Da die Fluoreszenz spezifisch für die Sequenz der DNA ist, korreliert die Leuchtintensität direkt mit der DNA - Menge der Zielgens. Zur relativen

Material und Methoden

Quantifizierung wurde GAPDH als interner Standard verwendet, wobei die Reaktionen für das zu untersuchende Gen und die Kontrolle parallel in einem Lauf angesetzt wurden. So konnte durch die Real-Time Detektion das Amplicon direkt quantifiziert werden. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte durch die mitgelieferte Software (7300 System SDS v1.4 Software).

2.5.4.1 Ansatz für die Real - Time PCR

Von jeder Probe wurden zu Beginn Verdünnungen, erstellt um eine Gesamt RNA - Konzentration von 2,78 ng/µl in einem Volumen von 100 µl zu erreichen (Optimalkonzentration für den SPHK1 Assay). Dann wurde jeweils ein Mastermix (je 1µl Taqman Primer, 10µl Taqman Mastermix /Well) für das Zielgen sowie die interne Kontrolle angefertigt. Für den dann folgenden Versuch wurden in einer 96 - Loch - Platte anschließend 9µl RNA und 11 µl Mastermix gemischt. Je Probe wurden dabei 3 Ansätze für das Zielgen und die Kontrolle auf der 96 – Loch Platte aufgetragen.

2.6 Analyse von Proteinen

2.6.1 Western Blot-Verfahren

2.6.1.1 Isolierung von Proteinen aus SMCs

Für die Untersuchungen mittels Western Blot wurden Zellen einer 6-Loch-Platte nach einmaligem Waschen mit PBS durch Zugabe von 1 x HBE / Laemmli-Puffer (100 µl) lysiert. Das Zell-Lysat wurde mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturplatten gelöst, in Reaktionsgefäße überführt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Bei dieser Hitzebehandlung kommt es zu einer reduktiven Spaltung vorhandener Disulfidbrücken, zur negativen Aufladung und zur Linearisierung der Proteine. Im Anschluss daran nicht sofort analysierte Proben wurden bei –20 °C gelagert.

2.6.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine aus dem Zell-Lysat erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese. Dazu wurde zwischen zwei Glasplatten zunächst übereinander ein 1.5 mm dickes Trenngel (10 % Acrylamid) und nach

erfolgter Polymerisation ein Sammelgel (4 % Acrylamid) gegossen. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm mit der benötigten Taschenanzahl (10 oder 15) eingebracht. Nach Befüllen der Taschen mit jeweils 20 - 30 µl Lysat erfolgte der Gel-Lauf bei 200 V für 45 min in einer Bio-Rad Mini PROTEAN™ 3 Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad, München). Als Molekulargewichtsmarker diente ein hochmolekularer Proteinstandard (New England Biolabs, Beverly, MA, USA).

2.6.1.3 Proteintransfer

Die im Polyacrylamid -Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels einer „Semi-Dry“-Blotting Apparatur (Bio-Rad, München, Deutschland) auf eine Methanol - benetzte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon™-P, Millipore, Bedford, MA, USA) transferiert. Der Transfer erfolgte mit Blotpuffer bei 13 V für 60 min.

2.6.1.4 Antikörper-Hybridisierung und Detektion

Zur Sättigung unspezifischer Bindungen wurden die Membranen unmittelbar nach dem Proteintransfer für 3 h bei RT oder alternativ über Nacht bei 4 °C in TBST-M oder TBST-M advanced prähybridisiert ("Blocken"). Zum immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine erfolgte anschließend die Hybridisierung mit Primärantikörpern (1:500 - 1:2000 in 5 - 10 ml TBST - M oder TBST - advanced). Dazu wurden die Membranen einzeln mit der Antikörperlösung in Falcon Röhrchen gelagert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST (je 15 min) erfolgte die Hybridisierung mit Peroxidase - gekoppelten Sekundärantikörpern (1:4000 in TBST-M oder 1:30000 TBSTM advanced) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen (TBST-M / 3 x 15 min) wurden die Proteine mit Hilfe des Advanced ECL Western Blotting Substrate (GE Healthcare, Solingen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers detektiert. Bei dieser Methode wird das Substrat (Luminol) durch die Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper mittels H₂O₂ oxidiert und die entstehende Lichtemission (Chemolumineszenz) durch Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm™ ECL™, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) visualisiert. Die belichteten Filme wurden im Anschluss mit Hilfe eines Scanners und entsprechender Software ausgewertet (GSM 800,

Biorad; Quantity One 2.4, Biorad, München). Die für Western Blot - Experimente verwendeten Antikörper sowie die entsprechenden Verdünnungen sind in Abschnitt 2.3 aufgelistet.

2.6.2 Prüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung

Um die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung zu kontrollieren, wurden die PVDF-Membranen nach der Detektion kurz mit Wasser gewaschen (5 min), und anschließend die Antikörper mittels einer 0,2 molaren NaOH - Lösung (5 min) entfernt. Nach einem weiteren Waschschrift (5 min H₂O) wurden die Membranen erneut geblockt (TBST-M 30 min) und dann mit einem β - Actin Antikörper hybridisiert (45 min RT). Im Anschluss wurde die Membran erneut gewaschen (TBST-M / 3 x 5 min) sowie mit einem Peroxidase - gekoppelten Sekundärantikörpern für 1 h bei RT inkubiert.

2.6.3 Proteinanalyse mittels InCell Western

Um den Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Expression der SPHK1 zu untersuchen, wurde die von der Firma LiCOR ® entwickelte *InCell* Western Methode verwendet. Dazu wurden die SMC in 96 well Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90% in SMSG-Medium belassen. Anschließend wurden die Zellen für 48 h gehungert. Dann wurden sie mit den Inhibitoren behandelt. Nach 30 min Inkubationszeit wurden die Zellen zusätzlich mit FXa (30nM) für 16 h behandelt (in Anwesenheit der Inhibitoren). Nach Abschluss der Behandlung wurden die Zellen 3 mal für 15 min mit PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde mit PFA 4% fixiert. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen (3 mal 15 min mit PBS). Um den im Anschluss verwendeten Antikörpern den Eintritt in das Zellinnere zu ermöglichen, wurden die Zellen 5 min lang mit 1% Triton X100/PBS permeabilisiert und erneut gewaschen. Um die unspezifischen Bindungen zu sättigen, wurden die Zellen nun für 6 h mit einem speziellen, von LiCOR gelieferten Puffer behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen für 16 h bei 4°C mit dem SPHK1 Antikörper inkubiert. Nach der Primärantikörperinkubation wurden die Zellen erneut gewaschen und für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper behandelt. Nach drei weiteren Waschschriften wurden die Zellen mit einem Farbstoff behandelt, der im späteren Verlauf als Referenz diente. Die so behandelten Platten wurden dann auf dem LiCOR Laserscanner ausgelesen und mit der entsprechenden Software ausgewertet.

2.7 Immunhistochemische Arbeiten

2.7.1. Vorbereitung der Versuchstiere und Organentnahme

Für die immunhistochemischen Versuche erhielten Mäuse (C57B6/ApoE^{-/-}) über 2 bzw. 4 Wochen eine fettreiche Diät (Western Diät). Danach wurden die Mäuse getötet und die Herzen entnommen. Die entnommenen Herzen wurden 24 h in Paraformaldehydlösung (4%) gelagert und anschließend für 2 h in Wasser überführt. Danach wurden die Organe der Düsseldorfer Tierversuchsanstalt zur Entwässerung sowie zur Einbettung in Paraffin übergeben. Die so aufbereiteten Herzen wurden dann mit Hilfe einer Schneidemaschine in 5µm dünne Scheiben geschnitten und auf Objektträger überführt. Dabei wurden für die weitere Bearbeitung nur Schnitte durch den Aortenursprung genutzt. Um eine optimale Fixierung der Schnitte zu gewährleisten, wurden die Objektträger daraufhin für 1 h hitzebehandelt (60°C).

2.7.2 Färbung von Aortenursprüngen mittels Diaminobenzidin

Zur Durchführung der Färbung musste zuerst das Paraffin mit Hilfe von Xylol entfernt werden (3 x 15 min). Anschließend wurden die Objektträger in Ethanol überführt (2 min). Zur Absättigung der endogenen Peroxidasen wurden die Proben dann 20 min mit einer 3 % Wasserstoffperoxid - Methanollösung behandelt. Danach wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe geführt (Ethanol 100 / 95 / 70% je 2 min) und dann für 10 min in PBS gewässert. Um die Antigenbindestellen zu regenerieren, wurden die Proben im Anschluss in einer Antigenretrivallösung hitzebehandelt (20 min, 100°C). Danach wurden die Schnitte mit PBS gewaschen (3 x 5 min) und es erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindestellen (1h in Blockierlösung). Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (Antikörper - abhängige Verdünnung in PBS + 1% BSA) inkubiert. Nach weiteren Waschschritten (PBS, 3 x 15 min) erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1:400 in PBS, 1h RT). Zur Vorbereitung der Detektion mit Diaminobenzidin (DAB) wurden die Schnitte zunächst für 10 min mit TBS 2 bei 37°C behandelt und dann mit der DAB - Lösung behandelt (30 sek - 10 min, 37°C). Nach weiteren Waschschritten mit TBS 2 und Wasser (5 bzw. 1 min) wurden die Präparate zusätzlich mit Hämalaun gefärbt. Um überschüssige Farblösung zu entfernen, wurden die Schnitte dann kurz in Wasser und 1 % HCl - Lösung getaucht sowie 10 min mit Leitungswasser gespült und im Anschluss mit Aquadex versiegelt. Die

Untersuchung der so gefärbten Präparate erfolgte mit Hilfe von Durchlichtmikroskopie an einem Olympus BX 50 bzw. Zeiss Axiovision Mikroskop. Neben den so behandelten Schnitten wurden uns anfänglich Gefrierschnitte der AG - Fischer zur Verfügung gestellt. Die Behandlung dieser Präparate erfolgte ebenso wie die der Paraffinpräparate, abgesehen von der anfänglichen Xylol und Ethanolbehandlung.

2.7.3 Fluoreszenzfärbung von Aortenursprüngen

Die Proben wurden für diese Färbung wie in Punkt 2.7.3 behandelt. Abweichend von diesem Protokoll wurden hier Sekundärantikörper mit Fluoreszenzfarbstoff verwendet (siehe 2.3) (1:400 in PBS, 1h RT). Um den jeweiligen Farbstoff zu schützen, wurden alle Schritte ab der Sekundärantikörper-Inkubation im Dunkeln durchgeführt. Nach der Antikörperinkubation wurden die Schnitte gewaschen (PBS, 3 x 15 min) und anschließend die Zellkerne mit Hilfe des Hoechst-Farbstoffs sichtbar gemacht. Nach den finalen Waschschritten wurden die Schnitte mit Aquatex eingedeckt und nach dem Trocknen mit Hilfe des Zeiss Axiovision Mikroskops untersucht.

2.8 Isolation von S1P

Aortale glatte Gefäßmuskelzellen wurden zunächst in 6 well Platten ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 70% sind die Zellen für 48h gehungert (FCS freies SMCGM) und anschließend für 16 h mit 30 nM FXa behandelt worden. Darauf folgend wurden die Zellen für 5 min mit 0,2 μ Ci [3 H]Sphingosin inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann im Lipidlysepuffer aufgenommen. Danach wurden die Lipide mittels Chloroform/Methanol-Fällung isoliert (BLIGH and DYER 1959).

2.9 Lipidauftrennung

Die isolierten Lipide wurden nach dem Eindampfen der Proben in Methanol gelöst und auf die Silica Gel 60 Dünnschichtchromatographieplatten (Macherey Nagel GmbH, Düren) aufgetragen. Zur Auftrennung der Lipide erfolgte zunächst ein Lauf für 1 h in Dichlormethan:Aceton (20:1). In einem zweiten Lauf in Butanol:Essigsäure:Wasser (3:1:1) für 1 h Stunde erfolgte die finale Auftrennung der

Sphingolipide. Im Anschluss wurden die Platten getrocknet und mit Scintillationslösung (Rotiszint® eco plus, Roth) beschichtet. Auf die so behandelten Platten wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser in einer Fotokassette bei – 80°C für 72 h belichtet. Im Anschluss wurde der Film entwickelt und mit Hilfe eines Scanners (GS-800 Calibrated Densitometer; BioRad, München) eingelesen. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mittels Quantity One Software.

2.10 Herabregulation der SPHK1 mRNA durch spezifische siRNA

Um die Wirkung der SPHK1 auf verschiedene Prozesse wie Migration oder Proliferation zu untersuchen, war es nötig, dieses Enzym herab zu regulieren. Dazu wurde ein Mix aus spezifischen siRNAs genutzt (Dharmacon, USA). Nach der Aussaat der SMC (ca 70% Konfluenz) wurden sie mit einer Mischung aus siRNA (30nM) und Ribojuice (Merk, Darmstadt), einem kationischen Transfektionsreagenz entsprechend der Anweisungen des Herstellerprotokolls für 16 h behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen für 48 h gehungert und dann den verschiedenen Versuchen zugeführt.

2.11 Rho A Pulldown Assay

Zur Bestimmung des aktiven Rho A in SMC nach Stimulation wurden die Zellen in 6 well Platten ausgesät und für 48h durch FCS Entzug gehungert. Danach erfolgte die Stimulation mit FXa (30nM) im Zeitverlauf stimuliert (Abb. 3.15). Thrombin diente hier als Kontrolle für die Aktivierung der Rho A Systems. Nach Abschluss der Stimulation wurden die Zellen lysiert. Zur Bestimmung des Gesamt - Rho A - Gehalts sowie zur Bestimmung der Menge an aktivem Rho A wurde ein Rho-Rhotekin Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) entsprechend dem Herstellerprotokoll eingesetzt. Die daraus erhaltenen Isolate wurden mittels Western Blot aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und die Banden durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht und ausgewertet.

2.12 Bestimmung der DNA-Neusynthese mittels [³H]Thymidin Inkorporationsassay

Zur Bestimmung der Proliferationsrate von SMC nach FXa Stimulation wurden die SMC in 24 well Platten bis zu einer Konfluenz von ca. 70% gezüchtet, anschließend entweder mit SPHK1 spezifischer siRNA behandelt oder direkt für 48 h gehungert. Daraufhin folgte die Zugabe der Inhibitoren (bei Verwendung von siRNA erfolgte keine Inhibitorzugabe) und 30 min später die Zugabe von FXa (30 nM) sowie [³H]Thymidin (1μCi). Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert und mit Scintillatorflüssigkeit (2ml, Rotiszint® eco plus, Roth) versetzt. Das Auslesen der radioaktiven Signale erfolgt mit Hilfe eines β-Counters (Perkin Elmer, USA).

2.13 Migrationsbestimmung von SMC

Um den Einfluss von FXa auf die Migration von SMC zu untersuchen, wurde der Wound Scratch Assay (Weber *et al.* 2000) eingesetzt. Dazu wurden SMC in 24 well Platten ausgesät (90% Konfluenz). Danach erfolgt entweder die Behandlung mit SPHK1 spezifischer siRNA oder die Zellen wurden direkt für 48 h gehungert. Dann wurde in den Zellrasen eine „Wunde“ mit definierter Breite gesetzt (1 ml Pipettenspitze). Um zu verhindern, dass neben der Migration auch Proliferation beim Verschluss der Wunde eine Rolle spielt, wurde dem Medium der Zellen ab diesem Zeitpunkt Hydroxyharnstoff (5mmol/l) zugesetzt. Anschließend wurden die Inhibitoren oder Aktivatoren zugesetzt (bei siRNA-Behandlung entfiel die Inhibitorbehandlung) und die Zellen für 30 min inkubiert. Dann wurden die Zellen mit FXa behandelt. Daraufhin wurde den Zellen erlaubt, über einen Zeitraum von bis zu 36 h zu migrieren. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PFA 4% fixiert. Die Kerne wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst 33342 angefärbt und anschließend wurden die Wunden unter dem Mikroskop (BX 50, Olympus) fotografiert und die Anzahl der in den Spalt gewanderten Zellen ausgezählt.

2.14 Statistik

Die Angabe der Messdaten erfolgte als Angabe der Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Analyse von mehreren Versuchsgruppen (>2) wurde der nicht parametrische ANOVA (Kruskal Wallis test) sowie Dunn's multiple comparison post-hoc Test eingesetzt. Das Signifikanzniveau P wurde bei 0,05 festgelegt. Zur Untersuchung von zwei

Material und Methoden

Versuchsgruppen wurde der ungepaarte oder gepaarte „Student's t-Test“ verwendet. Das Signifikanzniveau P wurde jeweils bei 0,05 festgelegt. Bei der zur Auswertung verwendeten Software handelte es sich um GraphPad Prism (V.5.00, Prism Software, San Diego, USA) und Microsoft Excel™ (Microsoft GmbH, Frankfurt)

3. Ergebnisse

3.1 Expression der SPHK-1 in humanen Plaques

Die Sphingosinkinase (SPHK) wird ubiquitär in Säugerzellen exprimiert. Ihr Produkt S1P reguliert zahlreiche unterschiedliche Zellfunktionen. Insbesondere der Einfluss von S1P auf lokale inflammatorische Reaktionen trägt möglicherweise zur Entstehung von Entzündungserkrankungen der Gefäßwand, wie sie die Atherosklerose darstellt, bei. Die SPHK liegt in zwei Isoformen vor, SPHK-1 und SPHK-2. Beide Isoformen sind in der Lage, S1P zu produzieren und werden daher zu den so genannten Signalezymen gerechnet (Wattenberg 2010). S1P fungiert dabei als intra- und extrazellulärer Messenger. In einigen Zelltypen führt eine Erhöhung des cAMP-Spiegels oder eine PKC Aktivierung zur Induktion der SPHK-1 (Olivera *et al.* 1999). Eine Aktivierung der SPHK-1 durch die Protease aktivierten Rezeptoren (PAR) ist zwar für PAR-1, -3 und -4 in Endothelzellen beschrieben, jedoch ist die Rolle von FXa und PAR-2 in aortalen glatten Gefäßmuskelzellen bislang unbekannt (Billich *et al.* 2009). Zunächst sollte deshalb untersucht werden, ob die SPHK-1 in humanen aortalen Plaques nachweisbar ist. Dazu wurden humane *Arteria carotis communis* Präparate genutzt. Diese stellte die Gefäßchirurgie des Universitätsklinikum Düsseldorf nach einer Atherektomie der A. carotis zur Verfügung. Mithilfe immunhistochemischer Färbungen der in Paraffin eingebetteten Proben konnte SPHK-1 Expression im Plaque nachgewiesen werden (Abb. 3.1 A), erkennbar an der braunen Färbung im Gewebe. In weiteren Schnitten wurde die Antikörperspezifität unter Nutzung eines unspezifischen Kontroll-IgG überprüft, hier exemplarisch für die SPHK-1 Färbung dargestellt (Abb. 3.1 B). Im Gegensatz zum spezifischen SPHK-1 Antikörper zeigt die Färbung mit dem nicht spezifischen Kontroll-IgG keinerlei Braunfärbung. Des Weiteren wurden aSMC in diesem Bereich durch eine M-Aktin Färbung nachgewiesen (Abb. 3.1 B), erkennbar an der roten Färbung.

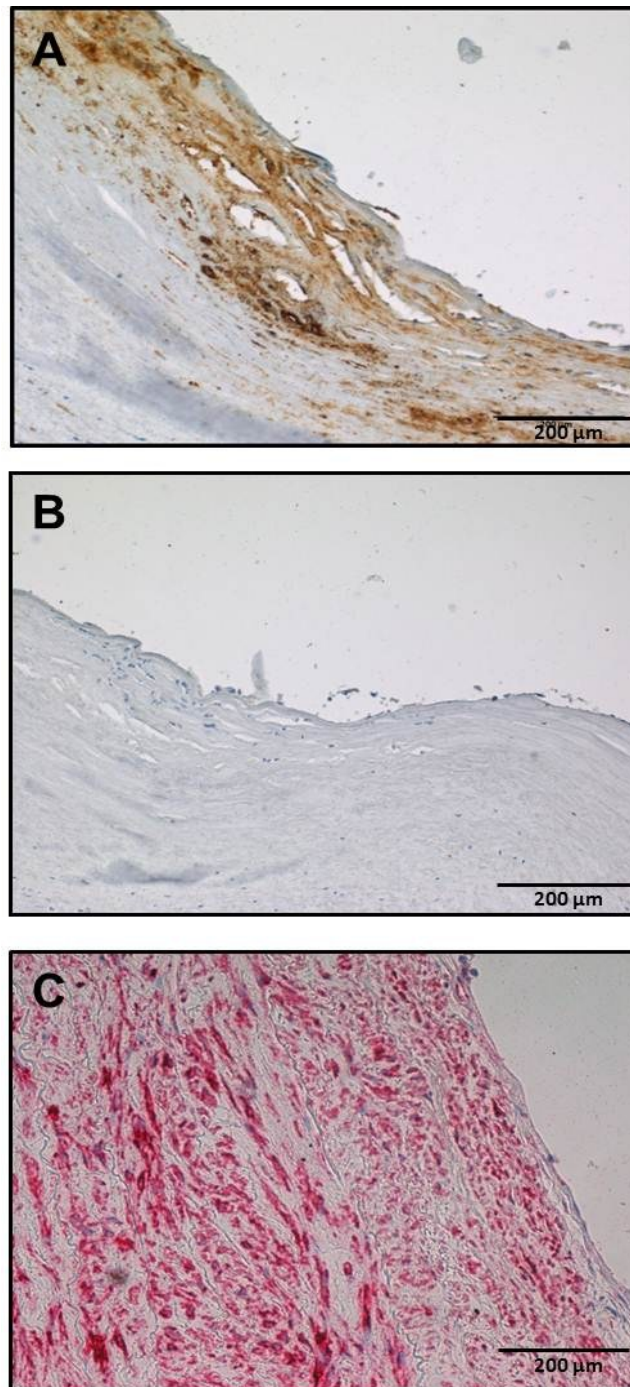


Abb. 3.1: Immunhistochemischer Nachweis der SPHK-1 und M-Actin im humanen Carotis Plaque.

A) zeigt den Schnitt durch eine humane Atherektomie-Probe im Bereich der fibrotischen Kappe, behandelt mit einem SPHK-1 spezifischen Antikörper. **B)** zeigt einen Folgeschnitt, behandelt mit einem unspezifischen Kontrollantikörper. **C)** zeigt einen M-Aktin (Muskel-Actin) gefärbten Folgeschnitt. (Vergrößerung 100-fach)

3.2 Expression von PAR-1 und PAR-2 in humanen Plaques

Da ein positiver Nachweis der Expression von SPHK-1 in humanen Plaques erbracht werden konnte, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die von FXa aktivierten Rezeptoren PAR-1 und PAR-2 ebenfalls im Plaquegewebe exprimiert werden. Dazu wurden erneut Serienschnitte von humanen aortalen Plaques angefertigt und mit spezifischen Antikörpern gegen PAR-1 und PAR-2 behandelt. Ferner wurden zur Kontrolle wiederum nicht spezifische IgG Antikörper in konsekutiven Schnitten eingesetzt.

