



Proinflammatorische und prothrombotische Wirkung
von MT-SP1/Matriptase über Aktivierung des
Protease-aktivierten Rezeptors-2 in Endothelzellen
Bedeutung in der Atherosklerose

Isabell Seitz

München, März 2006

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

durchgeführt in der Abteilung
Experimentelle Erwachsenenkardiologie
des Deutschen Herzzentrums München

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §12 Abs. 3 der Promotionsordnung von Frau PD Dr. Ilka Ott betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Ich habe weder anderweitig versucht, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen, noch wurde diese Dissertation oder Teile derselben einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

München, den 20. März 2006

Isabell Seitz

Dissertation eingereicht am: 24. März 2006

Erstgutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Zweitgutachter: Prof. Dr. Charles N. David

Sondergutachter: PD Dr. Ilka Ott

Mündliche Prüfung am: 30. Mai 2006

ABKÜRZUNGEN

AK	Antikörper
AMC	7-Amino-4-Methyl-Coumarin
AP	agonistisches Peptid
AP-1	Aktivator Protein-1
APC	aktiviertes Protein C
AS	Aminosäure(n)
AVK	arterielle Verschlusskrankheit
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CASMC	glatte Muskelzellen der Koronararterie (<i>coronary artery smooth muscle cells</i>)
cDNA	komplementäre DNA
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CRP	C-reaktives Protein
CUB	Komplementfaktor C1r/C1s - embryonales Seeigelprotein UEGF - Knochenmorphogenetisches Protein BMP
DAG	Diazylglyzerol
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzellen (<i>endothelial cells</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
hEGF	humaner epidermaler Wachstumsfaktor
egr-1	<i>early growth response 1</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i> (ERK1/2 = p44/42)
EYFP	verstärkt gelb fluoreszierendes Protein (<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAM	6-Carboxy-Fluoreszein
hFGF	humaner Fibroblastenwachstumsfaktor
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FKS	fötales Kälberserum
FRS	fötales Rinderserum
FVII	Gerinnungsfaktor VII
FVIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor VII

GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen koloniestimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HAI-1	Hepatozyten-Wachstumsfaktor Aktivator Inhibitor-1
HBS	HEPES-gepufferte Kochsalzlösung
HCAEC	humane Endothelzellen aus der Koronararterie
HDMEC	humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HGFA	Hepatozyten-Wachstumsfaktor Aktivator
HMEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HRP	Rettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HUVEC	humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IHC	Immunhistochemie
I κ B	Inhibitor von NF κ B
IKK	I κ B Kinase
IL-1	Interleukin-1
IP3	Inositol 1,4,5-Trisphosphat
JNK	c-jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low-density lipoprotein</i> -Rezeptor
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LPS	Lipopolysaccharide
Luc	Luciferase
M	molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
MCSF	Makrophagen koloniestimulierender Faktor
min	Minute(n)
MNC	Mononukleäre Zellen (<i>mononuclear cells</i>)

mRNA	messenger RNA
MT-SP1	<i>membrane-type serine protease-1 / Matriptase</i>
NF-IL-6	nukleärer Faktor für IL-6
NF- κ B	nukleärer Faktor κ B
NIK	NF κ B-induzierende Kinase
nm	Nanometer
PAR	Protease-aktivierte(r) Rezeptor(en) (<i>protease-activated receptor(s)</i>)
PAR-2-AP	agonistisches Peptid für PAR-2
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	(Dulbeccos) phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PMSF	Phenylmethylsulfoxid
PS-SCL	<i>positional scanning synthetic combinatorial library</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur <i>oder</i> Reverse Transkription
s	Sekunden
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMC	glatte Muskelzellen (<i>smooth muscle cells</i>)
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TEA	Thrombendarterektomie

TF	Tissue Factor (Gewebsthromboplastin)
TF Δ zyt	Tissue Factor mit deletierter zytoplasmatischer Domäne
TFzyt	zytoplasmatische Domäne von Tissue Factor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
U	<i>units</i>
uPA	Urokinase Plasminogen-Aktivator
uPAR	Urokinase Plasminogen-Aktivator-Rezeptor
Upm	Umdrehungen pro Minute
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VEGF	vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktor
WT	Wildtyp
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Atherosklerose	1
1.2	Tissue Factor und Hämostase	4
1.3	Protease-aktivierte Rezeptoren	5
1.3.1	Struktur, Aktivierungsmechanismus und Regulation	5
1.3.2	Klassifizierung und Genetik	7
1.3.3	PAR-2	8
1.3.3.1	PAR-2-aktivierende Proteasen	9
1.3.3.2	PAR-2 im kardiovaskulären System	10
1.3.3.2.1	PAR-2-Expression in der Vaskulatur	10
1.3.3.2.2	Funktionelle Bedeutung von PAR-2 im kardiovaskulären System	11
1.3.3.3	PAR-2-vermittelte Signaltransduktion	11
1.4	PAR-2-Aktivierung durch den TF/FVIIa-Komplex	13
1.4.1	Tissue Factor	13
1.4.2	TF/FVIIa-induzierte Signaltransduktion - Rolle von PAR-2	13
1.4.3	Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von TF	14
1.5	MT-SP1/Matriptase – ein neuer PAR-2-Aktivator?	16
1.5.1	Substratspezifität	18
1.5.2	HAI-1 als Inhibitor von MT-SP1/Matriptase	18
1.5.3	Expression	19
1.5.4	Funktion	19
1.5.5	Aktivierung von MT-SP1/Matriptase	20
1.6	Zytokine als Modulatoren der Atherogenese	21
1.7	Ziel dieser Arbeit	23
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Material	24
2.1.1	Chemikalien, biochemische Reagenzien, „Kits“	24

