

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. J.W. Fischer

**Einfluss von Sphingosin-1-Phosphat auf die Expression der
Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4 in humanen Monozyten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Björn Dirk Sostmann

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Rauch

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Schott

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ANOVA	<i>One-Way Analysis of Variance</i>
AP	Aktivierendes Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CMP	<i>common-myeloid progenitors</i>
DC	Dendritische Zellen
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GMP	<i>granulo-monocyte progenitors</i>
GPCR	<i>G-Protein coupled receptor</i>
HDL	<i>high-density lipoprotein</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperanzinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzkrankheit

<i>LDL</i>	<i>low density lipoprotein</i>
mA	Milliampere
<i>MDP</i>	<i>myeloid-dendritic progenitors</i>
MI	Myokardinfarkt
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht
NaOH	Natriumhydroxid
NK	Natürliche Killerzellen
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
<i>SMC</i>	<i>vascular smooth muscle cells</i>

TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS Tween-20
TBSTM	TBST, 5 Gew.-% Milchpulver
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Tween™-20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
V	Volt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Monozyten	1
1.2 Atherosklerose	3
1.3 Thrombin	5
1.4 Protease-aktivierte-Rezeptoren	7
1.5 Sphingosin-1-Phosphat	8
1.6 Zielsetzungen	10
2. Material und Methoden	11
2.1 Substanzen	11
2.2 Antikörper	12
2.3 Puffer und Lösungen	13
2.4 Geräte und Materialien	14
2.5 Software	15
2.6 Zellkultur	16
2.6.1 Kultivierung der humane monozytären Zelllinie U937	16
2.6.2 Isolierung und Kultivierung humaner Monozyten aus Vollblut	16
2.7 Zell-Vitaltest	17
2.8 Präparation, Analyse und Quantifizierung von RNA	18
2.9 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	18
2.10 Western Blotting	19
2.11 Durchflusszytometrie	20
2.12 Modifizierter Boydenkammer Chemotaxis Assay	21
2.13 Statistik	22

2.14 Ethikvotum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	23
3. Ergebnisse	24
3.1. Basale Expression der Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4	24
3.1.1 Basale Expression der PAR-1 und PAR-4 mRNA	24
3.1.2 Basale Expression des PAR-1 und PAR-4 Proteins	26
3.2 Regulation der Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4 durch S1P	28
3.2.1 S1P induziert die Expression von PAR-1 und PAR-4 mRNA	28
3.2.2 Induktion der PAR-4 mRNA Expression ist unabhängig von der Isolationsart humaner Monozyten	29
3.3 S1P induziert die Expression des PAR-1- und PAR-4-Proteins	31
3.3.1 Konzentrations-Wirkungsbeziehung	31
3.3.2 Kinetik	32
3.3.3 Analyse humaner Monozyten	32
3.4 S1P induziert selektiv PAR-4-Oberflächenexpression	33
3.4.1 Konzentrations-Wirkungsbeziehung	33
3.4.2 Kinetik	34
3.4.3 Analyse humaner Monozyten	36
3.5 Funktionelle Konsequenzen der PAR-1- und PAR-4-Induktion durch S1P	38
3.5.1 Chemotaktische Thrombinwirkung wird durch S1P verstärkt	38
3.5.2 Verstärkte chemotaktische Thrombinwirkung wird selektiv PAR-4 vermittelt	39
3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse	40
4. Diskussion	42
4.1 U937 Zellen und humane Monozyten exprimieren PAR-1 und PAR-4	43

4.2 Regulation von PAR-1 und PAR-4 durch S1P	45
4.3 Verstärkte Migration wird selektiv PAR-4 vermittelt	46
4.4 Konsequenzen für die Atherogenese	47
4.5 Ausblick	49
5. Zusammenfassung	51
6. Literaturverzeichnis	53
7. Publikationen	64
8. Danksagungen	65
9. Eidesstattliche Erklärung	66

1. Einleitung

1.1 Monozyten

Monozyten machen 10 % der im menschlichen Blut zirkulierenden Leukozyten aus und gehören als Vorläuferzellen der Makrophagen zusammen mit den neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen (NK) zum zellulären Teil des angeborenen Immunsystems (Serbina et al. 2008; Geissmann et al. 2010). Sie besitzen eine bedeutende Stellung in der Abwehr von Mikroorganismen (Serbina et al. 2008) und stellen eine wichtige Verbindungsstelle zwischen dem angeborenen und adaptiven Teil des

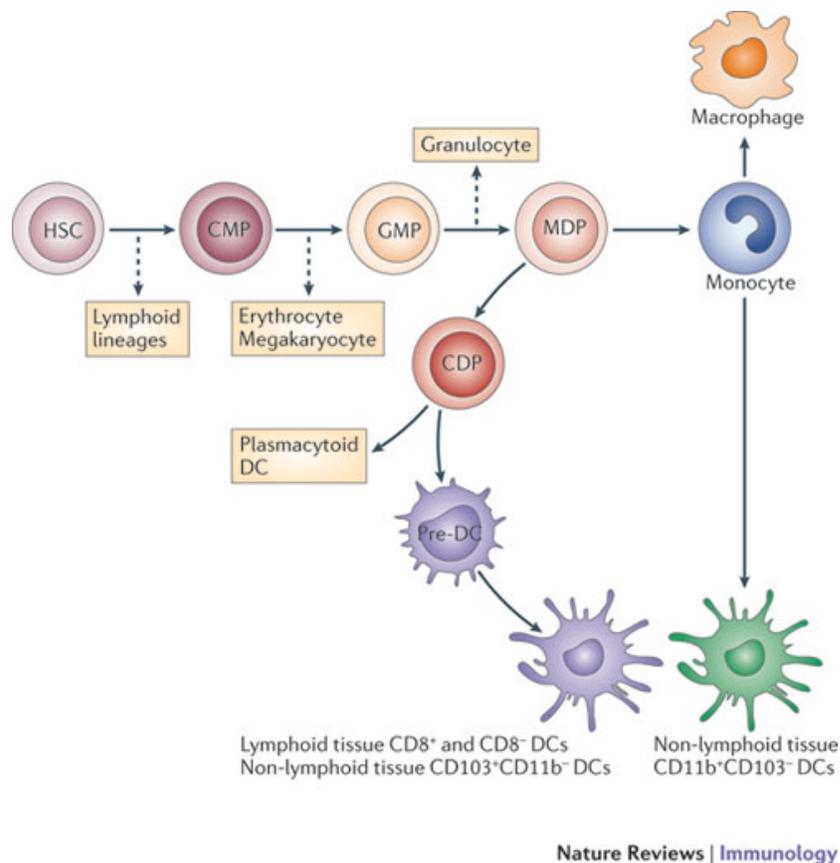


Abb. 1.1 Differenzierung von Monozyten aus hämatopoetischen Stammzellen

Monozyten, die daraus entstehenden Makrophagen und eine spezielle Subpopulation (CD11b⁺CD103⁻) von dendritischen Zellen (DC) stammen von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) ab. Sie entwickeln sich über verschiedene Stammzellzwischenstufen (CMP, GMP und MDP) (Chow et al. 2011). CMP = common-myeloid progenitors, GMP = granulo-monocyte progenitors, MDP = myeloid-dendritic progenitors

Immunsystems dar (Geissmann et al. 2008). Weiterhin sind sie im Rahmen der Pathogenese zahlreicher entzündlicher Erkrankungen (z.B. Atherosklerose) von enormer Wichtigkeit (Woollard and Geissmann 2010). Zusätzlich ist eine Beteiligung von Monozyten an der Abwehr von Tumorerkrankungen (Papewalis et al. 2011) nachgewiesen sowie immunregulatorische und immunsuppressive Effekte durch Monozyten (Peranzoni et al. 2010) beschrieben.

Monozyten bilden sich aus sich selbsterneuernden, hämatopoetischen Stammzellen über verschiedenen Stammzellzwischenstufen (Abb. 1.1). Die so entstandenen Monozyten können entweder als Effektoren des angeborenen Immunsystems agieren oder sich durch Einwirkung verschiedener Faktoren zu gewebsständigen Makrophagen oder speziellen Subpopulationen dendritischer Zellen entwickeln. Physiologisch zirkulieren Monozyten für 2-3 Tage nach Austritt aus dem Knochenmark im Blut, bevor sie als Makrophagen bzw. dendritische Zellen in das Gewebe übertreten. Im Gewebe übernehmen Makrophagen wichtige Funktionen im Rahmen der Immunabwehr (Antigenpräsentation, Phagozytose, Eliminierung von fremden Mikroorganismen) und der physiologischen Homöostase (z.B. Wundheilung) (Nathan et al. 1980). Im Fall einer Infektion bzw. einer akuten/chronischen entzündlichen Reaktion werden Monozyten direkt rekrutiert, migrieren in den betroffenen Gewebsbereich und beginnen mit der direkten antimikrobiellen Abwehr (Serbina et al. 2008) bzw. einer unspezifischen Entzündungsreaktion. Im Verlauf einer Infektion bzw. Entzündung übernehmen Makrophagen ebenso Aufgaben im Rahmen der Defektheilung (Shi and Pamer 2011). Auch in pathologischen Vorgängen spielen Monozyten und Makrophagen eine zentrale Rolle. So stellt die Monozytenrekrutierung und -migration ein Schlüsselereignis in der Pathogenese der Atherosklerose dar (Ross 1999).

Da sich die Verfügbarkeit von humanen Monozyten und deren Kultivierung zu Untersuchungszwecken bei Zeiten problematisch darstellt, wurde 1976 die humane monozytäre Zelllinie U937 implementiert. Die Zellen dieser Zelllinie stammen aus einem 37-jährigen Patienten mit diffus-generalisiertem, histiozytärem Lymphom. Sie wurden aus einer Plaurapunktion des Patienten isoliert (Sundstrom and Nilsson 1976). Seitdem sind U937 Zellen als Modellzellen für humane Monozyten weit verbreitet und wurden in zahlreichen Untersuchungen (Speidl et al. 2004; Stampfuss et al. 2008; Rauch et al. 2011) eingesetzt.

1.2 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine entzündliche Erkrankung der großen und mittleren Arterien des elastischen und muskulären Typs (Ross 1999). Sie hat in den letzten Jahrzehnten einen enormen gesundheitsökonomischen Stellenwert erlangt. So werden die Atherosklerose und die sich daraus entwickelnden Folgeerkrankungen, wie beispielsweise die koronare Herzkrankheit (KHK) und der Apoplex, für ca. 50 % der Todesfälle in den westlichen Industrienationen verantwortlich gemacht (Braunwald 1997; Lusis 2000). Die Entstehung der Atherosklerose kann durch die sogenannte „*response to injury*“ - Hypothese erklärt werden, welche von einer Läsion im Sinne einer umschriebenen endothelialen Dysfunktion als Auslöser der Atherosklerose ausgeht. Diese Endotheldysfunktion kann sowohl auf biochemischer als auch auf morphologischer Ebene nachgewiesen werden (Kelm and Strauer 1999). Mögliche Ursachen für diese endotheliale Dysfunktion können erhöhte LDL-Cholesterinwerte, freie Radikale entstehend durch Rauchen von Zigaretten, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, genetische Prädisposition, erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Plasma oder infektiöse Mikroorganismen (z.B. Viren der Herpesgruppe, Chlamydia pneumoniae) sein (Ross 1999). Folge der Endotheldysfunktion ist eine Störung der regulären Endothelhomöostase, welche zu einer Verstärkung der adhäsiven Eigenschaften des Endothels sowie zur Bildung eines prokoagulatorischen, anstatt des physiologischen, antikoagulativen Milieus führt. Zusätzlich entwickelt sich eine erhöhte Endothelzellpermeabilität, welche eine subendotheliale Migration von Monozyten und Leukozyten begünstigt sowie zu einer Anhäufung von Lipiden in der arteriellen Zellwand führt (Abb. 1.3 a). Durch diese Veränderungen in der Gefäßwand kommt es zur Bildung einer sog. „*fatty-streak*“-Formation, welche sich aus lipidbeladenen Makrophagen (sog. Schaumzellen), T-Lymphozyten und glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) zusammensetzen. Zusätzlich kommt es zur Adhärenz und Aggregation von Thrombozyten im Bereich der endothelialen Läsion (Abb. 1.3.b). Im Folgenden entsteht durch Untergang der Schaumzellen und weitere Anhäufung von Lipiden ein nekrotischer Kern im zentralen Bereich der „*fatty-streak*“-Formation, welcher nur durch eine fibrotische Kappe zum Gefäßlumen hin abgeschirmt wird. Die dadurch entstandene Formation wird nun als manifester atherosklerotischer Plaque sichtbar (Abb. 1.3 c). Im weiteren Verlauf kommt es zur Dickenabnahme der fibrotischen Kappe und bei Verletzung dieser zu einer Plaqueruptur. Diese Ruptur initiiert

die primäre und sekundäre Hämostase mit Thrombozytenadhäsion und -aggregation sowie die Bildung von Thrombin (Abb. 1.3 d) (Ross 1993; 1999). Dieser Ablauf resultiert schließlich in einem akuten Gefäßverschluss, wie er beispielsweise in den koronaren Gefäßen bei einem akuten Myokardinfarkt (MI) vorliegt (Stary 2000).

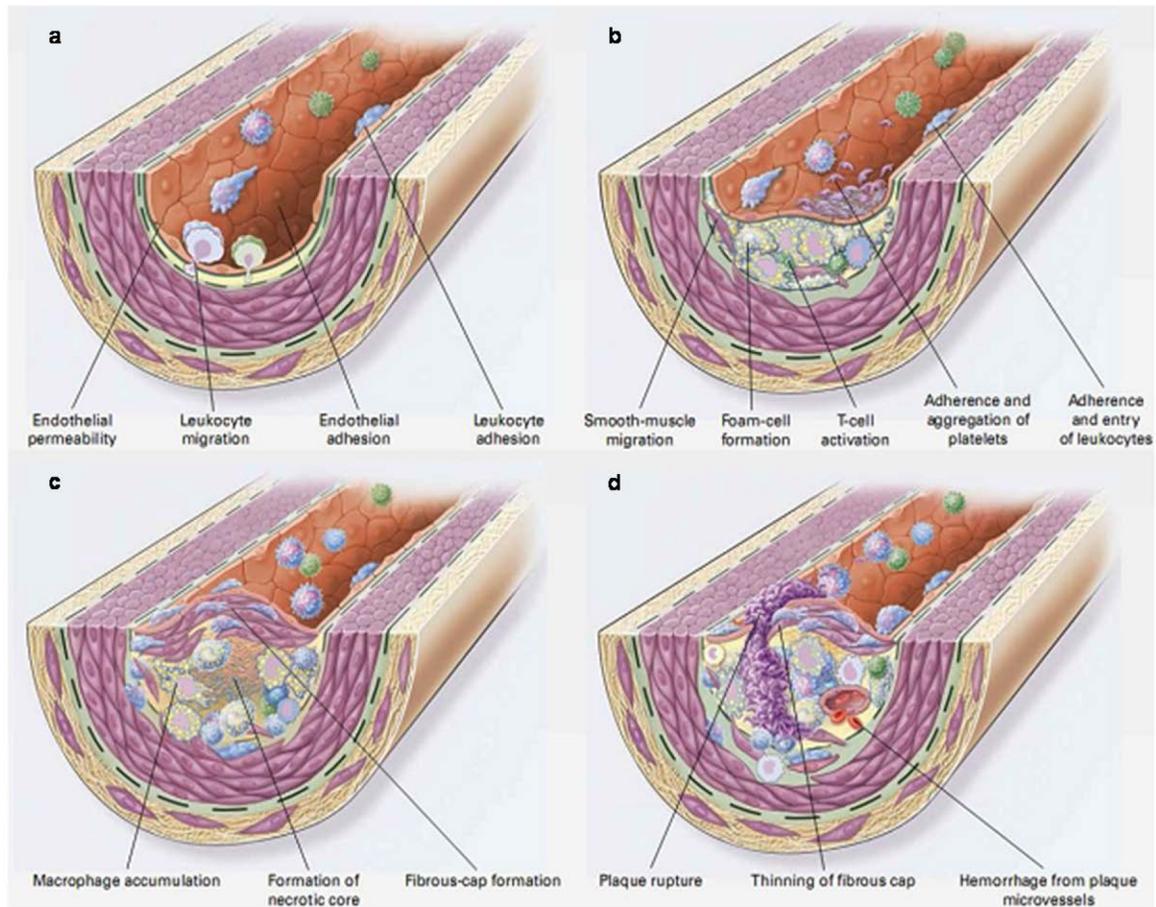


Abb. 1.3 Entstehung der Atherosklerose

(a) Die endotheliale Dysfunktion führt zu einer erhöhten Permeabilität und Homöostase, so dass das Eindringen von Monozyten und Leukozyten sowie Lipoproteinen begünstigt wird. **(b)** Monozyten beginnen LDL-Cholesterin zu phagozytieren und mutieren zu Schaumzellen, was zu einer veränderten Zytokinsekretion und damit zu vermehrter Migration von SMCs, Aktivierung von T-Zellen und zur Aggregation von Thrombozyten führt. **(c)** Entstehung eines nekrotischen Kerns durch den Untergang von Schaumzellen, welcher von einer fibrotischen Kappe zum Gefäßlumen hin abgeschirmt wird. **(d)** Bei Ruptur des Plaques kommt es zur Thrombusbildung mit nachfolgendem Gefäßverschluss. (modifiziert nach (Ross 1999))

1.3 Thrombin

Thrombin ist eine multifunktionale Serinprotease und besitzt eine zentrale Rolle im Rahmen der Hämostase. Es wird primär an der Oberfläche zirkulierender Thrombozyten im Anschluss an eine Gefäßverletzung gebildet. Die Hämostase besteht aus einer Abfolge von Aktivierungsreaktionen, bei welcher aus inaktiven Proenzymen (sog. Zymogene) durch Proteolyse aktivierte Enzyme entstehen. Diese aktivierten Enzyme aktivieren wiederum weitere Proenzyme. Zu Beginn steht die Gefäßverletzung bzw. Plaqueruptur, wodurch es zum Kontakt zwischen Blutkomponenten und Tissue-Faktor (TF) tragenden Zellen kommt (Mackman et al. 2007). Es kommt zu einer Komplexbildung von TF, im Blut zirkulierendem Ca^{2+} , Phospholipiden aus geschädigten Zellmembranen und aktiviertem Kofaktor VII (FVIIa), welcher in geringen Mengen als aktivierte Form im Blut zirkuliert. Alleine besitzt FVIIa eine sehr geringe katalytische Aktivität (Borensztajn et al. 2008) und erlangt erst im Komplex mit TF seine vollständige katalytische Aktivität (Hoffman and Monroe 2001). Der neugeformte Komplex ist in der Lage Faktor X (FXa) und Faktor IX (FIXa) zu aktivieren. Im weiteren Ablauf kann FXa Faktor V (FVa) aktivieren und durch proteolytische Spaltung des 72 kDa großen Zymogens Prothrombin (FII) kleine Mengen Thrombin (FIIa) bilden (*Initiierungsphase*) (Weber and Schrör 2006). In aktivierter Form besitzt Thrombin eine Größe von 35 kDa. Die gebildete Menge an Thrombin ist allerdings noch zu gering und reicht nicht zur Bildung eines Thrombus durch die Proteolyse von Fibrinogen zu Fibrin aus. In der sich anschließenden *Vorbereitungsphase* kommt es zur Aktivierung von Thrombozyten direkt durch Thrombin über die Protease-aktivierten-Rezeptoren (PAR) sowie zur Adhäsion der Thrombozyten an Kollagen des lädierten Gefäßes mit Hilfe des von-Willebrand-Faktors (vWF). Die Aktivierung der Thrombozyten induziert eine autokrine Sekretion von Thromboxan A_2 (TXA_2) und ADP, welche die eigene Aktivierung weiter verstärkt. Durch die Thrombozytenaktivierung kommt es zur Oberflächenvergrößerung der Thrombozyten und damit zu einer verstärkten Expression von FV (Hoffman and Monroe 2001), so dass dieser im Komplex mit FXa vermehrt Prothrombin zu Thrombin aktivieren kann. All dies führt schließlich zu einer effizienten Bildung von Thrombin (*Propagationsphase*), welches die Bildung eines Thrombus durch Bereitstellung von Fibrin zur Defektabdeckung ermöglicht (Abb 1.4) (Monroe et al. 2002).

