

**Thrombin-aktivierte Signalwege in humanen
glatten Gefäßmuskelzellen und deren Modifikation
durch Iloprost**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

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

vorgelegt von

Robert Pape

aus Düsseldorf

Düsseldorf 2004

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

Referent: Prof. Dr. Karsten Schrör

Koreferent: Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2004

Abkürzungsverzeichnis

μCi	Mikrocurie
μM	Mikromolar (μmol/l)
Abb.	Abbildung
AM	Arteria mammaria interna
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
cDNA	<i>copy</i> -DNA
cpm	<i>counts per minute</i>
cRNA	<i>copy</i> -RNA
DEPC	Diethyl-pyrocbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2-Desoxy-Ribonukleotidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	Extracellular-signal regulated protein kinase
FCS	fötales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FXa	aktivierter Faktor X
GAPDH	Glycerol Aldehyd Phosphat Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HB-EGF	<i>heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor</i>
HBSS	Hanks' Salzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyl-ethyl-piperazin-N'-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IBMX	Isobutylmethylxanthin
IP-R	Prostacyclin-Rezeptor

IVT	<i>in vitro</i> -Transkription
K _D	Dissoziationskonstante
KON	Kontrolle
M	Molar (mol/l)
m/v	Gewichtsprozent
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MEK3	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase Kinase 3
MES	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
mM	Millimolar (mmol/l)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-2	Plasminogen-Aktivator Inhibitor 2
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PGI ₂	Prostacyclin
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-myristat-acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIA	Radioimmuno-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunden
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SMC	glatte Gefäßmuskelzelle
SSPE	Natriumchlorid-Natriumphosphat-EDTA
Tab.	Tabelle
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Triton™ X-100	o-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenyl]-deca(oxyethylen)
Tween™ 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
VS	Vena saphena

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Problematik der Restenose	1
1.1.1	Hintergrund	1
1.1.2	Pathogenese	2
1.1.3	Unterschiede Arterien – Venen	3
1.2	Thrombin	5
1.2.1	Zelluläre Wirkungen	5
1.2.2	Protease-aktivierte Rezeptoren	7
1.2.3	Signaltransduktion	10
1.2.4	Sekundäre Mediatorfreisetzung	12
1.3	Prostacyclin	14
1.4	Zusammenfassung und Fragestellung	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Puffer und Lösungen	19
2.2	Substanzen	20
2.3	Antikörper	21
2.4	Zellkultur	21
2.4.1	Isolation und Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen	21
2.5	Präparation und Analyse von RNA	22
2.5.1	Präparation von Gesamt-RNA aus SMCs	22
2.5.2	Quantifizierung von RNA	23
2.5.3	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	23
2.5.4	Visualisierung und densitometrische Auswertung von RT-PCRs	24
2.6	Microarray-Analyse	25
2.6.1	Übersicht	25
2.6.2	RNA-Präparation	26
2.6.3	cDNA-Synthese	27
2.6.4	Aufreinigung der cDNA	27
2.6.5	<i>in vitro</i> -Transkription	27
2.6.6	Aufreinigung der cRNA	28

2.6.7	cRNA-Fragmentierung	28
2.6.8	Hybridisierung der Arrays	28
2.6.9	Waschen und Färben	29
2.6.10	Auswertung	30
2.6.11	Vergleichende Genexpressions-Analyse	31
2.7	Analyse von Proteinen	32
2.7.1	Western Blot-Verfahren	32
2.7.1.1	Isolierung von Proteinen aus SMCs	32
2.7.1.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.7.1.3	Proteintransfer	32
2.7.1.4	Antikörper-Hybridisierung und Detektion	32
2.7.1.5	Prüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung	33
2.7.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	33
2.8	Zymographie	34
2.8.1	Prinzip und Probenvorbereitung	34
2.8.2	Auftrennung der Enzyme durch SDS-PAGE	34
2.8.3	Aktivitätsnachweis durch Gelatine-Abbau	34
2.9	Bestimmung intrazellulärer Calcium-Transienten	35
2.9.1	Kultivierung der Zellen und Beladung mit Fluo-3-AM	36
2.9.2	Fluoreszenzmikroskopie	36
2.9.3	Auswertung	37
2.10	Messung der DNA-Syntheserate	37
2.11	Bestimmung der Zellmigration	38
2.12	cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP)-Bestimmung	39
2.13	Statistik	39
3	ERGEBNISSE	40
3.1	Expression von Thrombin-Rezeptoren in arteriellen und venösen SMCs	40
3.1.1	Vergleich der basalen Expression	40
3.1.2	Regulation durch Thrombin und FXa	41
3.2	Thrombin-Rezeptor-vermittelte Signale	42
3.2.1	Einfluss PAR-aktivierender Peptide (AP) auf die HB-EGF-Genexpression	43
3.2.2	Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase 2 durch PAR-AP	43
3.2.3	Beteiligung von G _i -Proteinen	45
3.3	Funktionelle Bedeutung von HB-EGF für Thrombin- und FXa-Wirkungen	47

3.3.1	DNA-Synthese	48
3.3.2	Zellmigration	49
3.3.3	Signaltransduktion (ERK-1/2-Phosphorylierung)	49
3.4	Untersuchungen zum Mechanismus der HB-EGF-Transkription	52
3.4.1	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit	52
3.4.2	Einfluss von Actinomycin-D auf die Thrombin-induzierte HB-EGF-Expression	53
3.4.3	Beteiligung mitogener Post-Rezeptor-Signaltransduktionswege	54
3.4.3.1	PLC-/ Calcium-/ PKC-Weg	54
3.4.3.2	p42/44-MAPK-Weg	56
3.4.3.3	p38-MAPK-Weg	56
3.4.3.4	PI3-Kinase-Weg	57
3.5	Microarray-Analysen mit Thrombin und FXa in venösen SMCs	59
3.5.1	Vergleichende Genexpressionsanalyse	59
3.5.2	Verifizierung der Array-Daten mittels RT-PCR-Analyse	64
3.5.2.1	<i>Fibroblast growth factor 5</i> (FGF-5)	64
3.5.2.2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 3</i> (MEK-3)	66
3.5.2.3	<i>Plasminogen activator inhibitor 2</i> (PAI-2)	67
3.6	Regulation Thrombin-vermittelter Signale durch Iloprost in arteriellen und venösen SMCs	69
3.6.1	Einfluss von Iloprost und Forskolin auf die PAR-1- und PAR-3-Expression	70
3.6.2	Effekte von Iloprost auf die Thrombin-vermittelte Aktivierung intrazellulärer Signalwege	72
3.6.2.1	MAPK- und PI3-Kinase/Akt-Weg	72
3.6.2.2	Calcium-/ PKC-Weg	73
3.6.3	Einfluss von Iloprost auf die Thrombin-induzierte HB-EGF-Genexpression	75
3.6.4	Bedeutung des cAMP/PKA-Weges für die Iloprost-mediierte Hemmung der Thrombin-induzierten HB-EGF-Genexpression	76
3.6.4.1	Einfluss von IBMX und db-cAMP	76
3.6.4.2	IP-Rezeptor-Expression	77
3.6.4.3	Intrazelluläre cAMP-Erhöhung und VASP-Phosphorylierung durch Iloprost	77
3.6.4.4	Einfluss von Iloprost und Forskolin auf die HB-EGF-Genexpression	77
4	DISKUSSION	79
4.1	Expression und Regulation von Thrombin-Rezeptoren	79
4.2	Bedeutung von HB-EGF für die Vermittlung von Thrombin-Wirkungen	82

4.3	Genexpressionsanalysen mit Thrombin und FXa	88
4.4	Modifikation von Thrombin-Signalen durch Iloprost	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	97
6	LITERATURVERZEICHNIS	98
7	VERÖFFENTLICHUNGEN	117
8	DANKSAGUNG	119
9	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	120
10	LEBENS LAUF	121

1. Einleitung

1.1 Problematik der Restenose

1.1.1 Hintergrund

Revaskularisierungen in Form autologer aortokoronarer Bypass-Operationen zur Behandlung ischämischer Herzkrankheiten zählen heute zu den wichtigsten Routineeingriffen in der kardiovaskulären Chirurgie. Die erste Operation dieser Art an einem Menschen wurde im Februar 1964 in Leningrad unter Verwendung der linken Arteria mammaria interna (AM) von Dr. Vasilii Kolessov durchgeführt (Kolessov, 1967). Wenig später gelang Garret und Kollegen (1973) unter Verwendung der Vena saphena (VS) die Implantation des ersten venösen Bypasses. Beide Gefäße werden nach wie vor bevorzugt verwendet und es besteht kein Zweifel daran, dass die Methode bei den meisten Patienten, zumindest initial, die Symptomatik deutlich verbessert und die Lebenserwartung erhöht.

Bei einer Vielzahl der Patienten kommt es allerdings innerhalb kurzer Zeit zu einem erneuten Verschluss (Restenose) des implantierten Präparates (Campeau et al., 1984). Innerhalb des ersten Jahres nach Operation zeigen bis zu 15 % der venösen Gefäße eine Restenose, die Offenwahrscheinlichkeit nach 10 Jahren beträgt etwa 60 %, wobei nur etwa 50 % dieser offenen Gefäße frei von einer signifikanten Stenose sind (Bourassa, 1991; Fitzgibbon et al., 1996). Ein erneuter Eingriff ist bei etwa 19 % der Patienten nach 10 Jahren unumgänglich (Weintraub et al., 1994).

Unter den nicht-operativen Verfahren findet zunehmend die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) Anwendung bei der Therapie von Gefäßstenosen. Bei dieser komplikations- und letalitätsarmen Methode werden Koronararterien durch Einführen eines Ballon-Katheters aufgeweitet (Rutsch et al., 2002). Zwar wird dem Verfahren eine initiale Erfolgsquote von etwa 95 % bescheinigt (Hombach et al., 1995), bei 30 – 40 % der erfolgreich behandelten Patienten zeigte sich dennoch innerhalb von 3 – 6 Monaten eine erneute Stenosierung (definiert als Durchmesserenge von mehr als 50 %), die in 20 – 25 % der Fälle eine Wiederholungsbehandlung notwendig machte (Cameron et al., 1994).

Nahezu jede perkutane Intervention wird daher heute zusätzlich mit einer Stent-Implantation durchgeführt (Al Suwaidi et al., 2000). Stents sind netz- oder spiralförmige, endoluminale Gefäßprothesen, die der Abstützung und der Sicherung der Durchgängigkeit des Blutgefäßes nach PTCA dienen. Stent-behandelte Koronararterien weisen gegenüber rein Ballon-dilatierten Gefäßen eine signifikant niedrigere Restenosierungsrate auf (Mintz et al., 1997),

die sich insbesondere durch eine geringere Anzahl koronarchirurgischer Notfall-Versorgungen manifestiert. Trotz dieser Überlegenheit sind mit der zunehmenden Verwendung von Stents neue Probleme entstanden, einerseits die erhöhte Thrombogenität, und andererseits die Stenosierung innerhalb des Stents (In-Stent-Restenose), deren Behandlung besondere Anforderungen stellt (Rutsch et al., 2002). Während die Inzidenz subakuter In-Stent-Thrombosen durch eine geeignete Medikation und schonende Implantationstechniken von anfänglich 40 % (Sigwart et al., 1987) auf unter 1 % gesenkt werden konnte (Edelman und Rogers, 1998), bereiten die In-Stent-Restenose und deren Konsequenzen nach wie vor große Probleme im klinischen Alltag.

1.1.2 Pathogenese

Für die Entstehung der Restenose nach Bypass-Operation sind drei zeitlich aufeinanderfolgende, distinkte Vorgänge verantwortlich: intravaskuläre Thrombosierung, intimale Hyperplasie und Atherosklerose (Motwani und Topol, 1998). Vor allem innerhalb des ersten Monats nach Intervention sind bei 3 – 12 % der Patienten thrombotische Gefäßverschlüsse für ernste Komplikationen verantwortlich (Cox et al., 1991). Als Ursache ist zum einen die Beschädigung und der Verlust des Endothels anzusehen, was zur Adhäsion von Thrombozyten und Neutrophilen führt, auf der anderen Seite kommt es gleichzeitig zur Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade durch den Tissue-Faktor, der in der Adventitia konstitutiv exprimiert wird (Verrier und Boyle, Jr., 1996). Die in großer Menge gebildeten Gerinnungsfaktoren führen nach Aktivierung schließlich zur Akkumulation von Fibrin auf der Gefäßoberfläche. Sehr frühe Untersuchungen haben gezeigt, dass Blut von Bypass-Patienten, die einen Gefäßverschluss aufwiesen, hyperkoagulatorische Eigenschaften besitzt, die unter anderem auf vergleichsweise hohe Thrombin-Konzentrationen im Plasma und eine niedrige Antithrombin-Aktivität zurückzuführen waren (Zajtchuk et al., 1977).

Als Hauptursache für Gefäßverschlüsse zwischen einem Monat und einem Jahr nach Operation gilt die intimale Hyperplasie, die definiert ist als eine Akkumulation glatter Gefäßmuskelzellen (SMCs) und extrazellulärer Matrix (ECM) im intimalen Kompartiment (Davies und Hagen, 1995). SMCs regulieren normalerweise den Tonus des arteriellen sowie venösen Gefäßbettes und befinden sich beim Gesunden ausschließlich im Bereich der Media, der mittleren der drei Gefäßwandschichten. Sie sind dort von einer dreidimensionalen Bindegewebs-Matrix umgeben, deren strukturelle Zusammensetzung maßgeblich die funktionellen Eigenschaften der intakten Gefäßwand bedingt. Unter pathologischen Bedingungen kommt es, in Folge der akuten Gefäßwandschädigung und einer endothelialen

Dysfunktion, zu einer Exposition subendothelialer Zellen gegenüber aktivierten Gerinnungsfaktoren, lokal gebildeten Wachstumsfaktoren und weiteren plasmatischen Mitogenen, die in erster Linie von Thrombozyten und aktivierten Makrophagen freigesetzt werden. Es kommt zum Wechsel des medialen glattmuskulären Phänotyps von einem differenzierten "kontraktilen" zu einem dedifferenzierten "synthetischen" Phänotyp, der vor allem durch seine sekretorisch-proliferierenden Eigenschaften gekennzeichnet ist (Bauriedel et al., 1994). Dieser Phänotyp bildet vermehrt Wachstumsfaktoren, wie z.B. *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder *basic fibroblast growth factor* (bFGF, FGF-2), und exprimiert Rezeptoren für diese Wachstumsfaktoren auf der Zelloberfläche. Neben der SMC-Proliferation kommt es zur Migration medialer SMCs in den Bereich der Intima und zu umfangreichen Strukturveränderungen in der ECM. Dedifferenzierte SMCs exprimieren Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die zum Abbau der ECM und ebenfalls zur Zellmigration beitragen. Gleichzeitig synthetisieren und sezernieren sie eine Reihe neuer ECM-Bestandteile, wie z.B. Kollagene und diverse Proteoglykane (Jacob et al., 2001). Die Konsequenz der dargestellten Prozesse ist eine massive Störung des dreischichtigen Wandaufbaus, die letztendlich zur progressiven Ausbildung einer Neo-Intima führt. Im Falle einer unkontrollierten SMC-Proliferation, -Migration und Matrixdeposition kann dies eine erneute Stenosierung des Gefäßes zur Folge haben (Cox et al., 1991; Dilley et al., 1992; Allaire et al., 1997).

Ähnliche Wundheilungsvorgänge sind auch nach Ballonkatheter-Intervention zu beobachten (Schwartz und Henry, 2002). Klinische Studien konnten zeigen, dass, im Falle einer Restenose nach PTCA, die vermehrt gebildete Matrix mit einem Volumenanteil von mehr als 50 % zur Entstehung der Läsion beiträgt (Faxon et al., 1997). Die In-Stent-Restenose ist dagegen in erster Linie die Folge einer sehr ausgeprägten SMC-Hyperplasie (Holmes, Jr., 2001).

1.1.3 Unterschiede Arterien - Venen

Der langfristige Erfolg einer koronaren Bypass-Operation hängt, neben der Operationstechnik, stark vom Ursprung des verwendeten Bypassgefäßes ab, wobei ein arterielles Präparat in Bezug auf die Überlebensrate, das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse und die Langzeit-Durchgängigkeit gegenüber dem venösen Bypass nachgewiesenermaßen deutliche Vorteile besitzt. Eine 1996 veröffentlichte Studie konnte diesbezüglich zeigen, dass Patienten, die einen arteriellen Bypass (AM) erhielten, 15 Jahre nach dem Eingriff ein geringeres relatives Mortalitätsrisiko gegenüber Patienten mit venösem Bypass (VS)

aufwiesen (Cameron et al., 1996). Die Vorteile bei der Überlebensrate wurden mit zunehmender Zeit immer deutlicher, was darauf hindeutet, dass hier insbesondere die initiale Auswahl des verwendeten Gefäßes von entscheidender Bedeutung zu sein scheint, und weniger die Progression der Atherosklerose, d.h. der koronaren Herzkrankheit. Die günstigeren Eigenschaften des arteriellen Bypasses lassen sich dabei unabhängig von Alter und Geschlecht darstellen (Loop, 1996).

Es wird heute davon ausgegangen, dass das schlechtere Abschneiden des venösen Bypasses auf eine Reihe grundlegender Unterschiede in Bezug auf anatomisch-histologische und physiologisch-biochemische Eigenschaften zwischen beiden Präparaten zurückzuführen ist (Cox et al., 1991). Hierzu zählen unter anderem eine gewisse Resistenz von AM-Präparaten hinsichtlich der Bildung atherosklerotischer Plaques, eine vermehrte Freisetzung antithrombotischer und vasoaktiver Substanzen (z.B. Prostacyclin), eine erhöhte Sensitivität gegenüber diesen Substanzen, und eine geringere Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (Cox et al., 1991; Nguyen et al., 1994). Neben diesen differentiellen intrinsischen Eigenschaften werden auch unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber der chirurgischen Präparation diskutiert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass bereits eine durch chirurgische Manipulation ausgelöste Gefäßverletzung zu einer Änderung des medialen glattmuskulären Phänotyps führte (Johnson et al., 2001). Schon früh konnte gezeigt werden, dass präparierte Venen im Vergleich zu Arterien eine deutlich stärkere Neointima-Bildung und SMC-Proliferation aufwiesen (Holt et al., 1993). Weitere Arbeiten belegen ebenfalls ein differentielles Proliferationsverhalten der aus beiden Gefäßtypen isolierten SMCs (Dethlefsen et al., 1996; Yang et al., 1998b; Waybill und Hopkins, 1999). Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind bis heute allerdings noch immer unklar.

1.2 Thrombin

Thrombin (EC 3.4.21.5) besitzt die Funktion eines intermediären Schlüsselenzyms für die Blutgerinnung und für die natürliche Wundheilung, und gilt als einer der wohl am besten charakterisierten Faktoren, denen eine Bedeutung bei pathophysiologischen Prozessen nach Gefäßverletzung beigemessen wird (Harker et al., 1995; Patterson et al., 2001).

Thrombin wird im kardiovaskulären System in erster Linie auf der Oberfläche zirkulierender Thrombozyten durch die proteolytische Aktivierung seines Zymogens Prothrombin (Faktor II) gebildet. Diese Reaktion wird in der Gerinnungskaskade wiederum durch den aktivierten Faktor X (FXa) und dessen Kofaktor Va katalysiert. Als Serin-Protease ist Thrombin in der Lage, Fibrinogen zu Fibrin zu spalten. Dies stellt den finalen Vorgang bei der Koagulation dar und führt zur Bildung der fibrösen Matrix eines Blutgerinnsels (Davie et al., 1991). Das Ausmaß und die Geschwindigkeit der plasmatischen Thrombin-Bildung ist zusätzlich von weiteren Faktoren abhängig, wie z.B. der Verfügbarkeit der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa, oder von der Adsorption an Phosphatidylserin-Membranstrukturen (Hemker und Beguin, 1995). Zusätzlich wird die Thrombin-Bildung auch durch eine Reihe antikoagulatorischer Mechanismen kontrolliert. So initiiert unter anderem die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin die Aktivierung von Protein C, das wiederum, über eine Komplexierung von Protein S und nachfolgender Inaktivierung des FXa-Kofaktors Va, die Thrombin-Bildung hemmen kann (Esmon, 1989). Thrombin ist auch ein potenter Aktivator der Thrombozytenaggregation (Davey und Lüscher, 1967), und *in vivo*-Studien konnten anhand verschiedener Gefäßverletzungsmodelle zeigen, dass die direkte (Hirudin, Hirulog) oder auch indirekte (FXa-Hemmung) Inaktivierung von Thrombin, oder die Hemmung der Thrombin-Rezeptor-Funktion, wirksam die arterielle Thrombus-Bildung verhindert (Übersicht in Harker, 1998).

1.2.1 Zelluläre Wirkungen

Neben dieser zentralen Funktion bei der intravaskulären Thrombosierung besitzt Thrombin weitere wichtige Funktionen in der vaskulären Biologie (Patterson et al., 2001). Thrombin kann direkte Wirkungen auf eine Reihe von Zelltypen ausüben, denen eine elementare Bedeutung bei der systemischen Antwort auf einen Gefäßschaden beigemessen wird. Die Gruppe solcher Zielzellen umfasst neben Mono- und Leukozyten vor allem Endothelzellen sowie subendothelial gelegene Fibroblasten und SMCs (Fager, 1995). Viele der in diesen Zellen ausgelösten Effekte, wie z.B. Proliferation, Migration und Differenzierung, stehen im

Einklang mit der primären Funktion des Thrombins für die Wundheilung und Revaskularisierung (Carney et al., 1992).

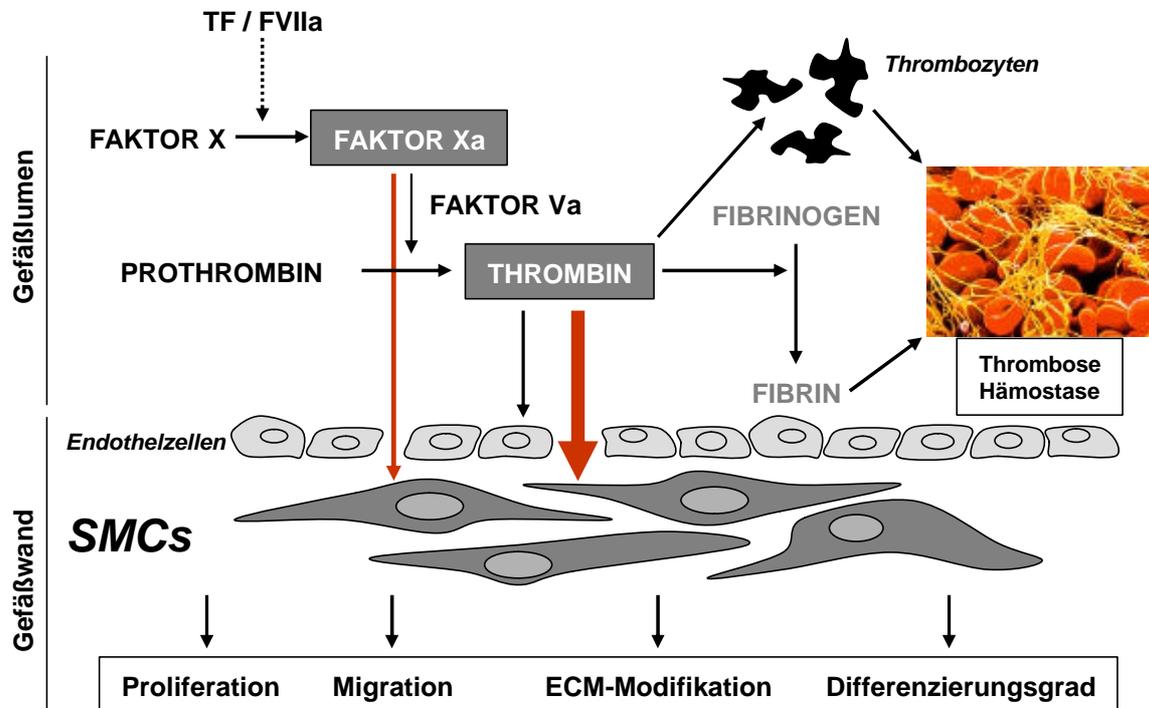


Abbildung 1

Schematische Darstellung der intravaskulären Bildung von Thrombin und dessen thrombotischen und zellulären Wirkungen im kardiovaskulären System. SMCs = Glatte Gefäßmuskelzellen; ECM = Extrazelluläre Matrix; TF/FVIIa = Tissue-Faktor / Faktor VIIa.

Im Mittelpunkt des Interesses stehen heute insbesondere die Wirkungen des Thrombins auf die glatte Muskulatur. Bereits früh konnte gezeigt werden, dass Thrombin ein potentes Mitogen für SMCs *in vitro* darstellt (Bar-Shavit et al., 1990; Kanthou et al., 1992). Ein mittlerweile großes Studienkollektiv weist auf die Beteiligung von Thrombin bei der Proliferation von SMCs und der Neointimabildung *in vivo* hin (Übersicht in Patterson et al., 2001). Thrombin kann innerhalb der Gefäßwand, z.B. im Bereich atherosklerotischer Läsionen, nachgewiesen werden (Smith et al., 1996), wo es durch die subendotheliale Matrix immobilisiert und unter Erhaltung seiner funktionellen Aktivität geschützt vor Inaktivierung durch Antithrombin vorliegt (Bar-Shavit et al., 1989). Unter diesen Bedingungen muss daher von einer sehr langen Exposition vaskulärer Zellen gegenüber hohen lokalen Thrombin-Konzentrationen *in vivo* ausgegangen werden.

Nach dem heutigen Stand der Erkenntnisse wird für die Entfaltung mitogener Thrombin-Wirkungen die proteolytische Aktivität des Gerinnungsfaktors benötigt (McNamara et al., 1993). Als chemotaktischer Faktor stimuliert Thrombin ebenfalls die Migration von SMCs (Noda Heiny und Sobel, 1995; Seasholtz et al., 1999; Wang et al., 2004), fördert die Akkumulation von ECM (Dabbagh et al., 1998) und aktiviert Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die den Abbau/Umbau der ECM steuern und wahrscheinlich ebenfalls zur Entwicklung vaskulärer Läsionen beitragen (Galis et al., 1997; Oak et al., 2004). SMCs sind auch selbst in der Lage, durch Spaltung von Prothrombin proteolytisch aktives Thrombin zu generieren (Benzakour et al., 1995). Des Weiteren ist die Thrombin-Bildung auch in apoptotischen SMCs beobachtet worden (Flynn et al., 1997), welche sich nach einer Ballon-Dilatation innerhalb sehr kurzer Zeit in der Media nachweisen lassen (Perlman et al., 1997). Die lokale glattmuskuläre Thrombin-Bildung kann demnach die Progression einer Atherosklerose zusätzlich beeinflussen.

Auch FXa besitzt in diesem Zusammenhang eine Reihe interessanter biologischer Wirkungen auf vaskuläre Zellen, die im Vergleich zum Thrombin allerdings schlechter charakterisiert sind. Zusätzlich zu seiner Bedeutung als Koagulationsfaktor ist FXa ebenfalls ein potentes Mitogen (Gasic et al., 1992; Herbert et al., 1998) und ein potenter chemotaktischer Faktor für SMCs (Sato et al., 1997). FXa ist in der Lage, die sekundäre Mediatorfreisetzung (Ko et al., 1996; Koo und Kim, 2003) und die Aktivierung von MMPs (Rauch et al., 2002) zu stimulieren. Darüber hinaus konnte seine Bedeutung für die Entstehung der Restenose gezeigt werden (Ragosta et al., 1994). Aufgrund der vielen Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Aktivierungsbedingungen und der zellulären Effekte ergibt sich ein erhebliches Potential synergistischer Wirkungen von Thrombin und FXa *in vivo*.

1.2.2 Protease-aktivierte Rezeptoren

Die initiale Beobachtung, dass Thrombin eine Reihe direkter Wirkungen auf Zellen der Gefäßwand besitzt, deutet auf die Existenz Rezeptor-vermittelter Vorgänge hin. Die bis heute identifizierten Thrombin-Rezeptoren gehören zur Gruppe der Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs), die Mitglieder der G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR)-Familie sind (Coughlin, 1999). Von den mittlerweile 4 bekannten PAR-Subtypen werden der PAR-1 (Abb. 2), der PAR-3 und der PAR-4 durch Thrombin aktiviert. Der vierte Rezeptor (PAR-2) wird nicht durch Thrombin aktiviert, dient allerdings als Rezeptor für weitere Proteasen, wie z.B. Trypsin oder FXa (O'Brien et al., 2001). Für die Spezifität ist jeweils eine Erkennungssequenz am Amino-terminalen extrazellulären Ende verantwortlich.

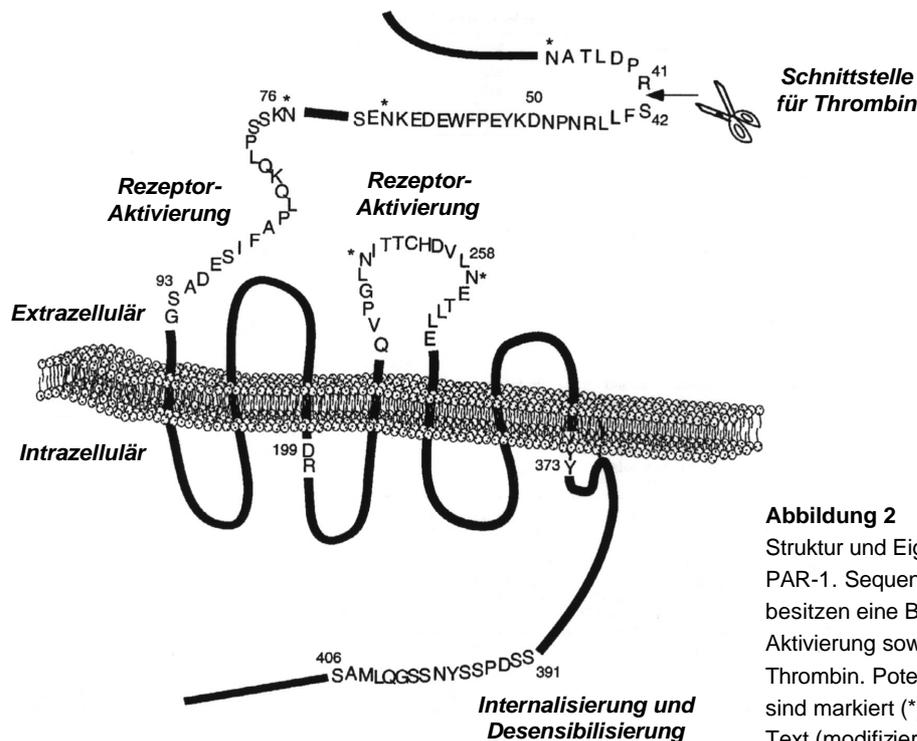


Abbildung 2

Struktur und Eigenschaften des humanen PAR-1. Sequenziert dargestellte Bereiche besitzen eine Bedeutung bei der Rezeptor-Aktivierung sowie für Interaktionen mit Thrombin. Potentielle Glykosylierungstellen sind markiert (*). Weitere Erklärungen siehe Text (modifiziert nach O'Brien et al., 2001)

Ein charakteristisches Merkmal der PAR-Familie ist der außergewöhnliche Rezeptor-Aktivierungsmechanismus. Anders als bei den meisten GPCRs besitzen PARs einen in den verlängerten N-Terminus integrierten intrinsischen Liganden. Nach proteolytischer Spaltung des N-Terminus durch Thrombin oder andere Serin-Proteasen entsteht ein neuer, verkürzter N-Terminus, der als *tethered ligand* („angebundener Ligand“) bezeichnet wird und nach intramolekularer Bindung für die Aktivierung des Rezeptors verantwortlich ist (Abb. 3). Unter Berücksichtigung dieses Mechanismus lässt sich die proteolytische Aktivierung der einzelnen PAR-Subtypen durch kurze Peptide imitieren, deren Sequenz der des angebundenen Liganden am N-Terminus entspricht. PARs können demnach auch als Peptid-Rezeptoren bezeichnet werden, die ihren eigenen Liganden tragen. Eine Übersicht über die einzelnen PAR-Subtypen und die Aminosäure-Sequenzen der entsprechenden selektiven PAR-aktivierenden Peptide (PAR-AP) ist in Tab. 1 dargestellt.

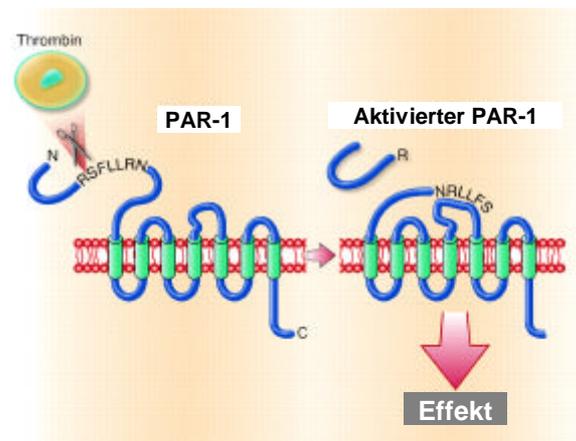


Abbildung 3

Mechanismus der PAR-1-Aktivierung durch Thrombin (nach Coughlin und Camerer, 2003)

Tabelle 1: Übersicht über die in vaskulären Zellen identifizierten Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR). PAR-AP = PAR-aktivierendes Peptid (modifiziert nach O'Brien, 2001)

Rezeptor	Aktivierende Protease	Peptid-Agonist (PAR-AP)	Chromosom
PAR-1	Thrombin Trypsin FXa	SFLLRN TFLLRN	5q13
PAR-2	Trypsin Tryptase FXa	SLIGKV SFLLRN	5q13
PAR-3	Thrombin	TFRGAP	5q13
PAR-4	Thrombin Trypsin Cathepsin G	AYPGKF (human) GYPGKF (murin)	19p12

Neben den Gemeinsamkeiten in Bezug auf den Aktivierungsmechanismus besteht ein wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen PARs hinsichtlich der jeweiligen Affinität gegenüber Thrombin. Während der PAR-1 und der PAR-3 diesbezüglich ähnliche Konzentrations-Wirkungs-Kurven aufweisen, werden, zumindest in Abwesenheit weiterer PARs, für die Aktivierung des PAR-4 etwa 10- bis 100-fach höhere Thrombin-Mengen benötigt (EC_{50} Thrombin-PAR-1: 50 pM; Thrombin-PAR-4: 5 nM) (O'Brien et al., 2001). In Anwesenheit des PAR-3 sind zur Aktivierung des PAR-4 auch geringere Thrombin-Konzentrationen ausreichend, da der PAR-3 in Form eines Thrombin-gebundenen Komplexes als Kofaktor für die proteolytische Transaktivierung des PAR-4 diskutiert wird (Nakanishi-Matsui et al., 2000).

In Analogie zu anderen GPCRs werden auch PARs nach erfolgter Aktivierung relativ schnell entkoppelt und durch einen Phosphorylierungs-abhängigen Mechanismus desensibilisiert (Brass, 1992; Ishii et al., 1994). Diese Inaktivierung ist, unter Berücksichtigung des speziellen Aktivierungsmechanismus, von besonderer Bedeutung, da der irreversibel demaskierte Ligand am aktiven Zentrum des Rezeptors verbleibt, so dass eine langandauernde Rezeptor-Stimulation die Folge wäre. Im Zuge der homologen Desensibilisierung kommt es nach endozytotischer Internalisierung zur lysosomalen Degradation des Rezeptors (Hoxie et al., 1993; Shapiro et al., 1996), so dass für erneute PAR-vermittelte Wirkungen die Neusynthese des Proteins erforderlich ist. In Endothelzellen und Fibroblasten konnte allerdings auch gezeigt werden, dass der PAR-1 sowohl auf der Zelloberfläche als auch in beträchtlicher Menge in intrazellulären Speichern vorhanden ist (Hein et al., 1994; Storck et al., 1997). Dies

könnte möglicherweise zu einer schnelleren Resensibilisierung beitragen (Woolkalis et al., 1995; Storck und Zimmermann, 1996).

Auf der Rezeptor-Ebene ist bislang wenig bekannt über die Vermittlung von Thrombin-Wirkungen in SMCs, insbesondere welche der drei PARs involviert sind, und ob deren Expression durch Thrombin selber beeinflusst wird. Dabei müssen vor allem die eingangs erwähnte lange Exposition gegenüber Thrombin *in vivo* und auch synergistische Effekte mit anderen Koagulationsfaktoren, z.B. FXa, berücksichtigt werden. Frühere Untersuchungen konnten bereits die Expression funktionell aktiver PAR-1 (Kanthou et al., 1995b), PAR-3 (Bretschneider et al., 2003) und PAR-4 (Bretschneider et al., 2001) in humanen venösen SMCs nachweisen.

1.2.3 Signaltransduktion

Die Stimulation von PARs durch Thrombin führt zur Konformationsänderung des Rezeptors und schließlich zur Aktivierung multipler G-Protein-abhängiger Signalwege (Macfarlane et al., 2001). Die heutigen Kenntnisse über diese nachgeschalteten Wege sind vor allem das Ergebnis intensiver Studien am PAR-1. Demnach kann die Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktion durch Thrombin G_q -, G_i - und/oder $G_{12/13}$ -vermittelt sein (Macfarlane et al., 2001; Patterson et al., 2001). Als die wichtigsten Effekte gelten dabei (i) die G_i -abhängige Hemmung der Adenylatzyklase und die damit verbundene verminderte Bildung von cAMP, und (ii) die Aktivierung des Phospholipase C (PLC)- / Proteinkinase C (PKC)-Weges (Hung et al., 1992). Exemplarisch für den PAR-1 zeigt Abb. 4 eine Übersicht über die wichtigsten bislang identifizierten Thrombin-aktivierten Signaltransduktionswege.

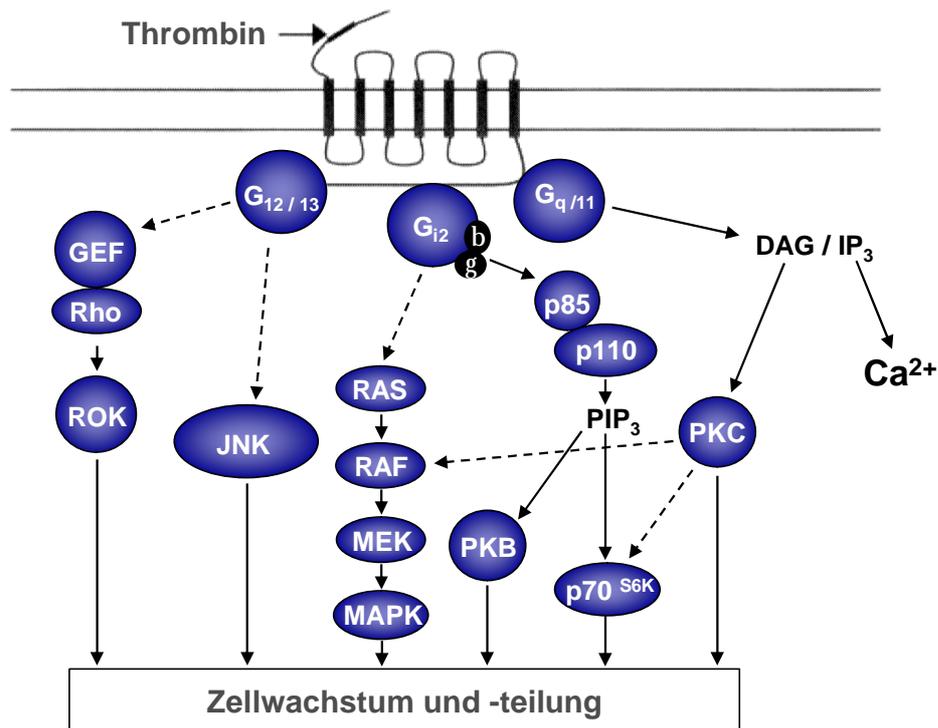


Abbildung 4

Thrombin-induzierte Signaltransduktion durch Aktivierung des PAR-1 (modifiziert nach McFarlane et al., 2001)

Neben der $G_{12/13}$ -abhängigen Aktivierung von Rho und der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) beinhalten nachgeschaltete Wege im Wesentlichen die G_q -abhängige Aktivierung der PLC und die G_i -vermittelte Aktivierung verschiedener Mitogen-aktivierter Protein-Kinasen (MAPK) bzw. der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase). Die PLC katalysiert die Bildung der sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), die ihrerseits wiederum einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration und die Aktivierung der PKC bewirken. G_i -vermittelte Signale kommen sowohl über die α - als auch über die $\beta\gamma$ -Untereinheit zustande. $G_{i\beta\gamma}$ bewirkt in Folge der Aktivierung der PI3-Kinase die Phosphorylierung der Proteinkinase B (PKB) und der p70S6-Kinase. $G_{i\alpha}$ führt über mehrere Zwischenstufen zur Aktivierung der Ras-Raf-Kaskade und zur Phosphorylierung der MAPK. Eine indirekte Aktivierung MAPK-Kaskade kann auch über den PKC-Weg erfolgen (Abb. 4).

Die aufgezeigten pleiotropen Effekte auf die Signaltransduktion stehen im Einklang mit der Diversität von Thrombin-Wirkungen in verschiedenen Zellsystemen. In humanen SMCs ist bislang allerdings wenig bekannt über die relative Bedeutung dieser Signalwege hinsichtlich der zentralen zellulären Reaktionen – Migration, Proliferation und Matrixsynthese. Ebenfalls

unklar ist, ob zwischen arteriellen und venösen Zellen Unterschiede in Bezug auf die Thrombin-vermittelte Signaltransduktion oder hinsichtlich des Besatzes an Thrombin-Rezeptoren bestehen. Derartige Unterschiede könnten für die Bypass-Problematik von Bedeutung sein.

1.2.4 Sekundäre Mediator-Freisetzung

Eine Reihe zellulärer Thrombin-Wirkungen, wie z.B. Wachstum und Proliferation, werden indirekt durch die Produktion sekundärer Mediatoren vermittelt (McNamara et al., 1996). Es wird davon ausgegangen, dass die Freisetzung solcher sekundärer Mediatoren für die Entfaltung maximaler Thrombin-Effekte benötigt wird (Stouffer und Runge, 1998). In diesem Zusammenhang interessieren insbesondere Wachstumsfaktoren, die nach Thrombin-Stimulation von SMCs vermehrt exprimiert und freigesetzt werden. Zu diesen zählen neben PDGF (Nakano et al., 1993; Stouffer et al., 1993; Cucina et al., 1999), bFGF (Weiss and Maduri, 1993; Cucina et al., 2002), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Bassus et al., 2001) und Epiregulin (Taylor et al., 1999) vor allem der *heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor* (HB-EGF) (Nakano et al., 1993). Daneben führt Thrombin auch zur Aufregulation entsprechender Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (Okazaki et al., 1992; Du et al., 2001). Auch für FXa konnten indirekte Wirkungen nachgewiesen werden (Ko et al., 1996; Koo and Kim, 2003; Rauch et al., 2004).

HB-EGF ist ein Heparin-bindendes, O-glykosyliertes Protein (22 kDa), das gemeinsam mit mindestens 13 weiteren Mitgliedern zur *epidermal growth factor* (EGF)-Superfamilie gehört (Davis-Fleischer und Besner, 1998). Ebenso wie die anderen EGF-Familienmitglieder wird HB-EGF in Form einer trans-membranären Vorstufe (pro-HB-EGF) synthetisiert und unter bestimmten Bedingungen, im Sinne einer proteolytischen Prozessierung, als para- / autokriner Wachstumsfaktor von der Zelloberfläche freigesetzt (Raab et al., 1994; Goishi et al., 1995). HB-EGF entfaltet seine zellulären Wirkungen über EGF-Rezeptoren (EGFR, HER), die zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) gehören, und von denen heute vier Subtypen bekannt sind (HER1, HER2, HER3, HER4) (Raab und Klagsbrun, 1997). Für eine maximale Wirksamkeit von HB-EGF wird zusätzlich die Interaktion mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) benötigt, die kolokalisiert zu den EGFRs auf der Zelloberfläche zu finden sind (Higashiyama et al., 1993).

HB-EGF wird mit zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen in Verbindung gebracht, so unter anderem mit der Wundheilung (Marikovsky et al., 1993), mit der SMC-Hyperplasie nach Gefäßschädigung (Igura et al., 1996) und mit der Entstehung der Atherosklerose (Nakata et al., 1996). Im Einklang damit gilt HB-EGF für eine Reihe vaskulärer Zellen, wie z.B. Fibroblasten und SMCs, nicht aber für Endothelzellen, als potenter Stimulus für die Zellproliferation und –migration (Besner et al., 1990; Higashiyama et al., 1991; Higashiyama et al., 1992; Higashiyama et al., 1993). Auch für HB-EGF sind indirekte Wirkungen durch die Expression sekundärer Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren beschrieben (Dluz et al., 1993; Peifley et al., 1996).