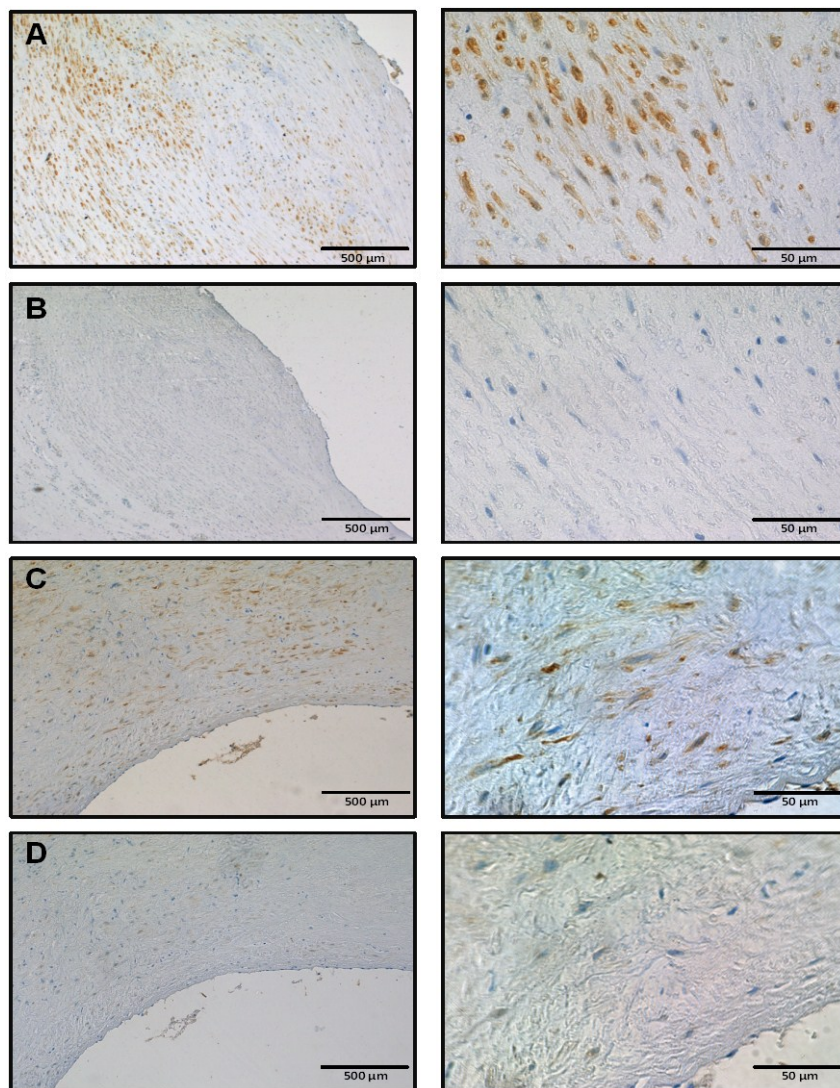


Abb. 3.2: Nachweis von PAR-1 und PAR-2 in humanem atherosklerotischen Gewebe in mittels immunhistochemischen Färbungen.

Dargestellt sind repräsentative Gewebeschnitte aus humanen Karotisplaques, die mit **A)** Par-1 sowie **C)** PAR-2 Antikörpern behandelt wurden. Begleitend wurden korrespondierende Schnitte mit unspezifischen Kontrollantikörpern behandelt, **B); D)** (Vergrößerung 100-fach bzw. 400-fach).

Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass die von FXa aktivierten Rezeptoren in humanen Plaques exprimiert werden (Abb.3.2). Dies ist zu erkennen an der braunen Färbung in den Schnitten, die mit einem spezifischen Antikörper behandelt wurden. Im Gegensatz dazu weisen die Kontrollschnitte keine entsprechenden Signale auf.

3.3 Nachweis von FX/FXa in humanen Atherektomie-Proben

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl die SPHK-1 als auch die Protease aktivierten Rezeptoren 1 und 2 im atherosklerotischen Gewebe exprimiert werden, wurde im weiteren Verlauf untersucht, ob in identischen Bereichen der Läsionen auch FXa immunhistochemisch nachweisbar war. So wurden Serienschnitte angefertigt, welche jeweils mit einem FX/FXa -oder einem SMC-spezifischen α -*smooth muscle actin* Antikörper oder einem SPHK1 Antikörper behandelt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass FX/FXa im Bereich der Muskelzellen und SPHK1 – Expression zu finden ist (Abb. 3.3).

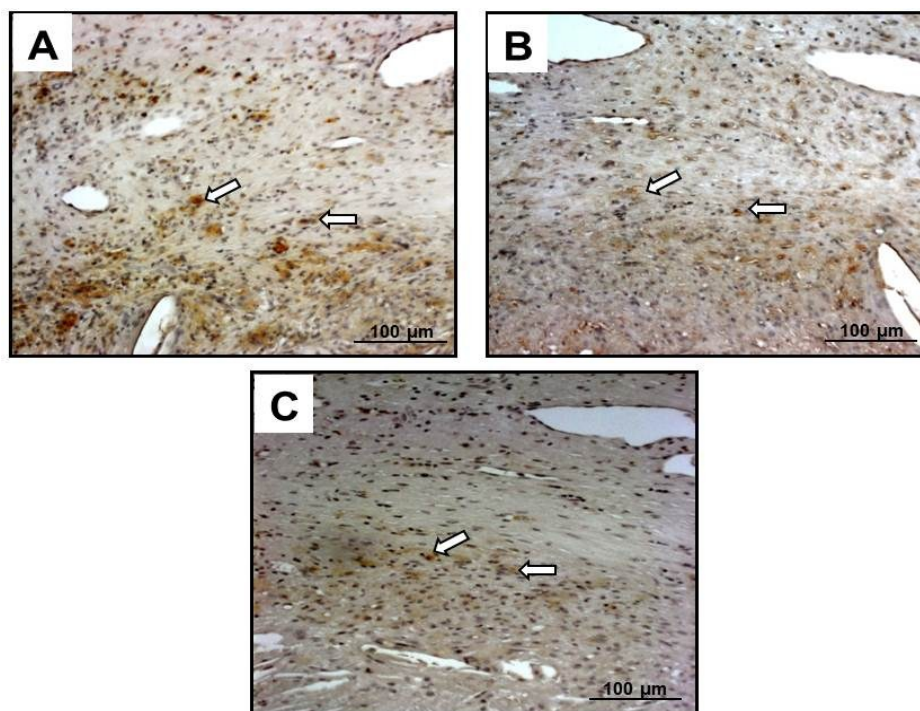


Abb. 3.3: Immunhistochemischer Nachweis von α SMC Aktin, FX/FXa und SPHK1 im humanen Carotisplaque

A) Repräsentativer Gewebeschnitt aus einem humanen Carotisplaque, der mit einem α -*smooth muscle actin* Antikörper zum Nachweis von glatten Gefäßmuskelzellen behandelt wurde. **B)** zeigt einen Folgeschnitt, der mit einem FX/FXa Antikörper behandelt wurde. **C)** zeigt einen weiteren Serienschnitt mit einer SPHK1-Färbung. (Vergrößerung 200 fach)

Ergebnisse

In einem weiteren Ansatz sollte die Kolokalisation von FX/FXa und den in der Läsion vorhandenen Muskelzellen sowie die Kolokalisation der SPHK1 und SMCs (anti-Smoothelin) mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. In einem letzten Ansatz sollte untersucht werden, ob der für die Aktivierung von Faktor-X nötige *tissue factor* (TF) ebenfalls im Bereich der Muskelzellen nachgewiesen werden kann. (Abb. 3.4) So wurden humane atherosklerotische Gewebeschnitte mit den entsprechenden Antikörperkombinationen behandelt. Da die verschiedenen Primärantikörper aus unterschiedlichen Wirtstieren stammten, konnten für ihre Detektion entsprechende Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Farbstoffen verwendet werden. Die so erhaltenen Bilder wurden im Anschluss übereinander gelegt, um die Kolokalisation (gelb) zu zeigen.

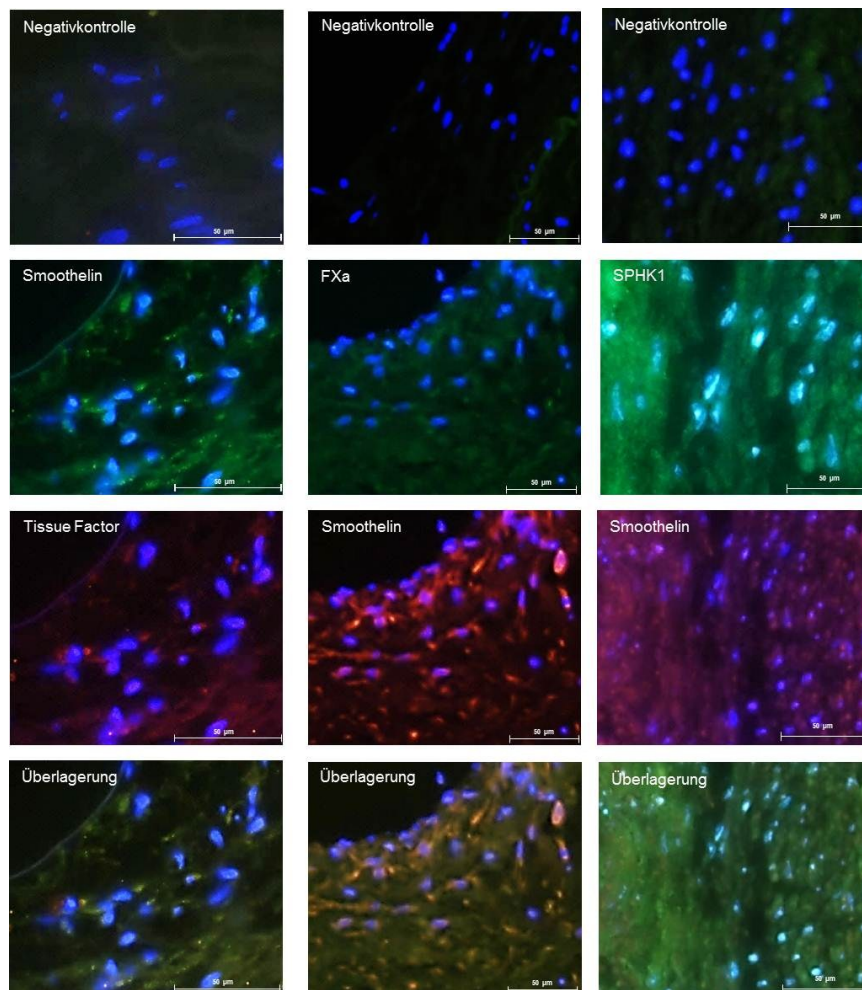


Abb. 3.4: Nachweis der Kolokalisation von FXa/SMC, SPHK1/SMC und SMC/TF

Dargestellt sind repräsentative Gewebeschnitte humaner Karotisplaques. Die obere Reihe zeigt jeweils die Kernfärbung mittels DAPI (Blau). Die beiden Reihen darunter zeigen jeweils die Färbung mit den entsprechenden Antikörpern. Die untere Reihe zeigt die Überlagerung.

Ergebnisse

Der zum immunhistochemischen Nachweis verwendete Antikörper ist jedoch nicht in der Lage, zwischen Faktor-X und seiner aktiven Form FXa zu unterscheiden. Um nachzuweisen, dass FX tatsächlich in seiner aktiven Form vorliegt und in der Lage ist, die Protease aktivierten Rezeptoren zu aktivieren, wurde humanes Plaquegewebe homogenisiert und FX sowie FXa mittels Westernblot nachgewiesen (Abb. 3.5). Zum Vergleich der aus humanem Plaquegewebe gewonnenen Extrakte mit hochreinem Protein wurden hierbei kommerziell erworbenen Standards für FX und FXa als Marker eingesetzt. Die Auswertung dieser Westernblots zeigt im Plaque sowohl das Vorhandensein von FX als auch von FXa.

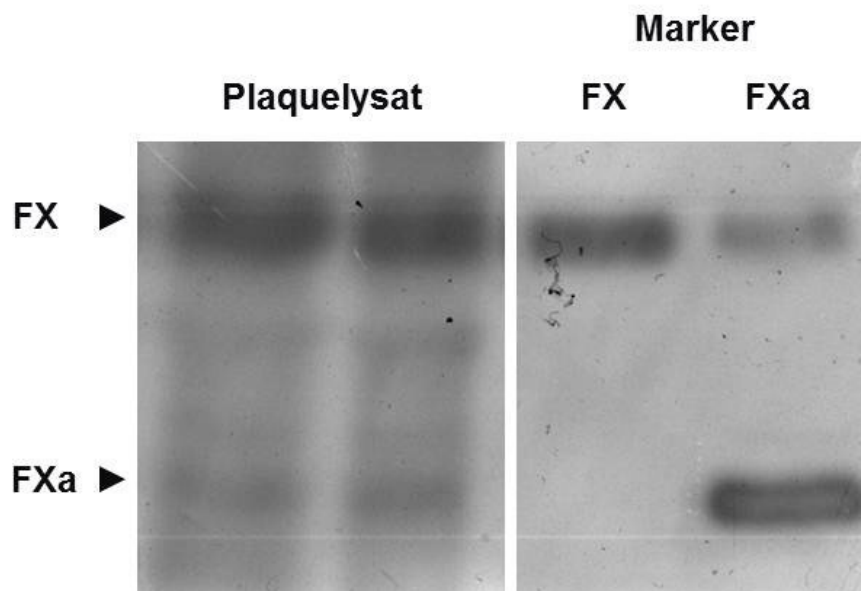


Abb. 3.5: Nachweis von FX/FXa im Plaquegewebe mittels Westernblot

Der Nachweis von FX und FXa wurde mittels Westernblot erbracht. Als Marker dienten die Reinsubstanzen FX und FXa. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot (n=3)

3.4 Untersuchung eventueller Einblutungen in humanen Plaques

In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob die im Gewebe gefundenen Vorkommen von FX/FXa überwiegend von Einblutungen stammten. Dazu wurden Schnitte der humanen Carotisplaques mit einem CD42 Antikörper behandelt. CD42 ist ein spezifischer Oberflächenmarker für Thrombozyten. In diesen Untersuchungen konnten in gewissem Umfang Signale für Thrombozyten nachgewiesen werden (Abb. 3.6). Jedoch entsprachen sowohl Verteilung als auch Intensität dieser Messwerte nicht dem Verteilungsmuster von FX/FXa in den Plaques. Die Schlussfolgerung

Ergebnisse

hieraus war, dass die im Gewebe vorhandenen FX/FXa Mengen überwiegend nicht aus akuten Einblutungen stammen können. Möglicherweise sind Diffusionsprozesse, beispielsweise als Folge einer auf Plaquegewebe erhöhten endothelialen Permeabilität, hieran ursächlich beteiligt.

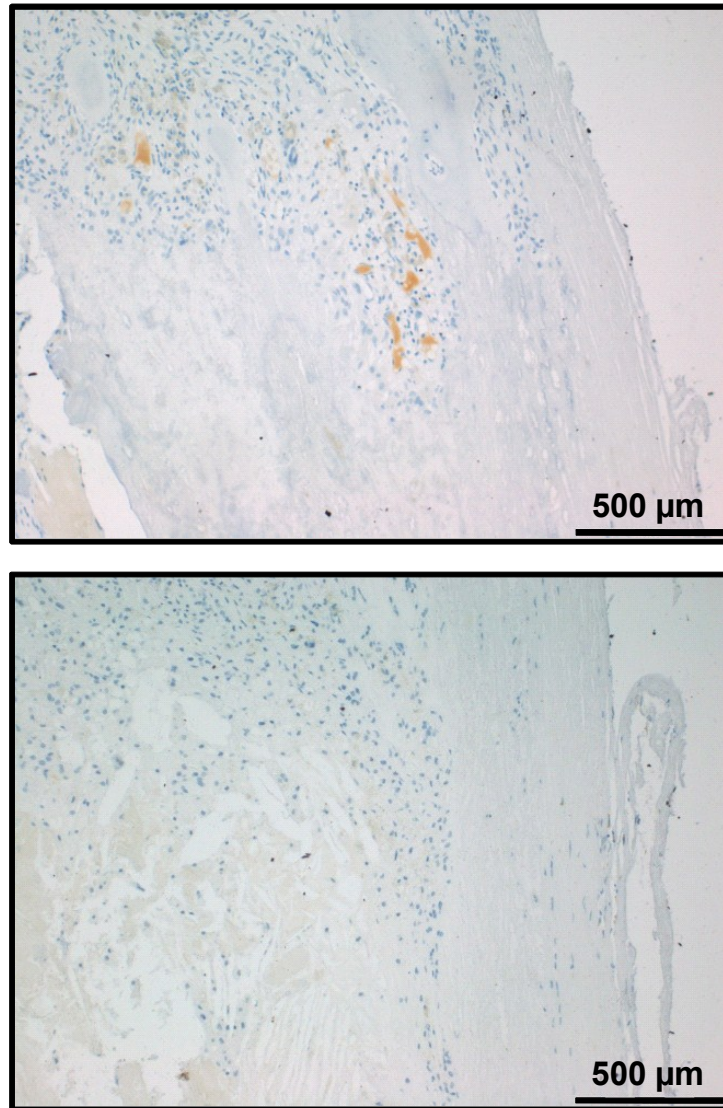


Abb. 3.6: Thrombozyten-Nachweis in Atherektomie-Proben

Dargestellt ist ein repräsentativer Gewebeschnitt, der mit einem Thrombozyten spezifischen Antikörper (CD42) behandelt wurde (Vergrößerung 100-fach).

3.5 FXa induziert die Expression der SPHK1

Nach einer Gefäßverletzung und im Anschluss erfolgter Thrombusbildung und Blutstillung ist auch nach Abschluss der Hämostase über einen Zeitraum von bis zu einer Woche noch eine erhöhte Bildung von FXa in der Gefäßwand nachweisbar (Ghigliotti *et al.* 1998). Die dabei produzierten Mengen entsprechen hierbei denen

Ergebnisse

des gebildeten Thrombins (Schrör *et al.* 2010). Insofern ist eine Hypothese der hier durchgeführten Untersuchungen, dass der an oder in der Gefäßwand gebildete FXa einen zeitlich anhaltenden Einfluss auf die Transkription proentzündlicher Gene wie beispielsweise der SPHK1 ausüben kann. Die Wirkung von FXa auf die Expression der SPHK1 in aSMC wurde zunächst auf Proteinebene in Hinblick auf eine Dosisabhängigkeit (Abb. 3.6) und im Zeitverlauf (Abb. 3.7) untersucht.

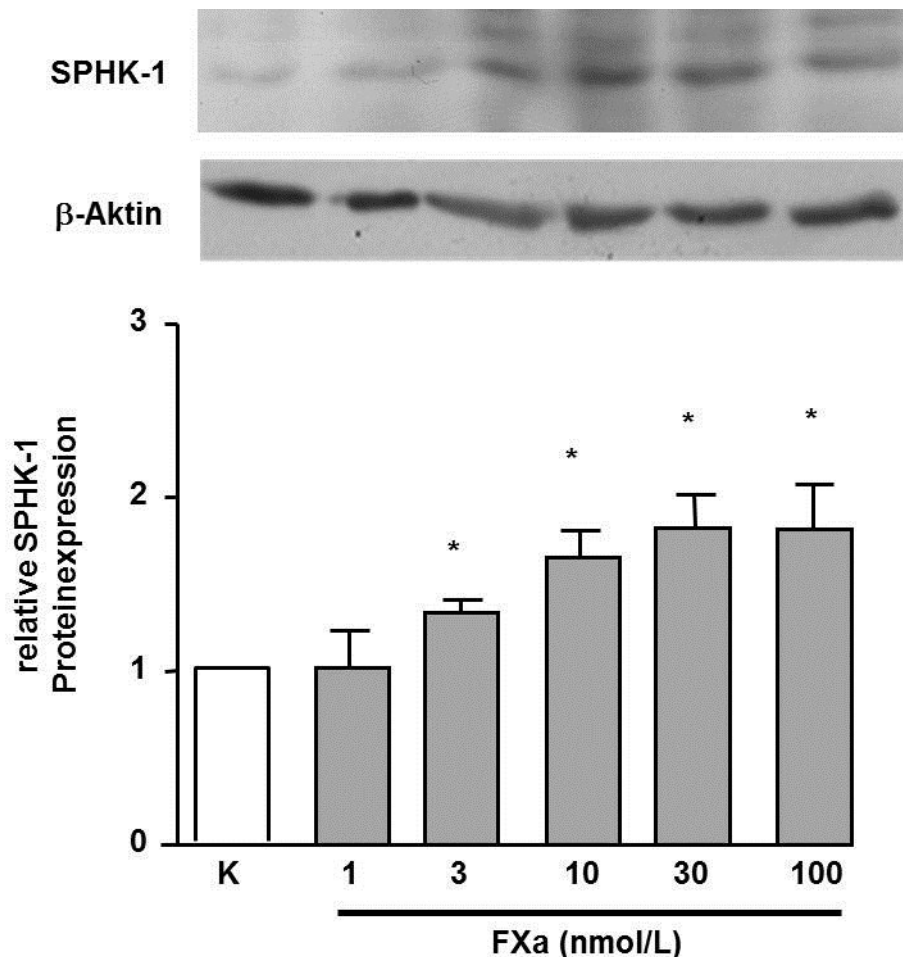


Abb. 3.7: Einfluss verschiedener FXa Konzentrationen auf die SPHK-1 Proteinexpression

Konzentrationsabhängige Induktion der SPHK1 Proteinexpression durch FXa in humanen aortalen SMC. Die Inkubation mit FXa (1-100 nmol/L) erfolgte in humanen aortalen SMC für 24h. Die SPHK1 Proteinexpression wurde gegen β-Aktin normalisiert ($p < 0,05$, $n = 7$).

Zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit wurden SMC in 6-well Platten ausgesät. Nach Erreichen von ca. 70% Konfluenz wurden die Zellen für 48 h in serum-freiem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen konzentrationsabhängig mit 1-100 nmol/l FXa für 24 h inkubiert. Danach wurde die Proteinexpression mittels

Ergebnisse

Westernblot analysiert (Abb. 3.7). Der Einsatz von 1 nmol/l FXa führte nicht zu einer Erhöhung der SPHK1 Expression. Eine signifikante Erhöhung der SHPK1 Proteinexpression zeigte sich ab einer FXa-Konzentration von 3 nM. Eine maximale Stimulation wurde bei Verwendung von 30 nM FXa erreicht. Diese Konzentration entspricht auch in etwa der Menge von FXa, die über einen Zeitraum von zwei Stunden aus *in vitro* generierten Blutgerinnseln physiologisch freigesetzt werden kann (Rosenkranz *et al.* 2011). In den nachfolgenden *in vitro* Untersuchungen wurde daher 30 nM FXa verwendet.