2.1.2	<i>Pharmakologische Inhibitoren</i>	25
2.1.3	<i>Verbrauchsmaterial</i>	26
2.1.4	<i>Geräte</i>	26
2.1.5	<i>Bakterien</i>	27
2.1.6	<i>Primärzellen</i>	27
2.1.7	<i>Zellkulturmedien, Zusätze und Reagenzien</i>	27
2.1.8	<i>Allgemein benötigte Puffer</i>	28
2.1.9	<i>Enzyme</i>	28
2.1.10	<i>Rekombinante MT-SP1/Matriptase-Proteine</i>	29
2.1.10.1	Aminosäuresequenz von MT-SP1/Matriptase Cys122Ser	30
2.1.10.2	Reinheit der MT-SP1/Matriptase-Proteine	31
2.1.10.2.1	MT-SP1/Matriptase Cys122Ser	31
2.1.10.2.2	MT-SP1/Matriptase Cys122Ser, Ser195Ala	31
2.1.11	<i>Antikörper</i>	32
2.1.11.1	Primärantikörper	32
2.1.11.2	Sekundärantikörper.....	33
2.1.12	<i>Plasmide</i>	33
2.1.13	<i>Oligonukleotide</i>	33
2.1.13.1	Primer und 6-Carboxy-Fluoreszein-markierte Sonden für die quantitative PCR (<i>Assay-on-Demand</i>)	33
2.1.13.2	Primer zur Amplifikation der PCR-Produkte für die Standardkurven der qPCR	34
2.1.13.3	Primer zur Klonierung der TF-Konstrukte	35
2.1.13.4	siRNA-Sequenzen	36
2.1.14	<i>Charakteristika der Patienten mit arterieller Verschlusskrankheit (AVK)</i>	36
2.2	Methoden	38
2.2.1	<i>Zellbiologische Methoden</i>	38
2.2.1.1	Kultivierung von Säugerzellen.....	38
2.2.1.1.1	Endothelzellen (EC)	38
2.2.1.1.2	Glatte Muskelzellen (SMC).....	38
2.2.1.1.3	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC)	38
2.2.1.2	Transfektion adhärenter Zellen mit Plasmid-DNA	39
2.2.1.3	Transfektion adhärenter Zellen mit siRNA	39

2.2.1.4	Tissue Factor-Aktivitätstest	40
2.2.1.5	Durchflusszytometrie/FACS	40
2.2.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	40
2.2.2.1	Extraktion von Gesamt-RNA aus adhärenenten Zellen	41
2.2.2.2	Extraktion von Gesamt-RNA aus Gewebe	41
2.2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)	41
2.2.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA (Maxipräparation)	42
2.2.2.5	Reverse Transkription	42
2.2.2.6	Quantitative Real-Time Polymerasen-Kettenreaktion (qPCR)	42
2.2.2.7	Klonierung von TF-WT und TF Δ zyt aus pCDM8 in pEYFP-C1	45
2.2.2.8	Gerichtete Mutagenese der TF-Konstrukte	46
2.2.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	47
2.2.3.1	Messung der enzymatischen Aktivität von MT-SP1/Matriptase	47
2.2.3.2	Western Blot	47
2.2.3.3	ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	49
2.2.3.4	Luciferase-Aktivität	49
2.2.3.5	Immunfluoreszenzfärbung von MT-SP1/Matriptase	50
2.2.3.6	Präparation von Gefrierschnitten und immunhistochemische Färbung von MT-SP1/Matriptase	51
3	ERGEBNISSE	53
3.1	Funktionalität der rekombinanten Serinproteasedomäne von MT-SP1 /Matriptase	53
3.2	Proinflammatorische Wirkung von MT-SP1/Matriptase in humanen Endothelzellen	54
3.2.1	<i>Induktion von IL-8</i>	54
3.2.2	<i>Induktion von IL-6 und MCP-1</i>	57
3.3	Rezeptormechanismus der MT-SP1/Matriptase-induzierten IL-8-Expression...	59
3.3.1	<i>MT-SP1/Matriptase induziert IL-8 abhängig von der katalytischen Aktivität</i>	59
3.3.2	<i>MT-SP1/Matriptase induziert IL-8 via PAR-2</i>	60
3.3.3	<i>Überexpression von PAR-2 verstärkt die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-Expression</i>	64
3.4	Endothelzellspezifische Induktion von PAR-2 durch IL-1β	65

3.5	MT-SP1/Matriptase-induzierte intrazelluläre Signaltransduktion	67
3.5.1	<i>Sequenzielle Aktivierung der MAPK p38 und p42/44.....</i>	67
3.5.2	<i>Verstärkte Promotoraktivität von NF-κB.....</i>	69
3.5.3	<i>Die NF-κB-Aktivierung ist abhängig von p38 und p42/44</i>	70
3.5.4	<i>Die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-Expression erfordert p38, aber nicht p42/44 und NF-κB</i>	71
3.5.5	<i>PKCα-abhängige IL-8-Induktion ohne Beteiligung von p38, p42/44 oder NF-κB ..</i>	73
3.6	Rolle von Tissue Factor bei der MT-SP1/Matriptase-induzierten IL-8-Expression	75
3.6.1	<i>Tissue Factor beeinflusst nicht die PAR-2-vermittelte IL-8-Expression</i>	75
3.6.2	<i>Tissue Factor induziert IL-8 in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne</i>	77
3.7	MT-SP1/Matriptase reguliert Tissue Factor.....	80
3.8	Vaskuläres Expressionsmuster von MT-SP1/Matriptase.....	81
3.8.1	<i>MT-SP1/Matriptase-Expression in humanen Thrombendarterektomien</i>	81
3.8.2	<i>Basale MT-SP1/Matriptase-Expression in vaskulären Zellen</i>	84
4	DISKUSSION	88
4.1	Proinflammatorische Wirkung von MT-SP1/Matriptase in Endothelzellen.....	89
4.2	PAR-2 als Vermittler der proinflammatorischen MT-SP1/Matriptase-Wirkung .	92
4.3	MT-SP1/Matriptase-induzierte Signaltransduktion.....	94
4.4	Tissue Factor und MT-SP1/Matriptase-Aktivierung von PAR-2	98
4.4.1	<i>Tissue Factor beeinflusst nicht die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL8-Expression.....</i>	98
4.4.2	<i>MT-SP1/Matriptase reguliert TF</i>	101
4.5	Expression von MT-SP1/Matriptase.....	102
4.5.1	<i>MT-SP1/Matriptase-Expression in vaskulären Zellen</i>	102
4.5.2	<i>MT-SP1/Matriptase-Expression in gesunden und atherosklerotischen Gefäßen</i>	103
4.6	MT-SP1/Matriptase in der Atherosklerose und Ausblick.....	106
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	109