HB-EGF wird in einer Vielzahl von Geweben und kultivierten Zellen, darunter auch in SMCs, synthetisiert, wobei die Expression des Gens einer ausgeprägten Regulation unterliegt (Raab und Klagsbrun, 1997). Unter dem Einfluss einer Reihe mittlerweile identifizierter Regulationsfaktoren kommt es bereits nach sehr kurzer Zeit zu einem transienten Anstieg der HB-EGF-mRNA-Spiegel mit, für *immediate early genes* typischen, Maxima innerhalb von 1 – 2 h (Dluz et al., 1993). In SMCs wird HB-EGF unter anderem durch Angiotensin II und durch Thrombin induziert (Dluz et al., 1993; Nakano et al., 1993). Arbeiten der letzten Jahre, insbesondere der Gruppen um A. Ullrich und G. Daum, haben darüber hinaus Hinweise gefunden, dass HB-EGF an der Vermittlung von Thrombin-Signalen beteiligt ist (Prenzel et al., 1999; Kalmes et al., 2001). In SMCs der Ratte und des Pavians konnte die Vermittlung der Thrombin-induzierten Migration durch eine vermehrte Freisetzung von HB-EGF gezeigt werden (Kalmes et al., 2000). In dieser und in weiteren Arbeiten an Ratten-SMCs (Kanda et al., 2001a) konnte ebenfalls eine Transaktivierung des EGFR durch Thrombin nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass es nach Thrombin-Stimulation, durch bislang noch nicht identifizierte intrazelluläre Signaltransduktionswege, intermediär zu einer Aktivierung von Metalloproteinasen kommt. Diese sind in der Lage, in der Zellmembran verankertes pro-HB-EGF proteolytisch zu spalten, und das nachfolgend freigesetzte HB-EGF führt zu einer Aktivierung des EGFR und nachgeschalteter Signalwege. Dieser sogenannte *triple membrane-passing signal* (TMPS)-Mechanismus der EGFR-Transaktivierung (Abb. 5) gilt in zahlreichen Zellsystemen als ein allgemein anerkanntes Konzept für die Vermittlung von GPCR-Signalen (Prenzel et al., 2001).

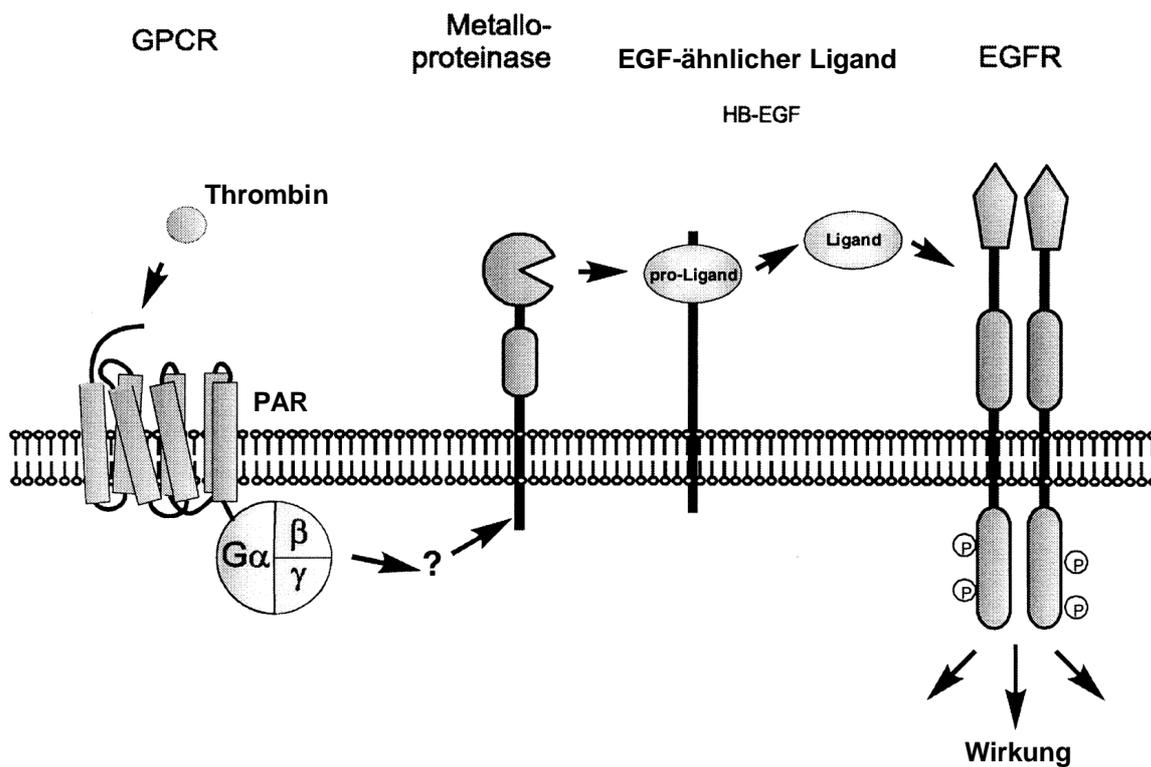


Abbildung 5

Postulierter *triple membrane-passing signal* (TMPS)-Mechanismus der Thrombin-induzierten EGFR-Transaktivierung über die Freisetzung von HB-EGF (modifiziert nach Fischer et al., 2003). PAR = Protease-aktivierter Rezeptor.

1.3 Prostacyclin

Von großem Interesse ist ebenfalls die Modifikation Thrombin-induzierter zellulärer Wirkungen durch funktionelle Gegenspieler. Leider sind spezifische niedermolekulare Antagonisten von Thrombin-Rezeptoren bisher nicht bekannt und verfügbare Peptide, z.B. die kürzlich beschriebenen Pepducine (Covic et al., 2002), haben nach dem Ergebnis eigener Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe nur eine limitierte Spezifität und Selektivität (Stampfuss et al., 2003). Prostacyclin (PGI_2) ist als physiologischer antiatherogener und proliferationshemmender Faktor in Blutgefäßen bekannt (Schrör, 1997) und kann daher als wichtiger Gegenspieler des Thrombins im kardiovaskulären System angesehen werden. Für die Untersuchungen zur Modifikation zellulärer Thrombin-Wirkungen wurde daher das chemisch stabile PGI_2 -Mimetikum Iloprost verwendet.

PGI_2 ist das Hauptprodukt des Arachidonsäure-Stoffwechsels im Endothel (Schönbeck et al., 1999). An der mehrstufigen Biosynthese sind unter anderem die Cyclooxygenase (COX) und

die nachgeschaltete PGI₂-Synthase (PGIS) beteiligt (Vane et al., 1998). Zu den Hauptwirkungen von PGI₂ zählen die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation (Weiss und Turitto, 1979) und die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Moncada et al., 1976). Darüber hinaus hemmt PGI₂ die SMC-Proliferation und -Migration (Grosser et al., 1995; Schrör und Weber, 1997; Blindt et al., 2002) und trägt so zur Erhaltung eines ruhenden, kontraktiven Phänotyps bei. In Übereinstimmung damit regulieren synthetische PGI₂-Mimetika die Aktivität diverser Zellzyklus-assoziiierter Faktoren (Ii et al., 2001; Kothapalli et al., 2003). Jüngste Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnten eine Reihe neuer PGI₂-regulierter Gene identifizieren, die an der Modulation des glattmuskulären Phänotyps beteiligt sein könnten (Meyer-Kirchrath et al., 2004). In therapeutischen Ansätzen konnte an verschiedenen Restenose-Modellen ebenfalls die Wirksamkeit einer gesteigerten PGI₂-Produktion, durch lokale Überexpression der PGIS, in Form einer verminderten Endothelschädigung und Neointimabildung gezeigt werden (Harada et al., 1999; Numaguchi et al., 1999; Todaka et al., 1999; Yamada et al., 2002). Diese Daten belegen die atheroprotektive Bedeutung des PGI₂.

Neben Endothelzellen sind auch SMCs unter bestimmten Bedingungen in der Lage, vermehrt PGI₂ zu synthetisieren (Dejana et al., 1983). Dies konnte in proliferierenden SMCs *in vitro* (Larrue et al., 1980) und in verschiedenen Gefäßverletzungsmodellen *in vivo* (Baenziger et al., 1977; Larrue et al., 1984) beobachtet werden. Unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren (Rimarachin et al., 1994) oder inflammatorischer Zytokine (Bishop-Bailey et al., 1998) produzieren SMCs ebenfalls vermehrt PGI₂. Auch Patienten mit einer Atherosklerose zeigten eine erhöhte glattmuskuläre PGI₂-Bildung (Belton et al., 2000). Insgesamt deuten diesen Daten darauf hin, dass SMCs in der Lage sind, eine verminderte vaskuläre Bildung von PGI₂, z.B. in Folge einer endothelialen Dysfunktion, zu kompensieren, und damit die eigene Proliferation und Migration unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren zu kontrollieren.

Die physiologischen Wirkungen von PGI₂ werden durch spezifische PGI₂-Rezeptoren (IP-R) vermittelt (Narumiya et al., 1999). IP-R gehören zur Gruppe der GPCR und koppeln in vaskulären Zellen hauptsächlich an stimulatorische G-Proteine (G_s). Dies bewirkt eine Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) und nachfolgend die Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). cAMP ist in der Lage, die Proteinkinase A (PKA) zu aktivieren, die wiederum über eine Phosphorylierung

verschiedener Transkriptionsfaktoren die Genexpression moduliert. Neben dieser nukleären Komponente des cAMP/PKA-Signalweges ist auch eine direkte Beeinflussung mitogener Signaltransduktionswege beschrieben. In verschiedenen Zellsystemen verhinderte die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration eine Aktivierung der Ras-Raf-MAPK-Kaskade (Wu et al., 1993; Severson et al., 1993). Im Einklang damit konnten Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass Iloprost die Aktivierung des MAPK-Weges und die DNA-Synthese nach Stimulation mit PDGF hemmt (Grosser et al., 1995). Eine stark vereinfachte Darstellung der PGI₂-abhängigen Signaltransduktion ist unter Berücksichtigung möglicher antimitogener Effekte in Abb. 6 zu sehen.

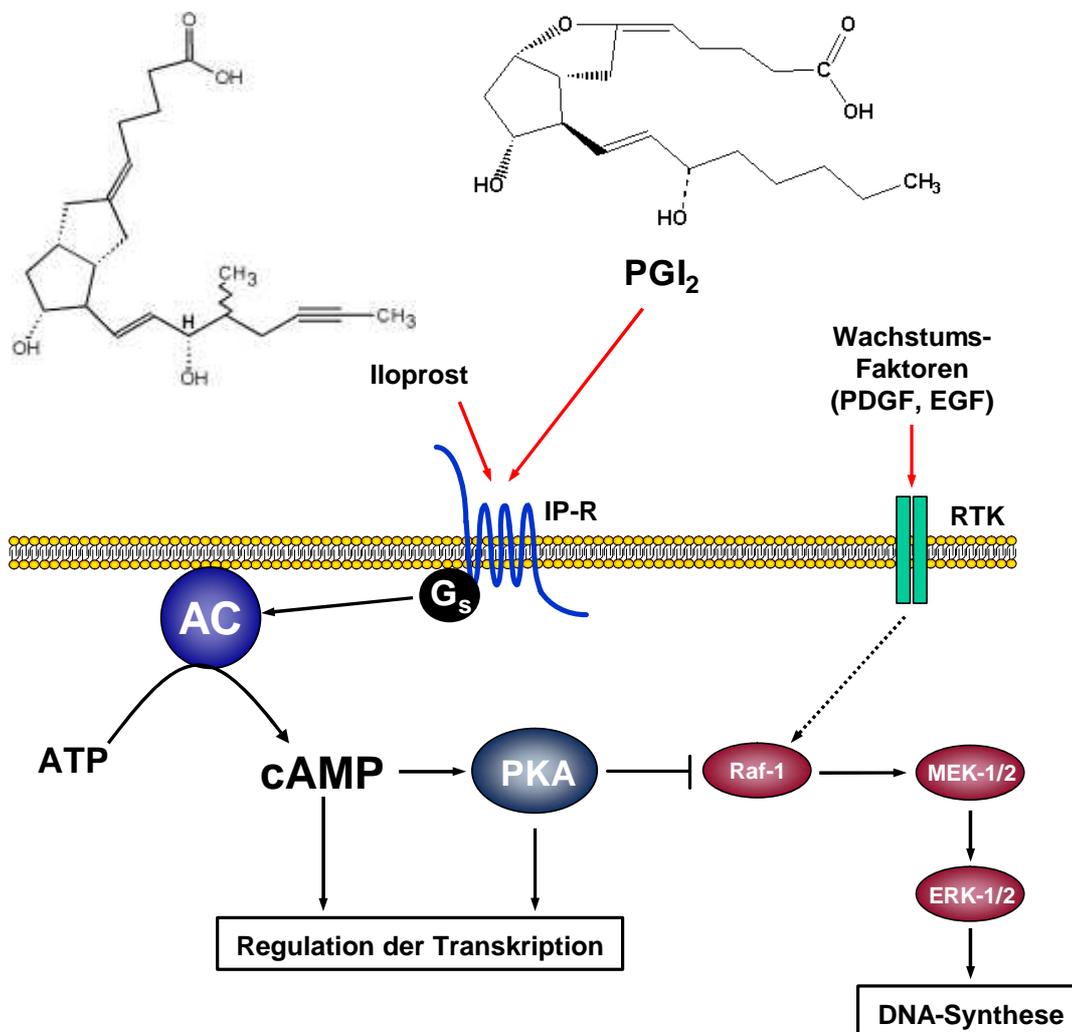


Abbildung 6

Prostacyclin (PGI₂)- / Iloprost-abhängige Signaltransduktionswege und Wirkungen (stark vereinfachte Darstellung).
 RTK = Rezeptor-Tyrosin-Kinase; PDGF = *platelet-derived growth factor*, EGF = *epidermal growth factor*.

Aufgrund der beschriebenen antimitogenen und vasoprotektiven Eigenschaften kann PGI₂ im weiteren Sinne als physiologischer Gegenspieler des Thrombins angesehen werden. Über die direkte Regulation von Thrombin-Signalen durch PGI₂ ist allerdings nur wenig bekannt. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass Iloprost die Thrombin-induzierte Expression proliferativer Faktoren, wie z.B. Cyr 61, hemmt (Debey et al., 2003). Daneben existieren wenige und zum Teil widersprüchliche Arbeiten, die die Thrombin-induzierte DNA-Synthese und Signaltransduktion unter dem Einfluss diverser cAMP-erhöhender Agenzien untersucht haben (Yamaguchi et al., 1993; Rao und Runge, 1996; Cospedal et al., 1999). Bisher nicht untersucht sind die Wirkungen von PGI₂ auf die Expression von Thrombin-Rezeptoren und die Thrombin-vermittelte Aktivierung mitogener Signalwege, und ob in diesem Zusammenhang Unterschiede zwischen SMCs aus Arterien und Venen bestehen.

1.4 Zusammenfassung und Fragestellung

Neben seiner zentralen Bedeutung für die Blutgerinnung besitzt Thrombin eine Reihe biologischer Wirkungen auf glatte Gefäßmuskelzellen (SMCs). Unter dem Einfluss von Thrombin und weiteren Wachstumsfaktoren kann es zu einer Änderung des glattmuskulären Phänotyps kommen, der insbesondere durch eine vermehrte Zellmigration, -proliferation und Matrix-Synthese gekennzeichnet ist. Daneben können SMCs selbst mitogene oder migratorische Faktoren bilden und freisetzen, so dass ein komplexes Netzwerk möglicher Interaktionen entsteht. Diese Interaktionen sind bislang wenig verstanden, allerdings von großer praktischer Bedeutung für die Entstehung vaskulärer Erkrankungen, wie z.B. der Thrombinbildung in Gefäßen, bei Verletzungen im Bereich atherosklerotischer Plaques, oder für die Bypass-Chirurgie. Auf diesem Hintergrund ergibt sich die zentrale Frage nach der Entstehung zellulärer Thrombin-Wirkungen, nach den involvierten Signalwegen und nach der Modulation dieser Wirkungen, insbesondere durch funktionelle Gegenspieler wie dem Prostacyclin (PGI_2). Darüber hinaus machen es Daten aus der Literatur wahrscheinlich, dass sich SMCs aus Arterien und Venen unterscheiden. Über mögliche Unterschiede zwischen beiden Zelltypen in Bezug auf Thrombin-Signale und deren Regulation ist allerdings nur sehr wenig bekannt.

Folgende Fragestellungen waren daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit:

- (i) Welche Thrombin-Rezeptoren sind an Thrombin-medierten Signalen in SMCs beteiligt und unterliegen sie einer transkriptionellen oder post-transkriptionellen Regulation?
- (ii) Welche Post-Rezeptor-Signalkaskaden vermitteln proliferative und migratorische Thrombin-Wirkungen? Sind diese für beide Zellreaktionen identisch?
- (iii) Führt Thrombin auch zur Freisetzung oder Bildung weiterer mitogener Faktoren?
- (iv) Welchen Einfluss hat das stabile PGI_2 -Mimetikum Iloprost auf diese Effekte?

Aufgrund der geschilderten klinischen Relevanz möglicher Unterschiede zwischen Arterien und Venen wurden SMCs aus beiden Gefäßen in der vorliegenden Arbeit vergleichend untersucht. Da neben Thrombin auch FXa als Koagulationsfaktor bedeutsam ist, sind einige der Untersuchungen exemplarisch auch mit FXa durchgeführt worden.

2. Material und Methoden

2.1 Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in höchster verfügbarer Qualität 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.

Tabelle 2: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen

Amido-Schwarz-Entfärbelösung	25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure
Amido-Schwarz-Färbelösung	0.1% (m/v) Amido-Schwarz, 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure
Blaumarker (10x)	30% Glycerol, 0.04% Bromphenolblau
Blot-Puffer	190 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol
Calcium-Messpuffer (10x)	145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO ₄ , 1.5 mM CaCl ₂ , 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 0.25% Humanes Serumalbumin
Coomassie-Blau-Färbelösung	0.2% Coomassie Brilliant-Blau, 40% Methanol, 10% Essigsäure
DEPC-Wasser	0.1% (v/v) Diethyl-pyrocbonat
Färbe-Puffer (2x)	100 mM MES, 1 M (Na ⁺), 0.05% Tween™ 20, 0.005% Antifoam
Fragmentierungspuffer (5x)	200 mM Tris-Acetat (pH 8.1), 500 mM K-Acetat, 150 mM Mg-Acetat
HBSS-Puffer (10x)	1.35 mM NaCl, 50 mM KCl, 4 mM Na ₂ HPO ₄ , 4.5 mM KH ₂ PO ₄ , 8 mM MgSO ₄ , 40 mM NaHCO ₃ (pH 7.0)
HBSS-Puffer (1x)	10% HBSS (10x), 1 mM CaCl ₂ , 5.5 mM Glukose, 10 mM HEPES, 1 mg/ml BSA (pH 7.8)
Hybridisierungspuffer (2x)	200 mM MES, 2M (Na ⁺), 40 mM EDTA, 0.02% Tween™ 20
Laemmli-Puffer (2x)	125 mM NaHPO ₄ /NaH ₂ 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

PBS	137 mM NaCl, 9.6 mM Na ₂ HPO ₄ , 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.4)
RIA-Puffer	50 mM Tris/HCl, 4 mM EDTA (pH 7.5)
Sammelgelpuffer	0.5 mM Tris/HCl (pH 6.8)
SSPE-Puffer (20x)	3 M NaCl, 0.2 M NaH ₂ PO ₄ , 0.02 M EDTA
TBE-Puffer (10x)	1 mM Tris, 83 mM Borsäure, 10 mM EDTA (pH 7.4)
TBS (10x)	100 mM Tris/HCl, 1.5 mM NaCl (pH 7.4)
TBST	150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7.4), 0.1% Tween™ 20
TBST-BSA	TBST, 5% (m/v) bovines Serumalbumin
TBST-M	TBST, 5% (m/v) Milchpulver
Trenngelpuffer	1.5 mM Tris/HCl (pH 8.8)
Waschpuffer A	SSPE (6x), 0.01% Tween™ 20, 0.005% Antifoam
Waschpuffer B	100 mM MES, 0.1 M (Na ⁺), 0.01% Tween™ 20
Zymographie-Inkubationspuffer	50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 10 mM CaCl ₂ , 1 μM ZnCl ₂ , 1.0% Triton™ X-100, 0.02% NaN ₃
Zymographie-Waschpuffer	50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 10 mM CaCl ₂ , 1 μM ZnCl ₂ , 2.5% Triton™ X-100, 0.02% NaN ₃

2.2 Substanzen

Folgende Substanzen wurden für die Zellkulturversuche als Stimulantien bzw. Inhibitoren eingesetzt: bovines α -Thrombin (Dr. J. Stürzebecher, Zentrum für Vaskuläre Biologie und Medizin, Jena); humaner Faktor Xa (FXa, Kordia Life Sciences, Leiden, Niederlande); Iloprost (Ilomedin® Infusionskonzentrat, Schering, Berlin); rekombinanter humaner HB-EGF (R&D Systems, Wiesbaden); Actinomycin-D (USB Corporation, Cleveland, USA); Dibutyryl-cyclo-Adenosinmonophosphat (db-cAMP), Isobutylmethylxanthin (IBMX), PDGF-BB, Pertussistoxin, Forskolin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Phorbol-myristat-acetat (PMA), Ro 31-8220 (Alexis Biochemicals, Grünberg); PD98059 (Cell Signaling Technology, Beverly, USA); LY294002, SB203580, BAPTA/AM (Calbiochem, San Diego, USA); PAR-aktivierende Peptide (PAR-1-AP (SFLLRN-NH₂), PAR-3-AP (TFRGAP-NH₂), PAR-4-AP (AYPGQV-NH₂)) wurden von GL Biochem (Shanghai, China) synthetisiert.

2.3 Antikörper

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper sind unter Angabe der zugehörigen Applikationen und der eingesetzten Verdünnungen in Tab. 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Antikörper und Applikationen

Bezeichnung (Katalognummer)	Hersteller	Applikation (Verdünnung)
anti-phospho-p42/44-MAPK, polyklonal (#9101)	Cell Signaling Technology / NEB, Beverly, MA, USA	Western Blot (1:2000, TBST-M)
anti-phospho-p38-MAPK, polyklonal (#9211)	Cell Signaling Technology / NEB, Beverly, MA, USA	Western Blot (1:500, TBST-BSA)
anti-phospho-Akt (Ser473), polyklonal (#9271)	Cell Signaling Technology / NEB, Beverly, MA, USA	Western Blot (1:500, TBST-BSA)
anti-phospho-PKC-Substrat, polyklonal (#2261)	Cell Signaling Technology / NEB, Beverly, MA, USA	Western Blot (1:1000, TBST-BSA)
anti-VASP (S-19), polyklonal (sc-1950)	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA	Western Blot (1:500, TBST-M)
anti-HB-EGF, neutralisierend, polyklonal (AF-259-NA)	R&D Systems, Wiesbaden	Zellkultur / Neutralisation der biologischen Aktivität (5 µg/ml)
anti-rabbit-IgG, HRP-konjugiert, polyklonal (sc-2004)	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA	Sekundärantikörper Western Blot (1:4000)

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) bezogen. Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) wurde aus Pulverzubereitungen nach Herstellerangaben zubereitet und durch Membranfiltrierung sterilisiert (Sterile Acrodisc 0.2 µm, Gelman Sciences, Cambridge, USA).

2.4.1 Isolation und Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen (SMCs) des Menschen wurden durch Explant-Technik aus der Arteria mammaria interna (AM) oder Vena saphena (VS) isoliert (Braun et al., 1997). Die Kultivierung erfolgte in DMEM supplementiert mit 15 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin, 1.9 mM L-Glutamin, 9.6 mM Natrium-Pyruvat und nicht-

essentiellen Aminosäuren bei 37 °C unter Begasung mit 5 % CO₂. Für die Weiterkultivierung wurden die Zellen nach erreichter Konfluenz mit Trypsin/EDTA (0.05 % / 0.5 mM) passagiert. Für die einzelnen Versuche wurden in der Regel SMCs der Passage 3 - 10 (p3 – p10) verwendet, in Einzelfällen bis p12. Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle Zellen vor den akuten Experimenten einmal mit PBS gewaschen und für 24 h in serumfreiem DMEM mit 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin inkubiert.

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 gebrauchsfertigen Phenol-Isothiozyanat-Gemisches (1 ml/10 cm², Trifast-Reagenz (peqLab Biotechnologie, Erlangen) oder 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 450 µl abgenommen und die darin gelöste RNA durch Zugabe von Isopropanol (450 µl) für mindestens 30 min bei 4 °C ausgefällt. Nach anschließender Zentrifugation für 30 min (13000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13) wurde das erhaltene RNA-Pellet in 200 µl DEPC-Wasser gelöst und anschließend erneut durch Zugabe von steriler 5 M Kaliumacetat-Lösung (1/10 des Volumens) und absolutem Ethanol (doppeltes Volumen) präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation (20 min, 13000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge 13) wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet, in DEPC-Wasser (20 – 30 ml) 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 einer 1:50-verdünnten Lösung bei 260 nm und 280 nm in einem Genequant II DNA/RNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt. Da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm und das von aromatischen Aminosäuren oder Phenol bei 280 nm liegt, bietet der Quotient aus beiden Absorptionswerten (ratio 260/280 nm) eine gute Abschätzung der RNA-Reinheit und sollte zwischen 1.5 und 2 liegen. $1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$ RNA.

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

RT-PCR Reaktionen wurden in einem TRIO-Thermo-Cycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die für die Amplifizierung der cDNA verwendeten Oligonukleotid-Primer (siehe Tab. 4) wurden von Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Für alle gezeigten RT-PCR-Experimente wurde ein One-Step™ RT-PCR-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Als interner Standard wurde die Genexpression des Enzyms Glycerol Aldehyd Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) nachgewiesen. Für jeden RT-PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 25 μl) wurden 250 ng Gesamt-RNA eingesetzt.

RT-PCR-Ansatz: 250 ng Gesamt-RNA
 5 μl 5 x RT-PCR-Puffer
 5 μl Q-Lösung
 1 μl dNTP-Mix (jeweils 10 mM)
 0.5 – 0.75 μl Genspezifische Primer (15 – 20 μM)
 0.5 – 0.75 μl GAPDH-Primer (10 – 15 μM)
 1 μl Enzym-Mix
 RNase-freies Wasser ad 25.0 μl

RT-PCR-Bedingungen: 30 min, 50 °C
 15 min, 95 °C
 28 – 31 Zyklen { 1 min, 94 °C
 1 min, 54 – 62 °C (Anlagerungs-Temperatur, siehe Tab. 4)
 1 min, 72 °C
 10 min, 72 °C

Tab. 4 gibt eine Übersicht über die im individuellen RT-PCR-Ansatz eingesetzten genspezifischen Primer, die zu erwartenden Fragmentgrößen und die entsprechenden PCR-Bedingungen (Anlagerungs-Temperatur / Zyklenzahl).

Tabelle 4: Für die RT-PCR-Analyse eingesetzte Oligonukleotid-Primer und PCR-Bedingungen

Gen	Primer-Sequenz <i>upstream</i> <i>downstream</i>	Fragment- größe des PCR- Produktes	Anlagerungs- Temperatur (°C)	Zyklus- zahl
FGF-5 / FGF-5S	5'-CTG CCA CTG ATA GGA ACC-3' 5'-GCT GAG GCA TAG GTA TTA TAG-3'	427 / 323	54	31
GAPDH	5'-TGA TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA-3' 5'-TCC TTG GAG GCC ATG TAG GCC AT-3'	238	52,55,60,62	28-31
HB-EGF	5'-TTTTAAGCTTACCATGAAGCTGCTGCCGTCGG-3' 5'-TTTTGGATCCCCAGCCGATTCTTGAGCAC-3'	700	62	30
IP-R	5'-GGTCCCCCATCTCACTGCTGCTGTCAGG-3' 5'-GCGTCTCTTCTGCGCGCTGCCCTGCTGG-3'	370	58	28
MEK-3	5'-GGA TCA ACC CAG AGC TGA AC-3' 5'-GCA CTT GGG ACA AAT GGC-3'	509	60	29
PAI-2	5'-GGT CCT GGT GAA TGC TGT CTA C-3' 5'-CTC CAT GCC CAT GCT TCT C-3'	403	54	28
PAR-1	5'-CCA CGG CAG ATG TGC TGT TTG-3' 5'-TAG GCA GCC TCT GTG GTG GAA G-3'	615	58	28
PAR-3	5'-TGG CAA AGC CAA CCT TAC CC-3' 5'-GGC AAG GAG CAG AAT GGA GC-3'	466	56	30
PAR-4	5'-GCC GCA CTC TAT GGT CAC ATG-3' 5'-GAT CCA CGC AGC TGT TGA GG-3'	549	56	30

2.5.4 Visualisierung und densitometrische Auswertung von RT-PCRs

Zur Visualisierung wurden jeweils 11 µl des RT-PCR-Ansatzes mit 1.5 µl Blaumarker versetzt und in Ethidiumbromid (0.5 µg/ml)-haltigen Agarose-Gelen (1.0 – 1.5 %) aufgetrennt. DNA-Banden wurden unter Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht. Die densitometrische Auswertung der Intensitäten der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht-Bestrahlung mittels einer Geldoc 2000-Apparatur und der Software Quantity One (Version 4.1.1, Bio-Rad, München). Für jede Probe wurde der Quotient aus den Intensitäten des zu untersuchenden Gens und des internen Standards GAPDH gebildet. Für die Darstellung der Ergebnisse wurde jeweils ein Quotient als Referenzwert definiert (nicht-stimulierte

Kontrolle = 1 bzw. Thrombin-Stimulation = 100%) und die Quotienten der weiteren Banden auf diesen Referenzwert bezogen (relative mRNA-Expression).

2.6 Microarray-Analyse

2.6.1 Übersicht

Das Verfahren der Microarray-Analyse erlaubt es, durch den Einsatz individueller Gen-Chips, in einem einzigen Experiment eine Vielzahl von Genen gleichzeitig auf ihr Expressionsniveau hin zu untersuchen. Eine Übersicht über den Ablauf einer Array-Analyse ist in Abb. 7 schematisch dargestellt. Zunächst wird Gesamt-RNA (Ausgangsmenge 5 µg) durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Zur cDNA-Synthese werden Oligo(dT)-Primer eingesetzt, die am 5'-Ende die Sequenz des bakteriophagen T7-RNA-Polymerase-Promotors tragen. Nach Aufreinigung der cDNA-Proben werden bei der nachfolgenden *in vitro*-Transkription unter Verwendung einer T7-RNA-Polymerase Biotin-markierte Nukleotide (UTP oder CTP) in die neu synthetisierte cRNA eingebaut. Anschließend werden die Proben erneut aufgereinigt, und die Konzentration und die Qualität der markierten cRNA bestimmt. Im letzten Schritt erfolgt die Fragmentierung der RNA und die dabei entstehenden

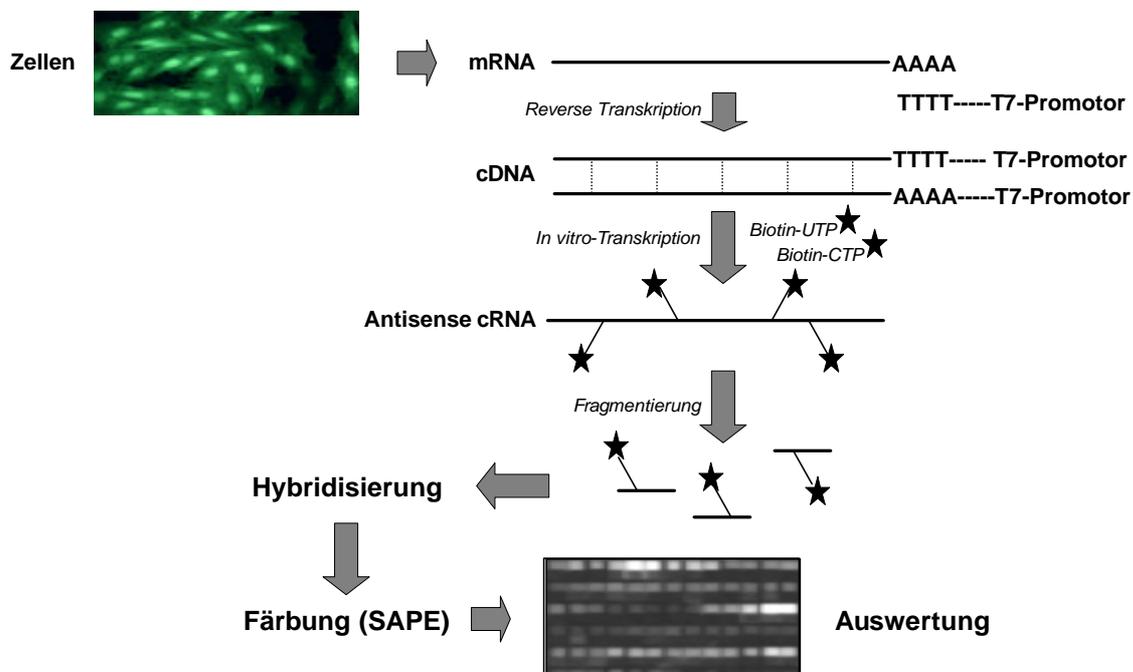


Abbildung 7

Übersicht über die Array-Analyse. Erklärungen siehe Text. SAPE (Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat).

Biotin-markierten RNA-Fragmente werden auf einen entsprechenden Array hybridisiert. Es folgt die Färbung der hybridisierten Chips mittels eines Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugates und anschließend die Bestimmung der Fluoreszenzemission nach Anregung mit Laserlicht bei 488 nm. Computergestützt werden die einzelnen Signalintensitäten, die ein Maß für die Genexpression darstellen, registriert und ausgewertet.

2.6.2 RNA-Präparation

Als Ausgangsmaterial für die Array-Analyse wurde präparierte Gesamt-RNA (vgl. Abschnitt 2.5.1) eingesetzt. Für diese spezielle Präparation wurden venöse Zellen aus einer konfluent bewachsenen 175 cm²-Flasche (entsprechend etwa 3.5 x 10⁶ Zellen) verwendet, die durch Zugabe von 15 ml Trifast-Reagenz lysiert wurden. Das Lysat wurde mit 3 ml Chloroform versetzt, durch Schütteln gemischt und zentrifugiert (15 min, 5000 rpm, RT). 10 ml der wässrigen Phase wurden abgenommen und die Nukleinsäuren mit 10 ml Isopropanol über Nacht (4 °C) ausgefällt. Nach Ethanol-Präzipitation und anschließender Zentrifugation erfolgte die Resuspendierung des RNA-Pellets in 100 µl RNase-freiem Wasser. Die Quantifizierung erfolgte wie unter Abschnitt 2.5.2 beschrieben. Für die folgende cDNA-Synthese wurde eine Mindest-RNA-Konzentration von 477 µg/ml (5 µg RNA in 10.5 µl Wasser) benötigt. Proben, die nicht ausreichend konzentriert vorlagen, wurden erneut präzipitiert und entsprechend resuspendiert.

Tabelle 5: Ansätze für Erst- und Zweitstrang-Synthese

Primer-Anlagerung	5 µg RNA in 10.5 µl H ₂ O + 1 µl Oligo(dT)-Primer (100 pmol/µl) (10 min / 70 °C)
Erststrang-Synthese	Temperaturanpassung 42 °C + 4 µl Erststrang-Synthesepuffer (5x) + 2 µl DTT (0.1 M) + 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) (2 min / 42 °C) +1 µl Reverse Transkriptase (1 h / 42 °C) Lagerung auf Eis
Zweitstrang-Synthese	+ 91 µl DEPC-H ₂ O + 30 µl Zweitstrang-Synthese-Puffer (5x) + 3 µl dNTP (je 10 mM) + 1 µl E. coli-DNA-Ligase (10 U/µl) + 4 µl DNA-Polymerase (10 U/µl) + 1 µl RNase H (2 U/ml) (2 h / 16 °C) + 2 µl T4-DNA-Polymerase (10 U) (5 min / 16 °C) + 10 µl EDTA (0.5 M)

2.6.3 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden ein Superscript™ Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Karlsruhe) und ein T7-Oligo(dT)-Primer (Metabion, Planegg-Martinsried) verwendet: 5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄-3'. Für jede Probe wurden 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt, es folgten anschließend ein Primer-Anlagerungsschritt, die Erststrang-Synthese und die Zweitstrang-Synthese (Tab. 5). Bis zum späteren Gebrauch wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.6.4 Aufreinigung der cDNA

Die Aufreinigung der doppelsträngigen cDNA erfolgte mit einem GeneChip™ Sample Cleanup-Module (Affymetrix, Santa Clara, USA) nach dem Protokoll des Herstellers. Das Gesamtvolumen des cDNA-Synthese-Ansatzes (162 µl) wurde mit 600 µl cDNA-Bindepuffer versetzt, gemischt, und anschließend 500 µl dieser Probe auf eine Säule (cDNA-Cleanup Spin Column) aufgetragen. Nach Zentrifugation wurde das Eluat verworfen und mit den verbleibenden 262 µl des Ansatzes in identischer Weise verfahren. Die Säule wurde mit 750 µl cDNA-Waschpuffer gewaschen, durch Zentrifugation getrocknet, und die cDNA schließlich mit 14 µl cDNA-Elutionspuffer eluiert.

2.6.5 *in vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription (IVT) diente der Synthese Biotin-markierter cRNA, die auf den später hybridisierten Arrays detektiert wird. Dazu wurde ein BioArray™ High Yield™ RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Biochem., Farmingdale, USA) unter Einsatz des gesamten Ansatzes aufgereinigter cDNA (vgl. Abschnitt 2.6.4) verwendet. Zur Markierung wurde die RNA über den Einbau von rUTP und rCTP biotinyliert. Die Zugabe der Reagenzien erfolgte bei RT in der in Tab. 6 aufgelisteten Reihenfolge. Anschließend wurde der gesamte Ansatz gemischt und für 5 h bei 37 °C inkubiert, wobei alle 30 min erneut kurz gemischt und zentrifugiert wurde. Die Proben (cRNA) wurden bis zur weiteren Verwendung eingefroren (-20 °C).

Tabelle 6: IVT-Ansatz

cDNA	12 µl
HY-Reaktionspuffer (10x)	4 µl
Biotin-markierte Ribonukleotide (10x)	4 µl
DTT (10x)	4 µl
RNAse-Inhibitor-Mix (10x)	4 µl
T7-RNA-Polymerase (20x)	2 µl
RNAse-freies Wasser	ad 40.0 µl

2.6.6 Aufreinigung der cRNA

Für die Aufreinigung wurde wiederum ein GeneChip™ Sample Cleanup Module (Qiagen, Hilden) verwendet. Nach Verdünnung des gesamten IVT-Ansatzes (40 µl) mit 60 µl RNAse-freiem Wasser wurde die Probe mit 350 µl IVT-cRNA-Bindpuffer und 250 µl Ethanol (96%) versetzt und nach Mischen über eine Säule (IVT cRNA-Cleanup Spin Column) zentrifugiert (15 s, 10000 rpm, RT). Das Eluat wurde verworfen und die Säule in zwei Schritten gewaschen (1. 500 µl Waschpuffer, 2. 500 µl Ethanol (80 %)) und anschließend durch Zentrifugation (5 min, 25000 x g, RT) getrocknet. Die cRNA wurde schließlich in drei Schritten mit RNAse-freiem Wasser eluiert (11 µl, 2x12µl) und deren Konzentration, wie unter Abschnitt 2.5.2 beschrieben, bestimmt.

2.6.7 cRNA-Fragmentierung

Für die cRNA-Fragmentierung wurden jeweils 15 µg aufgereinigte cRNA eingesetzt und diese nach Zugabe von 6 µl Fragmentierungspuffer (5x) zu 30 µl DEPC-Wasser verdünnt. Nach Inkubation der Ansätze für 35 min bei 95 °C und anschließender Zentrifugation wurden die Proben auf Eis gelagert und direkt für die Array-Hybridisierung eingesetzt.

2.6.8 Hybridisierung der Arrays

Vor dem eigentlichen Hybridisierungsschritt wurden die Gen-Chips (HG-U133A, Lot.-Nr. 3002824, Affymetrix, Santa Clara, USA) auf RT temperiert, mit jeweils 280 µl Hybridisierungspuffer befüllt und für 10 min bei 45 °C im Hybridisierungsofen (GeneChip™ Hybridization Oven 640, Affymetrix, Santa Clara, USA) unter Rotation (60 rpm) inkubiert (Prähybridisierung). Zeitgleich wurde der Hybridisierungscocktail (Zusammensetzung siehe Tab. 7) mit 15 µg fragmentierter cRNA (in 30 µl) versetzt (Gesamtvolumen 300 µl), für 5 min bei 99 °C und weitere 5 min bei 45 °C inkubiert und zur Sedimentation von Schwebepartikeln

zentrifugiert (5 min, 14000 rpm). Nach Entnahme der Prähybridisierungslösung wurden die Chips mit dem cRNA-haltigen Hybridisierungscocktail (jeweils 250 µl) für 16 h bei 45 °C im Hybridisierungssofen unter Rotation (60 rpm) inkubiert.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Hybridisierungscocktails

Eukaryotische Hybridisierungskontrolle (20x; GeneChip™ Eukaryotic Hybridization Control Kit, Affymetrix, Santa Clara, USA), 5 min bei 65 °C vorinkubiert	15 µl
B2-Oligo-Kontrolle (3 nM; GeneChip™ Eukaryotic Hybridization Control Kit, Affymetrix, Santa Clara, USA)	5 µl
Lachs-Sperma-DNA (10 mg/ml; Stratagene, La Jolla, USA)	3 µl
Acetyliertes BSA (50 ng/ml; Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe)	3 µl
Hybridisierungspuffer (2x)	150 µl
Wasser	ad 270 µl

2.6.9 Waschen und Färben

Nach Entnahme des Hybridisierungscocktails (Aufbewahrung bei –20 °C) wurden die Chips mit 280 µl Waschpuffer A befüllt (Lagermöglichkeit für einige Stunden bei 4 °C). Die Färbung erfolgte in drei Färbeschritten unter Verwendung einer Fluidic-Station (GeneChip™ Fluidics Station 400, Affymetrix, Santa Clara, USA). Für den ersten und dritten Färbeschritt wurden die Chips mit einer Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE)-Lösung (Tab. 8) versetzt, im zweiten Färbeschritt erfolgte zur Verstärkung der Signale die Inkubation mit einer biotinylierten anti-Streptavidin-Antikörper-Lösung (Tab. 9). Die Arrays wurden in die entsprechenden Module der Fluidics-Station überführt und die Färbe- und Waschlösungen (Waschpuffer A und B) in der Maschine platziert. Die Färbung erfolgte nach dem Wasch- und Färbeprotokoll EukGE-W2V4 (Dauer der Färbeschritte: 45 min / 10 min / 30 min) unter Befolgung der Arbeitsanweisungen des Programms. Nach Beendigung wurden die Chips in einem Agilent GeneArray Scanner (Argon-Laser, Anregungswellenlänge 488 nm) gescannt.

Tabelle 8: Zusammensetzung der SAPE-Färbelösung

Färbe-Puffer (2x)	600 µl
Wasser	540 µl
Acetyliertes BSA (50 ng/ml; Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe)	48 µl
SAPE-Lösung (1 mg/ml; Molecular Probes, Göttingen)	12 µl

Tabelle 9: Zusammensetzung der Antikörper-Färbelösung

Färbe-Puffer (2x)	300 µl
Wasser	266.4 µl
Acetyliertes BSA (50 ng/ml; Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe)	24 µl
Goat IgG (10 mg/ml; Sigma-Aldrich, Deisenhofen)	6 µl
anti-Streptavidin-Antikörper (biotinyliert, 0.5 mg/ml; Vector Laboratories, CA, USA)	3.6 µl

2.6.10 Auswertung

Die Bilder der gescannten Gen-Chips stellen die Rohdaten für jedes Einzelexperiment dar, wobei das Lichtsignal eines jeden Sondenfeldes (*probe cell*) als 16-Bit-Intensitätswert registriert wird. Als Auswertungs-Software wurde Microarray Suite (MAS, Version 5.0, Affymetrix, Santa Clara, USA) verwendet. Für die Analyse jedes einzelnen Gens stehen auf dem Chip spezifische SONDENSÄTZE (*probe set*) zur Verfügung, die wiederum aus 11 - 20 Sondenpaaren (*probe pairs*) bestehen (Abb. 8). Ein Sondenpaar besteht aus PM (*perfect match*)-Oligonukleotiden, die exakt komplementär zu einem Sequenzabschnitt in einem spezifischen Transkript sind, und MM (*mismatch*)-Oligonukleotiden, die ebenfalls komplementär sind, allerdings an einer zentralen Position eine falsche Base aufweisen. Die MM-Sonde eines jeden Sondenpaares dient als Kontrolle der Hybridisierungsspezifität. Jedes Sondenfeld beinhaltet Millionen Oligonukleotid-Kopien (jeweils 25 Basen lang).

