

Bedeutung des PAR-4 Thrombinrezeptors für die diabetische Gefäßerkrankung *in vivo*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Goran Pavic
aus Mostar

Düsseldorf, Oktober 2014

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

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

Referent: Prof. Dr. Jens W. Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Peter Proksch

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
1.1. <i>Diabetes mellitus</i>	1
1.1.1. Typ-1-Diabetes.....	2
1.1.2. Typ-2-Diabetes.....	2
1.1.3. Vaskuläre Komplikationen in Diabetes	2
1.2. Vaskuläres Remodeling	3
1.3. Thrombin	4
1.4. Thrombin in Diabetes	6
1.5. Protease-aktivierte Rezeptoren	7
1.6. Posttranskriptionelle Mechanismen der Genregulation	8
1.7. Fragestellung	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Geräte	11
2.2. Puffer und Lösungen	13
2.3. Chemikalien und Reagenzien	15
2.3.1. Größenstandards	15
2.3.2. Kits.....	15
2.3.3. Primer	15
2.3.4. Antikörper.....	16
2.4. Humane Gewebeproben	17
2.4.1. Atherektomien	17
2.4.2. Venöse Proben	18
2.5. Tierexperimentelle Arbeiten	20

2.5.1. Verwendete Tiere	20
2.5.2. Tierhaltung und Genehmigung	20
2.5.3. Genotypisierung	20
2.5.4. Polymerasekettenreaktion	21
2.5.5. Plättchenaggregation in PAR-4 ^{-/-} -Mäusen	22
2.5.6. Streptozotocin-induzierter Diabetes.....	23
2.5.7. Ketoazidose-Test nach STZ-Behandlung	25
2.5.8. Modell einer Carotis-Ligatur	25
2.5.9. Bromdesoxyuridin-Behandlung als Proliferationsmarker	26
2.6. Zellkultur	27
2.6.1. Isolation und Kultivierung venöser SMC	27
2.6.2. Stimulation der Zellen.....	27
2.7. Histologische Techniken	28
2.7.1. Immunfluoreszenz-Färbung humaner und muriner Proben	28
2.7.2. Immunhistochemische Färbung muriner Pankreas-Proben	29
2.7.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	29
2.7.4. Sirius Red-Färbung	30
2.7.5. Zytochemische Färbung humaner SMC	30
2.8. Molekularbiologische Methoden	31
2.8.1. RNA-Isolation und Messung der mRNA-Konzentration	31
2.8.2. cDNA-Synthese mittels reverser Transkription	32
2.8.3. Real Time quantitative PCR (qPCR) Analyse	32
2.9. Statistik	34
3. Ergebnisse	35
3.1. Erhöhte PAR-4-Expression in Proben diabetischer Patienten....	35
3.2. Posttranskriptionelle Regulation von PAR-4 in humanen SMC mit simulierter Hyperglykämie.....	40
3.3. Hyperglykämie erhöht PAR-4-Expression in STZ-behandelten Mäusen.....	43

3.4. PAR-4-Defizienz schützt vor verstärkter neointimaler Hyperplasie in diabetischen Mäusen	46
3.5. Reduzierte Proliferation und Inflammation in PAR-4 ^{-/-} -Mäusen ..	50
4. Diskussion	53
4.1. Gesteigerte PAR-4-Expression in Atherektomien diabetischer Patienten	53
4.2. Gesteigerte PAR-4-Expression in der <i>Vena saphena</i> diabetischer Patienten	55
4.3. PAR-4 wird posttranskriptionell über mRNA-Stabilisierung reguliert.....	56
4.4. Destabilisierung des PAR-4-Transkripts durch cAMP/PKA	57
4.5. PAR-4-Defizienz schützt vor verstärkter neointimaler Hyperplasie in vivo.....	58
4.6. PAR-4-verstärkte Proliferation und Inflammation in diabetischen Wildtyp-Mäusen	59
5. Zusammenfassung.....	61
6. Summary	62
7. Literaturverzeichnis	63
8. Veröffentlichungen.....	69
9. Tagungen und Kongressbeiträge.....	70
10. Danksagung.....	71
11. Eidesstaatliche Erklärung.....	73

Abkürzungsverzeichnis

AGE	<i>Advanced Glycation Endproduct</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ARE	AU-reiche Region
BrdU	Bromdesoxyuridin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ELAV	<i>embryonal lethal abnormal vision</i>
FCS	Fetales Kälberserum
GTC	Gunaidinisothiocyanat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HuR	<i>Human antigen R</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
PAR-4 ^{-/-}	PAR-4-Knockout
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
qPCR	Real Time quantitative PCR
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SMC	glatte Muskelzellen
STZ	Streptozotocin

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Fakten über Diabetes in Deutschland im Jahr 2013	2
Tab. 2.1	Überblick über die verwendeten Geräte I	11
Tab. 2.2	Überblick über die verwendeten Geräte II	12
Tab. 2.3	Verwendete Puffer und Lösungen I	13
Tab. 2.4	Verwendete Puffer und Lösungen II	14
Tab. 2.5	Verwendete Standards	15
Tab. 2.6	Überblick über die verwendeten Kits	15
Tab. 2.7	Überblick über die verwendeten Oligonukleotide I.....	15
Tab. 2.8	Überblick über die verwendeten Oligonukleotide II.....	16
Tab. 2.9	Primärantikörper zur Immundetektion.....	16
Tab. 2.10	Sekundärantikörper zur Immundetektion	16
Tab. 2.11	Patientencharakteristika der Atherektomie-Proben für RNA- Untersuchungen	17
Tab. 2.12	Patientencharakteristika der Atherektomie-Proben für histologische Untersuchungen	18
Tab. 2.13	Patientencharakteristika venöser Proben für RNA-Untersuchungen	19
Tab. 2.14	Patientencharakteristika venöser Proben für histologische Untersuchungen	19
Tab. 2.15	PCR-Programm für die Genotypisierung	22
Tab. 2.16	Stimulanzen für <i>in vitro</i> Versuche	27

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Sortierung der Länder in Europa nach der Gesamtzahl der Diabetiker	1
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der Thrombin-induzierten SMC-Proliferation und -Migration	6
Abb. 1.3	Schematische Darstellung der PAR-4-Regulation <i>in vivo</i>	10
Abb. 2.1	Genotypisierung der Wildtyp- und PAR-4 ^{-/-} -Mäuse	22
Abb. 2.2	Plättchenaggregation im Blut der Wildtyp- und PAR-4 ^{-/-} -Mäuse	23
Abb. 2.3	Quantifizierung der PAR-4-mRNA-Expression nach einem Diabetes- Zeitverlauf	24
Abb. 2.4	Schematische Darstellung einer Carotis-Ligatur	26
Abb. 3.1	Immunfluoreszenz-Färbung humaner Atherektomien I	35
Abb. 3.2	Immunfluoreszenz-Färbung humaner Atherektomien II	37
Abb. 3.3	Quantifizierung der PAR-4-Immunfluoreszenz und PAR-4-mRNA Expres- sion in humanen Atherektomien	38
Abb. 3.4	PAR-4-Immunfluoreszenz-Färbung humaner Koronararterien	38
Abb. 3.5	Immunfluoreszenz-Färbung humaner Venen	39
Abb. 3.6	Quantifizierung der PAR-4-Immunfluoreszenz und PAR-4-mRNA- Expression in humanen Venen	40
Abb. 3.7	HuR-Immunfluoreszenz-Färbung humaner venöser SMC	41
Abb. 3.8	Immunfluoreszenz-Färbung humaner venöser SMC	42
Abb. 3.9	Quantifizierung der HuR- und PAR-4-Immunfluoreszenz in humanen ve- nösen SMC	43
Abb. 3.10	Insulin-Färbung muriner Inselzellen	44
Abb. 3.11	Quantifizierung des Glukosespiegels und der PAR-4-mRNA-Expression in Mäusen	45
Abb. 3.12	PAR-4-Immunfluoreszenz-Färbung muriner Gefäße	46
Abb. 3.13	HE-Färbung muriner Carotiden nach einer Ligatur	47
Abb. 3.14	Untersuchung der neointimalen Fläche in ligierten Carotiden	48
Abb. 3.15	Quantifizierung der neointimalen, medialen und luminalen Fläche in ligier- ten Carotiden	49
Abb. 3.16	Immunfluoreszenz-Färbung muriner Carotiden	51
Abb. 3.17	Quantifizierung der Proliferation und Inflammation in murinen Carotiden	52

1. Einleitung

1.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine bereits in der Antike bekannte Erkrankung, die sich bis zum 21. Jahrhundert zu einer der führenden Todesursachen entwickelt hat. Nach Schätzungen der *World Health Organization* (WHO) leiden weltweit mittlerweile über 347 Millionen Menschen an Diabetes (Stand: Oktober 2013), wobei Typ-2-Diabetes mit ca. 90% überwiegt. Alleine in Deutschland haben wir nach *The International Diabetes Federation* (IDF) ca. 7,6 Millionen Diabetiker und eine Prävalenz von ca. 8,3% (Stand: 2013, Tab. 1.1). Damit liegt Deutschland anhand der Anzahl der Diabetiker auf dem zweiten Platz in Europa hinter Russland (Abb. 1.1). Unter den Sekundärkomplikationen sind kardiovaskuläre Erkrankungen mit 50-80% die Haupttodesursache bei den Diabetikern. In Deutschland gab es im Jahr 2013 über 60.000 mit Diabetes verbundene Todesfälle (Tab. 1.1).

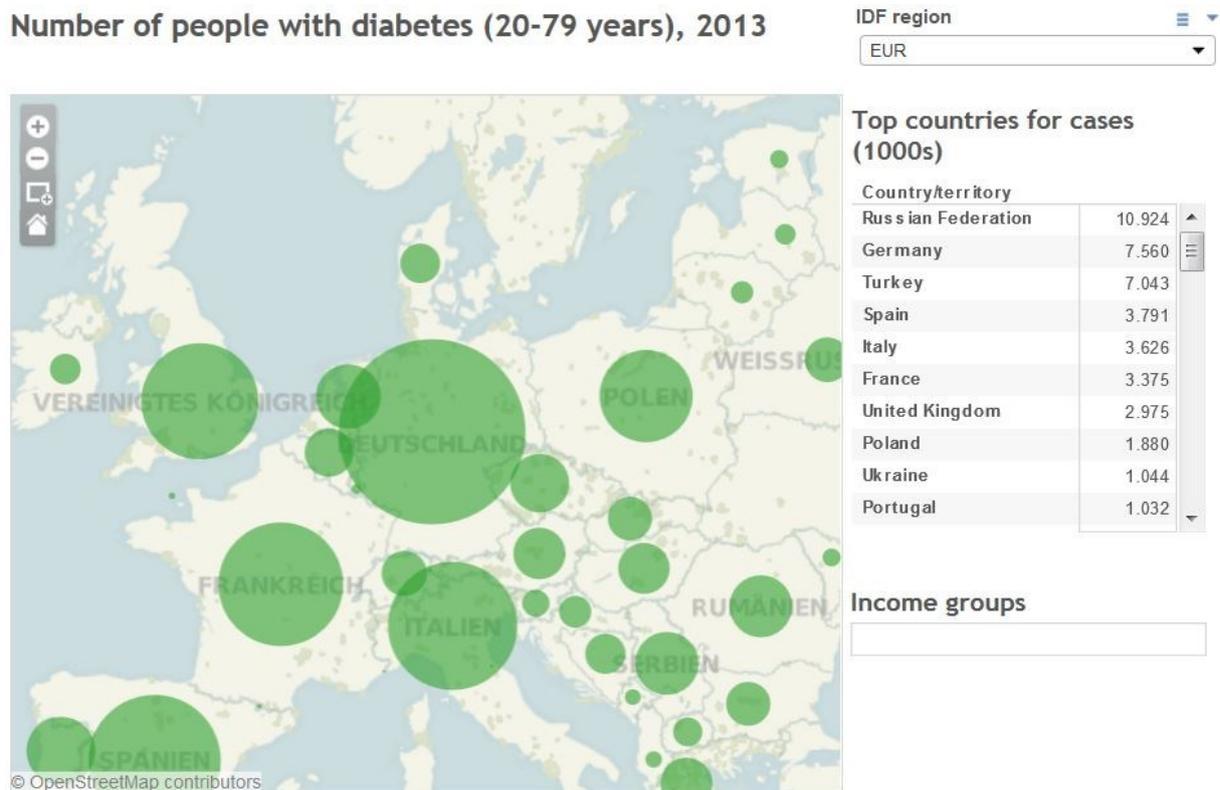


Abb. 1.1: Sortierung der Länder in Europa nach der Gesamtzahl der Diabetiker. Die Größe der Kreise kennzeichnet die Anzahl der Diabetiker (IDF, Oktober 2013).

Tab. 1.1: Fakten über Diabetes in Deutschland im Jahr 2013 (IDF, Oktober 2013).

Bevölkerungs- zahl (20-79)	Anzahl der Diabetes- patienten (20-79)	Menschen mit Diabetes (20-79) Männer	Menschen mit Diabetes (20-79) Frauen	Prävalenz (in %)	Mit Diabetes verbundene Anzahl der Todesfälle
63.281.330	7.559.777	3.772.124	3.787.654	8,27	62.460

1.1.1. Typ-1-Diabetes

Typ-1-Diabetes ist eine Form des Diabetes mellitus, die mit einem Verlust der Insulinproduktion als Folge von der Zerstörung der β -Zellen in der Bauchspeicheldrüse durch körpereigene Abwehrzellen einhergeht. Als Ursache gilt heute eine mögliche erbliche Veranlagung oder auch eine Fehlsteuerung des Immunsystems. Daher handelt es sich bei dieser Diabetes-Form um eine Autoimmunerkrankung. Klassische Anzeichen eines Typ-1-Diabetes als Folge eines Insulinmangels sind Polyurie, Ketoazidose und Gewichtsverlust. Typ-1-Diabetiker werden mit einer Insulin- und Lifestyletherapie behandelt.

1.1.2. Typ-2-Diabetes

Anders als bei Typ-1-Diabetes liegt bei dieser Form Insulin vor, kann aber aufgrund einer Resistenz an seinem Zielort nicht wirken. Typ-2-Diabetes ist durch eine Insulinresistenz aber auch eine Insulinsekretionsstörung charakterisiert. Auch bei dieser Diabetes-Form kann erbliche Veranlagung eine Ursache sein, aber auch ein falscher Lebensstil, wie Fehlernährung, Übergewicht und Bewegungsmangel. Therapiert werden Typ-2-Diabetiker mit einer Insulintherapie, oralen Antidiabetika aber auch einer Änderung des Lebensstils.

1.1.3. Vaskuläre Komplikationen bei Diabetes

Ein Diabetes erhöht automatisch das Risiko für klinische Komplikationen, welche zum größten Teil irreversibel sind, insbesondere mikro- und makrovaskuläre Erkrankungen. Es gibt viele Risikofaktoren für diese Erkrankungen, aber am wichtigsten ist wohl die Dauer der Diabeteserkrankung. Damit verbunden ist auch der hyperglykämische Zustand der Patienten, der zu einer Erhöhung intrazellulärer reaktiver Sauer-

stoffspezies (ROS), und damit auch zu oxidativem Stress führt. Die ROS aktivieren viele Signalwege, die zu einer Schädigung des Gewebes führen. Darunter fällt auch eine Aktivierung der intrazellulären *Advanced Glycation Endproduct* (AGE)-Bildung.[1] Die AGE führen über ihre Rezeptoren, deren Expression ebenfalls durch ROS erhöht wird, zur Entzündung und dadurch zur Schädigung der Zellen.[2] Besonders problematisch ist daher eine Anreicherung an AGE durch Hyperglykämie und oxidativen Stress im diabetischen Gewebe, da es bekannt ist, dass eine solche AGE-Akkumulation unter anderem zu Atherosklerose und gestörter Wundheilung führen kann.[3] Hyperglykämie führt zudem auch über den oxidativen Stress zu einer erhöhten Zytokin-Freisetzung von TNF- α und IL-6, und damit zu einer erhöhten Inflammation.[4] Neben der erhöhten Zytokin-Freisetzung ist Hyperglykämie auch für die Induktion der Apoptose der Endothelzellen verantwortlich, und damit auch eine der Hauptursachen für die Atherosklerose.[5] Hyperglykämie und oxidativer Stress sind somit zwei der Hauptursachen für vaskuläre Komplikationen in *Diabetes mellitus*.

1.2. Vaskuläres Remodeling

Neben dem erhöhten Atherosklerose-Risiko kann es in Diabetes auch durch das sog. Remodeling der Gefäßwand zu vaskulären Komplikationen kommen. Damit ist ein Umbauvorgang des Gewebes gemeint, der eine Reaktion auf pathologische Belastungen wie Hyperglykämie ist, und dem eine Schädigung des Gewebes zugrunde liegt. Nach einer vaskulären Schädigung kommt es durch Proliferation und Migration glatter Muskelzellen (SMC) zu einer Akkumulation im Gefäßlumen. Dieses Gebilde, auch als Neointima aufgrund der neu gebildeten Intima bekannt, sorgt für die Verkleinerung des Gefäßlumens. Ebenfalls spielt hierbei eine Steigerung der extrazellulären Matrixsynthese eine Rolle, da sie das Grundgerüst einer Neointima bildet.[5] Wenn diese Entwicklung unentdeckt bleibt, kann es schließlich zu einer lebensbedrohlichen Stenose kommen. Dadurch kommt es zu einer mangelhaften Sauerstoffversorgung der Organe, und falls kardiale Gefäße betroffen sind, kann es zu einem Infarkt kommen. Aufgrund dieser Probleme ist das vaskuläre Remodeling unter anderem die Hauptursache für ein klinisches Versagen der Koronarintervention wie Bypass-Operationen.[6] Interessanterweise sind hierbei venöse Bypässe stärker betroffen als arterielle Bypässe. Dies liegt daran, dass die Verschlussrate bei Venen

wie *Vena saphena* im Vergleich zu Arterien wie *Arteria thoracica interna* oder *Arteria radialis* viel höher ist.[7, 8] Die höhere Verschlussrate venöser Bypässe im Vergleich zu Bypässen arteriellen Ursprungs beruht auf funktionellen und strukturellen Unterschieden, z.B. dem Aufbau der Gefäßwand.[9] Patienten mit *Diabetes mellitus* weisen ein signifikant höheres Risiko für verstärkte Restenose nach Angioplastie und Stenteinsatz auf.[10, 11] Eine Begründung für dieses Ergebnis könnte eine verstärkte intimale Hyperplasie in diabetischen Stent- und Stentfreien-Läsionen sein.[12] Zudem haben kultivierte vaskuläre SMC aus diabetischen Gefäßen eine stärkere Proliferationsrate, Adhäsion und Migrationsfähigkeit als nicht-diabetische vaskuläre SMC.[13] Aufgrund der strukturellen und molekularen Unterschiede zwischen Venen und Arterien besteht bei Venen ein erhöhtes Okklusions-Risiko. Zusätzlich stellt auch eine Diabeteserkrankung ein Risiko für eine erneute Okklusion bei Bypass-Patienten dar.

1.3. Thrombin

Zusätzlich zu den Risikofaktoren kommt es bei solchen Interventionen wie Bypass-Operationen zu Gefäßverletzungen und damit zum Verlust des Endothels. Die unter dem Endothel befindlichen SMC kommen dadurch in den Kontakt mit dem Blut und den darin befindlichen Gerinnungsfaktoren. Als Folge kommt es zur Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten, welche in aktiver Form Wachstumsfaktoren wie *Platelet-derived growth factor* (PDGF) sezernieren. Diese sind wiederum wichtig für die Proliferation und Migration von SMC, als Teil der Wundheilung.[14] Eine vermehrte Adhäsion der Thrombozyten hat eine Bildung des Thrombus zur Folge, welcher zusätzlich große Mengen von Thrombin (mehr als 96% nach abgeschlossener Koagulation),[15] aber auch FXa freisetzt. Sowohl Thrombin als auch FXa können die Proliferation und Migration von SMC induzieren,[16] und dadurch zu einer überschüssigen Wundheilung bis hin zu einem erhöhten Risiko für Okklusion beitragen. Zusammengefasst kann eine Gefäßverletzung zu einer unkontrollierbaren Wundheilung führen. Durch verschiedene Faktoren, wie Thrombin oder Wachstumsfaktoren, kann es zu einer Proliferation und Migration der SMC und dadurch auch zu einer Okklusion des Gewebes kommen. Zusätzlich zu Thrombin wurde auch für Protein-kinase C (PKC) gezeigt, dass sie eine zentrale Rolle bei vaskulären Komplikationen in Diabetes und bei Glukose-stimulierter Genexpression spielt.[17-19] Es gibt viele

verschiedene Isoformen der PKC, wobei zwei von denen PKC β und PKC δ über eine hohe Glukosekonzentration und den damit verbundenen oxidativen Stress aktiviert werden können.[17] Das Hauptziel der PKC in glatten Muskelzellen ist der Transkriptionsfaktor NF κ B,[17] der ubiquitär vorkommt und von großer Bedeutung für die Zellproliferation ist. NF κ B wurde schon in atherosklerotischen Gefäßen gefunden, was auf eine wichtige Rolle in Atherosklerose hindeutet.[20] Damit übernimmt nicht nur Thrombin sondern auch PKC und NF κ B eine wichtige Rolle bei der Pathogenese vaskulärer Komplikationen in Diabetes. Im Rahmen einer Gefäßverletzung spielt die Serinprotease Thrombin (Faktor IIa) eine große Rolle bei der Blutgerinnung. Wenn der Gewebefaktor, ein Blutgerinnungsfaktor, der sich auf der Zelloberfläche unterhalb des Endothels befindet, bei einer Gefäßverletzung in Kontakt mit Blutkomponenten kommt, wird eine Koagulationskaskade aktiviert. Dabei wird an deren Ende Thrombin aus seiner Vorstufe Prothrombin freigesetzt, indem es von FXa gespalten wird. Damit stellt Thrombin das Ende der Aktivierungsphase und gleichzeitig den Anfang der Gerinnungsphase dar. In dieser aktiven Form spaltet Thrombin über seine Proteaseaktivität den Gerinnungsfaktor Fibrinogen zu Fibrin. Ebenfalls fördert Thrombin die Aktivierung weiterer Gerinnungsfaktoren, und über diese somit auch seine eigene Freisetzung. Es hat sich herausgestellt, dass ein Thrombus im Rahmen einer Gefäßverletzung eine erhebliche Menge an Thrombin freisetzen kann, und dadurch die hohe Menge an vorgefundenem Thrombin eher die Konsequenz als die Ursache für einen Thrombus ist.[15] Also ist nur ein Bruchteil an freigesetztem Thrombin für die Gerinnung selbst verantwortlich, der Rest spielt anscheinend erst danach eine Rolle, die weitestgehend noch unbekannt ist. Nachdem es freigesetzt worden ist, kann Thrombin an die extrazelluläre Matrix binden, an der es funktionell aktiv bleibt. Diese Bindung sorgt für eine ausgeprägte lokale Aktivität des Thrombins aber auch für den Schutz vor eigenen Inhibitoren.[21] Somit sind die Zellen der Gefäßwand über einen längeren Zeitraum der Thrombinaktivität ausgesetzt. Dies ist vor allem für die Heilung der Gefäßwand wichtig, da Thrombin die Proliferation und Migration der SMC induziert. Außerdem stimuliert Thrombin sowohl die Expression inflammatorischer Gene als auch die Produktion extrazellulärer Matrix und deren Umbau über die Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen (MMP).[22-24] Diese Funktionen bestätigen nicht nur die wichtige Rolle des Thrombins in der Heilung einer Gefäßverletzung, sondern sie deuten auch auf eine mögliche Rolle bei einem erneuten Gefäßverschluss.

1.4. Thrombin in Diabetes

Eine verstärkte Thrombin-Synthese ist mit Hyperglykämie und dadurch auch mit Diabetes assoziiert.[25] Dass Diabetiker an einem erhöhten Thromboserisiko leiden, könnte mit der verstärkten Thrombin-Bildung bei den Diabetikern erklärt werden. Zahlreiche Veröffentlichungen berichten auch über ein verstärktes Remodeling in diabetischen Patienten verglichen mit nicht-diabetischen Patienten. Ebenfalls sind weitere mikro- und makrovaskuläre Komplikationen mit Diabetes assoziiert.[6, 26] Diabetes führt also zur verstärkten Thrombin-Synthese, die wiederum die SMC zur Proliferation und Migration induziert. Dadurch kommt es zum proliferativen Remodeling in den Gefäßen, und so eine verstärkte Neointima-Bildung kann zu einem erneuten Gefäßverschluss führen. Da die vermittelnden Rezeptoren letztendlich der limitierende Faktor für das Ausmaß der Thrombin-Wirkung sind, ist der Einfluss von Diabetes auf die Regulation von Thrombin-Rezeptoren von vermehrtem Interesse.