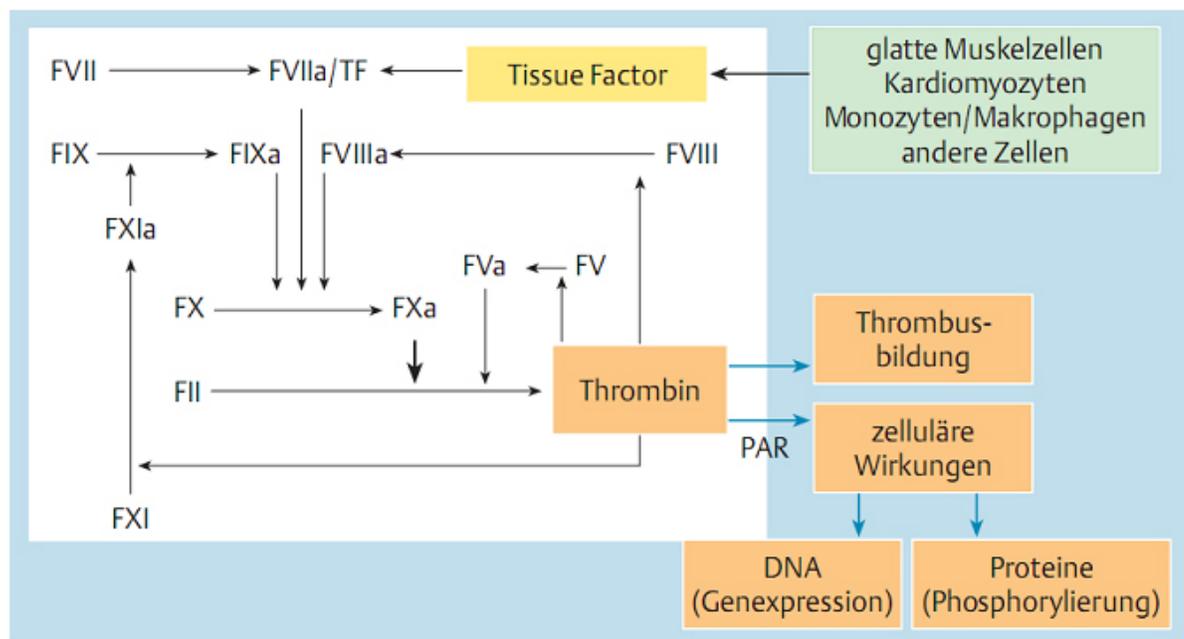


Abb. 1.4 Schematische Darstellung der Hämostase (Schrör 2008)

Zusätzlich zur Funktion in der Blutgerinnungskaskade sind für Thrombin weitere Funktionen beschrieben worden (Abb. 1.4). So konnte Thrombin eine wichtige Rolle im Rahmen von Entzündungen (Esmon 2000), der Immunantwort (Steinhoff et al. 2005) sowie der Embryonalentwicklung (Bugge et al. 1996; Connolly et al. 1996; Coughlin 1999) nachgewiesen werden. Außerdem wirkt Thrombin auf verschiedene Zellen des vaskulären Systems. Die während der Hämostase gebildete Menge Thrombin wird nur zu ca. 5 % für den regelrechten Ablauf der Hämostase benötigt. Der überwiegende Teil des Thrombins (> 95 %) vermittelt via G-Protein-gekoppeltem Protease-aktiviertem-Rezeptor (PAR)-1, -3 und -4 (siehe Abschnitt 1.5) eine direkte Signalwirkung auf vaskuläre Zellen. Als Beispiel sind Monozyten zu nennen (Coughlin 2000; Schrör et al. 2010), deren Migrationsverhalten durch Thrombin beeinflusst wird (Bar-Shavit et al. 1983; Bar-Shavit et al. 1983). Auch das in einem Thrombus vorhandene Thrombin kann zelluläre Effekte bewirken (Rosenkranz et al. 2011).

1.4 Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR)

Die zelluläre Wirkung von Thrombin wird, wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) vermittelt. Die PAR gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bestehen aus sieben transmembranären Domänen mit einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus (Macfarlane et al. 2001). Die Besonderheit dieser Rezeptoren besteht in ihrem Aktivierungsmechanismus. So wird die Aktivierung der PAR durch eine proteolytische Spaltung des extrazellulären N-Terminus initiiert. Durch diese proteolytische Spaltung entsteht ein neues, verkürztes extrazelluläres Ende, welches in der Lage ist, als *tethered ligand* („angebundener Ligand“) durch Interaktion mit dem zweiten extrazellulären Loop den Rezeptor zu aktivieren. Es ist auch möglich, die PAR selektiv über synthetische, aktivierende Peptide (AP) direkt zu aktivieren, ohne die Notwendigkeit einer vorherigen proteolytischen Aktivität (Abb. 1.5) (Marutsuka et al. 2005).

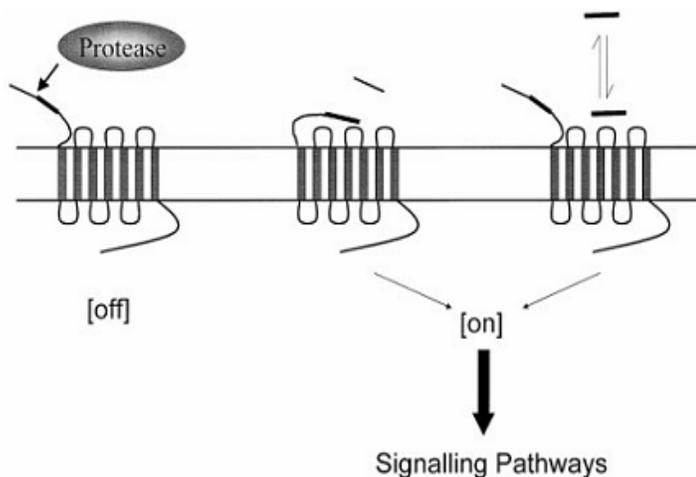


Abb. 1.5 Proteolytische Aktivierung der PAR

Proteolytische Spaltung des N-Terminus generiert ein neues, verkürztes Ende, welches als *tethered ligand* mit dem zweiten extrazellulären Loop des G-Protein Rezeptors interagiert und diesen so aktiviert. Auch eine direkte Aktivierung des zweiten Loops mit synthetischen, aktivierenden Peptiden (AP) ist möglich. (Macfarlane et al. 2001)

Die Deaktivierung der PAR erfolgt via Internalisierung und anschließendem Abbau in Lysosomen (Trejo 2003). Eine mögliche Desensibilisierung gegenüber einer Aktivierung der PAR funktioniert über eine verminderte Transkription und RNA-Stabilität (Tsao et al. 2001). Bis heute wurden insgesamt vier PAR (PAR 1-4) beschrieben, von welchen PAR-1, PAR-3 und PAR-4 durch Thrombin aktivierbar sind. Der PAR-2 kann u.a. durch den

aktivierten Gerinnungsfaktor FXa aktiviert werden, welcher gleichzeitig auch den PAR-1 aktiviert (Macfarlane et al. 2001). Auf Monozyten bzw. U937 Zellen wurden bisher der PAR-1, PAR-2 und PAR-3 nachgewiesen (Joseph and MacDermot 1993; Colognato et al. 2003; Li et al. 2006; Lopez-Pedrerera et al. 2010). Bezüglich der Expression von PAR-4 auf Monozyten gibt es widersprüchliche Untersuchungsergebnisse (Colognato et al. 2003; Li et al. 2006; Lopez-Pedrerera et al. 2010). Der PAR-1 als protypischer Thrombin-Rezeptor ist in zahlreichen Studien gut untersucht worden. Eine thrombininduzierte PAR-1 Aktivierung auf Monozyten führt zu einer Sekretion von Interleukinen (IL-8 (Kaplanski et al. 1997), IL-1 und IL-6 (Naldini et al. 2000)) und induziert die Expression des *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) (Colotta et al. 1994). Diese Funktion von Thrombin ist im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose von großer Bedeutung. Durch die erhöhte Expression von MCP-1 auf Monozyten und deren Sekretion von IL-8 wird die Adhäsion von weiteren Monozyten an dem Ort der atherosklerösen Läsion gesichert. IL-1 und IL-6 fördern die Aktivierung von Endothelzellen, was zu einer Erhöhung der Endothelzellpermeabilität für Lipide führt. Ebenso wird die Migration von SMC in den Bereich der atherosklerösen Läsion gefördert, sodass die Bildung eines atherosklerotischen Plaques verstärkt wird (Sprague and Khalil 2009). Es wird deutlich, dass die Thrombinwirkung auf Monozyten im Rahmen der Atherogenese einen wichtigen Teilaspekt darstellt.

1.5 Sphingosin-1-Phosphat

Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Sphingolipid, das an der Regulierung zahlreicher zellulärer Prozesse (z.B. Zellwachstum, Zellentwicklung, Zytokinproduktion) beteiligt ist (Maceyka et al. 2005). Die S1P-Konzentration in Körperflüssigkeiten ist höher als die im Gewebe (Takabe et al. 2008). An der Produktion sind Thrombozyten (Yatomi et al. 2001), vaskuläre Endothelzellen (Ancellin et al. 2002) und Erythrozyten (Hanel et al. 2007) beteiligt. S1P entsteht aus der Phosphorylierung von Sphingosin durch die Sphingosinkinase, welche in zwei Isoformen vorliegt. Der Abbau erfolgt entweder durch die S1P-Phosphatase, welche S1P wieder zu Sphingosin und Phosphat spaltet sowie durch die S1P-Lyase (Abb. 1.6) (Spiegel and Milstien 2003). S1P ist in der Lage, sowohl als extrazellulärer Ligand an spezifischen Rezeptoren zu fungieren, wie auch als intrazellulärer second messenger (Olivera and Spiegel 2001). Durch Aktivierung von S1P-Rezeptoren werden neben der Regulierung der endothelialen Permeabilität eine große

Anzahl weiterer Funktionen, wie beispielsweise die Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellmigration, Organisation des Zytoskelettes, Regulierung der Angiogenese und Vermittlung entzündlicher Reaktionen gesteuert (Spiegel and Milstien 2003; Anliker and Chun 2004; Saba and Hla 2004). Zusätzlich zu den extrazellulären Effekten beschreiben zahlreiche Studien intrazelluläre Funktionen für S1P, z.B. im Zusammenhang mit der zellulären Proliferation (Olivera et al. 1999), der Kalzium-Homöostase (Meyer zu Heringdorf et al. 1998) und in Bezug auf die Verhinderung der Apoptose (Olivera et al. 2003; Maceyka et al. 2005).

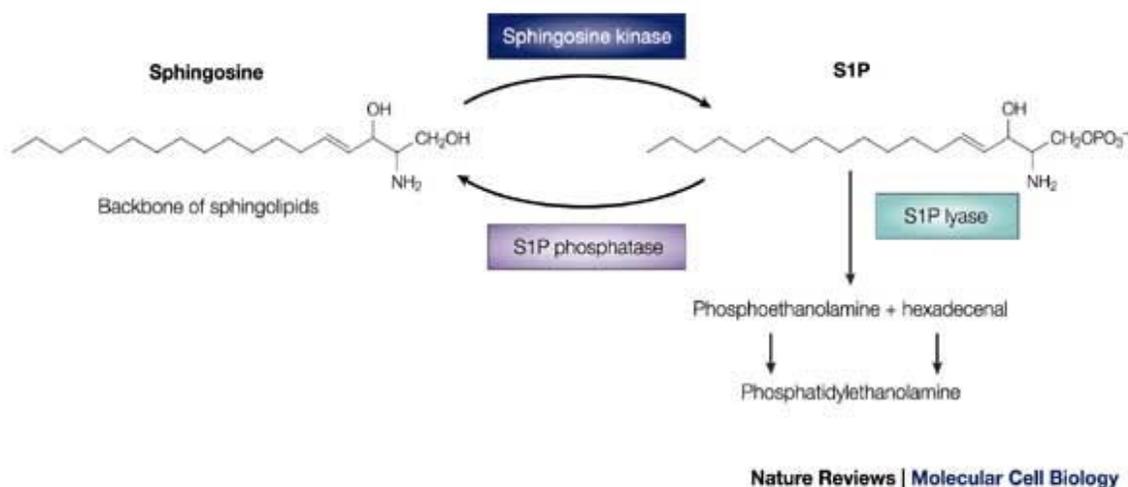


Abb. 1.6 S1P- Stoffwechsel (Spiegel and Milstien 2003)

In der Literatur sind fünf verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beschrieben, die S1P-Rezeptoren S1P₁₋₅ (Sanchez and Hla 2004). Auf Monozyten wurden alle fünf Rezeptoren auf mRNA-Ebene nachgewiesen, jedoch nur der S1P1, S1P2 und S1P5 auf Proteinebene entdeckt (Duong et al. 2004). Die Wirkung von S1P im Rahmen Pathogenese der Atherosklerose ist noch nicht abschließend geklärt. So wird in der Literatur sowohl eine proatherogene (Siess 2002) sowie eine antiatherogene Wirkung (Sato and Okajima 2010) beschrieben. S1P blockiert die Anheftung von Monozyten an das Endothel (Tani et al. 2007) und wird für einen Teil der antiatherogenen Eigenschaften der HDL verantwortlich gemacht (Sato and Okajima 2010). Zusätzlich wurde eine direkte

chemotaktische Wirkung von S1P auf Monozyten beschrieben (Gude et al. 2008). In dendritischen Zellen und Endothelzellen konnte S1P eine wichtige Rolle im Rahmen der Signalkaskade des PAR-1 zugeordnet werden (Feistritzer et al. 2005; Feistritzer and Riewald 2005; Niessen et al. 2008). In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte ein Induktionseffekt von S1P auf den PAR-2 in SMCs nachgewiesen werden, während kein regulierender Effekt auf PAR-1, PAR-3 und PAR-4 zu finden war (Ermler 2011). Über die Verbindungen von Thrombin, den Thrombinrezeptoren und S1P in Monozyten liegen bisher keine Daten vor.

1.6 Zielsetzung

Die Expression von PAR-1 und PAR-3 auf Monozyten ist mehrfach beschrieben worden. Die Frage nach einer möglichen Expression des PAR-4 konnte aber bisher nicht beantwortet werden, da unterschiedliche Berichte in der Literatur zu finden sind. Weiter wurden bisher keine Untersuchungen bezüglich eines möglichen regulatorischen Einflusses von S1P auf die PAR in humanen Monozyten durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde zuerst der Frage nach der Thrombinrezeptorausstattung von Monozyten nachgegangen. Im Verlauf sollte dann der Einfluss von S1P auf die monozytären PAR jeweils auf Transkript-, Protein- und Zelloberflächenebene untersucht werden. Im Falle einer regulierenden Wirkung auf einen oder mehrere PAR sollten die funktionellen Konsequenzen bezüglich des Migrationsverhaltens geklärt werden, da dieses im Rahmen der Atherosklerosepathogenese von enormer Bedeutung ist.

2. Material und Methoden

2.1 Substanzen

Tabelle 2.1: *Verwendete Substanzen und Komplettpakete*

Substanzen	Hersteller
Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM)	Calbiochem, Darmstadt
Dynabeads® Untouched™ Human Monocytes kit	Invitrogen, Karlsruhe
ECL Advance	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
High Capacity cDNA reverse transcription kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Humanes α -Thrombin	LOXO GmbH, Dossenheim
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
PAR-1-AP (SFLLRN-Amid)	Biosyntan GmbH, Berlin
PAR-4-AP (AYPGQV-Amid)	Biosyntan GmbH, Berlin
QuantiTect Primer Assay QT00230489 (GAPDH) QT00230489 (PAR-1) QT01192758 (PAR-4)	Qiagen GmbH, Hilden
RPMI-1640 GlutaMAX™- I	Invitrogen, Karlsruhe
Sensi-mix SYBR® green reagent	Quantace, London, UK
Sphingosin-1-Phosphat	Sigma-Aldrich, München
Tri-Reagent	Sigma-Aldrich, München

2.2 Antikörper

Tabelle 2.2: *Verwendete Antikörper*

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
β-Aktin (Maus monoklonaler AK)	Sigma, Schnelldorf	1:50000
Anti-CD14-PE (A07738) (Maus monoklonaler AK)	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich	1:5
Anti-CD45-PE (A07785) (Maus monoklonaler AK)	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich	1:5
IgG1 (Mouse)-PE (IM0670) (Isotyp-Kontrolle für Durchflusszytometrie)	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich	1:5
IgG1 (Mouse)-FITC (A07795) (Isotyp-Kontrolle für Durchflusszytometrie)	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich	1:5
Anti-thrombin receptor-PE (PAR-1), (WEDE15-Clone) (Maus monoklonaler AK)	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich	1:100
Anti-Proteinase-activated receptor-4 (extracellular)- FITC (Hase polyklonaler AK)	Alomone Labs, Jerusalem, Isreal	1:50
PAR-1 (ATAP2) (Maus monoklonaler AK)	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:2000
PAR-4 (M1-clone) (Maus monoklonaler AK)	Sigma-Aldrich, München	1:200
Goat anti-mouse IgG, HRP- conjugated	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:3000

Goat anti-rabbit IgG, HRP-conjugated	Santa Cruz Biotechnolgy, Santa Cruz, CA, USA	1:3000
--------------------------------------	---	--------

2.3 Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Lösungen wurden in höchster verfügbarer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (München) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Tabelle 2.3: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
ACD (Acid Citrate Dextrose)	85 mM Trinatriumcitrat x 2 H ₂ O 65 mM Citronensäure x H ₂ O 111 mM Glucose
Fixierlösung (Röntgenfilm)	1 % Kaliumdisulfid 20 % Natriumthiosulfat x 5 H ₂ O
Lämmli-Puffer (2x)	125 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0), 100 mM DTT, 20 % Glycerin, 4 % SDS, 0,002 % Bromphenolblau
Laufpuffer	190 mM Glycin, 25 mM Tris (pH 8,5), 0,1 % SDS
PBS	137 mmol/L NaCl 2,7 mmol/L KCl 1,5 mmol/L KH ₂ PO ₄ 8,3 mmol/L Na ₂ HPO ₄
Sammelgel (5 % für 2 Gele)	H ₂ O dest. 4,1 ml 30 % Acrylamid-Lösung 1 ml 1 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,75 ml 10 % SDS 60 µl 10 % APS 60 µl TEMED 6 µl
Transferpuffer (1x)	190 mM Glycin, 25 mM Tris, 20 % Methanol

Trenngel (10 % für 2 Gele)	H ₂ O dest.	4 ml
	30 % Acrylamid-Lösung	3.3 ml
	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	2.5 ml
	10 % SDS	100 µl
	10 % APS	100 µl
	TEMED	4 µl
TBS (10x)	1,5 M NaCl, 100 mM Tris/HCl (pH 7,4)	
TBST (1x)	1x TBS + 0,1 % Tween 20	
TBST-M	1x TBST + 5 % Magermilchpulver	

2.4 Geräte und Materialien

Tabelle 2.4: *Verwendete Geräte*

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Blot-Papier	Whatman-Papier	Schleicher und Schuell, Maidstone, UK
Densitometer, Scanner	Molecular Imager GS-800 Calibrated Densitometer	Umax Systems GmbH, Willich
Durchflusszytometer	EPIC-XL	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Gelkammer	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Biorad, München
Gradienten-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
MilliQ	MilliQ® Biocell™	Millipore SAS, Frankreich
Mikroskop	Olympus Ix50 und Olympus CK2	Olympus Optical Co. LTD., Japan
pH-Meter	Digital-pH-Meter 646	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin

Photometer	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Power Supply	Power 300	Biorad, München
PVDF Western Blotting Membranes	Immobilon-P Roche	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Realtime PCR Light-Cycler	7300 Real Time PCR Systems	Applied Biosystems, Darmstadt
Sterilbank	LaminAir HLB 2448 GS	Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Sonifier® B-12	Branson Sonic Power Company, Danbury, CT, USA
Wasser-Deionisierungsanlage	Millipore	Millipore, Schwalbach
Zellzählgerät	Countess™ Automated Cell Counter	Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifuge	J2-HS Centrifuge Minifuge GL	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf

2.5 Software

Tabelle 2.5: Verwendete Software

Software	Hersteller
7300 System sequence detection software (SDS)	Applied Biosystems, Darmstadt
Quantity One® Version 4.4.1	Biorad, München

Endnote X 4	Thomson Reuters Inc., http://www.endnote.com/
System II (30) software	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., http://www.graphpad.com

2.6 Zellkultur

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

2.6.1 Kultivierung der humanen monozytären Zelllinie U937

Die Zellen der humanen monozytären Zelllinie U937 (1593, ATCC, LGC Promochem, Wesel) wurden in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Glutamax Medium (Invitrogen, Karlsruhe) supplementiert mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin kultiviert. Die Suspensionzellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Vor Experimenten wurden die Zellen durch Zentrifugation (150 x g, 5 Min.) pelletiert, mit Hilfe des Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen, Karlsruhe) gezählt und in einer Konzentration von 2 x 10⁶ Zellen/ml auf eine 6- bzw. 24- Lochkulturplatte in serumfreien RPMI Glutamax Medium (Invitrogen, Karlsruhe) mit 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin ausgesät.