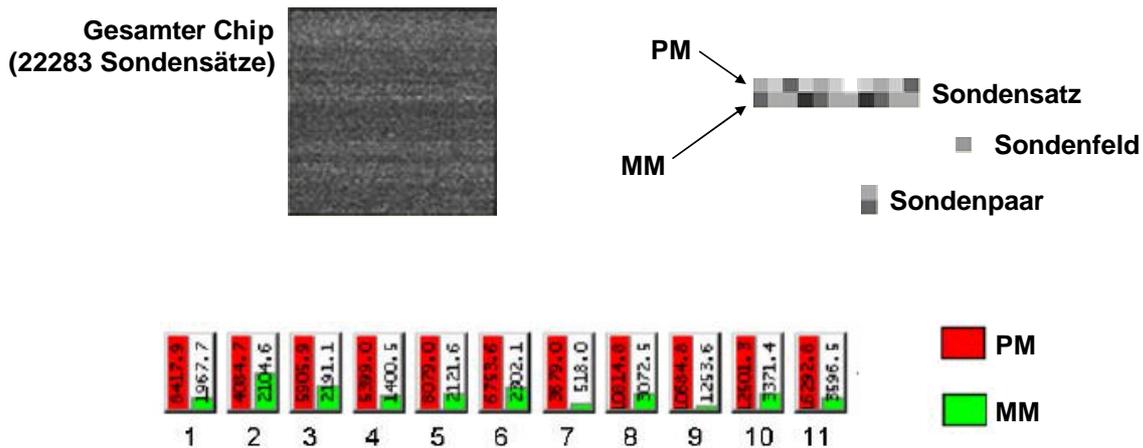


Abbildung 8

Exemplarische Darstellung eines gescannten Gen-Chips (oben links) und eines einzelnen SONDENSÄTZES (rechts), bestehend aus Sondenfeldern und Sondenpaaren. Der untere Teil der Abbildung stellt beispielhaft die aus den gemessenen Lichtintensitäten ermittelten Messwerte von PM (*perfect match*) und MM (*mismatch*) paarweise gegenüber. Jeder PM-Sonde wird eine entsprechende MM-Sonde gegenübergestellt. Aus allen Messwerten wird ein einziger Signal-Wert berechnet.

Für jeden Sondensatz wird letztendlich aus allen PM-MM-Differenzen ein Signalwert berechnet, der das relative Expressionsniveau des entsprechenden Transkripts repräsentiert (Abb. 8). Über einen komplexen Algorithmus (vgl. MAS-Handbuch) ermittelt die Software, ob ein Transkript vorhanden ist (*present*), nur sehr schwer detektierbar ist (*marginal*) oder nicht exprimiert wird (*absent*).

2.6.11 Vergleichende Genexpressions-Analyse

Zunächst mussten die Daten der Einzelanalysen normalisiert werden, um nicht-biologische Fehler-Faktoren, z.B. experimentelle Variablen, zu eliminieren, so dass die Vergleichbarkeit mehrerer Chips gewährleistet werden konnte. Im Rahmen einer absoluten Genexpressionsanalyse wurde zu diesem Zwecke zunächst die durchschnittliche Signalintensität der Gesamtheit aller Sondensätze eines Arrays bestimmt und anschließend ein Skalierungsfaktor ermittelt, der, mit dieser durchschnittlichen Signalintensität multipliziert, einen Wert von 100 ergab. Durch Multiplikation aller Signale eines Chips mit dem für den jeweiligen Chip spezifischen Skalierungsfaktor wurde der Vergleich verschiedener experimenteller Bedingungen ermöglicht. Als weiterer Parameter wurde der jeweilige Hintergrund (*background*) eines Chips kontrolliert. Alle im Rahmen dieser Arbeit hybridisierten Gen-Chips zeigten vergleichbare Hintergrund-Signalintensitäten.

Basierend auf den normalisierten Daten wurde abschließend eine vergleichende Genexpressionsanalyse durchgeführt. Als *baseline* wurden jeweils die Werte der nicht-stimulierten Kontrolle definiert, während die Daten Thrombin- oder FXa-behandelter Zellen jeweils als *experiment* festgelegt wurden. Für jedes normalisierte Sondensatz-Signal wurden die relativen quantitativen Veränderungen in der Expression der Transkripte als x-fache Veränderung (*fold change*, FC) ermittelt. Differentiell exprimierte Gene, die weniger als eine 2-fache Veränderung gegenüber der Kontrolle aufwiesen, sind im Ergebnisteil nicht aufgeführt.

2.7 Analyse von Proteinen

2.7.1 Western Blot-Verfahren

2.7.1.1 Isolierung von Proteinen aus SMCs

Für die Untersuchungen mittels Western Blot wurden subkonfluente Zellen einer 24-Loch-Platte nach einmaligem Waschen mit PBS durch Zugabe von 1 x Laemmli-Puffer (25 – 50 µl) lysiert. Das Zell-Lysat wurde mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturplatten gelöst, kurz im Eppendorf-Gefäß sonifiziert, 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.

2.7.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine aus dem Zell-Lysat erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dazu wurde zwischen zwei Glasplatten zunächst übereinander ein 0.75 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 10 – 15 µl Lysat erfolgte der Gel-Lauf bei 200 V für 40 min in einer Bio-Rad Mini PROTEAN™ 3 Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad, München). Als Molekulargewichtsmarker diente ein Biotin-konjugierter hochmolekularer Proteinstandard (New England Biolabs, Beverly, MA, USA).

2.7.1.3 Proteintransfer

Die im PAA-Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels einer „Semi-Dry“-Blotting Apparatur (Bio-Rad, München) auf eine Methanol-benetzte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon™-P, Millipore, Bedford, MA, USA) transferiert. Der Transfer erfolgte mit Blotpuffer bei 15 V für 60 min. Membranen, die im Anschluss nicht direkt „geblockt“ (s.u.) werden konnten, wurden getrocknet und über Nacht bei RT gelagert.

2.7.1.4 Antikörper-Hybridisierung und Detektion

Zur Sättigung unspezifischer Bindungen wurden die Membranen unmittelbar nach dem Proteintransfer für 1 h bei RT oder alternativ über Nacht bei 4 °C in TBST-M oder

TBST-BSA prähybridisiert ("Blocken"). Getrocknete Membranen wurden zuvor erneut durch Methanol-Behandlung aktiviert. Zum immunologischen Nachweis der immobilisierten Proteine erfolgte anschließend die Hybridisierung mit Primärantikörpern (1:500 – 1:2000 in 5 - 10 ml TBST-M oder TBST-BSA, vgl. Tab. 3). Dazu wurden die Membranen einzeln mit der Antikörperlösung in Folie eingeschweißt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST (je 15 min) erfolgte die Hybridisierung mit Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern (1:4000 in TBST-M oder TBST-BSA) für 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen (TBST-M / 3 x 15 min) wurden die Proteine mit Hilfe des Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers detektiert. Bei dieser Methode wird das Substrat (Luminol) durch die Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper mittels H_2O_2 oxidiert und die entstehende Lichtemission (Chemilumineszenz) durch Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm (Hyperfilm™ ECL™, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) visualisiert. Die für Western Blot-Experimente verwendeten Antikörper sowie die entsprechenden Verdünnungen sind in Tab. 3 (Abschnitt 2.3) aufgelistet.

2.7.1 Prüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung

Um die Gleichmäßigkeit der Proteinbeladung zu kontrollieren, wurden die PVDF-Membranen nach der Detektion mit Amido-Schwarz-Färbelösung für 10 min bei RT inkubiert und überschüssiger Farbstoff anschließend mit Amido-Schwarz-Entfärbelösung ausgewaschen. Nach Trocknung der Membranen wurden die Proteinbanden sichtbar und die gleichmäßige Beladung überprüft.

2.7.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad, München) bestimmt. Als Standard diente eine Eichkurve, die mit BSA-Lösungen aufsteigender Konzentration (0 – 2.4 µg/ml) erstellt wurde. Die photometrische Bestimmung der Proben erfolgte 20 min nach Zugabe des Bradford-Reagenz in einer Mikrotiterplatte in einem ELISA-Reader (Microplate Reader Model 550, Bio-Rad, München) bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.8 Zymographie

2.8.1 Prinzip und Probenvorbereitung

Die Zymographie diente dem Nachweis der Gelatinase-Aktivität der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) im Zellüberstand. Nach Auftrennung im Gelatine-haltigen PAA-Gel spalten die Enzyme das Substrat und als Zeichen dieser Aktivität erscheint nach Coomassie-Blau-Färbung eine weiße Negativbande auf Höhe des entsprechenden Molekulargewichts. Für die Zymographie wurden SMCs in 24-Loch-Platten mit den angegebenen Substanzen im serumfreien Hungermedium stimuliert und das konditionierte Medium (KM) nach 72 h geerntet. Zur Abtrennung abgelöster Zellen wurde das KM zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, RT) und anschließend mit nicht-reduzierendem Laemmli-Puffer (2x – 4x, Endkonzentrationen: 2 % SDS, 10 % Glycerol, 0.0625 M Natrium-Phosphat-Puffer, 0.01 % Bromphenolblau, pH = 7.0) versetzt. Die Proben wurden nicht durch Hitzeeinwirkung denaturiert, was zum Aktivitätsverlust der Enzyme geführt hätte.

2.8.2 Auftrennung der Enzyme durch SDS-PAGE

Die Elektrophorese wurde, wie unter Abschnitt 2.5.2 beschrieben, unter Verwendung eines 7 %-igen PAA-Gels durchgeführt. Zusätzlich wurde dem Trenngel Gelatine in einer Konzentration von 0.7 mg/ml zugesetzt.

Tabelle 10. Zusammensetzung von Sammel- / Trenngel für die Zymographie

Sammelgel (4% Acrylamid, keine Gelatine)	Trenngel (7% Acrylamid, 0.7 mg/ml Gelatine)
1.33 ml Acrylamid-Bis-Lösung (30%) 2.5 ml Sammelgelpuffer 100 µl SDS (10%) Aqua dest. ad 10.0 ml 50 µl APS-Lösung (10%) 10 µl TEMED	2.3 ml Acrylamid-Bis-Lösung (30%) 2.5 ml Trenngelpuffer 100 µl SDS (10%) Aqua dest. ad 10.0 ml 50 µl APS-Lösung (10%) 5 µl TEMED

2.8.3 Aktivitätsnachweis der Enzyme durch Gelatine-Abbau

Nach dreimaligem Waschen (je 10 min) des PAA-Gels mit Zymographie-Waschpuffer (Entfernung von SDS) wurde das Gel 18 – 36 h im Inkubationspuffer bei 37 °C gelagert, um einen ausreichenden Gelatine-Abbau zu erzielen. Durch die Färbung mit Coomassie-Blau-Färbelösung (10 min) und anschließender Entfärbung im Wasserbad wurden Gelatineabbau-Banden sichtbar. Die MMP-2- und pro-MMP-2-Banden wurden anhand ihres

Molekulargewichts identifiziert und deren Intensität mit Hilfe einer Gel Doc 1000-Apparatur / Quantity One Software (Version 4.1.1, Bio-Rad, München) bestimmt. Nach Abzug des Hintergrund-Signals wurden die Signalintensitäten der MMP-2- und der pro-MMP-2-Bande bestimmt und der Quotient der nicht-stimulierten Kontrolle gleich 1 gesetzt.

2.9 Bestimmung intrazellulärer Calcium-Transienten

Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) wurden nach Beladung der Zellen mit dem Calcium-sensitiven Farbstoff Fluo-3-AM (Molecular Probes, Eugene, USA) mittels konfokaler Laserfluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen. Als Membran-permeabler Acetoxymethylester gelangt Fluo-3-AM in die Zelle und wird intrazellulär von unspezifischen Esterasen unter Freisetzung der freien Säure (Fluo-3) gespalten, wodurch eine Rückdiffusion aus der Zelle heraus vermieden wird. Bei physiologischem pH liegt Fluo-3 in dissoziierter Form vor und ist in der Lage, über die Carboxylgruppe freie zytosolische Calcium-Ionen zu chelatieren ($K_D = 0.4 \mu M$), was Änderungen im Fluoreszenzspektrum bewirkt (Abb. 9) (Minta et al., 1989).

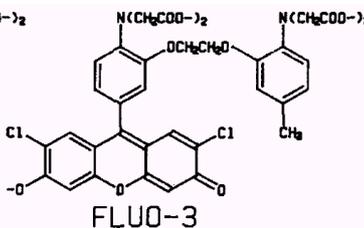
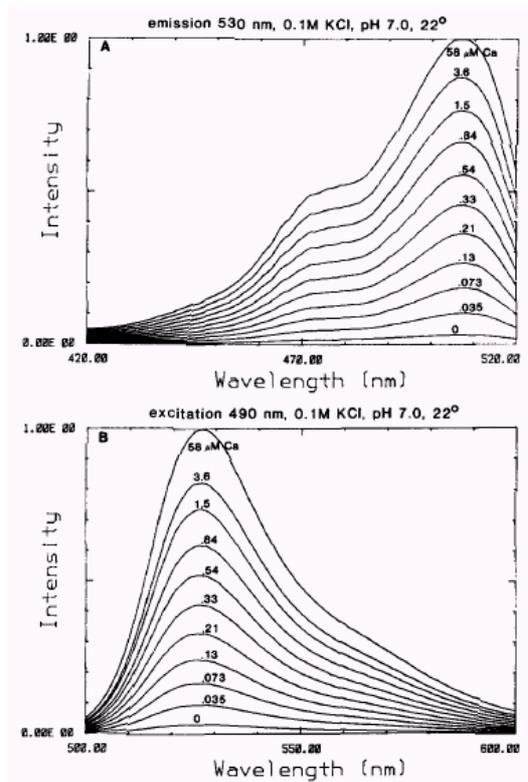


Abbildung 9
Strukturformel von Fluo-3 (oben) und Exzitations- bzw. Emissionsspektren des Farbstoffes gemessen in 0.1 M KCl-Lösung (pH 7.0, 22°C) und in Anwesenheit unterschiedlicher Calcium-Konzentrationen (0 - 58 μM) (nach Minati et al., 1988).

Alle Messungen wurden am Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin / Abteilung Molekulare und Zelluläre Sportmedizin (Leitung: Prof. Dr. W. Bloch) der Deutschen Sporthochschule Köln (Carl-Diem-Weg 6, 50933 Köln) durchgeführt.

2.9.1 Kultivierung der Zellen und Beladung mit Fluo-3-AM

Für die Calcium-Messungen wurden modifizierte d60-Zellkulturschalen verwendet (Abb. 10).

Aufgrund ihres dünnen eingearbeiteten Glasbodens zeichnen sich diese durch eine besonders hohe optische Transparenz sowie eine geringe Eigenfluoreszenz aus, können direkt in das Mikroskop eingespannt werden und sind daher für die Methode besonders geeignet. Die Sterilisation der Schalen erfolgte durch Ethanol (70 %)-Behandlung für 30 – 60 min und anschließende UV-Licht-Bestrahlung über Nacht unter einer sterilen Werkbank. SMCs wurden in die Vertiefung auf den Glasboden ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. 24 h vor den Versuchen wurde das Medium durch 3 ml frisches Vollmedium ersetzt (kein Serumentzug).

Zur Beladung der Zellen wurde Fluo-3-AM

mit Hungermedium (37 °C) verdünnt (Endkonzentration 5 µM) und gegen das Vollmedium ausgetauscht (250 µl / Schale). Die Inkubation der Zellen erfolgte unter Lichtabschluss im Brutschrank (37 °C / 5 % CO₂) für mindestens 45 - 60 min. Nach Waschen der Zellen mit Calcium-Messpuffer (4 – 5 ml) wurden die Zellen mit 100 µl Calcium-Messpuffer bedeckt und innerhalb von 2 h vermessen. Eine Iloprost-Vorinkubation erfolgte 15 min vor der Messung im Hungermedium.

2.9.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Messung relativer Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ wurde ein Axiovert 200M-Invertmikroskop mit einem konfokalen Laser-Scanner (LSM510, Zeiss, Oberkochen) und einem Argonlaser (LSM 510 Laser Modul) verwendet. Die Kulturschalen wurden direkt in der



Abbildung 10

Modifizierte d60-Zellkulturschalen für Calcium-Messungen. In den Boden konventioneller d60-Schalen wurde eine kreisförmige Öffnung gestanzt (2.7 mm) und diese von unten durch Ankleben (Silikon) eines handelsüblichen Deckglases wieder verschlossen. Zur Aussaat von SMCs wurden 250 µl einer Zellsuspension in die entstandene Vertiefung pipettiert. Nach erfolgter Adhärenz wurde die Schale mit Medium befüllt (3 - 5 ml). Ähnliche Schalen sind auch von der Firma Dunn Labortechnik (Asbach) erhältlich.

Einspannvorrichtung am Objektisch fixiert und die beladenen Zellen mit 40-facher Vergrößerung (Ölimmersionsobjektiv) im Strahlengang des Mikroskops fokussiert. Nach Einstellung eines geeigneten Bildausschnittes erfolgte die Betrachtung der registrierten Fluoreszenz-Emission bei 505 nm über das angeschlossene Rechner-System unter Verwendung der LSM Software (Version 3.2, Zeiss, Oberkochen). Nach Festlegung der Messbereiche (*region of interest*, ROI) wurde die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensitäten mit einer Frequenz von 1 Registrierung / s gestartet. Die Zugabe von Thrombin (100 µl, 1:2 Verdünnung) erfolgte nach 20 s unmittelbar in der Nähe des Strahlengangs. Die Dauer jeder Messung betrug insgesamt 140 s. Als Positiv-Kontrolle wurde in einigen Versuchen Digitonin (Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 50 µM eingesetzt.

2.9.3 Auswertung

Für die Auswertung der Daten wurde von den gemessenen Fluoreszenzintensitäten jeweils der Hintergrund (zellfreie ROI) subtrahiert. Die Ausgangssignalintensität (1. Registrierung, 0 Sekunden) wurde gleich 100 gesetzt und alle folgenden Messwerte entsprechend relativiert. Die im Ergebnisteil dargestellten Kurvenverläufe repräsentieren Mittelwerte aus den Daten aller gemessenen Zellen (3 – 8 ROIs pro Ausschnitt) eines Einzelexperiments von insgesamt n unabhängigen Versuchen.

2.10 Messung der DNA-Syntheserate

Als Maß für das Wachstum der Zellen wurde die DNA-Syntheserate anhand des Einbaus von Tritium-markiertem Thymidin ($[^3\text{H}]$ -Thymidin) in die zelluläre DNA bestimmt. Hierfür wurden SMCs bis zum Erreichen einer ca. 80 %-igen Konfluenz in 24-Loch-Platten kultiviert. 24 h vor Versuchsbeginn wurden die Zellen durch Serumentzug in der Ruhephase (G_0) des Zellzyklus arretiert ("synchronisiert") und anschließend für weitere 24 h mit den entsprechenden Substanzen stimuliert. $[^3\text{H}]$ -Thymidin (DuPont NEN, Dreieich) wurde 4 h vor Ablauf der Inkubationszeit zugesetzt (1 µCi/ml). Zur Aufarbeitung der Proben wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS (je 1 ml/Loch) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit eiskalter Perchlorsäure (0.3 M, 300 µl/Loch) für 2 min und ein erneuter Waschschrift mit PBS (1 ml/Loch). Durch die Säurebehandlung wurden Nukleinsäurepolymere mit einer Länge von mehr als etwa 20 Nukleotiden präzipitiert, so dass nicht-inkorporierte, radio-markierte Nukleotide abgetrennt werden

konnten. Abschließend wurden die Zellen durch Zugabe von NaOH (0.1 M, 300 µl/Loch) unter Schütteln im Wasserbad (37 °C, 30 min) solubilisiert. Die Überstände wurden quantitativ in Szintillationsgefäße (Packard Bioscience, Groningen, Niederlande) überführt und mit jeweils 5 ml Szintillationslösung (Lumasafe™ Plus, Lumac LSC, Groningen, Niederlande) versetzt. Die inkorporierte Radioaktivität wurde mittels Flüssigkeitsszintillations-Spektrometrie in einem LS6000IC / LS6500 Szintillations-Zähler (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) als Zerfälle pro Minute (*counts per minute*, cpm) quantifiziert. Jede Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Auswertung der Experimente wurde die nicht-stimulierte Kontrolle jeweils gleich 100 % gesetzt und alle übrigen Messwerte dazu in Relation gesetzt (% KON).

2.11 Bestimmung der Zellmigration

Die Migration von SMCs wurde in einem Mechanotransduktor-Assay (Weber et al., 2000) nachgewiesen. Dazu wurden bis zur Subkonfluenz kultivierte Zellen in 24-Loch-Platten für 24 h durch Serumentzug synchronisiert. Unmittelbar vor der Stimulation erfolgte die Zugabe von Hydroxyharnstoff (5 mM) für 15 min, um die Zellproliferation zu unterdrücken. Anschließend wurde mit einer sterilen Pipettenspitze (1 ml) ein etwa 1 mm breiter Spalt in die Zellschicht gekratzt und das Medium durch frisches Hungermedium ersetzt. Nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen wurde die Einwanderung der Zellen in den Spalt über einen Zeitraum von 72 – 96 h beobachtet. Zum Abstoppen des Versuches wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 5 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Nach Anfärben der Zellkerne mit dem Bisbenzimid H33258 (Hoechst-Farbstoff, Calbiochem, San Diego, USA) wurde die Zellmigration fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Der Migrationskanal wurde an einem repräsentativen Ausschnitt fotografiert und die eingewanderten Zellen ausgezählt. Zur Auswertung wurde die Migration der unbehandelten Kontrolle als 100 % definiert und alle übrigen Messwerte relativiert (% KON).

2.12 cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP)-Bestimmung

Zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration wurden die Zellen bis zur Konfluenz in 24-Loch-Platten kultiviert und 24 h vor der Messung durch Serumentzug

gehungert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit HBSS-Puffer gewaschen und mit 200 μ l Isobutylmethylxanthin (IBMX, 1 mM)-Lösung inkubiert (10 min, 37 °C). Anschließend erfolgte die Zugabe der entsprechenden Stimuli (Forskolin, Iloprost) und eine erneute Inkubation für 10 min bei 37 °C. Am Ende der Inkubationszeit wurde der Überstand abgesaugt und die Reaktion durch Zugabe von eiskaltem Ethanol (96 %) gestoppt. Nach Abdampfen des Alkohols (37 °C) wurden jeweils 300 μ l RIA-Puffer / Loch zugefügt und die Platte über Nacht zur vollständigen Lyse der Zellen bei –80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das Lysat entnommen, zentrifugiert, und der Gehalt an zyklischen Nukleotiden im Überstand mittels Radioimmuno-Assay (RIA) bestimmt (Steiner et al., 1972; Schröder und Schrör, 1993). Zur Proteinbestimmung wurden die lysierten Zellen mit NaOH (0.1 N, 200 μ l) versetzt und für 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Der Proteingehalt der Zellsuspension wurde anschließend mittels Bradford-Methode (vgl. Abschnitt 2.7.2) bestimmt. Der Gehalt an cAMP wurde in pmol cAMP / mg Protein x 10 min angegeben.

2.13 Statistik

Dargestellte Daten sind, soweit nicht anders gekennzeichnet, repräsentativ für mindestens drei unabhängige Versuche mit ähnlichem Ergebnis. Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwertes (SEM) von n Einzelexperimenten angegeben. Das Signifikanzniveau p für α wurde mit 0.05 festgelegt und Signifikanzunterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen wurden mittels One-Way Analysis of Variance (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test überprüft. Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit der GraphPad Prism-Software (Version 3.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) und/oder Microsoft Excel™ (Microsoft GmbH, Frankfurt).

3. Ergebnisse

3.1 Expression von Thrombin-Rezeptoren in arteriellen und venösen SMCs

Thrombin entfaltet seine zellulären Wirkungen spezifisch über die Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs) (Coughlin, 2000). In Abhängigkeit vom untersuchten Zelltyp können der Besatz an Thrombin-Rezeptoren und die entsprechend ausgelösten Signale stark variieren. In SMCs der humanen Vena saphena konnte bereits die funktionelle Expression des PAR-1 (Kanthou et al., 1995a), des PAR-3 (Bretschneider et al., 2003) und des PAR-4 (Bretschneider et al., 2001) nachgewiesen werden. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass PARs selbst einer transkriptionellen Regulation durch Thrombin unterliegen können (Zacharias et al., 1995; Bretschneider et al., 2003). Daher wurde zunächst (i) die Expression von PARs unter basalen Bedingungen und (ii) unter dem Einfluss von Thrombin und FXa in arteriellen und venösen SMCs untersucht.

3.1.1 Vergleich der basalen Expression

Mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide wurde die Expression des PAR-1, -3 und -4 in gehungerten SMCs (24 h Serumentzug) mittels RT-PCR untersucht. Hier ließen sich sowohl

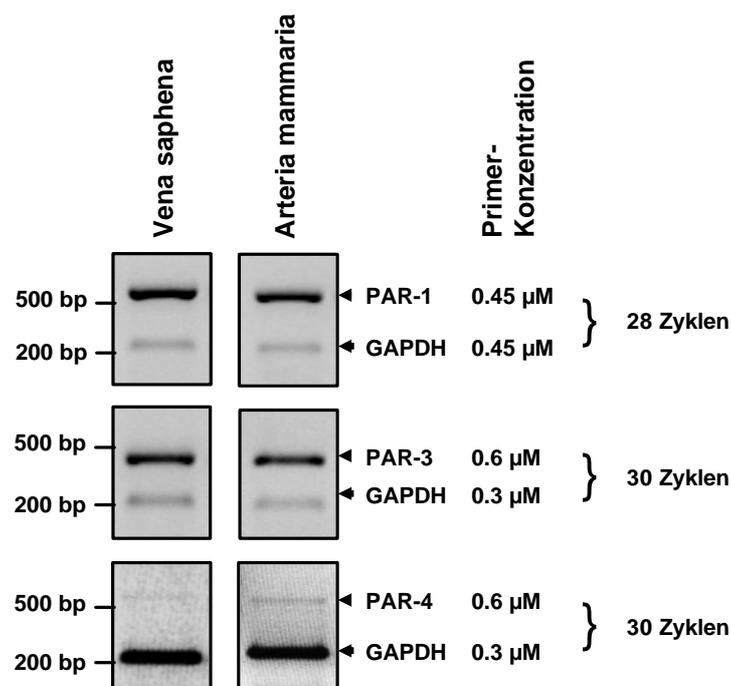


Abbildung 11

Bestimmung der basalen Expression von Thrombin-Rezeptoren in arteriellen und venösen SMC. Dargestellt sind repräsentative RT-PCR-Experimente von jeweils $n = 3$ unabhängigen Versuchen sowie zugehörige PCR-Bedingungen (Primer-Konzentrationen und Zyklenzahlen).

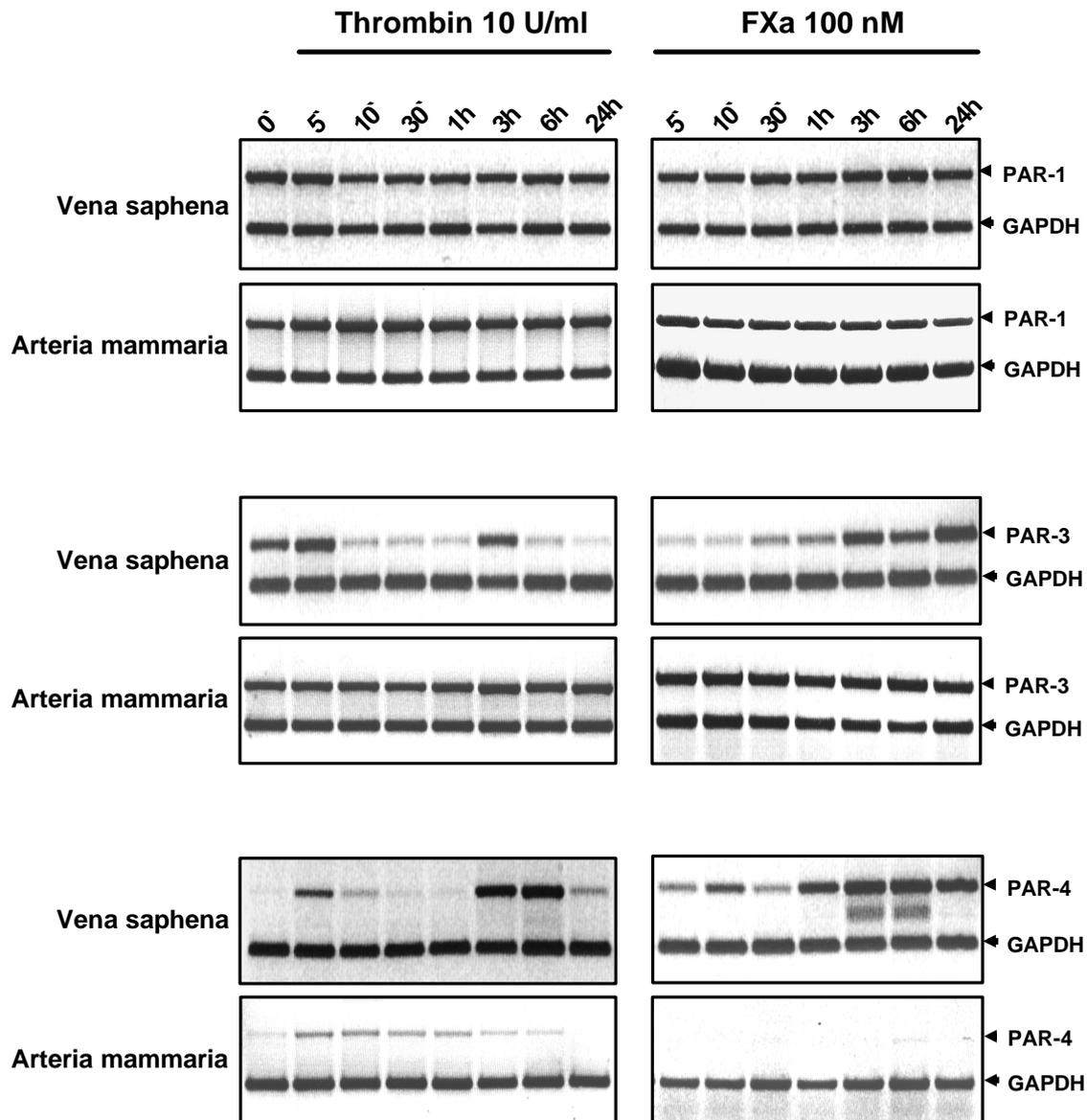
der PAR-1 und der PAR-3, als auch, in deutlich geringerem Maße, der PAR-4 nachweisen (Abb. 11). Unter Berücksichtigung der für die jeweilige Bestimmung verwendeten Primer-Konzentrationen und der Anzahl der durchlaufenen Zyklen, schien der PAR-1 auf arteriellen und venösen SMCs der dominierende Thrombin-Rezeptor zu sein. Hinsichtlich der basalen Expression der einzelnen PAR-Subtypen konnten keine Unterschiede zwischen beiden Zelltypen festgestellt werden.

3.1.2 Regulation durch Thrombin und FXa

Die Regulation der Genexpression des PAR-1, PAR-3 und PAR-4 unter dem Einfluss von Thrombin und FXa wurde über einen Zeitraum von 24 h bestimmt. Abb. 12 zeigt repräsentative Zeitkinetiken entsprechender RT-PCR-Experimente. Es war zu erkennen, dass die Expression des PAR-1 weder durch Thrombin (10 U/ml), noch durch FXa (100 nM) modifiziert wurde (Abb. 12 oben). Beide Koagulationsfaktoren besaßen ebenfalls keinen Einfluss auf das Expressionsniveau des PAR-3 in arteriellen Zellen. In venösen SMCs unterlag dieser Thrombin-Rezeptor allerdings einer recht komplexen Regulation (Abb. 12 mitte). Bereits nach 5 min führte Thrombin zu einer messbaren Zunahme der PAR-3-Expression, gefolgt von einer deutlichen Abnahme (10 – 60 min). Nach 3 h ließ sich PAR-3-mRNA erneut kurzzeitig feststellen und nach 24 h war der Rezeptor praktisch nicht mehr nachweisbar.

Auch der PAR-4 unterlag in venösen SMCs einer biphasischen Regulation durch Thrombin (Abb. 12 unten). Im Gegensatz zum PAR-3 kam es hier aber sowohl nach 5 min als auch nach 3 – 6 h zu einer Induktion, und auch nach 24 h war die Expression gegenüber der Kontrolle noch erhöht. Dagegen konnte in arteriellen Zellen nur eine marginale transiente PAR-4-Induktion nach 5 – 10 min demonstriert werden, die nach 3 – 6 h nahezu wieder verschwunden war (Abb. 12 unten). Auch FXa war in der Lage, die PAR-3- und PAR-4-Expression in venösen Zellen zu regulieren, während sie in arteriellen SMCs unter analogen Bedingungen nicht beeinflusst werden konnte (Abb. 12 mitte).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Thrombin-Rezeptoren in humanen SMCs einer ausgeprägten Regulation durch Thrombin, im Sinne einer positiven und negativen Rückkopplung, unterliegen können. Sie implizieren außerdem, dass grundlegende Unterschiede bezüglich der Regulation der Genexpression durch Thrombin und FXa zwischen arteriellen und venösen SMCs bestehen.

**Abbildung 12**

Regulation der PAR-1-, PAR-3- und PAR-4-Expression durch Thrombin und FXa in arteriellen und venösen SMC. Gezeigt sind repräsentative RT-PCR-Experimente von jeweils $n = 3$ Versuchen mit gleichem Ergebnis.

3.2 Thrombin-Rezeptor-vermittelte Signale

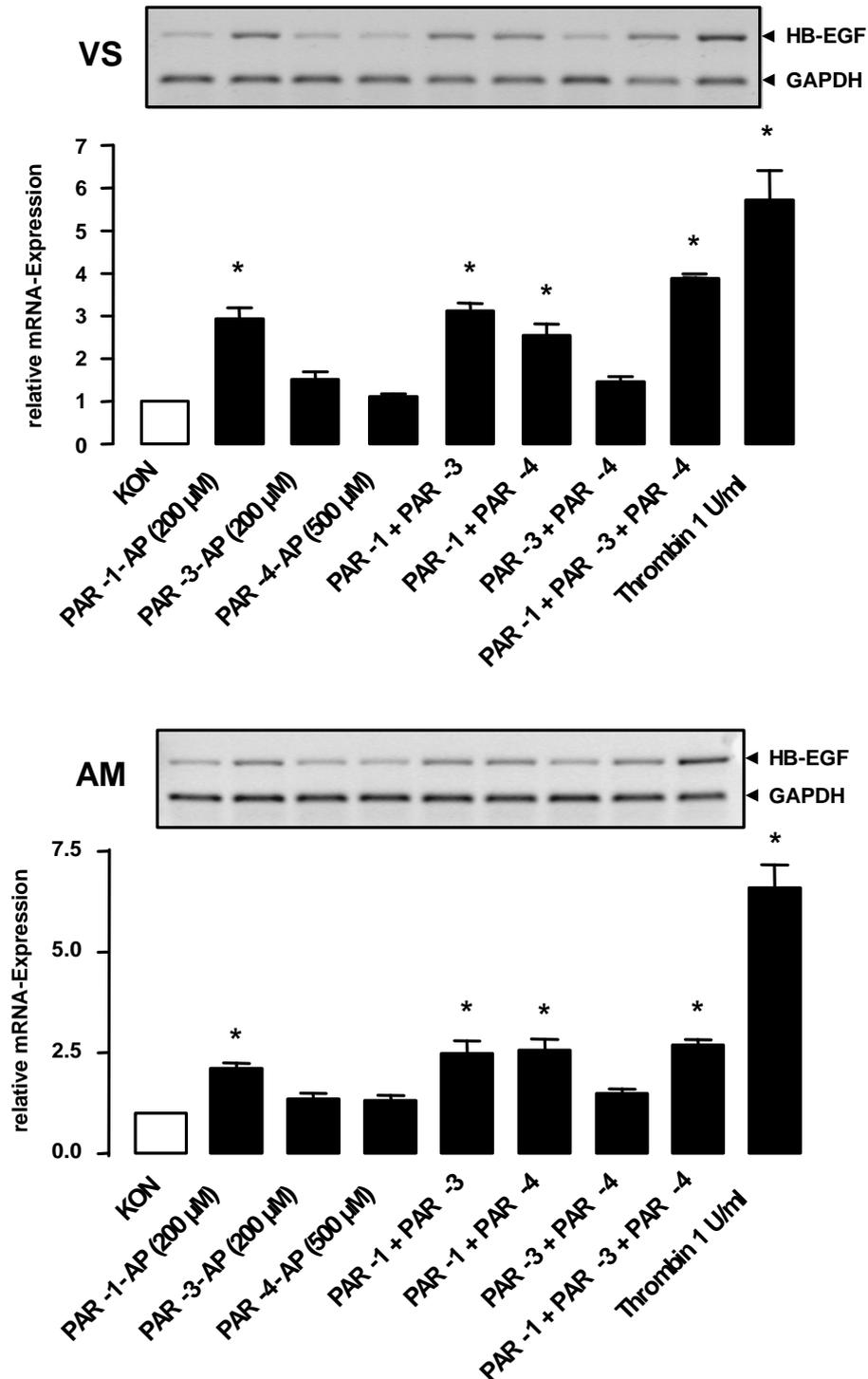
Unter Berücksichtigung der gezeigten unterschiedlichen Expression und Regulation einzelner Thrombin-Rezeptor-Subtypen, sollte als nächstes die Beteiligung von PARs an der Vermittlung von Thrombin-Signalen überprüft werden. Zur Untersuchung derartiger Fragestellungen hat sich der Einsatz selektiver PAR-aktivierender Peptide (AP) als nützlich erwiesen. Als funktionelle Parameter wurden die Thrombin-induzierte Genexpression von HB-EGF und die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) analysiert.

3.2.1 Einfluss PAR-aktivierender Peptide auf die HB-EGF-Genexpression

Da HB-EGF mit der Entstehung von Gefäßkrankheiten in Verbindung gebracht wird (Miyagawa et al., 1995; Nakata et al., 1996; Igura et al., 1996) und in nicht-humanen Zellsystemen als wichtiger Mediator für die Vermittlung von Thrombin-Wirkungen gilt (Prenzel et al., 1999; Kalmes et al., 2000), wurde der Einfluss verschiedener PAR-AP auf dessen Transkription hin untersucht. Hier zeigte sich, dass PAR-1-AP (SFLLRN, 200 µM) nach 3 h zu einer deutlichen Zunahme der HB-EGF-Genexpression führte (etwa 2- bis 3-fache Induktion gegenüber Kontrolle), während PAR-3-AP (TFRGAP, 200 µM) oder PAR-4-AP (AYPGQV, 500 µM) keinen Effekt zeigten (Abb. 13). Kombinationen von PAR-1-AP und weiteren PAR-AP (1 + 3, 1 + 4, 1 + 3 + 4) bewirkten ebenfalls eine signifikante Induktion, es zeigten sich jedoch keine synergistischen Effekte. Auch Thrombin (1 U/ml) führte zu einer Aufregulation der HB-EGF-Genexpression (Abb. 13). Es konnten keine Unterschiede zwischen arteriellen und venösen SMCs festgestellt werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung des PAR-1, nicht aber des PAR-3 oder PAR-4, an der Vermittlung der Thrombin-induzierten Expression von HB-EGF in humanen SMCs hin.

3.2.2 Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase 2 durch PAR-AP

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gehören zu einer Gruppe von Enzymen, die auf der Zelloberfläche oder in sezernierter Form perizelluläre Substrate proteolytisch spalten können (Übersicht in Sternlicht und Werb, 2001). Auf diese Weise regulieren MMPs eine Reihe biologischer Prozesse wie zum Beispiel die Zellmigration (Kenagy et al., 1997; Uzui et al., 2000). Auch die Thrombin-induzierte Migration von SMCs wird mit einer Aktivierung von MMPs in Verbindung gebracht (Galis et al., 1997; Oak et al., 2004). Daher wurde mittels Zymographie die Prozessierung der MMP-2-Vorstufe (Pro-MMP-2) zu MMP-2 im Thrombin-konditionierten Medium untersucht. Abb. 14a zeigt, dass neben Thrombin (10 U/ml) insbesondere die Ko-Inkubation von PAR-3- und PAR-4-AP bzw. PAR-1- und PAR-4-AP (je 200 µM) eine Aktivierung der MMP-2 bewirkte. PAR-1-AP dagegen zeigte keine signifikanten Effekte. FXa wurde in den Versuchen als Positiv-Kontrolle verwendet. Ein repräsentatives Zymographie-Gel ist in Abb. 14b dargestellt.

**Abbildung 13**

Einfluss von PAR-aktivierenden Peptiden (PAR-AP) und Thrombin auf die HB-EGF-Genexpression in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. Dargestellt sind repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung von $n = 3$ (VS/AM) unabhängigen Versuchen. * = $p < 0.05$ vs KON. Bei Behandlung der Zellen mit Kombinationen verschiedener PAR-AP wurden jeweils die Konzentrationen aus den Einzelstimulationen eingesetzt.

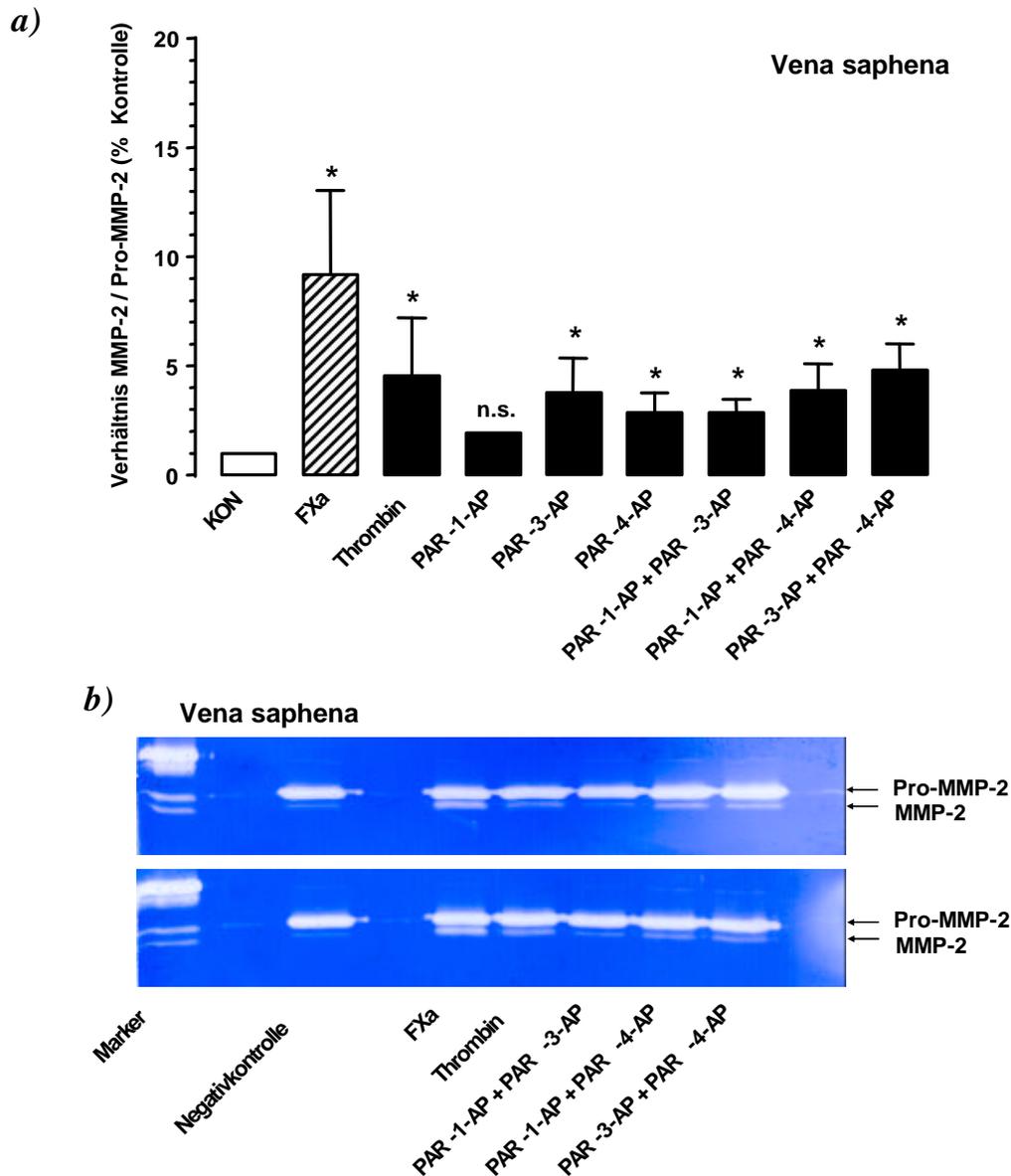


Abbildung 14

MMP-2-Aktivierung durch Thrombin (10 U/ml), FXa (100 nM) und PAR-aktivierende Peptide (PAR-AP, je 200 μ M) in venösen SMCs. a) Densitometrische Auswertung von $n = 1 - 8$ Versuchen (Mittelwert \pm SEM). * = $p < 0.05$ vs KON; n.s. = nicht signifikant vs KON. b) Repräsentative Zymographie-Gele.

3.2.3 Beteiligung von G_i -Proteinen

PARs koppeln an mindestens drei verschiedene G-Protein-Familien ($G_{12/13}$, G_q und G_i) und aktivieren nachfolgend multiple Signaltransduktionswege (Patterson et al., 2001). Um die Beteiligung von G_i -Proteinen an Thrombin-Signalen näher zu charakterisieren, wurde der Einfluss von Pertussis-Toxin (PTX) auf die Thrombin-induzierte HB-EGF-Genexpression untersucht. PTX ist in der Lage, spezifisch die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit von G_i -Proteinen zu katalysieren, wodurch eine Kopplung an den Rezeptor unmöglich wird (Katada

und Ui, 1982). Es zeigte sich, dass die Vorinkubation von PTX (10 ng/ml) für 18 h (McKenzie, 1992) in arteriellen und venösen Zellen zu einer partiellen Verminderung der Thrombin-induzierten HB-EGF-Expression führte (Abb. 15). Damit scheinen sowohl PTX-sensitive (G_i) als auch -insensitive (z.B. G_q) Signalwege an der Vermittlung der Thrombin-induzierten HB-EGF-Expression beteiligt zu sein.