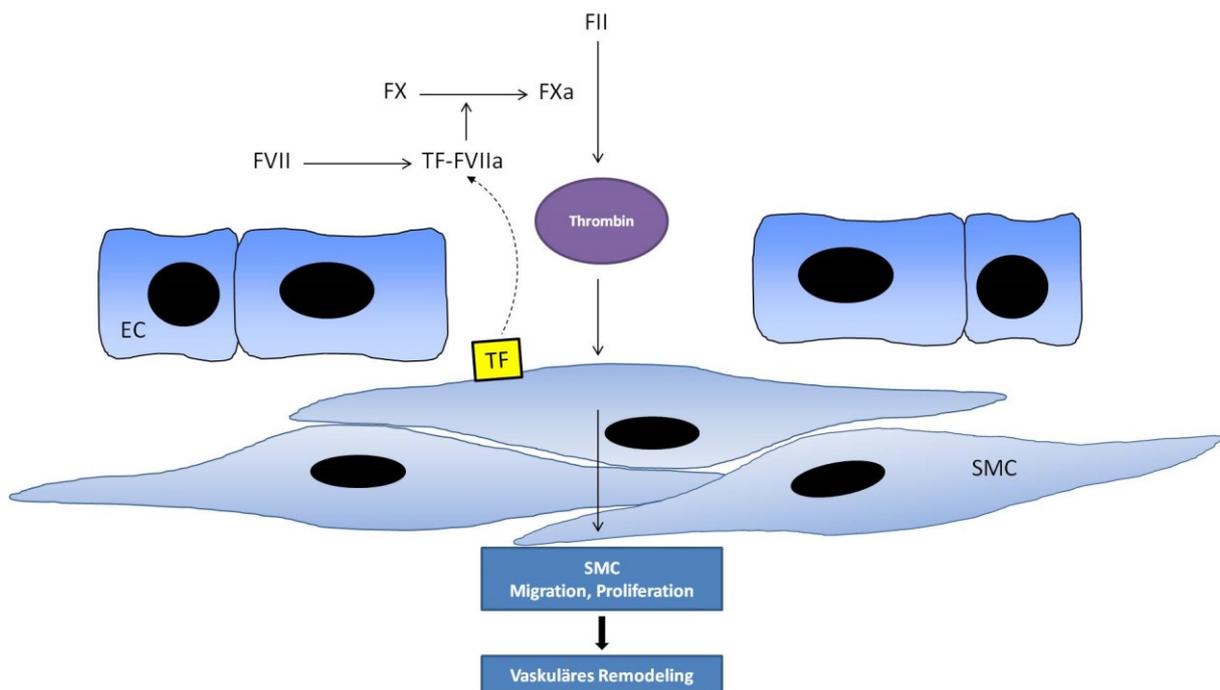


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Thrombin-induzierten SMC-Proliferation und -Migration. Thrombin wird über eine Koagulationskaskade aktiviert und über seine Rezeptoren leitet es das vaskuläre Remodeling ein (EC: Endothelzellen; SMC: glatte Muskelzellen; TF: Gewebefaktor).

1.5. Protease-aktivierte Rezeptoren

Die zellulären Wirkungen von Thrombin werden über eine kleine Familie von G-Protein-gekoppelten Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) vermittelt.[27] Dabei werden die Rezeptoren von Thrombin an N-terminaler extrazellulärer Domäne gespalten, so dass ein neues N-terminales Ende entsteht. Dieses sorgt als „*tethered ligand*“ für eine Autoaktivierung des Rezeptors. Synthetisch hergestellte Peptide, die diesem „*tethered ligand*“ entsprechen, aktivieren proteolytische Spaltung der PAR.[28] Bis heute wurden vier verschiedene PAR identifiziert, wobei nur drei (PAR-1, PAR-3 und PAR-4) von Thrombin aktiviert werden können. Alle durch Thrombin aktivierte PAR werden auf humanen SMC exprimiert und sind funktionell aktiv. Sie unterscheiden sich in ihrer Affinität zu Thrombin. Während PAR-1 die höchste Affinität mit einem EC_{50} von 0,05 nmol/L für Thrombin besitzt, ist PAR-4 der am wenigsten affine Rezeptor mit für die Aktivierung benötigten EC_{50} von 5 nmol/L. Auch PAR-2 wird auf SMC exprimiert, er wird allerdings nicht von Thrombin aktiviert. PAR-2 kann von Proteasen wie Trypsin, Tryptase oder Koagulationsfaktoren VIIa und Xa aktiviert werden.[27] Die Aktivierung der PAR hat verschiedene Signalmechanismen zur Folge, je nachdem welcher PAR und damit welche G-Proteine aktiviert werden. Während PAR-1 und PAR-2 G-Proteine der $G_{12/13}$ -, G_q - und G_i -Familie aktivieren können, aktiviert PAR-4 nur G-Proteine der $G_{12/13}$ - und G_q -Familie und PAR-3 nur die der G_q -Familie.[29, 30] Dadurch ergeben sich drastische Unterschiede auch in der Wirkung einzelner PAR in verschiedenen Umgebungen. Hinsichtlich ihrer Wirkung auf Plättchen sind die PAR sehr gut erforscht. In Menschen finden sich PAR-1 und PAR-4 auf den Plättchen und vermitteln die durch Thrombin stimulierte Aktivierung der Plättchen, die wichtig für die Wundheilung nach einer Gefäßverletzung ist. Beide PAR tragen gleichzeitig zur Aktivierung der Plättchen bei. Wobei PAR-4, aufgrund der niedrigeren Affinität zu Thrombin, „nur“ als Corezeptor von PAR-1 in humanen Plättchen agiert.[27] Im Gegensatz zu humanen Plättchen werden auf murinen Plättchen PAR-3 und PAR-4, jedoch nicht PAR-1 exprimiert. In murinen Plättchen übernimmt PAR-3 die Rolle des Corezeptors, indem er als Cofaktor für die Spaltung und damit die Aktivierung von PAR-4 verantwortlich ist.[27, 31] Damit ist auf murinen Plättchen PAR-4 der essentielle Rezeptor für die Plättchenaktivierung. Während auf humanen und murinen Plättchen unterschiedliche PAR exprimiert werden, findet man alle vier Mitglieder der PAR-Familie sowohl auf SMC als auch auf Endothelzellen im vaskulä-

ren System. Über PAR-1 übt Thrombin verschiedene Wirkungen auf das Gefäßsystem aus. In SMC stimuliert Thrombin über PAR-1 unter anderem Proliferation, Kontraktion, Produktion der extrazellulären Matrix und Zytokinfreisetzung.[30] Daher ist PAR-1 ein wichtiger Faktor sowohl in vaskulärem als auch in kardialem Remodeling.[32, 33] Über PAR-2 im vaskulären System ist ebenfalls bekannt, dass dessen Aktivierung zu Proliferation der SMC führt,[34] womit er auch zum vaskulären Remodeling beitragen kann. Im Vergleich zu PAR-1 und PAR-2 ist über PAR-3 wenig bekannt, welche Funktion seine Expression und seine Aktivierung im vaskulären System erfüllt. Es wurde lediglich über einen funktionell aktiven PAR-3 und seine mitogene Fähigkeit auf humanen SMC berichtet.[35] Durch die Untersuchungen humaner SMC, wird auch PAR-4 eine mitogene Fähigkeit zugeschrieben,[36] indem er zur Proliferation und Migration humaner SMC beiträgt.

In einem atherosklerotischen Mausmodell konnte jedoch kein Unterschied zwischen PAR-4-defizienten Mäusen und Wildtypen beobachtet werden, allerdings geschah dies ausschließlich unter normalglykämischen Bedingungen.[37] Es wurde aber über eine verstärkte PAR-4-Sensitivität in Plättchen von Typ-1-diabetischen Mäusen berichtet.[38] Dies könnte als Nachweis für einen Beitrag von PAR-4 zu erhöhten Thrombose-Risiko in Diabetes gewertet werden. Ebenso konnte in der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass PAR-4-Expression im Gegensatz zu anderen PAR in humanen SMC über eine hohe Glukosekonzentration gesteigert wird.[39] Dies impliziert, dass PAR-4 zwar möglicherweise eine untergeordnete Rolle unter normalglykämischen Bedingungen spielt, jedoch unter hyperglykämischen Bedingung durch seine Überexpression eine wichtige Rolle in vaskulären Komplikationen des Diabetes übernimmt. Die PAR-4-Hochregulation wird zum Teil über Isoformen der Proteinkinase C (PKC β , δ) und den Transkriptionsfaktor NF κ B gesteuert.[39]

1.6. Posttranskriptionelle Mechanismen der Genregulation

Posttranskriptionelle Mechanismen der PAR-4-Genregulation sind bislang unbekannt. Ein Hauptmechanismus der Regulation der Expression vieler eukaryotischer Gene ist die kontrollierte Degradation von *messenger* RNA (mRNA). Damit zusammenhängend sind Stabilisierung der mRNA und der Schutz vor deren Abbau. Eine dynamisch angepasste Stabilisierung und Destabilisierung des Transkriptes ermöglichen eine Feinjustierung des Expressionsniveaus vieler Gene. Dadurch können vor

allem induzierbare Gene und Gene mit hohem *turnover* posttranskriptionell reguliert werden. Eine wichtige Gruppe von mRNA-stabilisierenden und damit posttranskriptionell regulierenden Proteinen sind Proteine der *embryonal lethal abnormal vision* (ELAV) Familie. Das bekannteste Mitglied dieser Familie ist das *Human antigen R* (HuR), das ubiquitär exprimiert wird.[40] Es erkennt AU-reiche Sequenzen (ARE) innerhalb der 3'-untranslatierten Region der Ziel-mRNA und bindet daran. Damit erfolgen die Stabilisierung der mRNA und der automatische Schutz vor dem Abbau. HuR besitzt außerdem eine Shuttling-Sequenz, wodurch es gebunden an die mRNA ins Cytoplasma transloziert, dort an der mRNA gebunden bleibt, und diese somit stabilisiert und vor dem Abbau schützt.[41] Es wurde gezeigt, dass eine verstärkte HuR-Expression in glatter Muskulatur vorhanden ist. Diese ist mit pathologischen Zuständen wie z.B. neointimaler Hyperplasie oder dem Versagen eines venösen Bypassgrafts behaftet. Gleichzeitig wurde auch gezeigt, dass die Proliferation humaner glatter Muskelzellen mit der erhöhten HuR-Bindung zusammenhängt.[42] Zusätzlich wird die mRNA zahlreicher Proteine durch das HuR stabilisiert, wie z.B. bei Zellzyklussteuernden Cyclinen, bei für Zellmigration wichtige Matrix-Metalloproteasen wie MMP-9 oder bei Zytokinen wie TNF- α . Die HuR-vermittelte mRNA-Stabilisierung ist von der Phosphorylierung durch PKC δ abhängig.[43] Da PAR-4 auch über PKC reguliert wird, ergibt sich die Frage, ob PAR-4 möglicherweise über HuR reguliert werden könnte.

1.7. Fragestellung

Hinsichtlich der Wirkung und Regulation von PAR-4 in Diabetes ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Findet eine durch Hyperglykämie induzierte PAR-4-Expression auch in Gefäßen diabetischer Patienten statt?
2. Wird PAR-4 in humanen SMC über posttranskriptionelle Mechanismen reguliert?
3. Welche Bedeutung hat PAR-4 für das vaskuläre Remodeling bei Diabetes *in vivo*?

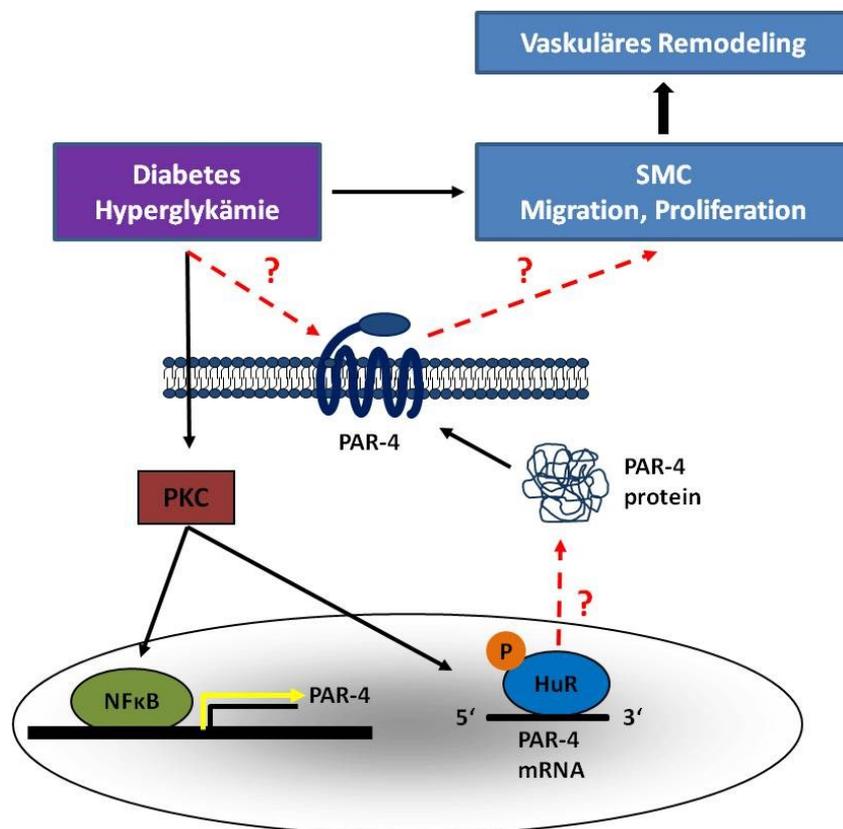


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der PAR-4-Regulation *in vivo*. Hyperglykämie induziert PKC- und damit auch die NFκB-Aktivierung. PAR-4-Expression wird über diese beiden Mechanismen reguliert. Die mit einem Fragezeichen gekennzeichneten Wege zeigen die Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet werden (PKC: Proteinkinase C; HuR: *Human antigen R*; SMC: glatte Muskelzelle).

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Geräte, die zur Grundausstattung in molekular- und zellbiologischen Laboratorien gehören, entsprechen dem allgemeinen Standard und sind hier nicht einzeln aufgeführt.

Tab. 2.1: Überblick über die verwendeten Geräte I

Geräte	Informationen
Blottingkammer	peqlab (Erlangen, Deutschland) PerfectBlue™ Semi-Dry-Elektroblotter
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Heraeus® BB15
Elektrophoresekammer (Western Blot)	Bio-Rad (Hercules, Kalifornien, USA) Mini-PROTEAN® Tetra Cell PowerPac™ Basic Power Supply
Gel-Imager	Bio-Rad (Hercules, Kalifornien, USA) Gel Doc™ System
Homogenisator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) gentleMACS™ Dissociator
Kühlplatte (Paraffinblöcke)	Leica (Solms, Deutschland) EG1150 C
Magnetrührer	IKA (Staufen, Deutschland) Combimag RCT
Mikroskop	Zeiss (Oberkochen, Deutschland) Axiostar Plus

Tab. 2.2: Überblick über die verwendeten Geräte II

Geräte	Informationen
Mikroskop (Fluoreszenz)	Zeiss (Oberkochen, Deutschland) Axio Imager.M2 AxioCam HRc (Kamera) HXP 120C (Beleuchtungseinrichtung) Power Supply 232
Mikrotom	Leica (Solms, Deutschland) RM2255
Operationsbesteck	B. Braun/Aesculap (Melsungen, Deutschland)
Paraffin-Streckbad	Medax (Neumünster, Deutschland) 25900
pH-Meter	VWR (Radnor, PA, USA) pHenomenal® pH 1000 L
Photometer	peqlab (Erlangen, Deutschland) NanoDrop 1000
Schüttler	BIOER (Hangzhou, Zhejiang, China) MiXing Block MB-102
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) Safe 2020 Class II Biological Safety Cabinet
Thermocycler (PCR-Block)	ependorf (Hamburg, Deutschland) Mastercycler gradient
Thermocycler (Real-Time-PCR-Block)	Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien, USA) 7300 Real Time PCR System
Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore (Billerica, MA, USA) Milli-Q®

2.2. Puffer und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Substanzen wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (St. Louis/Missouri, USA) bezogen.

Tab. 2.3: Verwendete Puffer und Lösungen I

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Blockierlösung	10% 10x TBS 10% FCS 1% BSA ad. H ₂ O dest.
DMEM	5,5 mM Glukose 15% FCS 100 Units/mL Penizillin 0,1 mg/mL Streptomycin 1,9 mM L-Glutamin 9,6 mM Natriumpyruvat
Lämmli-Puffer (4x)	25 mL, 1 M Tris/HCl 35 mL, Glycerol 8 g, SDS 0,002% Bromphenolblau ad. 100 mL, H ₂ O dest.
Laufpuffer	190 mM Glycin 25 mM Tris (pH 8,5) 0,1% SDS
Lysepuffer (Genotypisierung)	10mL, 100 mM Tris/HCl (pH 8,5) 1 mL, 5 mM EDTA (pH 8,0) 2 mL, 0,2% SDS 10 mL, 200 mM NaCl ad. 100 mL, H ₂ O dest.

Tab. 2.4: Verwendete Puffer und Lösungen II

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCL (pH 7,4) 150 mM NaCl 1% Triton X-100 1% Desoxycholate 0,1% SDS
Sammelgel (5%)	H ₂ O dest. Acrylamidlösung (30%) 1 M Tris/HCl (pH 6,8) 10% SDS 10% APS TEMED
Sodium Citrat Puffer	147 mg Trisodiumcitrat 49,5 mL NaCl 1 mol/L Citronensäure bis pH 4,5
Transferpuffer	190 mM Glycin 25 mM Tris 20% Methanol
Trenngel (10%)	H ₂ O dest. Acrylamidlösung (30%) 1,5 M Tris/HCl (pH 6,8) 10% SDS 10% APS TEMED
TBS (10x)	1,5 M NaCl 100 mM Tris/HCl (pH 7,4)
TBST (1x)	1x TBS 0,1% Tween 20

2.3. Chemikalien und Reagenzien

Alle nicht gesondert aufgeführten Substanzen wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), peqlab (Erlangen, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (St. Louis/Missouri, USA) bezogen.

2.3.1. Größenstandards

Tab. 2.5: Verwendete Standards

Standard	Informationen
100bp DNA-Ladder	Genecraft (Köln, Deutschland)
Easy Ladder I	Bioline (London, UK)

2.3.2. Kits

Tab. 2.6: Überblick über die verwendeten Kits

Kits	Informationen
peqGOLD TriFast™	peqlab (Erlangen, Deutschland)
RNA ^{later}	Qiagen (Venlo, Niederlande)
SensiMix™ SYBR® Hi-ROX	Bioline (London, UK)

2.3.3. Primer

Tab. 2.7: Überblick über die verwendeten Oligonukleotide I

Gen	Sequenz
18S	Vorwärts: GCAATTATCCCCATGAACG Rückwärts: GGCCTCACTAAACCATCCAA
GAPDH	Vorwärts: TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC Rückwärts: AAGATGGTGATGGGCTTCCCG

Tab. 2.8: Überblick über die verwendeten Oligonukleotide II

Gen	Sequenz
PAR-4	Vorwärts: GTACGCGCTATGTTGTGTCG Rückwärts: CCAGTCACAGAAGTGTAGAG
PAR-4 (Genotypisierung)	Vorwärts: CAGATGTTTCCTGGGCTGGGTG Rückwärts (WT): ATTGTGGGTGCCTCAGTGTCCC Rückwärts (KO):CAGGGTTTTCCCAGTCACGACG

2.3.4. Antikörper

Tab. 2.9: Primärantikörper zur Immundetektion

Spezifität (anti-)	Anwendung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
α -SMA	IF	Maus	1:200	Dako
BrdU	IF	Ratte	1:50	abcam
HuR	ICC	Maus	1:50	Santa Cruz
Insulin	IHC	Kaninchen	1:500	abcam
Mac-2	IF	Ratte	1:50	Cedarlane Laboratories
PAR-4	ICC	Maus	1:50	Santa Cruz
PAR-4	IF	Kaninchen	1:50	abcam

Tab. 2.10: Sekundärantikörper zur Immundetektion

Spezifität (anti-)	Anwendung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen	IF	Ziege	1:200	Invitrogen
Kaninchen	IHC	Ziege	1:200	Santa Cruz
Maus	ICC	Ziege	1:200	Invitrogen
Maus	IF	Ziege	1:200	Invitrogen
Ratte	IF	Ziege	1:200	Dianova

2.4. Humane Gewebeproben

2.4.1. Atherektomien

Die Proben humaner Atherektomien wurden sowohl von diabetischen als auch nicht-diabetischen Patienten während der Endarteriektomie an der Klinik für Gefäß- und Endvaskularchirurgie, Klinikum der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf, gesammelt. Eine Genehmigung wurde seitens der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf (Genehmigungsnummer #3944), und auch seitens der Spender erteilt. Es wurden Proben beider Geschlechter gesammelt und die Patientencharakteristika aufgenommen (Tab. 2.11 und Tab. 2.12). Dabei wurden die Patienten nicht nach spezifischen Kriterien bzw. Charakteristika ausgesucht. Entnommene Proben wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren, um die Degradation so gering wie möglich zu halten. Diese Proben wurden sowohl für Protein- als auch RNA-Untersuchungen verwendet. Für histologische Untersuchungen wurden die Proben zunächst für 24 h in Paraformaldehyd (4%) aufbewahrt und in Paraffin eingebettet.

Tab. 2.11: Patientencharakteristika der Atherektomie-Proben für RNA-Untersuchungen

	nicht-diabetisch	diabetisch
Anzahl	12	15
Alter \pm SD	69 \pm 10	69 \pm 6
männlich	7 (58%)	12 (80%)
Aspiringebrauch	9 (75%)	12 (80%)
Andere Antithrombotika	3 (25%)	3 (20%)
Statin-Gebrauch	10 (83%)	9 (60%)
β -Blocker-Gebrauch	4 (33%)	9 (60%)
Arterielle Hypertonie	11 (92%)	15 (100%)
Hyperlipidämie	9 (75%)	9 (60%)

Tab. 2.12: Patientencharakteristika der Atherektomie-Proben für histologische Untersuchungen

	nicht-diabetisch	diabetisch
Anzahl	13	9
Alter±SD	74±9	70±10
männlich	9 (70%)	6 (67%)
Aspiringebrauch	10 (77%)	7 (78%)
Andere Antithrombotika	3 (23%)	3 (33%)
Statin-Gebrauch	10 (77%)	6 (67%)
β-Blocker-Gebrauch	8 (62%)	4 (44%)
Arterielle Hypertonie	12 (92%)	6 (67%)
Hyperlipidämie	9 (69%)	5 (56%)

2.4.2. Venöse Proben

Humane Proben der *Vena saphena* wurden ebenfalls von Typ-2-Diabetes Patienten und nicht-diabetischen Patienten gesammelt, bei denen ein venöser Bypassgraft an der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie, Klinikum der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf gemacht wurde. Eine Genehmigung wurde seitens der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf (Genehmigungsnummer #3199), und auch seitens der Spender erteilt. Es wurden Proben beider Geschlechter gesammelt und die Patientencharakteristika aufgenommen (Tab. 2.13 und Tab. 2.14). Dabei wurden die Patienten nicht nach spezifischen Kriterien bzw. Charakteristika ausgesucht. Ein Teil der entnommenen Proben wurde sofort nach der Entnahme in RNA later aufgenommen, um die Degradation so gering wie möglich zu halten, und für RNA-Untersuchungen verwendet. Für histologische Untersuchungen wurden andere Proben zunächst für 24 h in Paraformaldehyd (4%) aufbewahrt und anschließend in Paraffin eingebettet.

Tab. 2.13: Patientencharakteristika venöser Proben für RNA-Untersuchungen

	nicht-diabetisch	diabetisch
Anzahl	10	6
Alter±SD	70±9	67±11
männlich	7 (70%)	5 (83%)
Aspiringebrauch	9 (90%)	4 (67%)
Andere Antithrombotika	4 (40%)	3 (50%)
Statin-Gebrauch	8 (80%)	4 (67%)
β-Blocker-Gebrauch	10 (100%)	4 (67%)
Arterielle Hypertonie	6 (60%)	6 (100%)
Hyperlipidämie	1 (10%)	2 (33%)

Tab. 2.14: Patientencharakteristika venöser Proben für histologische Untersuchungen

	nicht-diabetisch	diabetisch
Anzahl	9	9
Alter±SD	74±5	69±7
männlich	7 (78%)	5 (56%)
Aspiringebrauch	8 (89%)	8 (89%)
Andere Antithrombotika	3 (33%)	3 (33%)
Statin-Gebrauch	7 (78%)	7 (78%)
β-Blocker-Gebrauch	8 (89%)	8 (89%)
Arterielle Hypertonie	5 (56%)	7 (78%)
Hyperlipidämie	1 (11%)	2 (22%)

2.5. Tierexperimentelle Arbeiten

2.5.1. Verwendete Tiere

Für die Versuche benötigte männliche C57BL/6 Mäuse wurden bei Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen. C57BL/6 ist der für die Forschung und für gezielte Erzeugung transgener Tiere am meisten benutzte Inzucht-stamm. Die typischen Charakteristika dieses Stammes sind ausgezeichnete Fortpflanzung, hohe Lebensdauer und geringe Anfälligkeit für Tumorentwicklung. In der von uns verwendeten Mauslinie wurde das Gen für PAR-4 ausgeschaltet. Dadurch konnte dieser PAR-4-Knockout-Stamm (PAR-4^{-/-}) mit dem Stamm, der das Wildtyp-Gen noch besitzt, in Bezug auf Diabetes und unterschiedliche Krankheitsentwicklung verglichen werden. Die PAR-4^{-/-}-Tiere wurden freundlicherweise von Dr. Justin Hamilton aus Australien (*Australian Centre for Blood Diseases, Monash University*) bereitgestellt und damit in Düsseldorf eine homozygote Zucht angesetzt.