6	SUMMARY	110
7	DANKSAGUNG.....	111
8	LEBENS LAUF.....	112
9	LITERATURVERZEICHNIS	113
10	PUBLIKATIONEN	146
11	ANHANG	148
11.1	Humane MT-SP1/Matriptase-Sequenz: cDNA und Protein	148
11.2	Humane PAR-2-Sequenz: cDNA und Protein.....	150
11.3	Humane TF-Sequenz: cDNA und Protein	151

1 EINLEITUNG

1.1 Atherosklerose

Die Folgeerkrankungen der Atherosklerose wie Herzinfarkt, Schlaganfall und periphere Durchblutungsstörungen (arterielle Verschlusskrankheit, AVK) stehen als Todesursachen in den Industrienationen an erster Stelle. Die kardiovaskulären Risikofaktoren für die Ausbildung von Atherosklerose sind bekannt und umfassen unter anderem Nikotinkonsum, Hypertonie, Übergewicht, Hyperlipoproteinämie und Diabetes mellitus. Der genaue Entstehungsmechanismus atherosklerotischer Veränderungen hingegen ist nicht vollständig aufgeklärt. Lange Zeit wurde die Akkumulation von Lipiden in der Gefäßwand der Pathogenese zugrunde gelegt. Seit einigen Jahrzehnten betrachtet man die Erkrankung jedoch als deutlich komplexeren Prozess, der wesentlich durch eine lokale Entzündungsreaktion in der Gefäßwand charakterisiert ist.

Zur Entstehung der Atherosklerose hat sich die „Response-to-Injury“-Theorie etabliert, nach der am Beginn der Atherosklerose eine Läsion der endothelialen inneren Arterienwand (Intima) steht (Ross and Glomset, 1976a; Ross and Glomset, 1976b). Diese Theorie wurde inzwischen dahingehend modifiziert, dass eine Beschädigung nicht zwingend vorhanden sein muss. Neben der anatomischen Integrität spielt der funktionelle Zustand des Endothels eine wichtige Rolle bei der Entwicklung vaskulärer Erkrankungen. In der Atherosklerose geht man demzufolge von einem Funktionsverlust aus, der als endotheliale Dysfunktion bezeichnet wird (Ross, 1999a).

Die endotheliale Dysfunktion zeichnet sich durch eine erhöhte Permeabilität für Lipoproteine und andere plasmatische Stoffe aus. Infolgedessen kommt es zur verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin und ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) an der endothelialen Zelloberfläche (van der Wal et al., 1992). Dies bewirkt zuerst den temporären Kontakt („Andocken“ und „Rollen“) und dann das feste Anhaften („Adhäsion“) von Blutzellen wie Monozyten und T-Lymphozyten an das Endothel. Im weiteren Verlauf infiltrieren vor allem Monozyten den subendothelialen Raum, was wesentlich durch das Chemokin *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1) gesteuert wird (Libby, 2002; Reckless et al., 1999) (Abb. 1).

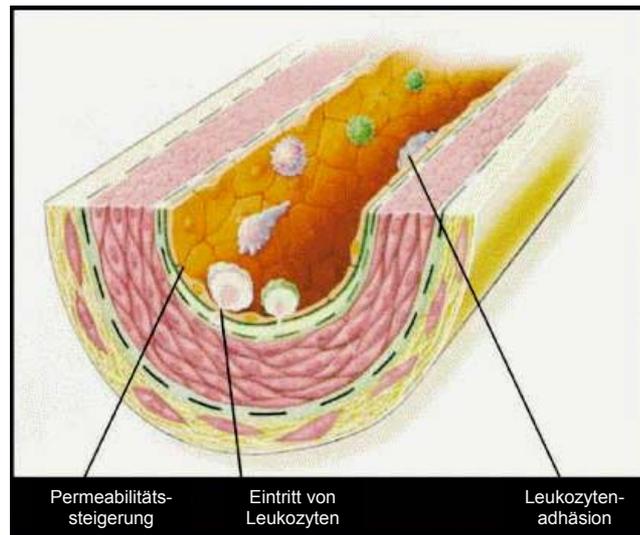


Abb. 1. Folgen der endothelialen Dysfunktion

Die frühesten Veränderungen, die der Bildung von atherosklerotischen Läsionen vorangehen, finden im Endothel statt. Dabei kommt es zu einer erhöhten endothelialen Permeabilität für Lipoproteine und andere Plasmastoffe, was zur gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen und damit zum Anhaften und Einwandern von Leukozyten in den subendothelialen Raum führt (nach Ross, 1999a).

Die einwandernden Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen, nehmen oxidiertes *low density*-Lipoprotein (LDL) auf und werden dadurch zu Schaumzellen, den charakteristischen Zellen der atherosklerotischen Plaque (Libby, 2002). Diese Schaumzellen bilden das histopathologische Korrelat der frühen atherosklerotischen Läsion, die so genannte Fettstreifenläsion (*fatty streak*) (Abb. 2).

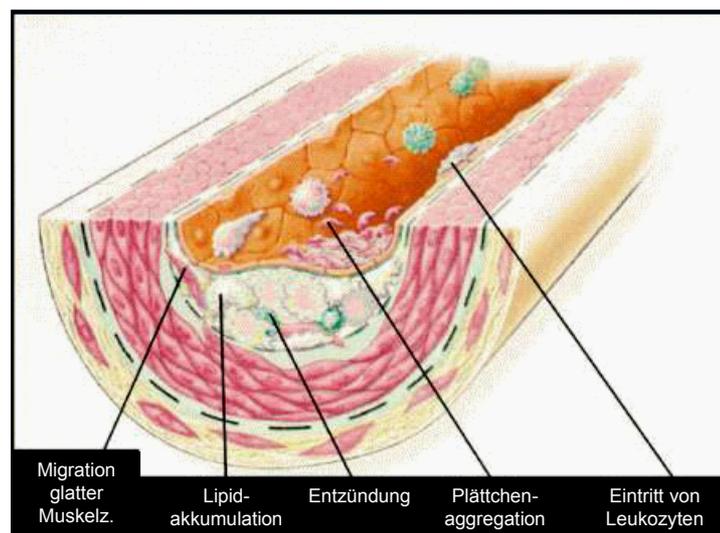


Abb. 2. Frühe atherosklerotische Plaque (*fatty streak*)

Lipidbeladene Monozyten und Makrophagen (Schaumzellen) sowie T-Lymphozyten infiltrieren die Gefäßwand. Glatte Muskelzellen migrieren aus der Media in die Intima. Eine lokale Entzündungsreaktion begleitet den atherosklerotischen Prozess (nach Ross, 1999a).