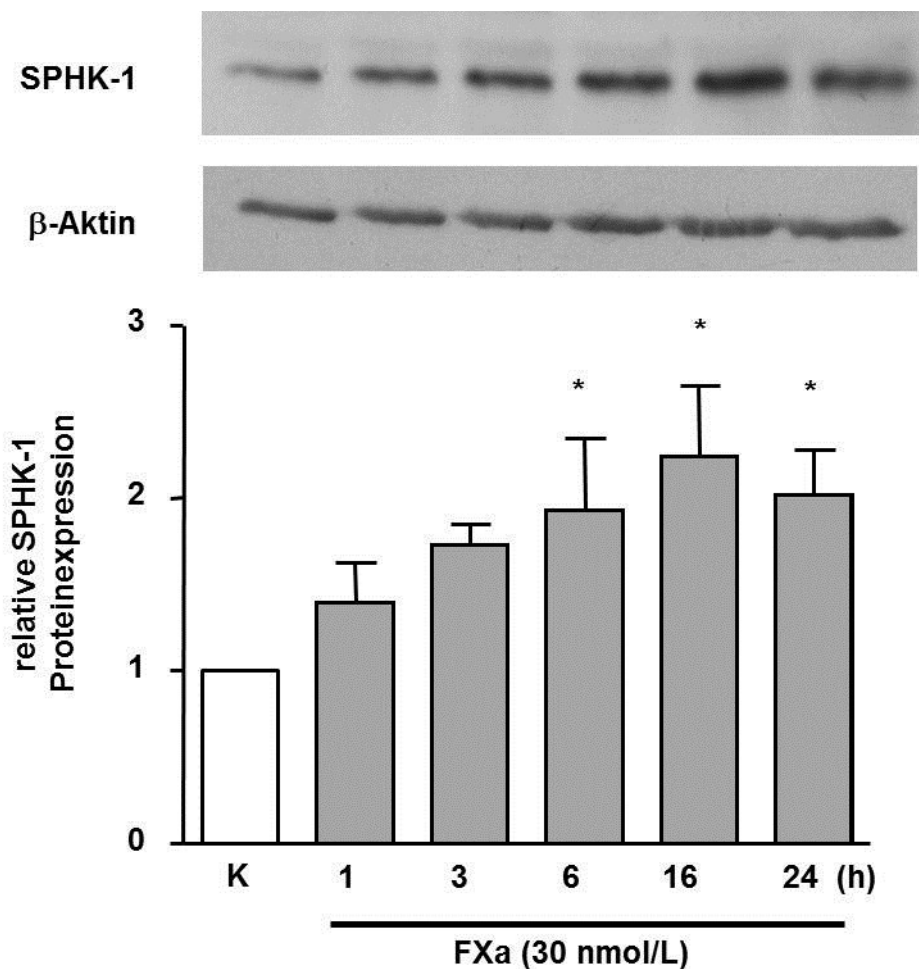


Abb. 3.8: Einfluss von FXa auf die SPHK1 Proteinexpression im Zeitverlauf
Die Inkubation mit FXa (30 nmol/L) erfolgte in humanen aortalen SMC in einem Zeitverlauf über 1-24 h. Die SPHK-1 Proteinexpression wurde gegen β-Aktin normalisiert ($p < 0,05$, $n = 7$).

In weiteren Versuchen sollte die Zeitabhängigkeit der FXa vermittelten Induktion der SPHK-1 Expression gezeigt werden (Abb. 3.8). Dazu wurden die aortalen SMC wieder bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert, dann für 48h in serm-freiem Medium kultiviert und anschließend über einen Zeitraum von 24 h zu

unterschiedlichen Zeitpunkten (1 h, 3 h, 6 h, 16 h, 24 h) stimuliert. Dabei zeigte sich nach Stimulation mit 30 nM FXa eine signifikante Erhöhung der SPHK1 Expression zwischen 6 und 24 h, mit einem Maximum nach 16 h.

3.6 FXa-Stimulation erhöht den intrazellulären S1P-Spiegel sowie die Freisetzung

Da FXa die Expression der SPHK1 in aSMC induziert, sollte untersucht werden, ob auch ihr Produkt - das S1P –ebenfalls vermehrt gebildet wird. Dazu wurden die Zellen wiederum bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert, im Anschluss für 48 h gehungert und mit 30 nM FXa über einen Zeitraum von 24 h stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert und die Lipide isoliert. Die erhaltene Lipidfraktion wurde dann mittels HPLC aufgetrennt und auf ihren S1P-Gehalt hin untersucht (Abb. 3.9). Diese Bestimmungen der intrazellulären S1P Konzentrationen erfolgten in Kooperation mit Prof. Burkhard Kleuser (Universität Potsdam).

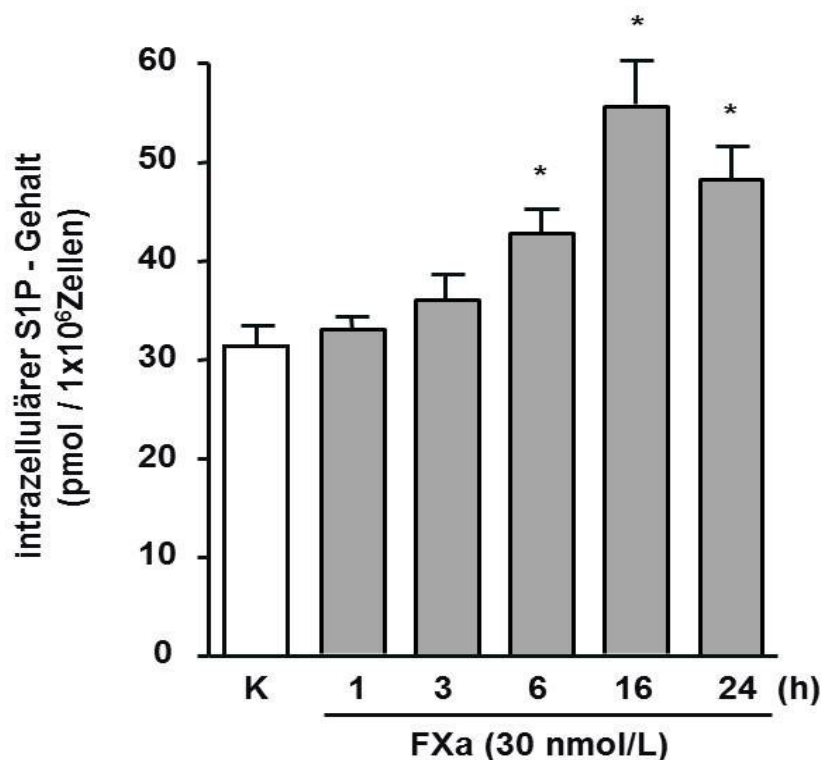


Abb. 3.9: Zeitabhängiger Einfluss von FXa auf den intrazellulären S1P Gehalt von aortalen SMC

Die Inkubation mit FXa (30 nmol/L) erfolgte in humanen aortalen SMC im angegebenen Zeitverlauf von 1-24 h. Die anschließende Messung des S1P Gehalts der Lipidfraktion erfolgte mittels HPLC ($p < 0,05$; $n=7$).

Ergebnisse

Eine Stimulation mit FXa führt zu einer signifikanten Erhöhung des intrazellulären S1P-Gehalts im Zeitraum von 6 bis 24 h, mit einem Maximum nach 16 h. Ob aus dieser Erhöhung auch eine erhöhte Freisetzung des S1P aus den Zellen resultiert, sollte im Folgenden untersucht werden. Dazu wurden die aSMC wie zuvor kultiviert und mit 30 nM FXa über einen Zeitraum von 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 min mit [³H]Sphingosin inkubiert. Die Auftrennung der Lipide erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Auf die Chromatographieplatten wurde vorsichtig Scintillationslösung aufgetragen und ein Röntgenfilm für 7 Tage aufgelegt. Dieser Film wurde dann entwickelt und densitometrisch ausgewertet (Abb.3.10).

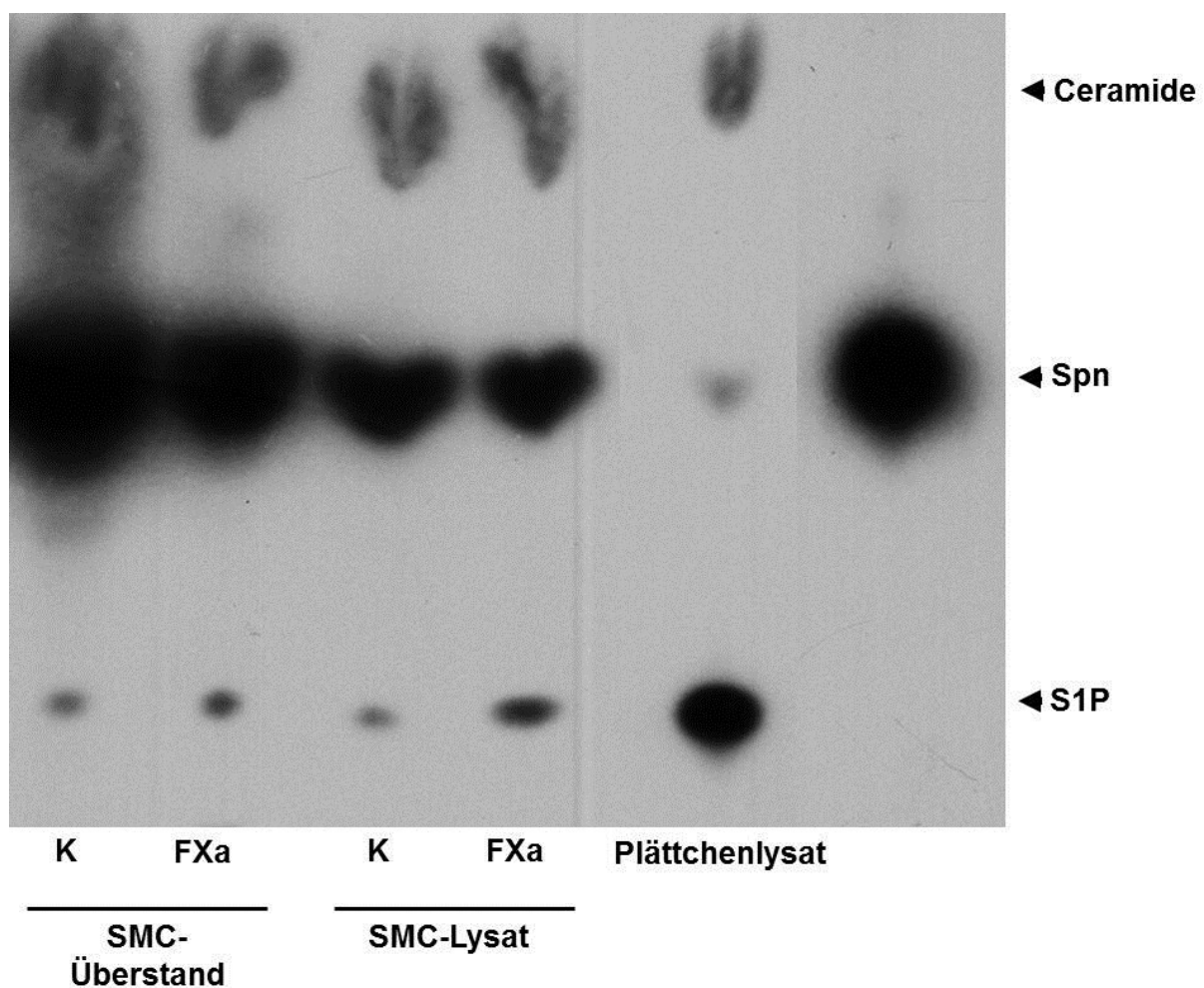


Abb. 3.10: Nachweis von S1P Bildung und Freisetzung in aortalen SMC

Die Auftrennung der Lipidfraktion aus Zelllysat und Zellüberstand erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Dargestellt ist der Scan eines repräsentativen Röntgenfilms nach 7-tägiger Exposition.

Ergebnisse

Die densitometrische Auswertung dieser Filme zeigte eine deutliche Erhöhung der intrazellulären S1P Konzentration nach 16 h FXa-Stimulation. Weiterhin konnte eine deutlich erhöhte Freisetzung von S1P in das Medium im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden (Abb.3.11).

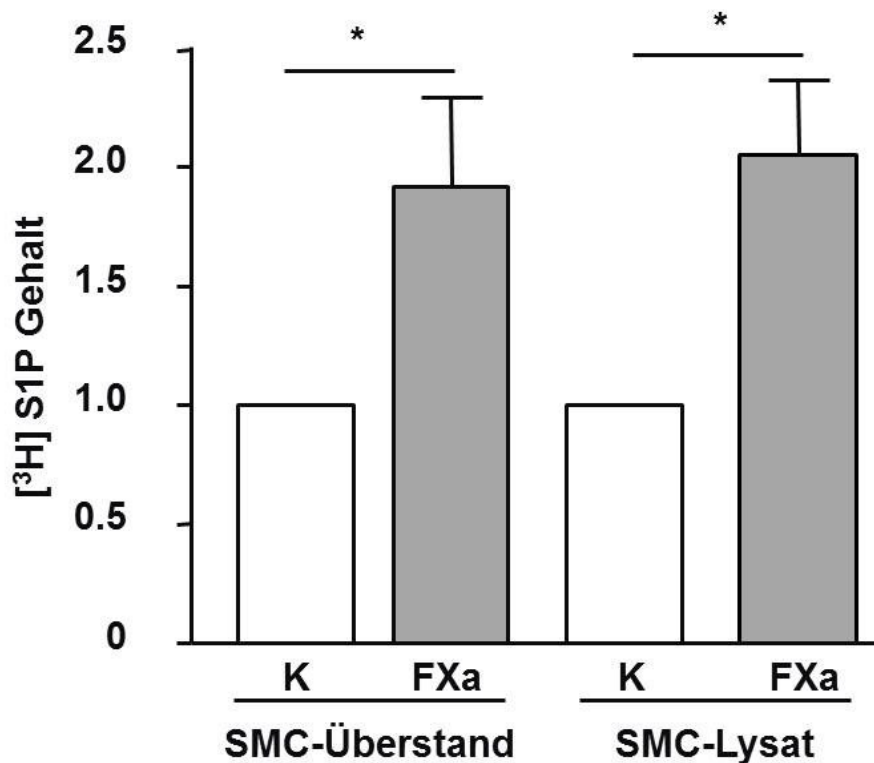


Abb. 3.11: Densitometrische Auswertung der S1P Produktion und Freisetzung aus aSMC

Intrazellulärer S1P-Gehalt und Freisetzung nach 16 h FXa-Stimulation (30nM) und anschließender Zugabe von [³H]Spn, welches nach der Aufnahme in [³H]S1P umgewandelt wird ($p < 0,05$; $n=9$).

3.7 Die Induktion der SPHK-1 durch FXa wird über die Aktivierung von PAR-1 und PAR-2 vermittelt

Da FXa die SPHK-1 zu induzieren vermag, sollte als nächstes untersucht werden, welcher der beiden bekannten FXa Rezeptoren diesen Effekt vermittelt. Aortale SMC wurden in 6 well Platten bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert, 48 h mit Hungermedium behandelt und anschließend mit synthetischen Peptiden stimuliert. Die verwendeten Peptide sind in der Lage, selektiv die von FXa angesprochenen Rezeptoren PAR-1 und PAR-2 zu aktivieren. Zur Negativkontrolle dienten unbehandelte, zur Positivkontrolle FXa (30 nmol/L) stimulierte Zellen. Die Stimulation

Ergebnisse

mit den aktivierenden Peptiden und FXa erfolgte über 6 h. Anschließend wurde die RNA isoliert und mittels Realtime PCR quantifiziert (Abb.3.12). Es zeigte sich beim Einsatz des PAR-1 aktivierenden Peptids (TFLLRN, 100 μ M) eine signifikante Erhöhung des SPHK1 Transkriptes um das 2,5-fache. Der Einsatz der PAR-2 aktivierenden Peptids (SLIGKV, 100 μ M) führte ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der SPHK-1 Expression um das 2-fache. Der gleichzeitige Einsatz beider Peptide resultierte in einer 3-fachen Erhöhung. Diese Erhöhung entspricht dem FXa vermittelten Anstieg der SPHK-1 Expression.

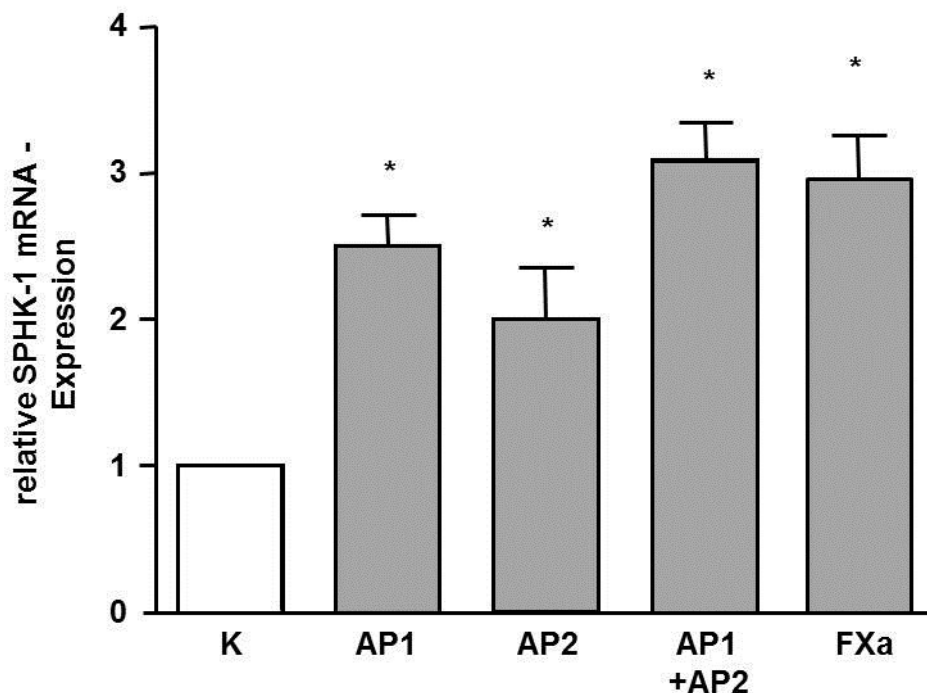


Abb. 3.12: Einfluss der PAR-1 und PAR-2 aktivierenden Peptide auf die Expression der SPHK-1 mRNA

Die PAR-1- und PAR-2-aktivierenden Peptide AP1 und AP2 induzieren einzeln oder in Kombination die Expression der SPHK1 in einem vergleichbaren Ausmaß wie FXa ($p < 0,05$; $n=6$).

3.8 Einfluss von S1P auf die Expression von PAR-2 in aSMC

FXa vermittelt seine zellulären Wirkungen über die Aktivierung der PAR-2. Deshalb wurde in weiteren Versuchen der mögliche Einfluss von S1P auf die Expression dieses Rezeptors untersucht. Zur Untersuchung dieses Sachverhalts wurden human SMC im Zeitverlauf mit 1 μ M S1P stimuliert. Eine Überprüfung der Proteinexpression zeigte eine deutliche Erhöhung der PAR-2-Expression nach 6 h (Abb. 3.13). Hieraus

Ergebnisse

lässt sich schließen, dass nicht nur FXa den S1P Metabolismus reguliert, sondern dass S1P wechselseitig auch einen Einfluss auf die Expression von PAR-2 besitzt.

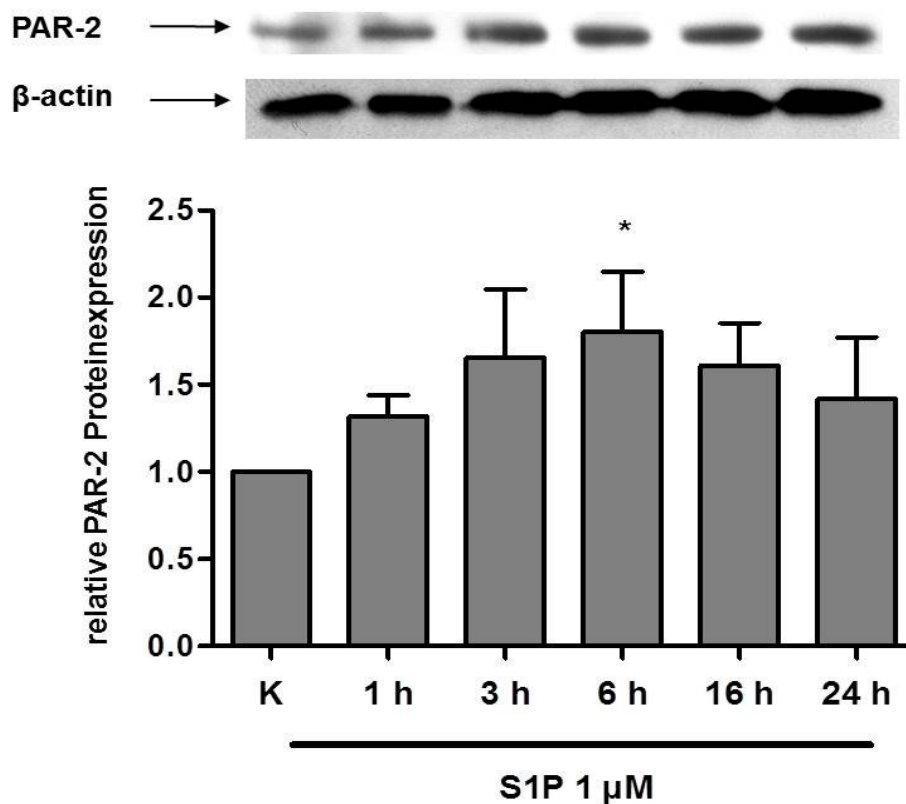


Abb. 3.13: S1P vermittelte Induktion des PAR-2 Rezeptors

Nachweis der Proteinexpression von PAR-2 im Zeitverlauf nach S1P-Stimulation. Die quantitative Auswertung der Daten erfolgte densitometrisch. Eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression zeigt sich 6 h nach Stimulation mit 1 μ M S1P ($p < 0,05$; $n = 8$).

3.9 FXa induziert die SPHK-1 über Aktivierung Rho A und PKC abhängiger Signalwege

In den folgenden Experimenten sollten die möglichen Signalwege untersucht werden, über die FXa die Expression der SPHK-1 induziert. Sowohl für PARs als auch für SPHK1 sind wachstumsfördernde Effekte in verschiedenen Zelltypen, so auch in SMC, beschrieben (Huang *et al.* 2013; Nagahashi *et al.* 2012). Um einen möglichen Zusammenhang der Regulation von SPHK1 Transkription und PAR-aktivierten proliferativen Effekten zu klären, wurden verschiedene Inhibitoren gegen klassische mitogene Signalwege eingesetzt. Um einen höheren Probendurchsatz bei gleichzeitig erhaltener hoher Sensitivität der Messungen zu gewährleisten, wurde die sogenannte *In - Cell Western* Technik verwendet. Die Zellen wurden in 96 well Platten bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert und danach 48 h mittels

Ergebnisse

Serumentzug gehungert. Daraufhin erfolgte die Zugabe der jeweiligen Inhibitoren. 30 min nach Zugabe der Inhibitoren wurden die Zellen für 16 h mit FXa (30 nmol/L) stimuliert oder zur Kontrolle unbehandelt belassen. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die SPHK-1 Expression mit Hilfe von Antikörpern, an die im Infrarotspektrum emittierende Farbstoffe gekoppelt sind, direkt auf der Zellkulturplatte detektiert. Der Vorteil der bei dieser Technologie zum Einsatz kommenden an Infrarotfarbstoffe gekoppelten Sekundärantikörper besteht im Vergleich zum klassischen Westernblot in einer erheblich verbesserten Sensitivität und Spezifität des Messsignals. Dies ermöglicht beispielsweise eine lineare Quantifizierung der Proteinexpression in Zellen über einen weiten Konzentrationsbereich. Um die gemessene Proteinexpression zu normalisieren, wurde in einem zweiten Detektionskanal die Gesamtzellzahl vorhandener Zellen in der jeweiligen Probe bestimmt und die SPHK1 Expression hierauf normiert.

Im Ergebnis zeigte sich, dass die Stimulation der SPHK-1 Expression durch FXa durch Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor Y27632 sowie durch GFX109203X blockiert wurde (Abb. 3.14). Y27632 ist ein Inhibitor der Rho-assoziierten Kinase p160Rock, GFX109203X inhibiert klassische PKC Isoformen wie die PKC α,β,γ . Im Gegensatz dazu hatten Inhibitoren gegen die kleine GTPase RAC1 (NSC23766), gegen die MAP Kinase (PD98059) und gegen die Proteinkinase A (myr-PKI) keinen Einfluss auf die FXa-induzierte Expression der SPHK-1.