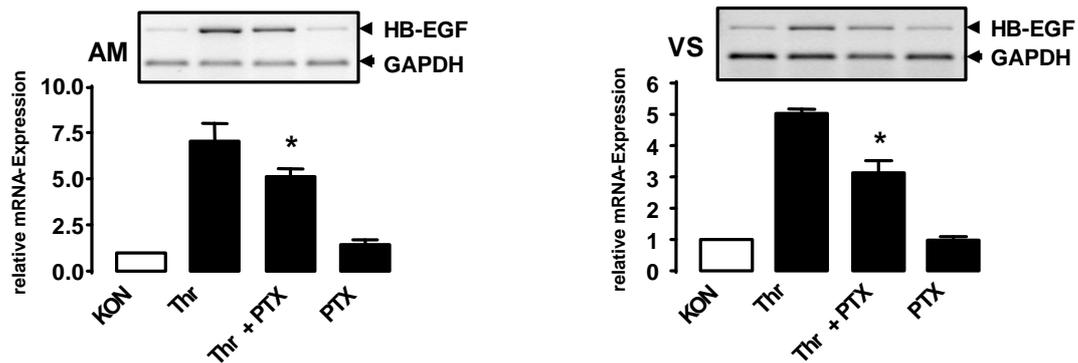


Abbildung 15

Einfluss von Pertussistoxin (PTX, 10 ng/ml) auf die Thrombin (Thr, 1 U/ml)-induzierte HB-EGF-Genexpression in venösen (VS, n = 3) und arteriellen (AM, n = 3) SMCs. * p < 0.05 vs Thr.

Abb. 16 zeigt schematisch die bisher gewonnenen Erkenntnisse über die in humanen SMCs ablaufenden Prozesse. Demnach führt Thrombin über eine Aktivierung des PAR-1 und unter Beteiligung PTX-sensitiver G_i -Proteine zu einer vermehrten Expression von HB-EGF. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse auf eine Beteiligung des PAR-3 und PAR-4 an der Aktivierung der MMP-2 hin. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten eine potentielle funktionelle Bedeutung von HB-EGF für die Vermittlung von Thrombin-Wirkungen und die an der Aufregulation von HB-EGF beteiligten intrazellulären Signaltransduktionswege näher untersucht werden.

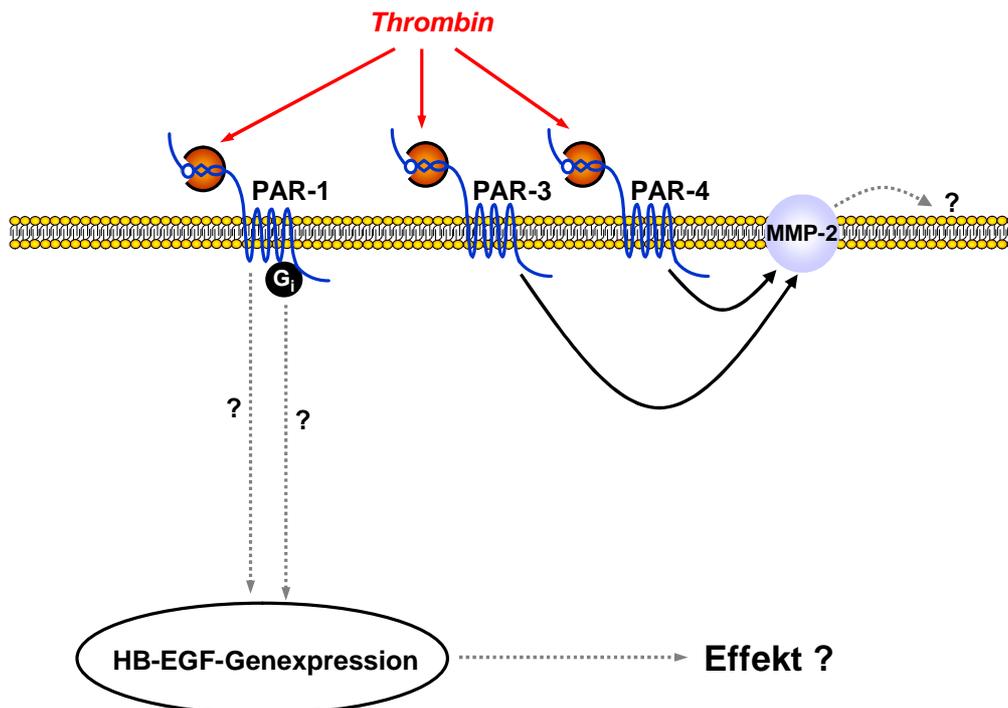


Abbildung 16

Schematische Darstellung PAR-vermittelter Thrombin-Signale in humanen SMCs.

3.3 Funktionelle Bedeutung von HB-EGF für Thrombin- und FXa-Wirkungen

Es wird heute angenommen, dass eine vermehrte Produktion und Freisetzung sekundärer Wachstumsfaktoren einen wichtigen Bestandteil zellulärer Thrombin- und auch FXa-Wirkungen darstellt (Stouffer und Runge, 1998; Patterson et al., 2001; Koo und Kim, 2003; Rauch et al., 2004). Über die Rolle von HB-EGF für die Vermittlung von Thrombin- und FXa-Wirkungen in humanen SMCs ist bislang nur wenig bekannt. Daher wurden zur Aufklärung einer potentiellen Funktion, und gleichzeitig zum indirekten Nachweis einer vermehrten HB-EGF-Proteinbildung, die Thrombin- und FXa-induzierte Migration und Proliferation in Anwesenheit neutralisierender anti-HB-EGF-Antikörper (5 µg/ml) untersucht. Da die unter Abschnitt 3.1 und 3.2 beschriebenen Ergebnisse keine Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation der HB-EGF-Expression in arteriellen und venösen Zellen ergeben haben, und da der PAR-1 als einzig möglicherweise beteiligter Rezeptor in beiden Zelltypen basal exprimiert und nicht reguliert wurde, sind die nachfolgenden Untersuchungen exemplarisch an venösen SMCs durchgeführt worden.

3.3.1 DNA-Synthese

Thrombin und FXa sind potente Mitogene für humane SMCs (Bretschneider et al., 2000). Als Mass für die Zellproliferation wurde die DNA-Synthese anhand des Einbaus von [^3H]-markiertem Thymidin in die zelluläre DNA bestimmt. Für 24 h gehungerte SMCs zeigten nur einen sehr geringen Thymidineinbau (Kontrolle = 100%), und durch Zugabe von Thrombin (1 U/ml) bzw. FXa (100 nM) kam es nach weiteren 24 h erwartungsgemäß zu einer deutlichen Zunahme der DNA-Synthese (etwa 4- bzw. 7.5-facher Anstieg gegenüber Kontrolle). Die Vorinkubation der HB-EGF-Antikörper hatte weder einen Einfluss auf die Thrombin-, noch auf die FXa-induzierte DNA-Synthese (Abb. 17). HB-EGF erwies sich in den Versuchen ebenfalls als potenter Stimulus der DNA-Synthese (etwa 6-facher Anstieg gegenüber Kontrolle), dessen mitogene Aktivität durch die Antikörper nahezu vollständig gehemmt wurde (Abb. 17). Diese Ergebnisse belegen demnach die neutralisierende Wirkung der verwendeten Antikörper und zeigen, dass HB-EGF nicht an der Vermittlung der Thrombin- oder FXa-induzierten Proliferation beteiligt zu sein scheint.

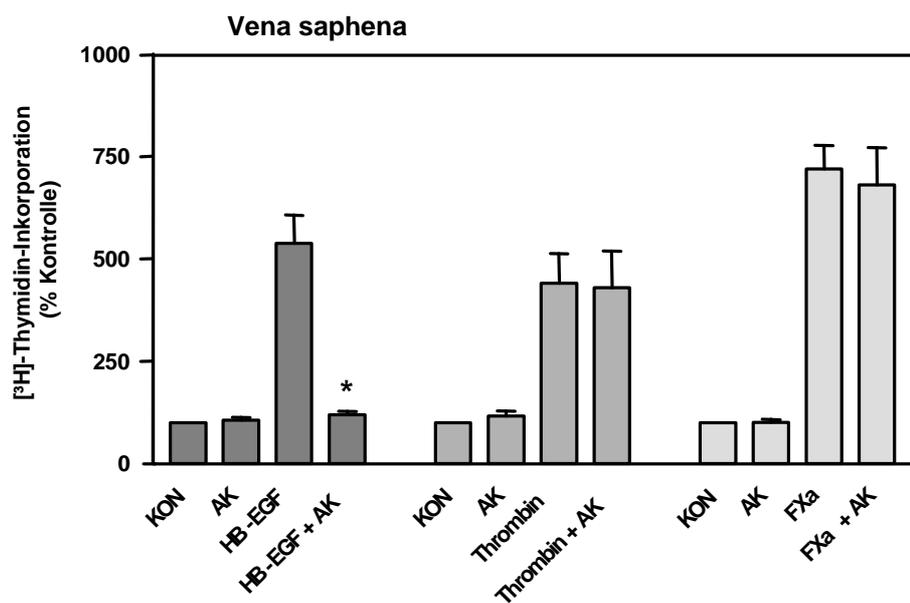


Abbildung 17

Einfluss neutralisierender anti-HB-EGF-Antikörper (AK, 5 $\mu\text{g/ml}$) auf die Thrombin (1 U/ml)-, FXa (100 nM)- und HB-EGF (1 ng/ml)-vermittelte DNA-Synthese in venösen SMCs. Dargestellt sind relative Mittelwerte \pm SEM von $n = 4 - 6$ Experimenten (Kontrolle = 100 %). * = $p < 0.05$ vs HB-EGF.

3.3.2 Zellmigration

In kultivierten SMCs führen Thrombin und FXa zu einer Zunahme der Zellmigration (Sato et al., 1997). Der Einfluss der neutralisierenden Antikörper auf die Migration wurde in einem Mechanotransduktorassay untersucht. Hierzu wurde eine Monoschicht kultivierter SMCs mit Hilfe einer Pipettenspitze spaltförmig verletzt und die Einwanderung der angrenzenden Zellen in diesen Spalt über einen Zeitraum von 72 – 96 h verfolgt. Nach Abstoppen des Versuches wurden die Zellen durch Kernfärbung visualisiert und ausgezählt. Abb. 18a zeigt jeweils ausschnittsweise die mikroskopischen Aufnahmen eines repräsentativen Experiments. Es ist zu erkennen, dass nicht-stimulierte Kontrollzellen nach 72 – 96 h nahezu keine migratorische Aktivität zeigten, während eine Stimulation mit Thrombin (10 U/ml) oder FXa (100 nM) jeweils eine deutliche Zunahme der in den Migrationskanal eingewanderten Zellen bewirkte. In Anwesenheit der HB-EGF-Antikörper wurde sowohl die Thrombin- als auch FXa-induzierte Zellmigration vermindert (Abb. 18a). Die statistische Auswertung der Versuche ergab jeweils eine signifikante Reduktion der eingewanderten Zellen (Abb. 18b). HB-EGF selbst führte zu einer etwa 3-fachen Zunahme der Zellmigration, die in Anwesenheit der Antikörper nahezu vollständig blockiert wurde (Abb. 18a und 18b). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass HB-EGF in humanen SMCs an der Vermittlung der Thrombin- und FXa-induzierten Zellmigration beteiligt ist.

3.3.3 Signaltransduktion (ERK-1/2-Phosphorylierung)

Die Effekte der neutralisierenden anti-HB-EGF-Antikörper auf die Thrombin- und FXa-induzierte Signaltransduktion wurde beispielhaft anhand der Phosphorylierung der *extracellular signal-regulated protein kinase 1/2* (ERK-1/2) im Western Blot untersucht. Auch hier zeigten die Antikörper keinen Einfluss auf die Thrombin- oder FXa-induzierte Aktivierung des ERK-Weges (Abb. 19). Dagegen konnte eine ausgeprägte HB-EGF-vermittelte Phosphorylierung der ERK-1/2 festgestellt werden, die sich wiederum durch die Antikörper erwartungsgemäß hemmen ließ.

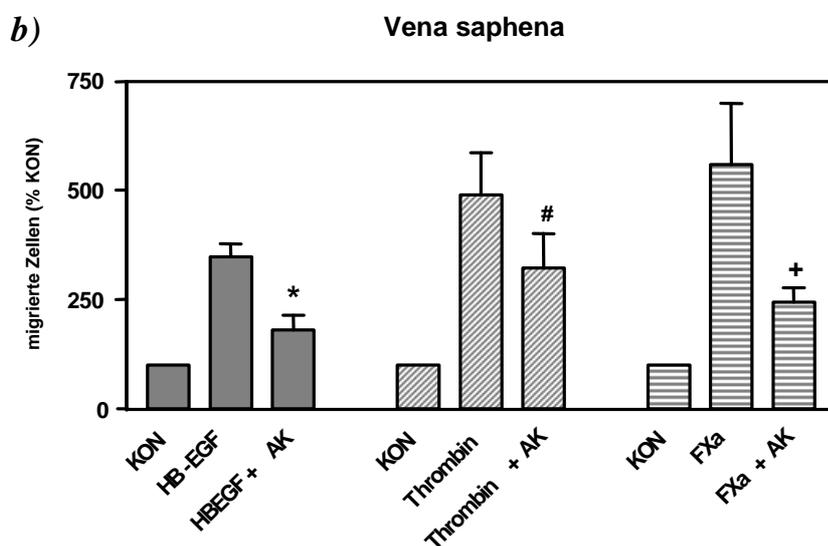
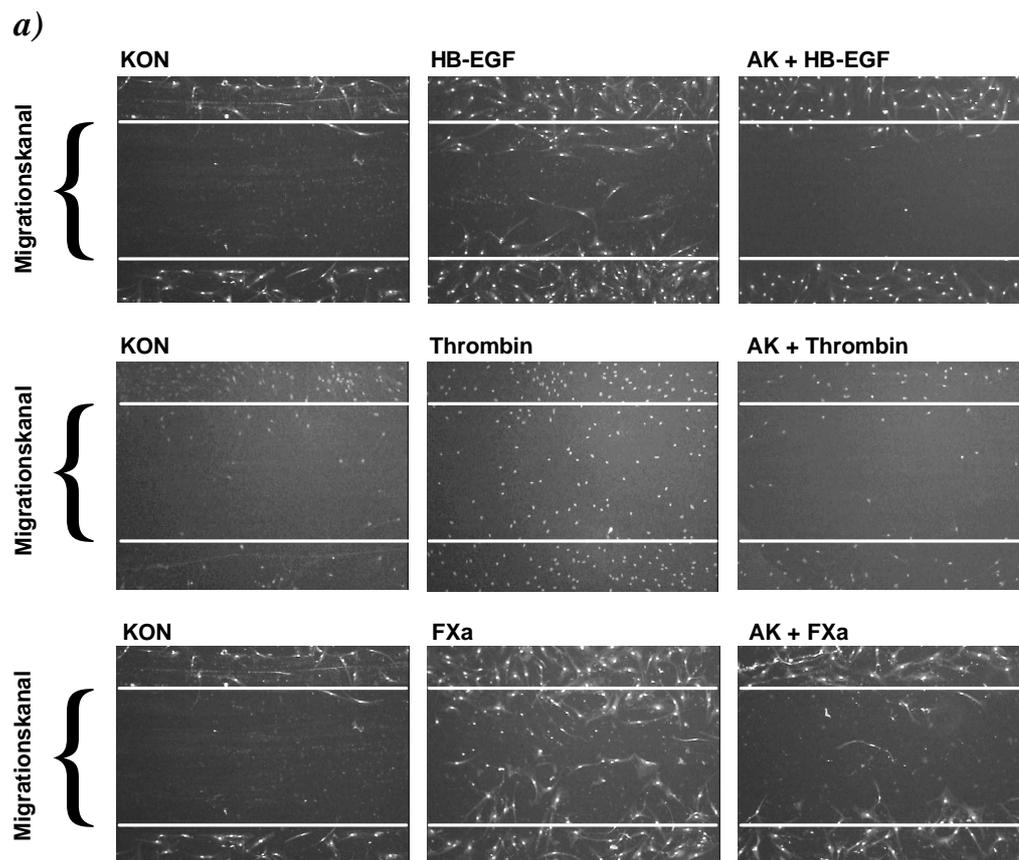
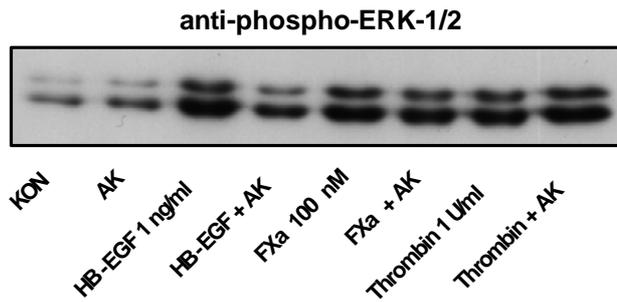


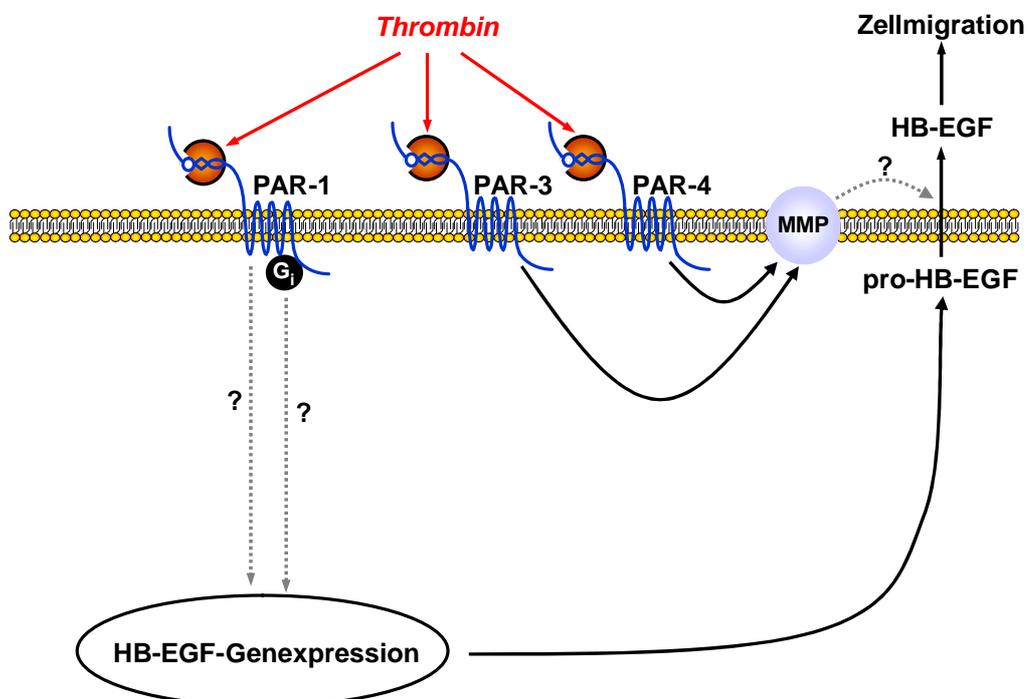
Abbildung 18

Einfluss neutralisierender anti-HB-EGF-Antikörper (AK, 5 µg/ml) auf die Thrombin (10 U/ml)-, FXa (100 nM)- und HB-EGF (25 ng/ml)-induzierte Zellmigration in venösen SMCs. a) Repräsentative Experimente. b) Statistische Auswertung von n = 5 - 8 Versuchen (Mittelwerte ± SEM). * = p < 0.05 vs HB-EGF; # = p < 0.05 vs Thrombin; + = p < 0.05 vs FXa.

**Abbildung 19**

Einfluss neutralisierender anti-HB-EGF-Antikörper (AK, 5 µg/ml) auf die Thrombin (1 U/ml)-, FXa (100 nM)- und HB-EGF (1 ng/ml)-induzierte ERK-1/2-Phosphorylierung in venösen SMCs. Dargestellt ist ein repräsentatives Western Blot-Experiment von n = 2 - 5 Versuchen mit gleichem Ergebnis.

Insgesamt implizieren die unter Abschnitt 3.3 dargestellten Ergebnisse, dass sowohl Thrombin als auch FXa, zumindest zum Teil, migratorische, nicht aber proliferative Wirkungen über eine Freisetzung von HB-EGF entfalten. Möglicherweise beruht eine vermehrte Freisetzung auf einer erhöhten Gen- und Proteinexpression des Wachstumsfaktors. Dabei könnten durch Thrombin aktivierte MMPs zur Abspaltung von HB-EGF aus Membranverankertem pro-HB-EGF beitragen (Abb. 20).

**Abbildung 20**

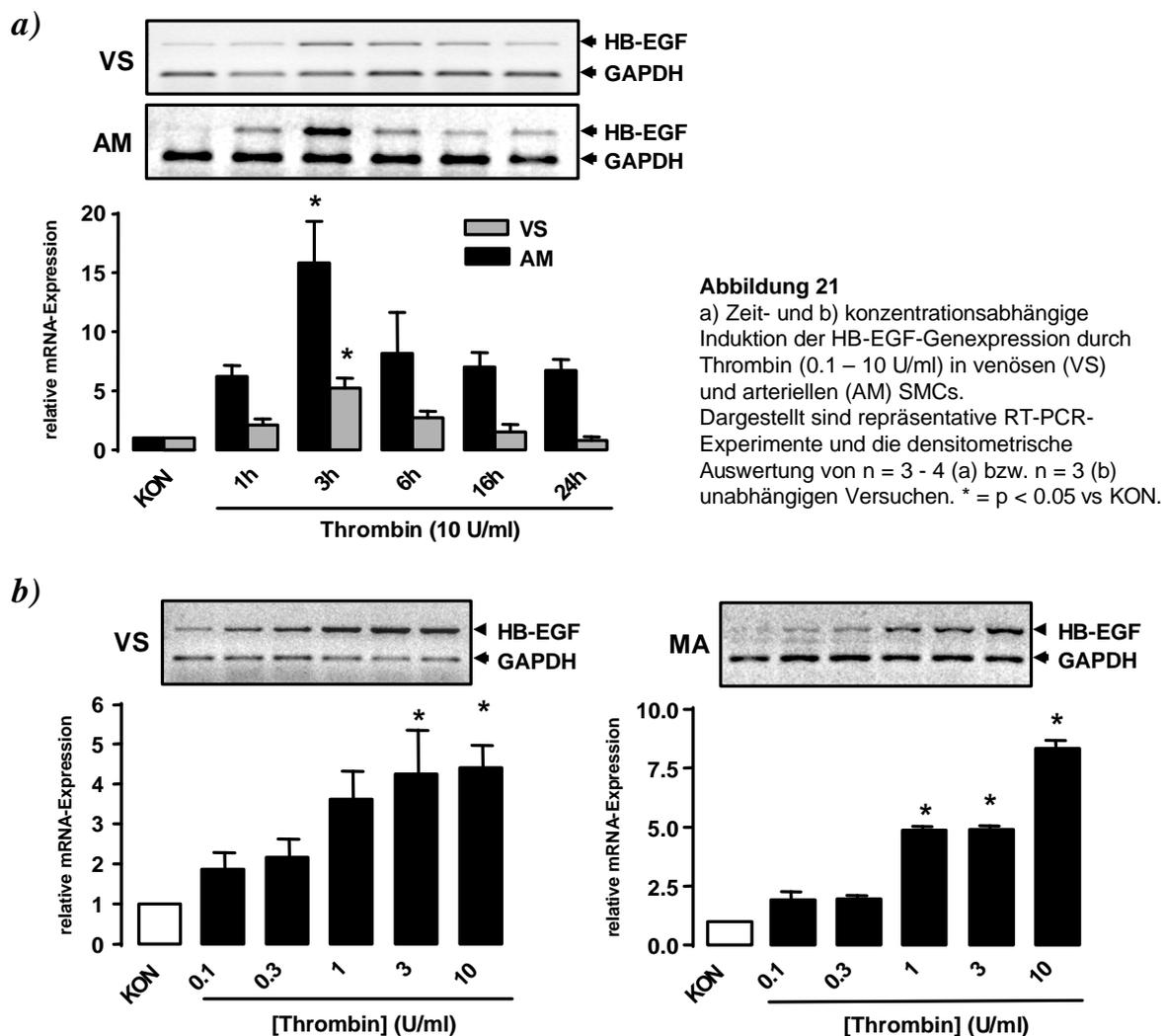
Schematische Darstellung eines möglichen Mechanismus zur Vermittlung migratorischer Thrombin-Wirkungen durch HB-EGF in humanen SMCs.

3.4 Untersuchungen zum Mechanismus der HB-EGF-Transkription

Bislang ist hinsichtlich der relativen Bedeutung mitogener Post-Rezeptor-Signaltransduktionswege für migratorische und proliferative Thrombin-Wirkungen in humanen SMCs wenig bekannt. Auf dem Hintergrund der postulierten Beteiligung von HB-EGF an der Vermittlung der Thrombin-induzierten Zellmigration sollten daher die an der Aufregulation von HB-EGF beteiligten Signalwege in arteriellen und venösen SMCs charakterisiert werden. Im Vorfeld dazu wurden zunächst Zeit- und Konzentrationsverläufe für die Induktion ermittelt.

3.4.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit

Die Kinetik der Induktion wurde in gehungerten arteriellen und venösen SMCs über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Thrombin (10 U/ml) bewirkte eine transiente Aufregulation der HB-EGF-Genexpression mit einem Maximum nach 3 h (Abb. 21a). Arterielle Zellen zeigten



im Vergleich mit venösen auch 24 h nach Stimulation gegenüber der Kontrolle noch leicht erhöhte mRNA-Spiegel. Gemessen an den Veränderungen der relativen mRNA-Expression schien die Induktion in arteriellen Zellen gegenüber venösen stärker zu sein (etwa 15-facher / 6-facher Anstieg nach 3 h gegenüber Kontrolle). Auch FXa (100 nM) führte in venösen SMCs zeitabhängig zu einer transienten Aufregulation der HB-EGF-Genexpression (Abb. 22). Experimente mit steigenden Thrombin-Konzentrationen (0.1 – 10 U/ml) ergaben in beiden Zelltypen eine konzentrationsabhängige Induktion, wobei deutliche Effekte bereits mit Thrombin in einer Konzentration von 1 U/ml erzielt wurden. Die in den Versuchen eingesetzte maximale Konzentration von 10 U/ml resultierte in einer maximalen Induktion der Genexpression (Abb. 21b).

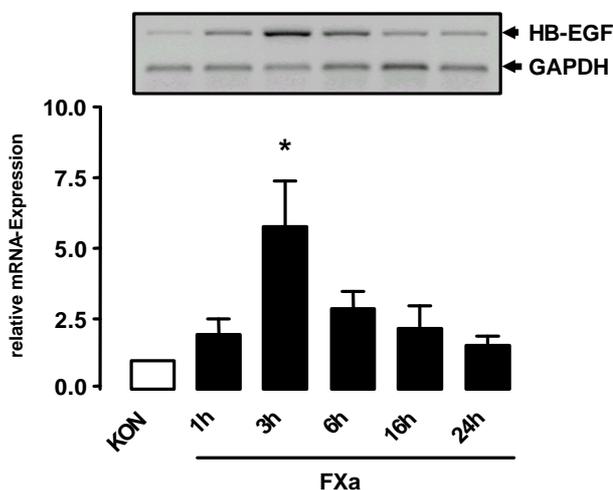


Abbildung 22

Zeitabhängige Induktion der HB-EGF Genexpression durch FXa (100 nM) in venösen SMCs.

Gezeigt ist ein repräsentatives RT-PCR-Experiment und die densitometrische Auswertung von n = 3 Versuchen.

* = p < 0.05 vs KON.

3.4.2 Einfluss von Actinomycin-D auf die Thrombin-induzierte HB-EGF-Expression

Die erhöhte Genexpression von HB-EGF könnte auf eine vermehrte *de novo*-Synthese, oder auf eine Stabilisierung bereits transkribierter mRNA zurückzuführen sein. Um zwischen beiden Mechanismen zu differenzieren, wurde die Genexpression in Anwesenheit eines Transkriptions-Inhibitors (Actinomycin-D) gemessen. Actinomycin-D (5 µg/ml) war in der Lage, die Thrombin-induzierte HB-EGF-Expression in arteriellen und venösen SMCs vollständig zu hemmen (Abb. 23). Dies deutet ausschließlich auf eine vermehrte *de novo*-Synthese von mRNA hin.

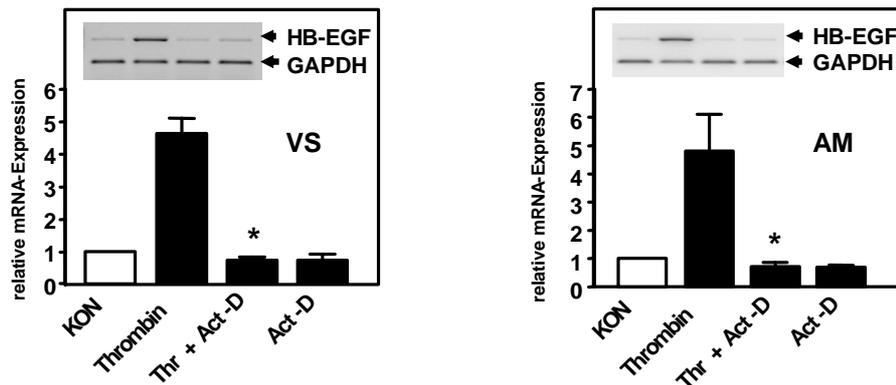


Abbildung 23

Einfluss von Actinomycin-D (Act-D, 5 µg/ml) auf die Thrombin (Thr)-vermittelte HB-EGF-Genexpression in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. Gezeigt sind repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung von jeweils n = 3 Versuchen. * = p < 0.05 vs Thrombin.

3.4.3 Beteiligung mitogener Post-Rezeptor-Signaltransduktionswege

Die durch Thrombin nach Rezeptor-Stimulation aktivierten, G-Protein-abhängigen Signaltransduktionswege sind durch Studien am PAR-1 mittlerweile sehr gut charakterisiert (Macfarlane et al., 2001). Zu den wichtigsten Thrombin-aktivierten Signalwegen zählen der Phospholipase C (PLC) – Calcium – Proteinkinase C (PKC) – Weg, der Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase – Akt – Weg und der MAPK – Weg (Hirano und Kanaide, 2003). Die der Thrombin-induzierten HB-EGF-Genexpression in humanen SMCs zugrundeliegenden Signaltransduktionswege sind bislang praktisch nicht untersucht worden.

3.4.3.1 PLC- / Calcium- / PKC-Weg

Thrombin ist in der Lage, über eine G_{α_q} -vermittelte Stimulation der PLC die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat zu katalysieren, was zur Bildung der sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), und im weiteren Verlauf zur Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration sowie zur Aktivierung der PKC führt. Um die Bedeutung dieses Signalweges näher zu charakterisieren, wurden der spezifische PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid IX (Ro 31-8220) sowie der Membranpermeable Calcium-Chelator BAPTA/AM eingesetzt. Sowohl Ro 31-8220 (0.1 µM) als auch BAPTA/AM (100 µM) waren in der Lage, in arteriellen und venösen SMCs die Thrombin-induzierte HB-EGF-Expression vollständig zu blockieren (Abb. 24a und 24b). Ferner führte Phorbol-myristat-acetat (PMA, 10 nM), ein direkter Aktivator der PKC, nach 3 h ebenfalls zu

einer deutlichen Induktion (8- bis 12-facher Anstieg gegenüber Kontrolle), die erwartungsgemäß in Anwesenheit von Ro 31-8220 vollständig gehemmt wurde (Abb. 24b).

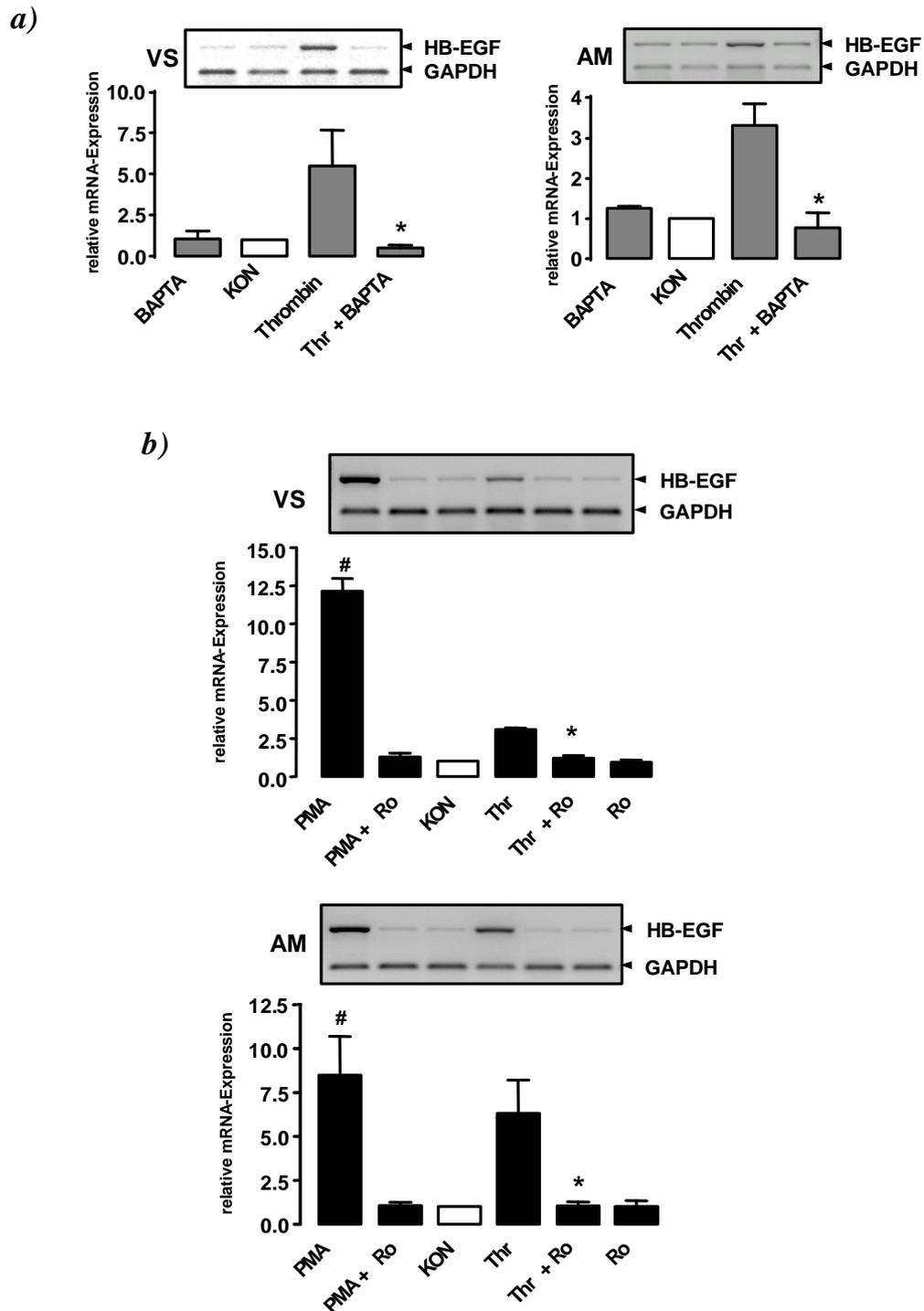


Abbildung 24

Untersuchungen zur Beteiligung des PKC-Calcium-Weges an der Aufregulation der HB-EGF-Expression in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. a) Einfluss von BAPTA/AM (100 μ M) auf die Thrombin (Thr, 1 U/ml)-induzierte HB-EGF-Genexpression. b) Einfluss des PKC-Inhibitors Ro 31-8220 (Ro, 0.1 μ M) auf die Thrombin (Thr, 1 U/ml)- und PMA (10 nM)-induzierte HB-EGF-Genexpression. Dargestellt sind jeweils repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung von (a) $n = 4$ (VS) / $n = 3$ (AM) und (b) $n = 3$ (VS/AM) unabhängigen Versuchen. * = $p < 0.05$ vs Thr; # = $p < 0.05$ vs KON.

3.4.3.2 p42/44-MAPK-Weg

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) gehören zur Familie der Serin- / Threoninkinasen und besitzen eine ubiquitäre Bedeutung für die Transmission von Wachstums- und Differenzierungssignalen nach Aktivierung von GPCRs (Cobb et al., 1991). Thrombin ist ein potenter Aktivator der zu dieser Familie gehörenden p42/44-MAPK (ERK-1/2) (Bretschneider et al., 2001). Die direkte Phosphorylierung der ERK-1/2 wird von der vorgeschalteten MAPK-Kinase (MEK-1/2) katalysiert. Die Rolle des ERK-1/2-Weges wurde daher mit Hilfe des selektiven MEK-1-Inhibitors PD98059 untersucht. PD98059 (1 - 100 μ M) führte sowohl in arteriellen als auch in venösen SMCs konzentrationsabhängig zu einer Verminderung der Thrombin-induzierten HB-EGF-Expression (Abb. 25).

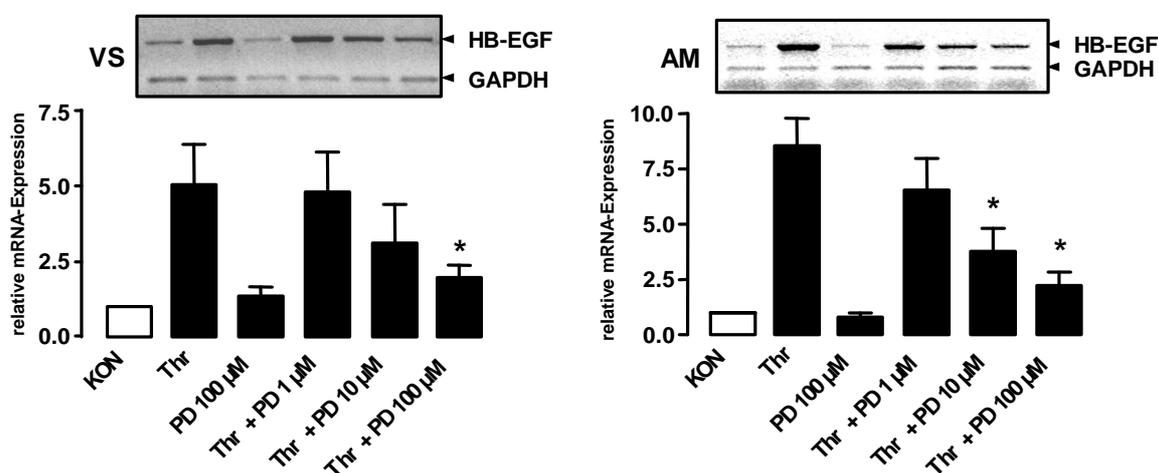


Abbildung 25

Einfluss des MEK-1-Inhibitors PD98059 (PD, 1-100 μ M) auf die auf die Thrombin (Thr, 1 U/ml)-induzierte HB-EGF-Genexpression in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. Dargestellt sind repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung von n = 4 (VS) bzw. n = 3 - 5 (AM) Versuchen. * = p < 0.05 vs Thr.

3.4.3.3 p38-MAPK-Weg

Die p38-MAPK gehört zu den neueren Mitgliedern der MAPK-Familie, die im Gegensatz zur ERK-1/2 vor allem durch zelluläre Stressfaktoren, wie inflammatorische Zytokine (Interleukin-1 β / TNF α) oder reaktive Sauerstoff-Verbindungen, aktiviert wird und daher auch als Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) bezeichnet wird (Force et al., 1996; Kyriakis und Avruch, 2001). In jüngeren Arbeiten konnte in SMCs auch eine Aktivierung dieser Kinase durch Thrombin (Kanda et al., 2001b; Wang et al., 2004) gezeigt werden. Wie Abb. 26 zu entnehmen ist, hatte der selektive p38-MAPK-Inhibitor SB203580 (0.1 - 10 μ M)

weder in arteriellen noch in venösen Zellen einen Einfluss auf die Thrombin-induzierte HB-EGF-Genexpression.

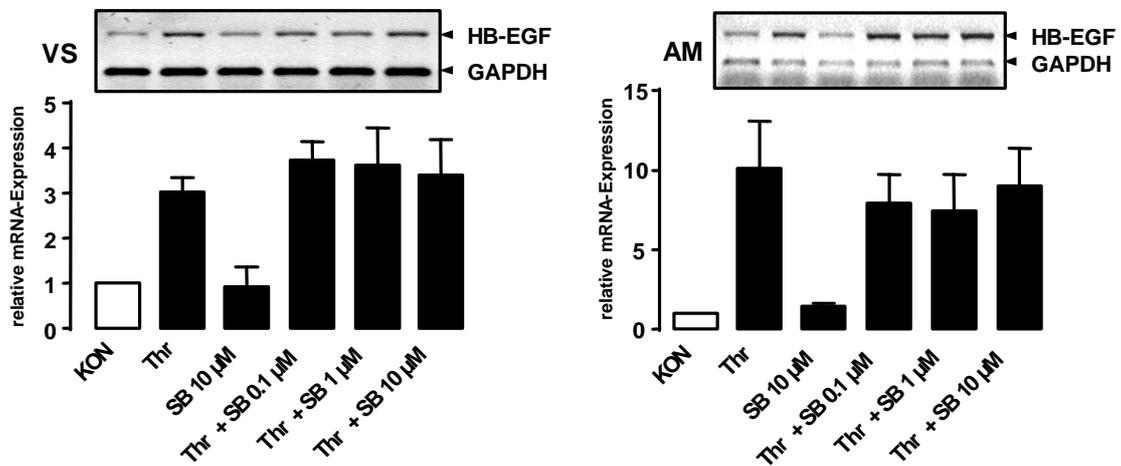


Abbildung 26

Einfluss des p38-MAPK-Inhibitors SB203580 (SB, 0.1 - 10 µM) auf die Thrombin (Thr, 1 U/ml)-induzierte HB-EGF-Genexpression in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. Dargestellt sind repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung von n = 3 (VS) bzw. n = 4 (AM) Versuchen. * = p < 0.05 vs Thr.

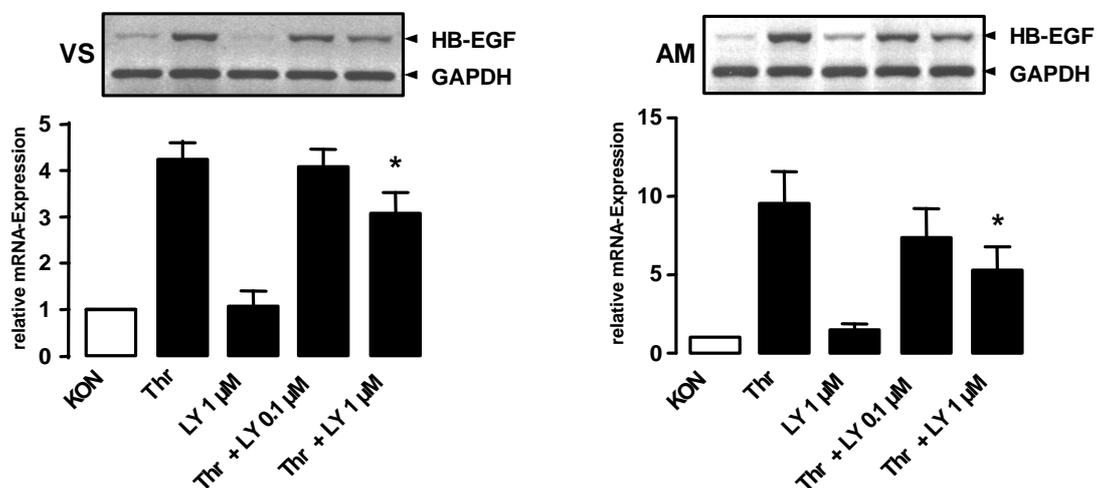


Abbildung 27

Einfluss des PI3-Kinase-Inhibitors LY294002 (LY, 0.1-1 µM) auf die auf die Thrombin (Thr, 10 U/ml)-induzierte HB-EGF-Genexpression in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. Dargestellt sind repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung von jeweils n = 4 (VS/AM) unabhängigen Versuchen. * = p < 0.05 vs Thr.

3.4.3.4 PI3-Kinase-Weg

PI3-Kinasen repräsentieren eine Familie von Enzymen, die an wichtigen Signaltransduktionsprozessen wie Zellwachstum, -überleben und -proliferation beteiligt sind (Cantley, 2002). Dabei handelt es sich um in mehrere Klassen einteilbare heterodimere

Proteine, die sich aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen (p85) Untereinheit zusammensetzen (Vanhaesebroeck et al., 1997; Fruman et al., 1998). Eines der wichtigsten nachgeschalteten Zielproteine der PI3-Kinase ist die Serin-Threonin-Kinase Akt (Proteinkinase B, PKB). Um die Bedeutung dieses Signalweges zu untersuchen, wurde der selektive PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 verwendet (Vlahos et al., 1994), der reversibel mit der ATP-Bindungsstelle des Enzyms interagiert. Es zeigte sich, dass die Vorinkubation mit LY294002 (0.1 – 1 μM) zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Thrombin-induzierten HB-EGF-Genexpression führte (Abb. 27).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass multiple intrazelluläre Signalwege, darunter der Calcium-PKC-, der ERK-1/2- und der PI3-Kinase/Akt-Weg, an der Thrombin-vermittelten Aufregulation der HB-EGF-Expression beteiligt sind. Der p38-MAPK-Weg scheint dagegen nicht involviert zu sein. Es ließen sich keine Unterschiede zwischen venösen und arteriellen SMCs feststellen. Basierend auf den bisherigen Befunden sind die in humanen SMCs ablaufenden Mechanismen in Abb. 28 zusammengefasst.