Während dieses Prozesses sezernieren die eingewanderten Leukozyten Wachstumsfaktoren und Zytokine (Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukine) und verursachen dadurch eine Entzündungsreaktion, die im weiteren Verlauf auf tiefere Bereiche der Gefäßwand übergreifen kann. Zum einen konvertieren dadurch die glatten Muskelzellen der medialen Gefäßwand vom kontraktilen zum synthetischen Phänotyp, was zur Migration in die Intima, zur verstärkten Proliferation und zur Bildung extrazellulärer Matrix führt. Folge ist ein allmählicher Gewebeumbau, der in der Entstehung einer bindegewebeartigen Kappe resultiert, die im Inneren einen Lipidkern aufweist („atherosklerotische Plaque“) (Libby, 2002). Zum anderen regen die infiltrierenden Leukozyten andere Leukozyten sowie Endothelzellen zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und zur Ausschüttung weiterer Zytokine und Chemokine an (Krishnaswamy et al., 1999). Über diese positive Rückkopplung wird der chronisch inflammatorische Prozess in Gang gehalten.

In diesem Zusammenhang wird auch zunehmend die Bedeutung von systemischen Entzündungsmarkern untersucht. Klinische Studien zeigen erhöhte Plasmaspiegel von Entzündungsmarkern wie Makrophagen koloniestimulierendem Faktor (M-CSF), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und C-reaktivem Protein (CRP) bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung im Vergleich zu gesunden Probanden und verdeutlichen damit die klinische Relevanz des atherosklerotischen Entzündungsprozesses (Ikonomidis et al., 1999; Tashiro et al., 1997).

Während Schaumzellen und T-Lymphozyten in der Gefäßwand akkumulieren und apoptotische Zellen und Lipide einen nekrotischen Kern bilden, wandern weitere glatte Muskelzellen ein und bilden zusammen mit extrazellulärer Matrix eine fibröse Kappe, die die atherosklerotische Plaque vom zirkulierenden Blutstrom trennt und Ursache für ein verengtes Gefäßlumen ist (Ross, 1999b). Wird die stabile Plaque instabil, zum Beispiel durch den Abbau extrazellulärer Matrix durch Matrixmetalloproteasen, kommt es zur Ausdünnung der fibrösen Kappe, was schließlich durch die Scherkräfte des Blutstroms eine Plaqueruptur bewirken kann (Libby, 2001). Dadurch kommt der thrombogene Lipidkern der Plaque in Kontakt mit zirkulierendem Blut, was durch die Aktivierung der Blutgerinnung eine Thrombusformation mit der Ausbildung eines akuten Koronarsyndroms zur Folge hat.

1.2 Tissue Factor und Hämostase

Zusätzlich zur Möglichkeit einer Plaqueruptur wird durch die pathophysiologische Expression von Tissue Factor (TF) in Schaumzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen ein prothrombotisches Umfeld geschaffen (Camerer et al., 1996a; Ghrib et al., 2002; Gorchach et al., 2000; Schechter et al., 1997; Schonbeck et al., 2000; Weis et al., 1991; Wilcox et al., 1989). TF ist der Hauptinitiator der extrinsischen Gerinnungskaskade nach Gewebsverletzung und wird in hohem Maße in den atherosklerotischen Plaques und den arteriellen Thrombi exprimiert und trägt damit zur Atherothrombose bei (Kato et al., 1996; Marmur et al., 1996; Moons et al., 2002).

TF, ein transmembranes Glykoprotein, ist der zelluläre Oberflächenrezeptor für den plasmatischen Gerinnungsfaktor VII/VIIa (FVII/FVIIa). In Gegenwart von Kalziumionen und Phospholipiden bindet TF das Zymogen FVII bzw. die aktivierte Serinprotease FVIIa (Ruf et al., 1991; Sabharwal et al., 1995). Der TF/FVIIa-Komplex aktiviert in der Folge die Gerinnungsfaktoren IX und X zu FIXa und FXa, wobei FIXa ebenfalls FX zu FXa konvertiert. Faktor Xa aktiviert Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa), was wiederum die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin katalysiert und schließlich in der Bildung eines unlöslichen Fibrinpolymers (Blutgerinnsel) resultiert (siehe Abb. 3).