2.5.2. Tierhaltung und Genehmigung

Die Tiere wurden unter kontrollierten Beleuchtungs- (Licht- und Dunkelphase je zwölf Stunden) und Luftverhältnissen in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Als Nahrung diente Standard-Nagerfutter und die Tiere hatten *ad libitum*-Zugang zum entkeimten Trinkwasser.

Die Genehmigung der durchgeführten Versuche wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes erteilt (Aktenzeichen 87-51.04.2011.A055).

2.5.3. Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde eine Schwanzbiopsie mit einem sterilen Skalpell entnommen und mit 50 mM Natronlauge (NaOH) bei 95°C für eine Stunde verdaut. Durch den Verdau lag die DNA außerhalb vom Zellkern frei in der Lösung vor. Danach wurde eine Mischung aus 1 M Tris/10 mM EDTA (pH 8,0) mit der verdauten Probe vermengt und die entstandene Lösung auf Eis kühl gelagert, damit die DNA vor dem Abbau zelleigener DNase geschützt wird. Die so gewonnene genomische

DNA wurde dann mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR) und anschließendem Auftrennen mittels einer Gelelektrophorese auf das Vorhandensein des PAR-4-Wildtyp-Gens sowie auf das des PAR-4-Knockout-Gens untersucht.

2.5.4. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um Nukleinsäuren selektiv zu amplifizieren. Dabei werden an eine einzelsträngige DNA zwei, zur Matrize komplementäre, Primer spezifisch angelagert, welche die zu amplifizierende DNA-Region flankieren. Die DNA-Polymerase kann nun zu den angrenzenden Bereichen den komplementären Strang bilden. Dazu wurde die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet, die ihr Aktivitätsoptimum bei 72°C besitzt. Der eigentliche Mechanismus der PCR basiert auf der zyklischen Wiederholung von drei Schritten: Denaturierung, Anlagerung von Primern (engl.: *annealing*) und Elongation. Während der Denaturierungsphase wird der DNA-Doppelstrang aufgrund der Aufspaltung der Wasserstoffbrücken durch die hohe Temperatur zwischen den gegenüberliegenden Basenpaaren aufgetrennt, so dass sich im nächsten Schritt, der Annealingphase, die Primer an komplementäre Sequenzen anlagern können. Im letzten Schritt kommt es bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, zur Elongation, d.h. zur Auffüllung der Stränge mit den Nukleotiden. In jedem Zyklus kommt es so zu einer Verdopplung der eingesetzten DNA-Menge, also zu einer exponentiellen Zunahme, sofern eine 100%ige Amplifikationseffizienz vorliegt. Dieser Zyklus wurde pro durchgeführte PCR 37mal wiederholt. Die optimale Annealing-Temperatur der Primer für die durchgeführten PCR-Reaktionen wurde anhand des DNA-Schmelzpunktes (T_M) der Primer gewählt (Sequenz der Primer: vgl. Tab. 2.8). Die optimale Annealing-Temperatur der Primer lag dabei knapp unterhalb des T_M . Die so entstandenen PCR-Produkte wurden dann mittels einer Agarose-Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und anschließend detektiert. Anhand des mitgelaufenen Markers konnte man die Banden analysieren und als eine Arte Nachweis für die Verwendung homozygoter Tiere benutzen. Diese lagen bei 600 bp für Wildtyp-Tiere, für PAR-4^{-/-}-Tiere lag die Bande aufgrund des Knockouts hingegen nur bei 380 bp (Abb. 2.1).

Tab. 2.15: PCR-Programm für die Genotypisierung

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95 °C	3 min
2	95 °C	1 min
3	60 °C	1 min
4	72 °C	1 min
Schritt 1-4 für 37 Zyklen wiederholen		
5	72 °C	5 min
6	4 °C	∞

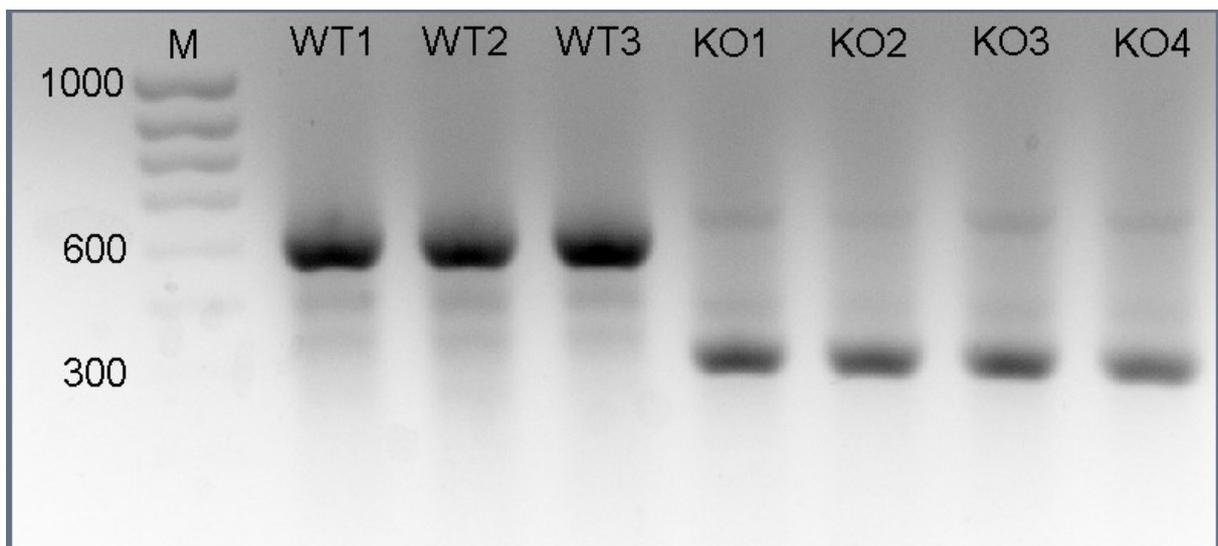


Abb. 2.1: Genotypisierung der Wildtyp- und PAR-4^{-/-}-Mäuse. Wildtyp-Bande liegt bei 600 bp, die von den Knockout-Tieren bei 380 bp (M: Marker; WT: Wildtyp; KO: PAR-4-Knockout).

2.5.5. Plättchenaggregation in PAR-4^{-/-}-Mäusen

Neben der Genotypisierung wurde ein weiterer Test durchgeführt, um den Knockout der Tiere zu überprüfen. Eine Ausschaltung des PAR-4-Gens hat eine gestörte Plättchen-Aggregation zur Folge.[31] Daher wurde aus dem, durch die Herzpunktion entnommenen, Blut der Wildtyp- und PAR-4^{-/-}-Mäuse die Plättchen isoliert und in einem Aggregometer auf dessen aggregierende Funktion überprüft. Zusätzlich wurden die

Plättchen mit Thrombin (3 IU/mL) und PAR-4-aktivierendem Peptid (500 µmol/L) stimuliert, um die Plättchenaggregation anzuregen (Abb. 2.2).

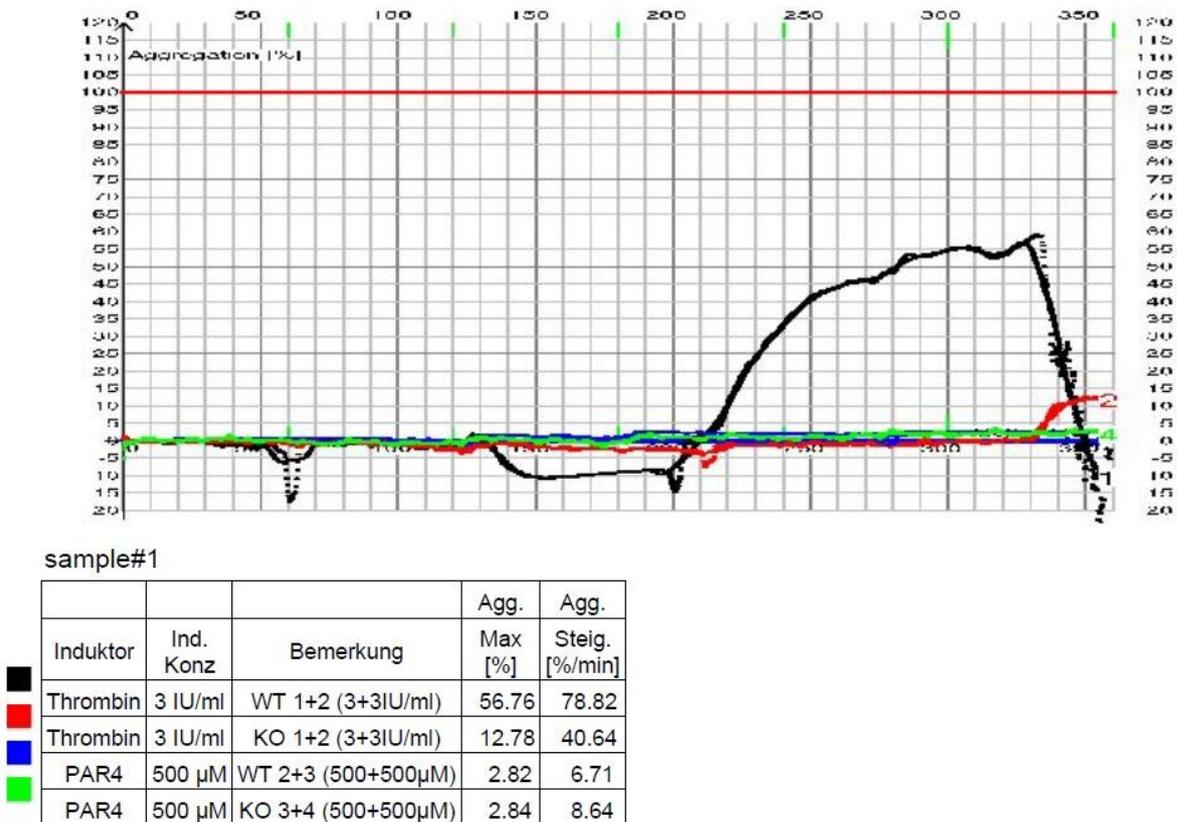


Abb. 2.2: Plättchenaggregation im Blut der Wildtyp- und PAR-4^{-/-}-Mäuse. Schwarze und blaue Kurve stellen die Plättchenaggregation in Wildtyp-Tieren dar, rote und grüne Kurve in PAR-4^{-/-}-Tieren. Schwarze und rote Kurve stellen die Plättchen dar, die mit Thrombin stimuliert wurden, blaue und grüne Kurve mit PAR-4-aktivierendem Peptid.

2.5.6. Streptozotocin-induzierter Diabetes

Streptozotocin (STZ) ist wie Alloxan eine diabetogene Substanz, die mit ihrer toxischen Wirkung auf die β -Zellen der Pankreas einen Typ-1-Diabetes induziert. STZ akkumuliert dabei in pankreatischen β -Zellen über den GLUT-2 Glukosetransporter und zerstört diese über die Sauerstoffradikale. Diese Zerstörung resultiert in einer Hyperglykämie, der der Organismus aufgrund zerstörter β -Zellen und durch fehlende Insulin-Produktion nichts entgegensetzen kann.[44] Zwei Modelle des STZ-induzierten Diabetes kamen in dieser Arbeit zur Anwendung. Das *low dose* Modell, bei dem die Tiere mehrere Dosen niedrig-konzentrierter STZ an mehreren Tagen appliziert bekommen und dadurch „schonend“ Diabetes erleiden, und das aggressiv-

vere *high dose* Modell, bei dem die Tiere eine hoch-konzentrierte Dosis an STZ an einem Tag verabreicht bekommen.[45, 46] In dieser Arbeit wurden sowohl Wildtyp- als auch PAR-4^{-/-}-Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen für sechs Stunden auf Nahrungsentzug gesetzt. Während man dann den Typ-1-Diabetes in Wildtyp-Tieren über die Injektion von 55 mg/kg STZ an fünf Tagen, entsprechend des *low dose* Modells, induziert hat, bekamen PAR-4^{-/-}-Mäuse einen Bolus von 180 mg/kg STZ verabreicht, im Sinne eines *high dose* Modells. Kontrolltiere beider Gruppen haben ausschließlich Citratpuffer verabreicht bekommen. Die Anwendung unterschiedlicher Modelle lag daran, dass das *high dose* Modell bei den Wildtyp-Mäusen zu einer hohen Letalitätsrate geführt hat. Das *low dose* Modell in PAR-4^{-/-}-Mäusen hat hingegen in den meisten Fällen, aufgrund einer bis heute nicht vollständig geklärten Resistenz der Mäuse, kein Diabetes verursachen können. In beiden Modellen jedoch konnte ein vergleichbarer Blutzuckerspiegel in diabetischen Tieren beobachtet werden. Eine Woche nach der STZ-Applikation werden die Zuckerspiegel im Urin mittels Glukose-Teststreifen (Biophan G) einmalig gemessen. Hierfür werden die Tiere am Nackenfell gehalten und mittels leichter Massage der Blasenregion zum Urinieren gebracht. Der Urin wird auf den Teststreifen appliziert und anhand der chemisch-induzierten Farbreaktion ein vorhandener Diabetes erkannt. Zusätzlich wurde ein Diabetes-Zeitverlauf mit anschließender Untersuchung der vaskulären PAR-4-Expression durchgeführt. Der Anstieg an PAR-4-mRNA in der Aorta war dabei nach drei Wochen am höchsten, daher wurde dieser Zeitpunkt für weitere *in vivo* Versuche angewendet (Abb. 2.3).

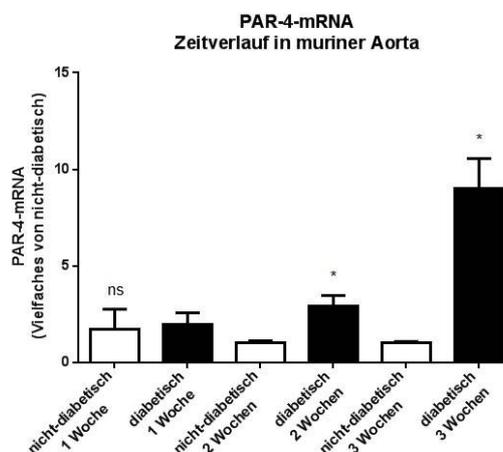


Abb. 2.3: Quantifizierung der PAR-4-mRNA-Expression nach einem Diabetes-Zeitverlauf. Bestimmung der PAR-4 mRNA-Expression in muriner Aorta diabetischer und nicht-diabetischer Mäuse mittels Real-time quantitativer PCR (n=4-5). *p<0,05 vs. nicht-diabetische Gruppe.

2.5.7. Ketoazidose-Test nach STZ-Behandlung

Eine Behandlung mit Streptozotocin verursacht Typ-1-Diabetes, der zur Entwicklung der Ketoazidose führen kann.[47] Ketoazidose ist eine metabolische Azidose, die bei absolutem Insulinmangel auftreten kann, und dabei Ketonkörper im Blut anhäuft. Daher wurde ein Test auf Ketoazidose bei den STZ- und auch bei den Citratpuffer-behandelten Mäusen durchgeführt, indem die β -Hydroxybutyrat Konzentration im Urin gemessen wurde. Die mittlere Konzentration wurde nach der massenspektrometrischen Untersuchung bestimmt. Der Schwellwert einer Ketoazidose liegt bei 20 mg/g Creatinin.

2.5.8. Modell einer Carotis-Ligatur

Drei Wochen nach einer Behandlung mit STZ oder Citratpuffer wurden die Tiere einer Operation unterzogen, bei der die linke Carotide nahe der Bifurkation ligiert wurde (Abb. 2.2). Eine solche Ligation ist ein oft angewandtes Modell zur Untersuchung des vaskulären Remodelings *in vivo*. [48, 49] Mittels einer intraperitoneal (i.p.) verabreichten Injektion von Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) wurden die Mäuse anästhesiert. Anschließend wurde der Kopfbereich fixiert und die Haut in einem kleinen Bereich zwischen Mandibula und Sternum aufgeschnitten. Die beiden Lappen der Speicheldrüse wurden beiseitegeschoben, damit die *Arteria carotis* freipräpariert und ligiert werden konnte. Danach wurde die Haut verschlossen, und den Tieren das stark wirksame Analgetikum Carprofen (5 mg/kg) verabreicht. Die Tiere wurden während Operation und anschließender Aufwachphase auf einer Wärmeplatte aufbewahrt, um Wärmeverlust so gering wie möglich zu halten. Im postoperativen Verlauf wurden die Tiere engmaschig überwacht, und der allgemeine Zustand, Wasser- und Nahrungsaufnahme kontrolliert. Vier Wochen nach der Ligatur wurden die Tiere zur Probenentnahme erneut narkotisiert und mit nachfolgender Perfusion mit PBS und Paraformaldehyd getötet. Die Proben wurden für weitere Untersuchungen mittels histologischer Techniken aufbewahrt.

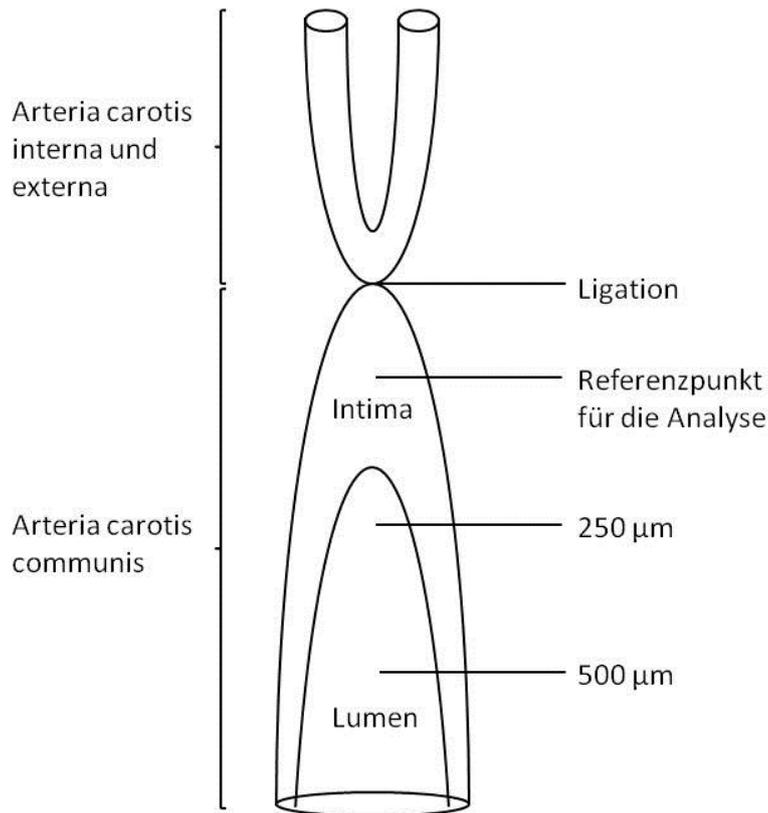


Abb. 2.4: Schematische Darstellung einer Carotis-Ligatur. Carotis wird nahe der Bifurkation ligiert und ab dem Referenzpunkt werden mittels histologischer Methoden Schnitte angefertigt. Dabei werden in 250 µm Intervallen die Proben analysiert (modifiziert nach de Waard et al., 2002).[50]

2.5.9. Bromdesoxyuridin-Behandlung als Proliferationsmarker

Eine Gruppe an Wildtyp- und PAR-4^{-/-}-Mäusen wurde eine Woche nach der Carotis-Ligatur mit Bromdesoxyuridin (BrdU) behandelt, um proliferierende Zellen mittels histologischer Untersuchungen analysieren zu können. Dabei wurde den Mäusen BrdU (50 mg/kg i.p.) 24 h und 1 h vor der Euthanasie verabreicht. BrdU ist ein Analogon des Nukleosids Thymidin. Es wird von der Zelle aufgenommen und an Stelle des Thymidins während der Zellteilung und der *de novo* DNA-Synthese eingebaut. Antikörper gegen BrdU können dann das eingebaute BrdU detektieren und somit die Proliferation nachweisen.

2.6. Zellkultur

2.6.1. Isolation und Kultivierung venöser SMC

Für die *in vitro* Versuche wurden humane vaskuläre glatte Muskelzellen (SMC) aus der *Vena saphena* isoliert. Die venösen SMC wuchsen adhärent und wurden bis zur Passage 8 kultiviert. Als Grundmedium diente dabei das *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), das 5,5 mmol/L D-Glukose und 15% an Fetalem Kälberserum (FCS) beinhaltete (Gibco® Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA). Außerdem wurde 1% an Penicillin/Streptomycin, zur Vorbeugung der Kontamination durch Bakterien, hinzugefügt. Kultiviert wurden die Zellen im Brutschrank unter optimalen Bedingungen bei 37 °C und 5% CO₂-haltiger Atmosphäre. Das Grundmedium wurde alle 48 h gewechselt. Nach Erreichen einer bestimmten Konfluenz wurden die Zellen für weitere Versuche entweder auf 12-Well oder auf 24-Well Platten ausgesät.

2.6.2. Stimulation der Zellen

SMC wurden in der Passage fünf bis acht für die Versuche benutzt und 48 h vor der Stimulation gehungert. Dabei wurde das Standardmedium der Zellen gegen ein Hungermedium, das kein FCS beinhaltete, ausgetauscht. Nach 48 h wurden die Zellen im Grundmedium oder einem Medium mit hoher Glukosekonzentration (25 mmol/L) stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen jeweils mit einem Adenylatcyclase-Aktivator (Cicaprost), oder mit einem der zwei Proteinkinase A (PKA)-Inhibitoren (myr-PKI und Rp-8-CPT-cAMPS) stimuliert. Nach weiteren 48 h wurde die Stimulation beendet und die Zellen entweder in peqGOLD TriFast™ zur RNA-Untersuchung aufgenommen, oder mit Paraformaldehyd (4%) fixiert und eine zytochemische Färbung durchgeführt.

Tab. 2.16: Stimulanzen für *in vitro* Versuche

Stimulanzen	Stimulationskonzentration
Cicaprost	10 nmol/L
myr-PKI	5 µmol/L
Rp-8-CPT-cAMPS	10 µmol/L

2.7. Histologische Techniken

Humane und murine Proben, die für die histologischen Untersuchungen bereitgestellt wurden, sind zunächst in Paraformaldehyd aufgenommen worden. Nach 24 h wurden die Proben im Autotechnikon über Nacht entwässert. Anschließend konnten die Proben in Paraffin eingebettet und am Mikrotom fixiert 3-5 μm dicke Schnitte angefertigt werden. Die Schnitte wurden auf Objektträger im 40 °C warmen Wasser aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Für die danach erfolgten Färbungen wurden die Schnitte im Inkubator bei 60 °C für 1 h fixiert. Anschließend wurden die Schnitte entparaffiniert, indem sie dreimal für jeweils 15 min mit Roticlear[®] (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) behandelt wurden. Danach wurden sie mit einer absteigenden Alkoholreihe (absolut, 95% und 75%) und abschließender Behandlung mit PBS und *Aqua dest.* gewässert.

2.7.1. Immunfluoreszenz-Färbung humaner und muriner Proben

Paraffinschnitte humaner und muriner Proben wurden zunächst mit Citratpuffer (pH 6,0, Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) bei 98 °C für 30 min behandelt und dadurch ein *Antigen-Retrieval* durchgeführt. Damit wurde eine möglicherweise verlorene Immunreaktivität aufgrund einer Fixierung mit Paraformaldehyd wiederhergestellt. Durch die Fixierung mit Paraformaldehyd werden Proteine miteinander quervernetzt, dadurch einige Epitope maskiert und können dann durch die Antikörper nicht erkannt werden. Nach erfolgter Antigendemaskierung erfolgten mehrere Waschschrte und anschließend eine Blockierung mit einer Blockierlösung (s. Tab. 2.3) bei Raumtemperatur für eine Stunde. Humane Proben wurden dann über Nacht mit Primärantikörper gegen PAR-4 oder α -SMA behandelt (s. Tab. 2.9). Murine Proben wurden zusätzlich zum PAR-4 Primärantikörper auch mit Antikörpern gegen Inflammationsmarker Mac-2 oder Proliferationsmarker BrdU behandelt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte, nach mehreren Waschschrten mit PBS, mit jeweiligen Sekundärantikörpern bei Raumtemperatur für eine Stunde behandelt (s. Tab. 2.10). Nach erneutem Waschen wurden ein Tropfen Roti[®]-Mount FluorCare DAPI (Carl Roth) auf die Schnitte gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Das Roti[®]-Mount dient zur blauen Darstellung der Zellkerne unter einem Fluoreszenzmikroskop. Es enthält 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), das mit DNA aber auch mit RNA interka-

lieren kann und als Fluoreszenzfarbstoff diese bei einer Anregung mittels ultraviolettem Licht darstellen kann. Die anschließende Analyse der Färbung erfolgte am Axio Imager.M2 Mikroskop. Fluoreszenzbilder wurden mit der AxioCam HRC Kamera aufgenommen und mittels der Axiovision Software analysiert. Eine zusätzliche Analyse der mittleren Fluoreszenz-Intensität wurde mit der Zeiss Zen Lite 2012 Software durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten bei dieser Färbung stets Schnitte, die nicht mit einem Primärantikörper behandelt wurden.