2.6.2 Isolierung und Kultivierung humaner Monozyten aus Vollblut

Zur Isolierung humaner Monozyten wurde gesunden Probanden, nach Vorlage von 5 ml Citrat (ACD), 45 ml venöses Vollblut entnommen (Aktenzeichen 3162 der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität). Das venöse Vollblut wurde zu jeweils 25 ml auf zwei 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und für 10 Min. bei 180 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Plasma abgesaugt. Die restlichen Blutbestandteile,

bestehend aus dem *buffy coat* (Leukozyten und Thrombozyten) und den Erythrozyten, wurden im Verhältnis 1:1 mit 0,1 % BSA versetztem PBS verdünnt. In zwei 50 ml Falcon-Röhrchen wurden jeweils 20 ml Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) vorgelegt und langsam, ohne Vermischung, mit den verdünnten zellulären Blutbestandteilen überschichtet. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 400 x g ohne Bremse. Die obere Phase wurde vorsichtig abgesaugt und die Thrombozyten- und PBMCs- enthaltende Interphase vorsichtig mit einer Pipette in ein frisches 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Um die Thrombozyten von PBMCs zu trennen, wurde die überführte Zellsuspension mit dem 3-fachen Volumen an 0,1 % BSA versetztem PBS verdünnt und für 10 Min. bei 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit den PBMCs erneut mit 0,1 % BSA versetztem PBS gewaschen. Anschließend wurden durch Entfernung nicht-monozytärer Zellen humane Monozyten (negativ Isolierung) aus den PBMCs isoliert. Die Entfernung nicht-monozytärer Zellen erfolgte mit Hilfe des Dynabeads® Untouched™ Human Monocytes Kits (Invitrogen, Karlsruhe) (enthält einen Mix aus Biotin-markierten monoklonalen Antikörpern gegen humane CD3-, CD7-, CD16- (a und b), CD19-, CD56-, CD123- und CD235a- (Glycophorin A) Rezeptoren sowie Streptavidin überzogene supramagnetische Polystyrenbeads) nach Herstellerangaben. Vergleichend wurden humane Monozyten durch eine positiv Isolierung mit Hilfe des Dynabeads® CD14 Kits (Invitrogen, Karlsruhe) (enthält Biotin-markierte monoklonale CD14-AK sowie Streptavidin überzogene supramagnetische Polystyrenbeads) nach Herstellerangaben gewonnen. Die dadurch isolierten Monozyten wurden dann auf eine 6- bzw. 24- Lochkulturplatte in RPMI Glutamax Medium mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin überführt und 24 h bis Versuchsbeginn inkubiert. Die Monozyten wurden durchflusszytometrisch mittels Streulichteigenschaften und Bindung von Anti-CD-14-PE- und Anti-CD-45-PE-AK (beide Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) identifiziert.

2.7 Zell-Vitaltest

Die Überlebensrate der Zellen wurde mit Hilfe des Countess™ Automated Cell Counter Zellzählgerätes (Invitrogen, Karlsruhe) durch Trypanblau-Färbung überprüft. Dafür wurden die Zellen mit Trypanblau im Verhältnis 1:2 gemischt und anschließend der Anteil vitaler Zellen im Zellzählgerät nach folgender Formel berechnet:

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

Der Anteil vitaler Zellen lag vor Versuchsbeginn beständig über 95%.

2.8 Präparation, Analyse und Quantifizierung von RNA

Gesamt-RNA aus U937-Zellen und Monozyten wurde mittels TriReagent® (Sigma-Aldrich, München) nach Angaben des Herstellers isoliert. Konzentration und Reinheit der präparierten RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm mit Hilfe eines Nanodrop-1000 (Peqlab, Erlangen) photometrisch bestimmt.

2.9 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die qPCR wurde in einem Zweischnitt-Protokoll durchgeführt. Im ersten Schritt wurde cDNA aus 0,5-1 µg der präparierten RNA nach Angaben des Herstellers (One-Step RT-PCR-Kit; Qiagen, Hilden) in einem Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) synthetisiert. Es erfolgte im zweiten Schritt die PCR mit 2 ng cDNA (PAR-1 und GAPDH) bzw. 15 ng (PAR-4) in einem Real-Time PCR System 7300 (Applied Biosystems, Darmstadt) mittels SYBR Green™ Technologie. Die qPCR wurde mit den QuantiTect® Primer Assays (Qiagen, Hilden) QT00230489 (PAR-1), QT01192758 (PAR-4) und QT01192646 (GAPDH als endogene Kontrolle) und dem Sensi-Mix SYBR® Green Reagent (Quantace, London, UK) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Daten wurden mittels Sequence Detection Software v 1.2.3. (Applied Biosystems, Darmstadt) detektiert.

Die PCR erfolgte in Versuchsansätzen á 20 µl:

10 µl Sensi-Mix SYBR® Green Reagent

2 µl QuantiTect® Primer Assay

8 µl Probe

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

2 Min.,	50 °C	
10 Min.,	95 °C	
15 Sek.,	94 °C	} 40 Zyklen
30 Sek.,	55 °C	
30 Sek.,	72 °C	
20 Sek.,	60 °C	

Bei der SYBR Green™ Technologie wird ein interkalierender Farbstoff zur Visualisierung des entstehenden Amplikons benutzt. Nach Anregung durch energiereiches UV-Licht, wird Licht im sichtbaren energieärmeren Wellenlängenbereich emittiert (Fluoreszenz). Bei nicht-interkaliertem Farbstoff liegt nur eine sehr geringe Emission vor. Durch die Interkalierung des Farbstoffs in doppelsträngige DNA wird die Emission verstärkt. SYBR Green™ besitzt eine Anregungswellenlänge von 497 nm und eine Emissionswellenlänge von 520 nm. Der Farbstoff bindet jedoch auch an jeder anderen doppelsträngigen DNA, daher kann das tatsächliche Produkt nicht von Artefakten (z.B. Primerdimere), welche einen unspezifischen Anstieg der Fluoreszenz erzeugen, unterschieden werden. Es ist so eine klare Differenzierung zwischen Artefakt und Zielfragment notwendig. Zu diesem Zweck wurde eine Schmelzpunktanalyse des PCR-Produktes durchgeführt. Diese erfolgte durch Erhitzen des Reaktionsgemisches in 1 °C- Schritten, von 60 °C auf 95 °C und kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz. Die Schmelztemperatur doppelsträngiger DNA ist durch einen Abfall der Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes gekennzeichnet, da der interkalierende Farbstoff von der einzelsträngigen DNA dissoziiert. Dieser Schmelzpunkt stellt das spezifische, zu erwartende Produkt dar und unterscheidet sich von der Schmelztemperatur der Artefakte. Durch diesen Analyseschritt gewinnt das System an Spezifität und ermöglicht es, ein spezifisches Produkt von Artefakten zu unterscheiden.

2.10 Western Blotting

Zur Gewinnung von Proteinproben wurden die Zellen durch Zugabe von 2 x Lämmli-Puffer lysiert. Das Lysat wurde anschließend für 5 Min. bei 90 °C denaturiert und kurz sonifiziert. Im Folgenden wurden die Proben aliquotiert und bei - 20 °C bis zur Analyse gelagert.

Die Analyse und Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 5 % und im Trenngel 10 %. Die Proteinauftrennung erfolgte für 60-90 Min. bei 180 V (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Biorad, München). Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Millipore, Bedford, MA, USA) übertragen. Dafür wurde die Membran in Methanol aktiviert, anschließend mit Wasser gespült und dann in Transferpuffer equilibriert. Die Übertragung erfolgte in einer „Semi-Dry“-Blot-Apparatur (Biorad, München) bei 12 V für 50 Min. Im weiteren Verlauf wurden die Proteine mittels „ECL Advance Western Blotting Detection Kit“ (GE Healthcare, München) detektiert. Dieses Detektions-Kit verwendet Lumigen®-TMA-6 als Substrat der Peroxidase, was zu einer wesentlich stärkeren Lumineszenz als bei der Oxidation von Luminol führt. Die proteinbeladene Membran wurde über Nacht in einer speziellen Blockinglösung prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (1:200- bis 1:2000-fach verdünnt) für 1,5 h und mit dem Zweitantikörper (1:20000-fach verdünnt) für 1 h. Die Detektion der Proteine erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die entwickelten Röntgenfilme wurden mit einem GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad, München) eingescannt und anschließend mit Hilfe der Software Quantity One® (BioRad, München) ausgewertet.

2.11 Durchflusszytometrie

Die Analyse der Oberflächenexpression von PAR-1 und PAR-4 auf U937-Zellen und humanen Monozyten wurde mittels EPIC-XL Zytometer (Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen pelletiert, in 50 µl PBS resuspendiert und mit dem jeweiligen Antikörper für 30 Min. lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 500 µl Waschpuffer gemischt und direkt analysiert. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper auszuschließen, wurden sog. Isotyp-Kontrollen mit fluoreszenzmarkierten Immunglobulinen durchgeführt. Die jeweilige Isotyp-Kontrolle stammte aus der gleichen Spezies (Maus) und war an den gleichen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wie der jeweils eingesetzte Antikörper. U937 Zellen sowie humanen Monozyten konnten anhand ihrer zellspezifischen Streulichteigenschaften, d.h. durch das sog. Vorwärtsstreulicht (FSC: Forward Scatter) und das sog. Seitwärtsstreulicht (SSC: Sidewards Scatter) sowie durch das Binden von Anti-CD45-PE- und Anti-CD14-PE-AK,

identifiziert werden. Die Detektion erfolgte bei logarithmischer Amplifikation. Je Probe wurden 10000 Zellen mit der System II-Software analysiert und anschließend die Parameter „Mittlere Fluoreszenzintensität“ (MnI) und „Prozent positive Ereignisse“ ausgewertet. Zur Quantifizierung wurde der Wert der „Mittleren Fluoreszenzintensität“ (Mn X) des Isotyps von dem Wert der Kontrolle und der jeweiligen stimulierten Probe subtrahiert. Der jeweils resultierende Wert der stimulierten Proben wurde auf den Wert der Kontrolle normalisiert.

2.12 Modifizierter Boydenkammer Chemotaxis Assay

Zur Untersuchung des Einfluss von humanem α -Thrombin auf die Chemotaxis von U937 Zellen und humane Monozyten wurde in dieser Arbeit eine modifizierte Boydenkammer verwendet (s. Abb. 2.1). Die modifizierte Boydenkammer bestand aus einer 24-Lochkulturplatte und Zellkulturinserts mit einer Filtergröße von 3 μm (BD Biosciences, Heidelberg). Durch diesen Versuchsaufbau ergaben sich zwei Kompartimente, welche durch den Filter aus Polyethylenterephthalat (PET) der Zellkulturinserts getrennt wurden (s. Abb. 2.1). Nach der jeweiligen Zellstimulation wurden die Zellen für 30 Min. bei 37° C im Brutschrank mit 1 μM Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) (Calbiochem, Darmstadt) angefärbt, um eine spätere Auszählung der migrierten Zellen zu ermöglichen.

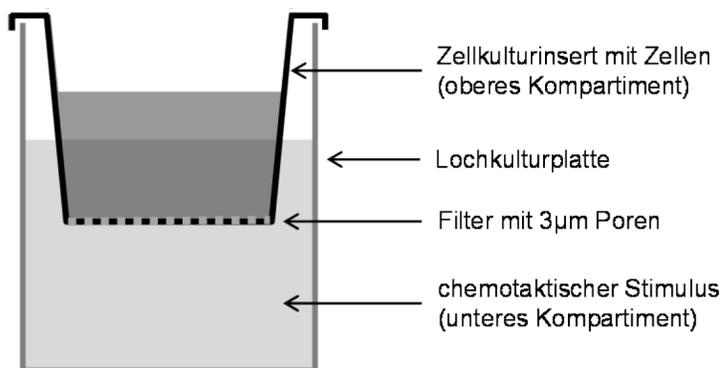


Abb. 2.1: Aufbau der modifizierten Boydenkammer

Zu Beginn des Versuches wird der chemotaktische Stimulus im unteren Kompartiment vorgelegt und anschließend die Zellen in das Zellkulturinsert (obere Kompartiment) gefüllt. Im Folgenden wird der Versuchsaufbau für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Bei Calcein-AM handelt es sich um den Acetoxy-methylester des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein. Calcein-AM wird von vitalen Zellen aktiv über die Zellmembran aufgenommen. Intrazellulär wird dann die Acetoxy-methylgruppe des Calcein-AMs durch unspezifische Esterasen abgespalten, wodurch Calcein freigesetzt wird und so im Komplex mit

Calciumionen zu einer grünen Fluoreszenz führt. Der Komplex aus Calcein und Calciumionen ist nicht mehr in der Lage, die Zelle zu verlassen. Calcein besitzt eine Exzitationswellenlänge von 495 nm und eine Emissionswellenlänge von 515 nm. Nach der Inkubation mit Calcein-AM wurden die Zellen mit serumfreien RPMI Glutamax Medium gewaschen, um das verbliebene Calcein-AM zu entfernen. Anschließend wurde das untere Kompartiment mit 500 µl serumfreien RPMI Glutamax Medium mit 3 U/ml humanem α -Thrombin als chemotaktischem Stimulus beladen. Das obere Kompartiment wurde mit 200 µl der Zellsuspension mit insgesamt 5×10^5 Zellen, ebenfalls in serumfreiem RPMI Glutamax Medium, befüllt. Im Folgenden wurde die modifizierte Bodyenkammer für 3 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Zellkulturinserts vorsichtig entfernt, der gesamte Inhalt des unteren Kompartiments in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Diese wurden in 200µl PBS resuspendiert und anschließend die Fluoreszenz der jeweiligen Probe mit Hilfe des Fluoroskan Ascent microplate readers (Thermo Labsystem, Oberhausen) analysiert. Die Fluoreszenz verhält sich dabei direkt proportional zu der Zahl der vitalen, migrierten, Calcein-AM angefärbten Zellen. Die Ergebnisse wurden auf die Kontrollgruppe (Proben ohne chemotaktischen Stimulus im unteren Kompartiment) normalisiert. Alle Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.13 Statistik

Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Das Signifikanzniveau p für α wurde mit 0,05 festgelegt. Signifikante Unterschiede zwischen mehreren Versuchsgruppen (≥ 3) wurden mittels *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) und nachfolgendem Bonferroni-Test für multiple Vergleiche überprüft. Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen wurden mittels ungepaartem oder gepaartem „*Student's t-Test*“ überprüft.

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit GraphPad Prism-Software (Version 5.00, GraphPad Software, San Diego, USA) oder Microsoft Excel™ (Microsoft GmbH, Frankfurt).

2.14 Ethikvotum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Für die hier vorliegende Arbeit wurde ein Ethikvotum von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität eingeholt (Aktenzeichen 3162, Rauch).

3. Ergebnisse

3.1 Basale Expression der Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4

Um den Einfluss von S1P auf die Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4 in U937 Zellen und humanen Monozyten zu untersuchen, ist es notwendig, die Existenz dieser Rezeptoren in den Zellen zu verifizieren. Die Existenz des PAR-1 auf U937 Zellen und Monozyten ist bereits in der Literatur beschrieben (Hoffman and Church 1993; Joseph and MacDermot 1993; Jenkins et al. 1995). Bezüglich der Existenz von PAR-4 auf monozytären Zellen gibt es widersprüchliche Daten (Colognato et al. 2003; Li et al. 2006; Lopez-Pedrera et al. 2010). Zur Klärung dieser widersprüchlichen Ergebnisse und zur Bestätigung der PAR-1 Daten wurden unbehandelte U937 Zellen aus der Zellkultur sowie frisch isolierte, unbehandelte humane Monozyten auf die Existenz von PAR-1 und PAR-4 hin untersucht.

3.1.1 Basale Expression der PAR-1 und PAR-4 mRNA

Unter Verwendung spezifischer Primer (QuantiTect Primer Assay, Qiagen GmbH, Hilden) wurde die basale Expression von PAR-1- und PAR-4- mRNA mittels qPCR untersucht. Abbildung 3.1 zeigt, dass beide Rezeptoren auf humanen Monozyten vorhanden sind. Das Expressionsniveau von PAR-1 und PAR-4 unterscheidet sich jedoch deutlich. So ergibt sich, nach Normalisierung der Signale auf GAPDH als endogene Kontrolle, eine PAR-4-mRNA-Expression von 2 % im Vergleich zu der PAR-1-mRNA-Expression in humanen Monozyten (s. Abb. 3.2).

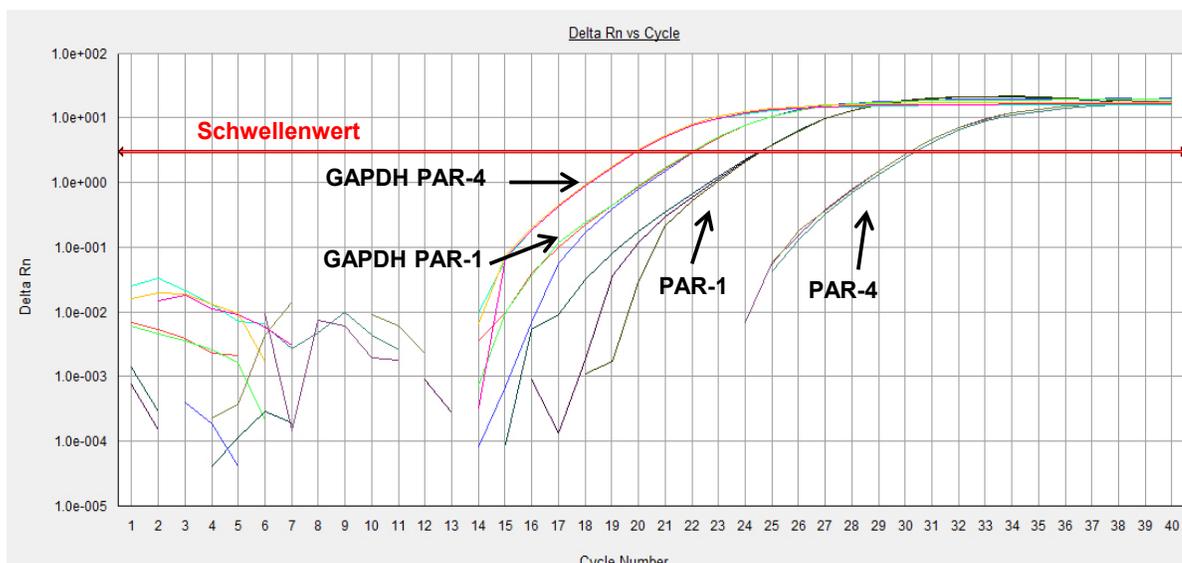


Abb. 3.1 Basale Expression der Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4 in humanen Monozyten

Repräsentative Darstellung des Ergebnisses einer qPCR aus n=6 unabhängigen Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis. Die qPCR wurde mit cDNA aus frisch isolierten, unbehandelten humanen Monozyten durchgeführt. Die dargestellten Kurven zeigen die Amplifikationskurven von GAPDH (endogene Kontrolle), PAR-1 und PAR-4. Für die Analyse des PAR-1 wurden 2 ng und für die Analyse des PAR-4 15 ng cDNA eingesetzt. Die rote Linie stellt den Schwellenwert („*threshold*“ genannt) dar, welcher im linearen Verlauf der Amplifikationskurven positioniert wird. An der Kreuzung von Schwellenwert und Amplifikationskurve wurden die *ct*(*cycle threshold*) Werte abgelesen. Aufgrund der unterschiedlich eingesetzten Menge an cDNA verlaufen die GAPDH Amplifikationskurven nicht identisch. Anhand der Kurvenverläufe von PAR-1, PAR-4

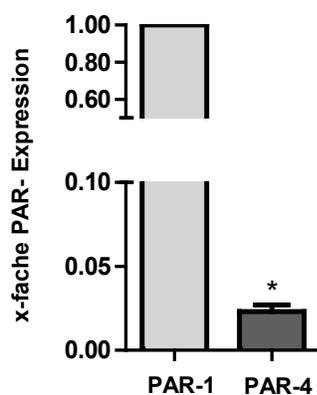


Abb. 3.2 Vergleich der basalen PAR-1 und PAR-4-mRNA-Expression in humanen Monozyten

Die PAR-1-mRNA-Expression wurde auf 1 normiert und die PAR-4-mRNA-Expression als Vielfaches dieser dargestellt (* $p < 0,05$, n=6).