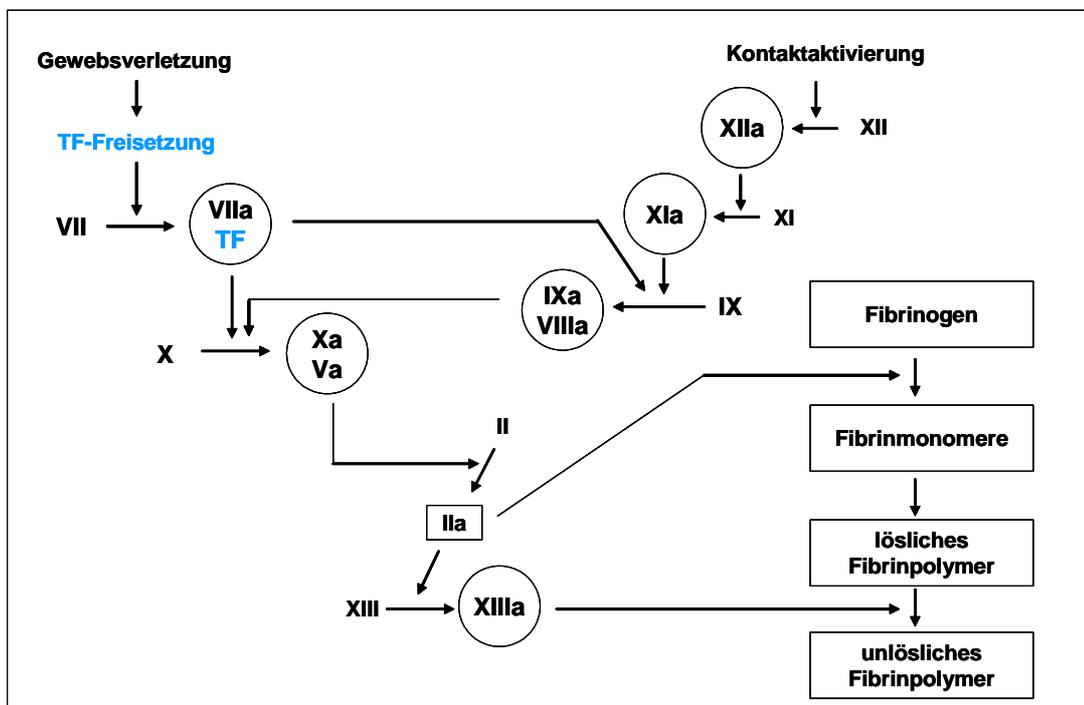


Abb. 3. Vereinfachtes Schema der Blutgerinnungskaskade

Tissue Factor (TF) steht als Hauptinitiator der extrinsischen Gerinnung (exogenes System) am Anfang der Gerinnungskaskade, die nach Exposition von TF durch Gewebsverletzung initiiert wird. II: Prothrombin, IIa: Thrombin

Konstitutiv wird TF ausschließlich in extra- und perivaskulären Zellen der Gefäßaußenwand, wie Fibroblasten und Perizyten, exprimiert. Erst in Folge einer Gefäßverletzung oder unter pathologischen Bedingungen kommt TF mit dem zirkulierenden Blut in Verbindung. Wichtigster Inhibitor der Blutgerinnung ist Antithrombin III, das vor allem FXa und Thrombin hemmt (High, 1988). Die erste Phase der Gerinnung reguliert Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), der zum größten Teil endothelial exprimiert wird (Bajaj et al., 1990). TFPI bindet FXa und inhibiert danach über die Bildung eines quaternären Komplexes die enzymatische Aktivität des TF/FVIIa-Komplexes (Girard et al., 1989).

1.3 Protease-aktivierte Rezeptoren

1.3.1 *Struktur, Aktivierungsmechanismus und Regulation*

Die Faktoren der Gerinnungskaskade spielen in der Atherosklerose eine wesentliche Rolle. Zum einen erwächst diese Bedeutung aus ihrer hämostatischen Wirkung, die die Fibrinablagerung in der atherosklerotischen Gefäßwand zur Folge hat. Zum anderen induzieren die Serinproteasen des Gerinnungssystems intrazelluläre Signaltransduktion in verschiedenen vaskulären Zellen, was über die Aktivierung von spezifischen Oberflächenrezeptoren, den Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR), vermittelt wird.

PAR umfassen eine Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren aus sieben transmembranen Helices, die durch Serinproteasen irreversibel aktiviert werden (Coughlin, 2000). Die Rezeptoren zeichnen sich durch einen besonderen Aktivierungsmechanismus aus: PAR werden an einer spezifischen Stelle innerhalb ihres extrazellulären N-Terminus proteolytisch gespalten, wodurch ein neuer N-Terminus entsteht, der als „rezeptorgebundener“ Ligand fungiert (*tethered ligand*). Sechs oder mehr spezifische Aminosäurereste des neugeschaffenen N-Terminus interagieren mit der zweiten extrazellulären Schleife des Rezeptors und triggern vermutlich eine Konformationsänderung des Rezeptors (Dery et al., 1998; Lerner et al., 1996). Dies resultiert im jeweils gebundenen heterotrimeren G-Protein in einem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) und in einer Dissoziation in die α - und β - γ -Untereinheit, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden initiiert werden (Coughlin, 2000; Dery et al., 1998; Grand et al., 1996). Dieser proteolytische Aktivierungsmechanismus kann durch synthetische agonistische Peptide (AP) umgangen werden, die der Sequenz des neugeschaffenen N-Terminus entsprechen (Coughlin, 2000) (siehe Abb. 4).