2.7.2. Immunhistochemische Färbung muriner Pankreas-Proben

Pankreas-Schnitte aus diabetischen und nicht-diabetischen Wildtyp-Mäusen wurden wie unter 2.7.1. beschrieben mit Citratpuffer behandelt. Nach der Blockierung mit der Blockierlösung wurden die Schnitte über Nacht mit dem Primärantikörper gegen Insulin behandelt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach mehreren Waschschritten mit 3% Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt, um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren. Dies wurde gemacht, da als Sekundärantikörper eine Peroxidase nach mehreren Waschschritten benutzt wurde (s. Tab. 2.10). Nach einer Stunde wurde der nicht gebundene Sekundärantikörper ausgewaschen, und die Schnitte mit Diaminobenzidin (DAB) behandelt. DAB dient der Peroxidase als Substrat und eine erfolgte Reaktion wird unterm Mikroskop an der dunkelbraunen Farbe erkannt. Nach einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkohollösung und Xylol dehydriert. Die Schnitte wurden abschließend mit Deckglas bedeckt und unterm Mikroskop analysiert.

2.7.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung ist die am weitesten verbreitete Routinefärbemethode zur morphologischen Untersuchung von Gewebeproben. Dabei können einzelne zelluläre Strukturen voneinander unterschieden werden. Die basische und blaue Komponente Hämatoxylin reagiert mit den sauren Anteilen der Zelle (z.B. Nucleinsäuren des Zellkerns). Hingegen reagiert die saure und rote Komponente Eosin mit den basischen Zellkomponenten (z.B. Zytoplasma). Die Gewebeschnitte wurden zuerst mit Hämatoxylin gefärbt und anschließend wurde der überschüssige blaue

Farbstoff mit dem Leitungswasser ausgewaschen. Danach erst wurden die Schnitte mit Eosin gefärbt, wobei sie anschließend mit Salzsäure ausgewaschen wurden.

2.7.4. Sirius Red-Färbung

Sirius Red ist ein anionischer Farbstoff, der aufgrund seiner Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Kollagenmolekül anfärbt. Dabei werden die Kollagenfasern rot dargestellt, während Muskelfasern und Zytoplasma gelb erscheinen. Eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Kollagen ist die Benutzung des polarisierten Lichts. Dabei färben sich große Fibrillen gelb-orange, kleine hingegen grün unter dem Mikroskop. Die Gewebeschnitte wurden in der Sirius Red-Lösung für eine Stunde gefärbt, wobei sich die Schnitte rötlich gefärbt haben. Danach wurde die Färbung mit Salzsäure differenziert.

2.7.5. Zytochemische Färbung humaner SMC

Zur zytochemischen Färbung humaner SMC wurden diese auf Coverslips mit 10 mm Durchmesser in 24-Well Platten ausgesät. Bei einer Konfluenz von 50-80% wurden die Zellen stimuliert (s. Tab. 2.16), und nach einer Inkubationszeit von 48h mit Paraformaldehyd (4%) für 40 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen durch Inkubation mit Triton X-100 (0,1%) permeabilisiert und mit einer Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt. Dann wurden die Zellen mit einem Primärantikörper gegen HuR oder PAR-4 (s. Tab. 2.9) über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mehrmals gewaschen und mit einem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur behandelt. Nach erneutem Waschen wurden 5 µL Roti[®]-Mount FluorCare DAPI (Carl Roth) auf leere Objektträger getan und anschließend die Cover Slips mit der oberen Seite nach unten zum Roti[®]-Mount gerichtet auf die Objektträger vorsichtig gelegt. Die anschließende Analyse der Färbung erfolgte am Axio Imager.M2 Mikroskop. Fluoreszenzbilder wurden mit der AxioCam HRC Kamera aufgenommen und mittels der Axiovision Software analysiert. Als Negativkontrolle dienten bei dieser Färbung stets Zellen, die nicht mit einem Primärantikörper behandelt wurden.

2.8. Molekularbiologische Methoden

2.8.1. RNA-Isolation und Messung der mRNA-Konzentration

Gewebeproben wurden in peqGOLD TriFast™ mit gentleMACS™ Dissociator homogenisiert und durch die anschließende Zentrifugation von Zelltrümmern separiert. Zellproben hingegen mussten nicht in einem Homogenisator behandelt werden, sondern wurden direkt in peqGOLD TriFast™ lysiert und zur weiteren RNA-Isolation bei -80 °C aufbewahrt. Die RNA wurde mittels einer modifizierten Single-Step-Methode als Gesamt-RNA isoliert. Das benutzte Fertiggemisch (peqGOLD TriFast™) besteht unter anderem aus Guanidiniisothiocyanat (GTC), einem chaotropen Salz, Phenol, Wasser, Natriumacetat und einem Puffer. Durch die Homogenisierung und die Verwendung dieser Detergenzien wurden die Zellen aufgeschlossen. GTC zerstört zelluläre Strukturen, bewirkt die Denaturierung von Proteinen und inaktiviert die bei der Lyse von Zellen freigesetzten RNAsen. Durch saure Phenolextraktion kommt es zur Abtrennung der RNA von anderen Nukleinsäuren. Darauf folgend wurde zur Fällung der DNA dem Überstand 200µL Chloroform zugesetzt. Die Proben wurden 30 Sekunden geschüttelt und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation (13200 rpm; 15 min; 4 °C) wurde die obere farblose Phase zur Fällung der RNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 450µL Isopropanol versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation (13200 rpm; 30 min; 4 °C) hatte sich die RNA von gelartiger Konsistenz auf dem Boden des Reaktionsgefäßes abgesetzt. Der Isopropanol-Überstand wurde entfernt und die RNA mit 500 µL Ethanol (75%) gewaschen und erneut zentrifugiert (13200 rpm; 5 min; 4 °C). Der Überstand wurde wieder vorsichtig entfernt und das RNA-Pellet für 5 min bei 37 °C getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 20 µL RNase-freiem Wasser für 10 min bei 65 °C gelöst und mit der nachfolgenden Behandlung mit DNase I von der noch vorhandenen DNA befreit. Anschließend wurde die mRNA-Konzentrationsbestimmung am Nanodrop durchgeführt. Bei dieser spektralphotometrischen Konzentrationsbestimmung misst man die optische Dichte bei $\lambda=260$ nm (OD260), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (DNA, RNA), und bei $\lambda=280$ nm (OD280), dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Ob die Probe mit genomischer DNA oder Proteinen verunreinigt ist, kann durch den Quotienten aus OD260 und OD280 ermittelt werden. Bei reiner RNA sollte das Verhältnis ungefähr bei 2,0

liegen. Liegt der Wert unterhalb ist die Probe mit Proteinen, genomischer DNA und/oder aromatischen Substanzen kontaminiert, und wird daher verworfen.

2.8.2. cDNA-Synthese mittels reverser Transkription

Reverse Transkription-PCR (RT-PCR) kombiniert mit der bei 2.5.4. beschriebenen Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine ausgezeichnete Methode, um die Genexpression von spezifischen Genen nachzuweisen. Da mittels PCR-Reaktion keine RNA vervielfältigt werden kann, geht bei der RT-PCR der eigentlichen PCR-Reaktion zunächst eine andere enzymatische Reaktion voraus. Mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) wird mit RNA als Matrize eine einzelsträngige DNA-Kopie (cDNA = „complementary“ DNA) erstellt. Um aus der isolierten RNA die cDNA zu synthetisieren, wurden maximal 1 µg der Gesamt-RNA in 7 µL *Aqua dest.* aufgenommen und bei weiteren Reaktionen eingesetzt. Die reverse Transkriptase ist eine RNA- und DNA-abhängige Polymerase, die in der Lage ist, eine stabile doppelsträngige cDNA zu synthetisieren. Sie wurde gemeinsam mit Random Hexamer, 10x Reaktionspuffer und dNTP Mix (10 mM) zu der RNA-Probe hinzugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte zunächst für 10 min bei 25 °C, um eine Anlagerung des Hexamers zu ermöglichen. Danach lief die Synthese für 2 h bei 37 °C, der optimalen Arbeitstemperatur der reversen Transkriptase. Durch die anschließende Inkubation für 10 min bei 85 °C wurde die reverse Transkriptase inaktiviert. Die so erhaltene cDNA wurde als Template für die Real-Time quantitative PCR verwendet.

2.8.3. Real Time quantitative PCR (qPCR) Analyse

Die qPCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht. So kann auf die Anfangskonzentration der Proben geschlossen werden. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende der PCR wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedin-

gungen herrschen. Für die Analyse wurde der in die doppelsträngige DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen eingesetzt. SYBRGreen ist ein unsymmetrischer Cyaninfarbstoff, der in der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA mit einer etwa 100mal höheren Affinität als Ethidiumbromid bindet. Somit ist dieser Farbstoff sehr gut geeignet, um die Akkumulation doppelsträngiger PCR-Produkte in der qPCR sichtbar zu machen. SYBRGreen zeigt in der Gegenwart von doppelsträngiger DNA eine Absorption bei $\lambda=480$ nm (blau) und eine Emission im grünen Wellenlängenbereich von $\lambda=520$ nm. Die emittierte Fluoreszenz wird bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt. Die Intensität des erhaltenen Signals lässt sich direkt proportional mit der Zahl der vorhandenen Doppelstränge korrelieren. Anders als bei Sonden-basierenden Systemen steigt bei der Verwendung von SYBRGreen sowohl das Signal spezifischer als auch unspezifischer Produkte. Aufgrund dessen ist die Auswahl von hochspezifischen Primern eine Grundvoraussetzung dieser Analysen. Zur Überprüfung der Spezifität wird nach der Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei werden die Proben unter der Annealing-Temperatur abgekühlt und anschließend wird die Temperatur langsam erhöht. Durch das Erreichen der Schmelztemperatur des jeweiligen Amplifikats, fällt das Fluoreszenzsignal ab. Ein spezifisches Produkt ist zu erwarten, wenn ein schmaler, einzelner Fluoreszenzpeak detektiert werden kann. Die Quantifizierung der qPCR basiert auf der Bestimmung des Zyklus, bei dem der Fluoreszenz-Schwellenwert erreicht wird (Threshold Cycle, CT-Wert). Der CT-Wert ist der PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Ab diesem Zeitpunkt ist die Amplifikation des PCR-Produktes exponentiell. Um eine Aussage über die Menge an PCR-Produkt machen zu können, diente als Ladekontrolle das 18S, das in einem parallelen Ansatz gemessen wurde, um die relative Quantifizierung zu ermöglichen. Dabei wird die unterschiedliche Expression als n-fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wertes angegeben. Wichtig bei diesem Verfahren ist eine gleiche Effizienz der beiden beteiligten PCR-Reaktionen. Die CT-Werte der Referenz und der untersuchten Proben werden hierbei voneinander abgezogen ($\text{CT-Probe} - \text{CT-Referenz} = \Delta\text{CT}$), die beiden ΔCT -Werte der einzelnen Gruppen (behandelt und unbehandelt) voneinander abgezogen ($\Delta\text{CT-Behandlung} - \Delta\text{CT-Kontrolle} = \Delta\Delta\text{CT}$) und in die Gleichung $n\text{-fache Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ eingesetzt.

2.9. Statistik

Die aufgeführten Daten in dieser Arbeit sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) n-unabhängigen Einzelexperimenten dargestellt, und wurden auf die unbehandelte oder nicht-diabetische Kontrolle normalisiert. Statistische Analyse wurde dabei mittels der Statistik-Software GraphPad Prims 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) und Microsoft Excel™ (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) durchgeführt. Dabei wurde Students t-Test für den Vergleich von zwei Datensätzen verwendet. Für den Vergleich mehrerer Versuchsgruppen wurde der *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) mit anschließendem Dunnet's oder Tukey post-hoc Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde als $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Erhöhte PAR-4-Expression in Proben diabetischer Patienten

Vor einigen Jahren berichtete die Arbeitsgruppe über eine Hochregulation von Protease-aktivierendem Rezeptor-4 (PAR-4) in kultivierten glatten Muskelzellen (SMC) aus humanen Koronararterien und *Vena saphena* nach Stimulation mit einer hohen Glukosekonzentration.[39] In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass eine PAR-4-Hochregulation auch in Gefäßen humaner Diabetes-Patienten stattfindet.

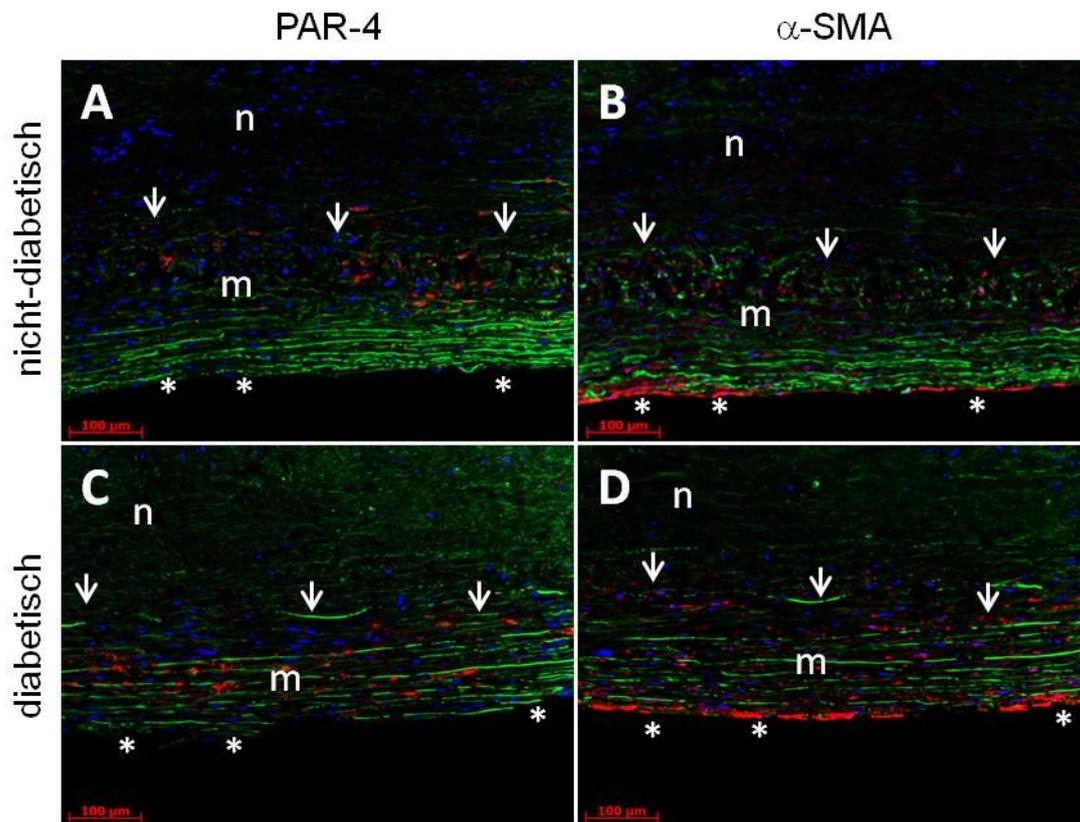


Abb. 3.1: Immunfluoreszenz-Färbung humaner Atherektomien I. Repräsentative Bilder einer **A, C)** PAR-4 Färbung und **B, D)** α -SMA-Färbung. **A, B)** Proben nicht-diabetischer Patienten mit n=13 und **C, D)** Proben diabetischer Patienten mit n=9 (**m**: *Tunica media*; **n**: Neointima; *****: Bereich der α -SMA-positiven differenzierten SMC; mit Pfeilen ist der luminaler Bereich der *Tunica media* abgegrenzt). PAR-4 und α -SMA sind in rot dargestellt. Grüne Autofluoreszenz ist gezeigt für eine bessere Darstellung der Gefäßstrukturen. Nuclei sind in blau dargestellt. Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung.

Immunfluoreszenz-Färbung humaner Atherektomien zeigte eine stärkere PAR-4-Expression in Proben diabetischer Patienten im Vergleich zu den Proben nicht-diabetischer Patienten (Abb. 3.1 + 3.2). Eine starke PAR-4-Expression war vor allem im Bereich der *Tunica media* sichtbar (Abb. 3.1 + 3.2, mit „m“ gekennzeichnet). Konsekutivschnitte mit zusätzlicher α -SMA-Färbung (*alpha smooth muscle actin*) zeigten, dass sich die PAR-4-Expression in der *Tunica media* auch in den Bereichen mit geringer oder keiner α -SMA-positiver Färbung konzentriert hat (Abb. 3.2). Es gab jedoch auch Bereiche mit sowohl starker PAR-4- als auch starker α -SMA-Expression. Eine sichtbare positive PAR-4-Färbung wurde auch in der Neointima gefunden, aber auch hier mit wenigen positiven α -SMA-Zellen (Abb. 3.2, mit „n“ gekennzeichnet).

Quantifizierung der PAR-4-Färbung ergab wie an den Bildern bereits erkennbar, eine stärkere PAR-4-Immunreaktivität in der *Tunica media* in Proben diabetischer Patienten im Vergleich zu den Proben nicht-diabetischer Patienten (Abb. 3.3, A). Die Fluoreszenz-Intensität nicht-diabetischer Proben lag bei $284,5 \pm 13,78$ arbitrary units, und die Fluoreszenz-Intensität diabetischer Proben bei $350,3 \pm 20,84$ arbitrary units. Die gemessene Fluoreszenz-Intensität diabetischer Proben war damit insgesamt um 23% stärker als die nicht-diabetischer Kontrollen. Im Gegensatz zur *Tunica media*, gab es in der Neointima keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb. 3.3, B). Zusätzlich zur Fluoreszenz-Intensität wurde auch die Größe der Media-Fläche, auf der die PAR-4-Expression untersucht und quantifiziert wurde, bestimmt. Diese war in den Proben beider Gruppen ähnlich groß (Abb. 3.3, C). Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchung humaner Atherektomien wurden durch die Western Blot Methode verifiziert.[51] Auch hier war ein signifikanter Anstieg der PAR-4 Expression in den Proben diabetischer Patienten im Vergleich zu den Proben nicht-diabetischer Patienten erkennbar. Zusätzlich wurde mittels qPCR die PAR-4-Expression auch auf RNA-Ebene untersucht. Die qPCR-Analyse ergab einen signifikanten Anstieg der PAR-4-mRNA in den Atherektomien diabetischer Patienten im Vergleich zu Proben nicht-diabetischer Patienten (Abb. 3.3, D). In Proben diabetischer Atherektomien war eine um 9-fach erhöhte PAR-4-mRNA-Expression als in Proben nicht-diabetischer Kontrollen sichtbar.

In humanen Koronararterien konnte ebenfalls eine erhöhte PAR-4 Expression in den Proben diabetischer Patienten im Vergleich zu den Proben nicht-diabetischer Patienten beobachtet werden (Abb. 3.4). Bei der geringen n-Zahl konnte leider keine aussagekräftige Quantifizierung durchgeführt werden.

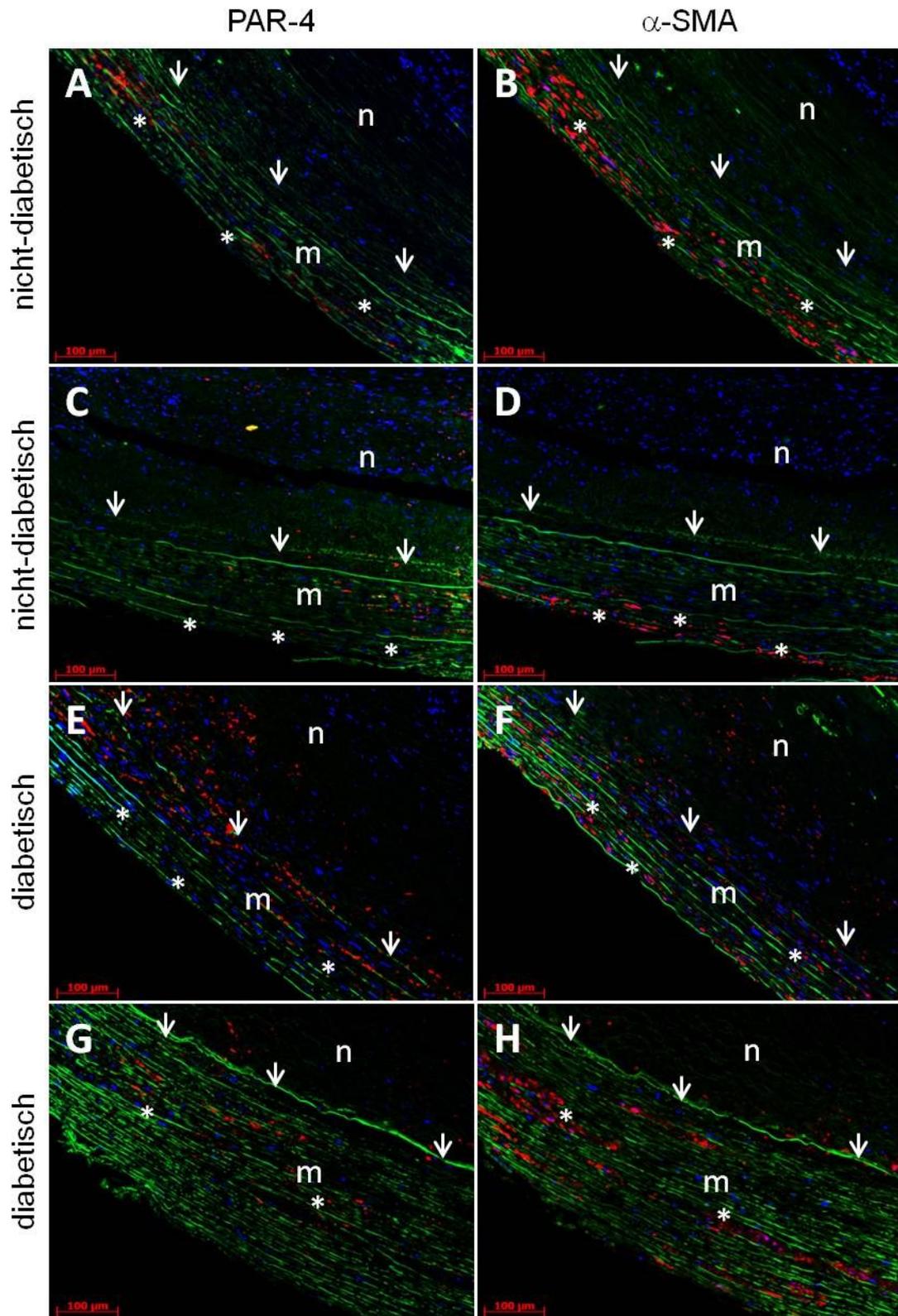


Abb. 3.2: Immunfluoreszenz-Färbung humaner Atherektomien II. Repräsentative Bilder der **A, C, E, G** PAR-4- und **B, D, F, H** α -SMA-Färbung. **A-D**) Proben nicht-dabetischer Patienten mit n=13 und **E-H**) Proben diabetischer Patienten mit n=9 (**m**: *Tunica media*; **n**: Neointima; *: Bereich der α -SMA-positiven differenzierten SMC; mit Pfeilen ist der luminaler Bereich der *Tunica media* abgegrenzt). PAR-4 und α -SMA sind in rot dargestellt. Grüne Autofluoreszenz ist gezeigt für eine bessere Darstellung der Gefäßstrukturen. Nuclei sind in blau dargestellt. Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung.

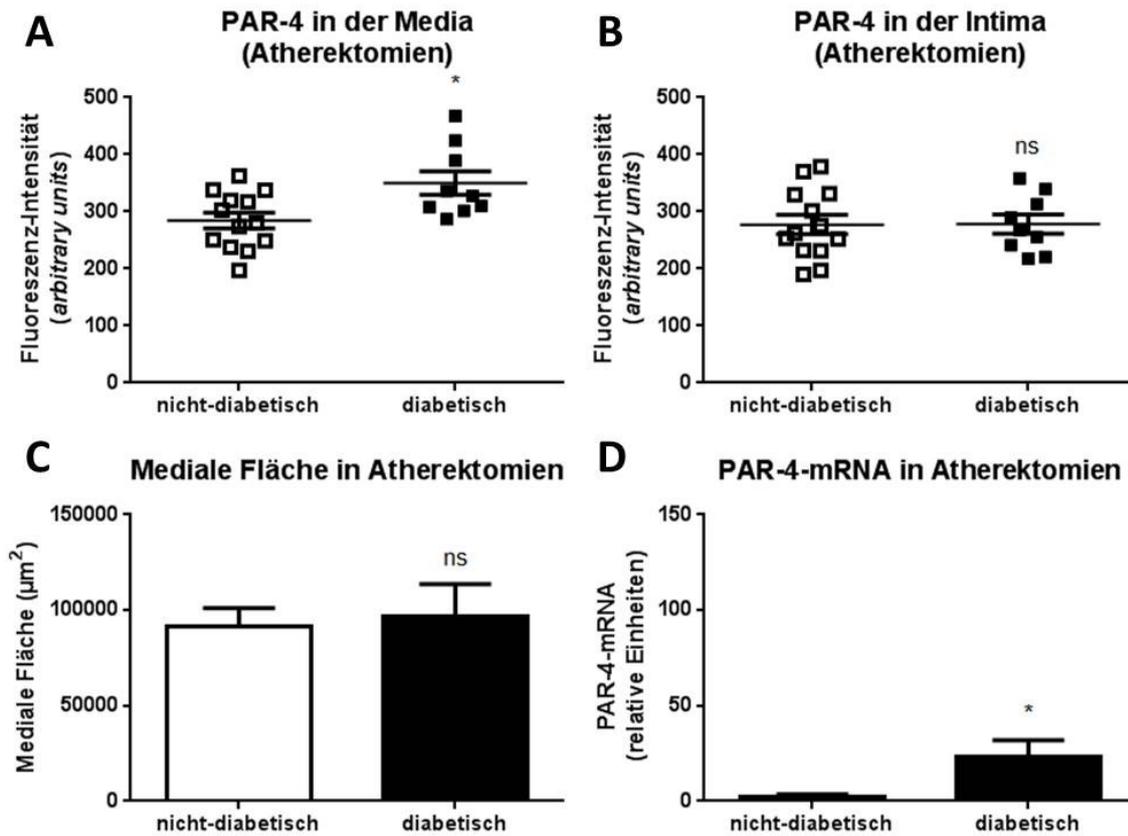


Abb. 3.3: Quantifizierung der PAR-4-Immunfluoreszenz und PAR-4-mRNA-Expression in humanen Atherektomien. Bestimmung der PAR-4-Fluoreszenz Intensität in der **A)** Tunica media und **B)** Neointima. **C)** Größe der untersuchten Media-Fläche in nicht-diabetischen und diabetischen Proben. Quantifizierung von n=13 nicht-diabetischen und n=9 diabetischen Proben. **D)** Bestimmung der PAR-4 mRNA-Expression in humanen Atherektomien mittels Real-time quantitativer PCR. Quantifizierung von n=12 nicht-diabetischen Proben und n=15 diabetischen Proben. * $p < 0,05$ vs. nicht-diabetische Gruppe.