3.1.2 Basale Expression des PAR-1 und PAR-4 Proteins

Des Weiteren wurde die basale Expression von PAR-1 und PAR-4 auf Proteinebene untersucht. Hierfür wurde Zelllysate von humanen Monozyten mittels Western-Blot (AK PAR-1: PAR-1 (ATAP2); AK PAR-4: PAR-4 (M1-clone)) (s. Tab. 2.2) analysiert. PAR-1 besitzt ein Molekulargewicht von 66 kDa und PAR-4 von 33 kDa. Beide Rezeptoren konnten im Zelllysate humaner Monozyten nachgewiesen werden (s. Abb. 3.3).

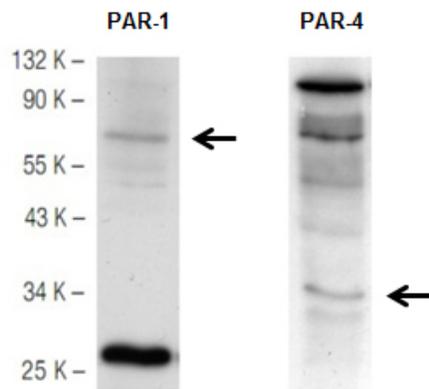


Abb. 3.3 Western-Blot Analyse humaner Monozyten

Das PAR-1- und PAR-4-Protein konnte jeweils im Zelllysate von humanen Monozyten nachgewiesen werden (←). Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Western-Blot aus n=3 Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen.

Eine anschließend durchgeführte durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von PAR-1 und PAR-4 auf humanen Monozyten bestätigte die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse. So konnten beide Rezeptoren mit Hilfe geeigneter AK (PAR-1: Beckman Coulter, Marseille, Frankreich; PAR-4: Alomone Labs, Jerusalem, Isreal) (s. Tab. 2.2) auf den Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 5 a und b).

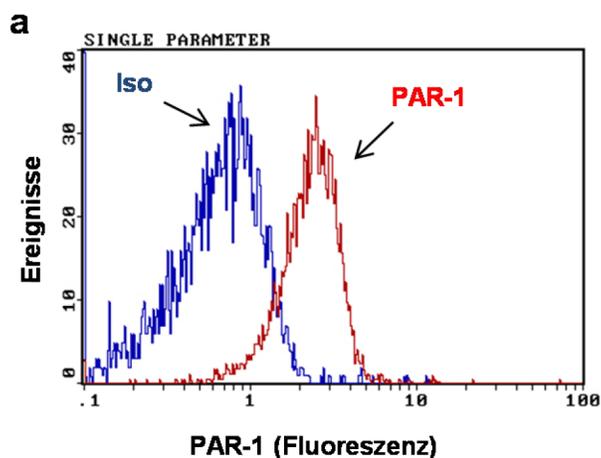


Abb. 3.4 (a) Durchflusszytometrische Bestimmung der basalen PAR-1-Oberflächenexpression auf humanen Monozyten

Dargestellt ist ein repräsentatives Originalhistogramm der durchflusszytometrischen Untersuchung aus n=3 Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis. Isotyp (blau), PAR-1 (rot).

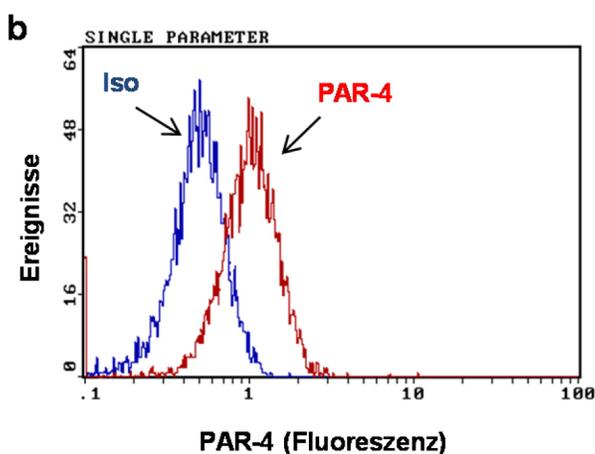


Abb. 3.4 (b) Durchflusszytometrische Bestimmung der basalen PAR-4-Oberflächenexpression auf humanen Monozyten

Dargestellt ist ein repräsentatives Originalhistogramm der durchflusszytometrischen Untersuchung aus n=3 Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis. Isotyp (blau), PAR-4 (rot).

Die Analyse von U937 Zellen erbrachte vergleichbare Ergebnisse bezüglich der mRNA-, Protein- und Oberflächenexpression von PAR-1 und PAR-4.

3.2 Regulation der Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4 durch S1P

Nachdem PAR-1 und PAR-4 auf Transkript-, Protein- und Zelloberflächenebene in humanen Monozyten und U937 Zellen nachgewiesen werden konnte, sollte nun der Einfluss von S1P auf PAR-1 und PAR-4 untersucht werden.

3.2.1 S1P induziert die Expression von PAR-1- und PAR-4-mRNA

Zuerst wurde die Wirkung von S1P auf die PAR-1- und PAR-4-mRNA untersucht. Für die Experimente wurde eine S1P-Konzentration von 1 μ M verwendet, was einer physiologischen Konzentration von S1P in humanem Plasma bzw. Serum entspricht (Caligan et al. 2000; Murata et al. 2000; Berdyshev et al. 2005).

Die Stimulation von U937 Zellen mit S1P führte zu einem signifikanten Anstieg der PAR-1- und PAR-4-mRNA. S1P bewirkte eine transiente Induktion der PAR-1-mRNA mit einem signifikanten Maximum (2,4-fach) nach 16 Stunden (s. Abb. 3.5 a). Die Analyse der PAR-4-mRNA nach S1P-Stimulation zeigt ebenfalls eine transiente Induktion der mRNA mit einem signifikanten Maximum (2,1-fache) nach 6 Stunden (s. Abb. 3.5 b).

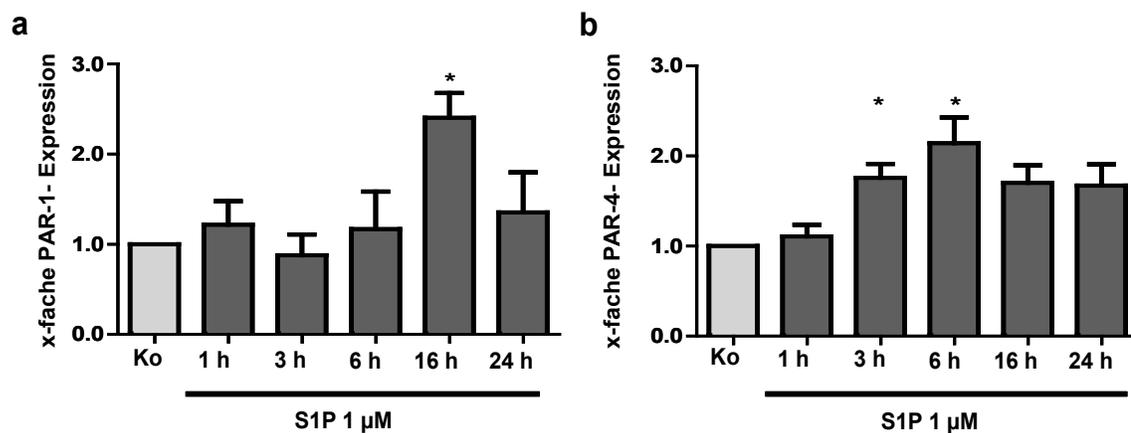


Abb. 3.5 Kinetik der Induktion von PAR-1- (a) und PAR-4-mRNA (b) durch S1P in U937 Zellen

S1P wurde in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt. Es wurde insgesamt ein Zeitraum von 24 Stunden untersucht (* $p < 0,05$, $n=5$ (a) bzw. $n=3$ (b)).

Auch im Kontrollversuch mit Primärzellen (humane Monozyten) mit 1 μM S1P für 6 bzw. 16 Stunden resultierte in einer vergleichbaren Induktion von PAR-1- (2,2-fach) und PAR-4-mRNA (2,9-fach) (s. Abb. 3.6 a und b).

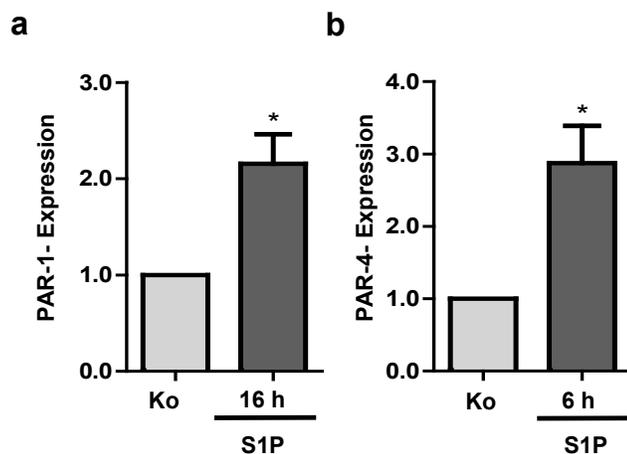


Abb. 3.6 Induktion von PAR-1-(a) und PAR-4-mRNA (b) durch S1P in humanen Monozyten

Die S1P-Konzentration betrug 1 μ M. Es wurden die Zeitpunkte der maximalen Induktion der PAR-1- und PAR-4-mRNA in U937 Zellen als Analysezeitpunkte für humane Monozyten gewählt (* $p < 0,05$, jeweils $n=4$).

3.2.2 Induktion der PAR-4-mRNA-Expression ist unabhängig von der Isolationsart humaner Monozyten

Wie weiter oben beschrieben, wird die Existenz von PAR-4 auf humanen Monozyten in der Literatur kontrovers diskutiert. Aufgrund dieser Diskussion und dem möglichen Einfluss unterschiedlicher Isolationsmethoden auf die PAR, wurde die Auswirkung unterschiedlicher Monozytenisolierungen auf die PAR-4-mRNA-Expression untersucht. Dazu wurden humane Monozyten einerseits durch eine sog. Positiv-Isolierung (direkte Isolierung von humanen Monozyten mit Hilfe von CD-14-AK) (Dynabeads® CD14 Kits, Invitrogen, Karlsruhe) und andererseits durch eine sog. Negativ-Isolierung (Entfernung nicht-monozytärer Zellen mit Hilfe eines AK Mixes) (Dynabeads® Untouched™ Human Monocytes Kits (Invitrogen, Karlsruhe) isoliert. Im Folgenden wurde noch der Einfluss der Kultivierung der humanen Monozyten in der Zellkultur auf die PAR-4-mRNA untersucht. Dafür wurde ein Teil der Zellen direkt nach der Isolierung und ein anderer Teil nach 24 Stunden Kultivierung in der Zellkultur analysiert. Des Weiteren wurden positiv sowie negativ isolierte Monozyten nach 24 Stunden Kultivierung in der Zellkultur mit 1 μ M S1P stimuliert, um die zuvor festgestellte Aufregulation des PAR-4 durch S1P zu kontrollieren.

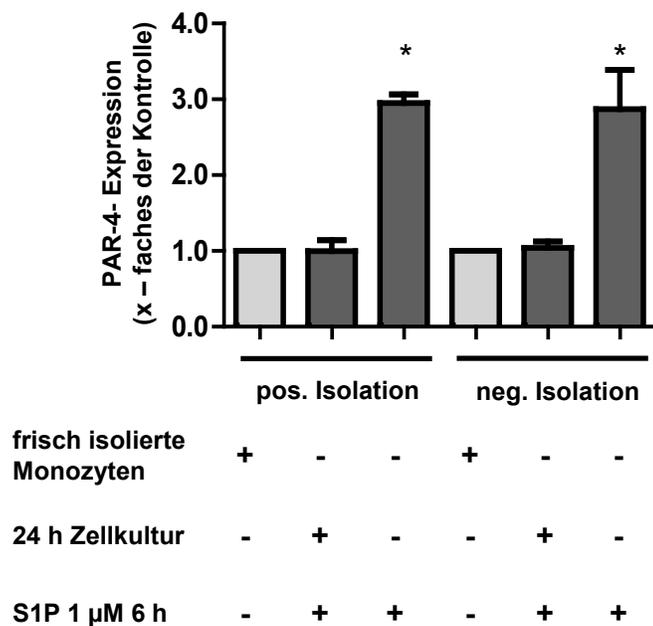


Abb. 3.7 Auswirkung der Isolationsart (Positiv- vs. Negativ-Isolation) auf die PAR-4-mRNA-Expression in humanen Monozyten

Es wurden sowohl bei der Positiv- als auch bei der Negativ-Isolation die Werte für frisch isolierte Monozyten auf 1 normiert und die restlichen Werte als Vielfaches davon dargestellt (*, $p < 0,05$, $n = 3-4$).

Abbildung 3.7 zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der positiv und negativ isolierten Monozyten hinsichtlich der PAR-4-mRNA-Expression gab. Sowohl die frisch isolierten als auch die kultivierten Monozyten zeigten eine ähnliche PAR-4-mRNA-Expression nach Normierung auf die frisch isolierten Monozyten. Auch die nach der Kultivierung durchgeführte Stimulation mit S1P resultierte bei beiden Isolationsarten, wie in der vorherigen Analyse auch, in einem signifikanten Anstieg in der PAR-4-mRNA (3-fach bei der Positiv- bzw. 2,9-fach bei der Negativ-Isolation).

3.3 S1P induziert die Expression des PAR-1- und PAR-4-Proteins

Nachdem die Stimulation von U937 Zellen und Monozyten mit S1P zu einer transienten Induktion des PAR-1- und PAR-4-Transkripts führte, sollte kontrolliert werden, ob die erhöhte Transkriptregulation eine erhöhte Proteinexpression zur Folge hat.

3.3.1 Konzentrations-Wirkungsbeziehung

Die PAR-1- und PAR-4-Proteinexpression wurde in U937 Zellen nach Inkubation mit S1P-Konzentrationen zwischen 0,1 μM und 10 μM für 16 Stunden untersucht. Es zeigte sich jeweils eine signifikante Aufregulation des PAR-1- (2,2-fach) und des PAR-4-Proteins (1,7-fach) bei einer S1P-Konzentration von 1 μM (s. Abb. 3.8 a und b). Diese S1P-Konzentration wurde in allen weiteren Experimenten verwendet.

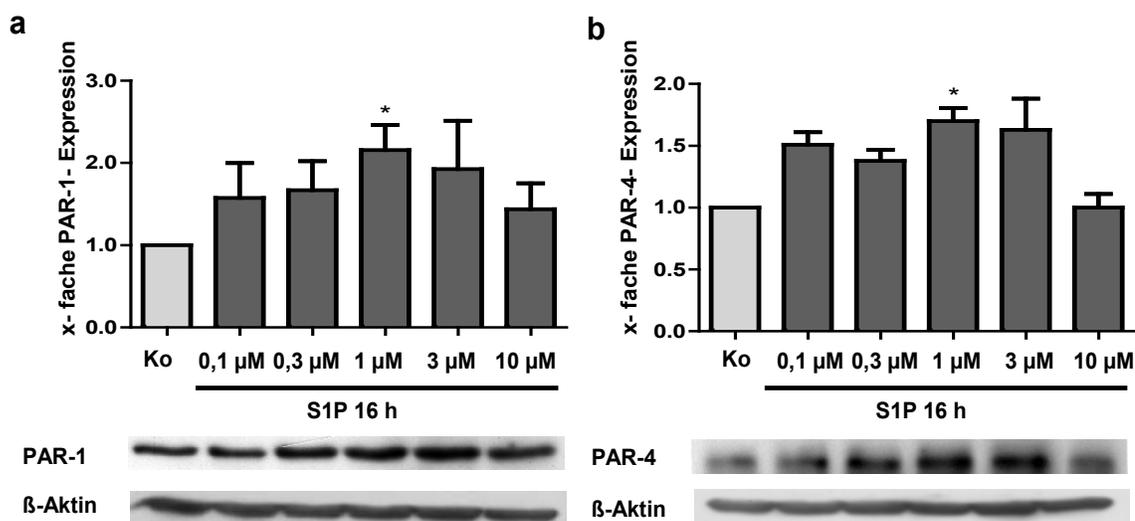


Abb. 3.8 Einfluss von verschiedenen S1P-Konzentrationen auf die PAR-1-(a) und PAR-4-Proteinexpression (b) in U937 Zellen

Die Inkubation von U937 Zellen mit S1P (0,1-10 μM) erfolgte über 16 Stunden (* $p < 0,05$, jeweils $n=4$).

3.3.2 Kinetik

Zusätzlich zur Konzentrations-Wirkungsbeziehung wurde die Kinetik der S1P induzierten PAR-1- und PAR-4-Proteininduktion über 24 Stunden mittels Western-Blot untersucht. Sowohl das PAR-1-, als auch das PAR-4-Protein zeigten eine signifikante, transiente Aufregulation nach 16 bzw. 6 Stunden (s. Abb. 3.9). Der maximale S1P-Effekt wurde bei PAR-1 nach 24 Stunden (2,6-fach) und bei PAR-4 nach 6 h (1,6-fach) gemessen.

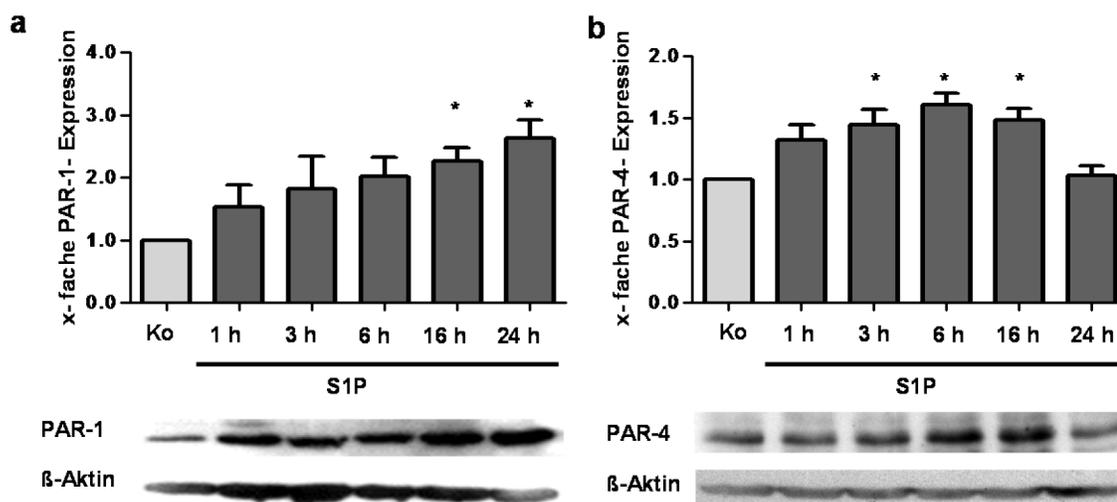


Abb. 3.9 Kinetik der Induktion des PAR-1-(a) und PAR-4-Proteins (b) durch S1P in U937 Zellen

U937 Zellen wurden mit 1 μ M S1P inkubiert und die PAR-1- und PAR-4-Proteinexpression zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht (* $p < 0,05$, $n=6$ (a) bzw. $n=5$ (b)).