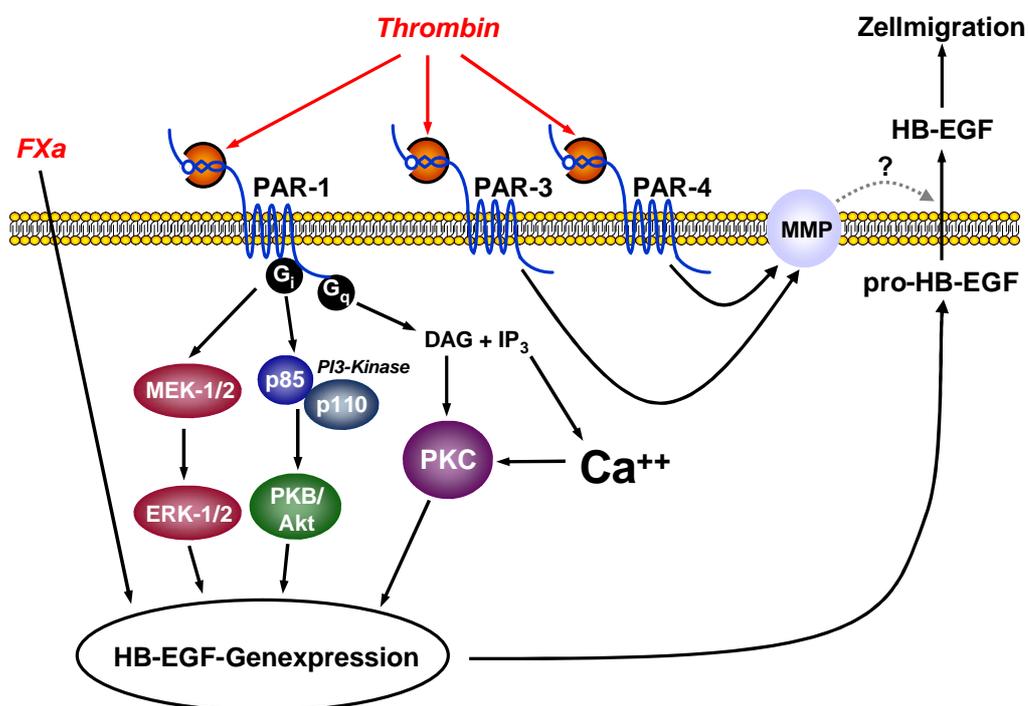


Abbildung 28

Schematische Darstellung der an der Thrombin-induzierten HB-EGF-Genexpression beteiligten intrazellulären Signaltransduktionswege.

3.5 Microarray-Analysen mit Thrombin und FXa in venösen SMCs

Bis heute konnten bereits zahlreiche Signalmoleküle (z.B. Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren, Protein-Kinasen, Integrine) identifiziert werden, die eine Bedeutung für die Vermittlung von Thrombin-Wirkungen in SMCs besitzen (Patterson et al., 2001). Da anzunehmen ist, dass weitere bislang nicht identifizierte sekundäre Mediatoren existieren, und aufgrund der Tatsache, dass systematische Studien bezüglich des Genexpressionsmusters von Thrombin und FXa in humanen SMCs in der Literatur bislang nicht publiziert sind, sollten im Rahmen dieser Arbeit, neben HB-EGF, neue Thrombin- und FXa-assoziierte Faktoren auf Genebene mittels Microarray-Analyse identifiziert werden. Unter Verwendung eines HG-U133A-Gen-Chips (Affymetrix) konnte gleichzeitig das Expressionsniveau von insgesamt 22283 Genen bestimmt werden, wobei insgesamt 3 Chips hybridisiert wurden (Chip 1: Kontrolle, nicht stimuliert = KON; Chip 2: Thrombin 10 U/ml, 6 h = THR; Chip 3: FXa 100 nM, 6 h = FXa).

3.5.1 Vergleichende Genexpressionsanalyse

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene unter dem Einfluss von Thrombin und FXa wurde eine vergleichende Genexpressionsanalyse der Array-Experimente durchgeführt. Dabei wurde jeweils das Kontroll-Experiment mit einem Stimulations-Experiment (Thrombin oder FXa) verglichen. Von insgesamt 22283 Genen zeigten 1193 / 830 Gene (THR vs KON / FXa vs KON) Veränderungen im Expressionsmuster, wobei 130 / 54 Gene eine mehr als 2-fache Änderung des Expressionsniveaus aufwiesen. 45 / 23 Gene wurden auf-, 85 / 31 Gene herabreguliert. Die folgenden Tabellen fassen die Ergebnisse der vergleichenden Genexpressionsanalyse zusammen. Die Klassifizierung der Gene erfolgte nach biologischen Funktionen.

Tabelle 11. Differentiell exprimierte Gene in Thrombin (10 U/ml, 6h)- behandelten venösen SMCs. Grau hinterlegte Gene wurden sowohl durch Thrombin als auch durch FXa³ 2-fach reguliert, Gene in fetter Schrift wurden nur durch Thrombin reguliert (FXa no change). FC = x-fache Änderung der Genexpression gegenüber Kontrolle. Gene, die für hypothetische Proteine kodieren oder aufgrund einer unbekanntenen Funktion nicht-klassifizierbar waren, sind nicht aufgeführt.

Acc.-Nr	Bezeichnung des Gens (Probe Set ID)	Synonym	FC
Metabolismus / Biosynthese			
NM_002065	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase) (200648_s_at)	GLUL	+ 2.0
AD000092	phenylalanine-tRNA synthetase-like (216602_s_at)	FARSL	+ 8.0
BC005980	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1 (UBC4/5 homolog, yeast) (211764_s_at)	UBE2D1	+ 2.3
NM_020674	cytochrome P450, family 20, subfamily A, polypeptide 1 (219565_at)	CYP20A1	+ 2.0
AI189359	mevalonate (diphospho) decarboxylase (203027_s_at)	MVD	- 2.1
NM_002661	phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific) (204613_at)	PLCG2	- 2.0
NM_002130	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble) (205822_s_at)	HMGCS1	- 2.0
AF201385	thioredoxin reductase 2 (210803_at)	TXNRD2	- 2.1
Hämostase			
U08839	plasminogen activator, urokinase receptor (210845_s_at)	PLAUR	+ 2.6
AY029180	plasminogen activator, urokinase receptor (211924_s_at)	PLAUR	+ 2.1
NM_002575	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (204614_at)	SERPINB2	+ 2.6
Apoptose / Zelltod			
NM_002575	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (204614_at)	SERPINB2	+ 2.6
BG260394	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor) (204466_s_at)	SNCA	- 2.0
NM_021158	chromosome 20 open reading frame 97 (218145_at)	C20orf97	- 2.0
Prostaglandine			
NM_000963	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (204748_at)	COX2	+ 2.1
Zytokine / Entzündung			
NM_004591	chemokine (C-C motif) ligand 20 (205476_at)	CCL20	+ 3.0
NM_003810	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 (202688_at)	TNFSF10	- 2.0
NM_002985	chemokine (C-C motif) ligand 5 (204655_at)	CCL5	- 2.0
AI421071	chemokine (C-C motif) receptor (205098_at)	CCR1	- 2.0
NM_000878	interleukin 2 receptor, beta (205291_at)	IL2RB	- 2.3
M57731	chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (209774_x_at)	CXCL2	- 2.0
Rezeptoren			
NM_002837	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B (205846_at)	PTPRB	+ 2.6
NM_000916	oxytocin receptor (206825_at)	OXTR	+ 2.0
X03348	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor) (216321_s_at)	NR3C1	+ 2.1
NM_016639	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A (218368_s_at)	TNFRSF1	+ 2.1

AI861942	low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia) (202067_s_at)	LDLR	- 2.0
NM_001036	ryanodine receptor 3 (206306_at)	RYR3	- 2.3
NM_002042	gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, rho 1 (206525_at)	GABRR1	- 2.3
NM_000909	neuropeptide Y receptor Y1 (205440_s_at)	NPY1R	- 2.3
AF035307	plexin C1 (serine protease inhibitor) (PLXNC1) (213241_at)	PLXNC1	- 7.5
NM_000798	dopamine receptor D5 (adenylate cyclase activating pathway) (208486_at)	DRD5	- 2.8

Zellzyklus

Z25434	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 3 (211089_s_at)	NEK3	- 2.1
NM_015714	putative lymphocyte G0/G1 switch gene (213524_s_at)	G0S2	- 2.8

Zellwachstum / Proliferation / Hormone

AI216690	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 (202969_at)	DYRK2	+ 2.0
AB016517	fibroblast growth factor 5 (210310_s_at)	FGF5	+ 7.5
AF119835	KIT ligand (211124_s_at)	KITLG	+ 2.3
NM_005542	insulin induced gene 1 (201627_s_at)	INSIG1	- 2.3
AI435828	stanniocalcin 2 (203438_at)	STC2	- 2.0
NM_004333	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (206044_s_at)	BRAF	- 2.5
BC002713	MAX dimerization protein 4 (210778_s_at)	MXD4	- 2.3
AF003934	prostate differentiation factor (TGFbeta receptor signaling pathway) (221577_x_at)	PLAB	- 2.1

Extrazelluläre Matrix

NM_005328	hyaluronan synthase 2 (206432_at)	HAS2	+ 2.5
-----------	-----------------------------------	------	-------

Zytoskelett

BC002654	tubulin beta-5 (209191_at)	TUBB-5	+ 2.0
NM_004543	nebulin (205054_at)	NEB	- 2.1
AL356504	filaggrin (215704_at)	FLG	- 3.7
Z22780	cylicin, basic protein of sperm head cytoskeleton 1 (216779_at)	CYLC1	- 8.0

Signaltransduktion

NM_002923	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa (202388_at)	RGS2	+ 2.0
NM_005613	regulator of G-protein signalling 4 (204338_s_at)	RGS4	+ 2.1
AA530892	dual specificity phosphatase 1 (201044_x_at)	DUSP1	+ 2.6
NM_004987	LIM and senescent cell antigen-like domains 1 (207198_s_at)	LIMS1	+ 2.0
NM_002661	phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific) (204613_at)	PLCG2	- 2.0
Z25434	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 3 (211089_s_at)	NEK3	- 2.1
NM_014586	hormonally upregulated Neu-associated kinase (219535_at)	HUNK	- 2.8
NM_000909	neuropeptide Y receptor Y1 (205440_s_at)	NPY1R	- 2.3
AA780381	mitogen-activated protein kinase kinase 3 (215499_at)	MAP2K3	+ 2.3
L20686	son of sevenless homolog 2 (Drosophila) (211665_s_at)	SOS2	- 2.1
NM_000753	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited (214582_at)	PDE3B	- 2.1
NM_022652	dual specificity phosphatase 6 (208893_s_at)	DUSP6	+ 2.5
AF119835	KIT ligand (211124_s_at)	KITLG	+ 2.3

AF012073	cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 (210836_x_at)	PDE4D	- 2.0
Transkription / DNA-Bindung / mRNA-Splicing			
X03348	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor) (216321_s_at)	NR3C1	+ 2.1
BC000914	splicing factor, arginine/serine-rich 3 (208672_s_at)	SFRS3	+ 2.0
AF107405	splicing factor, arginine/serine-rich 3 (208673_s_at)	SFRS3	+ 2.6
AV714029	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila) (212080_at)	MLL	- 2.0
AK022905	zinc finger protein 43 (HTF6) (222136_x_at)	ZNF43	+ 9.2
AI375916	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box) (212762_s_at)	TCF7L2	- 2.1
NM_001674	activating transcription factor 3 (202672_s_at)	ATF3	- 2.1
NM_005524	hairy and enhancer of split 1, (Drosophila) (203395_s_at)	HES1	- 2.5
NM_000551	von Hippel-Lindau syndrome (203844_at)	VHL	- 27.9
AL022726	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein (209292_at)	ID4	- 2.0
BC003637	DNA-damage-inducible transcript 3 (209383_at)	DDIT3	- 2.0
BF033354	splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa (214141_x_at)	SFRS7	+ 2.1
U65404	kruppel-like factor 1 (erythroid) (210504_at)	KLF1	- 2.8
NM_002166	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein (201565_s_at)	ID2	- 2.1
Translation			
L05096	ribosomal protein L39-like (210115_at)	RPL39L	+ 3.0
Protein-Transporter / Carrier / Ionenkanäle			
NM_006536	chloride channel, calcium activated, family member 2 (206165_s_at)	CLCA2	- 3.2
NM_001036	ryanodine receptor 3 (206306_at)	RYR3	- 2.3
NM_002042	gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, rho 1 (206525_at)	GABRR1	- 2.3
NM_016179	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 (220818_s_at)	TRPC4	+ 3.5

Tabelle 12. Differentiell exprimierte Gene in FXa (100 nM, 6h)- behandelten venösen SMCs. Grau hinterlegte Gene wurden sowohl durch FXa als auch durch Thrombin ³ 2-fach reguliert, Gene in fetter Schrift wurden nur durch FXa reguliert (Thrombin no change). FC = x-fache Änderung der Genexpression gegenüber Kontrolle. Gene, die für hypothetische Proteine kodieren oder aufgrund einer unbekanntenen Funktion nicht-klassifizierbar waren, sind nicht aufgeführt.

Acc.-Nr	Bezeichnung des Gens (Probe Set ID)	Synonym	FC
Metabolismus / Biosynthese			
NM_002340	lanosterol synthase (211019_s_at)	LSS	- 2.1
NM_005520	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (213470_s_at)	HNRPH1	- 16.0
Hämostase			
NM_002575	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (204614_at)	SERPINB2	+ 2.1
Apoptose / Zelltod			
NM_002575	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (204614_at)	SERPINB2	+ 2.1
NM_005815	zinc finger protein 443 (205928_at)	ZNF443	+ 2.1

Prostaglandine

NM_000963	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (204748_at)	COX2	+ 2.3
-----------	---	------	-------

Zytokine / Entzündung

NM_004591	chemokine (C-C motif) ligand 20 (205476_at)	CCL20	+ 4.6
-----------	---	-------	-------

Rezeptoren

NM_002837	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B (205846_at)	PTPRB	+ 2.8
-----------	--	-------	-------

Zellzyklus

AL080193	cyclin G2 (202769_at)	CCNG2	- 2.0
NM_003218	telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1 (203448_s_at)	TERF1	- 2.5
NM_001946	dual specificity phosphatase 6 (208892_s_at)	DUSP6	+ 2.1
NM_022652	dual specificity phosphatase 6 (208893_s_at)	DUSP6	+ 2.5

Zellwachstum / Proliferation / Hormone

NM_002309	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor) (205266_at)	LIF	+ 2.0
AB016517	fibroblast growth factor 5 (210310_s_at)	FGF5	+ 6.1
AF119835	KIT ligand (211124_s_at)	KITLG	+ 2.3
NM_005542	insulin induced gene 1 (201627_s_at)	INSIG1	- 2.0

Extrazelluläre Matrix

NM_005328	hyaluronan synthase 2 (206432_at)	HAS2	+ 2.5
-----------	-----------------------------------	------	-------

Proteasen

AK000667	a disintegrin and metalloproteinase domain 15 (metargidin) (217007_s_at)	ADAM15	- 3.2
----------	--	--------	-------

Signaltransduktion

NM_002309	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor) (205266_at)	LIF	+ 2.0
NM_005613	regulator of G-protein signalling 4 (204338_s_at)	RGS4	+ 2.1
NM_005739	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated) (205590_at)	RASGRP1	+ 2.1
BC003143	dual specificity phosphatase 6 (208892_s_at)	DUSP6	+ 2.1
NM_022652	dual specificity phosphatase 6 (208893_s_at)	DUSP6	+ 2.5
AF119835	KIT ligand (211124_s_at)	KITLG	+ 2.3
AA780381	mitogen-activated protein kinase kinase 3 (215499_at)	MAP2K3	+ 2.0
NM_000909	neuropeptide Y receptor Y1 (205440_s_at)	NPY1R	- 2.1

Transkription / DANN-Bindung / mRNA-Splicing

NM_002714	protein phosphatase 1, regulatory subunit 10 (201703_s_at)	PPP1R10	- 2.1
NM_001430	endothelial PAS domain protein 1 (200879_s_at)	EPAS1	- 2.3
AA704766	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila) (212078_s_at)	MLL	- 4.9
AV714029	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila) (212080_at)	MLL	- 2.0
NM_003070	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2 (206544_x_at)	SMARCA2	- 2.0
AI375916	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box) (212762_s_at)	TCF7L2	- 2.1
NM_005815	zinc finger protein 443 (205928_at)	ZNF443	+ 2.1
L22454	nuclear respiratory factor 1 (211279_at)	NRF1	+ 2.0
NM_005966	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1) (208047_s_at)	NAB1	+ 2.1
BF033354	splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa (214141_x_at)	SFRS7	+ 2.1

Protein-Transporter / Carrier / Ionenkanäle

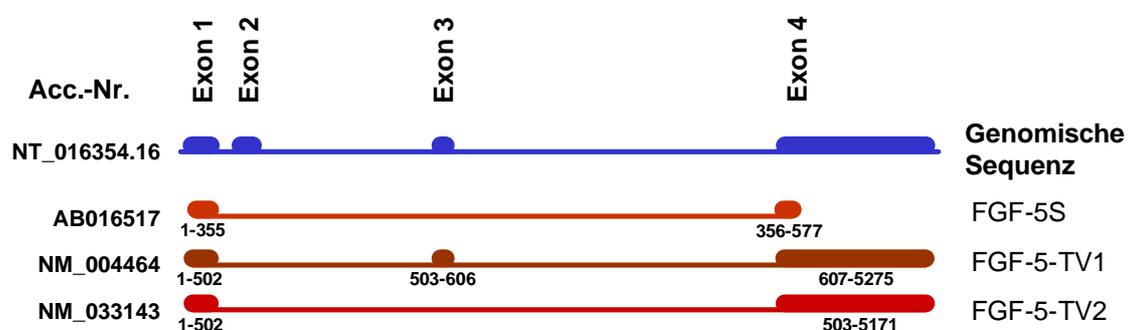
AA706065	ribosome binding protein 1 homolog 180kDa (dog) (201204_s_at)	RRBP1	- 2.1
NM_004207	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3 (202856_s_at)	SLC16A3	- 2.5
NM_016179	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 (220818_s_at)	TRPC4	+ 6.5

3.5.2 Verifizierung der Array-Daten mittels RT-PCR-Analyse

Um die Ergebnisse der Microarray-Analyse zu verifizieren, wurde die Genexpression ausgewählter und im Zusammenhang mit der Fragestellung interessant erscheinender Gene durch semi-quantitative RT-PCR überprüft. Gleichzeitig wurden Zeitverläufe der Thrombin- und FXa-induzierten Expression ermittelt.

3.5.2.1 Fibroblast growth factor 5 (FGF-5)

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs) besitzen in einer Reihe von Zellsystemen wichtige Funktionen für die Regulation von Proliferations-, Migrations- und Differenzierungsprozessen (Ornitz und Itoh, 2001; Auguste et al., 2003). Die Bedeutung von FGF-5 für das kardiovaskuläre System und insbesondere für zelluläre Thrombin- und FXa-Wirkungen ist bislang unbekannt. Bekannt ist allerdings, dass ein weiterer Vertreter der FGF-Familie, FGF-2 (bFGF), massgeblich an der Vermittlung mitogener Thrombin- und auch FXa-Wirkungen beteiligt ist (Weiss und Maduri, 1993; Cucina et al., 2002; Rauch et al., 2004). Für FGF-5 sind in der Literatur mehrere Splice-Varianten beschrieben, darunter ein Transkript in voller Länge (FGF-5, "full-length", 5275 Basenpaare, Acc.-Nr. NM_0044) und eine kurze Variante (FGF-5S, "short-form", 577 Basenpaare, Acc.-Nr. AB016517) (Ozawa et al., 1998). FGF-5S ist unter anderem durch ein fehlendes Exon 3 (104 bp) charakterisiert ist (Abb. 29).

**Abbildung 29**

Struktur verschiedener FGF-5-Splice-Varianten. FGF-5S (*short form*); FGF-5-TV1/2 (*transcript variant 1/2*). Weitere Erklärungen im Text.

In der differentiellen Genexpressionsanalyse konnte eine Aufregulation von FGF-5S durch Thrombin und FXa (7.5- bzw. 6.1-facher Anstieg gegenüber Kontrolle) nach 6 h festgestellt werden. FGF-5 dagegen wurde aufgrund der Ausschlusskriterien den nicht-regulierten Genen zugeordnet. Für die Untersuchung der Genexpression mittels RT-PCR wurden Primersequenzen gewählt, die zur Amplifikation beider Splice-Varianten führten (Exon 3-umschließend), so dass diese anhand unterschiedlicher Fragmentgrößen der PCR-Produkte im gleichen Ansatz identifiziert werden konnten. Es zeigte sich, dass Thrombin und FXa jeweils zu einer Aufregulation der FGF-5S- als auch der FGF-5-Expression führten (Abb. 30a und 30b). Eine maximale Induktion konnte nach 6 h festgestellt werden und auch 24 h nach Stimulation war das Expressionsniveau gegenüber der Kontrolle noch deutlich erhöht. Diese

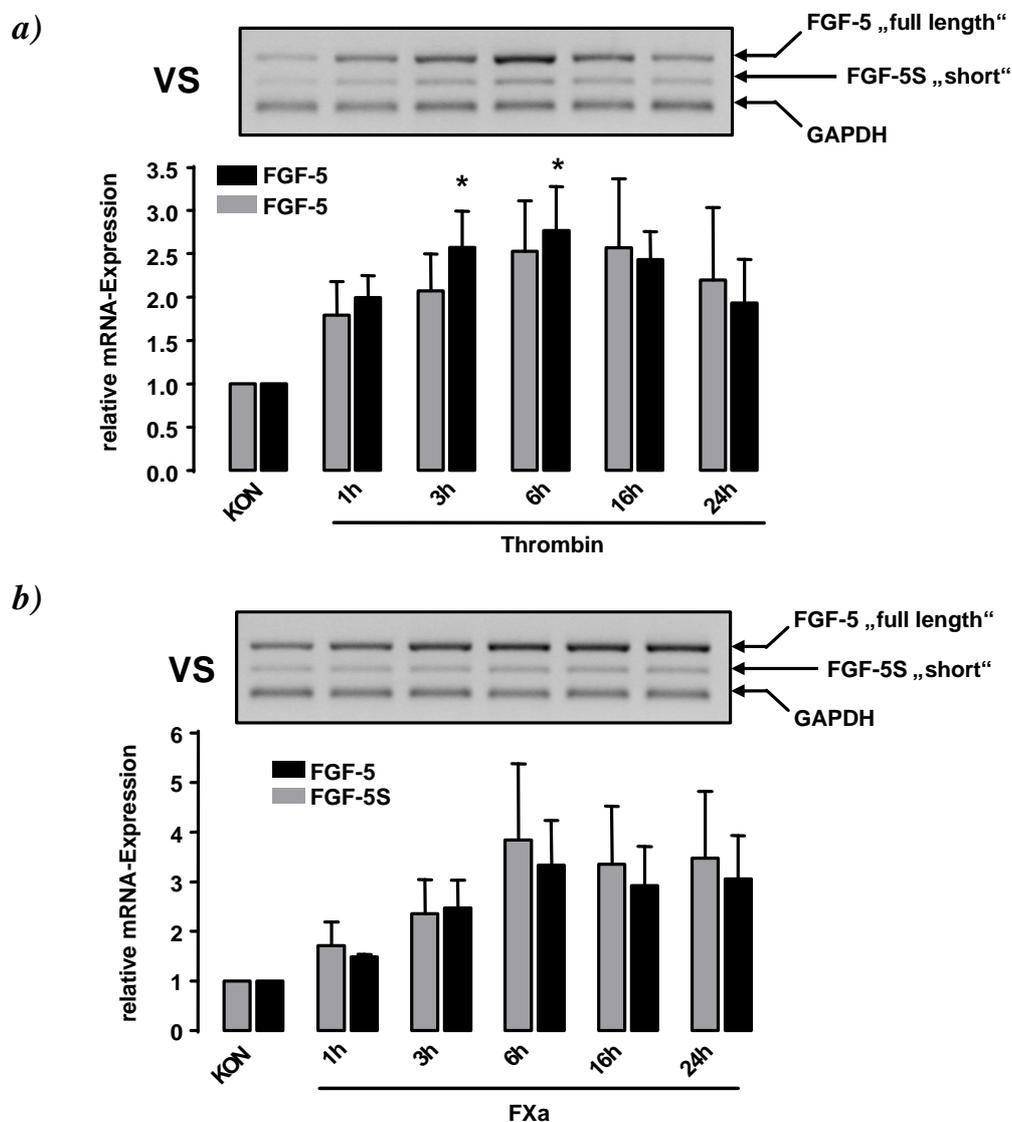


Abbildung 30

Zeitabhängige Induktion der FGF-5-/ FGF-5S-Genexpression durch a) Thrombin (10 U/ml) und b) FXa (100 nM) in venösen (VS) SMCs. Dargestellt sind repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung von jeweils n = 4 (a) bzw. n = 3 (b) unabhängigen Versuchen.

Ergebnisse bestätigen die Daten der Microarray-Analyse für die Expression von FGF-5S und demonstrieren zusätzlich, im Gegensatz zu den Array-Daten, eine vermehrte Transkription von FGF-5 durch Thrombin und FXa.

3.5.2.2 Mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MEK-3)

MEK-3 (Acc.-Nr. NM_145110), in der Literatur ebenfalls unter der Bezeichnung MAPKK3, MKK3 oder PRKMK3 zu finden, repräsentiert eine dual-spezifische Protein-Kinase aus der Familie der MAPK-Kinasen. Im Verlauf der intrazellulären Signaltransduktion bewirkt MEK-3 die Phosphorylierung der nachgeschalteten p38-MAPK, die wiederum eine Reihe wichtiger Transkriptionsfaktoren aktiviert. Neben der klassischen Funktion des p38-MAPK-Weges als Vermittler von Stress- und inflammatorischen Reizen (Kyriakis und Avruch, 2001) konnte in neueren Arbeiten auch eine Bedeutung für proliferative (Kanda et al., 2001b) und

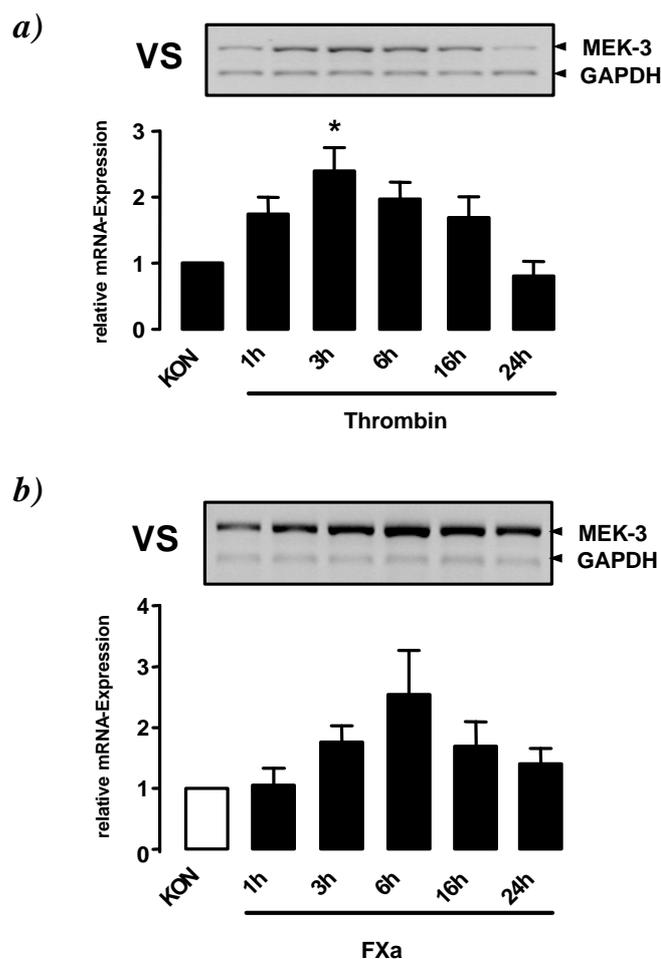


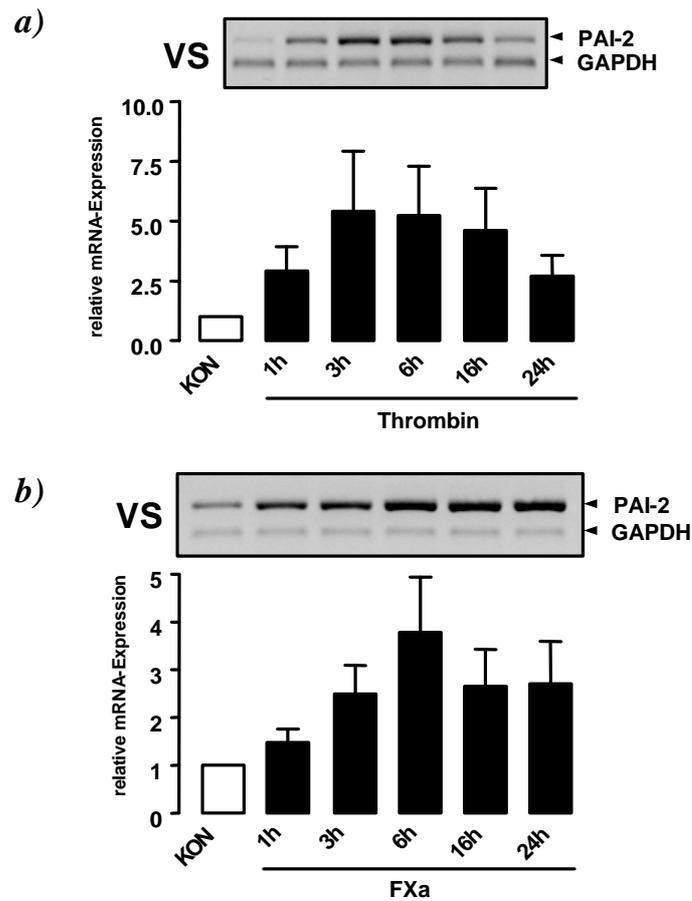
Abbildung 31

Zeitabhängige Induktion der MEK-3-Genexpression durch a) Thrombin (10 U/ml) und b) FXa (100 nM) in venösen (VS) SMCs. Dargestellt sind repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung von n = 4 (a) bzw. n = 3 (b) unabhängigen Versuchen. * = p < 0.05 vs KON.

migratorische (Wang et al., 2004) Thrombin-Wirkungen in SMCs gezeigt werden. Die vergleichenden Genexpressionsanalyse ergab eine Aufregulation der MEK-3-Genexpression nach Thrombin- oder FXa-Behandlung (2.6- bzw. 2.1-facher Anstieg gegenüber Kontrolle). In der RT-PCR-Analyse konnte ebenfalls eine zeitabhängige Zunahme der relativen mRNA-Expression mit einer maximalen Induktion nach 3 – 6 h festgestellt werden (Abb. 31a und 31b).

3.5.2.3 Plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2)

Das Plasminogen-Aktivator (PA)-System ist nicht nur für den Abbau intravasaler Blutgerinnsel durch die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin verantwortlich, sondern trägt auch bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen zur extrazellulären Proteolyse bei (Vassalli et al., 1991). Als Hemmstoffe des PA-Systems konnten bislang vier Arginin-spezifische Serin-Protease-Inhibitoren (SERPIN) identifiziert werden, darunter als prominenteste Vertreter PAI-1 und PAI-2. Während die Regulation der PAI-1-Expression durch Thrombin bereits verhältnismäßig gut untersucht wurde (Noda-Heiny et al., 1993; Ren et al., 1997; Shen et al., 1998), ist über PAI-2 in diesem Zusammenhang praktisch nichts bekannt. In der Genexpressionsanalyse konnte eine Induktion der PAI-2-Genexpression nach Thrombin- oder FXa-Behandlung (2.6- bzw. 2.1-facher Anstieg gegenüber Kontrolle) nach 6 h festgestellt werden (vgl. Tab. 11 und 12). Unter Verwendung spezifischer Primer konnten die Induktionen mittels RT-PCR-Analyse bestätigt werden (Abb. 32a und 32b).

**Abbildung 32**

Zeitabhängige Induktion der PAI-2-Genexpression durch a) Thrombin (10 U/ml) und b) FXa (100 nM) in venösen (VS) SMCs. Dargestellt sind repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung von $n = 4$ (a) bzw. $n = 3$ (b) unabhängigen Versuchen. * = $p < 0.05$ vs KON.

Dabei konnte nach Auswertung von $n = 4$ Versuchen ein maximaler Anstieg der Genexpression nach 3 – 6 h festgestellt werden, dieser Effekt war allerdings aufgrund der großen Streuung der Einzelergebnisse statistisch nicht signifikant. Es ist erwähnenswert, dass zwei Zelllinien in der gehungerten Kontrolle eine sehr hohe basale PAI-2-Expression aufwiesen, wobei Thrombin in diesen Versuchen nur eine etwa 2-fache Induktion bewirkte. In den beiden übrigen Zelllinien kam es dagegen aufgrund einer sehr schwachen, kaum nachweisbaren basalen PAI-2-Expression unter identischen Versuchs- und PCR-Bedingungen nominell zu einer sehr deutlichen Aufregulation (6- bis 12-facher Anstieg gegenüber Kontrolle).

Abb. 33 zeigt zusammenfassend die identifizierten Thrombin- und FXa-regulierten Gene.

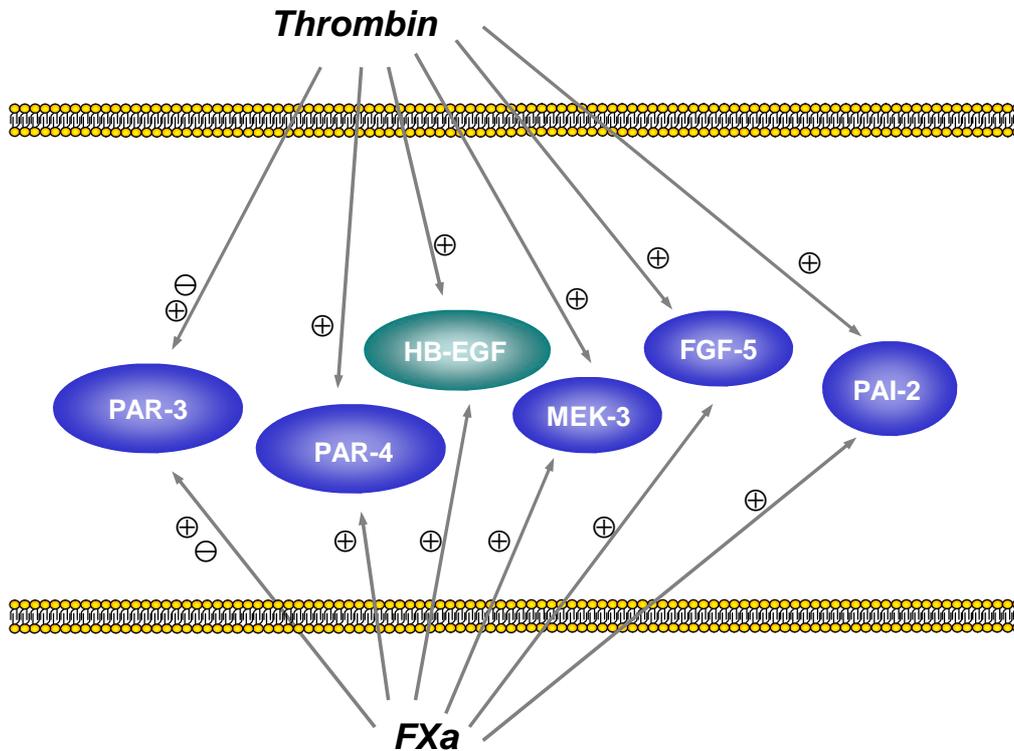


Abbildung 33

Übersicht über die in humanen SMCs identifizierten Thrombin- und FXa-regulierten Gene (Auswahl).

⊕ = Induktion ; ⊖ = Repression

3.6 Regulation Thrombin-vermittelter Signale durch Iloprost in arteriellen und venösen SMCs

Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse und in Hinblick auf weitere potentielle Unterschiede zwischen arteriellen und venösen SMCs sollte abschließend der Fragestellung nachgegangen werden, in wie weit zelluläre Thrombin-Signale einer Regulation durch Prostacyclin (PGI₂) unterliegen. PGI₂ kann aufgrund seiner atheroprotektiven Wirkungen (z.B. Hemmung der Thrombozytenaggregation, Hemmung der SMC-Proliferation) im kardiovaskulären System als wichtiger Gegenspieler des Thrombins angesehen werden. Im Folgenden sind die Effekte des chemisch-stabilen PGI₂-Mimetikums Iloprost auf die PAR-Expression, auf Thrombin-aktivierte Signaltransduktionswege und auf die Thrombin-induzierte Genexpression näher charakterisiert worden.

3.6.1 Einfluss von Iloprost und Forskolin auf die PAR-1- und PAR-3-Expression

Die Regulation der Thrombin-Rezeptor-Expression könnte einen initialen Angriffspunkt für die Modifikation zellulärer Thrombin-Signale darstellen. Eine Herabregulation des PAR-1 durch cAMP-erhöhende Substanzen ist für humane Mesangialzellen beschrieben worden (Zacharias et al., 1995). Da, den bisherigen Ergebnissen zu Folge, der PAR-1 an der Aufregulation von HB-EGF beteiligt sein könnte, war der Einfluss von Iloprost auf die Expression dieses Rezeptorsubtyps von besonderem Interesse. Es zeigte sich, dass die PAR-1-Genexpression durch Zugabe von Iloprost (100 nM) in venösen und in arteriellen Zellen zeitabhängig vermindert werden konnte (Abb. 34). Statistisch signifikante Effekte waren gegenüber der gehungerten Kontrolle nach 6 - 24 h nachweisbar.

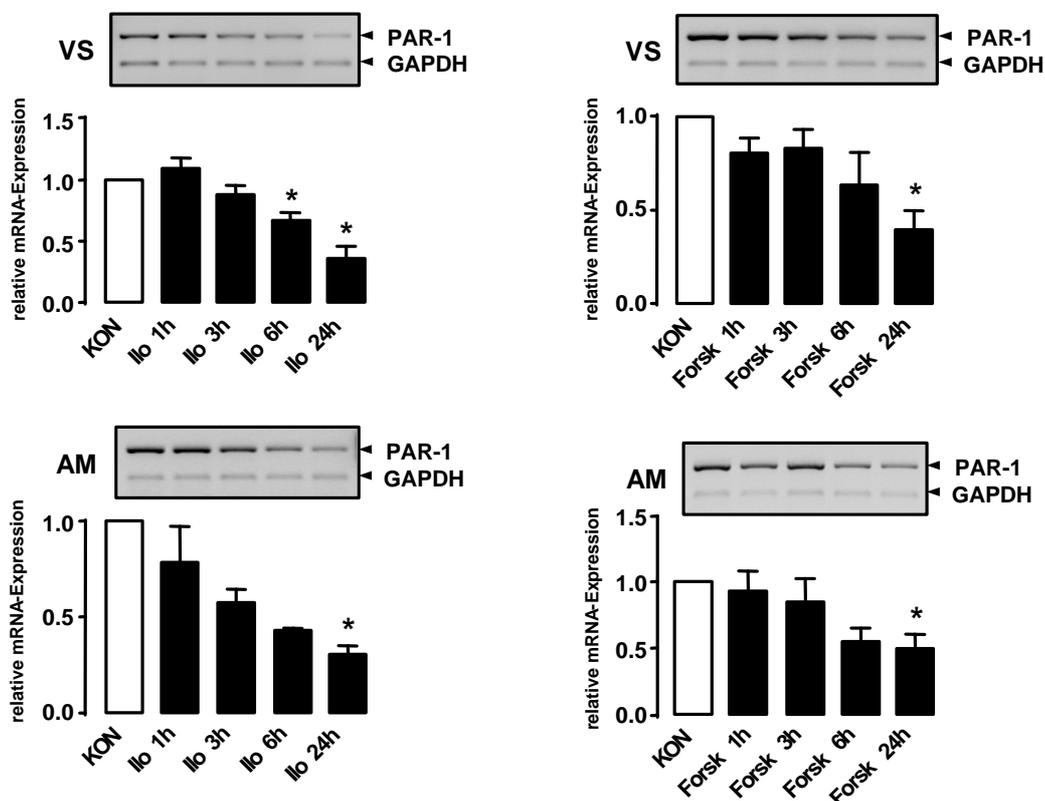


Abbildung 34

Zeitabhängiger Einfluss von Iloprost (Ilo, 100 nM) und Forskolin (Forsk, 10 μ M) auf die PAR-1-Expression in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. Gezeigt sind repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung von jeweils n = 3 (VS) bzw. n = 3 - 4 (AM) unabhängigen Versuchen (Mittelwerte \pm SEM).

* = p < 0.05 vs KON.

Iloprost entfaltet seine Wirkungen über den G_s-gekoppelten IP-Rezeptor (IP-R) und eine Adenylatzyklase-vermittelte cAMP-Erhöhung. Zur Überprüfung eines cAMP-abhängigen Mechanismus wurde in analoger Weise der Einfluss von Forskolin, einem direkten Aktivator

der Adenylatzyklase (Seamon et al., 1981), auf die PAR-1-Expression untersucht. Forskolin (10 μ M) bewirkte eine deutliche Reduktion der PAR-1-Expression nach 6 – 24 h (Abb. 34).

Auch der PAR-3 unterlag einer analogen Herabregulation durch Iloprost und Forskolin (Abb. 35). Diese Ergebnisse zeigen, dass PGI₂ (Iloprost), wahrscheinlich über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, die Expression von PARs in humanen SMCs vermindert, was zur Hemmung PAR-vermittelter Thrombin-Signale beitragen könnte.

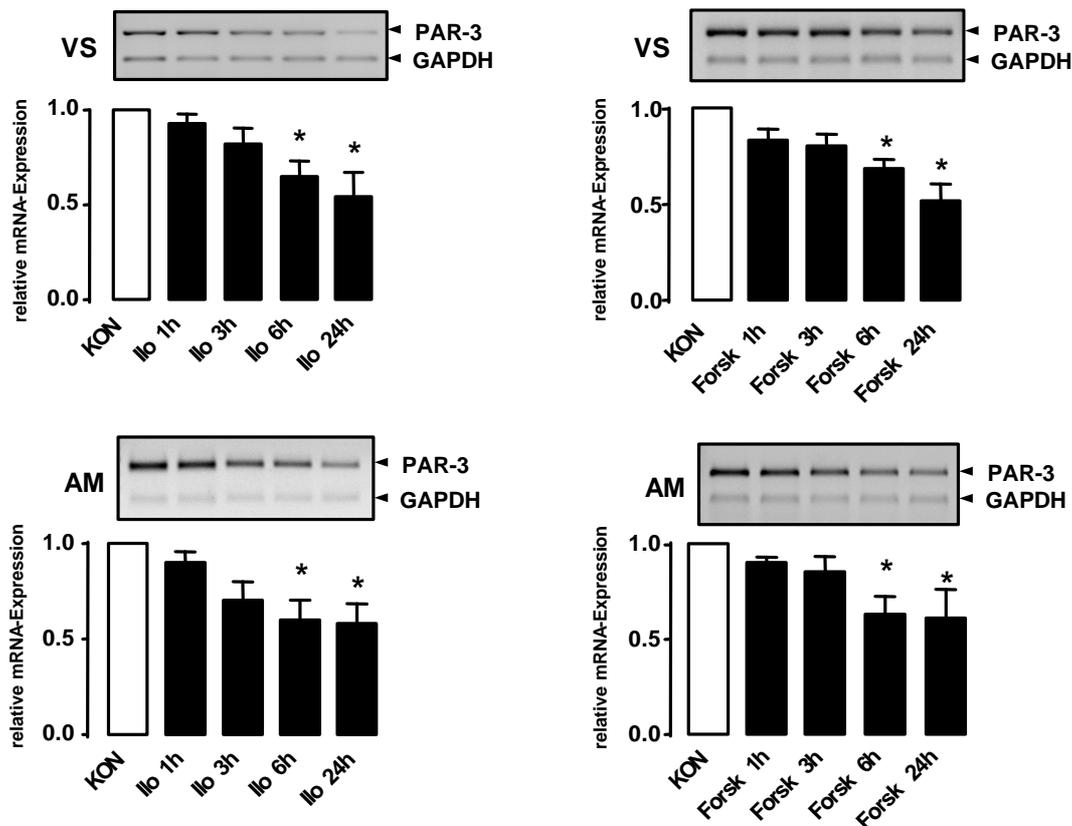


Abbildung 35

Zeitabhängiger Einfluss von Iloprost (Ilo, 100 nM) und Forskolin (Forsk, 10 μ M) auf die PAR-3-Expression in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. Gezeigt sind repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung von jeweils n = 3 (VS/AM) unabhängigen Versuchen (Mittelwerte \pm SEM). * = p < 0.05 vs KON.