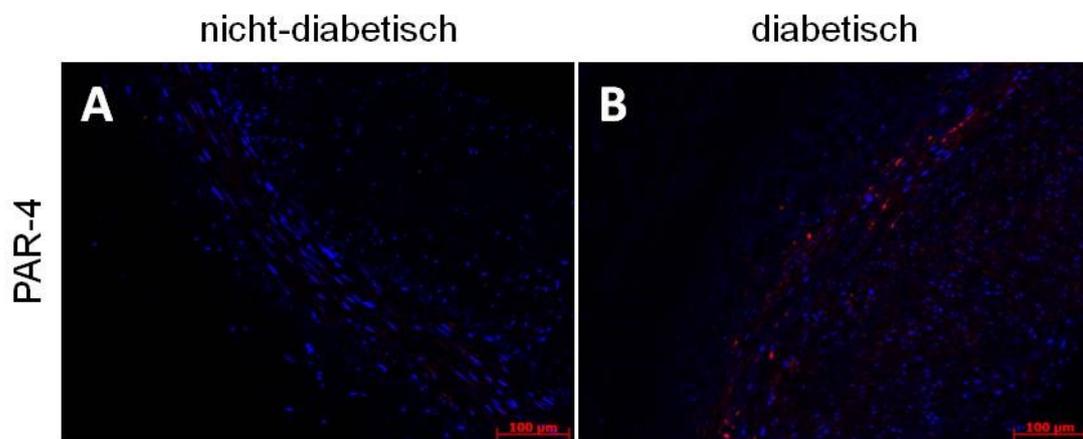


Abb. 3.4: PAR-4-Immunfluoreszenz-Färbung humaner Koronararterien. **A)** Repräsentative Bilder einer PAR-4-Färbung in Proben nicht-diabetischer Patienten und **B)** diabetischer Patienten (n=3). PAR-4 ist in rot dargestellt. Nuclei sind in blau dargestellt. Aufnahmen in 100-facher Vergrößerung.

Analog zu den Atherektomien wurden auch humane *Vena saphena*-Proben von Bypass-Patienten auf PAR-4-Expression untersucht. Immunfluoreszenz-Färbung der Venen ergab wie in den Atherektomien eine verstärkte PAR-4-Expression in Proben diabetischer Patienten im Vergleich zu Proben nicht-diabetischer Patienten (Abb. 3.5). Anhand der morphologischen Untersuchung und der Konsektivschnitte, welche auf α -SMA hin gefärbt und untersucht wurden, war erkennbar, dass die PAR-4-Expression auch hier hauptsächlich in der Media stattfand (Abb. 3.5, mit „m“ gekennzeichnet).

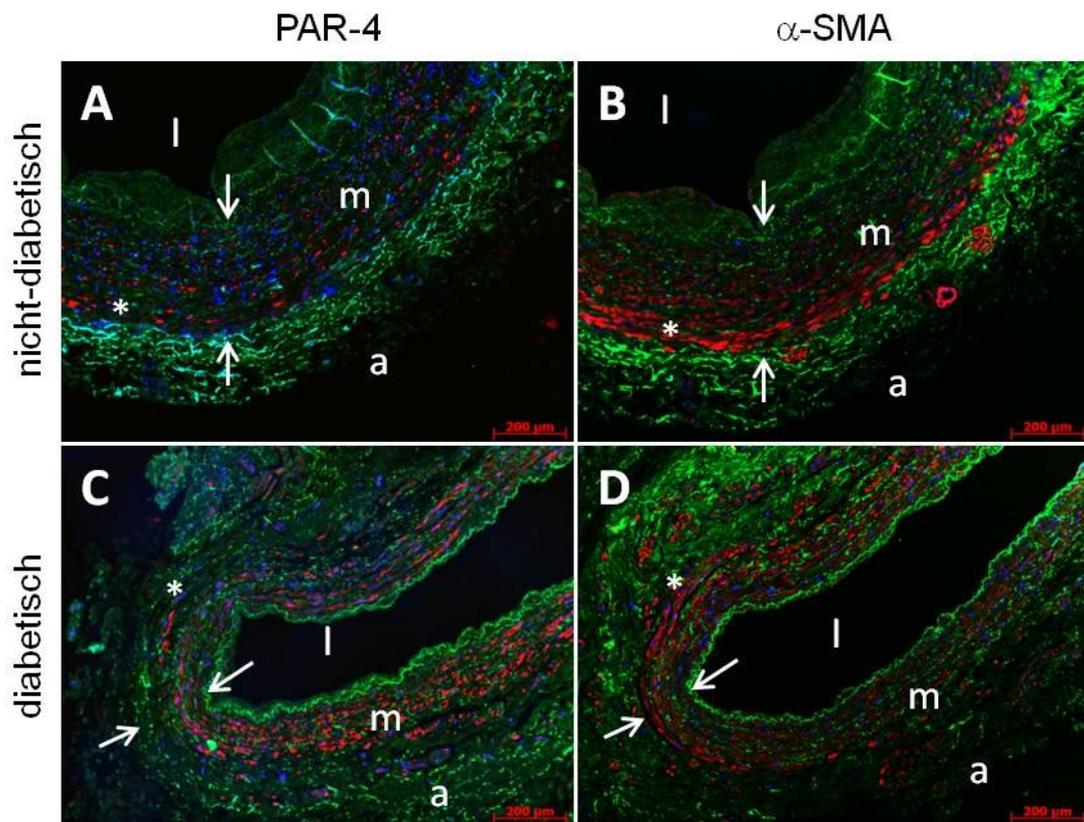


Abb. 3.5: Immunfluoreszenz-Färbung humaner Venen. Repräsentative Bilder einer **A, C)** PAR-4- und **B, D)** α -SMA-Färbung. **A, B)** Proben nicht-diabetischer Patienten mit n=9 und **C, D)** Proben diabetischer Patienten mit n=9 (**m**: *Tunica media*; **l**: Lumen; **a**: Adventitia; *****: Bereich der α -SMA-positiven differenzierten SMC; mit Pfeilen ist der Bereich der *Tunica media* eingegrenzt). PAR-4 und α -SMA sind in rot dargestellt. Grüne Autofluoreszenz ist gezeigt für eine bessere Darstellung der Gefäßstrukturen. Nuclei sind in blau dargestellt. Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

Bei den Venen ergab die Quantifizierung der PAR-4-Färbung wie bei den Atherektomien, eine stärkere PAR-4-Immunreaktivität in der *Tunica media* in Proben diabetischer Patienten im Vergleich zu Proben nicht-diabetischer Patienten (Abb. 3.6, A). Mittlere PAR-4-Fluoreszenzintensität in der Media nicht-diabetischer Proben lag bei

223,4 ± 8,618 *arbitrary units* und diabetischer Proben bei 271,6 ± 18,05 *arbitrary units*. Die gemessene Fluoreszenz-Intensität diabetischer Proben war damit insgesamt um 22% stärker als die nicht-diabetischer Kontrollen. Ebenfalls wurden qPCR Versuche durchgeführt, um die PAR-4-Expression auch auf der RNA-Ebene zu untersuchen. Die qPCR-Analyse ergab einen signifikanten Anstieg der PAR-4-mRNA in Venen diabetischer Patienten verglichen mit Venen nicht-diabetischer Patienten (Abb. 3.6, B).

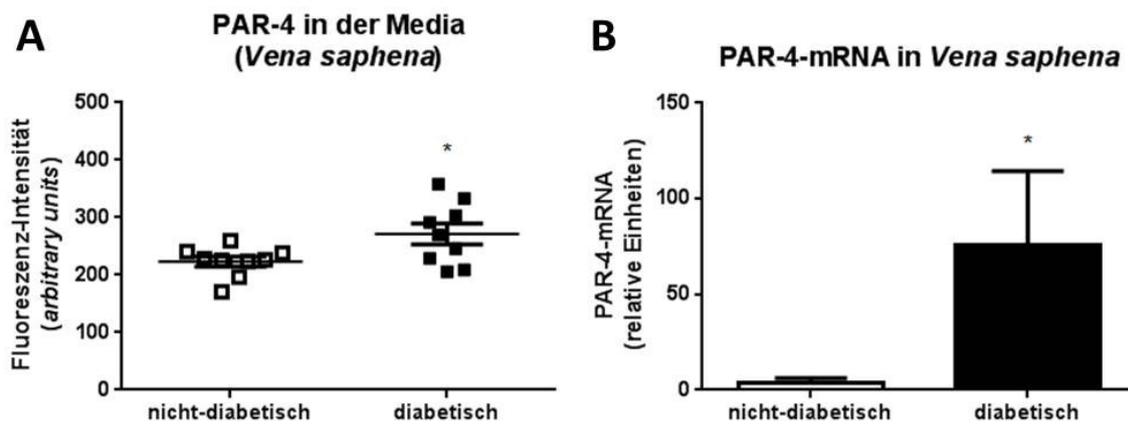


Abb. 3.6: Quantifizierung der PAR-4-Immunfluoreszenz und PAR-4-mRNA-Expression in humanen Venen. **A)** Bestimmung der PAR-4-Fluoreszenz Intensität in der *Tunica media*. Quantifizierung von n=9 nicht-diabetischen und n=9 diabetischen Proben. **B)** Bestimmung der PAR-4 mRNA-Expression in humanen Venen mittels Real-time quantitativer PCR. Quantifizierung von n=10 nicht-diabetischen Proben und n=6 diabetischen Proben. *p<0,05 vs. nicht-diabetische Gruppe.

3.2. Posttranskriptionelle Regulation von PAR-4 in humanen SMC mit simulierter Hyperglykämie

Der molekulare Mechanismus der erhöhten PAR-4-Expression in diabetischen Gefäßen wurde in kultivierten humanen glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) näher untersucht. Der Fokus lag hierbei auf einer möglichen posttranskriptionellen Regulation durch den mRNA-stabilisierenden Faktor HuR (*Human antigen R*). Hierfür wurde eine zeitabhängige Stimulation mit hoher Glukosekonzentration (25 mmol/L) an humanen venösen SMC durchgeführt (Abb. 3.7). Vor der Stimulation (Abb. 3.7, 0h) war eine positive HuR-Färbung ausschließlich im Nucleus lokalisiert. Infolge der Stimulation mit hoher Glukosekonzentration war eine langsam ansteigende HuR-Translokation, auch als Shuttling bekannt, aus dem Kern ins Cytosol sichtbar (Abb.

3.7, 1h). Nach einer dreistündigen Stimulation war die maximale Translokation sichtbar (Abb. 3.7, 3h), und sogar nach sechs Stunden konnte man immer noch eine starke Translokation sehen (Abb. 3.7, 6h).

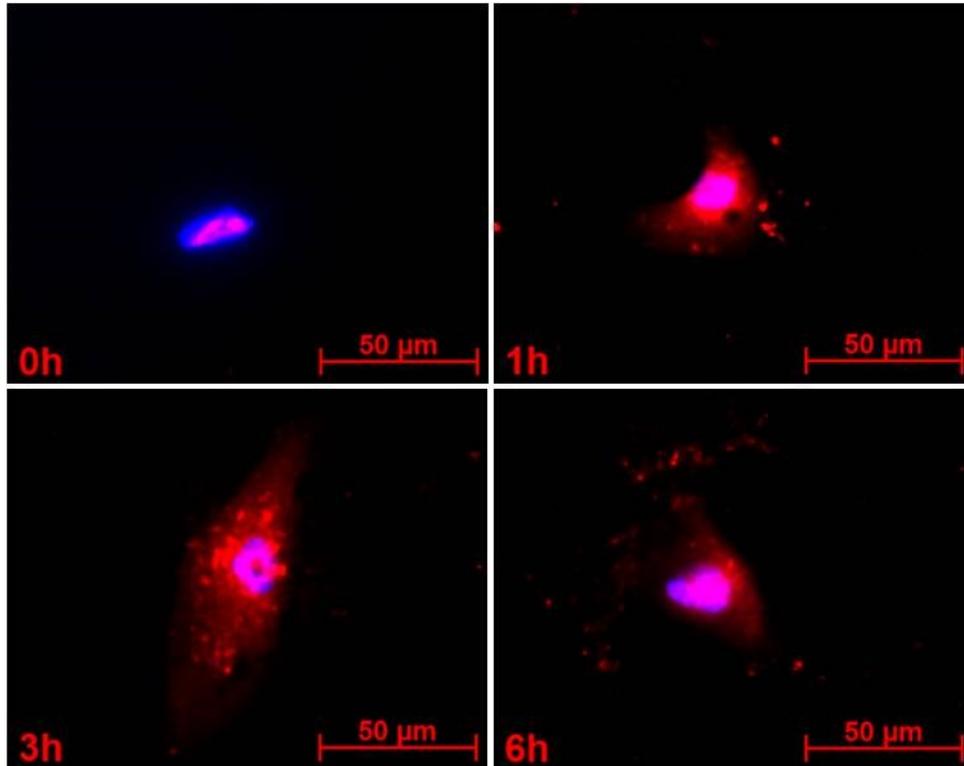


Abb. 3.7: HuR-Immunfluoreszenz-Färbung humaner venöser SMC. HuR-Färbung nach einer Stimulation mit hoher Glukosekonzentration (25 mmol/L). Gezeigt sind repräsentative Bilder von n=5 unabhängigen Experimenten. HuR ist in rot dargestellt. Nuclei sind in blau dargestellt. Aufnahmen in 400-facher Vergrößerung.

Bisherige Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigten dass Knockdown von HuR mittels siRNA die Glukose-induzierte PAR-4-Expression hemmt. Ebenfalls konnte der cAMP-Stimulus Cicaprost via HuR-Inhibierung,[52] die PAR-4-Expression in Glukose-behandelten Zellen, aufheben. Nun wurde erstmals untersucht, ob eine nachgeschaltete PKA-Aktivierung für den hemmenden Effekt von Cicaprost verantwortlich ist. Humane venöse SMC wurden mit einer hohen Glukosekonzentration und zwei verschiedene Inhibitoren der PKA (PKI und Rp-8-CPT-cAMPS) behandelt. Nach drei Stunden wurde die Stimulation für die HuR-Färbung beendet, da in Vorversuchen bei drei Stunden die stärkste HuR-Translokation gemessen wurde. Bei der Untersuchung der PAR-4-Expression wurden die Zellen für 48 Stunden stimuliert. Nach der Immunfluoreszenz-Färbung wurden Bilder aufgenommen (Abb. 3.8) und das Ausmaß der HuR-Translokation und PAR-4 Expression quantifiziert (Abb. 3.9).

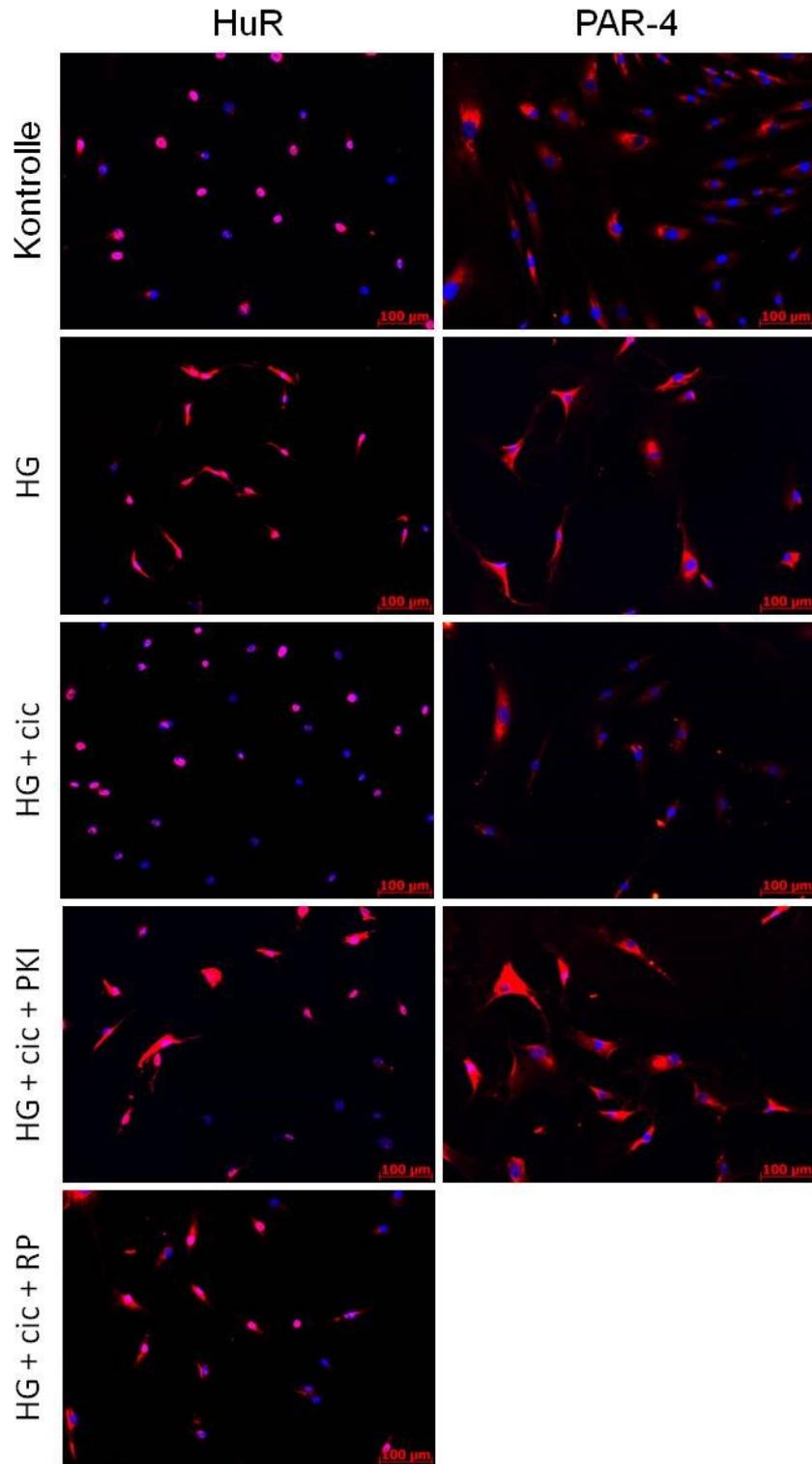


Abb. 3.8: Immunfluoreszenz-Färbung humaner venöser SMC. HuR- und PAR-4-Färbung nach einer Stimulation mit hoher Glukosekonzentration. Gezeigt sind repräsentative Bilder von n=3-4 unabhängigen Experimenten. (**HG**: hohe Glukosekonzentration (25 mmol/L); **cic**: Cicaprost (10 nmol/L); **PKI**: PKA Inhibitor (5 μ mol/L); **RP**: Rp-8-CPT-cAMPS (10 μ mol/L)). HuR und PAR-4 sind in rot dargestellt. Nuclei sind in blau dargestellt. Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

Ergebnisse

Die Quantifizierung der HuR-Translokation zeigte, dass es infolge der Stimulation mit einer hohen Glukosekonzentration zu einem 2,6-fach höheren HuR-Shuttling gegenüber der Kontrolle, kam (Abb. 3.9, A). Dieser Effekt konnte aber durch eine zeitgleiche Behandlung mit Cicaprost wieder auf das basale Niveau gebracht werden. Die Zugabe eines der PKA-Inhibitoren hob den Effekt des Cicaprost wieder auf, und es kam erneut zu einer starken Glukose-induzierten HuR-Translokation. Die fiel sogar etwas stärker aus als bei der Behandlung mit der hohen Glukosekonzentration alleine. Bei der Untersuchung der PAR-4 Expression ergaben sich ähnliche Ergebnisse (Abb. 3.9, B). Eine Stimulation mit hoher Glukose-konzentration führte nach 48 Stunden zum signifikanten Anstieg der PAR-4-Expression in humanen venösen SMC. Cicaprost hob diesen Effekt wieder auf, während die zusätzliche Gabe von PKI den signifikanten Anstieg wieder herstellte.

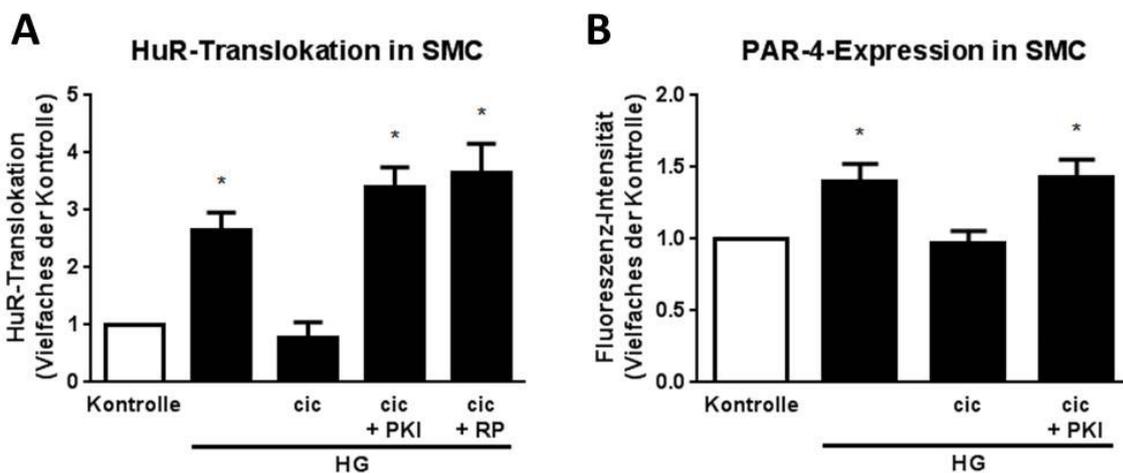


Abb. 3.9: Quantifizierung der HuR- und PAR-4-Immuno fluoreszenz in humanen venösen SMC. A) Quantitative Analyse der HuR-Translokation (n=4) und der B) PAR-4-Immuno fluoreszenz Intensität in humanen venösen SMC (n=3) (HG: hohe Glukosekonzentration (25 mmol/L); cic: Cicaprost (10 nmol/L); PKI: PKA Inhibitor (5 μ mol/L); RP: Rp-8-CPT-cAMPS (10 μ mol/L)). *p<0,05 vs. Kontrolle.

3.3. Hyperglykämie erhöht PAR-4-Expression in STZ-behandelten Mäusen

Ob erhöhte Glukosespiegel auch *in vivo* zu einer verstärkten vaskulären Expression von PAR-4 führen, wurde dies nun in einem Mausmodell des Typ-1-Diabetes in diabetischen Mäusen untersucht. Dabei wird Mäusen das Streptozotocin (STZ) injiziert, einen Nitrosoharnstoff, der toxisch für die β -Zellen der Bauchspeicheldrüse ist.

Zunächst wurden drei Wochen nach der STZ- oder Citratpuffer-Behandlung die Bauchspeicheldrüsen den Mäusen entnommen und die Langerhansschen Inseln auf Insulinproduktion hin untersucht. Eine immunhistochemische Insulin-Färbung zeigte in den STZ-behandelten Mäusen im Vergleich zu den Citratpuffer-behandelten Kontrolltieren, eine nur sehr schwache Insulinproduktion (Abb. 3.10, B, C). Dies deutete auf eine erfolgte STZ-Toxizität gegenüber β -Zellen hin.

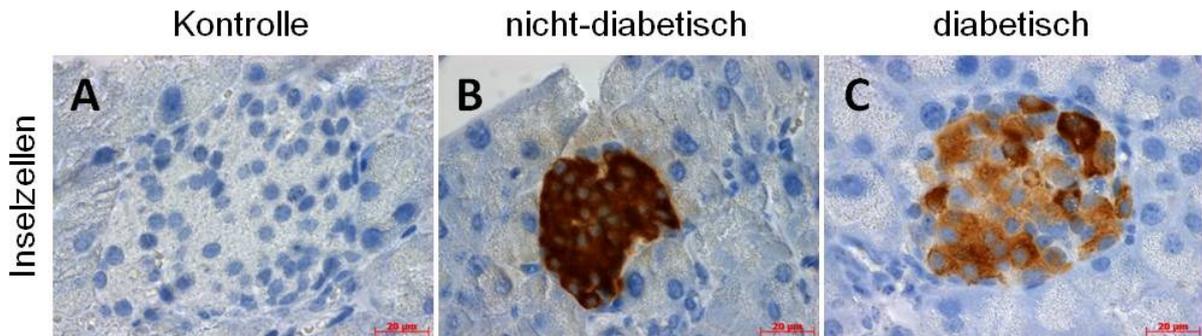


Abb. 3.10: Insulin-Färbung muriner Inselzellen. Murine Langerhanssche Inseln wurden auf Insulin-Expression hin untersucht drei Wochen nach einer STZ- oder Citratpuffer-Behandlung. Gezeigt sind repräsentative Bilder von $n=4$ unabhängigen Experimenten. **A)** Negativkontrolle der Färbung. **B)** Insulin-Färbung nicht-diabetischer und **C)** diabetischer Mäuse. Insulinproduktion ist in braun dargestellt. Nuclei sind in blau dargestellt. Aufnahmen in 1000-facher Vergrößerung.