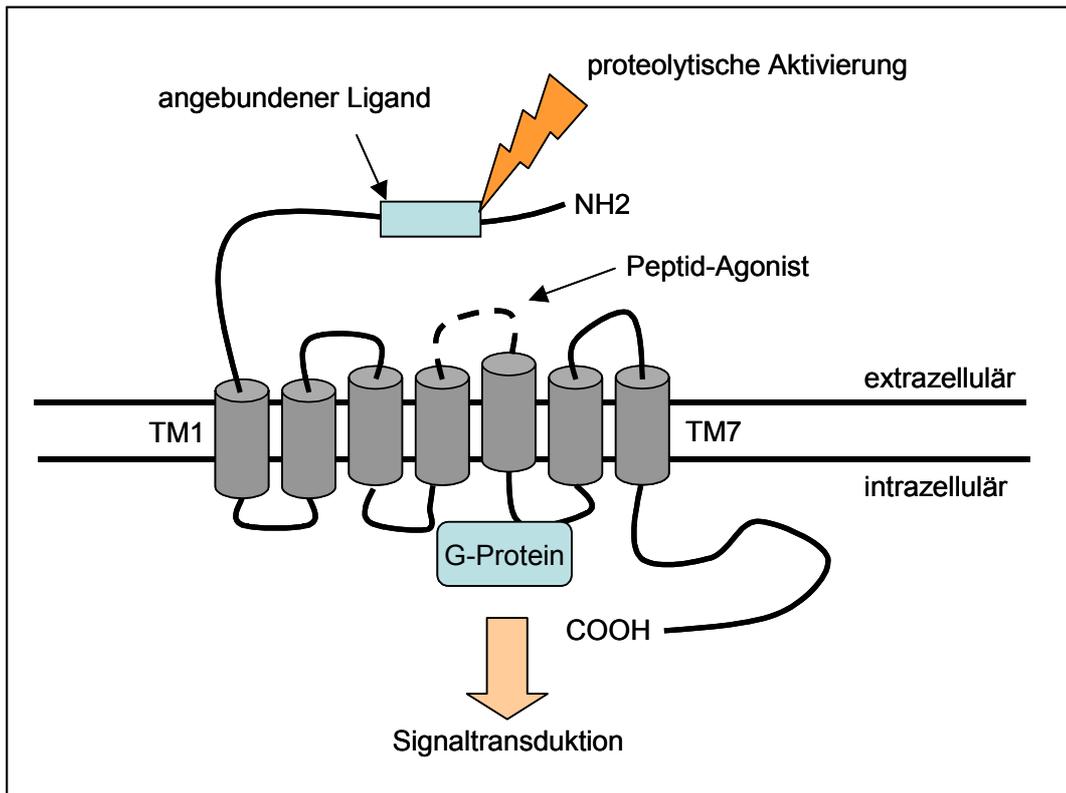


Abb. 4. Schema des Aktivierungsmechanismus der Protease-aktivierten Rezeptoren

Durch N-terminale proteolytische Spaltung entsteht ein neuer N-Terminus, der als „angebundener Ligand“ dient (Rechteck). Dieser bindet über die zweite extrazelluläre Schleife (gestrichelt) an den Rezeptor und induziert die intrazelluläre Signaltransduktion über ein G-Protein. Synthetische Peptide, die dem neuen N-Terminus entsprechen (Peptid-Agonist), sind in der Lage, den Rezeptor Proteolyse-unabhängig zu aktivieren. TM: Transmembrandomäne

PAR werden aufgrund ihres besonderen proteolytischen Aktivierungsmechanismus auf verschiedene Arten reguliert. Sie können durch mehrere Proteasen geschnitten werden und die proteolytische Spaltung des Rezeptors muss nicht notwendigerweise zur Aktivierung des Rezeptors führen. Ganz im Gegenteil kann eine Spaltung an einer Stelle, die den angebundenen Liganden komplett entfernt, dazu führen, dass PAR auf die nachfolgende Proteolyse eines Agonisten nicht mehr reagieren können (Steinberg, 2005). Abgesehen davon existieren Mechanismen zur Beendigung der Signaltransduktion, die denen anderer G-Protein gekoppelter Rezeptoren gleichen, wie Desensitivierung durch Phosphorylierung an Serin-/Threoninresten der zytoplasmatischen Domäne oder Internalisierung des Rezeptors mit anschließender lysosomaler Degradierung (Böhm et al., 1996a; Iaccarino et al., 1998; Ishii et al., 1994; Tirupathi et al., 2000). Als Mechanismen der Resensitivierung wurden die

Mobilisierung von Proteinspeichern aus dem Golgi-Apparat und die Neusynthese der Rezeptoren beschrieben (Böhm et al., 1996a).

1.3.2 Klassifizierung und Genetik

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden vier PAR identifiziert: PAR-1 bis -4. PAR-1 und PAR-4 werden durch Thrombin und Trypsin aktiviert, PAR-3 nur durch Thrombin und PAR-2 wird durch Trypsin und Mastzell-Tryptase aktiviert (Connolly et al., 1996; Ishihara et al., 1997; Kahn et al., 1998b; Molino et al., 1997a; Nystedt et al., 1994; Rasmussen et al., 1991; Vouret-Craviari et al., 1995; Vu et al., 1991; Xu et al., 1998).

Die für PAR-1, -2 und -3 kodierenden Gene finden sich in allen untersuchten Organismen kolokalisiert auf demselben Genlocus, was auf einen gemeinsamen genetischen Ursprung hindeutet (Guyonnet Duperat et al., 1998; Kahn et al., 1998a). Beim Menschen liegen die PAR-1-, PAR-2- und PAR-3-Gene nahe beieinander auf Chromosom 5q13, wohingegen PAR-4 auf 19p12 lokalisiert ist (Kahn et al., 1998a; Xu et al., 1998). Alle vier Subtypen weisen eine identische Genstruktur aus zwei Exons auf, die durch ein einzelnes langes Intron unterbrochen werden (Cupit et al., 1999; Kahn et al., 1998a). Dabei kodiert das erste Exon für die 5'-untranslatierte Region, das Startcodon und ein Signalpeptid, wohingegen das zweite Exon für das Rezeptorprotein und die 3'-untranslatierte Region kodiert (Kahn et al., 1998a).

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die unterschiedlichen Charakteristika der vier bislang bekannten PAR.

Charakteristika der PAR	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Aktivierende Proteasen (EC50)	Thrombin (50 pM)	Trypsin (1 nM) Tryptase (1 nM)	Thrombin (0,2 nM)	Thrombin (5 nM) Trypsin (1 nM)
Weitere bekannte aktivierende Proteasen	Trypsin TF/FVIIa FXa	FXa TF/FVIIa MT-SP1/Matriptase Bakterielle Proteasen		Plasmin
Inaktivierende Proteasen	Cathepsin G Plasmin Proteinase 3 Elastase	Cathepsin G Plasmin Proteinase 3 Elastase		
Schnittstelle	LDPR↓SFLLRN	SKGR↓SLIGKV	LPIK↓TFRGAP	PAPR↓YPGQV
Agonistische Peptide	SFLLRN	SLIGKV	unbekannt	GYPGKF
Antagonisten	BMS-200261 RWJ-56110			
Chromosomale Lokalisation	5q13	5q13	5q13	19p12

Tabelle 1. Charakteristika der PAR

Überblick über aktivierende und inaktivierende Proteasen der einzelnen PAR, proteolytische Schnittstellen jedes PAR, bekannte Peptid-Agonisten, aktuell verfügbare Antagonisten und chromosomale Lokalisation des jeweiligen PAR (modifiziert übernommen nach O'Brien et al., 2001; Steinberg, 2005).

1.3.3 PAR-2

PAR-2 wurde als zweites Mitglied der PAR-Familie 1994 kloniert und stellt inzwischen den einzigen PAR dar, der nicht durch Thrombin aktiviert wird (Böhm et al., 1996b; Nystedt et al., 1995a; Nystedt et al., 1994; Nystedt et al., 1995b). Der Rezeptor besteht aus 397 Aminosäuren (AS) und weist die für PAR typische Struktur aus sieben transmembranen Helices sowie ein N-terminales hydrophobes Signalpeptid, das wahrscheinlich zwischen Thr25 und Ile26 abgespalten wird, auf (Böhm et al., 1996b).