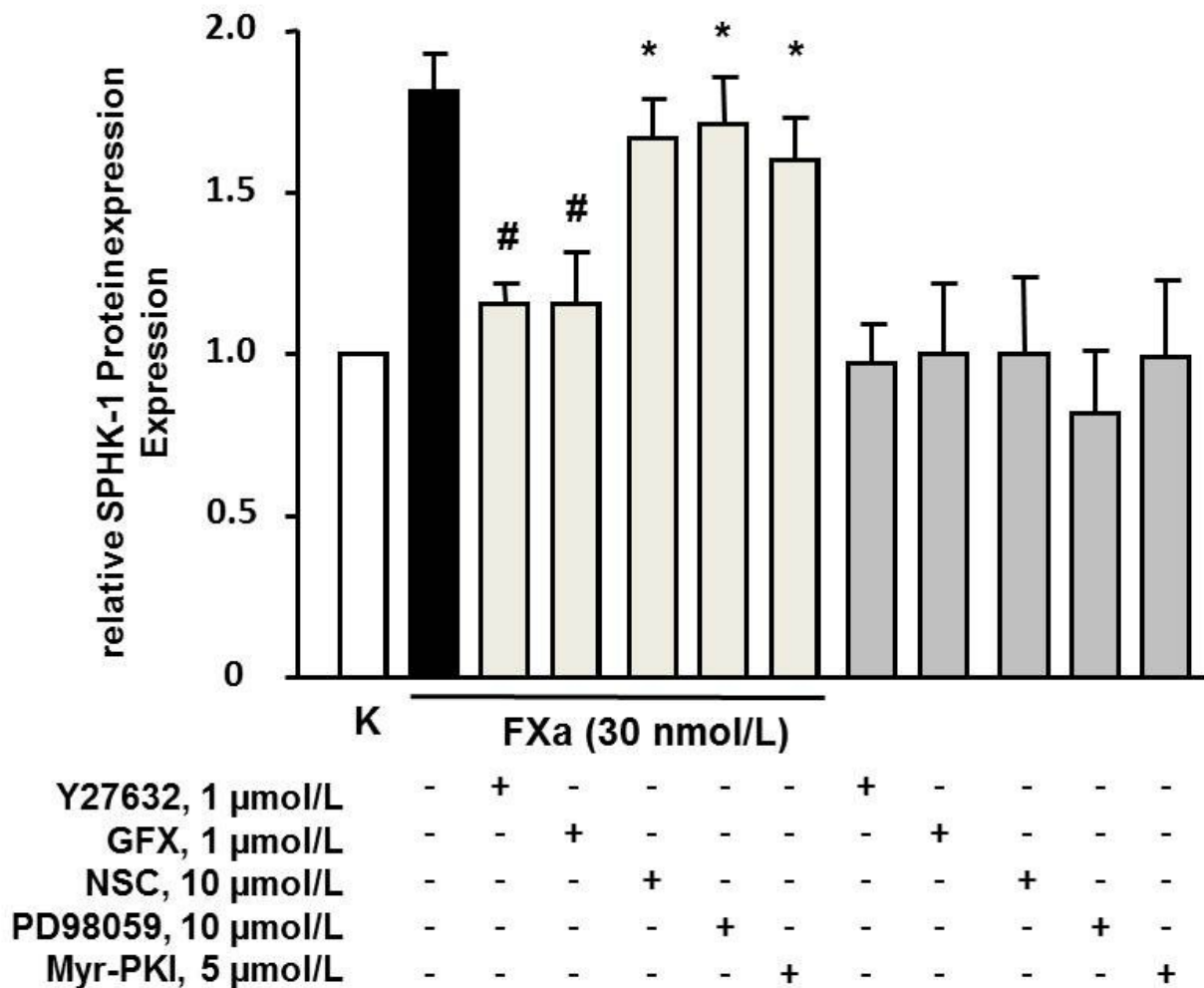


Abb. 3.14: FXa induzierte SPHK-1 Expression wird über Rho A und PKC Signalweg vermittelt

Die Expression der SPHK-1 nach Stimulation mit FXa (30 nmol/l) wurde mittels *In-Cell Western* bestimmt. Dabei kamen Inhibitoren verschiedener mitogener Signalwege zum Einsatz. ($p < 0,05$; $n = 6$)

In weiteren Versuchen sollte die Wirkung von FXa auf die Aktivierung der kleinen GTPase Rho A untersucht werden. Diese ist assoziiert mit dem Rho Kinase Signalweg und in der Lage, Isoformen der PKC zu aktivieren (Singh and Rattan 2013). Dazu wurden aSMC in 6-well Platten wie in den vorangegangenen Versuchen kultiviert und mit FXa (30 nmol/L) zu unterschiedlichen Zeitpunkten stimuliert (1 min, 2 min, 5 min, 15 min). Eine Stimulation mit Thrombin diente als Positivkontrolle. Die Zellen wurden im Anschluss lysiert und aktives Rho A mittels Rho-Rhotekin pulldown assay isoliert. Hierbei wird nur das aktivierte Rho A Protein gebunden und kann aus den Zelllysaten isoliert werden. Danach wurde die Menge von aktivem und

Ergebnisse

gesamtem Rho A mittels Westernblot bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von aSMC mit FXa zu einer Aktivierung von Rho A nach 2 bis 5 Minuten führt (Abb. 3.15).

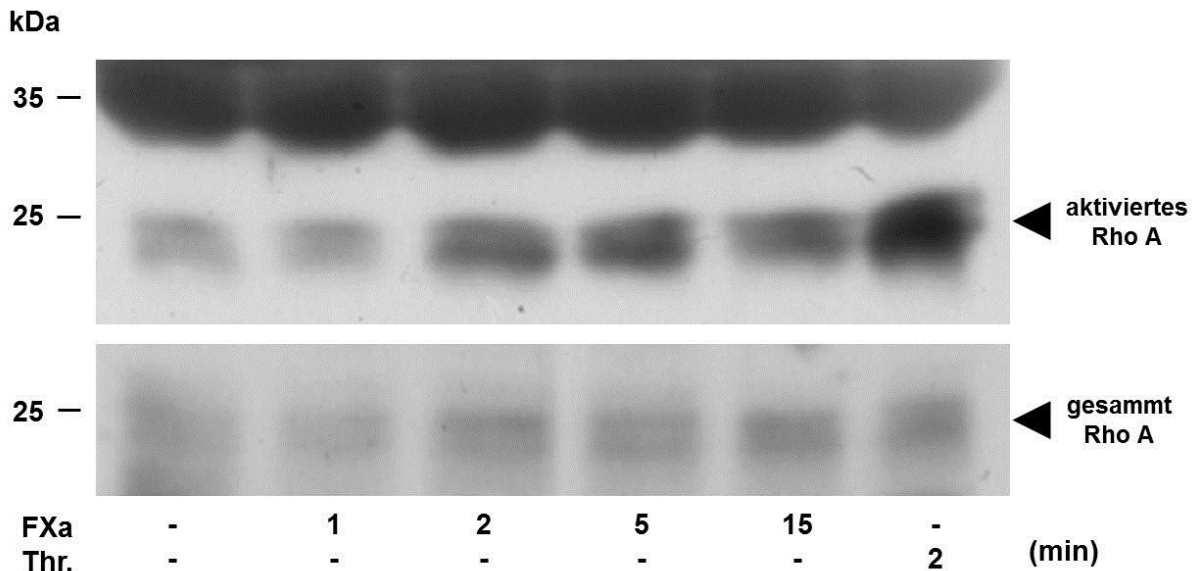


Abb. 3.15: Einfluss von FXa auf die Aktivierung von Rho A im Zeitverlauf
Die Aktivierung von Rho A durch FXa (30nmol/l) wurde mit Hilfe des Rho-Rhotekin pulldown assay gemessen, Thrombin diente als Positivkontrolle. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot (n=3)

3.10 FXa-Stimulation erhöht die SPHK1 mRNA-Stabilität

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass FXa die Transkription und Expression der SPHK1 über Rho A- und PKC-abhängige Signalwege erhöht. Ob es sich dabei um eine reine Steigerung der mRNA (Neu-)Bildung handelt oder ob auch Mechanismen der mRNA-Stabilisierung involviert sind, sollte im Folgenden näher beleuchtet werden. Dazu wurden aSMC in 6 well Platten ausgesät und nach Erreichen von ca. 70% Konfluenz mit Actinomycin D vorinkubiert. Diese Behandlung verhinderte die Neusynthese von mRNA. Im Anschluss wurden die aSMC im einem Zeitverlauf von einer bis fünf Stunden andauernd mit FXa behandelt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurde die RNA der Zellen isoliert und die relative mRNA Expression der SPHK1 bestimmt. Es zeigte sich das nach Behandlung der Zellen mit FXa die Menge der SPHK1 mRNA über den gesamten Messzeitraum hinweg signifikant erhöht war. Daraus lässt sich schließen, FXa nicht nur die Neusynthese von SPHK1 induziert, sondern auch die Stabilität der mRNA erhöht (Abb. 3.16).

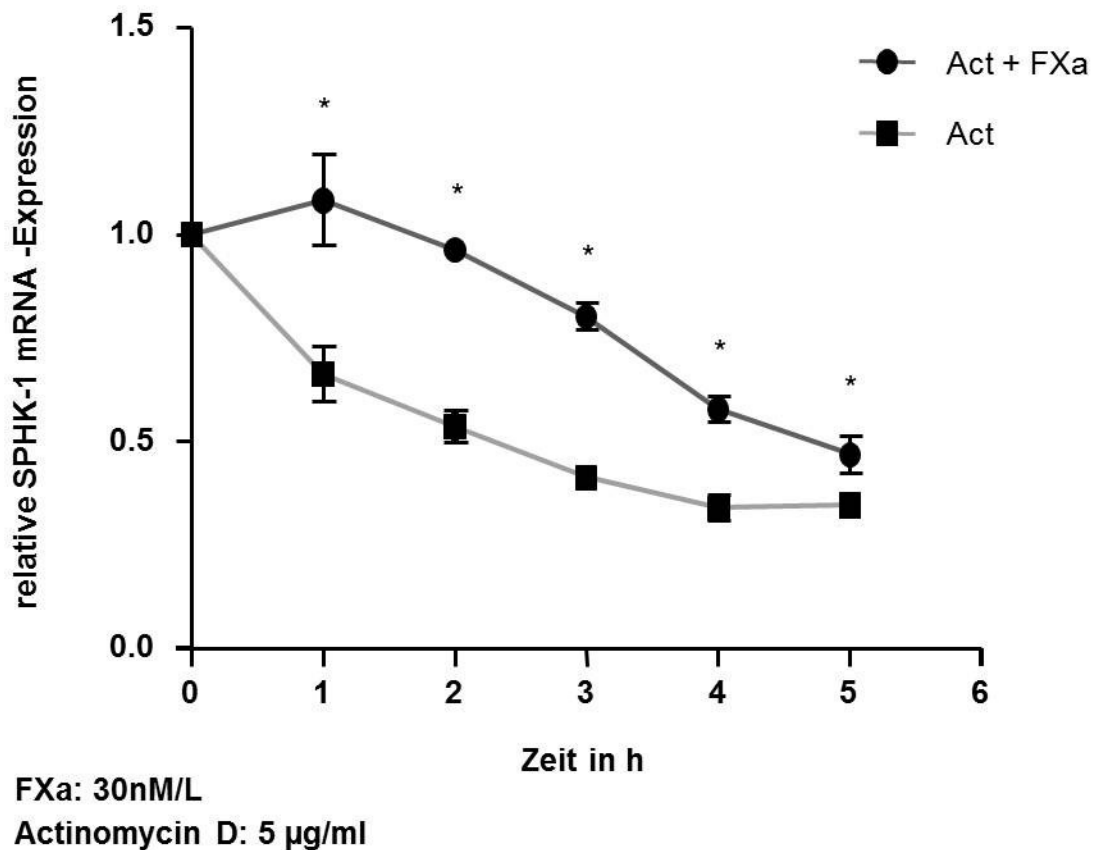


Abb. 3.16: Wirkung von FXa auf die Stabilität der SPHK1 mRNA in aSMC

FXa bewirkt über den gesamten untersuchten Zeitraum von 5 Stunden eine signifikante Erhöhung der SPHK1 mRNA Stabilität ($p < 0.05$; $n=3$)

3.11 Herabregulation der SPHK1 mittels RNA-Interferenz durch spezifische siRNA

Zur weiteren Untersuchung der Wirkung von FXa auf die SPHK-1 sowie deren zellulärer Funktionen war es nötig, das Enzym mit Hilfe von spezifischer siRNA (*small interfering RNA*) herab zu regulieren. In humanen aSMC konnte die SPHK-1 Expression auf RNA-Ebene mit SPHK-1 spezifischer siRNA auf 30 % reduziert werden (Abb. 3.17 A). Auf Proteinebene konnte die Expression um 50 % gesenkt werden (Abb. 3.17 B). Als Kontrolle dienten mit unspezifischer Kontroll-siRNA behandelte aSMC. Diese Kontroll-siRNA war zudem mit einem Farbstoff (Cy3) markiert, um die Transfektionseffizienz zu überprüfen, die nach Optimierung der Methode bei circa 90% lag (Abb. 3.17 C). Die SPHK-1 Expression wurde mittels Real Time PCR und Westernblot detektiert und gegen GAPDH bzw. β -Aktin normalisiert.

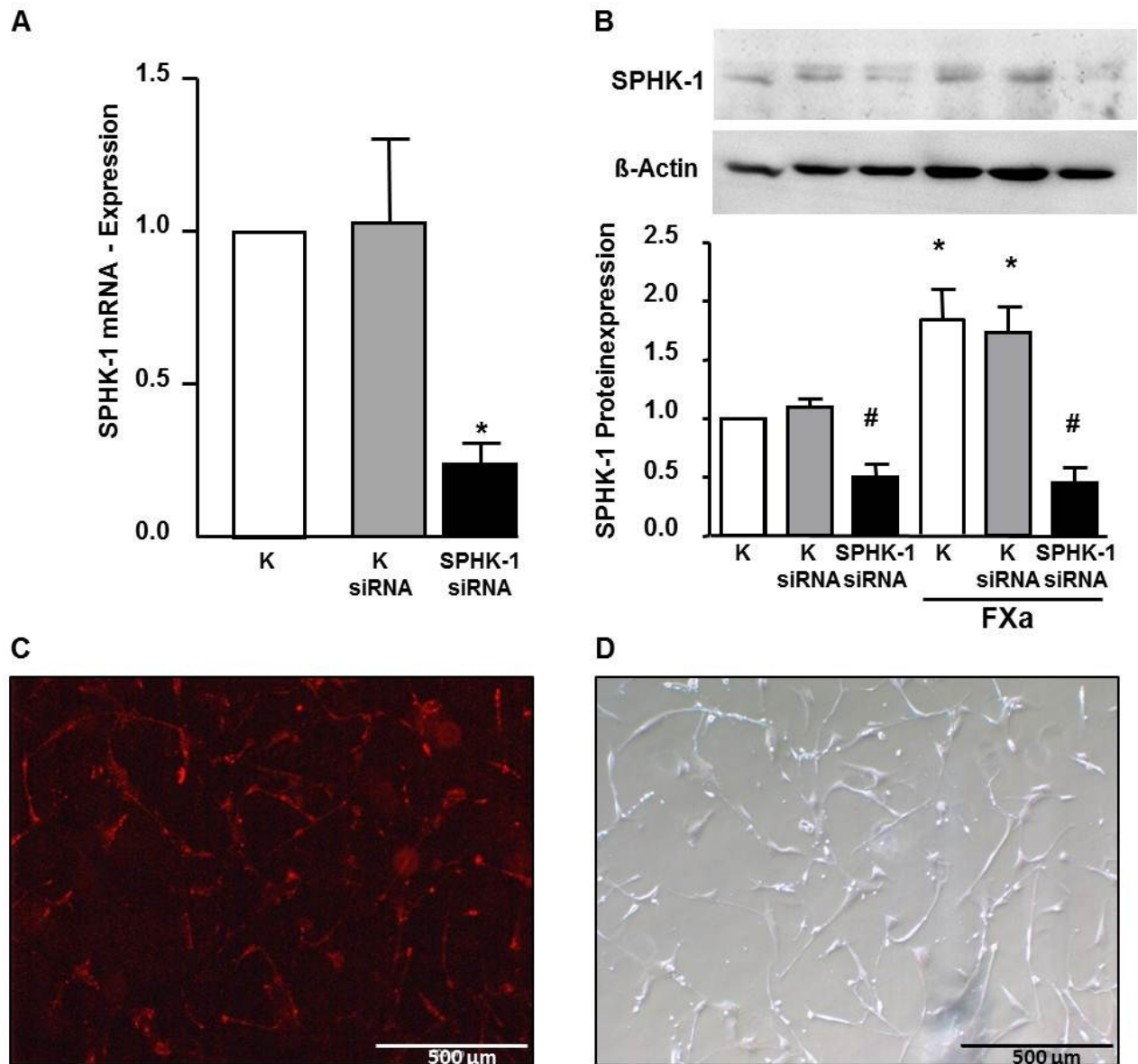


Abb. 3.17: Überprüfung der Funktionalität SPHK-1 spezifischer siRNA in aSMC

A) Dargestellt ist die quantitative Auswertung der SPHK-1 mRNA Expression nach Transfektion mit spezifischer siRNA in aSMC mittels Real Time PCR ($p < 0,05$; $n = 6$).

B) Zeigt einen repräsentativen Westernblot mit zugehöriger β -Aktin Kontrolle sowie die quantitative Auswertung ($p < 0,05$; $n = 6$). **C)** Stellt eine repräsentative Fluoreszenzaufnahme (Cy3) Kontroll-siRNA transfizierter Zellen dar. Die Hellfeldaufnahme **D)** dient als Vergleich.

3.12 Einfluss von FXa auf das Migrationsverhalten von aSMC in Verbindung mit SPHK-1 Expression

Im weiteren Verlauf sollte geklärt werden, ob sich diese Herabregulation der SPHK-1 auf das Migrationsverhalten der aSMC auswirkt. Dazu wurde ein sogenannter *wound-scratch* Assay (Weber *et al.* 2000) genutzt. Bei diesem Versuch wurden aSMC in 48 well Platten ausgesät und bei Erreichen einer Konfluenz von 70% mit

Ergebnisse

SPHK-1 spezifischer siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in serumfreien Medium für 48 h weiter kultiviert. Nachfolgend wurde *in vitro* eine künstliche Wunde im *monolayer* der aSMC erzeugt. Danach wurde die Einwanderung von Zellen in die Wunde über einen Zeitraum von 48 h beobachtet, die Zellen im Anschluss fixiert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt und ausgezählt. Um zu verhindern, dass die Proliferation von Zellen das Ergebnis verfälscht, wurde ein entsprechender Inhibitor eingesetzt (5 mmol/l Hydroxyharnstoff). Die Stimulation der aSMC mit FXa (30nmol/l) führte zu einer signifikant erhöhten Migration. Dieser Effekt konnte durch die Herabregulation der SPHK-1 signifikant reduziert werden (Abb. 3.18).

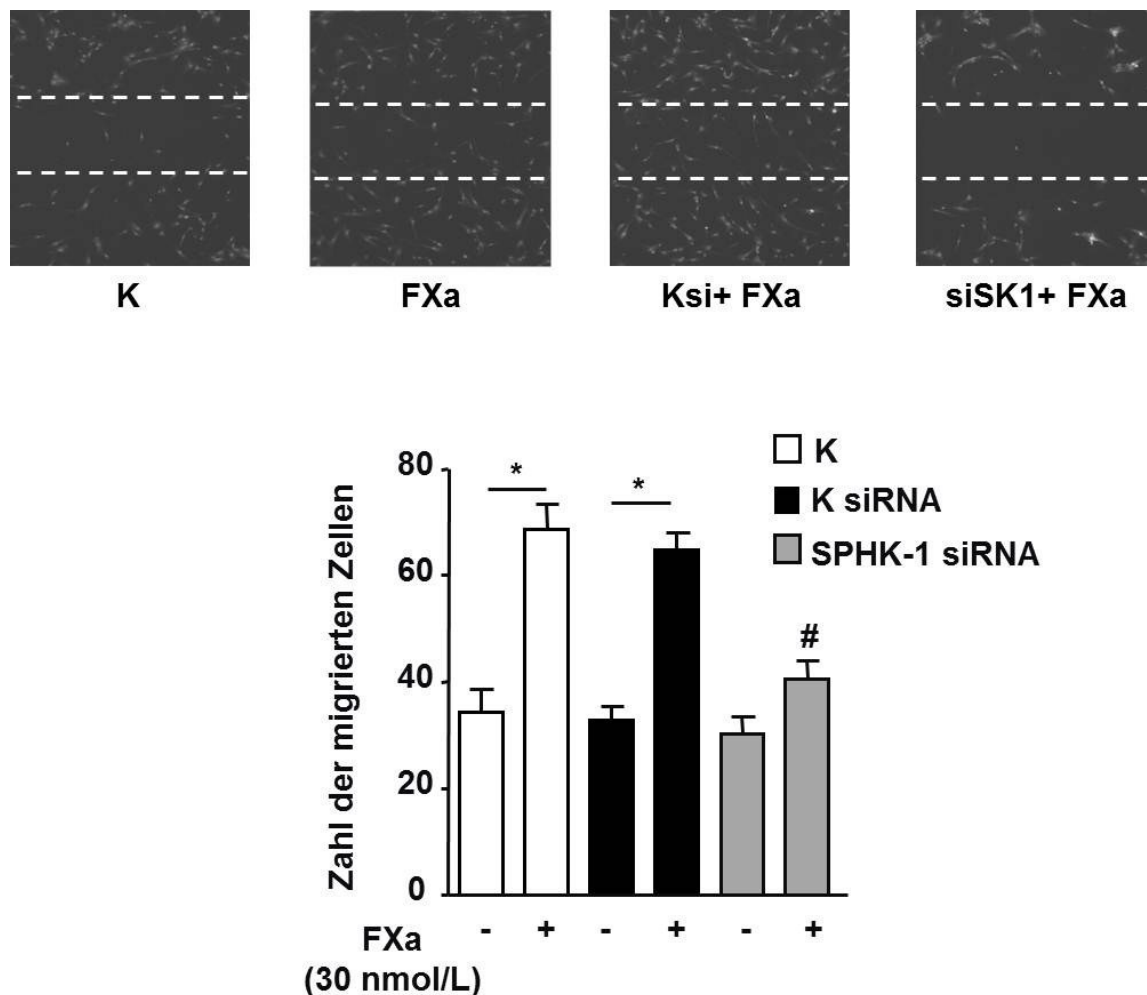


Abb. 3.18: Einfluss von FXa und SPHK-1 auf das Migrationsverhalten von humanen aSMC

Die Stimulation von aSMC mit FXa (30nmol/L) erhöht die Migration signifikant. Der Einsatz SPHK-1 spezifischer siRNA hebt diesen Effekt nahezu auf ($p < 0.05$; $n=6$).