Infolge der STZ-induzierten Zerstörung der Pankreaszellen und somit infolge des Verlustes der Insulinproduktion entwickelten die Tiere eine ausgeprägte Hyperglykämie. Drei Wochen nach STZ-Behandlung war der Blutglukosewert signifikant erhöht auf $448,3 \pm 12,74$ mg/dL, während in Citratpuffer-behandelten Tieren der Blutglukosespiegel bei $184,8 \pm 10,96$ mg/dL lag (Abb. 3.11, A). Eine Ketoazidose konnte bei beiden Behandlungen, den STZ- und auch bei den Citratpuffer-behandelten Mäusen, ausgeschlossen werden. Die β -Hydroxybutyrat-Konzentration im Urin lag stets unter 20 mg/g Creatinin, dem Schwellenwert für eine Ketoazidose (Abb. 3.11, B). Gleichzeitig konnte ein signifikanter Anstieg der vaskulären PAR-4-Expression in diabetischen Mäusen beobachtet werden. In Aorten diabetischer Mäuse war PAR-4-mRNA um 9-fach höher als in Aorten nicht-diabetischer Kontrollen (Abb. 3.11, C). PAR-1-mRNA zeigte keinen Unterschied zwischen den diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen (Abb. 3.11, D).

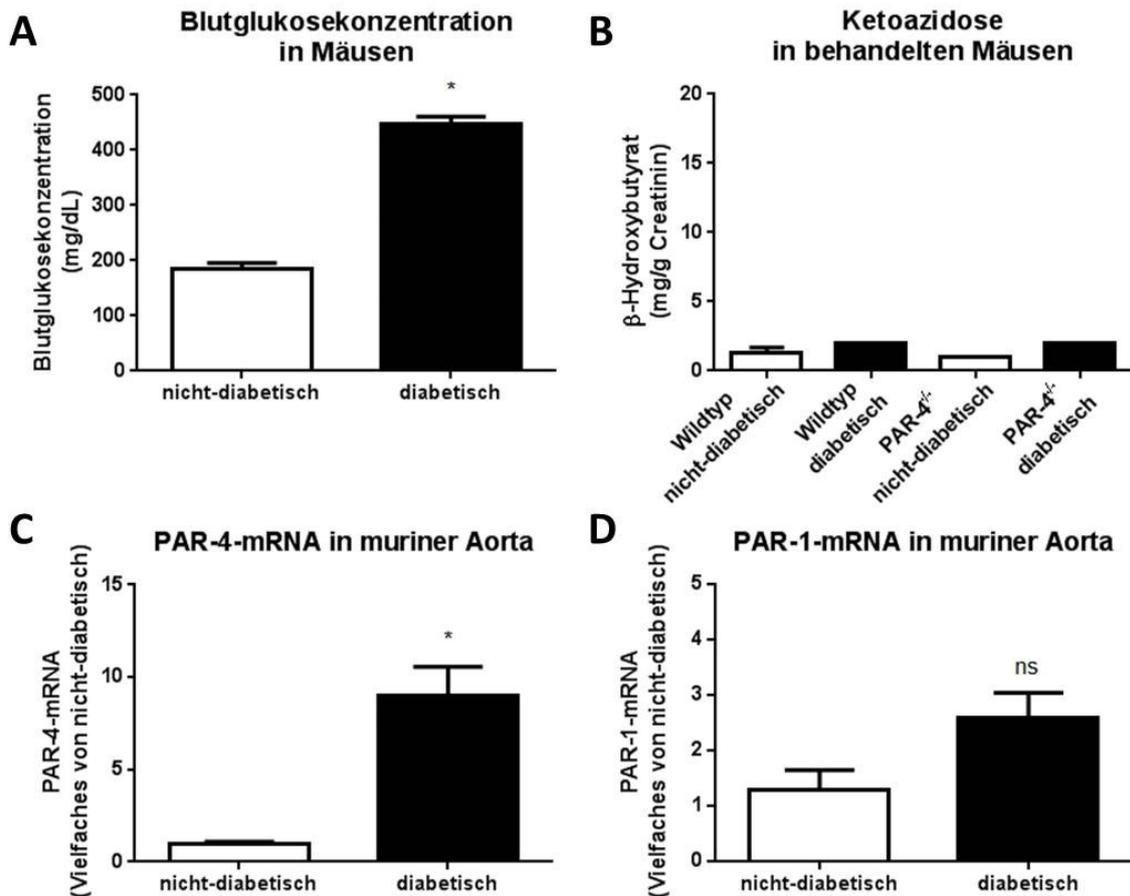


Abb. 3.11: Quantifizierung des Glukosespiegels und der PAR-mRNA-Expression in Mäusen. **A)** Bestimmung des Glukosespiegels im Blut diabetischer und nicht-diabetischer Mäuse drei Wochen nach einer STZ- bzw. Citratpuffer-Behandlung (n=4). **B)** Untersuchung einer möglichen Ketoazidose anhand der β -Hydroxybutyratkonzentration (>20 mg/g Creatinin) im Urin nicht-diabetischer und diabetischer Tiere drei Wochen nach der Behandlung (n=2-3). **C)** Bestimmung der PAR-4- und **D)** PAR-1-mRNA-Expression in murinen Aorten mittels Real-time quantitativer PCR (n=4). *p<0,05 vs. nicht-diabetische Gruppe.

Analyse der vaskulären PAR-4-Expression auf Protein-Ebene wurde mittels Immunfluoreszenz-Färbungen der Aorten und linken Carotiden durchgeführt. Sowohl in den Aorten als auch in den Carotiden diabetischer Mäuse zeigte sich eine erhöhte PAR-4 Expression im Vergleich zu nicht-diabetischen Mäusen (Abb. 3.12).

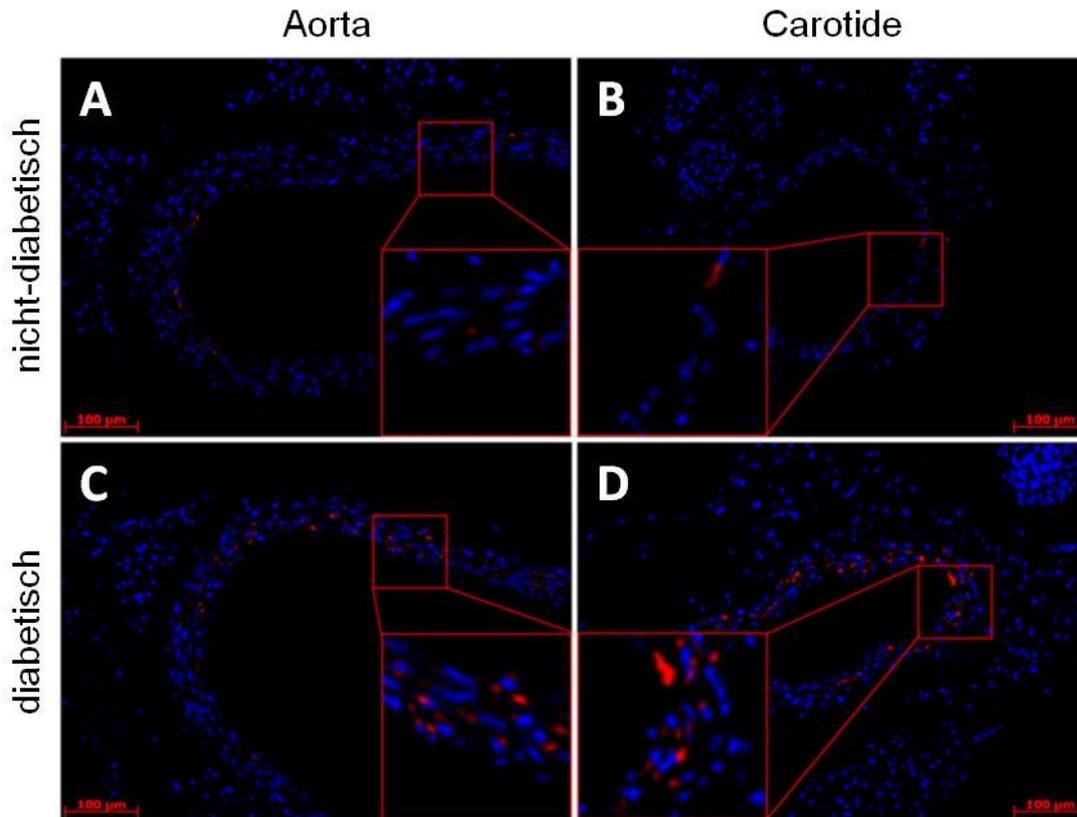


Abb. 3.12: PAR-4-Immunfluoreszenz-Färbung muriner Gefäße. Untersuchung der PAR-4-Expression in Gefäßen aus diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen drei Wochen nach einer STZ- bzw. Citratpuffer-Behandlung. **A, C)** Repräsentative Bilder einer PAR-4-Färbung in der Aorta und **B, D)** in den Carotiden. **A, B)** Proben nicht-diabetischer Mäuse und **C, D)** Proben diabetischer Mäuse (n=4). Ausschnitte zeigen vergrößerte Regionen, gekennzeichnet mit roten Vierecken. PAR-4 ist in rot dargestellt. Nuclei sind in blau dargestellt. Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

3.4. PAR-4-Defizienz schützt vor verstärkter neointimaler Hyperplasie in diabetischen Mäusen

Nach dem erfolgten Nachweis des Diabetes und der dadurch erhöhten PAR-4-Expression in STZ-behandelten Mäusen, wurde die Auswirkung dieser Veränderung auf das vaskuläre Remodeling untersucht. Hierfür wurde ein Modell der Ligatur-induzierten neointimalen Hyperplasie angewandt. Den Mäusen wurde die linke Carotis ligiert, während die rechte Carotis als Kontrolle diente. Insgesamt wurden vier Tiergruppen untersucht, diabetische und nicht-diabetische Wildtyp-Mäuse, und diabetische und nicht-diabetische PAR-4^{-/-}-Mäuse. Drei Wochen nach Behandlung mit STZ oder Citratpuffer wurde die Ligatur an den Mäusen durchgeführt. Vier Wochen nach der Ligatur wurden die Carotiden entfernt und auf die neointimale Hyperplasie hin untersucht. Anhand der morphologischen Untersuchung der Carotiden mittels

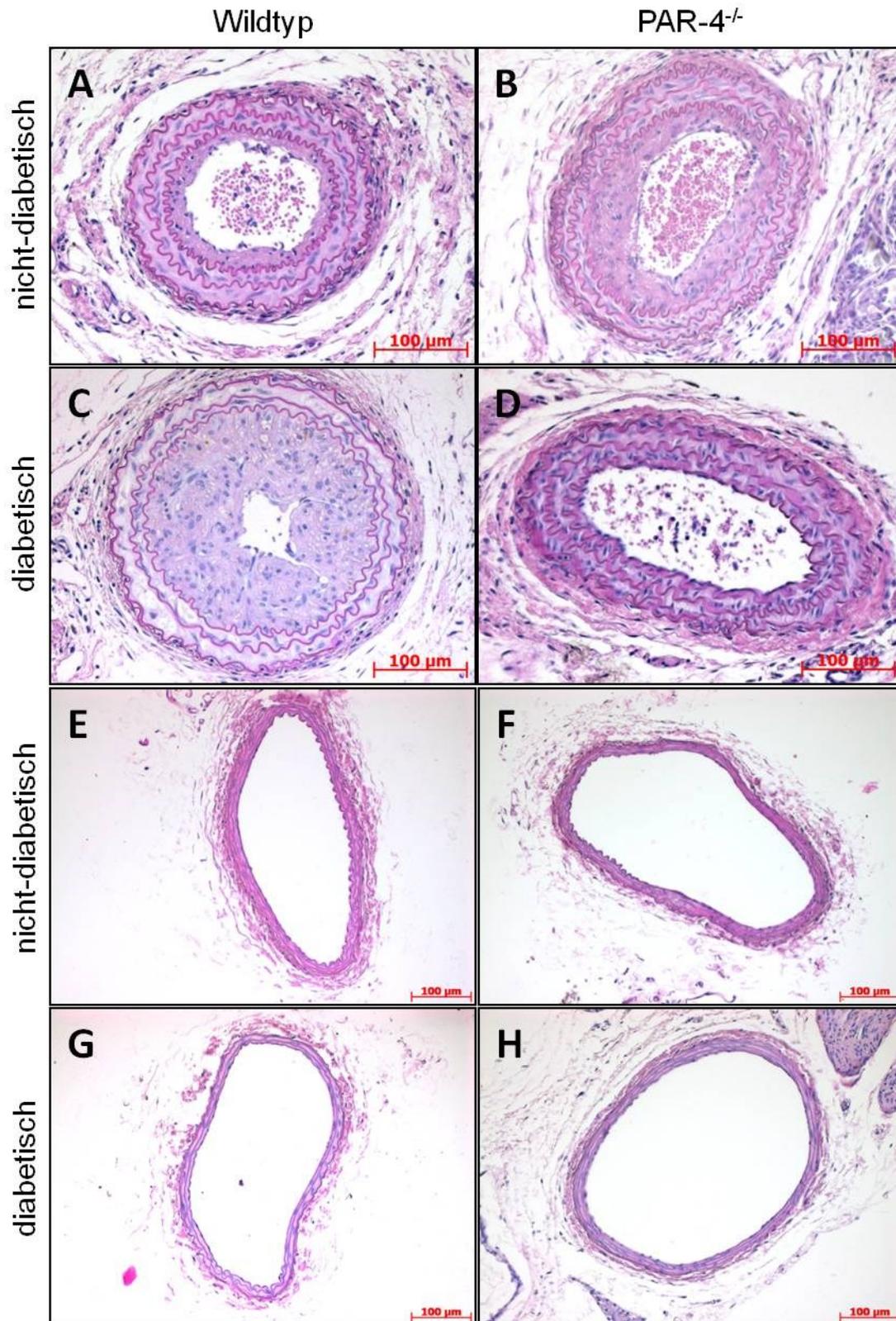


Abb. 3.13: HE-Färbung muriner Carotiden nach einer Ligatur. Neointimale Hyperplasie dargestellt durch eine HE-Färbung in linken Carotiden nicht-diabetischer **A)** Wildtyp- und **B)** PAR-4^{-/-}-Mäuse oder diabetischer **C)** Wildtyp- und **D)** PAR-4^{-/-}-Mäuse. Zusätzlich wurden als Kontrolle die rechten Carotiden nicht-diabetischer **E)** Wildtyp- und **F)** Par-4^{-/-}-Mäuse oder diabetischer **G)** Wildtyp- und **H)** PAR-4^{-/-}-Mäuse untersucht. Repräsentative Bilder der Carotiden vier Wochen nach der Ligatur und 250 µm proximal zur Ligatur in n=6 Mäusen. Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

HE-Färbung zeigten sich starke Unterschiede zwischen diabetischen Wildtyp- und PAR-4^{-/-}-Mäusen. In nicht-diabetischen Wildtyp- bzw. PAR-4^{-/-}-Kontrolltieren war das Ausmaß der neointimalen Hyperplasie vergleichbar (Abb. 3.13, A vs. B). In diabetischen Wildtyp-Mäusen jedoch war die Neointima-Bildung stark fortgeschritten, nicht jedoch in den diabetischen PAR-4^{-/-}-Mäusen (Abb. 3.13, C vs. D). Bei der morphologischen Untersuchung dienten nicht-ligierte rechte Carotiden stets als Kontrolle (Abb. 3.13, E-H). Diese zeigte in keiner der vier Versuchsgruppen eine Neointima-Entwicklung.

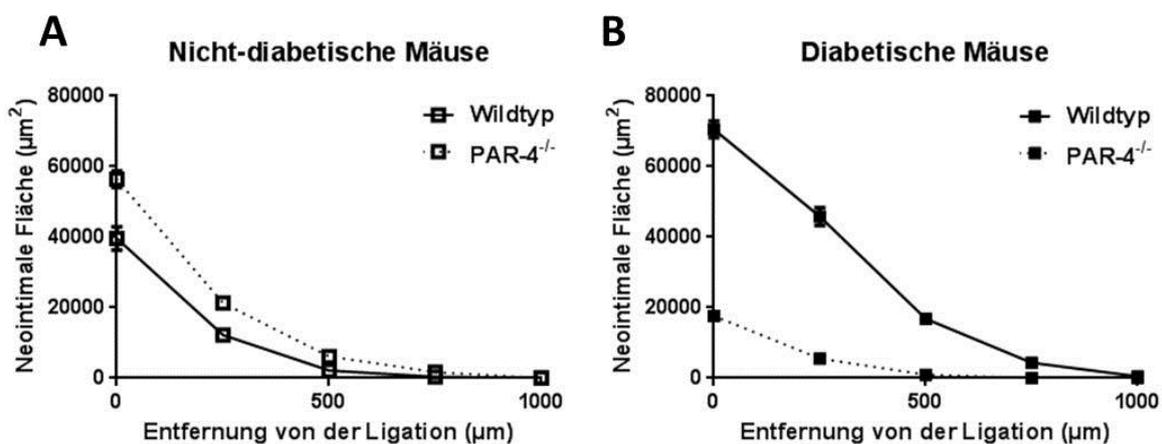


Abb. 3.14: Untersuchung der neointimalen Fläche in ligierten Carotiden. Entwicklung der neointimalen Hyperplasie in linken Carotiden bis zu 1000 µm proximal zur Ligation. Ergebnisse sind in 250 µm Intervallen in **A**) nicht-diabetischen Wildtyp- und Par-4^{-/-}-Mäusen, und **B**) diabetischen Wildtyp- und Par-4^{-/-}-Mäusen dargestellt (n=6).

Es erfolgte eine Quantifizierung der neointimalen Fläche über 1000 µm proximal zur Ligation in Intervallen von 250 µm. Auch hier konnte man an keinem Messpunkt Unterschiede zwischen den nicht-diabetischen Wildtyp- und PAR-4^{-/-}-Mäusen feststellen (Abb. 3.14, A). Hingegen waren an fast jedem Messpunkt Unterschiede zwischen diabetischen Wildtyp- und PAR-4^{-/-}-Mäusen sichtbar (Abb. 3.14, B). Ein Vergleich der Mittelwerte der neointimalen Fläche bestätigte, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den nicht-diabetischen Wildtyp- und PAR-4^{-/-}-Mäusen gab (Abb. 3.15, A). Hingegen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen diabetischen Wildtyp-Mäusen mit einer neointimalen Fläche von $27629 \pm 1837 \mu\text{m}^2$ und diabetischen PAR-4^{-/-}-Mäusen mit einer Fläche von $4847 \pm 855,1 \mu\text{m}^2$ festgestellt werden. Interessanterweise war dieser Wert sogar signifikant niedriger als in nicht-diabetischen Wildtyp- oder PAR-4^{-/-}-Mäusen. Die Zelldichte in den Gefäßen war in beiden diabeti-

schen Gruppen vergleichbar, was auf eine proportionale Reduktion der Zellzahl und der Matrix hinweist. Zusätzlich zur Untersuchung der neointimalen Fläche wurde auch mediale und lumenale Fläche untersucht (Abb. 3.15, B + C). Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Abschließend konnte auch die Intima zu Media-Ratio ähnliche Ergebnisse zeigen wie

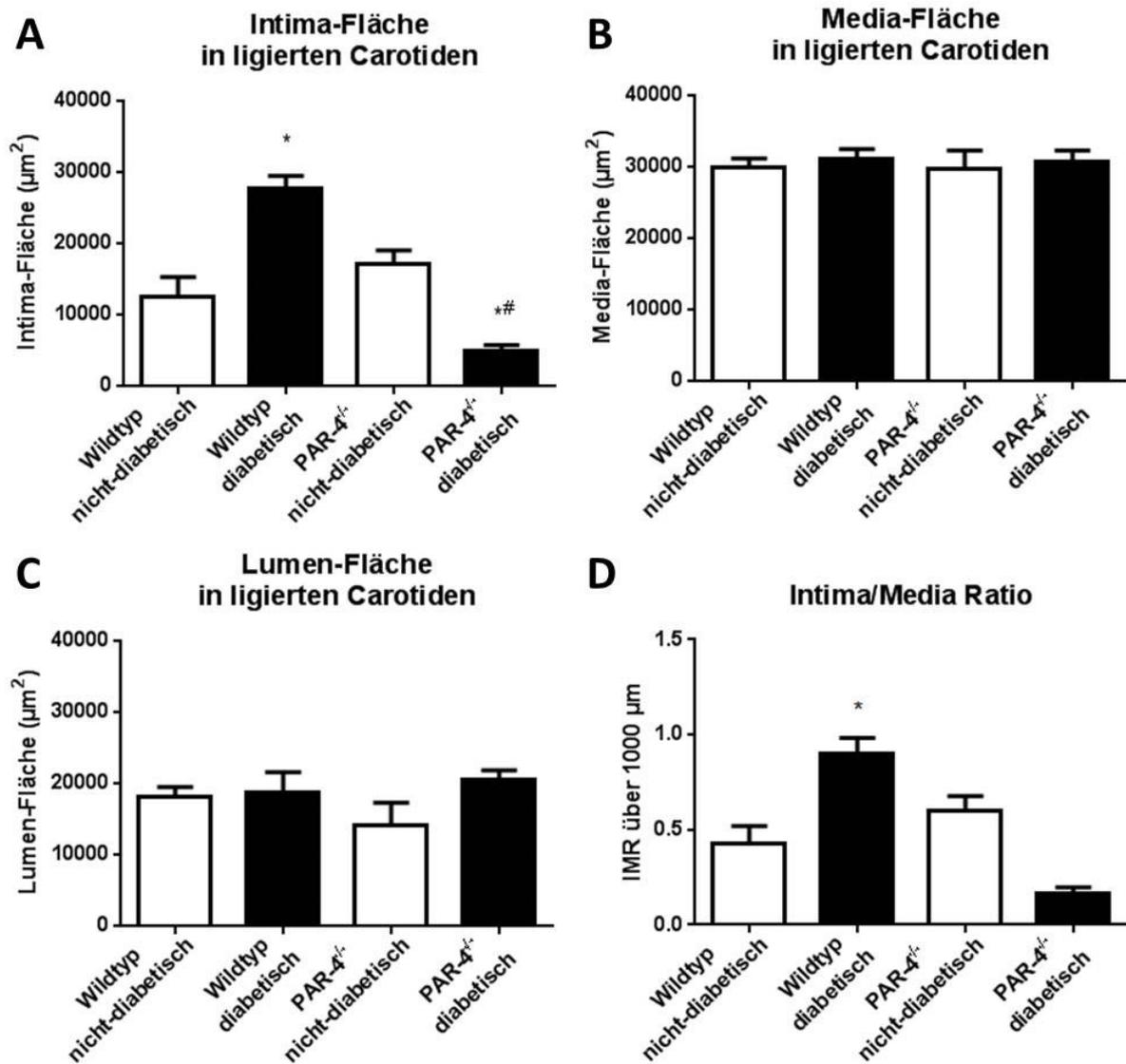


Abb. 3.15: Quantifizierung der neointimalen, medialen und lumenalen Fläche in ligierten Carotiden. Summe aller Mittelwerte der untersuchten **A)** neointimalen, **B)** medialen und **C)** lumenalen Fläche in Carotiden diabetischer und nicht-diabetischer Wildtyp- und PAR-4^{-/-}-Mäuse vier Wochen nach der Ligatur. **D)** Zusammengefasste Intima/Media Ratio von allen Messpunkten entlang der 1000 μm Länge proximal zu der Ligatur (n=6). *p<0,05 vs. nicht-diabetische Gruppe. #p<0,001 vs. diabetische Wildtyp-Gruppe.

die Untersuchung neointimaler Fläche (Abb. 3.15, D). Während eine signifikant höhere Ratio bei diabetischen Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den diabetischen PAR-4^{-/-}-Mäusen feststellbar war, gab es keine Unterschiede zwischen beiden nicht-diabetischen Gruppen.

3.5. Reduzierte Proliferation und Inflammation in PAR-4^{-/-}-Mäusen

Als nächstes wurde untersucht, ob die unterschiedlich ausgeprägte neointimale Hyperplasie in den vier Versuchsgruppen möglicherweise durch Unterschiede in der Zellproliferation hervorgerufen wurde. Hierfür wurde den Tieren Bromdesoxyuridin (BrdU), ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin, 24 h und 1 h vor der Euthanasie injiziert. Sieben Tage nach der Carotis-Ligatur wurde die BrdU-Inkorporation in den Zellen der ligierten Carotis als Maß für die Mitogenese bzw. Proliferation mittels Immunfluoreszenz quantifiziert. Die BrdU-Färbung der Gewebeproben wurde 50 µm proximal zur Ligation untersucht, da an diesem Punkt die neointimale Entwicklung in allen vier Gruppen vergleichbar war (Abb. 3.17, A-D). Zwischen den nicht-diabetischen Wildtyp- und PAR-4^{-/-}-Mäusen war die Anzahl BrdU-positiver Zellen vergleichbar (Abb. 3.17, A vs. B). Hingegen konnte eine erhöhte Anzahl der BrdU-positiven Zellen bei den diabetischen Wildtyp-Tieren im Vergleich zu den diabetischen PAR-4^{-/-}-Tieren beobachtet werden (Abb. 3.17, C vs. D).