Die Expression von PAR-2 wurde in der Vaskulatur, im gastrointestinalen Trakt, in

der Haut, in der Lunge, im Gehirn, in der Prostata und im Uterus nachgewiesen (D'Andrea et al., 1998; Nystedt et al., 1995a; Nystedt et al., 1994). Entsprechend wurden physiologische Wirkungen von PAR-2 im kardiovaskulären und gastrointestinalen System, in der Haut, im Atmungssystem und in peripheren Nerven beschrieben (Cocks et al., 1999; Damiano et al., 1999a; Derian et al., 1997; Kawabata, 2002; Vergnolle et al., 2001).

Im Vergleich zu PAR-1-defizienten Mäusen, die zu 50% embryonal letal aufgrund fehlerhafter Gefäßentwicklung sind, entwickeln sich PAR-2-defiziente Mäuse normal (Damiano et al., 1999a; Darrow et al., 1996). Dies kann seine Ursache in funktionellen Redundanzen oder einem möglichen Wechselwirken der PAR untereinander haben. Eine eindeutige Aussage zur Funktion von PAR-2 lässt sich daher auf der Basis von Genablationsstudien nicht treffen.

1.3.3.1 PAR-2-aktivierende Proteasen

PAR-2 wird durch Trypsin aktiviert, wobei die proteolytische Spaltung des humanen Rezeptors zwischen Arg36 und Ser37 stattfindet und Trypsin PAR-2 nur an dieser Stelle aktivieren kann (Alm et al., 2000; Nystedt et al., 1994). Die Dipeptidsequenz Ser37-Leu38 scheint dabei eine Hauptrolle bei der Aktivierung zu spielen (Al-Ani et al., 2004). Trypsin kann PAR-2 im Verdauungstrakt aktivieren, aber in allen anderen Geweben erscheint Trypsin aufgrund seiner gastrointestinalen Expression als PAR-2-Agonist unwahrscheinlich. Die Suche nach physiologischen Liganden von PAR-2 führte zur Identifizierung der Serinprotease Mastzell-Tryptase, wobei der Glykosylierungszustand von PAR-2 an Asn30 eine wichtige Rolle bei seiner Sensitivität gegenüber Mastzell-Tryptase zu spielen scheint (Alm et al., 2000; Compton et al., 2002; Corvera et al., 1997; Mirza et al., 1997). Dies könnte die Varianzen in der Effizienz erklären, die bei PAR-2-Aktivierung durch Tryptase zu beobachten sind (Huang et al., 2001; Molino et al., 1997a; Schechter et al., 1998; Steinhoff et al., 2000).

Weitere bekannte Liganden für PAR-2 sind Gerinnungsfaktoren, wie Faktor Xa (FXa) und der Komplex aus TF und FVIIa bzw. der ternäre Komplex aus TF, FVIIa und FX (Camerer et al., 2000b; Koo et al., 2002). Viele PAR-2-Agonisten, wie zum Beispiel FXa, TF/FVIIa oder Trypsin, können allerdings sowohl PAR-2 als auch PAR-1 aktivieren und sind somit keine selektiven Aktivatoren des Rezeptors (Alm et al., 2000; Camerer et al., 2000b; Molino et al., 1997b; Nystedt et al., 1994; Parry et al., 1996; Vouret-Craviari et al., 1995; Xu et al., 1998).

Eine membrangebundene Serinprotease, deren Substratspezifität zu PAR-2 mittels *positional scanning synthetic combinatorial library* (PS-SCL) und Substrat-Phagendisplay festgestellt wurde, ist die erst vor einigen Jahren identifizierte Matriptase/*membrane-type serine protease 1* (MT-SP1), die vor allem aufgrund ihrer ähnlichen Gewebeverteilung einen interessanten Liganden für PAR-2 darstellt (Takeuchi et al., 1999).

1.3.3.2 PAR-2 im kardiovaskulären System

PAR-2 ist - anders als PAR-1, PAR-3 und PAR-4 - nicht an der Thrombin-induzierten Plättchenaktivierung beteiligt und wird auch als einziger PAR nicht in Thrombozyten exprimiert (Chung et al., 2002; Kahn et al., 1999; Mackie et al., 2002; Nakanishi-Matsui et al., 2000). Unabhängig davon wird PAR-2 eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System zugeordnet, so dass im Folgenden auf die Expression und Funktion von PAR-2 in der Vaskulatur eingegangen werden soll (Hirano and Kanaide, 2003; Maree and Fitzgerald, 2002; Steinberg, 2005).

1.3.3.2.1 PAR-2-Expression in der Vaskulatur

PAR-2 wird in zahlreichen hochvaskularisierten Organen wie Niere, Darm und Magen im Menschen und in anderen Spezies exprimiert (Nystedt et al., 1994; Nystedt et al., 1995b). Innerhalb der Blutgefäße ist PAR-2 in Endothelzellen und glatten Muskelzellen lokalisiert (D'Andrea et al., 1998; Hwa et al., 1996; Mirza et al., 1996; Molino et al., 1998; Molino et al., 1997b; Nystedt et al., 1994). Zudem wurde PAR-2 bei neugeborenen Ratten in den Kardiomyozyten nachgewiesen (Sabri et al., 2000). Es ist dabei nicht selten, dass mehr als ein Vertreter der PAR-Familie im gleichen Zelltyp vorhanden ist. So exprimieren humane Endothelzellen PAR-2, PAR-1 und PAR-3 (Chi et al., 2001; Mirza et al., 1996; Nystedt et al., 1996; O'Brien et al., 2000; Schmidt et al., 1998). Des Weiteren wird PAR-2 in Blutzellen wie eosinophilen und neutrophilen Granulozyten exprimiert (Howells et al., 1997; Miike et al., 2001).

Aktuelle Daten beschreiben die pathophysiologische Expression von PAR-2 in humanen koronaren atherosklerotischen Läsionen und deuten darauf hin, dass PAR-2 Signalwege nach Gefäßverletzung regulieren könnte (Napoli et al., 2004). Dies lieferte erstmalig einen Hinweis auf die potenzielle Bedeutung von PAR-2 bei atherosklerotischen Veränderungen der Gefäßwand.