3.6.2 Effekte von Iloprost auf die Thrombin-vermittelte Aktivierung intrazellulärer Signalwege

Hinsichtlich der Modifikation der Thrombin-aktivierten Signaltransduktion durch PGI₂ ist in der Literatur wenig bekannt. Daher wurden die an der vermehrten Transkription von HB-EGF beteiligten Signalwege näher untersucht.

3.6.2.1 MAPK- und PI3-Kinase/Akt-Weg

Unter Abschnitt 3.4 konnte eine Beteiligung des p42/44-MAPK (ERK-1/2)- und des PI3-Kinase-Weges an der Thrombin-induzierten HB-EGF-Expression nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob Iloprost die Aktivierung dieser Signalwege beeinflusst, wurde die Phosphorylierung der ERK-1/2 bzw. der PI3-Kinase-nachgeschalteten Proteinkinase Akt mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper im Western Blot untersucht. Thrombin führte nach 10 min zu einer deutlichen Zunahme der ERK-1/2- und auch der Akt-Phosphorylierung, die jeweils durch Iloprost (1 – 10 nM) konzentrationsabhängig und vollständig gehemmt werden konnte (Abb. 36). Iloprost war ebenfalls in der Lage, die Thrombin-induzierte p38-MAPK-Phosphorylierung zu hemmen (Abb. 36).

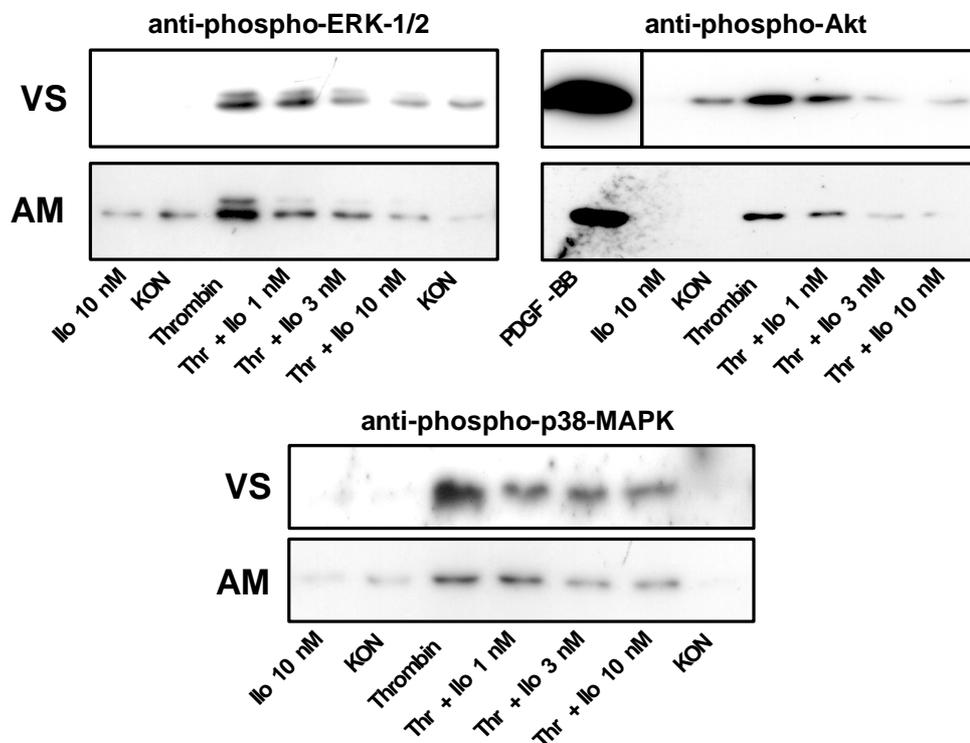


Abbildung 36

Einfluss von Iloprost (Ilo, 1-10 nM) auf die Thrombin (Thr, 10 U/ml)-vermittelte ERK-1/2-, p38-MAPK- und Akt-Phosphorylierung nach 10 min in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. PDGF-BB (10 ng/ml) wurde als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Dargestellt sind repräsentative Western Blot-Experimente von jeweils n = 3 unabhängigen Versuchen mit gleichem Ergebnis.

3.6.2.2 Calcium-PKC-Weg

Eine Beeinflussung des G_q -abhängigen Calcium/PKC-Weges wurde zum einen anhand der Phosphorylierung von PKC-Substraten im Western Blot untersucht, zum anderen anhand der Bestimmung intrazellulärer Calcium-Transienten mittels Laserfluoreszenzmikroskopie. Hier zeigte sich, dass Thrombin, ebenso wie PMA (10 nM), nach 15 - 30 min zu einer Zunahme der Phosphorylierung von PKC-Substraten führte (Abb. 37). Iloprost (10 nM) war auch in diesen Experimenten in der Lage, die Thrombin-vermittelte PKC-Substrat-Phosphorylierung abzuschwächen (Abb. 37). Ro 31-8220 (PKC-Inhibitor, 0.1 μ M) bewirkte darüber hinaus eine vollständige Hemmung Thrombin-induzierter Phosphorylierungen (Abb. 37), was die Spezifität des verwendeten Antikörpers belegt.

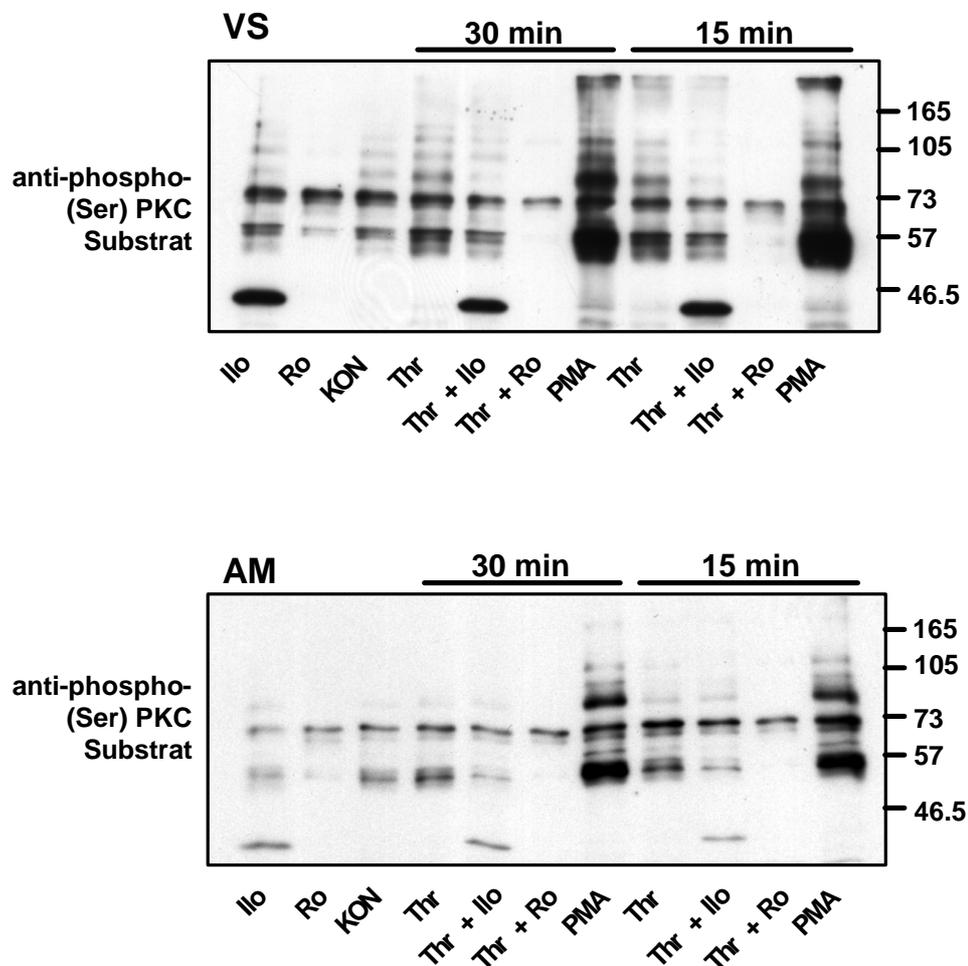


Abbildung 37

Einfluss von Iloprost (Ilo, 10 nM) und Ro 31-8220 (Ro, 0.1 μ M) auf die Thrombin (Thr, 10 U/ml)-induzierte Phosphorylierung von PKC-Substraten nach 15 und 30 min in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. PMA (10 nM) wurde als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Dargestellt sind repräsentative Western Blot-Experimente von jeweils $n = 4$ (VS) bzw. $n = 3$ (AM) unabhängigen Versuchen mit ähnlichem Ergebnis.

Um zu klären, ob die Verminderung der PKC-Aktivierung mit Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration korreliert, wurden Thrombin-induzierte Calcium-Signale in An- und Abwesenheit von Iloprost gemessen. Innerhalb weniger Sekunden nach der Zugabe von Thrombin konnten in Fluo-3-beladenen Zellen charakteristische Calcium-Transienten beobachtet werden (Abb. 38a und 38b).

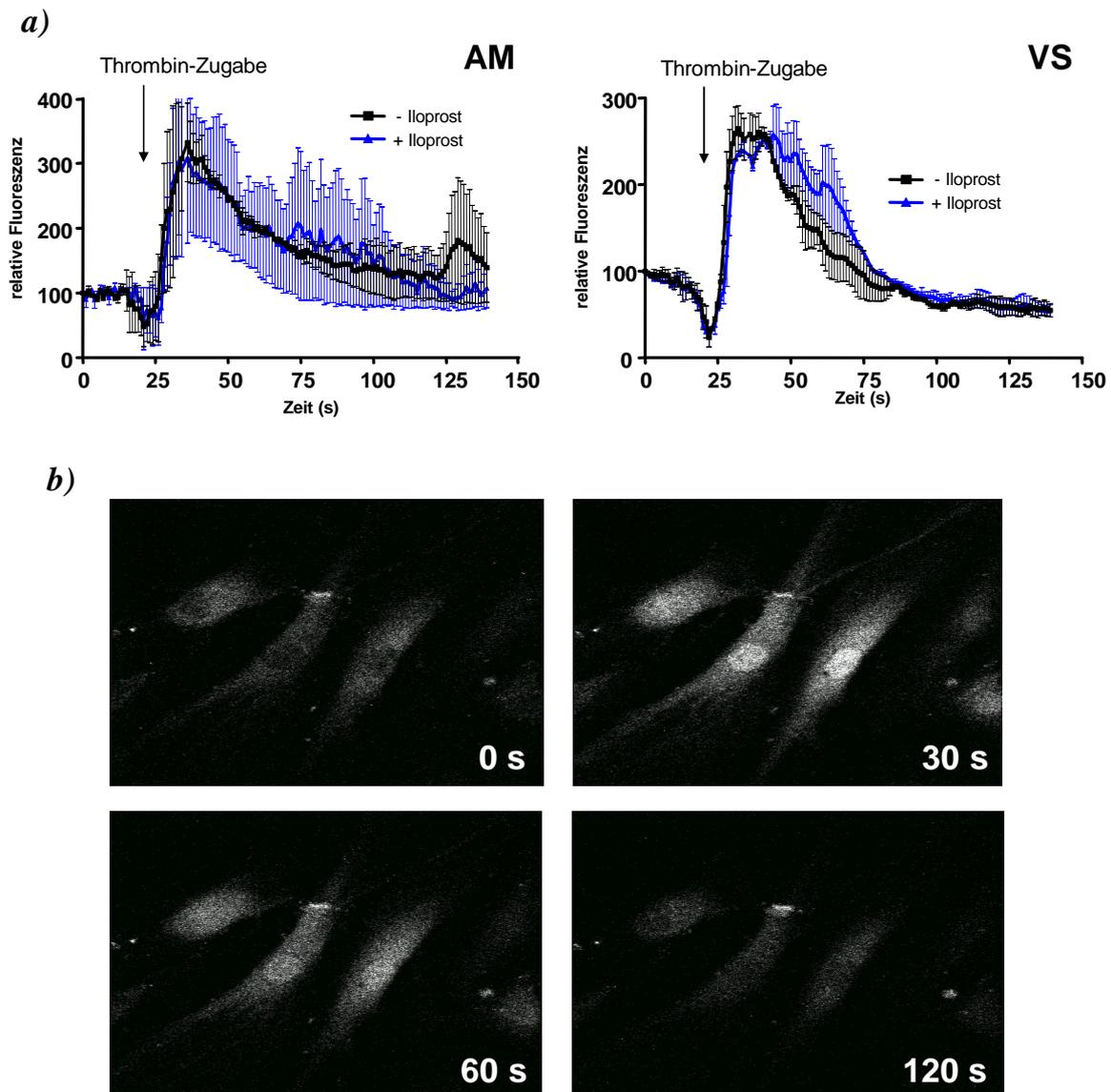


Abbildung 38

Thrombin-induzierte Calcium-Transienten in An- und Abwesenheit von Iloprost (10 nM) in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. a) Zeitabhängige Veränderungen der jeweils maximalen Fluoreszenzintensität von insgesamt 3 - 8 Zellen in jedem Einzelexperiment aus zwei unabhängigen Versuchen. Weitere Versuche (n = 1 - 2) unter Verwendung von 100 nM Iloprost lieferten identische Ergebnisse. b) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen (40-fache Vergrößerung) Fluo-3-beladener SMCs zu ausgewählten Zeitpunkten der Calcium-Messung (keine Iloprost-Vorinkubation). Die Zugabe von Thrombin erfolgte 20 s nach Versuchsbeginn (= 0 s).

Eine Vorinkubation mit Iloprost (10 – 100 nM) hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf die Signale (Abb. 38a). Die in Abb. 38b dargestellten mikroskopischen Aufnahmen Fluo-3-beladender SMCs zeigen die transienten Veränderungen der Fluoreszenzintensität vor und nach der Thrombin-Stimulation. Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass PGI₂ (Iloprost) in der Lage ist, die Thrombin-induzierte Aktivierung des PKC-Weges zu hemmen, und dass dieser Effekt nicht über eine Modifikation der intrazellulären Calcium-Konzentration zustande kommt.

3.6.3 Einfluss von Iloprost auf die Thrombin-induzierte HB-EGF-Genexpression

Nachdem die Modifikation der PAR-Expression und der mitogenen Signaltransduktion durch Iloprost herausgearbeitet wurde, sollte schließlich die Thrombin-vermittelte Transkription untersucht werden. Hier zeigte sich, dass die Thrombin-induzierte HB-EGF-Genexpression in Anwesenheit von Iloprost (1 - 10 nM) in arteriellen Zellen konzentrationsabhängig und vollständig gehemmt werden konnte (Abb. 39). Halbmaximale Effekte wurden bereits mit Iloprost-Konzentrationen von 1 nM erzielt. Interessanterweise war Iloprost unter analogen Bedingungen in venösen Zellen nicht in der Lage, die Thrombin-induzierte HB-EGF-Expression zu hemmen (Abb. 39). Im Gegensatz zu arteriellen Zellen kam es hier sogar zu einer leichten, allerdings nicht signifikanten Zunahme der mRNA-Spiegel. Auch höhere Iloprost-Konzentrationen (100 nM) bewirkten keine Hemmung der Genexpression (Daten nicht gezeigt).

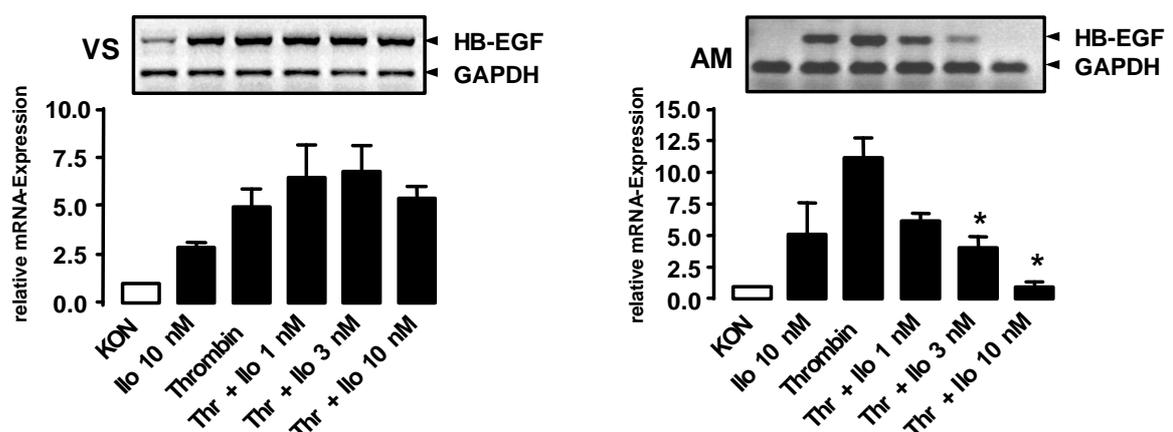


Abbildung 39

Einfluss von Iloprost (Ilo, 1 - 10 nM) auf die Thrombin (Thr, 10 U/ml)-induzierte HB-EGF-Genexpression in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. Gezeigt sind repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung (Mittelwert ± SEM) von n = 5 (VS) bzw. n = 4 (AM) unabhängigen Versuchen. * = p < 0.05 vs Thr.

Die alleinige Zugabe von Iloprost resultierte allerdings in beiden Zelltypen in einer schwachen Induktion der Expression von HB-EGF (Abb. 39). Diese Ergebnisse geben damit weitere Hinweise auf grundlegende Unterschiede im Verhalten arterieller und venöser humaner SMCs.

3.6.4 Bedeutung des cAMP/PKA-Signalweges für die Iloprost-medierte Hemmung der Thrombin-induzierten HB-EGF-Genexpression

3.6.4.1 Einfluss von IBMX und db-cAMP

Um den Mechanismus der beobachteten Hemmung der HB-EGF-Expression durch Iloprost in arteriellen SMCs näher zu charakterisieren, wurde die Bedeutung einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration sowie eine mögliche Beteiligung der Proteinkinase A (PKA) untersucht. Für diese Experimente wurden der Phosphodiesterase (PDE)-Hemmstoff Isobutylmethylxanthin (IBMX) und der direkte PKA-Aktivator Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) eingesetzt. Die Hemmung der PDE-Aktivität führt zu einem verminderten Abbau von cAMP und somit zu einer verstärkten Antwort der Zelle auf cAMP-abhängige Effekte. Es zeigte sich, dass eine halbmaximale Hemmung der HB-EGF-Expression durch Iloprost (1 nM) in Anwesenheit von IBMX (0.5 mM) weiter verstärkt wurde (Abb. 40a und 40b). IBMX alleine hatte keinen Einfluss auf die Thrombin-induzierte HB-EGF-Expression.

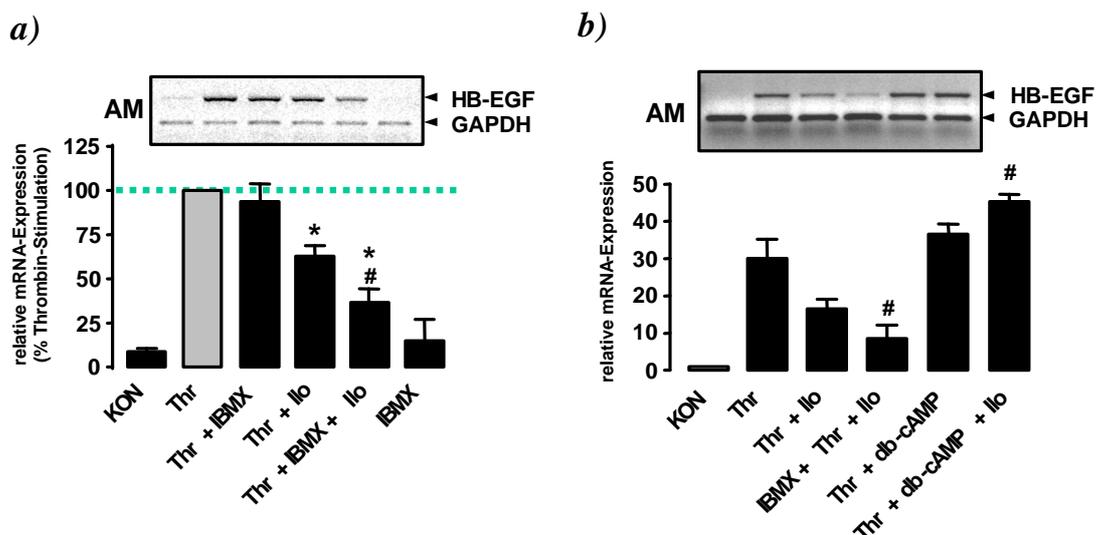


Abbildung 40

Effekte von a) Isobutylmethylxanthin (IBMX, 0,5 mM) und b) Dibutyryl-cAMP (db-cAMP, 1 mM) auf die Iloprost (Ilo, 1 nM)-medierte Hemmung der Thrombin (Thr, 10 U/ml)-induzierten HB-EGF-Genexpression in arteriellen (AM) SMCs. Dargestellt sind jeweils repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung (Mittelwert \pm SEM) von $n = 3 - 8$ (a) bzw. $n = 3$ (b) Versuchen. * = $p < 0.05$ vs Thr; # = $p < 0.05$ vs Thr + Ilo.

Db-cAMP (1 mM) bewirkte im Gegensatz dazu keine Hemmung der Thrombin-induzierten HB-EGF-Expression, war allerdings in der Lage, eine Iloprost-vermittelte Hemmung der Thrombin-induzierten HB-EGF-Expression in arteriellen Zellen vollständig aufzuheben (Abb. 40b). Da Iloprost in venösen SMCs keine HB-EGF-expressionshemmende Wirkung besaß, wurden die dargestellten Versuche zur Aufklärung des Mechanismus nur mit arteriellen Zellen durchgeführt.

Die Befunde lassen vermuten, dass Iloprost in arteriellen SMCs über eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in der Lage ist, die Thrombin-induzierte HB-EGF-Expression zu hemmen, wobei möglicherweise ein PKA-unabhängiger Mechanismus zugrunde liegen könnte.

3.6.4.2 IP-Rezeptor-Expression

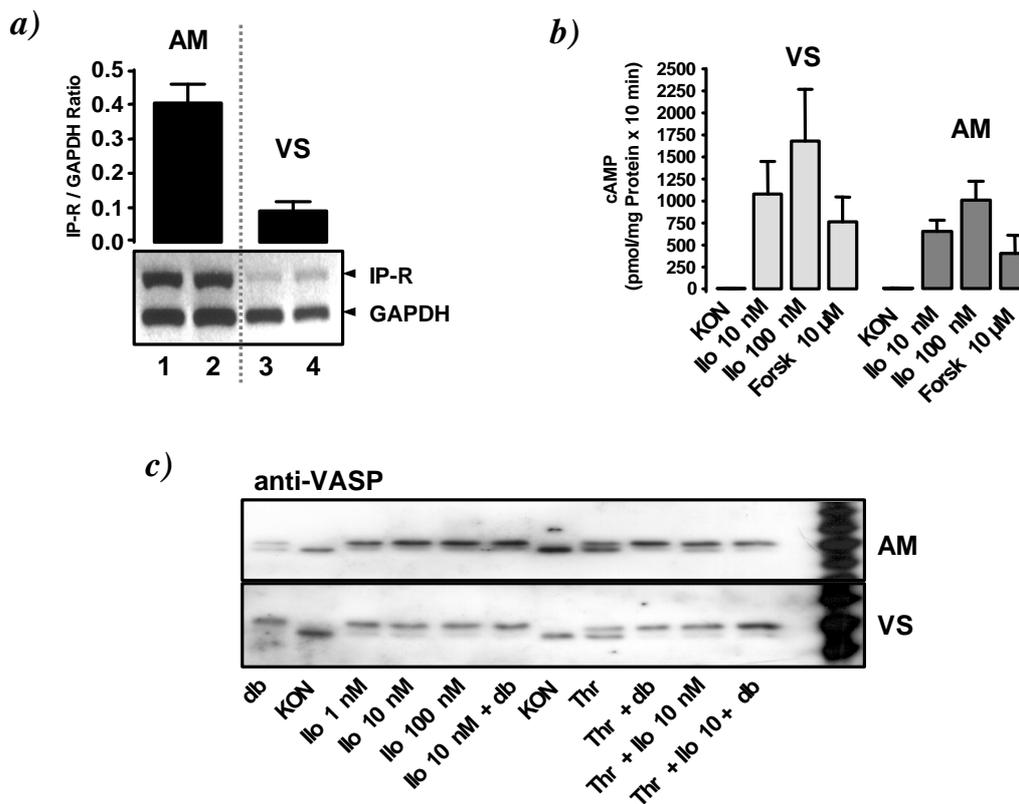
3.6.4.3 Intrazelluläre cAMP-Erhöhung und VASP-Phosphorylierung durch Iloprost

Nach der Postulierung einer cAMP-Abhängigkeit für die Verminderung der HB-EGF-Genexpression durch Iloprost in arteriellen Zellen wären Unterschiede hinsichtlich der cAMP-Antwort venöser SMCs als Erklärung für die fehlende Hemmbarkeit denkbar. Obwohl der PGI₂-Rezeptor (IP-R) in venösen Zellen deutlich schwächer exprimiert wurde als in arteriellen (RT-PCR-Nachweis, Abb. 41a), war eine deutliche Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Iloprost (10 – 100 nM) unabhängig vom Ursprung des untersuchten Zelltyps evident (Abb. 41b). Als Indikator für eine Aktivierung des cAMP/PKA-Weges wurde zusätzlich die Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) nach Iloprost-Gabe (1 - 100 nM) untersucht. Auch diesbezüglich konnten keine Unterschiede zwischen arteriellen und venösen Zellen festgestellt werden (Abb. 41c).

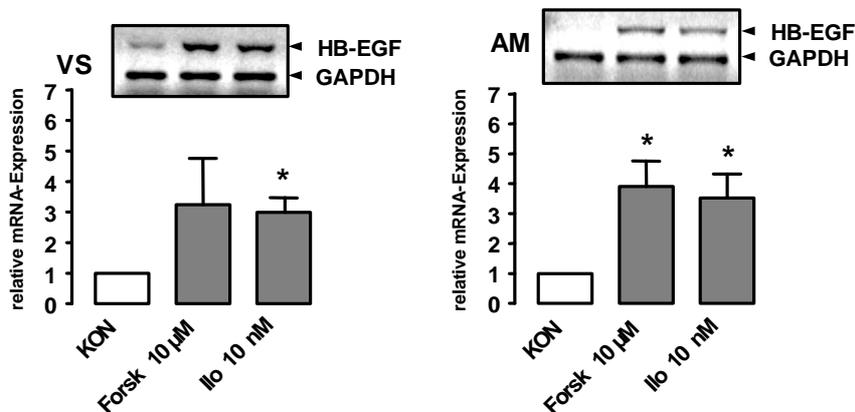
3.6.4.4 Einfluss von Iloprost und Forskolin auf die HB-EGF-Genexpression

Iloprost alleine zeigte in den unter Abschnitt 3.6.3 dargestellten Versuchen eine induktive Wirkung auf die HB-EGF-Expression. Neben Iloprost war auch Forskolin in der Lage, in venösen und arteriellen Zellen ebenfalls eine Induktion von HB-EGF zu bewirken (Abb. 42).

Insgesamt demonstrieren diese Daten, dass die fehlende Hemmung in venösen SMCs offensichtlich nicht die Folge einer unzureichenden Aktivierung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges ist und deuten auf eine duale Funktion (Repression / Induktion) von cAMP bezüglich der Regulation der HB-EGF-Expression in arteriellen SMCs hin.

**Abbildung 41**

Bedeutung des cAMP/PKA-Signaltransduktionsweges für die Hemmung der Thrombin-induzierten HB-EGF-Expression durch Iloprost. a) Basale Expression des Prostacyclin (PGI_2)-Rezeptors (IP-R) in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. Untersucht wurden jeweils zwei unterschiedliche Zelllinien. b) Intrazelluläre cAMP-Konzentration nach Stimulation mit Iloprost (Ilo) und Forskolin (Forsk). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils $n = 3$ unabhängigen Experimenten. c) Nachweis der VASP-Phosphorylierung mittels Western Blot. db (db-cAMP, 1 mM), Thr (Thrombin, 10 U/ml). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von jeweils $n = 2$ Versuchen. Die obere bzw. untere Bande entsprechen der phosphorylierten bzw. nicht-phosphorylierten Form von VASP.

**Abbildung 42**

Einfluss von Forskolin (Forsk) und Iloprost (Ilo) auf die HB-EGF-Genexpression in venösen (VS) und arteriellen (AM) SMCs. Gezeigt sind repräsentative RT-PCR-Experimente und die densitometrische Auswertung jeweils $n = 3$ Versuchen. * = $p < 0.05$ vs KON.

4. Diskussion

Als Wachstumsfaktor stimuliert Thrombin die Proliferation, Migration und Matrixsynthese glatter Gefäßmuskelzellen (SMCs), die darauf hin selbst, im Zuge einer stark veränderten Genexpression, mitogene und migratorische Faktoren freisetzen. Um diese komplexen Vorgänge und Zusammenhänge besser zu verstehen, beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit den an diesen Prozessen beteiligten trans- und intrazellulären Signalwegen, mit der Identität sekundärer Mediatoren, und mit der Regulation von Thrombin-Signalen unter dem Einfluss funktioneller Gegenspieler. Die Ergebnisse der Untersuchungen sollen im Folgenden diskutiert werden.

4.1 Expression und Regulation von Thrombin-Rezeptoren

PARs gelten heute als die wichtigsten Determinanten Koagulationsfaktor-abhängiger Signale und Funktionen auf vaskulären Zellen (Ruf et al., 2003). *In vivo* können Thrombin-Rezeptoren allerdings unter physiologischen Bedingungen nicht oder nur in sehr geringer Menge in medialen SMCs nachgewiesen werden (Coughlin, 2000; Hirano und Kanaide, 2003). In atherosklerotisch-veränderten Geweben (Nelken et al., 1992) oder nach Gefäßverletzung (Wilcox et al., 1994; Baykal et al., 1995) werden PARs dort dagegen exprimiert. Eine Bedeutung von PARs, insbesondere des PAR-1, für die Entstehung und die Progression der Restenose und Atherosklerose konnte in mehreren Arbeiten eindrucksvoll belegt werden (Übersicht in Baykal et al., 1995).

Mittels RT-PCR ließen sich alle drei Thrombin-Rezeptoren (PAR-1, PAR-3, PAR-4) sowohl in arteriellen als auch in venösen SMCs nachweisen. Verglichen mit dem PAR-1 und PAR-3 zeigte sich in beiden Zelltypen eine verhältnismäßig schwache Expression des PAR-4, was vermuten lässt, dass der PAR-4 auch auf Protein-Ebene in einer geringeren Kopienzahl auf der Zelloberfläche vorhanden ist. Diese Relationen entsprechen Literaturdaten, in denen, ebenfalls verglichen mit dem PAR-1, deutlich geringere mRNA-Spiegel des PAR-4 in humanen SMCs nachgewiesen wurden (Bretschneider et al., 2001). Dennoch konnte die funktionelle Aktivität dieses Rezeptor-Subtyps in Bezug auf Signaltransduktion und DNA-Synthese demonstriert werden. In Übereinstimmung damit konnte mit Hilfe selektiver PAR-AP in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung des PAR-4, und auch des PAR-3, an der

Aktivierung der MMP-2 gezeigt werden. Darüber hinaus kam es zu einer deutlichen Induktion der HB-EGF-Genexpression durch PAR-1-AP. Diese Ergebnisse belegen die funktionelle Aktivität aller nachgewiesenen PARs in humanen SMCs und suggerieren, dass sowohl der PAR-1 und der PAR-3, als auch der in geringerem Maße vorhandene PAR-4, eine Relevanz für die Vermittlung von Thrombin-Signalen in diesen Zellen besitzen.

Hinsichtlich der basalen PAR-Expression und der Effekte von PAR-AP konnten keine Unterschiede zwischen arteriellen und venösen SMCs festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten sich unter dem Einfluss von Thrombin grundlegende Unterschiede bei der Regulation einzelner PAR-Subtypen. Während sich die Expression des PAR-1 in keiner der untersuchten Zellen veränderte, unterlagen der PAR-3 und der PAR-4 in venösen SMCs einer zeitabhängigen und komplexen biphasischen Regulation. In arteriellen Zellen dagegen wurde der PAR-3 nicht und der PAR-4 nur marginal reguliert. Diese Ergebnisse können bedeuten, dass sich (i) Thrombin-Wirkungen per se und (ii) PAR-3- und PAR-4-vermittelte Wirkungen unter dem Einfluss von Thrombin in arteriellen und venösen SMCs maßgeblich unterscheiden können.

Nach Literaturangaben unterliegt der PAR-1 in vaskulären Zellen einer ausgeprägten Regulation. In SMCs verschiedener Spezies konnte eine verstärkte PAR-1-Expression durch Wachstumsfaktoren wie Angiotensin II (Fisslthaler et al., 1998), PDGF (Wilcox et al., 1994) oder bFGF (Zhong et al., 1992; Wilcox et al., 1994) gezeigt werden. Der Phorbolster PMA, als auch PGE₁, führten in Mesangialzellen jeweils zu einer Verminderung der PAR-1-Gen- und Proteinexpression (Zacharias et al., 1995). Ebenso konnte eine Herabregulation dieses Rezeptors durch inflammatorische Zytokine wie TNF- α in Endothelzellen demonstriert werden (Yan et al., 1996). Scherkräfte-abhängig kam es in SMCs der humanen Aorta und der Ratte sowohl zu einer Induktion als auch Repression der PAR-1-Expression, was funktionell mit einer Modulation Thrombin-vermittelter Wirkungen einherging (Papadaki et al., 1998). *In vitro*-Daten zur Regulation von Thrombin-Rezeptoren durch Thrombin selbst sind äußerst begrenzt. Zacharias und Kollegen (1995) konnten demonstrieren, dass Thrombin oder Thrombin-Rezeptor-aktivierendes Peptid (TRAP) in humanen Mesangialzellen nach 24 h zu einer verminderten Anzahl von PAR-1 auf der Zelloberfläche führte. Die PAR-1-Genexpression blieb dabei allerdings unverändert. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit konnte ebenfalls keine Beeinflussung der PAR-1-Genexpression über 24 h durch Thrombin in humanen SMCs feststellen (Bretschneider et al., 2003). Zusammen mit den Befunden der

vorliegenden Arbeit festigen diese Daten die Annahme, dass der PAR-1 in humanen Glattmuskelzellen unter dem Einfluss seines eigenen Agonisten keiner transkriptionellen Regulation unterliegt.

Im Gegensatz dazu steht die unter analogen Bedingungen beobachtete differentielle Regulation des PAR-3 und des PAR-4. Auffällig waren hier insbesondere der in venösen SMCs beobachtete biphasische Zeitverlauf und die konstitutive Expression in Arterien. Der PAR-3 wurde in venösen SMCs durch Thrombin sowohl leicht auf- (5 min) als auch deutlich herabreguliert (10 – 30 min und 6 – 24 h). Der PAR-4 zeigte sowohl nach 5 – 10 min als auch nach 3 – 24 h eine deutliche Induktion. Es kann festgehalten werden, dass der PAR-3, abgesehen von einer leichten initialen Induktion, durch Thrombin über einen Zeitraum von 24 h insgesamt herabreguliert wurde, während für den PAR-4 unter gleichen Bedingungen eine verstärkte Expression zu beobachten war. Damit implizieren die Ergebnisse, dass Thrombin in der Lage sein könnte, PAR-vermittelte Wirkungen über eine homologe Rezeptor-Regulation sowohl im negativen (PAR-3) als auch positiven Sinne (PAR-4) zu modifizieren. Aufgrund des irreversiblen Aktivierungsmechanismus und der eingangs beschriebenen Internalisierung und Degradation (Macfarlane et al., 2001) gewinnt die Regulation der PAR-Genexpression möglicherweise zusätzlich an Bedeutung, da die Resensibilisierung eine Neusynthese des Rezeptors erforderlich macht. Für viele GPCRs ist eine Langzeit-Desensibilisierung durch Herabregulation der Rezeptor-Expression bekannt (Lohse, 1993). Den Ergebnissen zu Folge würde eine verminderte PAR-3-Expression eine prolongierte Refraktärphase nach sich ziehen, während der PAR-4, zumindest in venösen, nicht aber in arteriellen SMCs, einer schnelleren Resensibilisierung unterliegen könnte.

Insbesondere PAR-4-vermittelte Wirkungen könnten in Venen demnach deutlich stärker ausgeprägt sein. Der PAR-4 konnte erst vor wenigen Jahren identifiziert werden (Xu et al., 1998) und Untersuchungen zur Bedeutung dieses Rezeptors beschränken sich bislang größtenteils auf die Regulation der Plättchen- (Kahn et al., 1998; Ofosu, 2003) und Leukozytenfunktion (Vergnolle et al., 2002). In Kardiomyozyten der Maus wurde der Aktivierung PAR-4-abhängiger Signalwege eine Bedeutung für die Hypertrophie beigemessen (Sabri et al., 2003). In humanen SMCs bewirkte die selektive Aktivierung des PAR-4 mittels PAR-4-AP (GYPGQV) eine erhöhte DNA-Syntheserate (Bretschneider et al., 2001). Ebenfalls ist eine PAR-4-vermittelte Zunahme der Motilität glatter Muskelzellen im Gastrointestinaltrakt gezeigt worden (Kawabata, 2003). Diese Daten implizieren damit eine

Bedeutung des PAR-4 für Wachstums- und Migrationsprozesse. Eine Verstärkung PAR-4-vermittelter Wirkungen unter dem Einfluss von Thrombin würde daher auf unterschiedliche Proliferations- und Migrationseigenschaften venöser gegenüber arterieller SMCs hinweisen. Tatsächlich konnten neuere Untersuchungen zeigen, dass Thrombin in venösen, verglichen mit arteriellen SMCs, zu einer deutlich stärkeren Zunahme der DNA-Syntheserate führte (Yang et al., 1997). Eine differentielle PAR-Expression ist in diesem Zusammenhang allerdings nicht untersucht worden.

Neben Thrombin (Kahn et al., 1998), Trypsin (Kahn et al., 1998) und Cathepsin G (Sambrano et al., 2000) sind in jüngerer Zeit weitere potentielle Agonisten am PAR-4 diskutiert worden. Hierzu zählen hydrolytische Abbauprodukte des α -Thrombins, β - und γ -Thrombin (Soslau et al., 2004), über deren Funktion allerdings wenig bekannt ist, und die Serin-Protease Plasmin (Quinton et al., 2004), der eine Bedeutung bei der Zellproliferation (George et al., 2001) und -migration (Jackson et al., 1993; Wijnberg et al., 1997; Lijnen et al., 1998) beigemessen wird. Plasmin wird *in vivo* im Bereich von Gefäßverletzungen gebildet und könnte demnach, unter dem Einfluss von Thrombin, ebenfalls differentielle Wirkungen in beiden Gefäßtypen entfalten.

4.2 Bedeutung von HB-EGF für die Vermittlung von Thrombin-Wirkungen

Für Thrombin werden mittlerweile eine Reihe sekundärer Mediatoren diskutiert, die nach vermehrter Freisetzung dessen mitogene Wirkungen indirekt vermitteln (Patterson et al., 2001). In nicht-humanen SMCs gilt unter anderem HB-EGF als ein solcher wichtiger Mediator (Prenzel et al., 1999; Kalmes et al., 2000). Bezüglich der funktionellen Bedeutung sekundärer Wachstumsfaktorbildung für humane SMCs ist allerdings nach wie vor wenig bekannt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass in SMCs der humanen Vena saphena synthetisierter und freigesetzter VEGF einen wichtigen Mediator der Thrombin-induzierten Migration darstellt (Wang et al., 2004). Daneben wird auch FGF-2 eine Funktion bei der Thrombin-induzierten Proliferation in SMCs der humanen Aorta zugeschrieben (Rauch et al., 2004). In den in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen SMCs konnte die Thrombin-induzierte Zellmigration in Anwesenheit neutralisierender anti-HB-EGF-Antikörper signifikant gehemmt werden, was erstmalig eine Beteiligung dieses Wachstumsfaktors an der Vermittlung migratorischer Thrombin-Wirkungen in humanen SMCs aufzeigt.

Durch die Wirksamkeit der Antikörper wurde auch indirekt der Nachweis des Proteins im Zellüberstand erbracht, so dass die Befunde Rückschlüsse auf eine vermehrte Freisetzung von HB-EGF durch Thrombin zulassen. Tatsächlich konnte auf Genebene eine verstärkte Transkription des Wachstumsfaktors festgestellt werden und es kann in Folge dessen von einer verstärkten Protein-Bildung ausgegangen werden. Im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit konnte HB-EGF in Immunopräzipitations-Experimenten im Zellüberstand allerdings nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Grund dafür ist, neben der schlechten Nachweisgrenze der Methode, mit großer Wahrscheinlichkeit eine nur sehr geringe Menge von HB-EGF im konditionierten Medium (KM). Die Gruppe um Michael Klagsbrun, die erstmalig HB-EGF im KM einer humanen Lymphomzelllinie (U-937) nachweisen konnte, musste für die Präparation von 2 µg HB-EGF-Protein 10 Liter KM (entsprechend einer Konzentration von 200 pg/ml) einsetzen (Higashiyama et al., 1992). Demnach muss davon ausgegangen werden, dass HB-EGF entweder nur in einer sehr geringen Menge von der Zelle gebildet wird, oder ein Großteil auf der Zelloberfläche verbleibt und nicht durch Prozessierung freigesetzt wird.

Die Annahme eines autokrinen Mechanismus wird durch die Beobachtung unterstützt, dass sich HB-EGF selbst als potenter chemotaktischer Faktor erwies. Auch in SMCs anderen Ursprungs und in Endothelzellen konnte die chemotaktische Aktivität von HB-EGF gezeigt werden (Higashiyama et al., 1993; Abramovitch et al., 1998; Iivanainen et al., 2003). In Analogie zu vielen anderen Wachstumsfaktoren sind zur Entfaltung biologischer HB-EGF-Wirkungen sehr niedrige Konzentrationen ausreichend (Davis-Fleischer und Besner, 1998). In den unter Abschnitt 3.3 gezeigten Versuchen konnten deutliche mitogene Effekte durch HB-EGF bereits mit Konzentrationen von 1 ng/ml erzielt werden. Für die Migration konnte in bovinen SMCs eine EC₅₀ von 150 pg/ml ermittelt werden (Higashiyama et al., 1993). Daher machen diese Daten wahrscheinlich, dass auch möglicherweise nur sehr geringe, freigesetzte HB-EGF-Mengen für die Vermittlung migratorischer Thrombin-Wirkungen relevant sind.

HB-EGF wird von der Zelle in Form einer Membran-verankerten Vorstufe (pro-HB-EGF) synthetisiert und es kommt nach proteolytischer Prozessierung zur Sekretion von ausgereiftem (*mature*) HB-EGF (Raab et al., 1994; Goishi et al., 1995). In der Literatur sind vermehrt Hinweise zu finden, dass Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs), insbesondere die MMP-3, an der Freisetzung von HB-EGF beteiligt sein könnten (Suzuki et al., 1997; Izumi et al., 1998; Prenzel et al., 1999). Auch die Thrombin-vermittelte, HB-EGF-abhängige EGF-

Rezeptor-Transaktivierung konnte durch unspezifische Hemmung der MMP-Aktivität verhindert werden (Kalmes et al., 2000). Thrombin ist ein potenter Aktivator von MMPs in SMCs (Galis et al., 1997; Oak et al., 2004). Eine Aktivierung der MMP-3 durch Thrombin ist für Endothelzellen der humanen Vena saphena und Arteria mammaria beschrieben worden (Duhamel-Clerin et al., 1997). Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass Thrombin, möglicherweise über eine Aktivierung von MMPs, vermehrt HB-EGF freisetzen kann.