Die Quantifizierung BrdU-positiver Zellen als prozentualer Anteil aller Zellen in der Neointima bestätigte einen signifikanten Anstieg in diabetischen Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den nicht-diabetischen Kontrolltieren (Abb. 3.18, A). Sowohl in nicht-diabetischen als auch in diabetischen PAR-4^{-/-}-Mäusen hingegen lag die Anzahl BrdU-positiver Zellen auf dem Niveau der nicht-diabetischen Wildtyp-Kontrollen.

Neben der Proliferation wurde an diesen Tieren auch der mögliche Einfluss der Inflammation auf die verstärkte neointimale Hyperplasie analysiert. Als repräsentative Entzündungsmarker wurde die Makrophagen-Population in den ligierten Gefäßen mittels einer Immunfluoreszenz-Färbung quantifiziert. Ebenfalls konnte eine verstärkte inflammatorische Antwort auf die arterielle Schädigung gezeigt werden. Während zwischen den beiden nicht-diabetischen Gruppen keine Unterschiede feststellbar waren (Abb. 3.17, E vs. F), konnte in diabetischen Wildtyp-Tieren im Vergleich zu den diabetischen PAR-4^{-/-}-Tieren eine erhöhte Anzahl an Makrophagen in der Neointima beobachtet werden (Abb. 3.17, G vs. H).

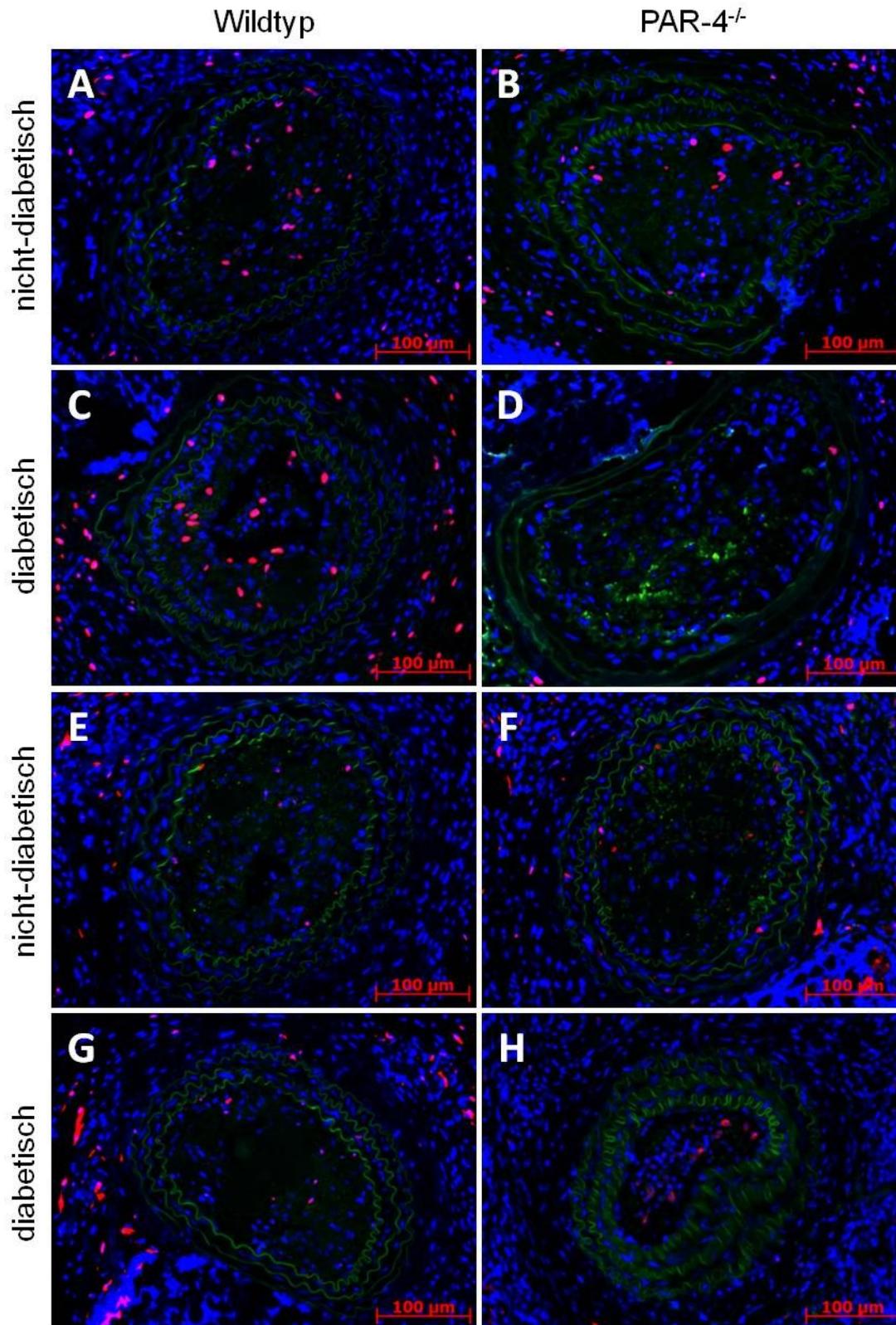


Abb. 3.16: Immunfluoreszenz-Färbung muriner Carotiden. Repräsentative Bilder einer **A-D)** BrdU- und **E-H)** Mac-2-Färbung in murinen Carotiden eine Woche nach der Ligation. **A, B, E, F)** Proben nicht-diabetischer und **C, D, G, H)** diabetischer Mäuse mit n=5-6. BrdU (Proliferationsmarker) und Mac-2 (Inflammationsmarker) sind in rot dargestellt. Grüne Autofluoreszenz ist gezeigt für eine bessere Darstellung der Gefäßstrukturen. Nuclei sind in blau dargestellt. Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

Die Quantifizierung Mac-2 positiver Zellen, die auch als prozentualer Anteil aller Zellen in der Neointima dargestellt sind, bestätigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg in diabetischen Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den nicht-diabetischen Kontrolltieren. Die Anzahl der Makrophagen in den Gefäßen nicht-diabetischer und diabetischer PAR-4^{-/-}-Mäuse war vergleichbar mit der Anzahl der Makrophagen in Wildtyp-Kontrolltieren (Abb. 3.18, B).

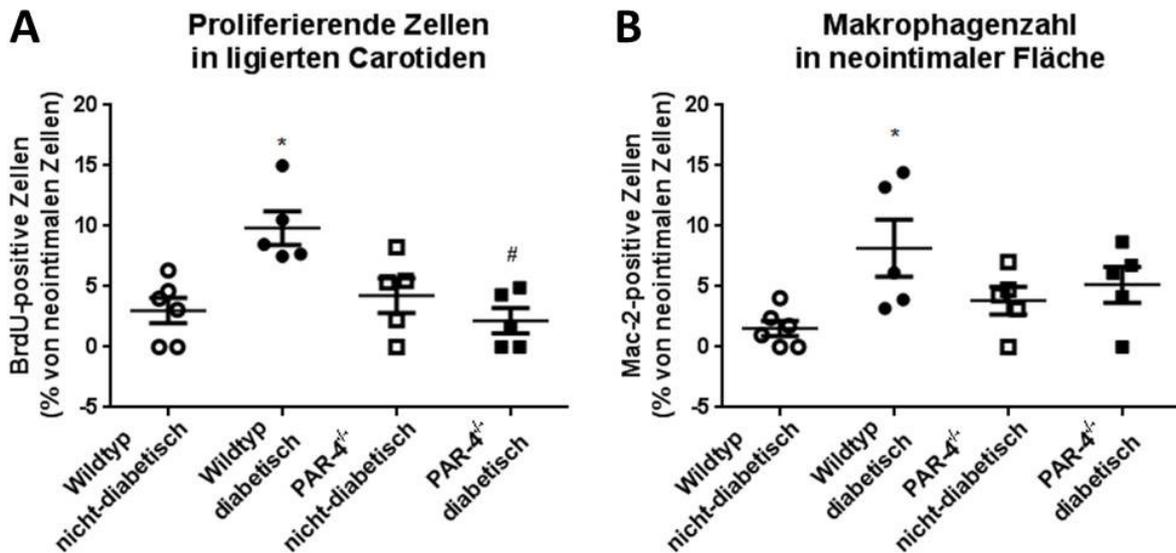


Abb. 3.17: Quantifizierung der Proliferation und Inflammation in murinen Carotiden. Analyse proliferativer und inflammatorischer Zellen in den murinen Carotiden eine Woche nach der Ligatur. **A)** Anzahl proliferativer, BrdU-positiver Zellen und **B)** inflammatorischer, Mac-2-positiver Zellen als prozentualer Anteil aller Zellen in der Neointima (n=5-6). *p<0,05 vs. nicht-diabetische Wildtyp-Gruppe. #p<0,05 vs. diabetische Wildtyp-Gruppe.

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen Nachweis für eine Schlüsselrolle des Protease-aktivierten Rezeptors-4 (PAR-4) als vermittelnder Faktor zwischen den bei Diabetes auftretenden Hyperglykämien, Koagulationsstörungen und Vaskulopathien. Wie einleitend beschrieben, ist bei diabetischen Patienten das Risiko für eine thrombotische und/oder proliferative Gefäßokklusion erhöht.[53, 54] Insbesondere ist die Restenose-Rate nach venösem Bypass gerade bei Diabetikern erhöht. Thrombin ist sowohl bei thrombotischen als auch bei proliferativen und inflammatorischen Prozessen von zentraler Bedeutung. Daher stellt die Entwicklung von Antagonisten des klassischen Thrombinrezeptors PAR-1 einen neuen Therapieansatz dar, um diesen Prozessen entgegen wirken zu können.[55, 56] Zumindest in Tiermodellen der Gefäßverletzung zeigte eine selektive PAR-1-Blockade durch Atopaxar eine vielversprechende Wirkung.[57, 58] Allerdings wäre eine Anwendung bei Patienten, die keine Antikoagulation benötigen aufgrund der erhöhten Blutungsneigung problematisch, da PAR-1 der in erster Linie verantwortliche Thrombinrezeptor auf Thrombozyten ist. Der Möglichkeit einer selektiven PAR-4-Hemmung wurde bislang kaum Beachtung geschenkt, da unter anderem PAR-4 nur eine Rolle als Kofaktor auf den Thrombozyten übernimmt. Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass die Blockade von PAR-4 ein geeigneter, therapeutischer Ansatz ist, um vor allem bei diabetischen Patienten das vaskuläre Remodeling zu unterbinden.

4.1. Gesteigerte PAR-4 Expression in Atherektomien diabetischer Patienten

Die bei Diabetes auftretende Hyperglykämie ist verantwortlich für die Schädigung und funktionelle Störung vaskulärer Zellen. In Diabetes ist ebenfalls die Bildung von Thrombin gesteigert, welches proliferative und entzündliche Prozesse in Gefäßwand begünstigt.[6, 25] Dies lässt vermuten, dass Thrombin vor allem bei, mit Diabetes assoziierten, Gefäßerkrankungen von zentraler Bedeutung sein könnte. Wie sich Diabetes allerdings auf die Expression und Funktion von Thrombinrezeptoren auswirkt, ist bislang wenig bekannt. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass kultivierte humane glatte Muskelzellen (SMC), die einer erhöhten Glukosekonzentration ausgesetzt werden, eine verstärkte PAR-4 Expression aufweisen. Hingegen andere

Thrombinrezeptoren, einschließlich PAR-1, veränderten sich nicht in ihrer Expression.[39] In dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob eine Hyperglykämie-induzierte PAR-4-Regulation auch *in situ* stattfindet.

Mittels einer Immunfluoreszenz-Färbung zeigte sich in Atherektomien diabetischer Patienten eine signifikant höhere PAR-4-Immunreaktivität im Vergleich zu Atherektomien nicht-diabetischer Patienten. Anhand anschließender Untersuchung der Konsekutivschnitte konnte mittels α -SMA-Färbung das stark positive PAR-4-Signal in den Atherektomien auf glatte Muskelzellen (SMC) in der *Tunica media* zurückgeführt werden. Dennoch wurde PAR-4-Immunfluoreszenz hauptsächlich in Bereichen mit geringer α -SMA-Expression detektiert. Dieses Ergebnis schließt drauf hin, dass PAR-4 hauptsächlich in dedifferenzierten SMC und im geringeren Ausmaß in differenzierten SMC exprimiert wird. Dies bekräftigt die bisherige Beobachtung einer Glukose-induzierten PAR-4-Expression in kultivierten humanen SMC die den dedifferenzierten Phänotyp darstellen.[39] Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch andere Zellpopulation zum stärkeren PAR-4-Signal in Atherektomien diabetischer Patienten beitragen können. Unter anderem wurde gezeigt, dass Monozyten, ein Zelltyp, der infolge einer Gefäßverletzung in das verletzte Gewebe einwandern, PAR-4 exprimieren können.[59] Die Flächen der *Tunica media*, in denen die PAR-4-Quantifizierung erfolgte, waren zwischen den Atherektomien diabetischer und nicht-diabetischer Patienten vergleichbar. Dies bestätigt, dass der Unterschied in der PAR-4-Expression zwischen den beiden Gruppen nicht auf unterschiedliche mediale Fläche zurückzuführen ist, sondern reelle Regulation darstellt. Im neointimalen Bereich der untersuchten Atherektomien fand sich ein positives PAR-4-Signal nur in Nähe weniger oder sogar keiner α -SMA-positiver SMC. Interessanterweise war in der Neointima kein Unterschied in der PAR-4-Expression zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Atherektomien sichtbar. Dies ist dadurch zu erklären, dass im Gegensatz zu der medialen Fläche diabetischer Artherektomien, die hauptsächlich dedifferenzierte SMC beinhaltet, der neointimale Bereich arm an dedifferenzierten SMC ist, und daher kein Unterschied zwischen den Patientengruppen sichtbar war. Die verstärkte PAR-4-Expression in der *Tunica media* stimmt mit der Fähigkeit von PAR-4, Migration und Proliferation medialer SMC zu begünstigen,[60] überein. Die erhöhte PAR-4-Expression in diabetischen Atherektomien wurde ebenfalls mittels Western Blot- und qPCR-Methode verifiziert.[51] Dabei war der Anstieg in der PAR-4-mRNA-Expression zwischen den beiden Patientengruppen deutlich stärker als der Unter-

schied in der PAR-4-Proteinexpression. Dies lässt darauf schließen, dass ein verzögerter Transport zur Zelloberfläche und/oder eine verstärkte Protein-Degradation stattfinden. Zusätzlich zu den Atherektomien wurden auch diabetische und nicht-diabetische humane Koronararterien auf PAR-4-Expression hin untersucht. Auch in diesen Gefäßen konnte eine stärkere PAR-4-Immunreaktivität in Proben diabetischer Patienten festgestellt werden. Leider war die verfügbare Anzahl an Proben nicht ausreichend für eine statistisch bedeutsame Analyse.

4.2. Gesteigerte PAR-4-Expression in der *Vena saphena* diabetischer Patienten

Venen wie die *Vena saphena* werden immer noch sehr häufig als Bypassgefäße eingesetzt. Vor allem bei diabetischen Patienten bergen sie jedoch ein Risiko, da sie eine hohe Restenoserate besitzen. Da eine erhöhte PAR-4-Expression von Bedeutung für diese hohe Verschlussrate in diabetischen Patienten sein könnte, wurde untersucht, ob der beobachtete Effekt in Atherektomien diabetischer Patienten gefäßübergreifend ist, und dadurch auch in Venen vorzufinden ist. Bei der Untersuchung stellte sich heraus, dass in humanen diabetischen Venen ebenfalls eine deutlich stärkere PAR-4-Expression als in nicht-diabetischen Venen zu sehen ist. Allerdings war in venösen Proben der Anstieg in der PAR-4-mRNA Expression höher als in Atherektomien. In diabetischen Venen war die PAR-4-Expression um 19-fach höher als in nicht-diabetischen Venen, während in den Atherektomien eine 9-fache Steigerung beobachtet wurde. Der Anstieg in der PAR-4-Immunreaktivität war in beiden Gefäßen vergleichbar. Es zeigte sich eine um 22% stärkere PAR-4-Immunreaktivität in diabetischen Venen im Vergleich zu den nicht-diabetischen Venen, während sie in humanen diabetischen Atherektomien bei 23% lag. PAR-4 vermittelt unter anderem die migratorischen, inflammatorischen und proliferativen Effekte von Thrombin. Eine verstärkte Expression könnte somit ein Grund dafür sein, dass venöse Bypass-Gefäße in diabetischen Patienten eher zur erneuten Okklusion neigen als es bei nicht-diabetischen Patienten, die eine geringere PAR-4-Expression aufweisen, der Fall ist.[61]

4.3. PAR-4 wird posttranskriptionell über mRNA-Stabilisierung reguliert

Die molekularen Mechanismen der PAR-4-Regulation wurden in isolierten humanen Zellen näher untersucht. Exemplarisch wurden diese *in vitro*-Versuche an SMC aus humanen *Vena saphena*-Proben durchgeführt, da das Signal in diesem Gefäßsystem besonders stark ausgeprägt war. Der Fokus lag bei diesen Untersuchungen auf den posttranskriptionellen Mechanismen der Genregulation, insbesondere auf der Transkript-Stabilisierung nach der Transkription.[62] Dabei wurde der mögliche Einfluss des *Human antigen R* (HuR) auf die Stabilität des PAR-4 erforscht. HuR ist das am besten charakterisierte mRNA-stabilisierende Protein.[40, 63, 64] Eine erhöhte HuR-Expression wurde in atherosklerotischen Gefäßen bei der Entwicklung intimaler Hyperplasie und in sklerotischen venösen Transplantaten gefunden.[42] Zudem zeigte eine Analyse von 3'UTR des PAR-4 mehrere AU-reiche Bereiche, welche als HuR bindende Motive dienen könnten, während solche Bereiche im PAR-1 nicht gefunden werden konnten. Außerdem zeigte bei PAR-1 im Gegensatz zu PAR-4 eine Stimulation mit hoher Glucosekonzentration keine Auswirkung auf die Akkumulation und Stabilisation.[51] In dieser Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass eine simulierte Hyperglykämie zu einem zeitabhängigen Shuttling von HuR in humanen SMC führt. Ergänzende Untersuchungen in der Arbeitsgruppe konnten eine Rolle für HuR bei der Glukose-induzierten PAR-4 Expression in SMC bestätigen: Mittels Immunpräzipitation-PCR konnte eine erhöhte Menge HuR-gebundener PAR-4-mRNA im Zytosol Glukose-stimulierter Zellen nachgewiesen werden. Eine Behandlung mit HuR-siRNA konnte den PAR-4-induzierenden Effekt von Glukose verhindern. Außerdem konnte eine Stabilisierung des PAR-4-Transkripts infolge der simulierten Hyperglykämie beobachtet werden. PAR-1-mRNA wurde nicht stabilisiert, was darauf zurückzuführen ist, dass die 3'UTR des humanen PAR-1 keine HuR-Bindungsmotive aufweist. Bei weiteren Untersuchungen in der Arbeitsgruppe konnte beobachtet werden, dass eine verstärkte HuR-Translokation aus dem Kern ins Cytosol in humanen vaskulären SMC als Antwort auf die Stimulation mit einer hohen Glukosekonzentration stattfand. Dadurch kommt es auch zu einer Akkumulation cytosolischer HuR-gebundener PAR-4-mRNA.[51]

4.4. Destabilisierung des PAR-4-Transkripts durch cAMP/PKA

Als weiteren PAR-4-Regulator konnte in dieser Arbeit das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) identifiziert werden. Das cAMP vermindert die mRNA-stabilisierende Fähigkeit von HuR in humanen vaskulären SMC über die gesteigerte Aktivität von der Proteinkinase A (PKA).[52] In dieser Arbeit konnte mittels eines cAMP-steigernden Stimulus, der Prostazyklin-Analog Cicaprost, die Glukose-induzierte HuR-Translokation und als Folge dessen auch die Glukose-induzierte PAR-4-Expression in humanen venösen SMC aufgehoben werden. Prostazyklin wirkt als physiologischer Gegenspieler von Thrombin, um proliferative und inflammatorische Prozesse in der Gefäßwand zu begrenzen.[60] Die hier vorgestellten Daten implizieren, dass Prostazyklin neben seinen direkt anti-trophischen, anti-thrombotischen und anti-adhäsiven Eigenschaften, auch indirekt über eine Inhibition der PAR-4-Expression wirken kann. Venöse Gefäße zeigen eine geminderte Fähigkeit endogenes Prostazyklin zu generieren, als die weniger zur Restenose neigenden Arterien.[65] Daher liegt die Vermutung nahe, dass die starke PAR-4-Expression in diabetischen humanen Venen zum Teil durch eine geringere Gegenregulation durch Prostazyklin zu erklären ist. Zusätzlich zu Cicaprost wurden weitere cAMP-Stimuli, wie das Forskolin und exogenes PGE₂, mit gleichem Endergebnis in dieser Arbeit benutzt.[51] Der genaue Mechanismus wie das zyklische AMP die HuR-vermittelte Stabilisierung der PAR-4-mRNA blockiert, muss allerdings noch geklärt werden. Phosphorylierung ist der primäre Mechanismus über den die HuR-Translokation aus dem Nukleus ins Cytosol reguliert wird.[66] Über den cAMP-Effektor PKA wurde bisher zwar nicht berichtet, dass er HuR phosphoryliert und dadurch inhibiert. Dennoch konnte mit zwei unterschiedlichen PKA-Inhibitoren (PKI und Rp-8-CPT-cAMPS) in dieser Arbeit gezeigt werden, dass deren Einsatz in humanen SMC den Cicaprost-induzierten Effekt aufhebt. Sie konnten der Inhibition der verstärkten HuR-Translokation nach einer Stimulation mit hoher Glukosekonzentration entgegenwirken. Ebenfalls konnte eine PKA-Inhibition, die mit einer hohen Glucosekonzentration stimulierte verstärkte PAR-4-Expression in humanen vaskulären SMC wiederherstellen, obwohl eine Cicaprost-Behandlung dem entgegen wirkte. Hingegen konnte ein anderer cAMP-Aktivator, das EPAC (*exchange protein activated by cAMP*), in ergänzenden Untersuchungen keinen Einfluss auf PAR-4-Expression zeigen. Daher ist

davon auszugehen ist, dass cAMP überwiegend über PKA die Wirkung von HuR und somit die postranskriptionelle Regulation von PAR-4 in humanen SMC vermittelt.

4.5. PAR-4-Defizienz schützt vor verstärkter neointimaler Hyperplasie *in vivo*

Es ist bekannt, dass PAR-4 zur Thrombin-stimulierten Mitogenese, Migration und inflammatorische Genexpression vaskulärer SMC beiträgt.[36, 39] Weiterhin ist bekannt, dass PAR-4 durch die Elastase Cathepsin G, welche von Neutrophilen freigesetzt wird, aktiviert werden kann. Dies ist interessant vor dem Hintergrund, dass diese Neutrophile in diabetischem Gewebe akkumulieren und zur neointimalen Hyperplasie beitragen.[67] Dementsprechend, auch basierend auf den Ergebnissen in dieser Arbeit, könnte Glukose-regulierte PAR-4-Expression wichtig für beschleunigtes vaskuläres Remodeling in Diabetes sein. Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal die zentrale Bedeutung von PAR-4 für die verstärkte neointimale Hyperplasie in diabetischen Mäusen. Infolge einer Behandlung mit Streptozotocin, welches die β -Zellen der Pankreas zerstört und dadurch Typ I Diabetes hervorruft,[45] entwickelten die Mäuse innerhalb von drei Wochen eine ausgeprägte Hyperglykämie. Durchschnittliche Blutglukosewerte lagen dabei bei 400 mg/dL, während die Werte bei Citratpuffer-behandelten Tieren um die 200 mg/dL lagen. Eine Ketoazidose konnte anhand der β -Hydroxybutyrat-Spiegel im Harn ausgeschlossen werden. Zeitgleich mit dem Anstieg der Glukosekonzentration kam es auch zu einem Anstieg der vaskulären PAR-4-Expression sowohl in der Aorta als auch in den Carotiden. In gleichen Gefäßen konnte eine verstärkte PAR-1-Expression nicht beobachtet werden, was das Ergebnis der Arbeitsgruppe mit isolierten humanen SMC unter simulierter Hyperglykämie bestätigt. Die funktionelle Bedeutung dieser gesteigerten PAR-4-Expression wurde in einem Modell des vaskulären Remodelings untersucht. Bei diesem bewährten Modell der neointimalen Verdickung, wird die linke Carotis nahe der Bifurkation ligiert.[48-50] Dabei zeigte sich eine beschleunigte Entwicklung der neointimalen Hyperplasie in STZ-behandelten Tieren, wobei der oxidativer Stress als Ursache aufgeführt wurde.[68] In Wildtyp-Mäusen konnte in dieser Arbeit dieser Befund bestätigt werden, da sich bei diabetischen Mäusen eine weitaus stärkere Neointima ausbildete als bei nicht-diabetischen Mäusen. Da eine Ketoazidose ausgeschlossen werden konnte, ist davon auszugehen, dass die in den diabetischen Wildtyp-Tieren eine verstärkte

Schädigung nicht auf Folgen der Ketoazidose zurückzuführen ist, sondern in erster Linie infolge der Hyperglykämie und ihren zellulären Auswirkungen. In PAR-4-defizienten (PAR-4^{-/-}) Mäusen hingegen zeigte sich keine verstärkte neointimale Hyperplasie infolge des Diabetes. Die Neointima war in diabetischen PAR-4^{-/-}-Mäusen nicht erhöht im Vergleich zu den nicht-diabetischen PAR-4^{-/-}-Mäusen und war sogar flächenmäßig kleiner als in den beiden Kontrollgruppen. Eine Erklärung für diese starke Hemmung des Remodelings konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erläutert werden. Jedoch wie schon erwähnt spielt der oxidative Stress in der Neointima-Bildung eine große Rolle. Da Thrombin als Verursacher von oxidativem Stress bekannt ist, könnte eine verstärkte Thrombin-Antwort über verstärkte PAR-4 Expression in Diabetes zu mehr oxidativem Stress und damit zum stärkeren Remodeling führen. Die Neointima-Bildung in nicht-diabetischen PAR-4^{-/-}-Mäusen war vergleichbar mit der in nicht-diabetischen Wildtypen. Dies lässt darauf schließen, dass PAR-4 unter normal-glykämischen Bedingungen vermutlich nur eine geringe/untergeordnete Rolle spielt, jedoch im diabetischen Zustand infolge der starken Hochregulation an Bedeutung gewinnt.