3.13 Inhibition des Rho A und PKC Signalweges verhindert die FXa vermittelte Migration von aSMC

Nachdem in den bisherigen Untersuchungen bereits nachgewiesen wurde, dass FXa die Expression der SPHK-1 erhöht und dass die SPHK-1 Aktivität wichtig für das Migrationsverhalten dieser Zellen ist, sollte nun überprüft werden, ob die Signalwege Rho A und PKC an diesen Prozessen beteiligt sind. Dazu wurde erneut ein *wound-scratch* Assay durchgeführt. Die Zellen wurden dabei entweder mit dem SPHK-1 spezifischen Inhibitor SKI, dem p160Rock Inhibitor Y27632 oder dem inzwischen eher als weniger spezifisch bekanntem PKC Inhibitor Rottlerin behandelt oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Nach der Vorbehandlung mit den Inhibitoren wurden die Zellen mit FXa stimuliert. Dabei führten sowohl die Inhibition der SPHK-1 als auch die Inhibition des Rho A und PKC Signalweges zu einer signifikanten Reduktion der Migration (Abb. 3.19).

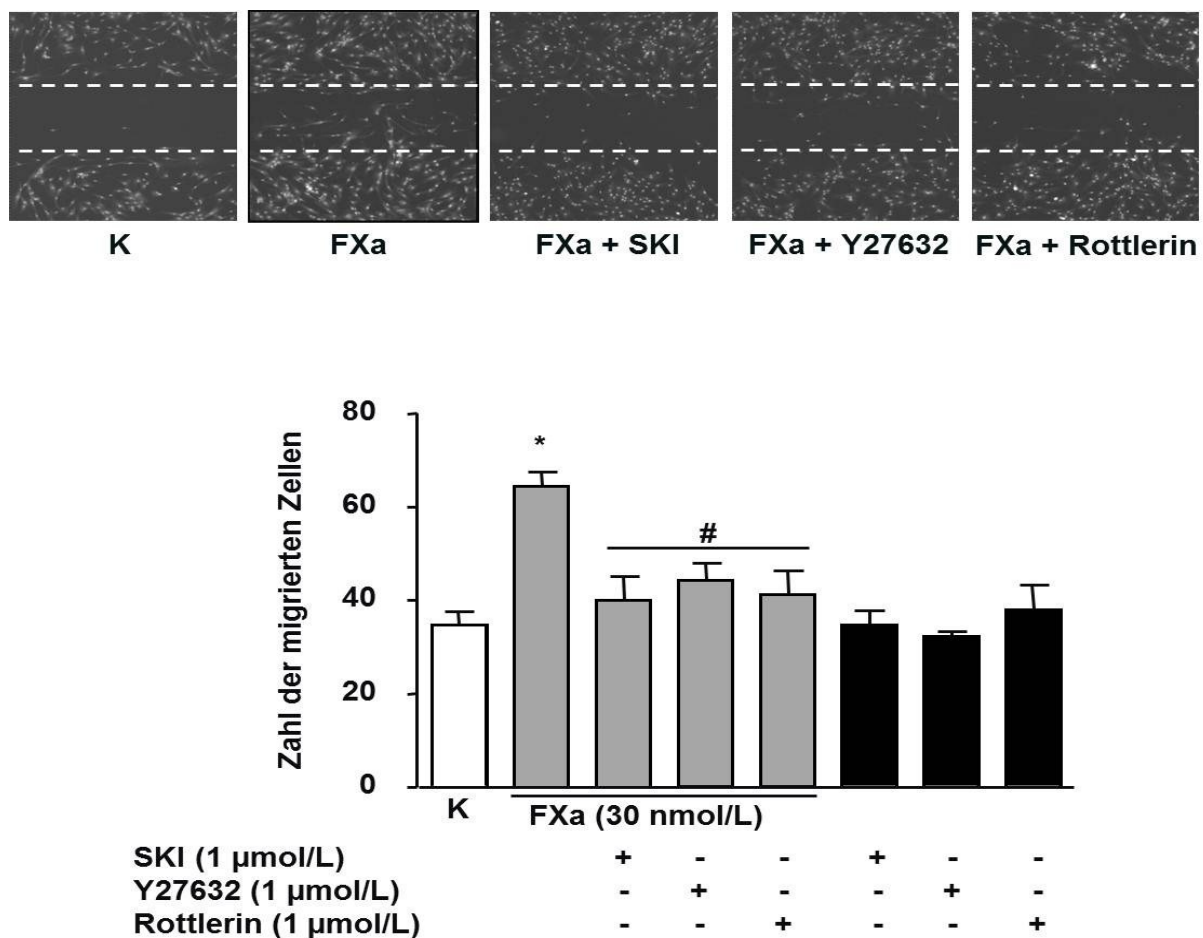


Abb. 3.19: Einfluss der Rho A und PKC Aktivierung auf das Migrationsverhalten von aSMC

FXa vermittelte Migration in aSMC ist nach Inhibition des Rho A (Y27632) und PKC (Rottlerin) Signalwegs signifikant reduziert. Als Kontrolle dienten unstimulierte sowie mit dem SPHK-1 Inhibitor behandelte aSMC ($p < 0.05$; $n = 6$)

3.14 Einfluss von PAR-2 auf die Migration von aSMC im Mausmodell

FXa entfaltet seine Wirkung in Zellen der Gefäßwand über die Aktivierung des G-protein-gekoppelten Rezeptors PAR-2. In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, wie sich ein Fehlen dieser Rezeptoren auf das Migrationsverhalten der aSMC auswirkt. Das hierzu verwendete Modell stellten aus PAR-2-defizienten Mäusen entnommene aortale glatte Gefäßmuskelzellen dar. Aus den entnommenen Aorten der Tiere wurden die SMC mittel Enzym-basierter Explantationstechnik isoliert und in die Zellkultur überführt. Danach wurden die Zellen expandiert und im Anschluss für einen *wound-scratch* Assay verwendet. Wiederum kamen hier die Inhibitoren des Rho A (Y27632), des PKC (Rottlerin) Signalwegs und der spezifische SPHK1 Inhibitor SKI zum Einsatz.

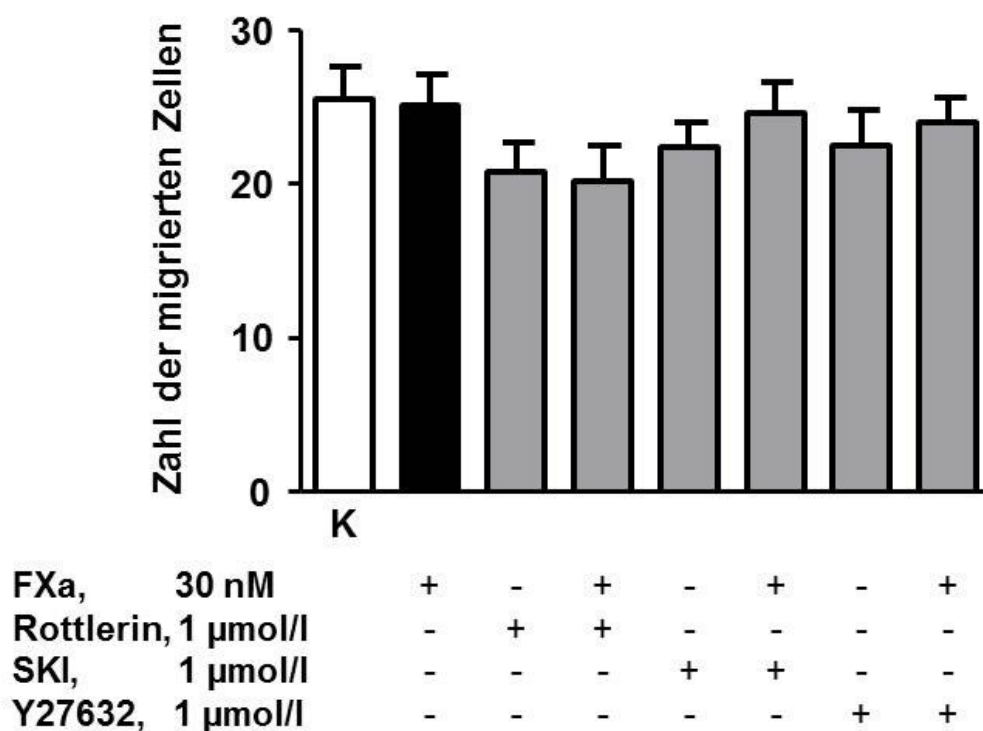


Abb. 3.20: Migration aSMC im murinen PAR-2 *knockout*-Modell nach FXa Stimulation
Das Fehlen von PAR-2 im verwendeten Modell verhindert die FXa induzierte Migration der aSMC. Der Einsatz von Rho A (Y27632) und PKCδ (Rottlerin) Inhibitoren hat keinen Einfluss auf diesen Prozess im *knockout*-Modell ($p < 0.05$; $n = 4$).

Nach Vorinkubation mit den Inhibitoren wurden die Zellen entweder mit FXa (30 nmol/L) behandelt oder zur Kontrolle unbehandelt belassen. Es zeigte sich, dass der Einsatz von FXa im PAR-2 Knockout Modell keinen Einfluss auf die Migration der

aSMC hatte (Abb. 3.20). Ebenso zeigte keiner der genutzten Inhibitoren in den verwendeten Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf die Zellmigration.

3.15 FXa vermittelte SPHK1 Induktion erhöht die Proliferationsrate von SMC

Neben dem Einfluss von FXa auf die Migration von SMC sollte in weiteren Versuchen ein eventueller Einfluss auf die Proliferation der SMC untersucht werden. Dazu wurden die Zellen zunächst mit FXa behandelt. Um zu überprüfen, ob eine eventuelle FXa vermittelte Proliferationssteigerung SPHK1 abhängig ist, wurden weitere Ansätze neben FXa auch mit dem SPHK1 spezifischen Inhibitor SKI vorinkubiert. Weiterhin wurde dem Medium ^3H -Thymidin zugesetzt. Die Menge an ^3H -Thymidin in der DNA der Zellen wurde nach 24 Stunden bestimmt und kann als Maß für die DNA-Neusynthese angesehen werden. Es zeigte sich, dass FXa zu einer deutlichen Verstärkung des ^3H -Thymidin-Einbaus in die DNA der SMC führte. Der SPHK1- Inhibitor reduzierte diesen Einbau hingegen dosisabhängig bis auf das Niveau der Kontrolle bei Verwendung von 10 $\mu\text{mol/l}$. SKI (Abb. 3.21).

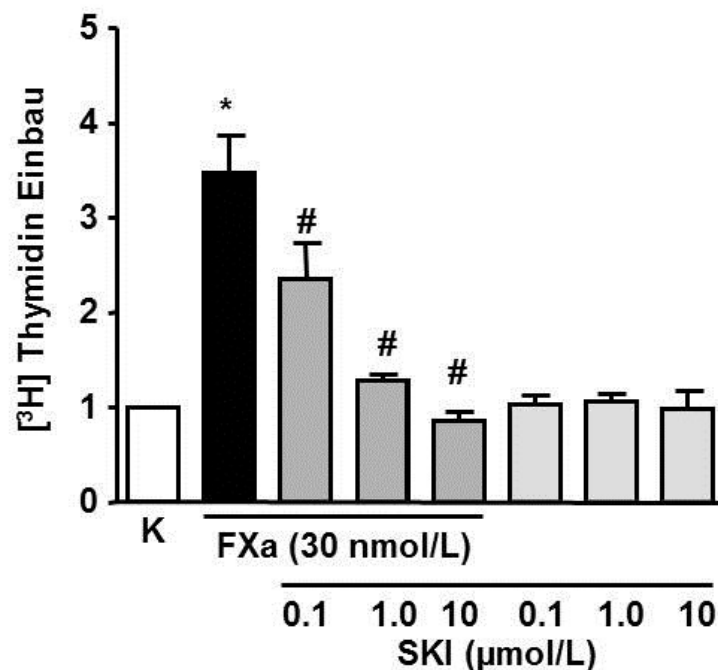


Abb. 3.21: Einfluss von FXa vermittelter SPHK1-Induktion auf die Proliferation von SMC unter Inhibierung der SPHK1

FXa induziert die verstärkte Proliferation von aSMC. Der SPHK1-Inhibitor SKI inhibiert diesen Prozess Dosisabhängig ($p < 0.05$; $n = 6$).

Ergebnisse

Neben dem Inhibitor SKI kam des Weiteren eine SPHK1 spezifische siRNA zum Einsatz. Erneut wurden die SMC mit FXa behandelt und der Einbau von [3 H]-Thymidin in die DNA der Zellen als Maß der Proliferation bestimmt. Neben FXa kam in diesem Fall zusätzlich S1P zum Einsatz, um zu überprüfen, ob das Produkt der SPHK1 selbst einen Einfluss auf die Proliferation der SMC hat. Auch dabei zeigte sich eine FXa induzierte Erhöhung der SMC-Proliferation, die durch Herabregulation der SPHK1-mRNA auf Kontrollniveau reduziert werden konnte. Das in diesem Ansatz zusätzlich betrachtete S1P hatte keinen Einfluss auf die Proliferation der SMC (Abb. 3.22).

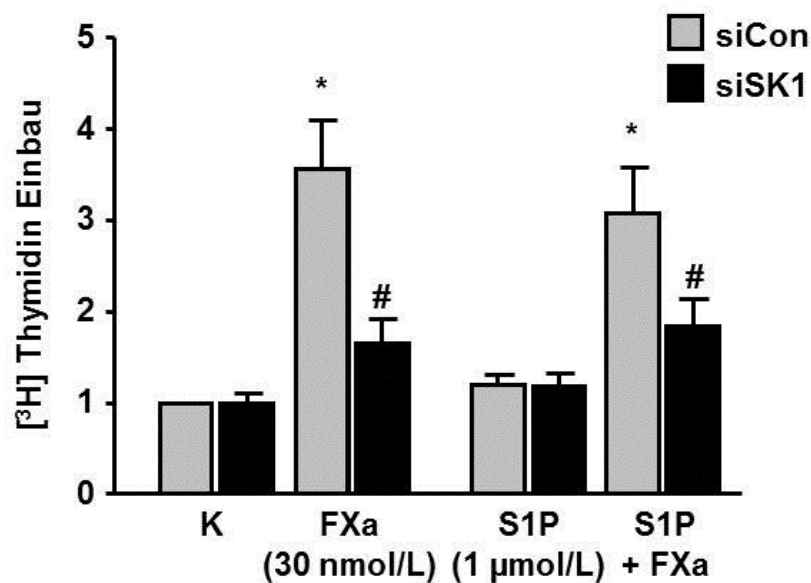


Abb. 3.22: Einfluss von FXa vermittelter SPHK1-Induktion auf die Proliferation von SMC unter Verwendung einer SPHK1 spezifischen siRNA

Der Einsatz einer SPHK1 spezifischen siRNA reduziert die FXa induzierte Proliferation auf Kontrollniveau, S1P-Stimulation der aSMC hat auf diesen Prozess keinen Einfluss ($p < 0.05$; $n = 6$)

Die Verwendung eines Rho A (Y27632) und PKC (Rottlerin) Inhibitors in Verbindung mit einer FXa-Stimulation sollte in weiteren Versuchen zeigen, ob der beobachteten FXa vermittelte und SPHK1 abhängige Effekt auf den gleichen Signalwegen beruht wie die bereits eingangs untersuchten (Abb. 3.14). Dazu wurden die SMC vor der Inkubation mit FXa und [3 H]-Thymidin, zunächst mit den entsprechenden Inhibitoren für 30 min vorbehandelt. Es zeigte sich, dass die Verwendung sowohl des Rho A als auch des PKC Inhibitors dosisabhängig zu einer deutlichen Reduktion der

Ergebnisse

Proliferation führte (Abb. 3.23). Das zu Kontrollzwecken zusätzlich eingesetzte Hirudin zeigte keinerlei Einfluss auf die Proliferation der SMC.

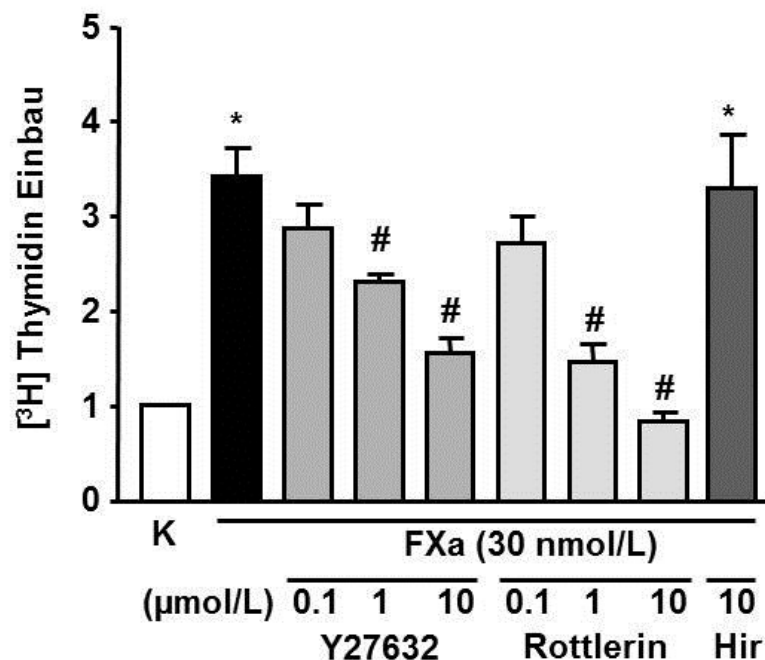


Abb. 3.23: Einfluss von FXa vermittelter SPHK1-Induktion auf die Proliferation von SMC nach Einsatz von Inhibitoren gegen die involvierten Signalwege
FXa vermittelte Proliferation von aSMC ist nach Inhibition des Rho A (Y27632) und PKC (Rottlerin) Signalwegs signifikant reduziert ($p < 0.05$; $n = 6$).

3.16 Untersuchung der S1P abbauenden Enzyme

Aufgrund der verstärkten Expression der SPHK1 nach FXa Stimulation und somit erhöhter S1P Produktion stellte sich die Frage, ob möglicherweise auch die abbauenden Enzyme dieses Signallipids beeinflusst waren. Hierzu wurden aSMC in 6 well Platten ausgesät und nach Erreichen von 70 % Konfluenz in einem Zeitverlauf über 24 h mit FXa behandelt. Im Anschluss wurde die RNA isoliert und die mRNA Expression der abbauenden Enzyme mittel Real Time PCR bestimmt (Abb. 3.24). Es zeigt sich weder für die S1P-Lyase (SGPL) noch für die S1P-Phosphatase-1 (SGPP1) eine signifikante Erhöhung ihrer Expression aus Ebene der mRNA. Für die SGPP2 war in den aSMC kein Transkript nachweisbar.

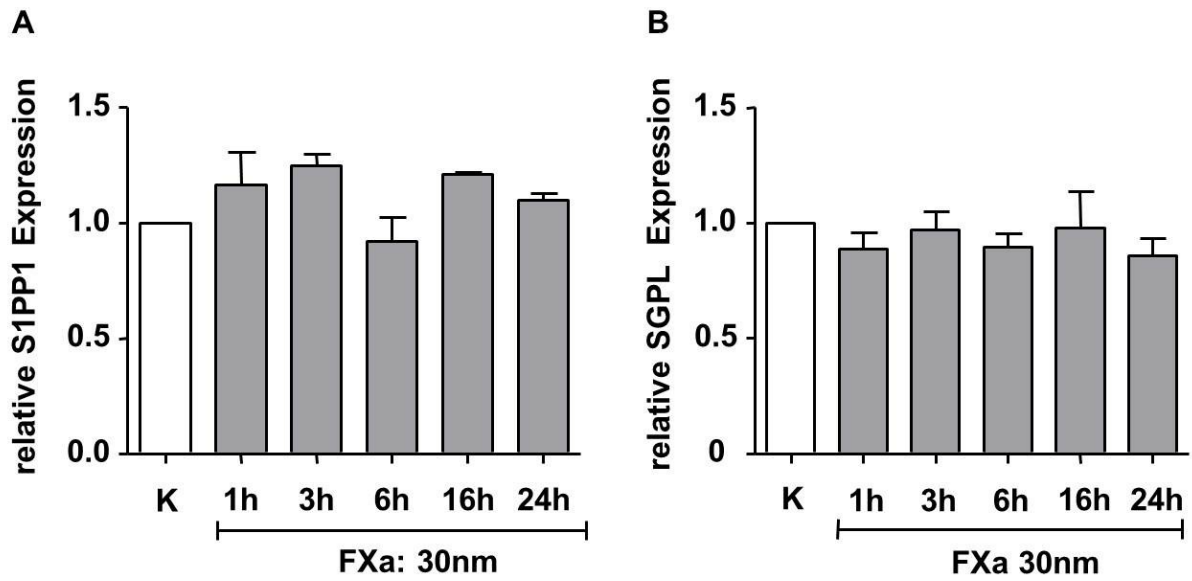


Abb. 3.24: Untersuchung der Regulation S1P abbauender Enzyme nach FXa Stimulation

A) Zeigt die Expression der S1P –Phosphatase 1 nach FXa Stimulation im Zeitverlauf. Es kommt zu keiner signifikanten Veränderung in der mRNA Expression. **B)** Zeigt die Expression der S1P –Lyase nach FXa Stimulation im Zeitverlauf. Wiederum kommt es zu keiner signifikanten Veränderung in der mRNA Expression ($p < 0.05$; $n = 3$).

3.17 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss des aktivierten Gerinnungsfaktors-X (FXa) auf die Expression des S1P-bildenden Enzyms SPHK1 in aortalen glatten Gefäßmuskelzellen des Menschen. Erstmals wurde eine transkriptionelle Regulation der SPHK1 durch FXa belegt. Diesen Effekt vermittelt FXa über Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren PAR-1 und PAR-2. Diese Genregulation zeigte sich *in vitro* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Von weitergehendem klinischem Interesse ist, dass FX und FXa erstmals auch innerhalb atherosklerotischen Läsionen aus der humanen A. Carotis nachgewiesen wurden. Hierbei ließen sich FX/FXa in SMC-reichen Arealen der Plaques und in Kolokalisation mit SPHK1 darstellen. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass auch die von FXa aktivierten Rezeptoren PAR-1 und PAR-2 sowie die SPHK-1 in den gleichen Arealen der Läsion im Bereich der glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert werden. Dieser Befund konnte sowohl durch immunhistochemische als auch durch proteinbiochemische Methoden bestätigt werden. In nachfolgenden Untersuchungen wurden die an der FXa-induzierten Regulation der SPHK1 beteiligten intrazellulären Signalwege erforscht. Es zeigte sich, dass insbesondere eine Aktivierung von Rho A und klassischer PKC-abhängiger Signalwege die Expression der SPHK1 regulieren. Mittels HPLC und Dünnschichtchromatographie wurde die Synthese des Signallipids S1P gemessen. Nach Induktion der SPHK-1 durch FXa kommt es zur verstärkten Produktion und zellulären Freisetzung von S1P aus aSMC. FXa-stimulierte Gefäßmuskelzellen zeigen eine deutlich verstärkte Migration im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dieser Effekt kann sowohl durch Inhibitoren des Rho A und des PKC Signalweges als auch durch eine Hemmung der Genexpression der SPHK1 mittels spezifischer siRNA vermindert werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die chemotaktische Wirkung von FXa in aSMC aus PAR-2-defizienten Mäusen nahezu aufgehoben ist. FXa stimuliert, wie aus der Literatur bekannt ist, eine Verstärkung der Proliferation von aSMC. Auch dieser Effekt wird über die Rho A, PKC Signalwege gesteuert und kann mit den entsprechenden Inhibitoren oder einer SPHK1 spezifischen siRNA inhibiert werden. Weitere Befunde legen nahe, dass die Wirkung von FXa auf die SPHK1 teils auf mRNA-stabilisierenden Effekten beruht. Hingegen zeigten die S1P-abbauenden Enzyme S1PP1 und SGPL nach FXa Stimulation keine Veränderungen in ihren Expressionsprofilen.