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte keine Beteiligung von HB-EGF an der Thrombin-vermittelten ERK-1/2-Phosphorylierung festgestellt werden. Damit widersprechen diese Ergebnisse denen von Kalmes und Kollegen (2000). In den dort verwendeten SMCs der Ratte und des Pavians führte die Thrombin-vermittelte Freisetzung von HB-EGF innerhalb weniger Minuten zu einer Transaktivierung des EGF-Rezeptors (EGFR) mit nachfolgender Aktivierung der ERK-1/2-Kaskade. In Übereinstimmung mit der in der vorliegenden Arbeit gezeigten fehlenden ERK-1/2-Hemmung konnten Rauch und Kollegen (2004) jüngst demonstrieren, dass weder Thrombin noch FXa in humanen SMCs der Aorta eine Transaktivierung des EGFR bewirkte. Diese Befunde weisen einerseits auf Spezies-spezifische Mechanismen in Bezug auf die Regulation von Thrombin-Signalen durch sekundäre Wachstumsfaktoren hin, und suggerieren andererseits, dass der ERK-1/2-Weg in humanen SMCs keine Bedeutung für die HB-EGF-vermittelte Migration durch Thrombin zu besitzen scheint. Es muss dennoch davon ausgegangen werden, dass, wie oben diskutiert, nach Thrombin-, und auch nach FXa-Stimulation, vermehrt HB-EGF freigesetzt wird. Für diese offensichtlichen Unterschiede kommen mehrere Erklärungsmöglichkeiten in Betracht. Eine Transaktivierung des EGFR, wie sie für viele Agonisten von GPCRs beschrieben ist (Zwick et al., 1999), besitzt eine sehr schnelle Kinetik und ist bereits nach 2 – 5 min detektierbar (Daub et al., 1997; Li et al., 1998; Prenzel et al., 1999). Dies impliziert, dass die HB-EGF-vermittelte Transaktivierung in nicht-humanen SMCs auf einer Freisetzung von bereits synthetisiertem und Membran-verankertem pro-HB-EGF beruht, und nicht auf *de novo*-transkriptionellen bzw. translatorischen Mechanismen. Für FGF-2 beispielsweise werden in der Literatur beide Mechanismen diskutiert. Einerseits wurde die partielle Vermittlung mitogener Thrombin-Wirkungen durch eine autokrine Produktion von FGF-2 postuliert, die auf einer mRNA- / Protein-Neusynthese zu beruhen scheint (Cucina et al., 2002). Andererseits kommt es durch Thrombin auch zu einer raschen FGF-2-vermittelten Transaktivierung des FGF-Rezeptors (Rauch et al., 2004). Aufgrund dieser Datenlage wäre es

wahrscheinlich, dass die Thrombin-induzierte Migration in humanen SMCs, zumindest zum Teil, auf einer vermehrten *de novo*-Synthese von HB-EGF beruht. Diese Vermutung wird durch Berichte gestützt, in denen die Thrombin-induzierte Migration in Anwesenheit eines Translationsinhibitors (Cycloheximid) deutlich vermindert werden konnte (Noda Heiny und Sobel, 1995). Auf der anderen Seite könnten andere HB-EGF-Rezeptoren als der klassische EGFR (erbB1/HER1) (Higashiyama et al., 1991) involviert sein. Zu diesen zählen die ebenfalls zur Gruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehörigen erbB2/HER2/c-Neu (Iivanainen et al., 2003) und erbB4/HER4 (Elenius et al., 1997), als auch N-arginine dibasic convertase (NRDc), eine Metalloendopeptidase aus der M16-Familie (Nishi et al., 2001). Interessanterweise scheint HB-EGF in HER4-exprimierenden Zellen ein potenter chemotaktischer Faktor, aber kein Mitogen zu sein, während er über den EGFR sowohl die Migration als auch die Proliferation fördert (Elenius et al., 1997). In SMCs der Koronar-Arterie konnte die Expression funktionell-aktiver FGFR und erbB2/HER2-Rezeptoren, nicht aber erbB4/HER4-Rezeptoren nachgewiesen werden (Iivanainen et al., 2003). Welche HB-EGF-Rezeptoren in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten SMCs exprimiert werden, ist bislang nicht untersucht worden.

Überraschenderweise konnte im Gegensatz zur Migration keine Beteiligung von HB-EGF an der Thrombin-induzierten DNA-Synthese festgestellt werden. Frühere Befunde aus Aorten-SMCs von Neugeborenen konnten ebenfalls keine funktionelle Bedeutung von HB-EGF für die Thrombin-induzierte DNA-Synthese feststellen (Nakano et al., 1993). Dies lässt vermuten, dass HB-EGF in humanen SMCs ein differentieller Mediator der Thrombin-induzierten Migration und Proliferation ist, was dafür sprechen würde, dass beiden Prozessen unterschiedliche Signalwege zu Grunde liegen. In mehreren in jüngerer Zeit publizierten Arbeiten konnten differentielle Signalwege für Migrations- und Proliferationsvorgänge identifiziert werden. In humanen SMCs (Vena saphena) führte die Aktivierung der PKC zu einer Stimulation der SMC-Proliferation bei gleichzeitiger Hemmung der Zellmigration (Itoh et al., 2001), wobei an der Vermittlung dieser Effekte möglicherweise verschiedene PKC-Isoformen (PKC- α , - β I, - δ und/oder - ϵ) beteiligt sind. Unter Verwendung der gleichen Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das kleine GTP-bindende Protein Rho eine kritische Bedeutung für die Migration, nicht aber für die Proliferation, und ebenfalls nicht für die Aktivierung des ERK-1/2-Weges besitzt (Liu et al., 2002). Thrombin ist ein potenter Rho-Aktivator in SMCs (Seasholtz et al., 1999). Ob HB-EGF in der Lage ist, Rho zu aktivieren,

und ob HB-EGF bei der Vermittlung der Rho-Aktivierung eine Rolle spielt, ist bislang unbekannt.

Die Beobachtung, dass HB-EGF selbst sowohl zu einer Zunahme der Migration als auch zu einer Zunahme der DNA-Synthese führte, erschwert die Interpretation der Ergebnisse. Auch hier könnten unterschiedliche HB-EGF-Rezeptoren eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang muss erneut der erb4/HER4 genannt werden, der offensichtlich nur migratorische, aber keine proliferativen Effekte vermittelt (Elenius et al., 1997). Über den Besatz humaner venöser SMCs an HB-EGF-Rezeptoren ist nichts bekannt, ebenso wenig über eine potentielle Regulation der HB-EGF-Rezeptorexpression durch Thrombin. Möglicherweise sind auch die kleinen, durch Thrombin-freigesetzten Mengen an HB-EGF für die Entfaltung migratorischer Wirkungen ausreichend, während für mitogene Effekte höhere Konzentrationen benötigt werden, die aber unter diesen experimentellen Bedingungen nicht erreicht werden. Zur Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und der beteiligten Signalwege sind weitergehende Untersuchungen erforderlich.

Auffällig bei den Proliferations-Versuchen war auch der verhältnismäßig schwache mitogene Effekt des Thrombins (etwa 4-facher Anstieg gegenüber Kontrolle), während sich insbesondere FXa, und auch HB-EGF, als wesentlich potentere Stimuli der DNA-Synthese (etwa 7.5- bzw. 5.5-fache Zunahme gegenüber Kontrolle) erwiesen. Damit war das mitogene Potential von FXa im Vergleich zum Thrombin nahezu doppelt so groß. Auch höhere Thrombin-Konzentrationen bewirkten praktisch keine weitere Zunahme der DNA-Synthese (Daten nicht gezeigt). Diese quantitativen Unterschiede könnten einerseits durch die Existenz individueller mitogener Signalwege erklärt werden, andererseits wäre aber in diesem Zusammenhang auch eine vermehrte Inaktivierung von Thrombin denkbar, z.B. durch Thrombomodulin (TM). TM ist ein Membran-integriertes Glykoprotein, das mit hoher Affinität an Thrombin bindet (Dittman und Majerus, 1990) und auf kultivierten SMCs nachgewiesen werden kann (Soff et al., 1991). Daneben ist Thrombin selbst in der Lage, die TM-Expression in diesen Zellen zu erhöhen (Ma et al., 1997). Da TM als Inhibitor der Thrombin-induzierten Proliferation gilt (Grinnell und Berg, 1996; Li et al., 2000), könnte dessen vermehrte glattmuskuläre Expression zur Erklärung der Befunde beitragen.

Regulation der HB-EGF-Genexpression

Aufgrund der eingehend diskutierten funktionellen Bedeutung von HB-EGF, und der Tatsache, dass über die Regulation der HB-EGF-Expression durch Thrombin bislang wenig bekannt ist, wurden die beteiligten trans- und intrazellulären Signalwege analysiert. Eine mögliche Beteiligung von Thrombin-Rezeptoren wurde mit Hilfe spezifischer PAR-aktivierender Peptide (AP) untersucht. Diese entsprechen der korrespondierenden Sequenz des angebundenen Liganden und sind in der Lage, nicht-proteolytisch selektiv einzelne PAR-Subtypen direkt zu aktivieren (Vu et al., 1991; Kahn et al., 1999; Faruqi et al., 2000). Hier zeigte sich, dass nur PAR-1-AP, nicht aber PAR-3- oder PAR-4-AP, in der Lage war, HB-EGF zu induzieren. Auch durch Kombinationen verschiedener PAR-AP zeigten sich keine synergistischen Effekte, was die Beteiligung weiterer PARs unwahrscheinlich macht, und darauf hindeutet, dass der PAR-1 als einziger Vertreter der PAR-Familie Thrombin-Effekte auf die HB-EGF-Genexpression vermittelt. Unter Annahme der Korrelation einer vermehrten HB-EGF-Expression / -Freisetzung mit der Zellmotilität weisen diese Befunde auch auf eine Funktion des PAR-1 für die Thrombin-induzierte Migration hin. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse weiterer Arbeiten gestützt, die ebenfalls eine Funktion des PAR-1 für die Zellmigration aufzeigen konnten (Seasholtz et al., 1999; Majumdar et al., 2004). Ebenfalls in humanen SMCs vermittelt vermutlich die Aktivierung des PAR-1, nicht aber die des PAR-3, die Expression und Freisetzung von VEGF (Arisato et al., 2003). Die Tatsache, dass VEGF ebenfalls als Mediator der Thrombin-induzierten Migration gilt (Wang et al., 2004), unterstreicht daher weiter die postulierte Bedeutung des PAR-1 für die indirekte Vermittlung migratorischer Thrombin-Wirkungen.

Beim quantitativen Vergleich der Wirkungen von PAR-AP und Thrombin auf die Genexpression zeigte sich, dass die Effekte von PAR-1-AP, und auch die der Kombinationen von PAR-1-AP mit weiteren PAR-AP, deutlich schwächer waren, als die durch Thrombin in einer moderaten Konzentration von 1 U/ml erzielten. Dies musste auch bei simultaner Zugabe aller drei PAR-AP festgestellt werden, was, bezogen auf PARs, dem natürlichen Wirkspektrum des Thrombins entsprechen sollte. Eine Erklärungsmöglichkeit für diese Feststellung wäre die niedrigere Rezeptor-Affinität der Peptide im Vergleich zum Thrombin. Die EC_{50} -Werte am PAR-1 betragen für das PAR-1-AP (SFLLRN) 0.1 μ M und für Thrombin 50 pM (O'Brien et al., 2001). Dies ist möglicherweise auf die fehlende räumliche Nähe des, im Falle der Aktivierung durch Thrombin, noch an den Rezeptor angebundenen Liganden zurückzuführen. Dementsprechend werden relativ hohe Konzentrationen des "freien" PAR-

AP benötigt, um eine Rezeptor-Aktivierung zu bewirken. In den Versuchen sind alle verwendeten PAR-AP in einer verglichen mit der EC_{50} vielfach höheren Konzentration (200 - 500 μ M) eingesetzt worden. Aus diesem Grunde ist es unwahrscheinlich, dass die Affinitäts-Unterschiede die geschilderten Befunde erklären. Die Ergebnisse sprechen eher dafür, dass alternative transzelluläre Signalwege existieren, die zur vollen Entfaltung von Thrombin-Effekten beitragen. Hinweise diesbezüglich gibt es unter anderem aus SMCs der Atemwege, in denen die selektive Aktivierung der bekannten, und in diesen Zellen exprimierten PARs, ebenfalls nicht ausreichte, um Thrombin-vermittelte Wirkungen (Mitogenese und Zytokin-Produktion) vollständig zu imitieren (Tran und Stewart, 2003). In diesen Untersuchungen wurde allerdings ebenfalls die Serin-Protease-Aktivität des Thrombins für die Entfaltung der Effekte benötigt. Anderen Berichten zu Folge wird die proteolytische Aktivität, die naturgemäß von essentieller Bedeutung für die Aktivierung von PARs ist, für zahlreiche Thrombin-Wirkungen nicht benötigt (Bar-Shavit et al., 1990). Diese Literaturdaten und die Befunde der vorliegenden Arbeit deuten damit auf die Existenz weiterer Thrombin-Rezeptoren hin.

Auch FXa führte zeitabhängig zu einer transienten Zunahme der HB-EGF-Expression und die FXa-vermittelte Migration konnte durch Neutralisation der HB-EGF-Aktivität signifikant gehemmt werden. Über die Identität der Rezeptoren, die zelluläre FXa-Wirkungen vermitteln, herrscht nach wie vor Unklarheit. Neben dem *effector-cell protease receptor 1* (EPR-1) (Nicholson et al., 1996; Herbert et al., 1998; Blanc-Brude et al., 2001) werden insbesondere der PAR-2 (Camerer et al., 2002) und auch der PAR-1 (Riewald et al., 2001) in diesem Zusammenhang diskutiert. Stimulation des PAR-2 mit einem selektiven PAR-2-AP führte nicht zur Induktion von HB-EGF (Daten nicht gezeigt). Daher könnte, zumindest zum Teil, eine Aktivierung des PAR-1 durch FXa zu einer vermehrten HB-EGF-Expression beitragen. Insgesamt weisen diese Zusammenhänge darauf hin, dass der Thrombin- und FXa-induzierten Migration partiell identische Signalwege zu Grunde liegen.

4.3 Genexpressionsanalysen mit Thrombin und Fxa

Unter dem Einfluss von Koagulationsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Zytokinen kommt es zu einer Änderung des glattmuskulären Phänotyps, der insbesondere durch ein stark modifiziertes Genexpressionsmuster gekennzeichnet ist (Beauchamp et al., 2003). In

vaskulären Zellen konnten bereits eine Reihe Thrombin-regulierter Gene identifiziert werden (Übersicht in Stenina, 2003), ein systematischer Ansatz unter Verwendung der Microarray-Analyse ist allerdings noch nicht verfolgt worden. In der vorliegenden Arbeit konnten mit dieser Methode zahlreiche neue Thrombin- und auch FXa-regulierte Gene identifiziert werden, die einerseits für Wachstumsfaktoren, inflammatorische Zytokine, deren Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Zellzyklus-assoziierte Proteine kodieren, und andererseits mit der Regulation der Hämostase assoziiert werden. Die veränderte Expression dieser Gene könnte zur Vermittlung proatherogener Wirkungen der Gerinnungsfaktoren beitragen und so die Entstehung einer intimalen Hyperplasie begünstigen.

Eines der drei ausgewählten Gene, dessen Expression mittels RT-PCR näher charakterisiert wurde, war der *fibroblast growth factor 5* (FGF-5). Den Mitgliedern der FGF-Familie werden heute wichtige Bedeutungen bei der Regulation von Wachstums-, Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beigemessen (Ornitz und Itoh, 2001; Auguste et al., 2003). FGF-5 ist ein heparin-bindendes Polypeptid, das ursprünglich als Produkt eines Onkogens, und durch seine Fähigkeit, das Wachstum von Fibroblasten unter serumfreien Bedingungen zu unterstützen, identifiziert wurde (Zhan et al., 1988). Des Weiteren besitzt FGF-5 biologische Funktionen für die Regulation des Haarwuchses bei Mäusen (Hebert et al., 1994; Pena et al., 1999), als Überlebensfaktor für Motoneurone (Hughes et al., 1993) und für die neuronale Differenzierung (Ozawa et al., 1998). Das auf Chromosom 4q11 lokalisierte FGF-5-Gen kodiert für ein glykosyliertes Protein, das aus 267 Aminosäuren besteht (Zhan et al., 1988). Im Gegensatz zu den prototypischen FGFs, wie z.B. FGF-1 (aFGF) oder FGF-2 (bFGF), besitzt FGF-5 eine für sezernierte Proteine typische Sequenz am N-Terminus (Zhan et al., 1988). Durch Thrombin oder FXa vermehrt gebildeter und freigesetzter FGF-5 könnte daher im Zuge para- oder autokriner Mechanismen an der Vermittlung von Wachstumssignalen beteiligt sein. Die vermehrte Expression von FGF-5 in Zellsystemen, die durch intensive Proliferationsprozesse gekennzeichnet sind, z.B. Tumorzellen aus Pankreas, Endometrium oder Blase (Bates et al., 1991; Kornmann et al., 1997), unterstreicht dabei seine Funktion als Wachstumsfaktor.

Über die pathophysiologische Bedeutung von FGF-5 für das kardiovaskuläre System ist bislang nur wenig bekannt. Die intrakoronare Injektion von FGF-5 unter Verwendung eines adenoviralen Shuttle-Systems führte, vermutlich durch vermehrte Angiogenese, zu einer Verbesserung des Blutflusses bei Mäusen mit Myokard-Ischämie (Giordano et al., 1996). In

humanen atherosklerotischen Geweben und in aktivierten SMCs konnte darüber hinaus eine vermehrte Genexpression von FGF-5 nachgewiesen werden (de-Vries et al., 2000), was eine Funktion für die Vermittlung proatherogener Thrombin-Effekte suggerieren könnte. Unklar ist die unterschiedliche Bedeutung der beiden in der RT-PCR identifizierten Splice-Varianten (FGF-5, "*full-length*" und FGF-5S, "*short-form*"). Neueren Vermutungen zu Folge ist FGF-5S ein partieller Agonist/Antagonist der FGF-5-Aktivität, dessen Wirkungen auf Ebene der FGF-Rezeptoren zustande kommt (Ozawa et al., 1998). Dieser Sachverhalt muss bei weitergehenden Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von FGF-5 für Thrombin- und FXa-Wirkungen berücksichtigt werden.

Sowohl Thrombin als auch FXa führten ebenfalls zeitabhängig zu einer deutlichen Zunahme der Plasminogen-Aktivator (PA)-Inhibitor 2 (PAI-2)-Expression. Das PA-System, bestehend aus den beiden Trypsin-ähnlichen Proteasen vom Gewebe- (t-PA) und Urokinase-Typ (u-PA), reguliert die Plasmin-Bildung und damit die Fibrinolyse, und ist so im Wesentlichen für die Degradation intravaskulärer Blutgerinnsel verantwortlich (Vassalli et al., 1991). Daneben leistet es einen Beitrag zur perizellulären Proteolyse und zum Umbau der ECM, und ist nach heutigem Stand der Erkenntnisse bei einer Reihe weiterer pathophysiologischer Prozesse wie der Wundheilung oder der Neointimabildung beteiligt (Irigoyen et al., 1999). PAI-1 und PAI-2 gelten als die wichtigsten Hemmstoffe dieses Systems, deren Bedeutung für vaskuläre Erkrankungen in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert wird. Auf der einen Seite begünstigen PA-Inhibitoren eine verminderte fibrinolytische Aktivität, als auch die Entstehung von Thromben und die Ablagerung von Fibrin in atherosklerotischen Läsionen (Nordt et al., 1999). Erhöhte PAI-1-Konzentrationen im Plasma und in der Gefäßwand werden mit Erkrankungen wie der Atherosklerose assoziiert (Schneiderman et al., 1992; Lupu et al., 1993). In experimentellen Restenose-Modellen wurde eine Beteiligung von PAI-1 an der Neointima-Bildung postuliert (Hasenstab et al., 1997; Zhu et al., 2001). Demnach könnte auch die Induktion von PAI-2 durch Thrombin oder FXa zum Auftreten thrombotischer Komplikationen und zur Vermittlung atherogener Wirkungen beitragen. Andererseits besitzt gerade u-PA, welches im Vergleich mit PAI-1 bevorzugt durch PAI-2 inaktiviert wird (Kruithof et al., 1995), eine etablierte Bedeutung für das Remodeling der ECM und die Zellmigration (Vassalli et al., 1991). u-PA ist außerdem ein potentes Mitogen für Fibroblasten (De Petro et al., 1994) und SMCs (Kanase et al., 1997), während, in Übereinstimmung damit, PAI-2 in der Lage ist, die Proliferation zu hemmen (Hibino et al., 1999). Des Weiteren sind für PAI-2 in mehreren Arbeiten anti-apoptotische Effekte beschrieben worden (Dickinson et

al., 1995; Zhou et al., 2001). Unter Berücksichtigung einer nach Gefäßverletzung im Bereich medialer SMCs nachweisbaren erhöhten u-PA-Expression (Clowes et al., 1990) würde von einer PAI-2-vermittelten u-PA-Inaktivierung eine Hemmung der Proliferation und Migration zu erwarten sein.

PAI-2 wird in Abhängigkeit vom untersuchten Zelltyp in nicht unerheblichen Maße als glykosyliertes Protein sezerniert (Mikus und Ny, 1996). Darüber hinaus sind PA-Inhibitoren als Mitglieder der Superfamilie der Serin-Protease-Inhibitoren (SERPIN) in der Lage, Serin-Proteasen wie Thrombin (Naski et al., 1993) und möglicherweise auch FXa zu inaktivieren. Eine vermehrte PAI-2-Expression könnte demnach autoregulatorische Funktionen für Thrombin-Wirkungen besitzen. In diesem Zusammenhang muss auch auf die in den RT-PCR-Experimenten beobachteten Schwankungen der basalen Expression von PAI-2 hingewiesen werden. Auf eine hohe basale PAI-2-Produktion und -Sekretion zurückzuführende vermehrte Inaktivierung von Thrombin könnte einen möglichen Erklärungsansatz für die ebenfalls sehr unterschiedliche Empfindlichkeit einzelner Zelllinien gegenüber Thrombin darstellen.

4.4 Modifikation von Thrombin-Signalen durch Iloprost

Da hinsichtlich der Regulation von Thrombin-Signalen durch PGI₂ und dessen potentielle funktionelle Bedeutung in der Literatur nur sehr wenig bekannt ist, wurden die Effekte von Iloprost auf die Expression von Thrombin-Rezeptoren, auf die Aktivierung intrazellulärer Signalwege, und auf die Thrombin-induzierte HB-EGF-Genexpression untersucht. Das stabile PGI₂-Mimetikum erwies sich dabei als ein potenter pleiotroper Modulator der untersuchten Signale. Dies bekräftigt die Annahme, dass PGI₂ als (endogener) Antagonist für Thrombin-Wirkungen bedeutsam sein könnte.

Iloprost war in der Lage, sowohl die PAR-1- als auch die PAR-3-Genexpression in beiden untersuchten Zelltypen wirkungsvoll zu hemmen. Die ebenfalls beobachtete Hemmung durch Forskolin deutet dabei auf einen cAMP-abhängigen Mechanismus hin. Damit bestätigen diese Daten, zumindest für den PAR-1, Ergebnisse früherer Arbeiten, die in Mesangialzellen eine verminderte PAR-1-Expression durch verschiedene cAMP-erhöhende Agenzien gezeigt haben (Zacharias et al., 1995). Die Regulation des PAR-4 unter dem Einfluss von Iloprost oder Forskolin wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Die gezeigte Herabregulation des PAR-3 könnte allerdings auch PAR-4-vermittelte Wirkungen

beeinflussen, da der PAR-3 als Korezeptor für den PAR-4 diskutiert wird (Nakanishi-Matsui et al., 2000).

Die Rezeptor-Expression wurde über einen Zeitraum von 24 h untersucht, wobei sich signifikante Effekte erst am Ende der maximalen Gesamtkubationszeit zeigten. Es kann darüber spekuliert werden, dass auch noch über diesen Zeitraum hinaus die PAR-1- und PAR-3-mRNA-Spiegel unterhalb des basalen Expressionsniveaus liegen, wobei die genauen Zeitverläufe in weiterführenden Untersuchungen näher charakterisiert werden müssten. Die Befunde geben allerdings jetzt schon Hinweise auf cAMP-abhängige Langzeiteffekte des PGI₂ bei der Modulation PAR-vermittelter Wirkungen. Aus diesen Daten wird auch ersichtlich, dass eine verminderte Expression des PAR-1 nicht, oder nur zu einem sehr geringen Teil, zu der beobachteten Hemmung der Thrombin-induzierten HB-EGF-Genexpression beiträgt, da diese bereits nach 3 h gemessen wurde. Dieser Mechanismus wäre auch insofern unwahrscheinlich, als die Hemmung der Rezeptor-Expression, zumindest in venösen Zellen, nicht mit einer Hemmung der Genexpression korrelierte.

Neben der Modulation der Thrombin-Rezeptor-Expression konnte anhand der Bestimmung der Phosphorylierung der ERK-1/2, der PKB/Akt und von Substraten der PKC in Western Blot-Experimenten eine Hemmung dieser mitogenen Signalwege durch Iloprost nachgewiesen werden. Da die meisten der in der Literatur beschriebenen Wirkungen von PGI₂ in SMCs auf einer cAMP-Erhöhung basieren (Schrör und Weber, 1997), ist auch hier, obwohl nicht näher untersucht, eine potentielle cAMP-Abhängigkeit der Hemmeffekte sehr wahrscheinlich. Im Gegensatz zur Hemmung der Phosphorylierung von PKC-Substraten war Iloprost allerdings nicht in der Lage, Thrombin-induzierte Calcium-Transienten zu modifizieren. Da eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration als wichtiges vorgeschaltetes Signal für die Aktivierung der PKC gilt (Newton, 1995), lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Hemmung dieses Signalweges auf Ebene eines nachgeschalteten Angriffsziels, möglicherweise über eine direkte Hemmung der PKC, zustande kommt. Bezüglich der Beeinflussung von Calcium-Signalen durch PGI₂ und/oder cAMP-Analoga existieren in der Literatur widersprüchliche Berichte. So konnte in glomerulären SMCs eine Hemmung der Angiotensin II-vermittelten Calcium-Erhöhung durch PGI₂ gezeigt werden (Purdy und Arendshorst, 1999). Ähnliche Effekte wurden in Endothelin-stimulierten SMCs des Hundes durch cAMP-erhöhende Agenzien beobachtet (Yang et al., 1998a). Dagegen konnte in SMCs der Kaninchen-Aorta keine Hemmung der FCS- oder Angiotensin II-vermittelten Calcium-Mobilisierung festgestellt werden (Assender et al.,

1992). Aufgrund dieser Datenlage muss davon ausgegangen werden, dass bedeutende Spezies- und Stimulus-spezifische Unterschiede bei der Regulation intrazellulärer Calcium-Signale bestehen.

Einer der wesentlichsten Befunde der vorliegenden Arbeit ist die unterschiedliche Regulation der Thrombin-induzierten Genexpression durch Iloprost in beiden untersuchten Zelltypen. Während eine konzentrationsabhängige und vollständige Hemmung der HB-EGF-Genexpression in arteriellen SMCs beobachtet werden konnte, bewirkte die kombinierte Gabe von Thrombin und Iloprost in venösen Zellen unter analogen Versuchsbedingungen (Inkubationszeiten, Endkonzentrationen) im Vergleich mit den Einzeleffekten eher eine leichte Zunahme der HB-EGF-mRNA-Spiegel. Der Hemmeffekt in arteriellen Zellen war auf eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration zurückzuführen, was in Versuchen mit dem Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX gezeigt werden konnte. Eine cAMP-abhängige Modulation der Expression von HB-EGF im Sinne einer Herabregulation konnte in Übereinstimmung mit den eigenen Befunden auch in diversen nicht-humanen Zellsystemen gezeigt werden (Kayanoki et al., 1997; Ellis et al., 2000). Die dargestellten Ergebnisse suggerieren, dass eine cAMP-abhängige Hemmung der glattmuskulären HB-EGF-Expression, neben der Modifikation der PAR-Expression und der intrazellulären Signaltransduktion, ein weiterer wichtiger Bestandteil atheroprotektiver PGI₂-Wirkungen sein könnte. Außerdem werden weitere wichtige Hinweise geliefert, dass sich Thrombin-Wirkungen (unter dem Einfluss von PGI₂) in Arterien und Venen offensichtlich deutlich unterscheiden. Dies könnte für das Verständnis der differentiellen Bypass-Problematik bedeutsam sein.

Die Daten zur Regulation der Genexpression sind in mehrerlei Hinsicht überraschend. Einerseits konnten keine Unterschiede bezüglich der Effekte der Einzelkomponenten zwischen beiden Zelltypen festgestellt werden. Iloprost führte, trotz einer deutlich geringeren IP-R-Expression, in Venen zu einer vergleichbaren cAMP-Erhöpfung und nachfolgend auch zur Aktivierung cAMP-abhängiger Signaltransduktionswege (VASP). Daher scheidet gleichzeitig eine fehlende oder verminderte cAMP-Antwort als Ursache für die beobachteten Unterschiede aus. Darüber hinaus bewirkte Iloprost allein eine schwache aber signifikante Induktion der HB-EGF-Expression in beiden Zelltypen. Die dargestellten Unterschiede zeigten sich erst bei der Ko-Inkubation von Thrombin und Iloprost, was darauf hindeutet, dass der inhibitorischen Wirkung eine gegenseitige Beeinflussung beider Faktoren zugrunde liegt. Dies wird auch dadurch verdeutlicht, dass Thrombin wiederum in der Lage zu sein schien,

den Iloprost-Eigeneffekt aufzuheben. Auf der anderen Seite ließen sich bezüglich der Iloprost-Wirkungen auf Ebene der Signaltransduktion ebenfalls keine Unterschiede feststellen. Dies lässt vermuten, dass die Hemmung der an der Aufregulation von HB-EGF beteiligten Signaltransduktionswege (ERK-1/2-, PI3-Kinase-, PKC-Weg) für die Hemmung der Genexpression möglicherweise benötigt wird, allerdings nicht ausreicht, um sie mechanistisch zu erklären. Diese Vermutung wird durch Literaturdaten gestützt, die ebenfalls zeigen konnten, dass die cAMP-vermittelte Hemmung einer ERK-abhängigen HB-EGF-Genexpression unabhängig von Effekten auf die ERK-Aktivierung zu Stande kam (Ellis et al., 2000). Auch die cAMP-abhängige Hemmung der Mitogenese scheint keine Hemmung des ERK-Weges zu benötigen (Rao und Runge, 1996; Cospedal et al., 1999).

Neben Iloprost führte auch Forskolin als cAMP-erhöhende Substanz zu einer Induktion von HB-EGF, so dass cAMP als sekundärer Botenstoff in diesem Zusammenhang gleichermaßen stimulatorische als auch inhibitorische Wirkungen vermitteln kann. Zumindest in arteriellen SMCs kann cAMP demnach eine duale Funktion hinsichtlich der HB-EGF-Regulation zugeschrieben werden. Unter Berücksichtigung dieses Sachverhaltes ist die beobachtete Hemmung der Thrombin-induzierten Genexpression nur schwer nachvollziehbar, und der Iloprost-Eigeneffekt möglicherweise von ursächlicher Bedeutung für fehlende Hemmbarkeit venöser Zellen. Eine vermehrte Expression von HB-EGF durch cAMP-Analoga ist in der Literatur nicht beschrieben und die potentielle Bedeutung einer solchen Wirkung völlig unklar. Möglicherweise kann eine Aktivierung cAMP-abhängiger Signalwege in SMCs anti-apoptotische Wirkungen auslösen (Orlov et al., 1999; Taurin et al., 2002). Da HB-EGF in der Lage ist, Apoptose zu verhindern (Fang et al., 2001), könnte eine cAMP-medierte Aufregulation von HB-EGF ein wichtiges Signal zur Kontrolle des programmierten Zelltods sein.

Weitere Versuche zur Aufklärung der für die Genexpressionshemmung verantwortlichen Mechanismen zeigten, dass der direkte PKA-Aktivator Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) nicht in der Lage war, den Iloprost-Hemmeffekt zu imitieren. Darüber hinaus konnte aber eine Iloprost-medierte Hemmung der Genexpression durch db-cAMP vollständig aufgehoben werden. Auf den ersten Blick sind die Ergebnisse in dieser Form nicht zu erwarten gewesen. Db-cAMP wird in der Literatur recht häufig eingesetzt, um cAMP-/PKA-Abhängigkeiten nachzuweisen. Bei der Substanz handelt es sich um einen modifizierten cAMP-Abkömmling, der durch die Butyryl-Reste die Fähigkeit besitzt, Membranen zu passieren. Intrazellulär wird

db-cAMP durch die hydrolytische Abspaltung eines Butyrats bioaktiviert. Das so entstandene Monobutyryl-cAMP gilt als potenter Aktivator der PKA (Information BIOLOG Life Science Institute, Bremen).

Die Hemmung einer cAMP-abhängigen Wirkung durch ein cAMP-Derivat, das nachgewiesenermaßen cAMP-mimetische Wirkungen hinsichtlich einer PKA-Aktivierung besitzt, ist schwer zu verstehen. Unter der Annahme, dass db-cAMP tatsächlich ein selektiver PKA-Aktivator ist, und, dass intrazellulär gebildetes cAMP nicht nur die PKA, sondern auch möglicherweise weitere cAMP-sensitive (und gleichzeitig db-cAMP-insensitive) Strukturen beeinflussen kann, könnte aufgrund der Befunde über einem zwar cAMP-abhängigen, aber PKA-unabhängigen Mechanismus spekuliert werden. Dies würde suggerieren, dass die PKA eher eine stimulatorische Funktion auf die HB-EGF-Genexpression besitzt. Ein solcher Mechanismus wird durch präliminäre Befunde gestützt, die darauf hinweisen, dass db-cAMP allein ebenfalls eine Induktion der HB-EGF-Expression bewirkt (Daten nicht gezeigt). Auch der beobachtete Iloprost-Eigeneffekt könnte demnach PKA-vermittelt sein. Diese Ergebnisse würden auch die in diesem Zusammenhang postulierte duale Funktion von cAMP bekräftigen.

Zur Bestätigung dieser Hypothese und zur Untersuchung der Bedeutung der PKA würde sich alternativ der Einsatz selektiver PKA-Inhibitoren anbieten. Deren Anwendung ist ebenfalls weit verbreitet und es stehen heute eine Reihe von Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zur Verfügung. Neben PKA-hemmenden cAMP-Analoga (Rp-cAMPs) werden Membran-permeable Formen des physiologischen Peptid-Inhibitors der PKA, PKI, und Substanzen, die mit der ATP-Bindungsstelle der katalytischen PKA-Untereinheit interferieren (z.B. H89, KT5720), eingesetzt. Diese Substanzen besitzen aber zum Teil nur eine geringe Selektivität (insbesondere ATP-Bindungsstellen sind in großer Anzahl in der Zelle vorhanden) und Spezifität (Osinski et al., 2000). In eigenen Versuchen diesbezüglich musste festgestellt werden, dass weder ein myristoyliertes PKI-Derivat, noch H89 oder Rp-cAMPs in der Lage waren, PKA-abhängige Effekte (gemessen anhand der Iloprost-vermittelten VASP-Phosphorylierung) zu hemmen (Daten nicht gezeigt). Daher wurde, an Stelle eines PKA-Inhibitors, ein PKA-aktivierendes cAMP-Analogon für die Untersuchungen eingesetzt.

Eine duale Funktion von cAMP und eine potentielle PKA-Unabhängigkeit hinsichtlich der Genexpressionshemmung würden die Beteiligung weiterer cAMP-Effektoren wahrscheinlich machen. Neben der PKA konnten gerade in den letzten Jahren eine Reihe neuer Zielstrukturen

für cAMP-Wirkungen identifiziert werden (Kopperud et al., 2003), und mehrere Arbeiten konnten mittlerweile eine Kreuzaktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) durch cAMP zeigen (Komalavilas und Lincoln, 1996; White et al., 2000; Murthy, 2001; Zhu et al., 2002). Die PKG könnte in sofern von Interesse sein, als sie ebenfalls mit der Vermittlung vasoprotektiver Wirkungen, z.B. Hemmung der Proliferation und Migration, und mit der Regulation der Genexpression, sowie Änderungen des glattmuskulären Phänotyps assoziiert wird (Lincoln et al., 2001). Unterstützt wird die Annahme einer Beteiligung der PKG dadurch, dass das eingesetzte db-cAMP mit einer vergleichbar hohen Selektivität die PKA aktiviert, während andere cAMP-Analoga, z.B. 8-(4-Chlorophenylthio)-cAMP, sowohl die PKA, als auch die PKG gleichermaßen stimulieren (Information Fa. Biomol GmbH, Hamburg). Letztendlich muss festgehalten werden, dass sich die Untersuchung der Bedeutung der PKA für die beobachteten Iloprost-Effekte schwierig gestaltet. Hier sind alternative experimentelle Ansätze, z.B. die RNA-Interferenz-Methodik, nötig, um Klarheit über die mechanistischen Grundlagen transkriptioneller Regulationen durch PGI₂ zu schaffen.

Es bleibt schließlich erwähnenswert, dass die zur Hemmung der Genexpression (und auch der Signaltransduktion) benötigten geringen (nanomolaren) Iloprost-Konzentrationen biologisch relevanten PGI₂-Konzentrationen entsprechen. Eine vermehrte PGI₂-Synthese ist ein wichtiges Kennzeichen proliferierender SMCs, die in der Gefäßwand nach einer Verletzung nachgewiesen werden können. Daneben muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass Thrombin selbst in SMCs via COX-2-Induktion die endogene PGI₂-Bildung verstärkt (Rimarachin et al., 1994). Unter Berücksichtigung der Bedeutung von HB-EGF als auch Thrombin für die Entstehung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen besitzen die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Befunde daher möglicherweise eine bedeutende klinische Relevanz.

5. Zusammenfassung

Als Hauptursache für eine erneute Gefäßverengung (Restenose) nach aortokoronarer Bypass-Operation gilt die intimale Hyperplasie, die definiert ist als eine Akkumulation glatter Gefäßmuskelzellen (SMCs) und extrazellulärer Matrix (ECM) im intimalen Kompartiment. Dem Koagulationsfaktor Thrombin wird aufgrund seiner biologischen Wirkungen, wie z.B. Stimulation der SMC-Proliferation, -Migration und ECM-Synthese, eine zentrale Bedeutung bei der Entstehung der intimalen Hyperplasie beigemessen. Über die Entstehung zellulärer Thrombin-Wirkungen in humanen SMCs und über deren Modulation, insbesondere durch funktionelle Gegenspieler wie dem Prostacyclin (PGI_2), herrscht nach wie vor Unklarheit. Folgende Fragestellungen waren Gegenstand der vorliegenden Arbeit: (i) Welche Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs) sind an Thrombin-medierten Signalen beteiligt und unterliegen sie einer Regulation durch Thrombin selbst? (ii) Welche Post-Rezeptor-Signalwege vermitteln proliferative und migratorische Thrombin-Wirkungen? (iii) Führt Thrombin zur Bildung oder Freisetzung weiterer mitogener Faktoren? (iv) Welchen Einfluss hat das stabile PGI_2 -Mimetikum Iloprost auf Thrombin-aktivierte Signalwege? Da es Literaturdaten wahrscheinlich machen, dass sich SMCs aus Arterien und Venen unterscheiden, sind beide Zelltypen vergleichend untersucht worden.

(i) In arteriellen und venösen SMCs waren Thrombin-Rezeptoren (PAR-1, PAR-3 und PAR-4) unter basalen Bedingungen nachweisbar. Deren funktionelle Aktivität konnte anhand einer vermehrten Genexpression des Wachstumsfaktors *heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF) (PAR-1) und einer Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) (PAR-3 und PAR-4) demonstriert werden. Unter dem Einfluss von Thrombin zeigte sich in venösen SMCs eine komplexe Modifikation der PAR-3- und PAR-4-Expression, während diese Rezeptoren in arteriellen Zellen nicht (PAR-3) oder nur marginal (PAR-4) reguliert wurden. Die Expression des PAR-1 wurde nicht beeinflusst. Die Ergebnisse geben wichtige Hinweise darauf, dass sich Thrombin-Wirkungen per se, aber auch PAR-vermittelte Wirkungen unter dem Einfluss von Thrombin, in Arterien und Venen unterscheiden können. (ii) In beiden Zelltypen bewirkten PAR-1-aktivierendes Peptid als auch Thrombin jeweils eine vermehrte HB-EGF-Genexpression. Des Weiteren konnte eine Beteiligung von HB-EGF an migratorischen, nicht aber an proliferativen Thrombin-Effekten nachgewiesen werden. An der Aufregulation der HB-EGF Expression waren multiple mitogene Signaltransduktionswege (ERK-1/2, PI3-Kinase, PLC/PKC) beteiligt. Diese Befunde implizieren eine funktionelle Bedeutung von HB-EGF für die Vermittlung migratorischer Thrombin-Wirkungen und deuten darauf hin, dass der Zellmigration und -proliferation unterschiedliche Signalwege zugrunde liegen. (iii) Mittels Microarray-Analyse konnten zahlreiche weitere potentielle Mediatoren atherogener Thrombin-Wirkungen identifiziert werden, darunter der Wachstumsfaktor FGF-5 und der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 2 (PAI-2), die an der Entstehung vaskulärer Erkrankungen beteiligt sein könnten. (iv) Iloprost führte in beiden untersuchten Zelltypen zeitabhängig zu einer Herabregulation der PAR-1- und PAR-3-Expression. Ebenso verhinderte es in arteriellen und venösen Zellen die Thrombin-vermittelte Aktivierung des ERK-1/2-, PI3-Kinase- und PKC-Weges. Iloprost hatte keinen Einfluss auf Thrombin-induzierte Calcium-Transienten. In arteriellen, nicht aber in venösen SMCs, war Iloprost in der Lage, die Thrombin-induzierte HB-EGF-Genexpression konzentrations-abhängig zu hemmen. Die Hemmung erfolgte nach einem cAMP-abhängigen Mechanismus, wobei sich hinsichtlich der Iloprost-vermittelten cAMP-Erhöhung keine Unterschiede zwischen beiden Zelltypen zeigten. Eine unterschiedliche Regulation der Thrombin-induzierten Genexpression und der mitogenen Signaltransduktion in arteriellen und venösen SMCs durch PGI_2 könnte möglicherweise zur Erklärung der schlechteren Prognose venöser Bypässe beitragen. Insgesamt leisten die dargestellten Befunde einen Beitrag zum besseren Verständnis der Restenose-Problematik und der Pathogenese vaskulärer Erkrankungen.