3.3.3 Analyse humaner Monozyten

Auch im Kontrollversuch mit Primärzellen (humane Monozyten) resultierte die S1P-Stimulation für 16 Stunden in einer Induktion des PAR-1- und PAR-4-Proteins (s. Abb. 3.10). Die Induktion des PAR-1- und PAR-4-Proteins in humanen Monozyten nach 16 Stunden Inkubation (PAR-1: 1,9-fach, PAR-4: 1,7-fach) ist mit der in U937 Zellen zum gleichen Zeitpunkt (PAR-1: 2,2-fach, PAR-4: 1,7-fach) (s. Abb. 3.9) vergleichbar.

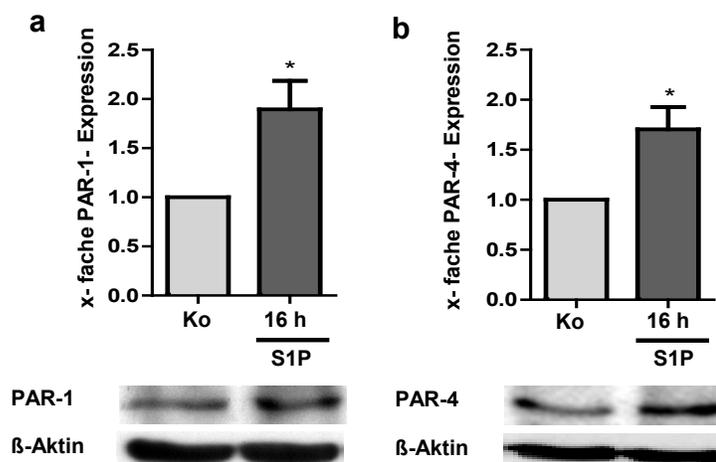


Abb. 3.10 Induktion des PAR-1-(a) und PAR-4-Proteins (b) durch S1P in humanen Monozyten

Humane Monozyten wurden 16 Stunden mit S1P in einer Konzentration von 1 μ M inkubiert (* $p < 0,05$, $n = 6$ (a) bzw. $n = 5$ (b)).

3.4 S1P induziert selektiv die PAR-4-Oberflächenexpression

Der Einfluss von S1P auf die Oberflächenexpression von PAR-1 und PAR-4 wurde mittels Durchflusszytometrie in U937 Zellen und humanen Monozyten bestimmt.

3.4.1 Konzentrations-Wirkungsbeziehung

Wie schon bei der Gesamtproteinanalyse mittels Western-Blot, wurden U937 Zellen für 16 Stunden mit S1P-Konzentrationen zwischen 0,1 μ M bis 10 μ M inkubiert. Jeweils ein repräsentatives Originalhistogramm mit der dazugehörigen quantitativen Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Es zeigte sich, dass S1P keinen signifikanten Einfluss auf die PAR-1-Oberflächenexpression hatte (s. Abb. 3.11 a). Im Originalhistogramm (s. Abb. 3.11 c) ist dies anhand des deckungsgleichen Verlaufs der Kontrolle (rot) und der S1P stimulierten Probe (grün) sichtbar. Im Gegensatz dazu führt die S1P-Stimulation zu einer signifikanten Aufregulation des PAR-4-Oberflächenproteins (1,8-fach) (s. Abb. 3.11 b). Die Rechtsverschiebung der S1P stimulierten Probe (grün) auf der X-Achse im Vergleich zur Kontrolle (rot) entspricht

hierbei der vermehrten Menge an PAR-4 auf der Zelloberfläche der U937 Zellen (s. Abb. 3.11 d).

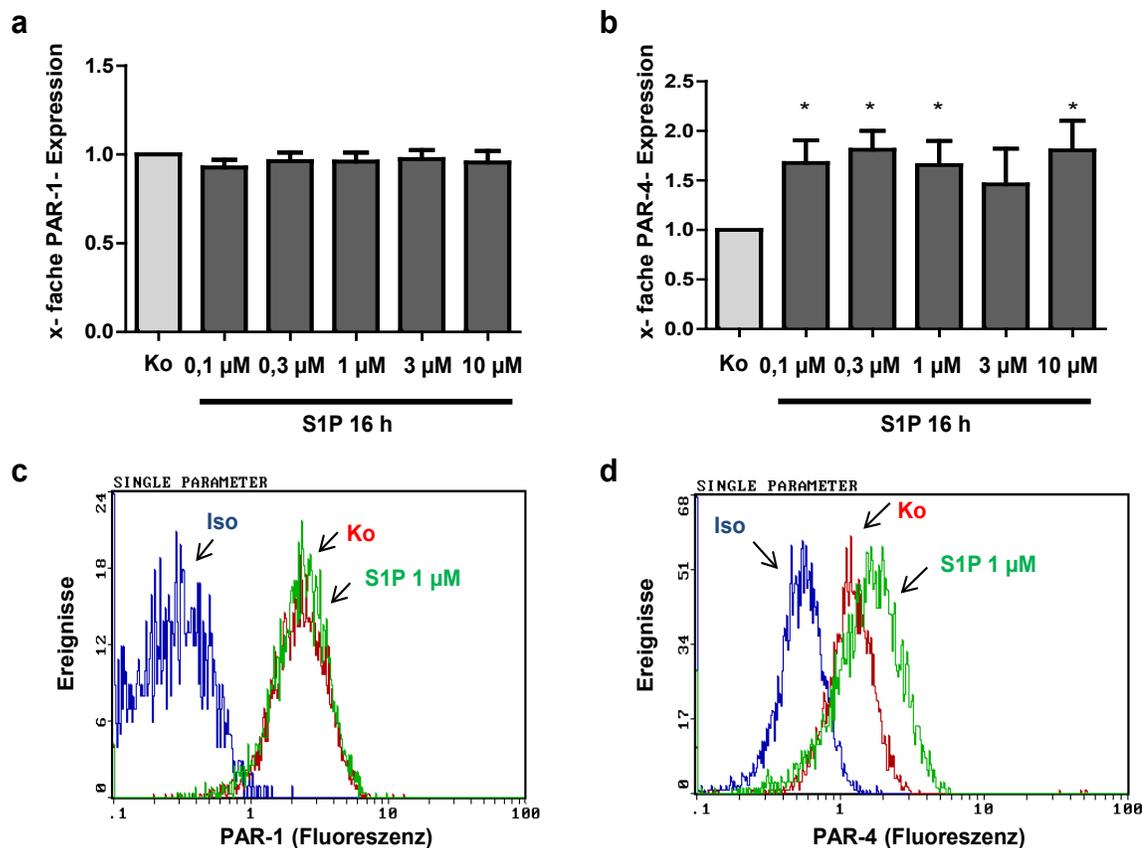


Abb. 3.11 Konzentrations-Wirkungsbeziehung von S1P auf die PAR-1-(a und c) und PAR-4-Oberflächenexpression (b und d)

U937 Zellen wurden 16 Stunden mit S1P-Konzentrationen zwischen 0,1 μM und 10 μM inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. **(a)** stellt die quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen von PAR-1 und **(b)** von PAR-4 dar (* $p < 0,05$, $n = 4$ (a) bzw. $n = 3$ (b)). **(c)** zeigt ein repräsentatives Originalhistogramm der Analyse von PAR-1 und **(d)** von PAR-4. Isotyp=blau, Kontrolle=rot, PAR-1 bzw. PAR-4 nach S1P-Stimulation (1 μM)=grün.

3.4.2 Kinetik

Im Folgenden wurde die Kinetik der S1P Wirkung auf die PAR-1- und PAR-4-Oberflächenexpression untersucht. In Abbildung 3.12 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse dargestellt. So konnte wie zuvor auch in der

Konzentrations-Wirkungsbeziehungsanalyse kein signifikanter Effekt von S1P auf die Oberflächenexpression von PAR-1 nachgewiesen werden. Im Originalhistogramm (s. Abb. 3.12 c) zeigt sich eine Deckungsgleichheit der Kontrolle und der S1P stimulierten Probe. Im Gegensatz dazu induziert S1P eine signifikante Zunahme des PAR-4-Oberflächenproteins (maximal 1,6-fach) nach 16 und 24 Stunden (s. Abb. 3.12 b). Dieses Ergebnis spiegelt sich in der Rechtsverschiebung der S1P-stimulierten Probe (grün) auf der X-Achse gegenüber der Kontrolle (rot) wieder. Die Rechtsverschiebung entspricht dabei der erhöhten Menge an PAR-4-Oberflächenprotein (s. Abb. 3.12 d).

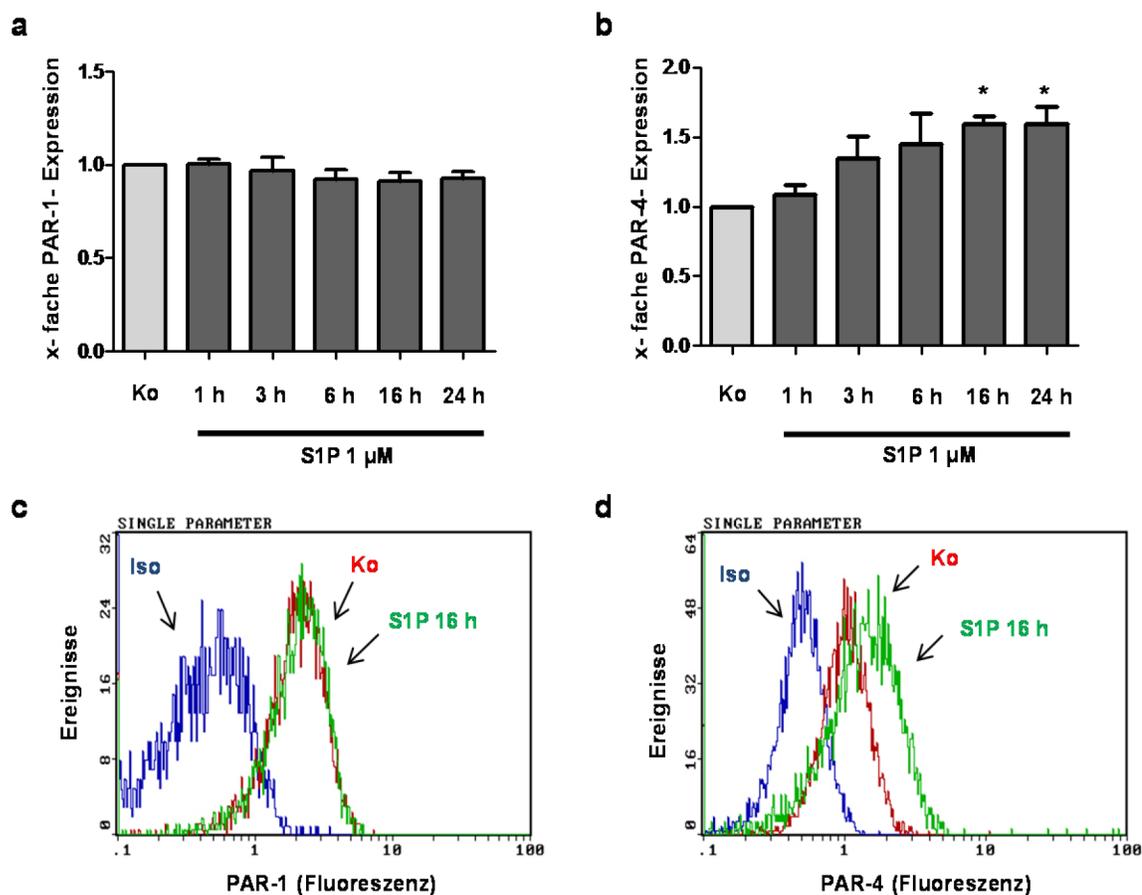


Abb. 3.12 Kinetik der S1P Wirkung auf die PAR-1 (a und b) und PAR-4 Oberflächenexpression (c und d)

U937 Zellen wurden mit einer S1P-Konzentration von 1 μM für einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert und die Oberflächenexpression von PAR-1 und PAR-4 zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. **(a)** stellt die quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Kinetikanalysen von PAR-1 und **(b)** von PAR-4 dar (* $p < 0,05$, $n = 5$ (a) bzw. $n = 4$ (b)). **(c)** zeigt ein repräsentatives Originalhistogramm der Kinetikanalyse von PAR-1 und **(d)** von PAR-4. Isotyp=blau, Kontrolle=rot, PAR-1 bzw. PAR-4 nach S1P-Stimulation (16 Stunden)=grün.

3.4.3 Analyse humaner Monozyten

Um die Übertragbarkeit der durchflusszytometrischen Ergebnisse von U937 Zellen auf humane Monozyten zu gewährleisten, wurden diese ebenfalls analysiert. Bei den Versuchen wurden eine S1P-Konzentration von 1 μM und eine Stimulationszeit von 16 Stunden ausgewählt, da diese Kombination in U937 Zellen zu einem signifikanten Effekt führte. Abbildung 3.13 zeigt die Ergebnisse der Analyse humaner Monozyten dargestellt.

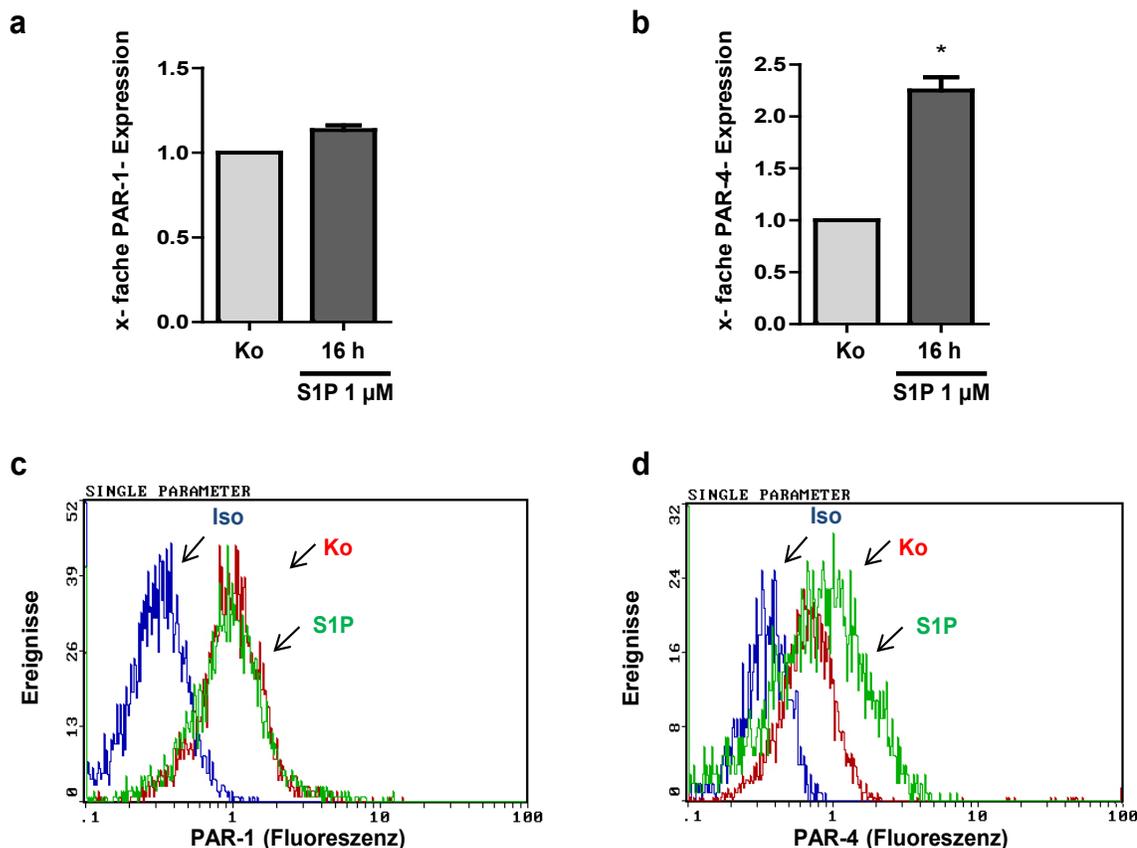


Abb. 3.13 S1P induziert selektiv die PAR-4 Oberflächenexpression in humanen Monozyten

Humane Monozyten wurden für einen Zeitraum von 16 Stunden mit einer S1P Konzentration von 1 μ M inkubiert und die Oberflächenexpression von PAR-1 und PAR-4 bestimmt. **(a)** stellt die quantitative Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen von PAR-1 und **(b)** von PAR-4 dar (* $p < 0,05$, jeweils $n=3$). **(c)** zeigt ein repräsentatives Originalhistogramm der Analyse von PAR-1 und **(d)** von PAR-4 in humanen Monozyten. Isotyp=blau, Kontrolle=rot, PAR-1 bzw.

Wie schon zuvor in U937 Zellen beobachtet, hat S1P ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die PAR-1-Oberflächenexpression in humanen Monozyten. Zugleich kann aber der in U937 Zellen beschriebene S1P-Effekt auf die PAR-4-Oberflächenexpression auch in humanen Monozyten nachgewiesen werden. So führt S1P auch in humanen Monozyten eine PAR-4 Induktion (2,2-fach) (s. Abb. 3.13).

3.5 Funktionelle Konsequenzen der PAR-1- und PAR-4-Induktion durch S1P

Nachdem der Einfluss von S1P auf die Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4 untersucht wurde, sollten nun die daraus entstehenden, möglichen funktionellen Konsequenzen untersucht werden. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Migration der U937 Zellen und humanen Monozyten gelegt.

3.5.1 Chemotaktische Thrombinwirkung wird durch S1P verstärkt

In der Literatur gibt es Hinweise, dass Thrombin einen positiven chemotaktischen Effekt auf humane Monozyten besitzt (Bar-Shavit et al. 1983). In der vorliegenden Studie konnte dieser chemotaktische Effekt in unbehandelten Zellen nicht beobachtet werden (s. Abb. 3.14). Nach vorheriger Stimulation der Zellen mit 1 μ M S1P für 16 Stunden migrierten jedoch signifikant mehr Zellen in Richtung Thrombin (3 U/ml). (s. Abb. 3.14.). Dies galt sowohl für U937 Zellen als auch für humane Monozyten. Es migrierten ca. 50 % mehr U937 Zellen und ca. 40 % mehr humane Monozyten nach vorheriger S1P-Stimulation in Richtung Thrombin verglichen zur Kontrollgruppe (s. Abb. 3.14).

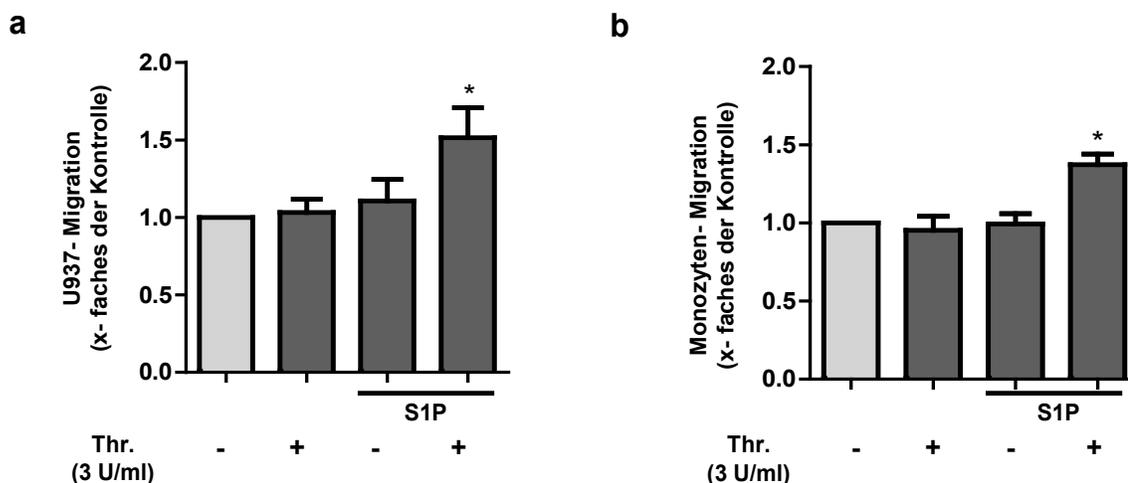


Abb. 3.14 Chemotaktische Thrombinwirkung auf U937 Zellen und humane Monozyten

Die chemotaktische Wirkung von Thrombin (3 U/ml) wurden mit Hilfe eines modifizierten Boyden Chemotaxis Assays gemessen (vgl. 2.12). **(a)** Chemotaktisches Verhalten von U937 Zellen nach Vorbehandlung +/- 1 μ M S1P für 16 Stunden gegenüber Thrombin (* $p < 0,05$, $n = 6$). **(b)** Chemotaktisches Verhalten von humanen Monozyten nach Vorbehandlung +/- 1 μ M S1P für 16 Stunden gegenüber Thrombin (* $p < 0,05$, $n = 5$).