4. Diskussion

FXa stellt eines der Schlüsselenzyme der Blutgerinnung dar. Verschiedene Studien in den letzten Jahren konnten eine Wirkung von FXa auf verschiedene zelluläre Prozesse, wie Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen zeigen (Rauch *et al.* 2002; Rauch *et al.* 2004). Diese Daten weisen auf einen möglichen pathophysiologischen Einfluss dieses Gerinnungsfaktors auf die Progression von Gefäßerkrankungen, beispielsweise der Atherosklerose und damit verbunden Plaqueentwicklung oder die Restenose nach einer Gefäßverletzung, hin. Des Weiteren sind Einflüsse des Gerinnungssystems bzw. zelluläre Effekte von Gerinnungsfaktoren auch für die Pathogenese anderer chronisch-entzündlicher und proliferativer Erkrankungen, z.B. Fibrose und Tumorerkrankungen, beschrieben (Scotton *et al.* 2009; Schaffner and Ruf 2009).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mögliche Bedeutung von FXa-vermittelten zellulären Effekten und dem S1P-System zu untersuchen. Der zentrale Befund und Basis der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ist die Beobachtung, dass FXa die Gentranskription der SPHK1 in humanen glatten Gefäßmuskelzellen induziert und eine vermehrte Synthese sowie Freisetzung des proinflammatorischen Signalmoleküles S1P stimuliert (Böhm *et al.* 2013). Darüber hinaus wurde in den hier beschriebenen Untersuchungen erstmals gezeigt, dass FX und seine aktive Form FXa bereits im Gewebe atherosklerotischer Plaques vorliegen und dort mit *tissue factor* (Cimmino *et al.* 2011) und Protease-aktivierten Rezeptoren an SMC co-lokalisiert sind. Somit scheint FXa nicht – wie bisher in der angenommen – erst bei der akuten Ruptur einer atherosklerotischen Plaque gebildet zu werden, sondern übt möglicherweise über seine Rezeptor-vermittelten Wirkungen in den Zellen der Gefäßwand einen andauernden pathophysiologisch relevanten pro-entzündlichen Einfluss aus (Zhou *et al.* 2011). Weitere Untersuchungen *in vitro* hatten die Klärung der molekularen Regulationsmechanismen der SPHK1-Expression in SMC zum Ziel. So induzierte eine spezifische Aktivierung der Rezeptoren PAR-1 und PAR-2 ebenfalls eine verstärkte Expression der SPHK1. Als an der Transkription der SPHK1 beteiligte intrazelluläre Signalwege konnten Rho A (Böhm *et al.* 2013) und PKC (Monno *et al.* 2001) identifiziert werden. Um die Bedeutung der FXa-induzierten Regulation der SPHK1 für die Zellfunktion zu

ermitteln, wurde der Einfluss pharmakologischer Hemmstoffe der SPHK1 und der beteiligten Signalwege untersucht. Hierbei zeigte sich *in vivo* eine essentielle Bedeutung der SPHK1 für eine FXa-abhängige Migration und Proliferation der SMC. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die beschriebenen Effekte vermutlich nicht ausschließlich auf einer Neusynthese von mRNA der SPHK1 nach FXa-Stimulation beruhten. So scheint FXa die Neubildung des SPHK1 Protein auch über eine Erhöhung der Stabilität der SPHK1 mRNA zu regulieren.

4.1 Nachweis von FXa, SPHK1 und PARs im atherosklerotischen Plaque

In histologischen Untersuchungen wurden FX/FXa, SPHK1 und die Rezeptoren für FXa, PAR-1 und PAR-2 in atherosklerotischen Plaques aus der A. carotis des Menschen nachgewiesen. Die Präparate wurden im Rahmen einer in der Klinik für Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführten operativen Therapie der Carotisstenose entnommen. Ein entsprechendes positives Votum der Ethikkommission der Universität Düsseldorf zur Durchführung der Studie (Studiennummer #3199) lag vor. Bei dem klassischen Operationsverfahren der sogenannten Thrombendarteriektomie (TEA) wird das Gefäß, nachdem es freipräpariert wurde, längsinzidiert und das arteriosklerotische Verschlussmaterial herausgeschält (Stötzl *et al.* 2012). Die Operationspräparate wurden sorgfältig gewaschen, um äußere Verunreinigungen mit Blut zu entfernen. Nach entsprechender Aufbereitung des Gewebes und histologischer Färbung (s. Material und Methoden) ließ sich in allen untersuchten Präparaten ein positiver Nachweis von FX/FXa führen (Abb. 3.3). Da der verwendete Antikörper jedoch nicht zwischen dem inaktiven FX und der aktivierten Form FXa differenzieren kann, wurde als weitere Untersuchungstechnik ein Westernblot durchgeführt. Hierbei konnte anhand unterschiedlichen Laufverhaltens aufgrund der jeweiligen Proteingröße zwischen FX und FXa unterschieden werden. Die Schlussfolgerung aus diesen Untersuchungen war zunächst, dass FXa im Plaquegewebe anteilig bereits in aktiver Form vorliegt, eine bislang in dieser Form nicht in der Literatur beschriebene Beobachtung (Böhm *et al.* 2013). Um weiterhin zu klären, dass nicht doch Einblutungen, beispielsweise als Folge der intraoperativen Handhabung der Präparate für den Nachweis von FXa im Plaque verantwortlich sind, wurden Kontrollfärbungen für Marker-Proteine von Blutplättchen (CD42, Abb. 3.6) und Monozyten (CD68, hier nicht gezeigt) durchgeführt. Im Vergleich mit den FX/FXa-Färbungen stellte sich ein grundsätzlich

unterschiedliches Färbemuster dar, was die Schlussfolgerung unterstützt, dass der im Plaquematerial nachweisbare FXa überwiegend nicht aus möglichen Einblutungen stammt. Diese Hypothese wird auch aus der Literatur heraus untermauert. So konnte in Studien anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass insbesondere in frühen atherosklerotischen Läsionen eine erhöhte Expression und Aktivität von gerinnungsaktiven Proteinen vorliegt (Borissoff *et al.* 2010). Ein direkter Nachweis von FXa im Plauegewebe wurde hierbei jedoch nicht geführt.

Neben FX/FXa wurde die Expression der SPHK1 in atherosklerotischen Läsionen untersucht (Abb. 3.1 und 3.3). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Co-Lokalisation von SPHK1 mit FX/FXa in atherosklerotischen Plaques deutet einen Zusammenhang von FXa und der Bildung dieses Enzyms auch *in vivo* an. Die Lokalisation von FX/FXa und SPHK1 in Plaquearealen, die ebenfalls positiv für klassische SMC-Marker sind (M-Actin und Smoothelin, Abb. 3.1 und Abb. 3.3), weist auf eine Assoziation mit Gefäßmuskelzellen im Plaque hin. Hinzu kommt weiterhin, dass auch die zellulären Rezeptoren PAR-1 und PAR-2, die durch FXa aktiviert werden können (Karsten Schrör *et al.* 2010; Borensztajn *et al.* 2011; Macfarlane *et al.* 2001), in diesen Bereichen des Plaquegewebe exprimiert sind (Abb. 3.2). Somit liegt die Schlussfolgerung nahe, dass FXa in atherosklerotischen Plaques, bedingt durch die Aktivierung von PAR-Rezeptoren, eine vermehrte Expression der SPHK1 induziert. Die daraus möglicherweise resultierenden Konsequenzen für den Phänotyp und die Funktion der SMC wurden in nachfolgenden Experimenten *in vitro* untersucht (s. Punkt 4.6).

4.2 Transkriptionelle Regulation der SPHK1 durch FXa

Das Signallipid S1P hat sich als potenter Modulator im Bereich vaskulärer Entzündungen erwiesen und konnte bereits in Studien anderer Arbeitsgruppen mit dem PAR-1 in Verbindung gebracht werden (Feistritzer *et al.* 2005; Niessen *et al.* 2008). In humanen aortalen glatten Gefäßmuskelzellen induziert FXa die verstärkte Expression von SPHK1 (Abb. 3.8). Dieser Effekt wurde zunächst auf der Ebene der SPHK1 mRNA untersucht und konnte durch Inkubation der Zellen mit spezifischen aktivierenden Peptiden für PAR-1 und PAR-2 imitiert werden. Hierbei zeigte sich, dass nur die gleichzeitige Aktivierung der beider PARs zu einer FXa-äquivalenten

Induktion der SPHK1 mRNA führte (Abb.3.12). Diese Beobachtung lässt mutmaßen, dass die Wirkung von FXa auf die Expression der SPHK1 auf einer simultanen Aktivierung dieser beiden Rezeptoren beruht. Ob möglicherweise weitere, rezeptor-unabhängige Effekte von FXa die Expression der SPHK1 beeinflussen können, wurde in den hier beschriebenen Untersuchungen nicht überprüft. Wie in zurückliegenden Arbeiten des Labors gezeigt wurde, kann FXa eine direkte Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Enzymen der extrazellulären Matrix, bewirken (Matsushita *et al.* 2006; Rauch *et al.* 2002a). Durch Abbau- bzw. Umbauvorgänge in der extrazellulären Matrix, wie sie typischerweise im Rahmen entzündlicher Veränderungen auftreten (Neto-Neves *et al.* 2013), könnten indirekte Wirkungen auf die SMC einwirken, die ebenfalls Einfluss auf die Regulation der SPHK1 besitzen. In der Literatur sind zahlreiche wechselseitige Einflüsse von MMPs mit dem S1P-Signalsystem beschrieben (Kang *et al.* 2011; Kim *et al.* 2011; Sun *et al.* 2010). Ob FXa-induzierte Wirkungen auf MMPs für die Regulation von S1P-Signaleffekten von Bedeutung sind, ist bislang nicht untersucht und könnte einen interessanten zukünftigen Studienansatz darstellen.

Nachdem die induzierende Wirkung von FXa auf die SPHK1 mRNA Expression festgestellt war, wurde auch das SPHK1 Protein untersucht. Hierzu wurden Analysen der Proteinexpression in kultivierten SMC mittels Western Blot durchgeführt (Abb. 3.7). FXa führt zu einer konzentrations- und zeitabhängig vermehrten Bildung von SPHK1 Protein. Interessant war in diesem Zusammenhang, dass eine signifikant erhöhte Proteinbildung von SPHK1 bereits ab einer FXa-Konzentration von 3 µmol/L beobachtet wurde. Eine nahezu maximale Stimulation zeigt sich bei 30 µmol/L FXa. Diese Mengen an FXa können auch aus einem in vitro generierten Fibringerinnsel freigesetzt werden und sind in der Lage, proentzündliche Veränderungen in SMC zu induzieren (Rosenkranz, *et al.* 2011). Die Schlussfolgerung hieraus ist, dass FXa bereits in niedrigen, physiologisch relevanten Konzentrationen die SPHK1-Transkription in SMC regulieren kann. Insofern scheinen SMC einen hochsensitiven Regelkreis für die Expression und Aktivität der SPHK1 und somit für die Synthese von S1P zu besitzen, der neben möglichen weiteren Stimuli auch durch FXa und PARs kontrolliert wird.

4.3 Induktion der Synthese und Freisetzung von S1P durch FXa

Neben der Untersuchung der durch FXa induzierten Genexpression der SPHK1, war die Frage von Interesse, ob die verstärkte Expression der SPHK1 tatsächlich zu einer vermehrten Synthese und Freisetzung des Signallipids S1P führt (Abb. 3.10; Abb. 3.11). Diese Frage wurde durch Analyse der intrazellulären S1P-Spiegel mittels HPLC aufgeklärt. Da diese Analyse technisch anspruchsvoll ist und eine entsprechende Geräteausstattung erforderte, wurden die Messungen von S1P in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Burkhard Kleuser (Universität Potsdam) durchgeführt. Zusätzlich zur Analyse mittels HPLC wurde in Versuchen, die eigenständig im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, die Neusynthese durch Umsatz von [³H]-markiertem Sphingosin zu [³H]S1P untersucht. Die radioaktive Isotopenmarkierung erlaubte eine sensitive Bestimmung des *de novo* synthetisierten S1P. Die aus den SMC isolierten Proben wurden hierzu mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und die S1P-Signale auf Autoradiographie-Filmen dokumentiert. Mit dieser klassischen, aber aufwendigen Technik konnte nicht nur das intrazellulär gebildete S1P, sondern auch eine FX-induzierte Freisetzung nach extrazellulär bewiesen werden (Abb. 3.10).

4.4 Wechselseitige Regulation von SPHK1/S1P und PARs

Eine im Rahmen der durchgeführten Arbeiten ebenfalls interessierende Frage war, ob nicht nur FXa und Aktivierung der PARs die Induktion von SPKH1 und die Synthese von S1P in Gefäßmuskelzellen regulieren, sondern ob es auch einen Effekt von S1P auf die Expression der PARs gibt. Um diese Frage zu klären, wurden kultivierte SMC mit S1P inkubiert und anschließend die Expression der PARs mittels Western Blot bestimmt. In den Untersuchungen wurde dabei auf die Expression von PAR-2 fokussiert. Die Einflüsse von S1P auf weitere PARs wurden im Rahmen von Untersuchungen ermittelt, die nicht Teil der vorliegenden Arbeit sind (Ermler 2013). Es zeigte sich, dass S1P tatsächlich die Expression von PAR-2 induzieren kann. Somit kann von einer Regulation der Expression von PARs (PAR-2) durch S1P ausgegangen werden. Die funktionelle Bedeutung dieser wechselseitigen Beeinflussung der Genexpression von Gerinnungsfaktor-Rezeptoren und S1P Synthese muss in zukünftigen Studien weiterführend geklärt werden.

4.5 Intrazelluläre Signalwege der FXa-induziert Regulation der SPHK1

Nachdem die Regulation der SPHK1 durch FXa auf der Ebene von mRNA und Protein untersucht war, sollten die hieran beteiligten intrazellulären Mechanismen aufgeklärt werden. Es sind verschiedene Signalwege, die die Expression der SPHK1 regulieren, in der Literatur beschrieben. So ist bekannt, dass SHPK1 in Leukämiezellen PKC-anhängig reguliert wird (Nakade *et al.* 2003). Daneben wurde bereits in Endothezellen eine Assoziation von S1P mit dem Signalweg Rho A beschrieben (Sashio *et al.* 2012). PAR1- und PAR-2 sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die eine Reihe verschiedener G-Proteine binden und deren assoziierte Signalwege induzieren können (Macfarlane *et al.* 2001). So ist PAR-1 in der Lage, G_i , G_q und $G_{12/13}$ zu aktivieren (Coughlin 2001; McCoy, *et.al* 2010). Über die durch PAR-2-abhängig gesteuerten Signalkaskaden ist im Vergleich hierzu weniger bekannt.

Um die Signalwege zu erforschen, die nach FXa-Stimulation die SHPK1 Expression in SMC regulieren, wurden die Zellen zunächst mit einer Reihe von Inhibitoren inkubiert, die bekannte durch PARs regulierte Mechanismen umfassen. Hierzu zählen Mitogen-aktivierte Signal wie Erk1/2, PKC und PKA und die kleinen GTPasen Rho A und Rac-1 (McCoy *et al.* 2010). Von den entsprechend eingesetzten Substanzen, zeigte nur die PKC-Hemmung und die Hemmung des Rho A-Signalweges mittels Rho-Kinase (ROCK)-Inhibitor einen hemmenden Einfluss. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass FXa die SPHK1 Expression über Aktivierung der beiden Signalwege PKC und Rho A reguliert. Dies schließt jedoch nicht eine Beteiligung weiterer hier nicht untersuchter Signalmoleküle aus.

Um die Wirkung von FXa auf Rho A im Detail zu ermitteln, wurde ein Rho A-Aktivierungsassay angewendet. Hierbei zeigte sich, da FXa innerhalb von Minuten zu einer Aktivierung von Rho A führt. Das ist ein Effekt, der bislang in dieser Form nicht in der Literatur beschrieben war (Böhm *et al.* 2013). Ob es einen direkten Zusammenhang, also eine intrazelluläre Kooperation von PKC und Rho-Aktivierung bei der Regulation der SPHK1 gibt, wurde in den hier beschriebenen Arbeiten nicht untersucht. Jedoch finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass PKC-Signalwege die Rho-Kinase aktivieren können (Kandabashi *et al.* 2003). Es liegt somit möglicherweise für die FXa-induzierte Regulation der SPHK1 eine hierarchische Clusterung („Downstream signaling“) der Signale PKC - Rho A/ROCK vor. Zukünftige Untersuchungen zur Aufklärung der intrazellulären Zusammenhänge,

die an der Regulation des Metabolismus von S1P beteiligt sind, wären eine sinnvolle Weiterführung des hier bearbeiteten Themengebietes.

Die Umsetzung von mRNA in Protein wird in der eukaryotischen Zelle durch vielfältige Prozesse bestimmt. Neben der Regulation der RNA-Neubildung kontrollieren posttranskriptionelle Mechanismen, beispielsweise Veränderungen der mRNA-Stabilität, die Proteinbiosynthese. Um die mögliche Beteiligung eines Effektes von FXa auf die Stabilität der SPHK1 mRNA zu untersuchen, wurden SMC nach Inkubation mit Actinomycin D als Hemmstoff der RNA-Neubildung inkubiert. Anschließend konnte die Persistenz der mRNA als Maß für ihre Stabilität mittels PCR bestimmt werden. Die gefundenen verstärkten Signalintensitäten bzw. der verzögerte Abfall der SPHK1 Transkriptmengen deuten auf einen stabilisierenden Effekt von FXa auf die SPHK1 mRNA hin (Abb. 3.16). Weitere mechanistische Untersuchungen hierzu sind notwendig, um die zugrundeliegenden Signalwege weiter aufzuklären.

4.6 Funktionelle Bedeutung von SPHK1/S1P für zelluläre Wirkungen von FXa in der glatten Gefäßmuskelzelle

Um die funktionelle Bedeutung der SPHK1-Induktion für zelluläre Wirkungen von FXa untersuchen zu können, wurde neben dem Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren eine zusätzlich molekularbiologische Technik angewendet. Hierbei handelt es sich um die RNA-Interferenz (Wilson *et al.* 2013). Mittels SPHK1-spezifischer siRNA wurde ein Abbau der SPHK1 mRNA herbeigeführt und die Transkription von RNA in Protein unterbunden (siehe Material und Methoden und Abb. 3.17). Diese Methodik wurde in einer Reihe von Vorversuchen in humanen SMC optimiert, um eine effiziente Hemmung der SPHK1 Transkription zu erreichen.

FXa ist als proliferativer und migratorischer Stimulus in der Literatur beschrieben (Rauch *et al.* 2002; Rauch *et al.* 2004). Dies zeigte sich auch in den durchgeführten eigenen Untersuchungen in kultivierten humanen SMC. In einem klassischen Migrationsassay, den Scratch-Assay, bei dem eine definierte „Wunde“ in einen Zellrasen geschabt wird, führte die Inkubation der Zellen FXa zu einem rascheren Wundschluss als dies in den unstimulierten Kontrollgruppen der Fall war. Die Hemmung der SHKP1 Expression mittels siRNA wirkte dieser durch FXa stimulierten

Zellmigration entgegen. In SPHK1-depletierten Zellen kam es also zu einer verminderten Zellwanderung. Die Schlussfolgerung hieraus ist zunächst, dass die SPHK1 Aktivität und somit vermutlich intrazelluläres S1P für die Migration humaner SMC zumindest, wenn sie durch FXa stimuliert wird, erforderlich ist. Diese Schlussfolgerung wurde von weiteren Versuchen, bei denen eine pharmakologische Hemmung der SPHK1 zu vergleichbaren Ergebnissen führte, untermauert.

Um die nach der siRNA-induzierten Hemmung der SPHK1 Expression gesehenen Ergebnissen zu bestätigen bzw. zu ergänzen, wurde ein kommerziell erhältlicher Inhibitor der SPHK1 Aktivität eingesetzt. Die Inhibition der SMC mit SKI führte ebenfalls zu einer verminderten Zellwanderung nach Stimulation mit FXa. In demselben Versuchsansatz sind auch die Inhibitoren verwendet worden, die eine Hemmung der an der SPHK1 beteiligten Transkription bewirken. Der Rho-Kinase Inhibitor Y27632 und PKC-Inhibitoren, hier gezeigt ist Rottlerin (Abb. 3.18). Auch die diese Hemmstoffe führten zu einer verminderten Migration der Zellen. Die Schlussfolgerung aus diesen Ergebnissen ist, dass sowohl eine Hemmung der SPHK1 Aktivität, als auch eine Hemmung von Signalwegen, die ihre Bildung regulieren, zu einer Einschränkung der FXa-induzierten Zellmigration führt. Allerdings muss zu diesen Daten kritisch hinzugefügt werden, dass Rottlerin bekannte unspezifische Wirkungen auch auf andere Enzyme als PKC besitzt (Soltoff 2007). Daher sind diese Daten mit Zurückhaltung zu interpretieren. Die Bedeutung der SPHK1 Expression und Aktivität für die FXa-stimulierte SMC Migration an sich scheint aber durch die Effekte der siRNA und des SPHK-Inhibitors Eindeutig belegt. Die Abb. 4.1 fasst die gefundenen Ergebnisse in einem Schema zusammen.

Weiter untermauert werden die Befunde zur FXa-induzierten Zellmigration in SMC aus PAR-2-defizienten Mäusen (Bretschneider and Schrör 2001). Nach Explantation muriner aortaler SMC wurden die Zellen in demselben Migrationsassay untersucht. Hierbei zeigten die Zellen keine chemotaktische Reaktion auf FXa hin. Diese bestätigt zusätzlich zu den Versuchen mit den PAR-aktivierenden Peptiden, die Bedeutung von PAR-2 für die zellulären Wirkungen von FXa.