4.6. PAR-4-verstärkte Proliferation und Inflammation in diabetischen Wildtyp-Mäusen

Der Mechanismus einer schützenden Funktion der PAR-4-Defizienz vor verstärkter neointimaler Hyperplasie konnte zum Teil in dieser Arbeit geklärt werden. Fokus der Untersuchungen lag auf proliferativen und inflammatorischen Prozessen, die wichtige Bestandteile der Neointima-Bildung darstellen. Um die Proliferation untersuchen zu können, wurde den Mäusen 24 h und 1h vor der Euthanasie Bromdesoxyuridin (BrdU) injiziert. Die Menge an proliferierenden BrdU-positiven Zellen wurde sieben Tage nach der Carotis-Ligatur mittels Immunfluoreszenz visualisiert. In diabetischen Wildtyp-Mäusen war der Anteil an BrdU-positiven Zellen signifikant höher als in nicht-diabetischen Kontrollgruppen und auch als in anderen Versuchsgruppen. Dies führt zur Schlußfolgerung, dass die verstärkte neointimale Hyperplasie in diabetischen Tieren zum Großteil aus einer durch erhöhte PAR-4-Expression stimulierten und gesteigerten Proliferation vaskulärer Zellen resultiert. Eine Schädigung der arteriellen Wand führt außerdem zur Rekrutierung inflammatorischer Zellen, insbesondere zirkulierender Monocyten, die sich in Makrophagen ausdifferenzieren, und aktiv zur

Entwicklung einer neointimalen Hyperplasie beitragen.[69] Hierbei wurde der klassische Thrombinrezeptor PAR-1 als wichtiger Faktor identifiziert.[70] In dieser Arbeit zeigte sich sieben Tage nach der Ligatur eine stärkere Ansammlung von Makrophagen in den Carotiden diabetischer Mäuse im Vergleich zu nicht-diabetischen Mäusen. Sowohl in diabetischen als auch in nicht-diabetischen PAR-4^{-/-}-Mäusen war die Anzahl der Makrophagen vergleichbar mit den Kontrolltieren. Durch geringere Rekrutierung inflammatorischer Monozyten lässt sich auch geringere Entwicklung der neointimalen Hyperplasie in PAR-4-defizienten Tieren erklären. In einem Modell der Atherosklerose, in dem Proliferation und Inflammation wichtig für die Entstehung und Pathogenese sind, allerdings ohne diabetische Stoffwechsellage, war ebenfalls kein Unterschied zwischen Wildtyp- und PAR-4^{-/-}-Mäusen zu sehen. Dies bekräftigt, dass PAR-4 vermutlich außerhalb von Thrombozyten unter normalglykämischen Bedingungen eher untergeordnete Bedeutung hat, allerdings bei Diabetes eine Hauptrolle in der Entwicklung vaskulärer Komplikationen übernimmt.

5. Zusammenfassung

Protease-aktivierter Rezeptor-4 (PAR-4) ist ein Thrombin-Rezeptor, dessen Funktion unter anderem die Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (SMC) ist. In kultivierten humanen Zellen wird PAR-4 unter simulierten hyperglykämischen Bedingungen hochreguliert. Da bei diabetischen Patienten die Thrombin-Generierung erhöht ist, könnte theoretisch eine verstärkte Aktivierung von PAR-4 durch Thrombin stattfinden, als unter normalglykämischen Bedingungen. Zum Teil könnte damit die erhöhte Okklusionsrate in diabetischen Patienten gegenüber nicht-diabetischen Patienten erklärt werden.

Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Diabetes sowohl in Patienten als auch in Mäusen zu einer gesteigerten vaskulären PAR-4-Expression führt. In diabetischen Mäusen geht die Hochregulation von PAR-4 mit einer verstärkten Ausbildung der Neointima nach Carotis-Ligatur einher, während PAR-4-Defizienz dieses verstärkte Remodeling verhindert. Mechanistisch ist dieser Schutz auf das Unterbinden der Zellproliferation und der Ansammlung entzündlicher Makrophagen in PAR-4^{-/-}-Mäusen zurückzuführen.

Auf der zellulären Ebene wurde *Human Antigen R* (HuR) als wichtiger posttranskriptioneller Regulator von PAR-4 identifiziert. Die mRNA-stabilisierende Funktion von HuR wird durch hohe Glukosekonzentrationen begünstigt. Dagegen wirkt sich Cica-prost, via Proteinkinase A, antagonistisch auf die mRNA-stabilisierende Funktion von HuR aus und führt so zur Suppression von PAR-4. Die dynamische Aktivierung bzw. Inaktivierung von HuR könnte einen potentiellen Mechanismus darstellen, um die PAR-4-Expression und damit auch die proliferativen und inflammatorischen Eigenschaften von Thrombins in der Gefäßwand zu regulieren.

Insgesamt zeigen die hier vorgestellten Daten, dass PAR-4 ein potentielles therapeutisches Ziel darstellt, um proliferative und inflammatorische Prozesse in Restenoseanfälligen Patienten zu limitieren. Dies ist vor allem für diabetische Bypass-Patienten von Bedeutung, die von einem erhöhten Risiko einer Okklusion betroffen sind. PAR-4-Blockade würde auch vermutlich geringere Blutungskomplikationen zur Folge haben als derzeitige Strategien, PAR-1- oder Thrombin direkt zu inhibieren.

6. Summary

Protease-activated receptor-4 (PAR-4) is a low-affinity thrombin receptor which can induce migration and proliferation of vascular smooth muscle cells (SMC). In cultured human cells PAR-4 is upregulated under hyperglycemic conditions. Because of simultaneously increased thrombin generation in diabetic patients, thrombin-activated PAR-4 signaling would theoretically be even pronounced than under normoglycemic conditions. This could provide an explanation for the higher risk of occlusion in diabetic than in non-diabetic patients.

This work shows for the first time that diabetes leads to an enhanced expression of vascular PAR-4 in patients and in mice. In diabetic mice, upregulation of PAR-4 is associated with strong neointima formation after cerotid ligation, whereas PAR-4 deficiency prevents the enhanced remodelling response in diabetic animals. Mechanistically, this protection is due to prevention of SMC proliferation and reduced inflammatory macrophages in ligated arteries of PAR-4^{-/-} mice.

At the cellular level, Human antigen R (HuR) could be identified as an important posttranscriptional PAR-4 regulator. The mRNA stabilising action of HuR is promoted by high glucose, conversely cicaprost reduces HuR stabilising activity via protein kinase A. Dynamic activation and inactivation of HuR could serve as a potential mechanism to regulate PAR-4 expression and so control proliferative and inflammatory responses in the diabetic vessel wall.

Overall, data from this study show that PAR-4 could be a potential therapeutic target to limit proliferative and inflammatory processes in restenosis-prone patients. This could be important especially for diabetic bypass patients, who are affected by higher risk of vessel occlusion. Selective PAR-4 blockade would presumably lead to less bleeding complications than current strategies that inhibit PAR-1 or thrombin directly.

7. Literaturverzeichnis

1. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 813-20.
2. Yao, D. and M. Brownlee, *Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands*. Diabetes, 2010. **59**(1): p. 249-55.
3. Stirban, A., T. Gawlowski, and M. Roden, *Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms*. Mol Metab, 2014. **3**(2): p. 94-108.
4. Esposito, K., et al., *Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress*. Circulation, 2002. **106**(16): p. 2067-72.
5. Davies, M.G. and P.O. Hagen, *Pathobiology of intimal hyperplasia*. Br J Surg, 1994. **81**(9): p. 1254-69.
6. Beckman, J.A., M.A. Creager, and P. Libby, *Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management*. JAMA, 2002. **287**(19): p. 2570-81.
7. Cameron, A., et al., *Coronary bypass surgery with internal-thoracic-artery grafts--effects on survival over a 15-year period*. N Engl J Med, 1996. **334**(4): p. 216-9.
8. Deb, S., et al., *The long-term impact of diabetes on graft patency after coronary artery bypass grafting surgery: A substudy of the multicenter Radial Artery Patency Study*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014. **148**(4): p. 1246-53.
9. Cox, J.L., D.A. Chiasson, and A.I. Gotlieb, *Stranger in a strange land: the pathogenesis of saphenous vein graft stenosis with emphasis on structural and functional differences between veins and arteries*. Prog Cardiovasc Dis, 1991. **34**(1): p. 45-68.
10. Abizaid, A., et al., *The influence of diabetes mellitus on acute and late clinical outcomes following coronary stent implantation*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(3): p. 584-9.
11. Elezi, S., et al., *Diabetes mellitus and the clinical and angiographic outcome after coronary stent placement*. J Am Coll Cardiol, 1998. **32**(7): p. 1866-73.
12. Kornowski, R., et al., *Increased restenosis in diabetes mellitus after coronary interventions is due to exaggerated intimal hyperplasia. A serial intravascular ultrasound study*. Circulation, 1997. **95**(6): p. 1366-9.

13. Faries, P.L., et al., *Human vascular smooth muscle cells of diabetic origin exhibit increased proliferation, adhesion, and migration*. J Vasc Surg, 2001. **33**(3): p. 601-7.
14. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
15. Brummel, K.E., et al., *Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation*. Blood, 2002. **100**(1): p. 148-52.
16. Rauch, B.H., et al., *Thrombin- and factor Xa-induced DNA synthesis is mediated by transactivation of fibroblast growth factor receptor-1 in human vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2004. **94**(3): p. 340-5.
17. Koya, D. and G.L. King, *Protein kinase C activation and the development of diabetic complications*. Diabetes, 1998. **47**(6): p. 859-66.
18. Itoh, H., et al., *Differential effects of protein kinase C on human vascular smooth muscle cell proliferation and migration*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(1): p. H359-70.
19. Srivastava, A.K., *High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes (review)*. Int J Mol Med, 2002. **9**(1): p. 85-9.
20. Wilson, S.H., et al., *Nuclear factor-kappaB immunoreactivity is present in human coronary plaque and enhanced in patients with unstable angina pectoris*. Atherosclerosis, 2002. **160**(1): p. 147-53.
21. Bar-Shavit, R., A. Eldor, and I. Vlodavsky, *Binding of thrombin to subendothelial extracellular matrix. Protection and expression of functional properties*. J Clin Invest, 1989. **84**(4): p. 1096-104.
22. McNamara, C.A., et al., *Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor*. J Clin Invest, 1993. **91**(1): p. 94-8.
23. Kranzhofer, R., et al., *Thrombin potently stimulates cytokine production in human vascular smooth muscle cells but not in mononuclear phagocytes*. Circ Res, 1996. **79**(2): p. 286-94.
24. Galis, Z.S., et al., *Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(3): p. 483-9.
25. Undas, A., et al., *Hyperglycemia is associated with enhanced thrombin formation, platelet activation, and fibrin clot resistance to lysis in patients with acute coronary syndrome*. Diabetes Care, 2008. **31**(8): p. 1590-5.

26. Morrish, N.J., et al., *Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes*. Diabetologia, 2001. **44 Suppl 2**: p. S14-21.
27. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
28. Vu, T.K., et al., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. Cell, 1991. **64**(6): p. 1057-68.
29. Coughlin, S.R., *Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1800-14.
30. Lee, H. and J.R. Hamilton, *Physiology, pharmacology, and therapeutic potential of protease-activated receptors in vascular disease*. Pharmacol Ther, 2012. **134**(2): p. 246-59.
31. Sambrano, G.R., et al., *Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis*. Nature, 2001. **413**(6851): p. 74-8.
32. Pawlinski, R., et al., *Protease-activated receptor-1 contributes to cardiac remodeling and hypertrophy*. Circulation, 2007. **116**(20): p. 2298-306.
33. Chen, D., et al., *Regenerative repair after endoluminal injury in mice with specific antagonism of protease activated receptors on CD34+ vascular progenitors*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4155-64.
34. Bono, F., I. Lamarche, and J.M. Herbert, *Induction of vascular smooth muscle cell growth by selective activation of the proteinase activated receptor-2 (PAR-2)*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **241**(3): p. 762-4.
35. Bretschneider, E., et al., *Evidence for functionally active protease-activated receptor-3 (PAR-3) in human vascular smooth muscle cells*. Thromb Haemost, 2003. **90**(4): p. 704-9.
36. Bretschneider, E., et al., *Evidence for functionally active protease-activated receptor-4 (PAR-4) in human vascular smooth muscle cells*. Br J Pharmacol, 2001. **132**(7): p. 1441-6.
37. Hamilton, J.R., et al., *Atherosclerosis proceeds independently of thrombin-induced platelet activation in ApoE^{-/-} mice*. Atherosclerosis, 2009. **205**(2): p. 427-32.
38. Stolla, M.C., et al., *Enhanced platelet activity and thrombosis in a murine model of type I diabetes are partially insulin-like growth factor 1-dependent and phosphoinositide 3-kinase-dependent*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(5): p. 919-29.

39. Dangwal, S., et al., *High glucose enhances thrombin responses via protease-activated receptor-4 in human vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(3): p. 624-33.
40. Ma, W.J., et al., *Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(14): p. 8144-51.
41. Fan, X.C. and J.A. Steitz, *HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(26): p. 15293-8.
42. Pullmann, R., Jr., et al., *Enhanced proliferation of cultured human vascular smooth muscle cells linked to increased function of RNA-binding protein HuR*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(24): p. 22819-26.
43. Doller, A., et al., *Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase Cdelta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(8): p. 2608-25.
44. Chatzigeorgiou, A., et al., *The use of animal models in the study of diabetes mellitus*. *In Vivo*, 2009. **23**(2): p. 245-58.
45. Rees, D.A. and J.C. Alcolado, *Animal models of diabetes mellitus*. *Diabet Med*, 2005. **22**(4): p. 359-70.
46. Tesch, G.H. and T.J. Allen, *Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy*. *Nephrology (Carlton)*, 2007. **12**(3): p. 261-6.
47. Lee, Y., et al., *Metabolic manifestations of insulin deficiency do not occur without glucagon action*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(37): p. 14972-6.
48. Lindner, V., J. Fingerle, and M.A. Reidy, *Mouse model of arterial injury*. *Circ Res*, 1993. **73**(5): p. 792-6.
49. Kumar, A. and V. Lindner, *Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(10): p. 2238-44.
50. de Waard, V., et al., *Plasminogen activator inhibitor 1 and vitronectin protect against stenosis in a murine carotid artery ligation model*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(12): p. 1978-83.
51. Pavic, G., et al., *Thrombin Receptor PAR-4 is a Key Regulator of Exaggerated Intimal Thickening in Diabetes*. *Circulation*, 2014.
52. Rosenkranz, A.C., et al., *Regulation of human vascular protease-activated receptor-3 through mRNA stabilization and the transcription factor nuclear factor of activated T cells (NFAT)*. *Mol Pharmacol*, 2011. **80**(2): p. 337-44.

53. Stone, K.E., E. Chiquette, and R.J. Chilton, *Diabetic endovascular disease: role of coronary artery revascularization*. Am J Cardiol, 2007. **99**(4A): p. 105B-112B.
54. Carr, M.E., *Diabetes mellitus: a hypercoagulable state*. J Diabetes Complications, 2001. **15**(1): p. 44-54.
55. Ahn, H.S., et al., *Development of proteinase-activated receptor 1 antagonists as therapeutic agents for thrombosis, restenosis and inflammatory diseases*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(28): p. 2349-65.
56. Derian, C.K., et al., *Blockade of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 with a small-molecule antagonist prevents thrombus formation and vascular occlusion in nonhuman primates*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **304**(2): p. 855-61.
57. Kogushi, M., et al., *The novel and orally active thrombin receptor antagonist E5555 (Atopaxar) inhibits arterial thrombosis without affecting bleeding time in guinea pigs*. Eur J Pharmacol, 2011. **657**(1-3): p. 131-7.
58. Kogushi, M., et al., *Oral administration of the thrombin receptor antagonist E5555 (atopaxar) attenuates intimal thickening following balloon injury in rats*. Eur J Pharmacol, 2011. **666**(1-3): p. 158-64.
59. Mahajan-Thakur, S., et al., *Sphingosine-1-phosphate induces thrombin receptor PAR-4 expression to enhance cell migration and COX-2 formation in human monocytes*. J Leukoc Biol, 2014. **96**(4): p. 611-8.
60. Schror, K., et al., *Thrombin receptors in vascular smooth muscle cells - function and regulation by vasodilatory prostaglandins*. Thromb Haemost, 2010. **103**(5): p. 884-90.
61. Singh, S.K., et al., *The impact of diabetic status on coronary artery bypass graft patency: insights from the radial artery patency study*. Circulation, 2008. **118**(14 Suppl): p. S222-5.
62. Misquitta, C.M., et al., *The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology*. Mol Cell Biochem, 2001. **224**(1-2): p. 53-67.
63. Peng, S.S., et al., *RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein*. EMBO J, 1998. **17**(12): p. 3461-70.
64. Brennan, C.M. and J.A. Steitz, *HuR and mRNA stability*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(2): p. 266-77.
65. Subramanian, V.A., et al., *Prostacyclin production by internal mammary artery as a factor in coronary artery bypass grafts*. Surgery, 1986. **100**(2): p. 376-83.
66. Schoenberg, D.R. and L.E. Maquat, *Regulation of cytoplasmic mRNA decay*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(4): p. 246-59.

67. Shah, P.K., *Inflammation, neointimal hyperplasia, and restenosis: as the leukocytes roll, the arteries thicken*. *Circulation*, 2003. **107**(17): p. 2175-7.
68. Sasaki, N., et al., *Augmentation of vascular remodeling by uncoupled endothelial nitric oxide synthase in a mouse model of diabetes mellitus*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(6): p. 1068-76.
69. Hui, D.Y., *Intimal hyperplasia in murine models*. *Curr Drug Targets*, 2008. **9**(3): p. 251-60.
70. Chen, D., et al., *Protease-activated receptor 1 activation is necessary for monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocyte recruitment in vivo*. *J Exp Med*, 2008. **205**(8): p. 1739-46.

8. Veröffentlichungen

Pavic G, Grandoch M, Dangwal S, Jobi K, Rauch BH, Doller A, Oberhuber A, Akhyari P, Schrör K, Fischer JW, Fender AC. "Thrombin receptor PAR-4 is a key regulator of exaggerated intimal thickening in diabetes." *Circulation*, 2014.

Fender AC, Pavic G, Drummond G.R., Dusting G.J., Ritchie R.H.. "Unexpected anti-hypertrophic responses to low-level stimulation of protease-activated receptors in adult rat cardiomyocytes." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2014. 387(10): p.1001-7.

Wruck CJ, Streetz K, Pavic G, Götz ME, Tohidnezhad M, Brandenburg LO, Varoga D, Eickelberg O, Herdegen T, Trautwein C, Cha K, Kan YW, Pufe T. "Nrf2 induces interleukin-6 (IL-6) expression via an antioxidant response element within the IL-6 promoter." *J Biol Chem*. 2011 Feb 11;286(6):4493-9.

9. Tagungen und Kongressbeiträge

- 03/2014 Poster-Präsentation auf der 80. Jahrestagung der DGPT e.V. (Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie) in Hannover, Deutschland: "Thrombin receptor PAR-4 deficiency protects against exaggerated intimal thickening in diabetes mellitus"
- 03/2014 Reisekostenstipendium zur 80. Jahrestagung der DGPT e.V.
- 12/2013 Poster-Präsentation auf dem The World Diabetes Congress von der IDF (International Diabetes Federation) in Melbourne, Australien: "Novel role of protease-activated receptor-4 in diabetic vascular remodeling"
- 03/2013 Orale Präsentation auf der 79. Jahrestagung der DGPT e.V. in Halle/Saale, Deutschland: "Protease-activated receptor-4 (PAR-4) is a novel mediator of vascular remodeling in diabetes"
- 11/2012 Orale Präsentation auf dem 17. Workshop für Kardiologie und Hämostaseologie, Solingen, Deutschland: "Induction of PAR-4 thrombin receptors in diabetes"
- 04/2012 Poster-Präsentation auf der 78. Jahrestagung der DGK (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie) in Mannheim, Deutschland: "Regulation of human vascular protease-activated receptor 4 is critically dependent upon the mRNA stabilising effects of human antigen R"
- 03/2012 Poster-Präsentation auf der 78. Jahrestagung der DGPT e.V. in Dresden, Deutschland: "The mRNA stabilising factor HuR is a critical regulator of human protease-activated receptor 4"

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Anke Fender, die mir mit der Bearbeitung dieses Themas die Möglichkeit zur Durchführung meiner Dissertation und einen tieferen Einblick in die Welt der Wissenschaftler gegeben hat. Mit ihrer kontinuierlichen Förderung und ihrer Fähigkeit wissenschaftliche Begeisterung zu wecken, hat sie entscheidend zu meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung beigetragen. Außerdem habe ich in ihr eine tolle Freundin gefunden, die mir im harten Laboralltag stets eine Stütze gewesen ist.

Beim Herr Prof. Dr. Jens W. Fischer möchte ich mich dafür bedanken, dass ich meine Dissertation unter seiner Leitung an seinem Institut durchführen konnte. Die großartigen Möglichkeiten und ausgezeichnete Ausstattung an seinem Institut waren ein Garant für die erfolgreiche Durchführung dieser Arbeit. Ebenfalls bin ich dankbar für die vielen konstruktiven Gespräche und Anregungen, die meine Publikation betrafen.

Ebenso möchte ich mich bei den Autoren bedanken, die zusätzlich dazu beigetragen haben eine erfolgreiche Publikation, die ein großer Teil meiner Dissertation war, zu veröffentlichen.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern meiner eigenen Arbeitsgruppe und des Instituts bedanken. Ohne deren Einsatz und tolle Unterstützung sowie der stets angenehmer und freundschaftlicher Atmosphäre wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank geht dabei an Dr. rer. nat. Till Freudenberger. Die fachlichen und außer-fachlichen Diskussionen mit ihm haben meinen wissenschaftlichen und persönlichen Horizont erweitert. Außerdem möchte ich mich auch bei meiner langjährigen Büronachbarin Kathrin Feldmann bedanken. Sie war mir eine unverzichtbare menschliche Stütze auf unserem gemeinsamen Weg. Die zahlreichen Stunden, die wir zusammen im Labor und Büro verbracht haben, werden mir stets in guter Erinnerung bleiben.

Ebenfalls ein riesiger Dank geht an Frau Erika Lohmann, die sich aufopfernd und fürsorglich nicht nur um mich, sondern um alle Doktoranden gekümmert hat. Außerdem auch ein Dankeschön an Frau Karin Montag für die Geduld bei der Bedienung

Danksagung

des Fax-Gerätes und den unzähligen Bestellungen. Danke auch an die lieben technischen Assistentinnen, die mir stets geholfen haben, wenn ich nicht weiter wusste. Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle noch Annika Zimmermann, die mir durch ihre unkonventionelle Art einfach ans Herz gewachsen ist. Die tollen Gesprächsthemen werden mir noch lange in Erinnerungen bleiben.

Auch ein besonderer Dank gilt meiner Schwägerin Ute und meinem Bruder Darko, die sich unermüdlich durch meine Arbeit gekämpft haben und detailliert die kleinsten Fehler gefunden haben. Vielen Dank für die tolle Korrektur sowie zahllosen Stunden, die ihr teils mit mir gemeinsam daran verbracht habt. Danke auch an meine kleine Nichte Magdalena, die mir immer meine Sorgenfalten zu einem Lächeln geformt hat, und dadurch auch viel Last von meinen Schultern genommen hat.

Meinen Eltern Sonja und Milenko möchte ich an dieser Stelle danken, deren selbstverständliche und kompromisslose Liebe und Unterstützung allgegenwärtig war, ist und immer sein wird. Deren Glaube an mich hat auch meinen Glauben gestärkt und mir stets neue Kraft für die weitere Arbeit gegeben. Danke für alles. Volim vas.

Insbesondere möchte ich mich bei meiner Freundin und Lebensgefährtin Birke für die tolle Unterstützung bedanken. Sowohl ihre grenzenlose Liebe als auch ihre Geduld hat mich gestärkt, damit diese Arbeit auch erfolgreich abgeschlossen wird. Ohne Dich hätte ich das niemals durchgezogen. Danke mein Schatz!

11. Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den

Goran Pavic