3.5.2 Verstärkte chemotaktische Thrombinwirkung wird selektiv PAR-4 vermittelt

Es stellte sich die Frage, über welche Thrombinrezeptoren die verstärkte chemotaktische Thrombinwirkung nach S1P-Stimulation vermittelt wurde. Hierfür wurden humane Monozyten mit 1 μM S1P für 16 Stunden stimuliert und anschließend das chemotaktische Verhalten gegenüber spezifischen PAR-AP für PAR-1 (SFLLRN-Amid) (200 μM) und PAR-4 (AYPGQV-Amid) (200 μM) mit Hilfe eines modifizierten Boyden Chemotaxis Assays gemessen. In Abbildung 3.15 ist dargestellt, dass die verstärkte chemotaktische Wirkung von Thrombin nach vorheriger S1P-Stimulation allein auf der Aufregulation von PAR-4 durch S1P beruht. So zeigten die PAR-AP in unbehandelten Kontrollzellen keinen Effekt. Erst nach Stimulation mit 1 μM S1P zeigte sich eine verstärkte Migration humaner Monozyten gegenüber dem PAR-4-AP (1,5-fach). Ebenso löste die Kombination von PAR-1- und PAR-4-AP nach S1P-Stimulation eine verstärkte Migration auf ähnlichem Niveau aus (1,6-fach).

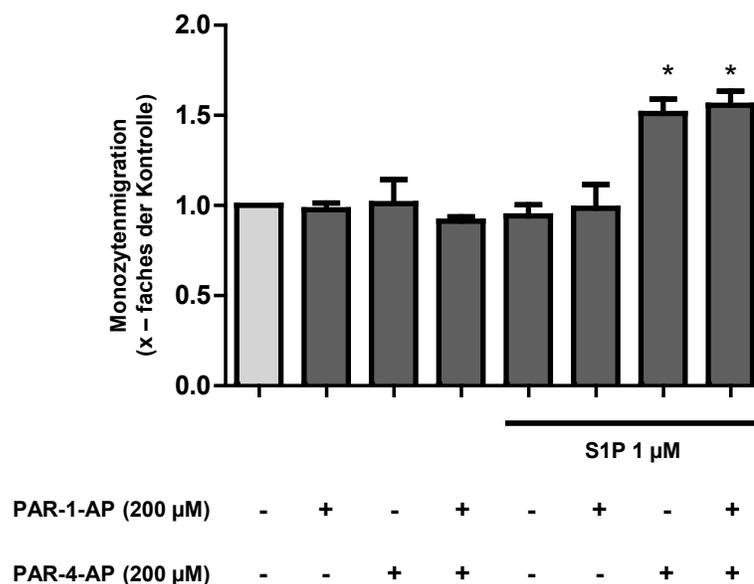


Abb. 3.15 Verstärkte chemotaktische Thrombinwirkung wird selektiv PAR-4 vermittelt

Die chemotaktische Wirkung von spezifischen PAR-AP wurden mit Hilfe eines modifizierten Boyden Chemotaxis Assays gemessen. Hierfür wurde das chemotaktische Verhalten humaner Monozyten nach Vorbehandlung +/- 1 µM S1P für 16 Stunden gegenüber dem PAR-1-AP (200 µM), dem PAR-4-AP (200 µM) und die Kombination beider (jeweils 200 µM) analysiert. (* $p < 0,05$, $n=5$).

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

U937 Zellen und humane Monozyten exprimieren beide die Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4 sowohl auf mRNA-, Protein- und Zelloberflächenebene. Das mRNA-Expressionslevel von PAR-4 beträgt jedoch nur 2 % im Vergleich zu dem von PAR-1. Die Isolationsart (positiv vs. negativ Isolation) von humanen Monozyten aus Vollblut hat dabei keinen Einfluss auf die Expression des PAR-4. Sowohl nach Positiv- als auch nach Negativ-Isolation lässt sich PAR-4-mRNA in humanen Monozyten nachweisen.

S1P (1 μ M) induziert signifikant die Expression von PAR-1- und PAR-4-mRNA in U937 Zellen und humanen Monozyten. Neben der gesteigerten mRNA-Expression konnte auch eine signifikante Induktion auf Proteinebene nachgewiesen werden. Bei der Analyse der Oberflächenexpression nach S1P-Stimulation konnte jedoch nur eine signifikante Aufregulation der PAR-4-Oberflächenexpression nachgewiesen werden. S1P zeigte keinen Effekt auf die PAR-1-Oberflächenexpression.

Die S1P induzierte PAR-Induktion resultierte in einer verstärkten Migration in Richtung Thrombin (3 U/ml), welche auf eine selektive PAR-4-Aktivierung zurückzuführen war.

4. Diskussion

Der Schlüsselbefund der hier vorliegenden Arbeit ist der Nachweis eines funktionell aktivem PAR-4 auf Transkript-, Protein- und Zelloberflächenebene in humanen Monozyten und U937 Zellen. Die Stimulation der Zellen mit S1P führt zu einer PAR-4-Induktion, welche in einer verstärkten chemotaktischen Thrombinwirkung resultiert. Der ebenfalls durch S1P verstärkt exprimierte PAR-1 hat keinen Einfluss auf die gesteigerte Monozytenmigration.

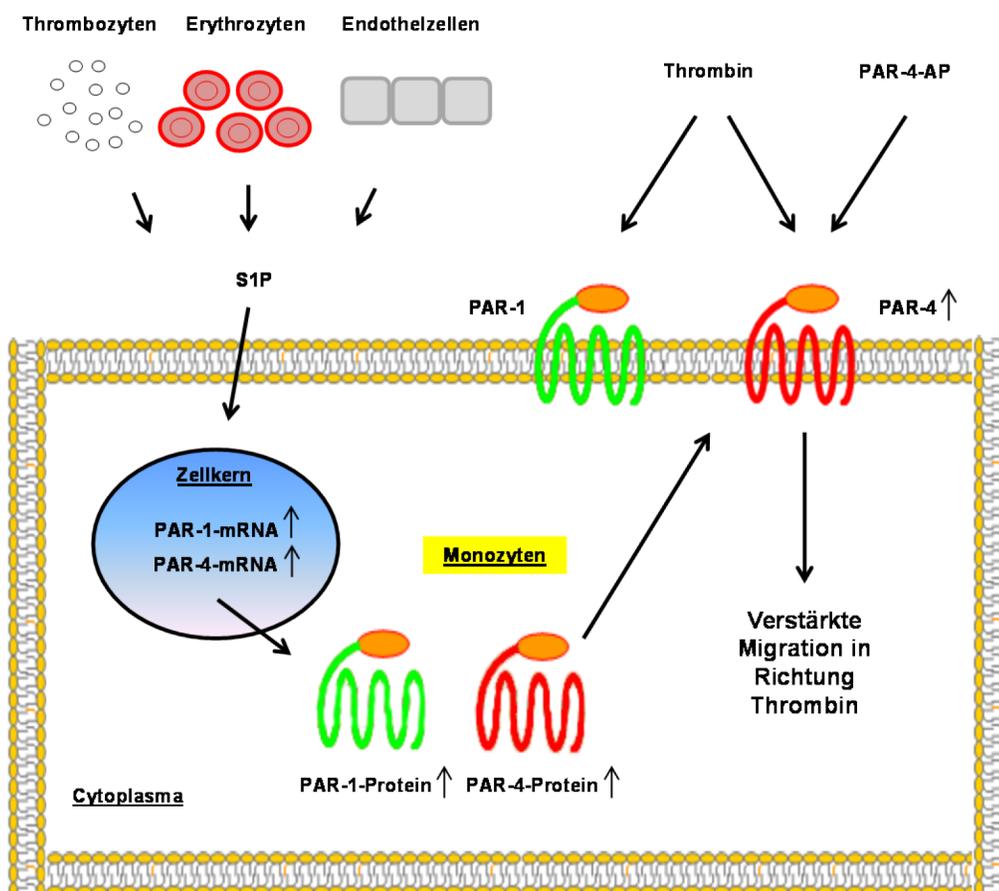


Abb. 4.1 Zusammenfassung des Schlüsselbefundes

Durch das von Thrombozyten, Erythrozyten und Endothelzellen sezernierte S1P kommt es zu einer Induktion von PAR-1- und PAR-4-mRNA sowie beider Proteine. Lediglich der PAR-4 ist vermehrt an der Zelloberfläche nachweisbar. Die verstärkte chemotaktische Wirkung von Thrombin wird selektiv durch Aktivierung des PAR-4 vermittelt, was durch den Einsatz von PAR-4-AP nachweisbar ist.

4.1 U937 Zellen und humane Monozyten exprimieren PAR-1 und PAR-4

In der Literatur gibt es widersprüchliche Berichte bezüglich der Expression der PAR in monozytären Zellen. Die Existenz eines funktionell aktivem PAR-1 in monozytären Zellen wurde schon mehrfach durch Untersuchungen in der Vergangenheit nachgewiesen (Joseph and MacDermot 1993; Colognato et al. 2003; Li et al. 2006; Lopez-Pedraera et al. 2010). Die Expression des PAR-1 ist sowohl für U937 Zellen (Joseph and MacDermot 1993) als auch für humane Monozyten (Colognato et al. 2003; Li et al. 2006; Lopez-Pedraera et al. 2010) belegt. Die Frage nach der Expression von PAR-4 in monozytären Zellen hingegen ist nicht ausreichend beantwortet, da die bisher durchgeführten Untersuchungen widersprüchliche Ergebnisse lieferten. In den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Colognato konnte keine PAR-4-mRNA in humanen Monozyten nachgewiesen werden (Colognato et al. 2003). Ebenso konnte die Arbeitsgruppe um López-Pedraera keine PAR-4-mRNA in Monozyten von Patienten mit einem Antiphospholipid-Syndrom detektieren (Lopez-Pedraera et al. 2010). Hingegen konnte in der Arbeit von Li das Vorkommen von PAR-4 an der Zelloberfläche von humanen Monozyten mittels durchflusszytometrischer Analyse belegt werden. Die hier vorliegende Arbeit konnte ergänzend zu den Untersuchungen von Li die Existenz von PAR-4 auf Transkript-, Protein- sowie Zelloberflächenebene in humanen Monozyten und U937 Zellen nachweisen. Es stellt sich daher die Frage nach möglichen Erklärungen für die unterschiedlichen Ergebnisse. Bei genauem Studium der vorhandenen Untersuchungen zur Existenz des PAR-4 fallen methodische Unterschiede auf. So wurde die Expressionsanalyse der PAR-mRNA in der hier vorliegenden Arbeit mittels qPCR durchgeführt. Im Gegensatz dazu untersuchte die Arbeitsgruppe um Colognato die PAR-Transkriptexpression mittels der weniger sensitiven semiquantitativen RT-PCR (Colognato et al. 2003). Wie in Abbildung 3.2 beschrieben, liegt das Expressionslevel des PAR-4-Transkripts nur bei 2 % des PAR-1-Levels. Es besteht daher die Möglichkeit, dass das PAR-4-Transkript einem Nachweis mittels semiquantitativer RT-PCR entgehen könnte. Unterstützend für diese These spricht, dass in der Arbeit von Li trotz PAR-4- Nachweis mittels Durchflusszytometrie kein PAR-4-Transkript mittels semiquantitativer RT-PCR gefunden werden konnte. Dies wurde in dem Bericht von Li auf technische Probleme bei der Durchführung der semiquantitativen RT-PCR zurückgeführt. Ein weiterer Unterschied zwischen den bisher vorhandenen Untersuchungen liegt in der Auswahl der Zellen. So

wurden in der Untersuchung von Colognato nach der Monozytenisolation aus humanem Blut lediglich die in der Zellkultur adhärenen Monozyten verwendet. Die nicht-adhärenen Monozyten wurden verworfen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden dahingegen alle isolierten Monozyten zur Analyse verwendet. In dem Bericht von López-Pedrera gibt es keine Auskunft über die Vorgehensweise zwischen der Isolation der Monozyten und der qPCR. In verschiedenen Untersuchungen von humanen Monozyten konnte belegt werden, dass die Kultivierung der Monozyten nach deren Isolation sowie die Auswahl der Monozyten nach Adhärenz Einflüsse auf die monozytären Zellfunktionen haben können (Bennett and Breit 1994). Es ist daher wichtig, die Auswahl der untersuchten Monozyten (adhärent, nicht-adhärent oder beides) bei der Betrachtung der Ergebnisse bezüglich der PAR-4-Expression zu beachten. Ein weiterer Faktor, welcher die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der PAR-4-Expression beeinflussen könnte, ist die Isolationsart der Monozyten. Dies wird am Beispiel des PAR-2 deutlich. In der Literatur liegen ebenfalls widersprüchliche Untersuchungsbefunde in Bezug auf die PAR-2-Expression auf Monozyten vor. So konnte der PAR-2, ein FXa-Rezeptor, in monozytären Zellen von der Arbeitsgruppe um Colognato detektiert werden (Colognato et al. 2003; Johansson et al. 2005). Der Gruppe um Johansson hingegen gelang kein PAR-2-Nachweis (Johansson et al. 2005). Diese unterschiedlichen Befunde bezüglich des PAR-2 sind möglicherweise auf die verschiedenen Isolationsarten von humanen Monozyten in den Untersuchungen zurückzuführen (Shpacovitch et al. 2008). In der hier vorliegenden Arbeit sowie in dem Bericht von López-Pedrera wurden die Monozyten mittels Negativ-Isolierung gewonnen. Dafür werden alle nicht-monozytären Zellen mittels geeigneter AK aus der Probe entfernt, so dass nur Monozyten übrig bleiben. Im Gegensatz dazu isolierten die Gruppen von Li und Colognato die Monozyten durch Positiv-Isolierung. Bei dieser Positiv-Isolierung binden CD-14-AK an Monozyten, um diese für magnetische Beads zu markieren. Bei der Negativ-Isolierung hingegen bleiben die Monozyten unberührt. Die Markierung der Monozyten mit CD-14-AK könnte zu deren Aktivierung geführt und die nachfolgenden Experimente beeinflusst haben. In der hier vorliegenden Arbeit wurden sowohl die Positiv- wie auch die Negativ-Isolierung exemplarisch durchgeführt und anschließend das PAR-4-Transskript gemessen. Dabei hatte die Isolationsart keine Auswirkung auf die PAR-4-Expression. Ebenso war die 24-stündige Kultivierung der humanen Monozyten in der Zellkultur nicht relevant für die gemessene PAR-4-Expression (s. Abb. 3.7). Aufgrund der hier aufgeführten methodischen Unterschiede zwischen den bisherigen Untersuchungen

des PAR-4 wäre eine genaue, durchflusszytometrische Charakterisierung der untersuchten Monozyten mittels Analyse der Oberflächenantigene CD-14 und CD-16 wünschenswert. Dadurch wäre eine Einteilung der Monozyten in die 2010 vorgeschlagenen Nomenklatur der Monozyten anhand ihrer Oberflächenantigene CD-14 und CD-16 in 3 Subgruppen (klassische, intermediäre und nicht-klassische Monozyten) möglich (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Dies würde eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleisten.

4.2 Regulation von PAR-1 und PAR-4 durch S1P

In den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte keine Induktion des PAR-1 und PAR-4 durch S1P in vaskulären glatten Muskelzellen (SMC) nachgewiesen werden (Ermler 2011). In der hier vorliegenden Arbeit sollte ein möglicher Einfluss von S1P auf den PAR-1 und PAR-4 geklärt werden. Wie im Kapitel 3.2 und 3.3 dargestellt, konnte eine Induktion der PAR-1- und PAR-4-mRNA sowie beider Proteine durch S1P nachgewiesen werden. Dabei konnte bei der Untersuchung von U937 Zellen eine 2,4-fache Induktion des PAR-1-Transkripts nach 16 Stunden gemessen werden (s. Abb. 3.5 a). Die maximale Induktion des PAR-4-Transkripts (2,1-fach) konnte nach 6 Stunden detektiert werden (s. Abb. 3.5 b). Die Analyse von humanen Monozyten zeigte vergleichbare Ergebnisse (s. Abb. 3.6). Die Western-Blot Untersuchungen zeigten eine 2,6-fache Induktion des PAR-1-Proteins nach 24 Stunden sowie eine 1,6-fache Induktion des PAR-4-Proteins nach 6 Stunden (s. Abb. 3.9). Bei der Analyse der Oberflächenexpression von PAR-1 und PAR-4 nach S1P-Stimulation konnte lediglich ein induktiver Effekt auf PAR-4 gezeigt werden (s. Abb. 3.11 und 3.12). Es stellt sich daher die Frage, warum es durch S1P zu einer Induktion von PAR-1-mRNA und PAR-1-Protein kommt, das Protein aber nicht an der Zelloberfläche zu detektieren ist. Neben methodischen Fehlern, könnte ein bisher unbekannter Einfluss von S1P auf den PAR-1-Metabolismus die Ursache hierfür sein. So wäre eine Störung des Gleichgewichtes von Rezeptorinternalisierung und Rücktransport aus dem Zytosol denkbar. Der PAR-1 liegt in seiner inaktivierten Form in einem zytoplasmatischen Pool vor, welcher den Rezeptor vor proteolytischer Spaltung schützt und so den Abbau verhindert (Soh et al. 2010). An diesem Punkt könnte S1P für einen verfrühten Abbau von PAR-1 verantwortlich sein. Dadurch wäre der Transport des Rezeptors an die Zelloberfläche gestört. Des Weiteren wäre auch ein bisher unbekannter,

den Transport des PAR-1 an die Zelloberfläche betreffenden, Stimulus denkbar. Dieser Stimulus könnte ebenfalls durch S1P beeinflusst werden, wodurch zwar vermehrt PAR-1-Protein produziert, dieses jedoch nicht an die Zelloberfläche transportiert werden würde. Schlussendlich kann über die Gründe für die fehlende Induktion der PAR-1-Oberflächenexpression bei vermehrter PAR-1-Proteinexpression nur spekuliert werden. In der Literatur sind keine Anhaltspunkte hinsichtlich dieser Fragestellung zu finden. Daher muss dieses Ergebnis vorerst hingenommen werden und in folgenden Untersuchungen bestätigt bzw. widerlegt werden.