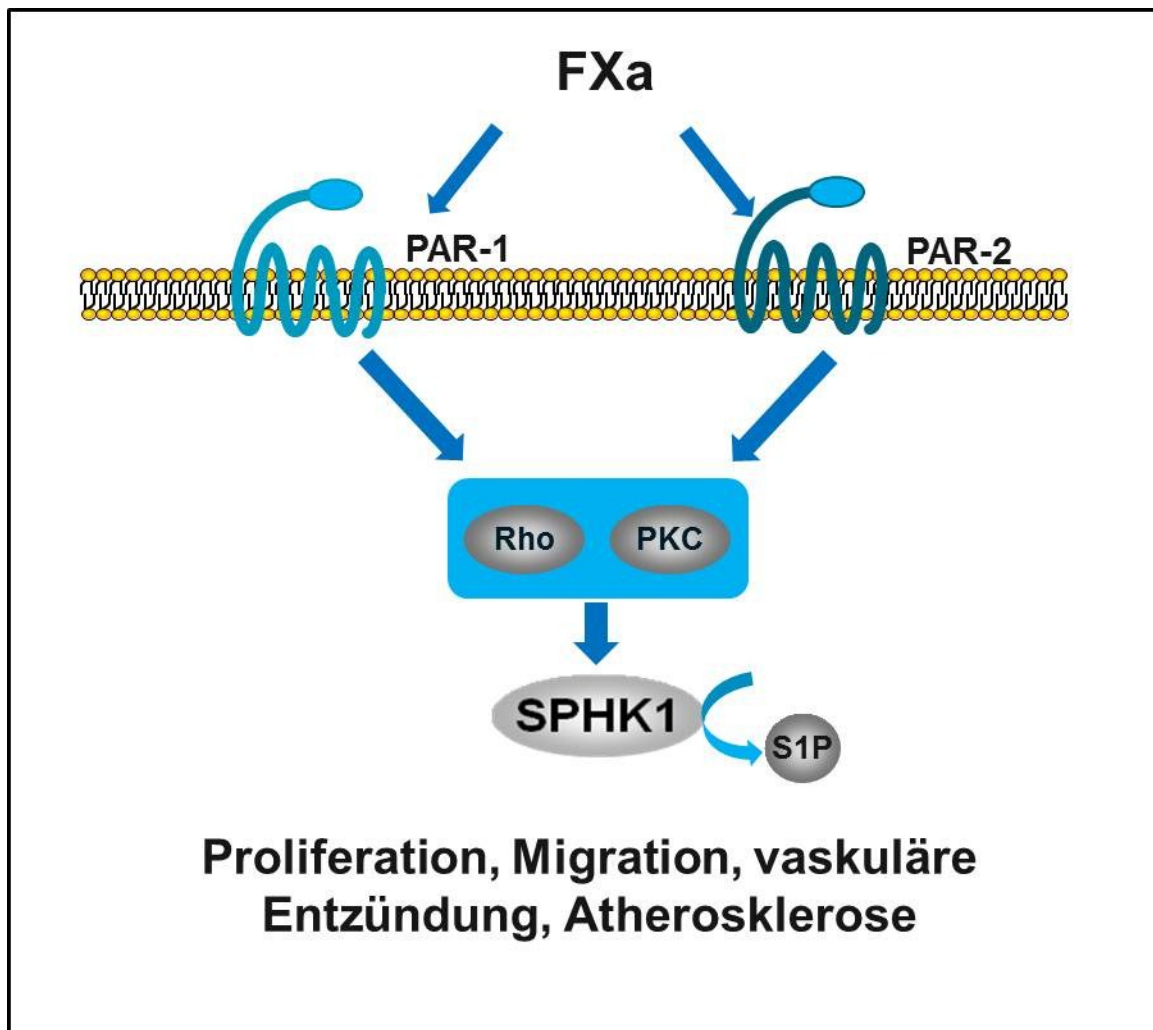


Abb. 4.1: Schema der FXa-induzierten SPHK1 Expression und der funktionellen Bedeutung in humanen SMC.

Neben der Bedeutung der SPHK1 für die Migration wurde auch ihre Rolle für die Proliferation von SMC untersucht. Als Maß für die Zellteilung wurde hierzu der Einbau von [^3H]Thymin in die DNA bestimmt. Hierdurch kann der Anteil der DNA-Neubildung nach einem proliferativen Reiz, hier FXa, ermittelt werden (Mond and Brunswick 2003). Sowohl der SPHK1-Inhibitor (Abb. 3.21), die siRNA-induzierte Hemmung der SPHK1 Expression (Abb. 3.22) und die Verwendung von Inhibitoren der die SPHK1-regulierenden Signaltransduktion (Abb. 3.23) führten zu einer Verminderung der FXa-induzierten Mitogenese. Diese Daten belegen die essentielle Bedeutung der SPHK1 Expression und Aktivität für die Proliferation von humanen SMC. Die Effekte sind somit vermutlich durch das intrazellulär gebildete S1P, welches die Funktion eines *second messenger* Systems besitzt, bedingt. Die

Bedeutung von S1P für die Zellteilung ist in verschiedenen Arbeiten untersucht worden (Bruni and Donati 2013). Die bisherigen Arbeiten haben hierbei den Schwerpunkt auf die Bedeutung von S1P für das Wachstum von Tumorzellen gelegt (Selvam and Ogretmen 2013). Daneben besitzt S1P aber auch eine anzunehmende wichtige Wirkung in der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (s. Schema in Abb. 4.1). Dass diese mitogene S1P-abhängige Signaltransduktion durch FXa aktiviert wird und es somit eine grundsätzliche Verknüpfung des Gerinnungssystems mit dem S1P-Signalnetzwerk nicht nur über die Einwirkung von Thrombin (Ermler 2013), sondern auch durch FXa besteht, wurde in den hier dargestellten Untersuchungen erstmalig aufgeklärt. Dies macht die essentielle Regulation proliferativer und pro-entzündlicher, potentiell atherogener Effekte durch Gerinnungsfaktoren deutlich. Somit tragen zelluläre Wirkungen von FXa über eine Induktion von S1P möglicherweise unmittelbar zur Pathogenese von proliferativen Erkrankungen der Gefäßwand wie der Atherosklerose oder der Restenose nach Gefäßverletzung bei. Diese Befunde können für die Anwendung neuer gerinnungshemmender Substanzen in der Klinik (s. Ausblick), beispielsweise die neuen oralen Antikoagulantien vom Typ der FXa-Hemmer, von Bedeutung sein. Obwohl in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, könnten die hier gewonnenen Erkenntnisse auch einen Einblick in die wachstumsfördernden Effekte von Gerinnungsfaktoren in Tumorzellen ermöglichen, die sich durch eine verstärkte Aktivierung des Gerinnungssystems auszeichnen (Mitroulis *et al.* 2011).

4.7 Untersuchung der S1P-abbauenden Enzyme

Nachdem die transkriptionelle Regulation der SPHK1 und der hieran beteiligten Signalwege untersucht waren, sollte in weiteren Experimenten ein möglicher Effekt auch auf die S1P-abbauenden Signalwege ermittelt werden. Hierzu wurde die Expression der S1P Phosphatase -1 und -2 (SGPP1/2) sowie der S1P Lyase *et al.* 2004) bestimmt. Es zeigte sich, dass kein signifikanter Effekt auf die mRNA Spiegel dieser Enzyme durch FXa nachweisbar war (Abb. 3.24). Das Enzym SGPP2 war zudem nicht bzw. kaum in den Zellen vorhanden. Hieraus ist zu schließen, dass FXa in humanen SMC zwar eine deutliche Wirkung auf die Neubildung von SP aufweist, die S1P-abbauenden Signalwege aber nicht reguliert werden. Zumindest kann diese Schlussfolgerung für die Ebene der mRNA gezogen werden. Eine evtl. vorhandene

Einflussnahme von FXa auf die Proteinmengen S1P-degradierender Enzyme oder auf die S1P Spiegel wurde hier nicht weiter untersucht.

4.8 Ausblick

Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Zusammenhang von zellulären Wirkungen des Gerinnungsfaktors FXa und dem Signallipid S1P belegt einen unmittelbaren Einfluss der Blutgerinnung auf zentrale Entzündungsprozesse an und innerhalb der Gefäßwand. Somit können Inhibitoren der Gerinnung auch einen direkten Einfluss auf chronische Entzündungsreaktionen und proentzündliche Prozesse an denen S1P als ubiquitärer Entzündungsmodulator beteiligt ist, haben. Dies trägt möglicherweise zu den Effekten von neuen Gerinnungshemmstoffen bei, die neben ihrem eigentlichen Mechanismus auch zusätzliche „pleiotrope“, also über die Hauptwirkung hinausgehende Wirkungen, aufweisen können. Wie ausgeprägt derartige Zusatzwirkungen sind und ob diese gezielt therapeutisch, z.B. zur Prävention nicht nur thrombotischer sondern auch atherogener Ereignisse, Anwendung finden können, muss in zukünftigen klinischen Studien untersucht werden.

Die hier dargestellten Untersuchungen haben im Detail die FXa-induzierte Expression der SPHK1 behandelt. Weitere Effekte von FXa oder PARs auf den S1P Metabolismus wurden hier nicht ermittelt. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit zwar kein signifikanter Effekt auf die mRNA Niveaus der S1P-abbauenden Enzyme gefunden, jedoch wurden die Untersuchungen nicht über einen Zeitraum von länger als 24 Stunden ausgedehnt und es wurden keine Untersuchungen zu einer vielleicht indirekten Einflussnahme auf S1P-metabolisierenden Enzyme *in vivo* durchgeführt. Insofern kann aus den hier gefundenen negativen Befunden kein Rückschluss auf das Fehlen eines Effektes von FXa oder PARs auf den weiteren S1P Metabolismus gezogen werden. Darüber hinaus wurde in den hier dargelegten Untersuchungen nicht die Frage nach einer möglichen Einflussnahme von FXa oder einer Aktivierung der PARs auf die Regulation von S1P-Rezeptoren gestellt. Zusätzlich gestehen Hinweise für eine direkte Interaktion von PARs mit S1P-Rezeptoren. Ob vergleichbare Mechanismen in humanen SMC von Bedeutung sind, wurde hier ebenfalls nicht untersucht. Die Beleuchtung dieser Prozesse könnte weitere Details der molekularen Interaktion von Gerinnungssystem und S1P-Signalnetzwerk aufklären und stellt ein interessantes zukünftiges Forschungsfeld dar.

5. Zusammenfassung

Nach einer Verletzung führt die Bindung des Gerinnungsproteins Faktor-X (FX) an *tissue factor* im Komplex mit Faktor-VIIIa zur Bildung von aktiviertem FX (FXa) und somit zur Aktivierung der Blutgerinnung. Neben seiner Bedeutung als zentraler Gerinnungsprotease übt FXa über G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die Protease-aktivierten Rezeptoren PAR-1 und PAR-2, direkte Effekte in den Zellen der Gefäßwand aus. FXa reguliert die Transkription proentzündlicher und proliferativer Gene und kann hierüber zu proliferativen Prozessen in der Gefäßwand wie Atherosklerose und Gefäßverdickung nach Verletzung beitragen. Ein zentraler und erst jüngst untersuchter Regulator von Entzündungsprozessen ist das Signallipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P). Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von FXa auf die Expression des S1P-bildenden Enzyms SPHK1 in aortalen glatten Gefäßmuskelzellen des Menschen. FXa induziert PAR-1/-2-vermittelt die Expression der SPHK1 *in vitro* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Erstmals wurde FX/FXa auch innerhalb atherosklerotischen Läsionen der humanen A. Carotis nachgewiesen und zwar in muskelzell-reichen Arealen der Plaques und in Kollokalisierung mit SPHK1 sowie PAR-1 und PAR-2. In nachfolgenden Untersuchungen zeigte sich, dass insbesondere eine Aktivierung von Rho A und klassischer PKC-abhängiger intrazellulärer Signalwege die Expression der SPHK1 regulieren. Die FXa-induzierte Expression der SPHK1 ging mit einer mittels HPLC und Dünnschichtchromatographie gemessenen verstärkten Synthese und Freisetzung von S1P einher. Phänotypisch reagierten FXa-stimulierte Gefäßmuskelzellen mit einer deutlich verstärkten Migration und DNA Synthese im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dieser Effekt konnte sowohl durch Inhibitoren des Rho A und des PKC Signalweges als auch durch eine Herabregulation der SPHK1-Genexpression mittels spezifischer siRNA vermindert werden. Weitere Befunde legen nahe, dass die Wirkung von FXa auf die SPHK1 teils auf mRNA-stabilisierende Effekten beruht. Hingegen zeigten die S1P-abbauenden Enzyme S1P Phosphatase-1 und S1P Lyase keine Veränderungen in ihren Expressionsprofilen. Zusammengefasst belegen diese Daten erstmals die Bedeutung der SPHK1-Expression und S1P-Bildung für Migration und Proliferation von Gefäßmuskelzellen nach Stimulation durch FXa. Dies legt einen bislang unbekannten direkten Einfluss des Gerinnungssystems auf den ubiquitären Entzündungsmodulator S1P offen.

6. Summary

Binding of the coagulation protein factor-X (FX) to tissue factor after vascular injury in complex with factor-VIIIa leads to generation of the activated factor-X (FXa) and thus to activation of blood coagulation. Besides its role as central coagulation protease, FXa exerts direct cellular actions at the vessel wall via the protease-activated receptors PAR-1 and PAR-2. FXa regulates transcription of proinflammatory and proliferative genes and can thereby contribute to proliferative vascular processes such as atherosclerosis and restenosis after vascular injury. A central and just recently emerging regulator of inflammation is the lipid signaling molecule sphingosine-1-phosphate (S1P). The present thesis investigates the impact of FXa for expression of the S1P generating enzyme SPHK1 in human aortic vascular smooth muscle cells (SMC). FXa induces PAR-1/-2 mediated expression of SPHK1 in vitro as well at the level of mRNA and as protein. For the first time, FX/FXa was also detected within atherosclerotic lesions of human carotid artery specimen in SMC-rich areas and in co-localization with SPHK1 and PAR-1 and PAR-2. Consecutive experiments indicated an involvement of Rho A and of classical PKC signaling pathways in the expression of SPHK1. FXa-induced expression of SPHK1 was accompanied by increased synthesis and release of S1P as determined by HPLC and thin layer chromatography. Phenotypically, FXa stimulated SMC responded with increased cell migration and DNA synthesis compared to control cells. This effect was attenuated by inhibition of Rho A and PKC signaling as well as after by downregulation of SPHK1 expression with specific siRNA. Additional results suggest that the effect of FXa on SPHK1 expression in part was due to mRNA stabilization. In comparison, no changes in the expression profiles of the S1P degrading enzymes S1P phosphatase-1 or S1P lyase were obvious. Taken together, these data suggest for the first time an effect of SPHK1 expression and S1P synthesis for migration and proliferation of SMC after stimulation with FXa. This reveals a to date unknown direct connection between the coagulation system and the ubiquitous inflammatory modulator S1P.

7. Literaturverzeichnis

- Billich, A., Nicole U., R. Reuschel, and T. Baumruker. 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) (July): 1547–1555. doi:10.1016/j.biocel.2009.01.001.
- Bligh, E.G., and W.J. Dyer. 1959. "A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification." *Can.J.Biochem.Physiol* 37 (8) (August): 911–917.
- Böhm, A., A. Flößer, S. Ermler, A. C Fender, A. Lüth, B. Kleuser, K. Schrör, and B. H Rauch. 2013. "Factor-Xa-induced Mitogenesis and Migration Require Sphingosine Kinase Activity and S1P Formation in Human Vascular Smooth Muscle Cells." *Cardiovascular Research* 99 (3) (August 1): 505–513. doi:10.1093/cvr/cvt112.
- Borensztajn, K., M.P. Peppelenbosch, and C.A. Spek. 2008. "Factor Xa: At the Crossroads Between Coagulation and Signaling in Physiology and Disease." *Trends Mol.Med.* 14 (1471-4914 (Print)) (October): 429–440. doi:10.1016/j.molmed.2008.08.001.
- Borensztajn, K., and C. A. Spek. 2011. "Blood Coagulation Factor Xa as an Emerging Drug Target." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 15 (3) (March): 341–349. doi:10.1517/14728222.2011.553608.
- Borissoff, J.I., S. Heeneman, E. Kiliç, P. Kassák, R. Van Oerle, K. Winckers, J. W. P. Govers-Riemslog, *et al.* 2010. "Early Atherosclerosis Exhibits an Enhanced Procoagulant State." *Circulation* 122 (8) (August 24): 821–830. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.907121.
- Bradley, M.E., N. McGuinness, Gareth Williams, S. J Charlton, and M. R Dowling. 2011. "The in Vitro Metabolism of Sphingosine-1-phosphate: Identification; Inhibition and Pharmacological Implications." *European Journal of Pharmacology* 672 (1-3) (December 15): 56–61. doi:10.1016/j.ejphar.2011.09.178.
- Bretschneider, E, and K Schrör. 2001. "Cellular Effects of Factor Xa on Vascular Smooth Muscle Cells--inhibition by Heparins?" *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 27 (5) (October): 489–493. doi:10.1055/s-2001-17956.
- Bretschneider, E., M. Braun, A. Fischer, M. Wittpoth, E. Glusa, and K. Schrör. 2000. "Factor Xa Acts as a PDGF-independent Mitogen in Human Vascular Smooth Muscle Cells." *Thromb.Haemost.* 84 (0340-6245 (Print)) (September): 499–505.

- Brummel, K.E, S.G Paradis, S. Butenas, and K. G Mann. 2002. "Thrombin Functions During Tissue Factor-induced Blood Coagulation." *Blood* 100 (1) (July 1): 148–152.
- Bruni, P., and C. Donati. 2013. "Role of Sphingosine 1-phosphate in Skeletal Muscle Cell Biology." *Handbook of Experimental Pharmacology* (216): 457–467. doi:10.1007/978-3-7091-1511-4_23.
- Chen, X, J Berrou, C Vigneau, F Delarue, and E Rondeau. 2001. "Internalisation of the Protease-activated Receptor 1: Role of the Third Intracellular Loop and of the Cytoplasmic Tail." *International Journal of Molecular Medicine* 7 (6) (June): 653–658.
- Cimmino, G., C. D'Amico, V. Vaccaro, M. D'Anna, and P. Golino. 2011. "The Missing Link Between Atherosclerosis, Inflammation and Thrombosis: Is It Tissue Factor?" *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 9 (4) (April): 517–523. doi:10.1586/erc.11.40.
- Coughlin, SR. 1999. "Protease-activated Receptors and Platelet Function." *Thrombosis and Haemostasis* 82 (2) (August): 353–356.
- Coughlin, SR. 2001. "Protease-activated Receptors in Vascular Biology." *Thrombosis and Haemostasis* 86 (1) (July): 298–307.
- Ermler, S. 2013. "Thrombin- vermittelte Regulation der Protease- aktivierten Rezeptoren und des Sphingosin-1-Phosphat-Signalsystems". Dissertation. Accessed August 18. <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=19905>.
- Feistritzer, C. and M. Riewald. 2005. "Endothelial Barrier Protection by Activated Protein C through PAR1-dependent Sphingosine 1-phosphate Receptor-1 Crossactivation." *Blood* 105 (8) (April 15): 3178–3184. doi:10.1182/blood-2004-10-3985.
- Gebbers, J.-O. 2007. "Atherosclerosis, Cholesterol, Nutrition, and Statins--a Critical Review." *German Medical Science: GMS E-journal* 5: Doc04.
- Ghigliotti, G, AR Waissbluth, C Speidel, DR Abendschein, and PR Eisenberg. 1998. "Prolonged Activation of Prothrombin on the Vascular Wall after Arterial Injury." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 18 (2) (February): 250–257.

- Hoffman, JR. 2001. "Thrombolytic Therapy for Acute Ischemic Stroke - Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke: Is the CAEP Position Statement Too Negative?" *CJEM* 3 (3) (July): 183–185.
- Huang, H.-L., S. Wang, M.-Xin Yin, L. Dong, C. Wang, W. Wu, Y. Lu, *et al.* 2013. "Par-1 Regulates Tissue Growth by Influencing Hippo Phosphorylation Status and Hippo-salvador Association." *PLoS Biology* 11 (8) (August): e1001620. doi:10.1371/journal.pbio.1001620.
- Huwiler, A., and J. Pfeilschifter. 2006. "Altering the Sphingosine-1-phosphate/ceramide Balance: a Promising Approach for Tumor Therapy." *Current Pharmaceutical Design* 12 (35): 4625–4635.
- Inoue, S., T. Nakazawa, A. Cho, F. Dastvan, F. Davastan, D. Shilling, G. Daum, and M. Reidy. 2007. "Regulation of Arterial Lesions in Mice Depends on Differential Smooth Muscle Cell Migration: a Role for Sphingosine-1-phosphate Receptors." *Journal of Vascular Surgery* 46 (4) (October): 756–763. doi:10.1016/j.jvs.2007.05.055.
- Ishikawa, C., T. Tsuda, H. Konishi, N. Nakagawa, and K. Yamanishi. 2009. "Tetracyclines Modulate Protease-activated Receptor 2-mediated Proinflammatory Reactions in Epidermal Keratinocytes." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (5) (May): 1760–1765. doi:10.1128/AAC.01540-08.
- Jonasson, L, J Holm, O Skalli, G Bondjers, and G K Hansson. 1986. "Regional Accumulations of T Cells, Macrophages, and Smooth Muscle Cells in the Human Atherosclerotic Plaque." *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 6 (2) (April): 131–138.
- Kandabashi, T., H. Shimokawa, K. Miyata, I. Kunihiro, Y. Eto, K. Morishige, Y. Matsumoto, *et al.* 2003. "Evidence for Protein Kinase C-mediated Activation of Rho-kinase in a Porcine Model of Coronary Artery Spasm." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (12) (December): 2209–2214. doi:10.1161/01.ATV.0000104010.87348.26.
- Kang, H., H.-I.I Kwak, R. Kaunas, and K. J Bayless. 2011. "Fluid Shear Stress and Sphingosine 1-phosphate Activate Calpain to Promote Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) Membrane Translocation and Endothelial Invasion into Three-dimensional Collagen Matrices." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (49) (December 9): 42017–42026. doi:10.1074/jbc.M111.290841.
- Kim, E.-S., J.-S. Kim, S. G. Kim, S. Hwang, C. H. Lee, and A. Moon. 2011. "Sphingosine 1-phosphate Regulates Matrix Metalloproteinase-9 Expression

- and Breast Cell Invasion through S1P3-Gaq Coupling." *Journal of Cell Science* 124 (Pt 13) (July 1): 2220–2230. doi:10.1242/jcs.076794.
- Libby, P, YJ Geng, M Aikawa, U Schoenbeck, F Mach, S K Clinton, G K Sukhova, and R T Lee. 1996. "Macrophages and Atherosclerotic Plaque Stability." *Current Opinion in Lipidology* 7 (5) (October): 330–335.
- Maceyka, M., S. Milstien, and S. Spiegel. 2005. "Sphingosine Kinases, Sphingosine-1-phosphate and Sphingolipidomics." *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 77 (1-4) (September): 15–22. doi:10.1016/j.prostaglandins.2004.09.010.
- Macfarlane, SR, M J Seatter, T Kanke, G D Hunter, and R Plevin. 2001. "Proteinase-activated Receptors." *Pharmacological Reviews* 53 (2) (June): 245–282.
- Mackman, N., R.E Tilley, and N.I S Key. 2007. "Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (8) (August): 1687–1693. doi:10.1161/ATVBAHA.107.141911.
- Marutsuka, K., K. Hatakeyama, A. Yamashita, and Y. Asada. 2005. "Role of Thrombogenic Factors in the Development of Atherosclerosis." *J.Atheroscler.Thromb.* 12 (1340-3478 (Print)): 1–8.
- Matsushita, K., T. Imamura, M. Tomikawa, S. Tancharoen, S. Tatsuyama, and I.Maruyama. 2006. "DX-9065a Inhibits Proinflammatory Events Induced by Gingipains and Factor Xa." *Journal of Periodontal Research* 41 (2) (April): 148–156. doi:10.1111/j.1600-0765.2005.00853.x.
- McCoy, Kelly L, Stephen F Traynelis, and John R Hepler. 2010a. "PAR1 and PAR2 Couple to Overlapping and Distinct Sets of G Proteins and Linked Signaling Pathways to Differentially Regulate Cell Physiology." *Molecular Pharmacology* 77 (6) (June): 1005–1015. doi:10.1124/mol.109.062018.
- McCoy, 2010b. "PAR1 and PAR2 Couple to Overlapping and Distinct Sets of G Proteins and Linked Signaling Pathways to Differentially Regulate Cell Physiology." *Molecular Pharmacology* 77 (6) (June): 1005–1015. doi:10.1124/mol.109.062018.
- McVerry, B.J., and J.G.N. Garcia. 2004. "Endothelial Cell Barrier Regulation by Sphingosine 1-phosphate." *Journal of Cellular Biochemistry* 92 (6) (August 15): 1075–1085. doi:10.1002/jcb.20088.
- Meyer Zu, Heringdorf D., H. Lass, R. Alemany, K.T. Laser, E. Neumann, C. Zhang, M. Schmidt, U. Rauen, K.H. Jakobs, and C.J. van Koppen. 1998. "Sphingosine

- Kinase-mediated Ca²⁺ Signalling by G-protein-coupled Receptors." *EMBO J.* 17 (0261-4189 (Print)) (May 15): 2830–2837. doi:10.1093/emboj/17.10.2830.
- Mitroulis, I., K. Kambas, P. Anyfanti, M. Doumas, and K. Ritis. 2011. "The Multivalent Activity of the Tissue Factor-thrombin Pathway in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders as a Target for Therapeutic Intervention." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 15 (1) (January): 75–89. doi:10.1517/14728222.2011.532788.
- Mond, J.J., and M. Brunswick. 2003. "Proliferative Assays for B Cell Function." *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et al.]* Chapter 3 (November): Unit 3.10. doi:10.1002/0471142735.im0310s57.
- Monno, R., G. Grandaliano, R. Faccio, E. Ranieri, C. Martino, L. Gesualdo, and F. P. Schena. 2001. "Activated Coagulation Factor X: a Novel Mitogenic Stimulus for Human Mesangial Cells." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 12 (5) (May): 891–899.
- Mosesson, M.W. 2005. "Fibrinogen and Fibrin Structure and Functions." *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 3 (8) (August): 1894–1904. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x.
- Nagahashi, M., S. Ramachandran, E. Y. Kim, J. C. Allegood, O. M. Rashid, A. Yamada, R. Zhao, *et al.* 2012. "Sphingosine-1-phosphate Produced by Sphingosine Kinase 1 Promotes Breast Cancer Progression by Stimulating Angiogenesis and Lymphangiogenesis." *Cancer Research* 72 (3) (February 1): 726–735. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2167.
- Nakade, Y., Y. Banno, K. T-Koizumi, K. Hagiwara, S. Sobue, M. Koda, M. Suzuki, *et al.* 2003. "Regulation of Sphingosine Kinase 1 Gene Expression by Protein Kinase C in a Human Leukemia Cell Line, MEG-O1." *Biochimica et Biophysica Acta* 1635 (2-3) (December 30): 104–116.
- Neto-Neves, E.M., T. Kiss, D. Muhl, and J.E. Tanus-Santos. 2013. "Matrix Metalloproteinases as Drug Targets in Acute Pulmonary Embolism." *Current Drug Targets* 14 (3) (March): 344–352.
- Niessen, F., F. Schaffner, C. Furlan-Freguia, R. Pawlinski, G. Bhattacharjee, J. Chun, C.K. Derian, P. Andrade-Gordon, H. Rosen, and W. Ruf. 2008. "Dendritic Cell PAR1-S1P3 Signalling Couples Coagulation and Inflammation." *Nature* 452 (1476-4687 (Electronic)) (April 3): 654–658. doi:10.1038/nature06663.
- Olivera, A., and S. Spiegel. 2001. "Sphingosine Kinase: a Mediator of Vital Cellular Functions." *Prostaglandins* 64 (1-4) (April): 123–134.