6. Literaturverzeichnis

Abramovitch R, Neeman M, Reich R, Stein I, Keshet E, Abraham J, Solomon A, Marikovsky M (1998), Intercellular communication between vascular smooth muscle and endothelial cells mediated by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and vascular endothelial growth factor. *FEBS Lett* 425:441-447

Al Suwaidi J, Berger PB, Holmes DR, Jr. (2000), Coronary artery stents. *JAMA* 284:1828-1836

Arisato T, Sarker KP, Kawahara K, Nakata M, Hashiguchi T, Osame M, Kitajima I, Maruyama I (2003), The agonist of the protease-activated receptor-1 (PAR) but not PAR3 mimics thrombin-induced vascular endothelial growth factor release in human smooth muscle cells. *Cell Mol Life Sci* 60:1716-1724

Assender JW, Southgate KM, Hallett MB, Newby AC (1992), Inhibition of proliferation, but not of Ca²⁺ mobilization, by cyclic AMP and GMP in rabbit aortic smooth-muscle cells. *Biochem J* 288 (Pt 2):527-532

Auguste P, Javerzat S, Bikfalvi A (2003), Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res* 314:157-166

Baenziger NL, Dillender MJ, Majerus PW (1977), Cultured human skin fibroblasts and arterial cells produce a labile platelet-inhibitory prostaglandin. *Biochem Biophys Res Commun* 78:294-301

Bar-Shavit R, Benezra M, Eldor A, Hy-Am E, Fenton JW, Wilner GD, Vlodavsky I (1990), Thrombin immobilized to extracellular matrix is a potent mitogen for vascular smooth muscle cells: nonenzymatic mode of action. *Cell Regul* 1:453-463

Bar-Shavit R, Eldor A, Vlodavsky I (1989), Binding of thrombin to subendothelial extracellular matrix. Protection and expression of functional properties. *J Clin Invest* 84:1096-1104

Bassus S, Herkert O, Kronemann N, Gorchach A, Bremerich D, Kirchmaier CM, Busse R, Schini-Kerth VB (2001), Thrombin causes vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1550-1555

Bates B, Hardin J, Zhan X, Drickamer K, Goldfarb M (1991), Biosynthesis of human fibroblast growth factor-5. *Mol Cell Biol* 11:1840-1845

Baykal D, Schmedtje JF, Jr., Runge MS (1995), Role of the thrombin receptor in restenosis and atherosclerosis. *Am J Cardiol* 75:82B-87B

Beauchamp NJ, van Achtenberg TA, Engelse MA, Pannekoek H, de Vries CJ (2003), Gene expression profiling of resting and activated vascular smooth muscle cells by serial analysis of gene expression and clustering analysis. *Genomics* 82:288-299

Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ (2000), Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 102:840-845

Benzakour O, Kanthou C, Lupu F, Dennehy U, Goodwin C, Scully MF, Kakkar VV, Cooper DN (1995), Prothrombin cleavage by human vascular smooth muscle cells: a potential alternative pathway to the coagulation cascade. *J Cell Biochem* 59:514-528

Besner G, Higashiyama S, Klagsbrun M (1990), Isolation and characterization of a macrophage-derived heparin-binding growth factor. *Cell Regul* 1:811-819

Bishop-Bailey D, Pepper JR, Larkin SW, Mitchell JA (1998), Differential induction of cyclooxygenase-2 in human arterial and venous smooth muscle: role of endogenous prostanoids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1655-1661

Blanc-Brude OP, Chambers RC, Leoni P, Dik WA, Laurent GJ (2001), Factor Xa is a fibroblast mitogen via binding to effector-cell protease receptor-1 and autocrine release of PDGF. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C681-C689

Blindt R, Bosserhoff AK, vom-Dahl J, Hanrath P, Schrör K, Hohlfeld T, Meyer-Kirchrath J (2002), Activation of IP and EP(3) receptors alters cAMP-dependent cell migration. *Eur J Pharmacol* 444:31-37

Bourassa MG (1991), Fate of venous grafts: the past, the present and the future. *J Am Coll Cardiol* 17:1081-1083

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

Brass LF (1992), Homologous desensitization of HEL cell thrombin receptors. Distinguishable roles for proteolysis and phosphorylation. *J Biol Chem* 267:6044-6050

Braun M, Pietsch P, Zepp A, Schrör K, Baumann G, Felix SB (1997), Regulation of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1-beta-induced induced adhesion molecule expression in human vascular smooth muscle cells by cAMP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2568-2575

Bretschneider E, Braun M, Fischer A, Wittpoth M, Glusa E, Schrör K (2000), Factor Xa acts as a PDGF-independent mitogen in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 84:499-505

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

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

Camerer E, Kataoka H, Kahn M, Lease K, Coughlin SR (2002), Genetic evidence that protease-activated receptors mediate factor Xa signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* 277:16081-16087

Cameron A, Davis KB, Green G, Schaff HV (1996), Coronary bypass surgery with internal-thoracic-artery grafts--effects on survival over a 15-year period. *N Engl J Med* 334:216-219

- Cameron J, Mahanonda N, Aroney C, Hayes J, McEniery P, Gardner M, Bett N (1994), Outcome five years after percutaneous transluminal coronary angioplasty or coronary artery bypass grafting for significant narrowing limited to the left anterior descending coronary artery. *Am J Cardiol* 74:544-549
- Campeau L, Enjalbert M, Lesperance J, Bourassa MG, Kwiterovich P, Jr., Wacholder S, Sniderman A (1984), The relation of risk factors to the development of atherosclerosis in saphenous-vein bypass grafts and the progression of disease in the native circulation. A study 10 years after aortocoronary bypass surgery. *N Engl J Med* 311:1329-1332
- Cantley LC (2002), The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655-1657
- Carney DH, Mann R, Redin WR, Pernia SD, Berry D, Heggors JP, Hayward PG, Robson MC, Christie J, Annable C (1992), Enhancement of incisional wound healing and neovascularization in normal rats by thrombin and synthetic thrombin receptor-activating peptides. *J Clin Invest* 89:1469-1477
- Clowes AW, Clowes MM, Au YP, Reidy MA, Belin D (1990), Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue-type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery. *Circ Res* 67:61-67
- Cobb MH, Boulton TG, Robbins DJ (1991), Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul* 2:965-978
- Cospedal R, Lobo M, Zachary I (1999), Differential regulation of extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) 1 and 2 by cAMP and dissociation of ERK inhibition from anti-mitogenic effects in rabbit vascular smooth muscle cells. *Biochem J* 342:407-414
- Coughlin SR (1999), How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11023-11027
- Coughlin SR (2000), Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407:258-264
- Covic L, Misra M, Badar J, Singh C, Kuliopulos A (2002), Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. *Nat Med* 8:1161-1165
- Cox JL, Chiasson DA, Gotlieb AI (1991), Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries. *Prog Cardiovasc Dis* 34:45-68
- Cucina A, Borrelli V, Lucarelli M, Sterpetti AV, Cavallaro A, Strom R, Santoro-D'Angelo L, Scarpa S (2002), Autocrine production of basic fibroblast growth factor translated from novel synthesized mRNA mediates thrombin-induced mitogenesis in smooth muscle cells. *Cell Biochem Funct* 20:39-46
- Cucina A, Borrelli V, Di Carlo A, Pagliei S, Corvino V, Santoro D'Angelo L, Cavallaro A, Sterpetti AV (1999), Thrombin induces production of growth factors from aortic smooth muscle cells. *J Surg Res* 82:61-66
- Dabbagh K, Laurent GJ, McAnulty RJ, Chambers RC (1998), Thrombin stimulates smooth muscle cell procollagen synthesis and mRNA levels via a PAR-1 mediated mechanism. *Thromb Haemost* 79:405-409

- Daub H, Wallasch C, Lanckenau A, Herrlich A, Ullrich A (1997), Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 16:7032-7044
- Davey MG, Lüscher EF (1967), Actions of thrombin and other coagulant and proteolytic enzymes on blood platelets. *Nature* 216:857-858
- Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W (1991), The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 30:10363-10370
- Davies MG, Hagen PO (1995), Pathophysiology of vein graft failure: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 9:7-18
- Davis-Fleischer KM, Besner GE (1998), Structure and function of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF). *Front Biosci* 3:d288-d299
- De Petro G, Copeta A, Barlati S (1994), Urokinase-type and tissue-type plasminogen activators as growth factors of human fibroblasts. *Exp Cell Res* 213:286-294
- de-Vries CJ, van-Achterberg TA, Horrevoets AJ, ten-Cate JW, Pannekoek H (2000), Differential display identification of 40 genes with altered expression in activated human smooth muscle cells. Local expression in atherosclerotic lesions of smags, smooth muscle activation-specific genes. *J Biol Chem* 275:23939-23947
- Debey S, Kirchrath L, Schrör K, Meyer-Kirchrath J (2003), Iloprost down-regulates the expression of the growth regulatory gene Cyr61 in human vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 474:161-164
- Dejana E, Balconi G, De Castellarnau C, Barbieri B, Vergara-Dauden M, De Gaetano G (1983), Prostacyclin production by human endothelial and bovine smooth muscle cells in culture. Effect of repeated stimulation with arachidonic acid, thrombin and ionophore A23187. *Biochim Biophys Acta* 750:261-267
- Dethlefsen SM, Shepro D, D'Amore PA (1996), Comparison of the effects of mechanical stimulation on venous and arterial smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Res* 33:405-413
- Dickinson JL, Bates EJ, Ferrante A, Antalis TM (1995), Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. Evidence for an alternate biological function. *J Biol Chem* 270:27894-27904
- Dittman WA, Majerus PW (1990), Structure and function of thrombomodulin: a natural anticoagulant. *Blood* 75:329-336
- Dluz SM, Higashiyama S, Damm D, Abraham JA, Klagsbrun M (1993), Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor expression in cultured fetal human vascular smooth muscle cells. Induction of mRNA levels and secretion of active mitogen. *J Biol Chem* 268:18330-18334
- Du J, Brink M, Peng T, Mottironi B, Delafontaine P (2001), Thrombin regulates insulin-like growth factor-1 receptor transcription in vascular smooth muscle: characterization of the signaling pathway. *Circ Res* 88:1044-1052

- Duhamel-Clerin E, Orvain C, Lanza F, Cazenave JP, Klein-Soyer C (1997), Thrombin receptor-mediated increase of two matrix metalloproteinases, MMP-1 and MMP-3, in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1931-1938
- Edelman ER, Rogers C (1998), Pathobiologic responses to stenting. *Am J Cardiol* 81:4E-6E
- Elenius K, Paul S, Allison G, Sun J, Klagsbrun M (1997), Activation of HER4 by heparin-binding EGF-like growth factor stimulates chemotaxis but not proliferation. *EMBO J* 16:1268-1278
- Ellis PD, Hadfield KM, Pascall JC, Brown KD (2000), Cyclic AMP inhibits agonist-induced heparin-binding EGF gene expression independently of effects on p42/p44 MAPK activation. *Biochem Biophys Res Commun* 277:558-561
- Esmon CT (1989), The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 264:4743-4746
- Fager G (1995), Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 77:645-650
- Fang L, Li G, Liu G, Lee SW, Aaronson SA (2001), p53 induction of heparin-binding EGF-like growth factor counteracts p53 growth suppression through activation of MAPK and PI3K/Akt signaling cascades. *EMBO J* 20:1931-1939
- Faruqi TR, Weiss EJ, Shapiro MJ, Huang W, Coughlin SR (2000), Structure-function analysis of protease-activated receptor 4 tethered ligand peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function. *J Biol Chem* 275:19728-19734
- Faxon DP, Coats W, Currier J (1997), Remodeling of the coronary artery after vascular injury. *Prog Cardiovasc Dis* 40:129-140
- Fisslthaler B, Schini-Kerth VB, Fleming I, Busse R (1998), Thrombin receptor expression is increased by angiotensin II in cultured and native vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 38:263-271
- Fitzgibbon GM, Kafka HP, Leach AJ, Keon WJ, Hooper GD, Burton JR (1996), Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J Am Coll Cardiol* 28:616-626
- Flynn PD, Byrne CD, Baglin TP, Weissberg PL, Bennett MR (1997), Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood* 89:4378-4384
- Force T, Pombo CM, Avruch JA, Bonventre JV, Kyriakis JM (1996), Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease. *Circ Res* 78:947-953
- Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC (1998), Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 67:481-507
- Galis ZS, Kranzhofer R, Fenton JW, Libby P (1997), Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:483-489

- Gasic GP, Arenas CP, Gasic TB, Gasic GJ (1992), Coagulation factors X, Xa, and protein S as potent mitogens of cultured aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2317-2320
- George SJ, Johnson JL, Smith MA, Jackson CL (2001), Plasmin-mediated fibroblast growth factor-2 mobilisation supports smooth muscle cell proliferation in human saphenous vein. *J Vasc Res* 38:492-501
- Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD, Nozaki S, DeMaria AN, Dillmann WH, Mathieu-Costello O, Hammond HK (1996), Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. *Nat Med* 2:534-539
- Goishi K, Higashiyama S, Klagsbrun M, Nakano N, Umata T, Ishikawa M, Mekada E, Taniguchi N (1995), Phorbol ester induces the rapid processing of cell surface heparin-binding EGF-like growth factor: conversion from juxtacrine to paracrine growth factor activity. *Mol Biol Cell* 6:967-980
- Grinnell BW, Berg DT (1996), Surface thrombomodulin modulates thrombin receptor responses on vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 270:H603-H609
- Grosser T, Bönisch D, Zucker TP, Schrör K (1995), Iloprost-induced inhibition of proliferation of coronary artery smooth muscle cells is abolished by homologous desensitization. *Agents Actions Suppl* 45:85-91
- Harada M, Toki Y, Numaguchi Y, Osanai H, Ito T, Okumura K, Hayakawa T (1999), Prostacyclin synthase gene transfer inhibits neointimal formation in rat balloon-injured arteries without bleeding complications. *Cardiovasc Res* 43:481-491
- Harker LA (1998), Therapeutic inhibition of thrombin activities, receptors, and production. *Hematol Oncol Clin North Am* 12:1211-1230
- Harker LA, Hanson SR, Runge MS (1995), Thrombin hypothesis of thrombus generation and vascular lesion formation. *Am J Cardiol* 75:12B-17B
- Hasenstab D, Forough R, Clowes AW (1997), Plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 increase after arterial injury in rats. *Circ Res* 80:490-496
- Hebert JM, Rosenquist T, Gotz J, Martin GR (1994), FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell* 78:1017-1025
- Hein L, Ishii K, Coughlin SR, Kobilka BK (1994), Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 269:27719-27726
- Hemker HC, Beguin S (1995), Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost* 74:134-138
- Herbert J, Bono F, Herault J, Avril C, Dol F, Mares A, Schaeffer P (1998), Effector protease receptor 1 mediates the mitogenic activity of factor Xa for vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 101:993-1000

- Hibino T, Matsuda Y, Takahashi T, Goetinck PF (1999), Suppression of keratinocyte proliferation by plasminogen activator inhibitor-2. *J Invest Dermatol* 112:85-90
- Higashiyama S, Abraham JA, Klagsbrun M (1993), Heparin-binding EGF-like growth factor stimulation of smooth muscle cell migration: dependence on interactions with cell surface heparan sulfate. *J Cell Biol* 122:933-940
- Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M (1991), A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 251:936-939
- Higashiyama S, Lau K, Besner GE, Abraham JA, Klagsbrun M (1992), Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. *J Biol Chem* 267:6205-6212
- Hirano K, Kanaide H (2003), Role of protease-activated receptors in the vascular system. *J Atheroscler Thromb* 10:211-225
- Holmes DR, Jr. (2001), In-stent restenosis. *Rev Cardiovasc Med* 2:115-119
- Holt CM, Francis SE, Newby AC, Rogers S, Gadsdon PA, Taylor T, Angelini GD (1993), Comparison of response to injury in organ culture of human saphenous vein and internal mammary artery. *Ann Thorac Surg* 55:1522-1528
- Hombach V, Waltenberger J, Voisard R, Hoher M (1995), [Recurrent stenosis following coronary angioplasty. Clinical, cell biological and molecular aspects]. *Z Kardiol* 84:5-21
- Hoxie JA, Ahuja M, Belmonte E, Pizarro S, Parton R, Brass LF (1993), Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J Biol Chem* 268:13756-13763
- Hughes RA, Sendtner M, Goldfarb M, Lindholm D, Thoenen H (1993), Evidence that fibroblast growth factor 5 is a major muscle-derived survival factor for cultured spinal motoneurons. *Neuron* 10:369-377
- Hung DT, Wong YH, Vu TK, Coughlin SR (1992), The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 267:20831-20834
- Igura T, Kawata S, Miyagawa J, Inui Y, Tamura S, Fukuda K, Isozaki K, Yamamori K, Taniguchi N, Higashiyama S, Matsuzawa Y (1996), Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in neointimal cells induced by balloon injury in rat carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1524-1531
- Ii M, Hoshiga M, Fukui R, Negoro N, Nakakoji T, Nishiguchi F, Kohbayashi E, Ishihara T, Hanafusa T (2001), Beraprost sodium regulates cell cycle in vascular smooth muscle cells through cAMP signaling by preventing down-regulation of p27(Kip1). *Cardiovasc Res* 52:500-508
- Iivanainen E, Nelimarkka L, Elenius V, Heikkinen SM, Junttila TT, Sihombing L, Sundvall M, Maatta JA, Laine VJ, Yla-Herttuala S, Higashiyama S, Alitalo K, Elenius K (2003), Angiopoietin-regulated recruitment of vascular smooth muscle cells by endothelial-derived heparin binding EGF-like growth factor. *FASEB J* 17:1609-1621

- Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y (1999), The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 56:104-132
- Ishii K, Chen J, Ishii M, Koch WJ, Freedman NJ, Lefkowitz RJ, Coughlin SR (1994), Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 269:1125-1130
- Itoh H, Yamamura S, Ware JA, Zhuang S, Mii S, Liu B, Kent KC (2001), Differential effects of protein kinase C on human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H359-H370
- Izumi Y, Hirata M, Hasuwa H, Iwamoto R, Umata T, Miyado K, Tamai Y, Kurisaki T, Sehara-Fujisawa A, Ohno S, Mekada E (1998), A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J* 17:7260-7272
- Jackson CL, Raines EW, Ross R, Reidy MA (1993), Role of endogenous platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cell migration after balloon catheter injury. *Arterioscler Thromb* 13:1218-1226
- Jacob MP, Badier-Commander C, Fontaine V, Benazzoug Y, Feldman L, Michel JB (2001), Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol (Paris)* 49:326-332
- Johnson JL, van-Eys GJ, Angelini GD, George SJ (2001), Injury induces dedifferentiation of smooth muscle cells and increased matrix-degrading metalloproteinase activity in human saphenous vein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:1146-1151
- Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR (1999), Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* 103:879-887
- Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Jr., Tam C, Coughlin SR (1998), A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394:690-694
- Kalmes A, Daum G, Clowes AW (2001), EGFR transactivation in the regulation of SMC function. *Ann N Y Acad Sci* 947:42-54
- Kalmes A, Vesti BR, Daum G, Abraham JA, Clowes AW (2000), Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor. *Circ Res* 87:92-98
- Kanda Y, Mizuno K, Kuroki Y, Watanabe Y (2001a), Thrombin-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation is mediated by epidermal growth factor receptor transactivation pathway. *Br J Pharmacol* 132:1657-1664
- Kanda Y, Nishio E, Kuroki Y, Mizuno K, Watanabe Y (2001b), Thrombin activates p38 mitogen-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 68:1989-2000

- Kanse SM, Benzakour O, Kanthou C, Kost C, Lijnen HR, Preissner KT (1997), Induction of vascular SMC proliferation by urokinase indicates a novel mechanism of action in vasoproliferative disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2848-2854
- Kanthou C, Benzakour O, Patel G, Deadman J, Kakkar VV, Lupu F (1995a), Thrombin receptor activating peptide (TRAP) stimulates mitogenesis, c-fos and PDGF-A gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 74:1340-1347
- Kanthou C, Kanse SM, Newman P, Kakkar VV, Benzakour O (1995b), Variability in the proliferative responsiveness of cultured human vascular smooth muscle cells to alpha-thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis* 6:753-760
- Kanthou C, Parry G, Wijelath E, Kakkar VV, Demoliou-Mason C (1992), Thrombin-induced proliferation and expression of platelet-derived growth factor-A chain gene in human vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 314:143-148
- Katada T, Ui M (1982), Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:3129-3133
- Kawabata A (2003), Gastrointestinal functions of proteinase-activated receptors. *Life Sci* 74:247-254
- Kayanoki Y, Che W, Kawata S, Matsuzawa Y, Higashiyama S, Taniguchi N (1997), The effect of cilostazol, a cyclic nucleotide phosphodiesterase III inhibitor, on heparin-binding EGF-like growth factor expression in macrophages and vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 238:478-481
- Kenagy RD, Hart CE, Stetler-Stevenson WG, Clowes AW (1997), Primate smooth muscle cell migration from aortic explants is mediated by endogenous platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9. *Circulation* 96:3555-3560
- Ko FN, Yang YC, Huang SC, Ou JT (1996), Coagulation factor Xa stimulates platelet-derived growth factor release and mitogenesis in cultured vascular smooth muscle cells of rat. *J Clin Invest* 98:1493-1501
- Kolessov VI (1967), Mammary artery-coronary artery anastomosis as method of treatment for angina pectoris. *J Thorac Cardiovasc Surg* 54:535-544
- Komalavilas P, Lincoln TM (1996), Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem* 271:21933-21938
- Koo BH, Kim DS (2003), Factor Xa induces mitogenesis of vascular smooth muscle cells via autocrine production of epiregulin. *J Biol Chem* 278:52578-52586
- Kopperud R, Krakstad C, Selheim F, Doskeland SO (2003), cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett* 546:121-126
- Kornmann M, Ishiwata T, Begger HG, Korc M (1997), Fibroblast growth factor-5 stimulates mitogenic signaling and is overexpressed in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine actions. *Oncogene* 15:1417-1424

- Kothapalli D, Stewart SA, Smyth EM, Azonobi I, Pure E, Assoian RK (2003), Prostacyclin receptor activation inhibits proliferation of aortic smooth muscle cells by regulating cAMP response element-binding protein- and pocket protein-dependent cyclin a gene expression. *Mol Pharmacol* 64:249-258
- Kruithof EK, Baker MS, Bunn CL (1995), Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 86:4007-4024
- Kyriakis JM, Avruch J (2001), Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81:807-869
- Laemmli UK (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Larrue J, Daret D, Demond-Henri J, Allieres C, Bricaud H (1984), Prostacyclin synthesis by proliferative aortic smooth muscle cells. A kinetic in vivo and in vitro study. *Atherosclerosis* 50:63-72
- Larrue J, Rigaud M, Daret D, Demond J, Durand J, Bricaud H (1980), Prostacyclin production by cultured smooth muscle cells from atherosclerotic rabbit aorta. *Nature* 285:480-482
- Li J, Garnette CS, Cahn M, Claytor RB, Rohrer MJ, Dobson JG, Jr., Gerlitz B, Cutler BS (2000), Recombinant thrombomodulin inhibits arterial smooth muscle cell proliferation induced by thrombin. *J Vasc Surg* 32:804-813
- Li X, Lee JW, Graves LM, Earp HS (1998), Angiotensin II stimulates ERK via two pathways in epithelial cells: protein kinase C suppresses a G-protein coupled receptor-EGF receptor transactivation pathway. *EMBO J* 17:2574-2583
- Lijnen HR, Van Hoef B, Lupu F, Moons L, Carmeliet P, Collen D (1998), Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1035-1045
- Lincoln TM, Dey N, Sellak H (2001), Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* 91:1421-1430
- Liu B, Itoh H, Louie O, Kubota K, Kent KC (2002), The signaling protein Rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation. *Surgery* 132:317-325
- Lohse MJ (1993), Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179:171-188
- Loop FD (1996), Internal-thoracic-artery grafts. Biologically better coronary arteries. *N Engl J Med* 334:263-265
- Lupu F, Bergonzelli GE, Heim DA, Cousin E, Genton CY, Bachmann F, Kruithof EK (1993), Localization and production of plasminogen activator inhibitor-1 in human healthy and atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb* 13:1090-1100

- Ma SF, Garcia JG, Reuning U, Little SP, Bang NU, Dixon EP (1997), Thrombin induces thrombomodulin mRNA expression via the proteolytically activated thrombin receptor in cultured bovine smooth muscle cells. *J Lab Clin Med* 129:611-619
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R (2001), Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53:245-282
- Majumdar M, Tarui T, Shi B, Akakura N, Ruf W, Takada Y (2004), Plasmin-induced migration requires signaling through protease-activated receptor 1 and integrin alpha(9)beta(1). *J Biol Chem* 279:37528-37534
- Marikovsky M, Breuing K, Liu PY, Eriksson E, Higashiyama S, Farber P, Abraham J, Klagsbrun M (1993), Appearance of heparin-binding EGF-like growth factor in wound fluid as a response to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3889-3893
- McKenzie FR (1992), Basic techniques to study G-protein function. In: *Signal Transduction - A Practical Approach*, Milligan G, ed. New York: The Practical Approach Series, Oxford University Press, pp 31-56
- McNamara CA, Sarembock IJ, Bachhuber BG, Stouffer GA, Ragosta M, Barry W, Gimple LW, Powers ER, Owens GK (1996), Thrombin and vascular smooth muscle cell proliferation: implications for atherosclerosis and restenosis. *Semin Thromb Hemost* 22:139-144
- McNamara CA, Sarembock IJ, Gimple LW, Fenton JW, Coughlin SR, Owens GK (1993), Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest* 91:94-98
- Meyer-Kirchrath J, Debey S, Glandorff C, Kirchrath L, Schrör K (2004), Gene expression profile of the Gs-coupled prostacyclin receptor in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 67:757-765
- Mikus P, Ny T (1996), Intracellular polymerization of the serpin plasminogen activator inhibitor type 2. *J Biol Chem* 271:10048-10053
- Minta A, Kao JP, Tsien RY (1989), Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem* 264:8171-8178
- Mintz GS, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Popma JJ, Leon MB (1997), Contribution of inadequate arterial remodeling to the development of focal coronary artery stenoses. An intravascular ultrasound study. *Circulation* 95:1791-1798
- Miyagawa J, Higashiyama S, Kawata S, Inui Y, Tamura S, Yamamoto K, Nishida M, Nakamura T, Yamashita S, Matsuzawa Y (1995), Localization of heparin-binding EGF-like growth factor in the smooth muscle cells and macrophages of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 95:404-411
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976), An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-665
- Motwani JG, Topol EJ (1998), Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* 97:916-931

- Murthy KS (2001), cAMP inhibits IP(3)-dependent Ca(2+) release by preferential activation of cGMP-primed PKG. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G1238-G1245
- Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR (2000), PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404:609-613
- Nakano T, Raines EW, Abraham JA, Wenzel FG, Higashiyama S, Klagsbrun M, Ross R (1993), Glucocorticoid inhibits thrombin-induced expression of platelet-derived growth factor A-chain and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 268:22941-22947
- Nakata A, Miyagawa J, Yamashita S, Nishida M, Tamura R, Yamamori K, Nakamura T, Nozaki S, Kameda-Takemura K, Kawata S, Taniguchi N, Higashiyama S, Matsuzawa Y (1996), Localization of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human coronary arteries. Possible roles of HB-EGF in the formation of coronary atherosclerosis. *Circulation* 94:2778-2786
- Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999), Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193-1226
- Naski MC, Lawrence DA, Mosher DF, Podor TJ, Ginsburg D (1993), Kinetics of inactivation of alpha-thrombin by plasminogen activator inhibitor-1. Comparison of the effects of native and urea-treated forms of vitronectin. *J Biol Chem* 268:12367-12372
- Nelken NA, Soifer SJ, O'Keefe J, Vu TK, Charo IF, Coughlin SR (1992), Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest* 90:1614-1621
- Newton AC (1995), Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270:28495-28498
- Nguyen HC, Grossi EA, LeBoutillier M, III, Steinberg BM, Rifkin DB, Baumann FG, Colvin SB, Galloway AC (1994), Mammary artery versus saphenous vein grafts: assessment of basic fibroblast growth factor receptors. *Ann Thorac Surg* 58:308-310
- Nicholson AC, Nachman RL, Altieri DC, Summers BD, Ruf W, Edgington TS, Hajjar DP (1996), Effector cell protease receptor-1 is a vascular receptor for coagulation factor Xa. *J Biol Chem* 271:28407-28413
- Nishi E, Prat A, Hospital V, Elenius K, Klagsbrun M (2001), N-arginine dibasic convertase is a specific receptor for heparin-binding EGF-like growth factor that mediates cell migration. *EMBO J* 20:3342-3350
- Noda Heiny H, Sobel BE (1995), Vascular smooth muscle cell migration mediated by thrombin and urokinase receptor. *Am J Physiol* 268:C1195-C1201
- Noda-Heiny H, Fujii S, Sobel BE (1993), Induction of vascular smooth muscle cell expression of plasminogen activator inhibitor-1 by thrombin. *Circ Res* 72:36-43
- Nordt TK, Peter K, Ruef J, Kubler W, Bode C (1999), Plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) and its role in cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 82 Suppl 1:14-8.:14-18
- Numaguchi Y, Naruse K, Harada M, Osanai H, Mokuno S, Murase K, Matsui H, Toki Y, Ito T, Okumura K, Hayakawa T (1999), Prostacyclin synthase gene transfer accelerates

- reendothelialization and inhibits neointimal formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:727-733
- O'Brien PJ, Molino M, Kahn M, Brass LF (2001), Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene* 20:1570-1581
- Oak MH, El Bedoui J, Anglard P, Schini-Kerth VB (2004), Red wine polyphenolic compounds strongly inhibit pro-matrix metalloproteinase-2 expression and its activation in response to thrombin via direct inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 110:1861-1867
- Ofosu FA (2003), Protease activated receptors 1 and 4 govern the responses of human platelets to thrombin. *Transfus Apheresis Sci* 28:265-268
- Okazaki H, Majesky MW, Harker LA, Schwartz SM (1992), Regulation of platelet-derived growth factor ligand and receptor gene expression by alpha-thrombin in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 71:1285-1293
- Orlov SN, Thorin Trescases N, Dulin NO, Dam TV, Fortuno MA, Tremblay J, Hamet P (1999), Activation of cAMP signaling transiently inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells in a site upstream of caspase-3. *Cell Death Differ* 6:661-672
- Ornitz DM, Itoh N (2001), Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2:REVIEWS3005
- Osinski MT, Weber A, Schrör K (2000), Complex actions of protein kinase A inhibitors on mitogenesis of bovine coronary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 395:173-176
- Ozawa K, Suzuki S, Asada M, Tomooka Y, Li AJ, Yoneda A, Komi A, Imamura T (1998), An alternatively spliced fibroblast growth factor (FGF)-5 mRNA is abundant in brain and translates into a partial agonist/antagonist for FGF-5 neurotrophic activity. *J Biol Chem* 273:29262-29271
- Papadaki M, Ruef J, Nguyen KT, Li F, Patterson C, Eskin SG, McIntire LV, Runge MS (1998), Differential regulation of protease activated receptor-1 and tissue plasminogen activator expression by shear stress in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 83:1027-1034
- Patterson C, Stouffer GA, Madamanchi N, Runge MS (2001), New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology. *Circ Res* 88:987-997
- Peifley KA, Alberts GF, Hsu DK, Feng SL, Winkles JA (1996), Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor regulates fibroblast growth factor-2 expression in aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 79:263-270
- Pena JC, Kelekar A, Fuchs EV, Thompson CB (1999), Manipulation of outer root sheath cell survival perturbs the hair-growth cycle. *EMBO J* 18:3596-3603
- Perlman H, Maillard L, Krasinski K, Walsh K (1997), Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation* 95:981-987
- Prenzel N, Fischer OM, Streit S, Hart S, Ullrich A (2001), The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocr Relat Cancer* 8:11-31

- Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A (1999), EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402:884-888
- Purdy KE, Arendshorst WJ (1999), Prostaglandins buffer ANG II-mediated increases in cytosolic calcium in glomerular VSMC. *Am J Physiol* 277:F850-F858
- Quinton TM, Kim S, Derian CK, Jin J, Kunapuli SP (2004), Plasmin-mediated activation of platelets occurs by cleavage of protease-activated receptor 4. *J Biol Chem* 279:18434-18439
- Raab G, Higashiyama S, Hetelekidis S, Abraham JA, Damm D, Ono M, Klagsbrun M (1994), Biosynthesis and processing by phorbol ester of the cells surface-associated precursor form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 204:592-597
- Raab G, Klagsbrun M (1997), Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta* 1333:F179-F199
- Ragosta M, Gimple LW, Gertz SD, Dunwiddie CT, Vlasuk GP, Haber HL, Powers ER, Roberts WC, Sarembock IJ (1994), Specific factor Xa inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits. *Circulation* 89:1262-1271
- Rao GN, Runge MS (1996), Cyclic AMP inhibition of thrombin-induced growth in vascular smooth muscle cells correlates with decreased JNK1 activity and c-Jun expression. *J Biol Chem* 271:20805-20810
- Rauch BH, Bretschneider E, Braun M, Schrör K (2002), Factor Xa releases matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) from human vascular smooth muscle cells and stimulates the conversion of pro-MMP-2 to MMP-2: role of MMP-2 in factor Xa-induced DNA synthesis and matrix invasion. *Circ Res* 90:1122-1127
- Rauch BH, Millette E, Kenagy RD, Daum G, Clowes AW (2004), Thrombin- and factor Xa-induced DNA synthesis is mediated by transactivation of fibroblast growth factor receptor-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 94:340-345
- Ren S, Cockell KA, Fenton JW, Angel A, Shen GX (1997), G proteins and phospholipase C mediate thrombin-induced generation of plasminogen activator inhibitor-1 from vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 34:82-89
- Riewald M, Kravchenko VV, Petrovan RJ, O'Brien PJ, Brass LF, Ulevitch RJ, Ruf W (2001), Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1. *Blood* 97:3109-3116
- Rimarachin JA, Jacobson JA, Szabo P, Maclouf J, Creminon C, Weksler BB (1994), Regulation of cyclooxygenase-2 expression in aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 14:1021-1031
- Ruf W, Dorfleutner A, Riewald M (2003), Specificity of coagulation factor signaling. *J Thromb Haemost* 1:1495-1503
- Rutsch W, Gliach V, Dubel HP, Borges A, Theres H, Laule M, Baumann G (2002), [Standards in interventional therapy of coronary artery disease]. *Herz* 27:481-501

- Sabri A, Guo J, Elouardighi H, Darrow AL, Andrade-Gordon P, Steinberg SF (2003), Mechanisms of protease-activated receptor-4 actions in cardiomyocytes. Role of Src tyrosine kinase. *J Biol Chem* 278:11714-11720
- Sambrano GR, Huang W, Faruqi T, Mahrus S, Craik C, Coughlin SR (2000), Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J Biol Chem* 275:6819-6823
- Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Kamikubo Y, Sumiyoshi A (1997), Tissue factor pathway inhibitor inhibits aortic smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex. *Thromb Haemost* 78:1138-1141
- Schneiderman J, Sawdey MS, Keeton MR, Bordin GM, Bernstein EF, Dilley RB, Loskutoff DJ (1992), Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6998-7002
- Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P (1999), Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 155:1281-1291
- Schröder H, Schrör K (1993), Prostacyclin-dependent cyclic AMP formation in endothelial cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347:101-104
- Schrör K (1997), Prostacyclin (Prostaglandin I₂) and Atherosclerosis. In: *The endothelium in clinical practice: source and target of novel concepts and therapeutics*, Rubanyi GM, Dzau V, eds. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong, pp 1-44
- Schrör K, Weber AA (1997), Roles of vasodilatory prostaglandins in mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Agents Actions Suppl* 48:63-91
- Schwartz RS, Henry TD (2002), Pathophysiology of coronary artery restenosis. *Rev Cardiovasc Med* 3 Suppl 5:S4-9.:S4-S9
- Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981), Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:3363-3367
- Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD, Brown JH (1999), Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res* 84:1186-1193
- Sevetson BR, Kong X, Lawrence JC, Jr. (1993), Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10305-10309
- Shapiro MJ, Trejo J, Zeng D, Coughlin SR (1996), Role of the thrombin receptor's cytoplasmic tail in intracellular trafficking. Distinct determinants for agonist-triggered versus tonic internalization and intracellular localization. *J Biol Chem* 271:32874-32880
- Shen GX, Ren S, Fenton JW (1998), Transcellular signaling and pharmacological modulation of thrombin-induced production of plasminogen activator inhibitor-1 in vascular smooth muscle cells. *Semin Thromb Hemost* 24:151-156
- Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L (1987), Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med* 316:701-706

- Smith EB, Crosbie L, Carey S (1996), Prothrombin-related antigens in human aortic intima. *Semin Thromb Hemost* 22:347-350
- Soff GA, Jackman RW, Rosenberg RD (1991), Expression of thrombomodulin by smooth muscle cells in culture: different effects of tumor necrosis factor and cyclic adenosine monophosphate on thrombomodulin expression by endothelial cells and smooth muscle cells in culture. *Blood* 77:515-518
- Soslau G, Goldenberg SJ, Class R, Jameson B (2004), Differential activation and inhibition of human platelet thrombin receptors by structurally distinct alpha-, beta- and gamma-thrombin. *Platelets* 15:155-166
- Stampfuss JJ, Schrör K, Weber AA (2003), Inhibition of platelet thromboxane receptor function by a thrombin receptor-targeted peducin. *Nat Med* 9:1447-1448
- Steiner AL, Parker CW, Kipnis DM (1972), Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 247:1106-1113
- Stenina OI (2003), Regulation of gene expression in vascular cells by coagulation proteins. *Curr Drug Targets* 4:143-158
- Sternlicht MD, Werb Z (2001), How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516
- Storck J, Vahland M, Breer T, Zimmermann ER (1997), Brefeldin A inhibits thrombin receptor regeneration in human endothelial cells. *Br J Haematol* 99:555-561
- Storck J, Zimmermann ER (1996), Regulation of the thrombin receptor response in human endothelial cells. *Thromb Res* 81:121-131
- Stouffer GA, Runge MS (1998), The role of secondary growth factor production in thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Semin Thromb Hemost* 24:145-150
- Stouffer GA, Sarembock IJ, McNamara CA, Gimble LW, Owens GK (1993), Thrombin-induced mitogenesis of vascular SMC is partially mediated by autocrine production of PDGF-AA. *Am J Physiol* 265:C806-C811
- Suzuki M, Raab G, Moses MA, Fernandez CA, Klagsbrun M (1997), Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J Biol Chem* 272:31730-31737
- Taurin S, Ryazhsky GG, Maximova NV, Chuchalin AG, Hamet P, Pshezhetsky AV, Orlov SN (2002), Suppression of programmed cell death by intracellular cAMP is not mediated by expression of genes encoding an inhibitor of apoptosis. *Biochemistry (Mosc)* 67:254-259
- Taylor DS, Cheng X, Pawlowski JE, Wallace AR, Ferrer P, Molloy CJ (1999), Epiregulin is a potent vascular smooth muscle cell-derived mitogen induced by angiotensin II, endothelin-1, and thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1633-1638
- Todaka T, Yokoyama C, Yanamoto H, Hashimoto N, Nagata I, Tsukahara T, Hara S, Hatae T, Morishita R, Aoki M, Ogihara T, Kaneda Y, Tanabe T (1999), Gene transfer of human prostacyclin synthase prevents neointimal formation after carotid balloon injury in rats. *Stroke* 30:419-426

- Tran T, Stewart AG (2003), Protease-activated receptor (PAR)-independent growth and pro-inflammatory actions of thrombin on human cultured airway smooth muscle. *Br J Pharmacol* 138:865-875
- Uzui H, Lee JD, Shimizu H, Tsutani H, Ueda T (2000), The role of protein-tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 149:51-59
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM (1998), Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120
- Vanhaesebroeck B, Leeyers SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997), Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22:267-272
- Vassalli JD, Sappino AP, Belin D (1991), The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* 88:1067-1072
- Vergnolle N, Derian CK, D'Andrea MR, Steinhoff M, Andrade-Gordon P (2002), Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *J Immunol* 169:1467-1473
- Verrier ED, Boyle EM, Jr. (1996), Endothelial cell injury in cardiovascular surgery. *Ann Thorac Surg* 62:915-922
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994), A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269:5241-5248
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR (1991), Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057-1068
- Wang Z, Castresana MR, Newman WH (2004), Reactive oxygen species-sensitive p38 MAPK controls thrombin-induced migration of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 36:49-56
- Waybill PN, Hopkins LJ (1999), Arterial and venous smooth muscle cell proliferation in response to co-culture with arterial and venous endothelial cells. *J Vasc Interv Radiol* 10:1051-1057
- Weber A, Köppen HO, Schrör K (2000), Platelet-derived microparticles stimulate coronary artery smooth muscle cell mitogenesis by a PDGF-independent mechanism. *Thromb Res* 98:461-466
- Weintraub WS, Jones EL, Craver JM, Guyton RA (1994), Frequency of repeat coronary bypass or coronary angioplasty after coronary artery bypass surgery using saphenous venous grafts. *Am J Cardiol* 73:103-112
- Weiss HJ, Turitto VT (1979), Prostacyclin (prostaglandin I₂, PGI₂) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood* 53:244-250
- Weiss RH, Maduri M (1993), The mitogenic effect of thrombin in vascular smooth muscle cells is largely due to basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 268:5724-5727

- White RE, Kryman JP, El Mowafy AM, Han G, Carrier GO (2000), cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BK(Ca) channel activity in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 86:897-905
- Wijnberg MJ, Quax PH, Nieuwenbroek NM, Verheijen JH (1997), The migration of human smooth muscle cells in vitro is mediated by plasminogen activation and can be inhibited by alpha2-macroglobulin receptor associated protein. *Thromb Haemost* 78:880-886
- Wilcox JN, Rodriguez J, Subramanian R, Ollerenshaw J, Zhong C, Hayzer DJ, Horaist C, Hanson SR, Lumsden A, Salam TA, . (1994), Characterization of thrombin receptor expression during vascular lesion formation. *Circ Res* 75:1029-1038
- Woolkalis MJ, DeMelfi TM, Jr., Blanchard N, Hoxie JA, Brass LF (1995), Regulation of thrombin receptors on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 270:9868-9875
- Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW (1993), Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 262:1065-1069
- Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC (1998), Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6642-6646
- Yamada M, Numaguchi Y, Okumura K, Harada M, Naruse K, Matsui H, Ito T, Hayakawa T (2002), Prostacyclin synthase gene transfer modulates cyclooxygenase-2-derived prostanoid synthesis and inhibits neointimal formation in rat balloon-injured arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:256-262
- Yamaguchi M, Diamond S, Watanabe H, Gallati H, Baur W, Sharefkin JB (1993), Heparin and dibutyl cAMP modulate gene expression in stimulated human saphenous vein smooth muscle cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A:867-872
- Yan W, Tiruppathi C, Qiao R, Lum H, Malik AB (1996), Tumor necrosis factor decreases thrombin receptor expression in endothelial cells. *J Cell Physiol* 166:561-567
- Yang CM, Pan SL, Chiu CT, Lin CC, Hsu YM (1998a), Effect of forskolin on endothelin-induced phosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization in cultured canine tracheal smooth muscle cells. *J Auton Pharmacol* 18:213-221
- Yang Z, Oemar BS, Carrel T, Kipfer B, Julmy F, Luscher TF (1998b), Different proliferative properties of smooth muscle cells of human arterial and venous bypass vessels: role of PDGF receptors, mitogen-activated protein kinase, and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Circulation* 97:181-187
- Yang Z, Ruschitzka F, Rabelink TJ, Noll G, Julmy F, Joch H, Gafner V, Aleksic I, Althaus U, Luscher TF (1997), Different effects of thrombin receptor activation on endothelium and smooth muscle cells of human coronary bypass vessels. Implications for venous bypass graft failure. *Circulation* 95:1870-1876
- Zacharias U, Xu Y, Hagege J, Sraer JD, Brass LF, Rondeau E (1995), Thrombin, phorbol ester, and cAMP regulate thrombin receptor protein and mRNA expression by different pathways. *J Biol Chem* 270:545-550

- Zajtchuk R, Collins GJ, Holley PW, Heydron WH, Schuchmann GF, Hamaker WR (1977), Coagulation factors influencing thrombosis of aorta-coronary bypass grafts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 73:309-311
- Zhan X, Bates B, Hu XG, Goldfarb M (1988), The human FGF-5 oncogene encodes a novel protein related to fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol* 8:3487-3495
- Zhong C, Hayzer DJ, Corson MA, Runge MS (1992), Molecular cloning of the rat vascular smooth muscle thrombin receptor. Evidence for in vitro regulation by basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 267:16975-16979
- Zhou HM, Bolon I, Nichols A, Wohlwend A, Vassalli JD (2001), Overexpression of plasminogen activator inhibitor type 2 in basal keratinocytes enhances papilloma formation in transgenic mice. *Cancer Res* 61:970-976
- Zhu S, Han G, White RE (2002), PGE2 action in human coronary artery smooth muscle: role of potassium channels and signaling cross-talk. *J Vasc Res* 39:477-488
- Zhu Y, Farrehi PM, Fay WP (2001), Plasminogen activator inhibitor type 1 enhances neointima formation after oxidative vascular injury in atherosclerosis-prone mice. *Circulation* 103:3105-3110
- Zwick E, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A (1999), The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* 20:408-412

7. Veröffentlichungen

1. Kurzartikel (Abstracts) für Tagungen und Kongresse

Bretschneider E, **Pape R**, Hermann A, Glusa E, Schrör K

Effects of unfractionated heparin and low molecular weight heparin on factor Xa- and thrombin-induced ERK-1/2 activation and mitogenesis in arterial and venous human vascular smooth muscle cells

Basic Res Cardiol **96** Suppl 1 (2001)

2nd European Meeting on Vascular Biology and Medicine, 27. – 29. Sept. 2001, Ulm

Pape R, Bretschneider E, Hermann A, Glusa E, Schrör K

Different effects of unfractionated heparin, low molecular weight heparin and pentasaccharide (fondaparinux) on factor Xa- and thrombin-induced ERK-1/2 activation and mitogenesis in human vascular smooth muscle cells

Annals of Hematology **81** Suppl 1 (2002)

46. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, 20. – 23. Feb. 2002, Erfurt

Pape R, Schrör K

Different effects of iloprost and thrombin on heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) gene expression in arterial and venous human vascular smooth muscle cells

Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **367** Suppl 1 (2003)

44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 17. – 20. März 2003, Mainz

Pape R, Schrör K

Different regulation of thrombin-induced heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) expression and mitogenic signaling by iloprost in human vascular smooth muscle cells

Hämostaseologie **24** (2004)

48. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, 25. – 28. Feb. 2004, Hamburg

Pape R, Schrör K

Role of cAMP and mitogenic signaling pathways for the regulation thrombin-induced heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) expression by iloprost in human vascular smooth muscle cells

Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **369** Suppl 1 (2004)

45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 9. – 11. März 2004, Mainz

2. Publikationen in Fachzeitschriften

Rabausch K, Bretschneider E, Sarbia M, Fischer J W, Censarek P, **Pape R, Schrör K, Weber A A**

Platelet-independent prothrombotic effects of selective COX-2 inhibition via thrombomodulin
Circ Res (2005)

(im Druck)

Pape R, Schrör K

Thrombin-induced HB-EGF expression in human arterial and venous vascular smooth muscle cells: characterization of signaling pathways and regulation by iloprost

(Manuskript in Vorbereitung)

Pape R, Bretschneider E, Warncke M, Schrör K

Expression of thrombin receptors and their regulation by thrombin and iloprost in human arterial and venous vascular smooth muscle cells

(Manuskript in Vorbereitung)

8. Danksagung

Prof. Dr. Karsten Schrör danke ich für die Überlassung des Themas und für die Betreuung dieser Arbeit. Anregende Gespräche brachten neue Denkansätze und Sichtweisen hervor. Besonders möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, an wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen zu können, und für die damit verbundene großzügige Unterstützung.

Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

PD Dr. Artur-Aron Weber und Dr. Jutta Meyer-Kirchrath danke ich für viele hilfreiche Ratschläge und Anregungen und für die Unterstützung bei einigen Experimenten.

Beate Weyrauther danke ich für die tatkräftige Unterstützung in der Zellkultur und für zahlreiche Mechanotransduktor-Versuche. Petra Kuger, Kerstin Freidel und Frau Reupert danke ich für methodische Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft im Labor-Alltag.

Bei Prof. Dr. Wilhelm Bloch und Daniela Wenzel möchte ich mich für die Möglichkeit zur Durchführung der Calcium-Messungen an der Sporthochschule Köln bedanken.

Erika Lohmann und Karin Montag danke ich herzlich für die Organisation des Institutslebens und die stetige Hilfsbereitschaft bei Dienstreisevorbereitungen, Reisekostenabrechnungen und Materialbestellungen.

Allen Kollegen danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre am Institut, die sicherlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ein besonderer Dank gilt meiner verständnisvollen Freundin Katrin, meiner Familie, meinen Großeltern, Bärbel, Rolf und meinen Freunden, die mir in dieser Zeit seelisch und moralisch zur Seite standen.

9. Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den 15. November 2004

10. Lebenslauf

Robert Pape

Aachener Str. 129

40223 Düsseldorf

geboren am 11.07.1974 in Düsseldorf

Schulausbildung

August 1984 – Juni 1993

Quirinus-Gymnasium Neuss,

Abschluss mit dem Abitur

Studium und Promotion

April 1995 – Januar 2001

Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,

Abschluss mit dem Staatsexamen

Februar 2001

Approbation zum Apotheker

März 2001 – Dezember 2004

Promotionsarbeit am Institut für
Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
bei Prof. Dr. K. Schrör
(Thema: Thrombin-aktivierte Signalwege in
humanen glatten Gefäßmuskelzellen und
deren Modifikation durch Iloprost)

Düsseldorf, den 15. November 2004