4.3 Verstärkte Migration wird selektiv PAR-4 vermittelt

Die Migration von Monozyten spielt, wie eingangs erwähnt, eine zentrale Rolle im Pathogenesemodell der Atherosklerose. In der Zielsetzung dieser Arbeit wurde die Migration als zu untersuchende, funktionelle Konsequenz eines möglichen Einflusses von S1P auf die Thrombinrezeptoren definiert. Nach dem Nachweis einer Induktion des PAR-1 und PAR-4 wurde die Wirkung von Thrombin als chemotaktischer Stimulus untersucht. In Kapitel 3.5 konnte eine verstärkte chemotaktische Wirkung von Thrombin auf Monozyten nach S1P-Stimulation nachgewiesen werden. So verstärkte sich die chemotaktische Wirkung auf U937 Zellen und humane Monozyten um den Faktor 1,6 (s. Abb. 3.14). Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob die verstärkte chemotaktische Wirkung von Thrombin spezifisch über einen der PAR vermittelt wird. Durch den Einsatz von AP war der Nachweis einer selektiv PAR-4 vermittelten verstärkten Migration in Richtung Thrombin möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde für PAR-1 (SFLLRN-Amid) und PAR-4 (AYPGQV-Amid) ein jeweils spezifisches AP verwendet. In der Literatur wird die Aktivität des PAR-1 AP SFLLRN-Amid mit 120 % im Vergleich zu humanem α -Thrombin angegeben (Faruqi et al. 2000). Die Aktivität des PAR-4-AP AYPGQV-Amid liegt bei ca. 92 % (Faruqi et al. 2000). Im Rahmen der Diskussion um die Existenz des PAR-4 auf Monozyten sind die AP ebenfalls ein diskussionswürdig. So wurde in den Untersuchungen von Colognato der Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} untersucht, um den Nachweis eines funktionell aktiven PAR-4 zu stellen. Die Untersuchung zeigte einen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} nach Stimulation der Monozyten mit dem PAR-4-AP GYPGQV-Amid. Dieses verwendete PAR-4-AP besitzt laut Literatur jedoch nur eine Aktivität von ca. 55 % vergleichend zu Thrombin (Faruqi et al. 2000; Colognato et al. 2003). Andererseits konnte

in den Untersuchungen von Li mit eben diesem AP (GYPGQV-Amid) eine verstärkte IL-6-Sekretion von Monozyten nachgewiesen werden. Es ist also nicht eindeutig geklärt, ob durch einen ausbleibenden Effekt bei Einsatz des AP GYPGQV-Amid auf ein Fehlen des PAR-4 geschlossen werden darf. Ein anderer interessanter Aspekt ist, dass in der vorliegenden Arbeit Monozyten im nicht stimulierten Zustand nicht auf Aktivierung durch das PAR-4-AP reagieren (s. Abb. 3.15). Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf das im nicht stimulierten Zustand sehr niedrige Expressionsniveau des PAR-4 zurückzuführen. So beträgt das Expressionsniveau des PAR-4 wie oben beschrieben nur ca. 2 % im Vergleich zum Expressionsniveau des PAR-1 (s. Abb. 3.2). Erst nach Stimulation der Monozyten mit 1 μM S1P ist eine verstärkte chemotaktische Wirkung von Thrombin und dem PAR-4-AP nachweisbar (s. Abb. 3.15). Es kann daher anschließend an die S1P-Stimulation von einem funktionell aktiven PAR-4 ausgegangen werden.

4.4 Konsequenzen für die Atherogenese

In zahlreichen Studien konnte eine wichtige Bedeutung von S1P für die Atherosklerose nachgewiesen werden. So konnte dem S1P-Analagon FTY720 in zwei von drei Studien in Mäusen eine abmildernde Wirkung bezüglich der Entstehung von Atherosklerose zugeschrieben werden (Keul et al. 2007; Klingenberg et al. 2007; Nofer et al. 2007). Das S1P-Analagon FTY720 wirkt als funktioneller Antagonist über eine vermehrte Internalisierung von S1P-Rezeptoren (Graler and Goetzl 2004). In den Untersuchungen führte der Einsatz von FTY720 zu einer verminderten Migration von Monozyten in den Bereich einer atherosklerösen Läsion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es bei S1P₃-Rezeptor Knockout-Mäusen zu einer verminderten Migration von Monozyten in den Bereich einer Entzündung bzw. einer atherosklerotischen Läsion kommt (Keul et al. 2011). Durch diese Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass S1P und speziell der S1P₃-Rezeptor eine wichtige Funktion im Rahmen der Atherogenese bezüglich der Monozytenmigration haben. Die hier vorliegende Arbeit unterstützt diese Ergebnisse, indem ein zusätzlicher indirekter Einfluss von S1P auf die Monozytenmigration über den PAR-4 und Thrombin dargestellt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde S1P in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt. Sie liegt damit im Durchschnittsbereich der physiologischen S1P-Serumkonzentrationen. Diese wird für S1P in der Literatur mit 484 pmol/ml – 630 pmol/ml (entspricht 0,5 – 0,6 μM) angegeben,

kann aber Konzentrationen bis 1500 pmol/ml (entspricht ca. 1,5 μM) erreichen (Yatomi et al. 1997; Deutschman et al. 2003). In einer Studie konnte eine erhöhte S1P-Serumkonzentration mit dem Auftreten und dem Schweregrad einer KHK positiv korreliert werden (Deutschman et al. 2003). Dabei lag die Durchschnittskonzentration von S1P in der Patientengruppe mit schwerer KHK bei ca. 1200 pmol/ml (entspricht 1,2 μM). In unserer Untersuchung kam es durch Einwirkung von 1 μM S1P über 6 Stunden zu einer Induktion von PAR-4. Diese PAR-4-Induktion konnte in anschließend durchgeführten Migrationsassays als Ursache für eine verstärkte chemotaktische Wirkung von Thrombin ausgemacht werden. Die chemotaktische Wirkung von Thrombin auf Monozyten erhöhte sich auf 150 % des Ausgangswertes nach S1P-Stimulation (s. Abb. 3.15). Über diesen Mechanismus ist S1P neben seiner direkten chemotaktischen Wirkung auch in der Lage auf einem indirekten Weg verstärkt Monozyten in atherosklerotische Läsionen zu rekrutieren.

Neben S1P spielt auch Thrombin eine zentrale Rolle im Rahmen der Atherogenese. So konnte in Tierversuchen durch den Einsatz des direkten Thrombininhibitors Melagatran eine Verminderung von atherosklerösen Läsionen sowie eine Plaquestabilisierung durch eine Dickenzunahme der fibrösen Kappe und eine Verkleinerung des nekrotischen Kerns erreicht werden (Bea et al. 2006). Auch Thrombin ist an der Monozytenrekrutierung in atherosklerotische Läsionen beteiligt. So bewirkt Thrombin eine Aufregulation von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) (Minami et al. 2004) und membrangebundenem CXCL-1 (Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1) (Popovic et al. 2008) in Endothelzellen. Zusätzlich reguliert Thrombin die für die Adhäsion, das Rolling und die Migration nötigen E- und P-Selektine herauf (Kaplanski et al. 1997; Ostrovsky et al. 2000). Durch die vermehrte Expression kommt es zu einer verstärkten Migration von Monozyten (Galkina and Ley 2007; Popovic et al. 2008). Thrombin wirkt auch direkt chemotaktisch auf Monozyten (Bar-Shavit et al. 1983). Die hier vorliegende Arbeit beschreibt ebenfalls eine verstärkte chemotaktische Thrombinwirkung auf Monozyten, welche auf eine Induktion der PAR-4 Expression durch S1P zurückzuführen ist. In der Literatur gibt es jedoch auch Berichte über migrationshemmende Effekte von Thrombin. In einer Studie an genetisch modifizierten Mäusen mit Hyperkoagulabilität führte die Monozytenstimulation mit Thrombin (10 nM) zu einer verminderten transendotheliale Monozytenmigration. Dies wurde auf die Aktivierung von PAR-1 zurückgeführt (Seehaus et al. 2009). Gleichzeitig wurden aber vergrößerte

atherosklerotische Plaques beobachtet, welche jedoch simultan durch eine vermehrte extrazelluläre Matrix stabiler waren. In den Versuchen von Bar-Shavit zur direkten chemotaktischen Thrombinwirkung wurde der größte Effekt mit der gleichen Thrombinkonzentrationen (10 nM) erzielt (Bar-Shavit et al. 1983). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Thrombinkonzentration von 3 U/ml (=30 nM) führte ebenfalls zu einer verstärkten, direkten chemotaktischen Wirkung von Thrombin. Es bleibt zusammenfassend festzuhalten, dass Thrombin in einer Konzentration von 10 – 30 nM sowohl zu einer verminderten transendothelialen Monozytenmigration (Stevens and Lentz 2009), gleichzeitig aber auch, wie in der vorliegenden Arbeit und durch Bar-Shavit gezeigt, eine verstärkte direkte Monozytenmigration bewirken kann (Bar-Shavit et al. 1983). So ist eine weitere Klärung der Wirkung von Thrombin auf die Monozytenmigration wünschenswert, speziell durch weitere *in vivo* Untersuchungen.

4.5 Ausblick

Sowohl S1P als auch Thrombin sind aktuell pharmakologische Zielobjekte. So werden der oral verfügbare S1P Rezeptor Modulator Fingolimod (FTY720) und vier weitere S1P Rezeptor Agonisten (BAF312, ACT 128800, CS-0777, ONO-4641) derzeit in zahlreichen klinischen Studien zur Behandlung der Multiplen Sklerose erprobt (Hohlfeld et al. 2011). In der FREEDOMS-Studie konnte durch Fingolimod eine Verminderung der jährlichen Rezidivrate von bis zu 60 % im Vergleich zu Placebo erreicht werden (Kappos et al. 2010). Ähnliche Ergebnisse konnte die TRANSFORMS-Studie zeigen, welche eine Verminderung der jährlichen Rezidivrate von bis zu 52 % im Vergleich zu intramuskulär appliziertem β -1a-Interferon nachwies (Cohen et al. 2010). Ein Einfluss der aktuell getesteten Substanzen auf mögliche kardiovaskuläre (Neben-) Wirkungen bleibt abzuwarten.

Direkte Thrombininhibitoren befinden sich derzeit in der Entwicklung bzw. werden schon therapeutisch eingesetzt. Der erste direkte orale Thrombininhibitor Ximelagatran musste 2006 aufgrund erhöhter Lebertoxizität vom Markt genommen werden. Aktuell besitzt der direkte Inhibitor Dabigatran eine Zulassung in Deutschland zur Thromboseprophylaxe nach Hüft- und Kniegelenksoperationen. In einer randomisierten Doppelblindstudie zeigte Dabigatran im Vergleich zu Warfarin bei der Behandlung von akut venösen Thrombembolien eine ähnliche Effektivität bei gleichem Nebenwirkungsprofil (Schulman et

al. 2009). Ein wichtiger Vorteil des Dabigatrans liegt jedoch in dem Wegfallen von Laborkontrollen zur Therapieüberwachung. Im Hinblick auf die weitere Entwicklung direkter Thrombininhibitoren ist eine Fortführung der *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen von Thrombin wünschenswert, um weitere Einsatzmöglichkeiten aber auch mögliche Nebenwirkungen der direkten Inhibitoren zu ermitteln.

5. Zusammenfassung

Die Serinprotease Thrombin besitzt neben seiner wichtigen Funktion im Ablauf der Hämostase weitere zelluläre Wirkungen. Beispielsweise im Rahmen von Entzündungen wie der Atherosklerose. Thrombin wirkt über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, den sog. Protease-aktivierten Rezeptoren, von denen insgesamt vier bekannt sind. Das bioaktive Sphingolipid Sphingosin-1-Phosphat wird von Thrombozyten, Erythrozyten sowie Endothelzellen gebildet und spielt in zahlreichen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Thrombinrezeptorausstattung von Monozyten untersucht und einem möglichen Einfluss von S1P hinsichtlich einer Wirkung auf Thrombinrezeptoren in humanen Monozyten bzw. monozytären U937 Zellen nachgegangen. Es wurden mRNA-Analysen durch qPCR, Proteinanalysen durch Western-Blotting und Durchflusszytometrie sowie Chemotaxismessungen mittels einer modifizierter Boydenkammer durchgeführt. Sowohl monozytäre U937-Zellen als auch humane Monozyten exprimieren die Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-4, jedoch enthalten Monozyten nur ca. ein Fünfzigstel PAR-4-mRNA bezogen auf die PAR-1-mRNA. S1P (1 μ M) führte in den Zellen zu einer verstärkten Expression beider Rezeptoren auf mRNA-Ebene mit einem Maximum für den PAR-1 nach 16 h (2,2-fach) und den PAR-4 nach 6 h (2,9-fach). Dabei zeigte die Isolationsmethode (Positiv-vs. Negativ-Isolation) von humanen Monozyten aus Vollblut keinen Einfluss auf die induzierte Expression. Auf Proteinebene zeigten sich ähnliche Befunde nach S1P-Stimulation mit einem Maximum der Proteinexpression für den PAR-1 nach 24 h (2,6-fach) und für den PAR-4 nach 6 h (1,6-fach). Auffällig war, dass es in den durchflusszytometrischen Analysen zu keinem Anstieg von PAR-1 an der Zelloberfläche kam, wohingegen es zu einem erwartungsgemäßen PAR-4-Anstieg an der Zelloberfläche kam. Der Grund für den fehlenden Transport des vermehrt gebildeten PAR-1-Proteins an die Zelloberfläche bleibt unklar und bedarf weiterer Abklärung. Durch die PAR-4-Induktion in Monozyten durch S1P kommt es zu einer verstärkten chemotaktischen Wirkung von Thrombin. So steigt die Migration von S1P vorbehandelten Monozyten um 40 % in Richtung Thrombin (3 U/ml) verglichen zur Kontrollgruppe. Dass dieser Effekt selektiv durch die Aktivierung des PAR-4 ausgelöst wird, konnte durch den Einsatz von spezifischen PAR-aktivierenden Peptiden (AP) nachgewiesen werden. So führte der Einsatz eines hochspezifischen PAR-4-AP

ebenfalls zu einer um 50 % gesteigerten Migration in Richtung des Peptids. Die alleinige Gabe eines spezifischen PAR-1-AP zeigte keinerlei Wirkung auf die Migration von Monozyten. Zusammenfassend resultiert die PAR-Induktion durch S1P in einer verstärkten Migration in Richtung Thrombin (3 U/ml), welche auf eine selektive PAR-4-Aktivierung zurückzuführen ist. Da sowohl S1P als auch Thrombin immer mehr in den Fokus als pharmakologische Targets in der Therapie verschiedenster Erkrankungen (z.B. Multiple Sklerose, Thrombembolien) gelangen, sind weitere Untersuchungen bezüglich der biologischen Funktionen beider Stoffe vonnöten.

6. Literaturverzeichnis

- Ancellin, N., C. Colmont, J. Su, Q. Li, N. Mittereder, S. S. Chae, S. Stefansson, G. Liao and T. Hla (2002). "Extracellular Export of Sphingosine Kinase-1 Enzyme. Sphingosine 1-Phosphate Generation and the Induction of Angiogenic Vascular Maturation." J Biol.Chem. **277**(8): 6667-6675.
- Anliker, B. and J. Chun (2004). "Cell Surface Receptors in Lysophospholipid Signaling." Semin Cell Dev Biol **15**(5): 457-465.
- Bar-Shavit, R., A. Kahn, J. W. Fenton, 2nd and G. D. Wilner (1983). "Chemotactic Response of Monocytes to Thrombin." J Cell Biol **96**(1): 282-285.
- Bar-Shavit, R., A. Kahn, J. W. Fenton and G. D. Wilner (1983). "Chemotactic Response of Monocytes to Thrombin." J Cell Biol. **96**(1): 282-285.
- Bar-Shavit, R., A. Kahn, G. D. Wilner and J. W. Fenton, 2nd (1983). "Monocyte Chemotaxis: Stimulation by Specific Exosite Region in Thrombin." Science **220**(4598): 728-731.
- Bea, F., J. Kreuzer, M. Preusch, S. Schaab, B. Isermann, M. E. Rosenfeld, H. Katus and E. Blessing (2006). "Melagatran Reduces Advanced Atherosclerotic Lesion Size and May Promote Plaque Stability in Apolipoprotein E-Deficient Mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(12): 2787-2792.
- Bennett, S. and S. N. Breit (1994). "Variables in the Isolation and Culture of Human Monocytes That Are of Particular Relevance to Studies of Hiv." J Leukoc Biol **56**(3): 236-240.
- Berdyshev, E. V., I. A. Gorshkova, J. G. Garcia, V. Natarajan and W. C. Hubbard (2005). "Quantitative Analysis of Sphingoid Base-1-Phosphates as Bisacetylated Derivatives by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." Anal Biochem **339**(1): 129-136.
- Borensztajn, K., M. P. Peppelenbosch and C. A. Spek (2008). "Factor Xa: At the Crossroads between Coagulation and Signaling in Physiology and Disease." Trends Mol Med **14**(10): 429-440.

- Braunwald, E. (1997). "Shattuck Lecture--Cardiovascular Medicine at the Turn of the Millennium: Triumphs, Concerns, and Opportunities." N Engl J Med **337**(19): 1360-1369.
- Bugge, T. H., Q. Xiao, K. W. Kombrinck, M. J. Flick, K. Holmback, M. J. Danton, M. C. Colbert, D. P. Witte, K. Fujikawa, E. W. Davie and J. L. Degen (1996). "Fatal Embryonic Bleeding Events in Mice Lacking Tissue Factor, the Cell-Associated Initiator of Blood Coagulation." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6258-6263.
- Caligan, T. B., K. Peters, J. Ou, E. Wang, J. Saba and A. H. Merrill, Jr. (2000). "A High-Performance Liquid Chromatographic Method to Measure Sphingosine 1-Phosphate and Related Compounds from Sphingosine Kinase Assays and Other Biological Samples." Anal Biochem **281**(1): 36-44.
- Chow, A., B. D. Brown and M. Merad (2011). "Studying the Mononuclear Phagocyte System in the Molecular Age." Nat Rev Immunol **11**(11): 788-798.
- Cohen, J. A., F. Barkhof, G. Comi, H. P. Hartung, B. O. Khatir, X. Montalban, J. Pelletier, R. Capra, P. Gallo, G. Izquierdo, K. Tiel-Wilck, A. de Vera, J. Jin, T. Stites, S. Wu, S. Aradhye and L. Kappos (2010). "Oral Fingolimod or Intramuscular Interferon for Relapsing Multiple Sclerosis." N Engl J Med **362**(5): 402-415.
- Colognato, R., J. R. Slupsky, M. Jendrach, L. Burysek, T. Syrovets and T. Simmet (2003). "Differential Expression and Regulation of Protease-Activated Receptors in Human Peripheral Monocytes and Monocyte-Derived Antigen-Presenting Cells." Blood **102**(7): 2645-2652.
- Colotta, F., F. L. Sica, M. Sironi, W. Luini, M. J. Rabinovitch and A. Mantovani (1994). "Expression of Monocyte Chemotactic Protein-1 by Monocytes and Endothelial Cells Exposed to Thrombin." Am J Pathol **144**(5): 975-985.
- Connolly, A. J., H. Ishihara, M. L. Kahn, R. V. Farese, Jr. and S. R. Coughlin (1996). "Role of the Thrombin Receptor in Development and Evidence for a Second Receptor." Nature **381**(6582): 516-519.
- Coughlin, S. R. (1999). "How the Protease Thrombin Talks to Cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 11023-11027.
- Coughlin, S. R. (2000). "Thrombin Signaling and Protease-Activated Receptors." Nature **407**(6801): 258-264.

- Deutschman, D. H., J. S. Carstens, R. L. Klepper, W. S. Smith, M. T. Page, T. R. Young, L. A. Gleason, N. Nakajima and R. A. Sabbadini (2003). "Predicting Obstructive Coronary Artery Disease with Serum Sphingosine-1-Phosphate." Am Heart J **146**(1): 62-68.
- Duong, C. Q., S. M. Bared, A. Abu-Khader, C. Buechler, A. Schmitz and G. Schmitz (2004). "Expression of the Lysophospholipid Receptor Family and Investigation of Lysophospholipid-Mediated Responses in Human Macrophages." Biochim.Biophys.Acta **1682**(1-3): 112-119.
- Ermiler, S. (2011). Thrombin-vermittelte Regulation der Protease-aktivierten Rezeptoren und des Sphingosin-1-Phosphat-Signalsystems Univ. Düsseldorf, Diss.
- Esmon, C. T. (2000). "Introduction: Are Natural Anticoagulants Candidates for Modulating the Inflammatory Response to Endotoxin?" Blood **95**(4): 1113-1116.
- Faruqi, T. R., E. J. Weiss, M. J. Shapiro, W. Huang and S. R. Coughlin (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**(26): 19728-19734.
- Feistritzer, C., R. Lenta and M. Riewald (2005). "Protease-Activated Receptors-1 and -2 Can Mediate Endothelial Barrier Protection: Role in Factor Xa Signaling." J Thromb Haemost **3**(12): 2798-2805.
- Feistritzer, C. and M. Riewald (2005). "Endothelial Barrier Protection by Activated Protein C through Par1-Dependent Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 Crossactivation." Blood **105**(8): 3178-3184.
- Galkina, E. and K. Ley (2007). "Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(11): 2292-2301.
- Geissmann, F., C. Auffray, R. Palframan, C. Wirrig, A. Ciocca, L. Campisi, E. Narni-Mancinelli and G. Lauvau (2008). "Blood Monocytes: Distinct Subsets, How They Relate to Dendritic Cells, and Their Possible Roles in the Regulation of T-Cell Responses." Immunol Cell Biol **86**(5): 398-408.

- Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley (2010). "Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells." Science **327**(5966): 656-661.
- Graler, M. H. and E. J. Goetzl (2004). "The Immunosuppressant Fty720 Down-Regulates Sphingosine 1-Phosphate G-Protein-Coupled Receptors." FASEB J **18**(3): 551-553.
- Gude, D. R., S. E. Alvarez, S. W. Paugh, P. Mitra, J. Yu, R. Griffiths, S. E. Barbour, S. Milstien and S. Spiegel (2008). "Apoptosis Induces Expression of Sphingosine Kinase 1 to Release Sphingosine-1-Phosphate as a "Come-and-Get-Me" Signal." FASEB J **22**(8): 2629-2638.
- Hanel, P., P. Andreani and M. H. Graler (2007). "Erythrocytes Store and Release Sphingosine 1-Phosphate in Blood." FASEB J **21**(4): 1202-1209.
- Hoffman, M. and F. C. Church (1993). "Response of Blood Leukocytes to Thrombin Receptor Peptides." J Leukoc Biol **54**(2): 145-151.
- Hoffman, M. and D. M. Monroe, 3rd (2001). "A Cell-Based Model of Hemostasis." Thromb Haemost **85**(6): 958-965.
- Hohlfeld, R., F. Barkhof and C. Polman (2011). "Future Clinical Challenges in Multiple Sclerosis: Relevance to Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulator Therapy." Neurology **76**(8 Suppl 3): S28-37.
- Jenkins, A. L., G. L. Howells, E. Scott, B. F. Le Bonniec, M. A. Curtis and S. R. Stone (1995). "The Response to Thrombin of Human Neutrophils: Evidence for Two Novel Receptors." J Cell Sci **108** (Pt 9): 3059-3066.
- Johansson, U., C. Lawson, M. Dabare, C. Syndercombe, A. C. Newland, G. L. Howells and M. G. Macey (2005). "Human Peripheral Blood Monocytes Express Protease Receptor-2 and Respond to Receptor Activation by Production of Il-6, Il-8, and Il-1{Beta}." J Leukoc.Biol. **78**(4): 967-975.
- Joseph, S. and J. MacDermot (1993). "The N-Terminal Thrombin Receptor Fragment Sflrn, but Not Catalytically Inactive Thrombin-Derived Agonists, Activate U937 Human Monocytic Cells: Evidence for Receptor Hydrolysis in Thrombin-Dependent Signalling." Biochem J **290** (Pt 2): 571-577.

- Kaplanski, G., M. Fabrigoule, V. Boulay, C. A. Dinarello, P. Bongrand, S. Kaplanski and C. Farnarier (1997). "Thrombin Induces Endothelial Type II Activation in Vitro: II-1 and Tnf-Alpha-Independent II-8 Secretion and E-Selectin Expression." J Immunol **158**(11): 5435-5441.
- Kappos, L., E. W. Radue, P. O'Connor, C. Polman, R. Hohlfeld, P. Calabresi, K. Selmaj, C. Agoropoulou, M. Leyk, L. Zhang-Auberson and P. Burtin (2010). "A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis." N Engl J Med **362**(5): 387-401.
- Kelm, M. and B. E. Strauer (1999). "[Endothelial Dysfunction. Therapeutic and Prognostic Issues]." Internist (Berl) **40**(12): 1300-1307.
- Keul, P., S. Lucke, K. von Wnuck Lipinski, C. Bode, M. Graler, G. Heusch and B. Levkau (2011). "Sphingosine-1-Phosphate Receptor 3 Promotes Recruitment of Monocyte/Macrophages in Inflammation and Atherosclerosis." Circ Res **108**(3): 314-323.
- Keul, P., K. Sattler and B. Levkau (2007). "Hdl and Its Sphingosine-1-Phosphate Content in Cardioprotection." Heart Fail Rev **12**(3-4): 301-306.
- Klingenberg, R., J. R. Nofer, M. Rudling, F. Bea, E. Blessing, M. Preusch, H. J. Grone, H. A. Katus, G. K. Hansson and T. J. Dengler (2007). "Sphingosine-1-Phosphate Analogue Fty720 Causes Lymphocyte Redistribution and Hypercholesterolemia in Apoe-Deficient Mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(11): 2392-2399.
- Li, T., H. Wang and S. He (2006). "Induction of Interleukin-6 Release from Monocytes by Serine Proteinases and Its Potential Mechanisms." Scand J Immunol. **64**(1): 10-16.
- Lopez-Pedreria, C., M. A. Aguirre, P. Buendia, N. Barbarroja, P. Ruiz-Limon, E. Collantes-Estevez, F. Velasco, M. Khamashta and M. J. Cuadrado (2010). "Differential Expression of Protease-Activated Receptors in Monocytes from Patients with Primary Antiphospholipid Syndrome." Arthritis Rheum. **62**(3): 869-877.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-241.
- Maceyka, M., H. Sankala, N. C. Hait, H. Le Stunff, H. Liu, R. Toman, C. Collier, M. Zhang, L. S. Satin, A. H. Merrill, Jr., S. Milstien and S. Spiegel (2005). "Sphk1 and Sphk2,

- Sphingosine Kinase Isoenzymes with Opposing Functions in Sphingolipid Metabolism." J Biol Chem **280**(44): 37118-37129.
- Macfarlane, S. R., M. J. Seatter, T. Kanke, G. D. Hunter and R. Plevin (2001). "Proteinase-Activated Receptors." Pharmacol Rev **53**(2): 245-282.
- Mackman, N., R. E. Tilley and N. S. Key (2007). "Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(8): 1687-1693.
- Marutsuka, K., K. Hatakeyama, A. Yamashita and Y. Asada (2005). "Role of Thrombogenic Factors in the Development of Atherosclerosis." J Atheroscler Thromb **12**(1): 1-8.
- Meyer zu Heringdorf, D., H. Lass, R. Alemany, K. T. Laser, E. Neumann, C. Zhang, M. Schmidt, U. Rauen, K. H. Jakobs and C. J. van Koppen (1998). "Sphingosine Kinase-Mediated Ca²⁺ Signalling by G-Protein-Coupled Receptors." EMBO J **17**(10): 2830-2837.
- Minami, T., A. Sugiyama, S. Q. Wu, R. Abid, T. Kodama and W. C. Aird (2004). "Thrombin and Phenotypic Modulation of the Endothelium." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(1): 41-53.
- Monroe, D. M., M. Hoffman and H. R. Roberts (2002). "Platelets and Thrombin Generation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(9): 1381-1389.
- Murata, N., K. Sato, J. Kon, H. Tomura, M. Yanagita, A. Kuwabara, M. Ui and F. Okajima (2000). "Interaction of Sphingosine 1-Phosphate with Plasma Components, Including Lipoproteins, Regulates the Lipid Receptor-Mediated Actions." Biochem J **352 Pt 3**: 809-815.
- Naldini, A., D. H. Carney, A. Pucci, A. Pasquali and F. Carraro (2000). "Thrombin Regulates the Expression of Proangiogenic Cytokines Via Proteolytic Activation of Protease-Activated Receptor-1." Gen Pharmacol **35**(5): 255-259.
- Nathan, C. F., H. W. Murray and Z. A. Cohn (1980). "The Macrophage as an Effector Cell." N Engl J Med **303**(11): 622-626.

- Niessen, F., F. Schaffner, C. Furlan-Freguia, R. Pawlinski, G. Bhattacharjee, J. Chun, C. K. Derian, P. Andrade-Gordon, H. Rosen and W. Ruf (2008). "Dendritic Cell Par1-S1p3 Signalling Couples Coagulation and Inflammation." Nature **452**(7187): 654-658.
- Nofer, J. R., M. Bot, M. Brodde, P. J. Taylor, P. Salm, V. Brinkmann, T. van Berkel, G. Assmann and E. A. Biessen (2007). "Fty720, a Synthetic Sphingosine 1 Phosphate Analogue, Inhibits Development of Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice." Circulation **115**(4): 501-508.
- Olivera, A., T. Kohama, L. Edsall, V. Nava, O. Cuvillier, S. Poulton and S. Spiegel (1999). "Sphingosine Kinase Expression Increases Intracellular Sphingosine-1-Phosphate and Promotes Cell Growth and Survival." J Cell Biol **147**(3): 545-558.
- Olivera, A., H. M. Rosenfeldt, M. Bektas, F. Wang, I. Ishii, J. Chun, S. Milstien and S. Spiegel (2003). "Sphingosine Kinase Type 1 Induces G12/13-Mediated Stress Fiber Formation, yet Promotes Growth and Survival Independent of G Protein-Coupled Receptors." J Biol Chem **278**(47): 46452-46460.
- Olivera, A. and S. Spiegel (2001). "Sphingosine Kinase: A Mediator of Vital Cellular Functions." Prostaglandins **64**(1-4): 123-134.
- Ostrovsky, L., J. Carvalho-Tavares, R. C. Woodman and P. Kubes (2000). "Translational Inhibition of E-Selectin Expression Stimulates P-Selectin-Dependent Neutrophil Recruitment." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(4): H1225-1232.
- Papewalis, C., B. Jacobs, A. M. Baran, M. Ehlers, N. H. Stoecklein, H. S. Willenberg, S. Schinner, M. Anlauf, A. Raffel, K. Cupisti, R. Fenk, W. A. Scherbaum and M. Schott (2011). "Increased Numbers of Tumor-Lysing Monocytes in Cancer Patients." Mol Cell Endocrinol **337**(1-2): 52-61.
- Peranzoni, E., S. Zilio, I. Marigo, L. Dolcetti, P. Zanovello, S. Mandruzzato and V. Bronte (2010). "Myeloid-Derived Suppressor Cell Heterogeneity and Subset Definition." Curr Opin Immunol **22**(2): 238-244.
- Popovic, M., Y. Laumonier, L. Burysek, T. Syrovets and T. Simmet (2008). "Thrombin-Induced Expression of Endothelial Cx3cl1 Potentiates Monocyte Ccl2 Production and Transendothelial Migration." J Leukoc Biol **84**(1): 215-223.

- Rauch, S. J., A. C. Rosenkranz, A. Bohm, J. Meyer-Kirchrath, T. Hohlfeld, K. Schror and B. H. Rauch (2011). "Cholesterol Induces Apoptosis-Associated Loss of the Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (Alcam) in Human Monocytes." Vascul Pharmacol **54**(3-6): 93-99.
- Rosenkranz, A. C., K. Schror and B. H. Rauch (2011). "Direct Inhibitors of Thrombin and Factor Xa Attenuate Clot-Induced Mitogenesis and Inflammatory Gene Expression in Human Vascular Smooth Muscle Cells." Thromb Haemost **106**(3): 561-562.
- Ross, R. (1993). "The Pathogenesis of Atherosclerosis: A Perspective for the 1990s." Nature **362**(6423): 801-809.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an Inflammatory Disease." N.Engl.J Med **340**(2): 115-126.
- Saba, J. D. and T. Hla (2004). "Point-Counterpoint of Sphingosine 1-Phosphate Metabolism." Circ Res **94**(6): 724-734.
- Sanchez, T. and T. Hla (2004). "Structural and Functional Characteristics of S1p Receptors." J Cell Biochem **92**(5): 913-922.
- Sato, K. and F. Okajima (2010). "Role of Sphingosine 1-Phosphate in Anti-Atherogenic Actions of High-Density Lipoprotein." World J Biol Chem **1**(11): 327-337.
- Schrör, K. (2008). "Das Gerinnungssystem Im Reperfundierten Koronarbett." DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift **133**(12): 579-581.
- Schrör, K., E. Bretschneider, K. Fischer, J. W. Fischer, R. Pape, B. H. Rauch, A. C. Rosenkranz and A. A. Weber (2010). "Thrombin Receptors in Vascular Smooth Muscle Cells - Function and Regulation by Vasodilatory Prostaglandins." Thromb Haemost **103**(5): 884-890.
- Schulman, S., C. Kearon, A. K. Kakkar, P. Mismetti, S. Schellong, H. Eriksson, D. Baanstra, J. Schnee and S. Z. Goldhaber (2009). "Dabigatran Versus Warfarin in the Treatment of Acute Venous Thromboembolism." N Engl J Med **361**(24): 2342-2352.
- Seehaus, S., K. Shahzad, M. Kashif, I. A. Vinnikov, M. Schiller, H. Wang, T. Madhusudhan, V. Eckstein, A. Bierhaus, F. Bea, E. Blessing, H. Weiler, D.

- Frommhold, P. P. Nawroth and B. Isermann (2009). "Hypercoagulability Inhibits Monocyte Transendothelial Migration through Protease-Activated Receptor-1-, Phospholipase-Cbeta-, Phosphoinositide 3-Kinase-, and Nitric Oxide-Dependent Signaling in Monocytes and Promotes Plaque Stability." Circulation **120**(9): 774-784.
- Serbina, N. V., T. Jia, T. M. Hohl and E. G. Pamer (2008). "Monocyte-Mediated Defense against Microbial Pathogens." Annu Rev Immunol **26**: 421-452.
- Shi, C. and E. G. Pamer (2011). "Monocyte Recruitment During Infection and Inflammation." Nat Rev Immunol **11**(11): 762-774.
- Shpacovitch, V., M. Feld, M. D. Hollenberg, T. A. Luger and M. Steinhoff (2008). "Role of Protease-Activated Receptors in Inflammatory Responses, Innate and Adaptive Immunity." J Leukoc.Biol. **83**(6): 1309-1322.
- Siess, W. (2002). "Athero- and Thrombogenic Actions of Lysophosphatidic Acid and Sphingosine-1-Phosphate." Biochim Biophys Acta **1582**(1-3): 204-215.
- Soh, U. J., M. R. Dores, B. Chen and J. Trejo (2010). "Signal Transduction by Protease-Activated Receptors." Br J Pharmacol **160**(2): 191-203.
- Speidl, W. S., W. G. Toller, C. Kaun, T. W. Weiss, S. Pfaffenberger, S. P. Kastl, A. Furnkranz, G. Maurer, K. Huber, H. Metzler and J. Wojta (2004). "Catecholamines Potentiate Lps-Induced Expression of Mmp-1 and Mmp-9 in Human Monocytes and in the Human Monocytic Cell Line U937: Possible Implications for Peri-Operative Plaque Instability." FASEB J **18**(3): 603-605.
- Spiegel, S. and S. Milstien (2003). "Sphingosine-1-Phosphate: An Enigmatic Signalling Lipid." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(5): 397-407.
- Sprague, A. H. and R. A. Khalil (2009). "Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease." Biochem Pharmacol **78**(6): 539-552.
- Stampfuss, J. J., P. Censarek, D. Bein, K. Schror, M. Grandoch, C. Naber and A. A. Weber (2008). "Membrane Environment Rather Than Tissue Factor Expression Determines Thrombin Formation Triggered by Monocytic Cells Undergoing Apoptosis." J Leukoc Biol **83**(6): 1379-1381.

- Stary, H. C. (2000). "Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions: An Update." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(5): 1177-1178.
- Steinhoff, M., J. Buddenkotte, V. Shpacovitch, A. Rattenholl, C. Moormann, N. Vergnolle, T. A. Luger and M. D. Hollenberg (2005). "Proteinase-Activated Receptors: Transducers of Proteinase-Mediated Signaling in Inflammation and Immune Response." Endocr Rev **26**(1): 1-43.
- Stevens, J. W. and S. R. Lentz (2009). "Countervailing Effects on Atherogenesis and Plaque Stability: A Paradoxical Benefit of Hypercoagulability?" Circulation **120**(9): 722-724.
- Sundstrom, C. and K. Nilsson (1976). "Establishment and Characterization of a Human Histiocytic Lymphoma Cell Line (U-937)." Int J Cancer **17**(5): 565-577.
- Takabe, K., S. W. Paugh, S. Milstien and S. Spiegel (2008). ""Inside-out" Signaling of Sphingosine-1-Phosphate: Therapeutic Targets." Pharmacol.Rev. **60**(2): 181-195.
- Tani, M., A. Kawakami, M. Nagai, K. Shimokado, K. Kondo and M. Yoshida (2007). "Sphingosine 1-Phosphate (S1p) Inhibits Monocyte-Endothelial Cell Interaction by Regulating of Rhoa Activity." FEBS Lett **581**(24): 4621-4626.
- Trejo, J. (2003). "Protease-Activated Receptors: New Concepts in Regulation of G Protein-Coupled Receptor Signaling and Trafficking." J Pharmacol Exp Ther **307**(2): 437-442.
- Tsao, P., T. Cao and M. von Zastrow (2001). "Role of Endocytosis in Mediating Downregulation of G-Protein-Coupled Receptors." Trends Pharmacol Sci **22**(2): 91-96.
- Weber, A. A. and K. Schrör (2006). "Pharmakologie Der Blutgerinnung." Biospektrum **1**.
- Woollard, K. J. and F. Geissmann (2010). "Monocytes in Atherosclerosis: Subsets and Functions." Nat Rev Cardiol **7**(2): 77-86.
- Yatomi, Y., Y. Igarashi, L. Yang, N. Hisano, R. Qi, N. Asazuma, K. Satoh, Y. Ozaki and S. Kume (1997). "Sphingosine 1-Phosphate, a Bioactive Sphingolipid Abundantly Stored in Platelets, Is a Normal Constituent of Human Plasma and Serum." J Biochem **121**(5): 969-973.

Yatomi, Y., Y. Ozaki, T. Ohmori and Y. Igarashi (2001). "Sphingosine 1-Phosphate: Synthesis and Release." Prostaglandins **64**(1-4): 107-122.

Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn and M. B. Lutz (2010). "Nomenclature of Monocytes and Dendritic Cells in Blood." Blood **116**(16): e74-80.

7. Publikationen

Sostmann B., Rosenkranz A.C., Schrör K., Rauch B.H. (2010), Sphingosine-1-phosphate potentiates migration of monocytic U937 cells towards thrombin and FXa by up regulating PAR-1 and PAR-2 receptor expression. *Hämostaseologie* 1/2010 A119

Sostmann B., Rosenkranz A.C., Schrör K., Rauch B.H. (2010), Sphingosin-1-Phosphat verstärkt die Thrombin- und FXa-induzierte Migration monozytärer U937 Zellen über eine Aufregulation der Protease-aktivierten Rezeptoren-1 und -2. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 381 Suppl. 1

8. Danksagungen

An erster Stelle möchte ich Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Bernhard Rauch, für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf danken. Weiterhin bedanke ich mich herzlich für die anregenden Diskussionen und Ratschläge sowie für die Betreuung und Finanzierung der Arbeit und für die Möglichkeit der Teilnahme an diversen Kongressen.

Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Matthias Schott aus der Klinik für Diabetologie, Endokrinologie und Rheumatologie danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Emeritus Univ.- Prof. Dr. med. Karsten Schrör danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Pharmakologie und Klinischer Pharmakologie des Universitätsklinikums Düsseldorf und für seine freundliche und fachliche Unterstützung.

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

Bei Frau Beate Weyrauther bedanke ich mich für die Einarbeitung und Hilfestellung in der Zellkultur.

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

Abschließend möchte ich noch meinen Eltern Dirk und Beatrix und meinem Bruder Thorben sowie meiner Freundin Tabea für die finanzielle und moralische Unterstützung danken. Weiterhin möchte ich auch allen Freunden und Kollegen, insbesondere Herrn Andreas Böhm und Herrn Swen Ermler für die Einarbeitung in den Laboralltag sowie die zu jeder Zeit vorhandene freundliche Stimmung danken.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

17.12.2012, Björn Dirk Sostmann

Unterschrift