- Olivera, A., T. Kohama, L. Edsall, V. Nava, O. Cuvillier, S. Poulton, and S. Spiegel. 1999. "Sphingosine Kinase Expression Increases Intracellular Sphingosine-1-phosphate and Promotes Cell Growth and Survival." *J.Cell Biol.* 147 (0021-9525 (Print)) (November 1): 545–558.
- Olivera, A., H.M. Rosenfeldt, M. Bektas, F. Wang, I. Ishii, J. Chun, S. Milstien, and S. Spiegel. 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 (0021-9258 (Print)) (November 21): 46452–46460. doi:10.1074/jbc.M308749200.
- Pyne, S., K.-C. Kong, and P. I Darroch. 2004. "Lysophosphatidic Acid and Sphingosine 1-phosphate Biology: The Role of Lipid Phosphate Phosphatases." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 15 (5) (October): 491–501. doi:10.1016/j.semcd.2004.05.007.
- Rauch, B.H., E. Bretschneider, M. Braun, and K. Schror. 2002a. "Factor Xa Releases Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) from Human Vascular Smooth Muscle Cells and Stimulates the Conversion of pro-MMP-2 to MMP-2: Role of MMP-2 in Factor Xa-induced DNA Synthesis and Matrix Invasion." *Circ.Res.* 90 (1524-4571 (Electronic)) (May 31): 1122–1127.
- Rauch, B.H., E. Millette, R.D. Kenagy, G. Daum, and A.W. Clowes. 2004a. "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 (1524-4571 (Electronic)) (February 20): 340–345. doi:10.1161/01.RES.0000111805.09592.D8.
- Rosenkranz, A.C., K. Schrör, and B. H Rauch. 2011. "Direct Inhibitors of Thrombin and Factor Xa Attenuate Clot-induced Mitogenesis and Inflammatory Gene Expression in Human Vascular Smooth Muscle Cells." *Thrombosis and Haemostasis* 106 (3) (September): 561–562. doi:10.1160/TH11-04-0275.
- Ross, R, and J.A. Glomset. 1973. "Atherosclerosis and the Arterial Smooth Muscle Cell: Proliferation of Smooth Muscle Is a Key Event in the Genesis of the Lesions of Atherosclerosis." *Science (New York, N.Y.)* 180 (4093) (June 29): 1332–1339.
- Ross, R. 1999. "Atherosclerosis Is an Inflammatory Disease." *Am.Heart J.* 138 (0002-8703 (Print)) (November): S419–S420.

- Sanchez, T., and T. Hla. 2004. "Structural and Functional Characteristics of S1P Receptors." *J.Cell Biochem.* 92 (0730-2312 (Print)) (August 1): 913–922. doi:10.1002/jcb.20127.
- Sashio, T., H. Kume, N. Takeda, T. Asano, S. Tsuji, M. Kondo, Y. Hasegawa, and K. Shimokata. 2012. "Possible Involvement of Sphingosine-1-Phosphate/G(i)/RhoA Pathways in Adherence of Eosinophils to Pulmonary Endothelium." *Allergology International: Official Journal of the Japanese Society of Allergology* 61 (2) (June): 283–293. doi:10.2332/allergolint.10-OA-0299.
- Schaffner, F., and W. Ruf. 2009. "Tissue Factor and PAR2 Signaling in the Tumor Microenvironment." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (12) (December): 1999–2004. doi:10.1161/ATVBAHA.108.177428.
- Schrör, K. 2008. "[The clotting system in the reperfused coronary circulation]." *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 133 (12) (March): 579–581. doi:10.1055/s-2008-1067285.
- Schrör, K., E. Bretschneider, K. Fischer, J. W Fischer, R. Pape, B. H Rauch, Anke C Rosenkranz, and A.-A. Weber. 2010. "Thrombin Receptors in Vascular Smooth Muscle Cells - Function and Regulation by Vasodilatory Prostaglandins." *Thrombosis and Haemostasis* 103 (5) (May): 884–890. doi:10.1160/TH09-09-0627.
- Scotton, C.J., M.A. Krupiczkoj, M. Königshoff, P. F. Mercer, Y. C. G. Lee, N. Kaminski, J. Morser, *et al.* 2009. "Increased Local Expression of Coagulation Factor X Contributes to the Fibrotic Response in Human and Murine Lung Injury." *The Journal of Clinical Investigation* 119 (9) (September): 2550–2563. doi:10.1172/JCI33288.
- Selvam, S. Panneer, and B. Ogretmen. 2013. "Sphingosine Kinase/sphingosine 1-phosphate Signaling in Cancer Therapeutics and Drug Resistance." *Handbook of Experimental Pharmacology* (216): 3–27. doi:10.1007/978-3-7091-1511-4_1.
- S., Jagmohan, and S. Rattan. 2013. "Role of PKC and RhoA/ROCK Pathways in the Spontaneous Phasic Activity in the Rectal Smooth Muscle." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 304 (8) (April 15): G723–731. doi:10.1152/ajpgi.00473.2012.
- Soltoff, S.P. 2007. "Rottlerin: An Inappropriate and Ineffective Inhibitor of PKCdelta." *Trends in Pharmacological Sciences* 28 (9) (September): 453–458. doi:10.1016/j.tips.2007.07.003.

- Spiegel, S., and S. Milstien. 2003. "Sphingosine-1-phosphate: An Enigmatic Signalling Lipid." *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 4 (1471-0072 (Print)) (May): 397–407. doi:10.1038/nrm1103.
- Stötzel, S, F Krause, and H. Bergert. 2012. "[Surgery of high-grade asymptomatic stenosis of the internal carotid artery]." *Zentralblatt für Chirurgie* 137 (5) (October): 411–413. doi:10.1055/s-0032-1327830.
- Sun, H.-Y., S.-P. Wei, R.-C. Xu, P.-X. Xu, and W.-Ch. Zhang. 2010. "Sphingosine-1-phosphate Induces Human Endothelial VEGF and MMP-2 Production via Transcription Factor ZNF580: Novel Insights into Angiogenesis." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 395 (3) (May 7): 361–366. doi:10.1016/j.bbrc.2010.04.019.
- Ter Braak, M., K. Danneberg, K. Lichte, K. Liphardt, N. T. Ktistakis, S. M Pitson, T. Hla, K. H Jakobs, and D. Meyer zu Heringdorf. 2009. "Galpha(q)-mediated Plasma Membrane Translocation of Sphingosine Kinase-1 and Cross-activation of S1P Receptors." *Biochimica et Biophysica Acta* 1791 (5) (May): 357–370.
- 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) (November): 437–442. doi:10.1124/jpet.103.052100.
- Wattenberg, B.W. 2010. "Role of Sphingosine Kinase Localization in Sphingolipid Signaling." *World Journal of Biological Chemistry* 1 (12) (December 26): 362–368. doi:10.4331/wjbc.v1.i12.362.
- Weber, A.A., S Liesener, A. Schanz, T. Hohlfeld, and K. Schrör. 2000. "Habitual Smoking Causes an Abnormality in Platelet Thromboxane A2 Metabolism and Results in an Altered Susceptibility to Aspirin Effects." *Platelets* 11 (3) (May): 177–182.
- Ross, W. C, and J A Doudna. 2013. "Molecular Mechanisms of RNA Interference." *Annual Review of Biophysics* 42: 217–239. doi:10.1146/annurev-biophys-083012-130404.
- Zhang, C., Y. Srinivasan, D H Arlow, J. J. Fung, D. Palmer, Y. Zheng, H. F. Green, et al. 2012. "High-resolution Crystal Structure of Human Protease-activated Receptor 1." *Nature* 492 (7429) (December 20): 387–392. doi:10.1038/nature11701.

- Zhou, Q., F. Bea, M. Preusch, H. Wang, B. Isermann, K. Shahzad, H. A Katus, and E. Blessing. 2011. "Evaluation of Plaque Stability of Advanced Atherosclerotic Lesions in Apo E-deficient Mice after Treatment with the Oral Factor Xa Inhibitor Rivaroxaban." *Mediators of Inflammation* 2011: 432080. doi:10.1155/2011/432080.

8. Veröffentlichungen

8.1 Fachzeitschriftenartikel

1. **Böhm, A.**, A. Flößer, S. Ermler, A. C Fender, A. Lüth, B. Kleuser, K. Schrör, and B. H. Rauch. 2013. "Factor-Xa-induced Mitogenesis and Migration Require Sphingosine Kinase Activity and S1P Formation in Human Vascular Smooth Muscle Cells." *Cardiovascular Research* 99 (3) (August 1): 505–513. doi:10.1093/cvr/cvt112.
2. Rauch, B. H, A. C Rosenkranz, S. Ermler, **A. Böhm**, J. Driessen, J. W. Fischer, A. Sugidachi, J. A. Jakubowski, and K. 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* 30 (12) (December): 2434–2442. doi:10.1161/ATVBAHA.110.213702.
3. Rauch, S. J., A. C. Rosenkranz, **A. Böhm**, J Meyer-Kirchrath, T Hohlfeld, K Schrör, and B.H. Rauch. 2011. "Cholesterol Induces Apoptosis-associated Loss of the Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) in Human Monocytes." *Vascular Pharmacology* 54 (3-6) (June): 93–99. doi:10.1016/j.vph.2011.03.004.
4. Rosenkranz, A. C., B. H. Rauch, A. Doller, W. Eberhardt, **A. Böhm**, E. Bretschneider, and K. Schrör. 2011. "Regulation of Human Vascular Protease-activated Receptor-3 through mRNA Stabilization and the Transcription Factor Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT)." *Molecular Pharmacology* 80 (2) (August): 337–344. doi:10.1124/mol.111.072850.
5. Ulrych, T, **A. Böhm**, A Polzin, G Daum, R M Nüsing, G Geisslinger, T Hohlfeld, K Schrör, and B H Rauch. 2011. "Release of Sphingosine-1-phosphate from Human Platelets Is Dependent on Thromboxane Formation." *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 9 (4) (April): 790–798. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04194.x.
6. Weithauser, A., P. Bobbert, S. Antoniak, **A. Böhm**, B. H. Rauch, K. Klingel, K. Savvatis, *et al.* 2013. "Protease-activated Receptor 2 Regulates the Innate Immune Response to Viral Infection in a CVB3-induced Myocarditis." *Journal of the American College of Cardiology* (July 3). doi:10.1016/j.jacc.2013.05.076.

8.2 Kongressbeiträge

1. **Böhm, A.**, A. Polzin, A. Lueth, B. Kleuser, T. Rassaf, M. Kelm, H. K. Kroemer, K. Schroer, and B. H. Rauch. 2012. "The Release of Sphingosine-1-phosphate from Human Platelets during Acute Coronary Syndrome Is Attenuated by Aspirin." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 385 (March): 12–12.
2. **Böhm, A.**, S. J. Rauch, A. C. Rosenkranz, J. Meyer-Kirchrath, K. Schrör, and B. H. Rauch. 2009. "Cholesterol-induced Apoptosis Is Associated with Downregulation of the Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) in Human Monocytic Cells." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 379 (April): 42–42.
3. Ermler, S., **A. Böhm**, A. Rosenkranz, K. Schrör, and B. H. Rauch. 2011. "Regulation of Sphingosine Kinase-1 Expression by factor-Xa - Role for Mitogenesis and Migration of Human Vascular Smooth Muscle Cells." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 383 (March): 34–35.
4. Ermler, S., **A. Böhm**, A. C. Rosenkranz, K. Schrör, and B. H. Rauch. 2011. "Thrombin Induces Expression Of Sphingosine Kinase-1 (SPHK-1) In Human Vascular Smooth Muscle Cells Via The mRNA Stabilising Protein HuR. Inhibition By Dabigatran Reduces Vascular SPHK-1 Expression And Atherosclerotic Burden In Vivo." *Circulation* 124 (21) (November 22).
5. Floesser, A., **A. Böhm**, S. Ermler, A. C. Rosenkranz, K. Schrör, H. K. Kroemer, and B. H. Rauch. 2012. "Thrombin Regulates Expression of Sphingosine Kinase-1 (SPHK-1) in Human Vascular Smooth Muscle Cells - Inhibition by Dabigatran Reduces Vascular SPHK-1 Expression and Atherosclerotic Burden in Vivo." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 385 (March): 27–27.
6. Polzin, A., **A. Böhm**, T. Ulrych, A. Rosenkranz, K. Schrör, and B. H. Rauch. 2011. "Aspirin Attenuates Endothelial Cell Migration Induced by Platelet Supernatants via Reduced Platelet Sphingosine-1-phosphate Release." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 383 (March): 4–4.
7. Polzin, A., **A. Böhm**, T. Ulrych, A.C. Rosenkranz, T. Hohlfeld, K. Schrör, and Bernhard H. Rauch. 2010. "Sphingosine-1-Phosphate Is Thromboxane-dependently Released from Platelets and Modulates Chemotaxis of Human Monocytes." *Circulation* 122 (21) (November 23).
8. Rauch, B. H., J. Driessen, S. Ermler, **A. Böhm**, A. C. Rosenkranz, J. W. Fischer, J. A. Jakubowski, A. Sugidachi, and K. Schrör. 2009. "Thrombin Upregulated Expression of Functionally Active P2Y(12) ADP Receptors in Human Vascular

Smooth Muscle Cells." *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 379 (April): 96–96.

9. Rauch, B. H., S. Ermler, **A. Böhm**, A. C. Rosenkranz, J. Driessen, J. A. Jakubowski, A. Sugidachi, and K. Schrör. 2009. "THROMBIN INDUCES EXPRESSION OF FUNCTIONALLY ACTIVE P2Y(12) ADP RECEPTOR." *British Journal of Clinical Pharmacology* 68 (October): 11–11.
10. Rauch, B.H., A.C. Rosenkranz, S. Ermler, **A. Böhm**, J. Driessen, J. W. Fischer, A. Sugidachi, J. A. Jakubowski, and K. 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* 30 (12) (December): 2434–U199. doi:10.1161/ATVBAHA.110.213702.
11. Rauch, S.J. A.C. Rosenkranz, **A. Böhm**, J. Meyer-Kirchrath, T. Hohlfeld, Karsten Schrör, and B.H. Rauch. 2011. "Cholesterol Induces Apoptosis-associated Loss of the Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) in Human Monocytes." *Vascular Pharmacology* 54 (3-6) (June): 93–99. doi:10.1016/j.vph.2011.03.004.
12. Rosenkranz, A.C., B.H. Rauch, A. Doller, W. Eberhardt, **A. Böhm**, E. Bretschneider, and K. Schrör. 2011. "Regulation of Human Vascular Protease-Activated Receptor-3 through mRNA Stabilization and the Transcription Factor Nuclear Factor of Activated T Cells (NFAT)." *Molecular Pharmacology* 80 (2) (August): 337–344. doi:10.1124/mol.111.072850.
13. Ulrych, T., **A. Böhm**, A. Polzin, G. Daum, R. M. Nuesing, G. Geisslinger, T. Hohlfeld, K. Schrör, and B.H. Rauch. 2011. "Release of Sphingosine-1-phosphate from Human Platelets Is Dependent on Thromboxane Formation." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 9 (4) (April): 790–798. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04194.x.

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Bernhard Rauch danke ich herzlich für die Überlassung dieses interessanten Themas, die anregenden Diskussionen, Ratschläge und Hilfestellungen, die zur Erstellung dieser Arbeit führten. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme an verschiedenen Kongressen und die damit verbundene Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Joachim Ernst danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich herzlich für die stets freundliche Unterstützung in fachlichen Fragen.

Frau Petra Kruger danke ich für die hervorragende methodische Unterstützung und Hilfe bei der Planung verschiedener Versuchsvorhaben.

Frau Kerstin Freidel danke ich besonders für ihre freundliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor.

Frau Bärbel Reupert möchte ich besonders für die Unterstützung im Bereich Genotypisierung danken und das stets offene Ohr bei Problemen aller Art.

Frau Beate Weyrauther danke ich für die Hilfe bei Zellkulturexperimenten und ihre fortwährende Unterstützung bei der Versorgung mit Zellen.

Frau Erika Lohmann und Frau Karin Montag möchte ich für Ihre Geduld und freundliche Unterstützung bei organisatorischen Dingen aller Art danken.

Allen hier nicht namentlich erwähnten Kollegen danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, selbst in stressigen Zeiten, die immerwährende Hilfsbereitschaft und die diversen lustigen Abende außerhalb des Labors.

Spezieller Dank gebührt meiner Mutter für ihre Geduld, Hilfe und die Versorgung mit Hilfspaketen, ohne die ich sicherlich verhungert wäre.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

10. Eidesstattliche Erklärung

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

Greifswald, 28.08.2013

Lebenslauf

Andreas Böhm

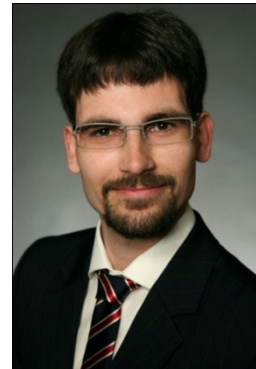
Diplom Biologe

Lange Reihe 30b

17489 Greifswald

Telefon: 017634991860

Andreas.Boehm@uni-duesseldorf.de



Persönliche Daten

Geburtsdatum	11.03.80
Geburtsort	Rathenow
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

Promotion

08/2007-08/2013 Anfertigung der Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) an den Medizinischen Hochschulen Düsseldorf (08/2007-08/2011) und Greifswald (08/2011-08/2013) Abteilung Pharmakologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rauch

Studium

10/1999-11/2005 Diplomstudiengang Biologie an der Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald mit den Schwerpunkten:

- Zoologie
- Mikrobiologie
- Genetik

05/2005-11/2005 Anfertigung der Diplomarbeit „Auf- und Abbau des Zellzyklus-Regulatorproteins p27^{Kip1} der Enten-Nasendrüse.“ an der Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald in der Biologie, Abteilung Physiologie und Biochemie der Tiere, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hildebrandt

Schulabschluss

Lebenslauf

1998 Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Barth

Nebentätigkeiten

01/2006-07/2007 **Nachhilfelehrer mit den Schwerpunkten Biologie und Englisch**

03/2004-05/2005 **Institut für Zoologie, Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald**

Studentische Hilfskraft mit den Aufgaben

- Praktikumsbetreuung physiologisches Grundpraktikum
- Praktikumsbetreuung physiologisches Fortgeschrittenenpraktikum

Sprachen

Englisch fließend

PC-Kenntnisse

fundierte Kenntnisse im Umgang mit **MS Office** (Word, Excel, Powerpoint) und anderen gängigen **PC Programmen** (u.a. Adobe Photoshop)

fundierte Kenntnisse im Umgang mit **Graph Pad Prism**

fundierte Kenntnisse im Umgang mit **T-Base**

umfassende Kenntnisse im Umgang Software zu diversen Geräten u.a. Zeiss AxioVision, Zeiss Robo Palm, Biorad Quantity one, Applied Biosystems SDS

Methodenspektrum

Zellkulturmethoden

Isolation und Kultivierung primärer Zellen (u.a. vaskuläre und aortale glatte Gefäßmuskelzellen, mononukleäre Zellen aus Maus und Mensch)

Kultivierung und Transfektion verschiedener Zelllinien (u.a. HL-1, U937, HEK, HELA, T17b, 293, primäre Muskelzellen)

Migrationsassays (Boyden Chamber, Scratch Assay)

Proliferationsassays (BRDU, Tritiumthymidin)

Viabilitätsassays

Lebenslauf

Immunhistochemische Färbungen primärer Zellen, Zelllinien

Proteinbiochemische Methoden

Herstellung von Proteinextrakten, Proteinbestimmung, SDS-PAGE mit nachfolgendem Western-Blot,

Arbeiten mit Blut, Isolation von Thrombozyten, Aggregometrie

Aufarbeitung von Patientenmaterial (Carotisplaques)

Molekularbiologische Methoden

Real-Time Quantitative PCR, PCR, Klonieren und allgemeines Arbeiten mit RNA und DNA

Histologische und immunhistochemische Methoden

Anfertigen von Paraffinschnitten und in OCT eingebettetes Gewebe am Cryotom,

Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Öl-Rot-O Färbung, verschiedene immunhistochemische Färbungen (u.a. CD45, CD42, Caspase, Nf- κ B, α SMC, Smoothelin, SPHK1 u.a.)

Anfertigung von Bildern am Fluoreszenzmikroskop, Hell-Feldmikroskop und

Polarisationsmikroskop und deren Auswertung

Arbeiten mit Versuchstieren

Überwachung und Organisation von Mauszuchten, Markieren und Genotypisieren von Mäusen, Injektionen, Organentnahme,

OP-Techniken (Carotis-Ligatur), physiologische Analysen (Blutungszeitanalysen)