1.3.3.2 Funktionelle Bedeutung von PAR-2 im kardiovaskulären System

PAR-2 spielt, ebenso wie PAR-1, eine Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus, wobei die Relaxation des Endothels die am häufigsten beschriebene PAR-2-Wirkung ist (Cicala et al., 1999; Damiano et al., 1999a; Hamilton et al., 1998; McLean et al., 2002; Sobey et al., 1999).

Abgesehen davon wird PAR-2 eine Rolle bei Verletzungen bzw. bei der anschließenden Wundheilung zugeschrieben. In Ratten wird nach Karotisverletzung durch einen Ballonkatheter die PAR-2-Expression induziert (Damiano et al., 1999b). Die erhöhte PAR-2-Expression in proliferierenden glatten Muskelzellen der Neointima nach Karotisverletzung lässt vermuten, dass PAR-2 zur Wundheilung beiträgt, da Wundheilung neben Entzündungsreaktion und Angiogenese eine gesteigerte Proliferation voraussetzt (Damiano et al., 1999b). Tatsächlich stimulieren PAR-2-Agonisten wie Trypsin, Tryptase, FXa oder Peptid-Agonisten die Proliferation von kultivierten humanen aortalen oder arteriellen glatten Muskelzellen - eine Wirkung, die in humanen Endothelzellen bestätigt wurde (Bono et al., 1997; Bretschneider et al., 1999; Koo et al., 2002; Mirza et al., 1996).

In vaskulären Entzündungsprozessen nimmt PAR-2 eine bedeutende Position ein. Die Expression von PAR-2 wird in humanen Endothelzellen durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 α sowie durch Lipopolysaccharide (LPS) hochreguliert, was die Beteiligung von PAR-2 an der akuten Entzündungsreaktion deutlich macht (Nystedt et al., 1996). Die diffuse Verteilung von PAR-2 über Zellen aus verschiedenen Organsystemen weist auf eine Bedeutung in sowohl lokalen als auch systemischen Entzündungsprozessen hin. Die PAR-2-Aktivierung spielt eine Rolle bei der Leukozytenrekrutierung, beim Rollen und der anschließenden Adhärenz an die Gefäßwand (Lindner et al., 2000; Vergnolle, 1999). Im Rattenmodell kommt es nach Applikation von PAR-2-Agonisten zur Entstehung von Ödemen und zur Infiltration von Granulozyten (Vergnolle et al., 1999). Bedenkt man, dass PAR-2 durch bestimmte Gerinnungsfaktoren aktivierbar ist, so wird deutlich, dass PAR-2 zur oft genannten Verbindung zwischen Aktivierung der Gerinnungskaskade und Entzündung beitragen könnte (Dugina et al., 2002; Welty-Wolf et al., 2001).

1.3.3.3 PAR-2-vermittelte Signaltransduktion

Die Aktivierung von PAR-2 induziert unterschiedliche zelluläre Effekte. Beschrieben wurden Wirkungen auf die Zellproliferation, auf die Differenzierung und auf die

Freisetzung von Mediatoren wie IL-6, Granulozyten Makrophagen kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF), Eotaxin und Matrixmetalloproteinase 9 (Akers et al., 2000; Mirza et al., 1996; Smith et al., 2004; Vliagoftis et al., 2001; Vliagoftis et al., 2000; Wakita et al., 1997).

Die intrazellulären Signalwege, die durch PAR-2 vermittelt werden, sind nicht vollständig charakterisiert. PAR-2 vermittelt die Aktivierung von Phospholipase C (PLC) und verschiedenen sekundären Botenstoffen wie Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP3) und Diazylglyzerol (DAG) in Abhängigkeit von Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen. Diese Vorgänge triggern die Mobilisierung von Kalziumströmen und die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (Böhm et al., 1996a; Kaufmann et al., 1998; Molino et al., 1997a; Molino et al., 1997b; Schultheiss et al., 1997). Bekannte PKC-Isoformen, die PAR-2-vermittelt aktiviert werden, sind zum Beispiel PKC ϵ oder PKC α (Ahamed and Ruf, 2004; Myatt and Hill, 2005; Oshiro et al., 2004). Beschrieben wurde außerdem eine G-Protein-abhängige Aktivierung der SH2-homologen Protein-Tyrosinphosphatase (SHP2) nach PAR-2-Aktivierung (Yu et al., 1997).

Zusätzlich existieren Signalwege, die die Aktivierung von Kinasen beinhalten und inflammatorische Antworten vermitteln können (Kawao et al., 2005; Koo et al., 2002). So gibt es Daten über eine PAR-2-medierte Aktivierung der p42/44-Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), die PKC-unabhängig zu sein scheint. Auf der anderen Seite wurde eine zumindest zum Teil PKC-abhängige Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und p38-MAPK beschrieben (Kanke et al., 2001; Kanke et al., 2005). Dieser Signalweg beinhaltet die Aktivierung des Transkriptionsfaktors nukleärer Faktor κ B (NF- κ B) und seiner stromaufwärts geschalteten regulierenden Kinase I κ B Kinase (IKK). Frühere Studien zeigten im Gegensatz dazu, dass PAR-2 in aortalen glatten Muskelzellen der Ratte eine selektive Aktivierung von p38, nicht aber von JNK vermittelt (Belham et al., 1996).

Diese Daten lassen vermuten, dass PAR-2 zelluläre Antworten durch die Aktivierung verschiedener Kinasen-Signalwege wie p42/44, JNK, p38 oder IKK zelltypspezifisch vermittelt und impliziert, dass unterschiedliche PKC-Subtypen regulierende Funktionen innehaben.

1.4 PAR-2-Aktivierung durch den TF/FVIIa-Komplex

PAR-2 wird durch verschiedene Proteasen aktiviert, wobei hier unter anderem Gerinnungsfaktor VIIa im Komplex mit seinem Rezeptor Tissue Factor angenommen wird (Camerer et al., 2000b; Marutsuka et al., 2002).

1.4.1 *Tissue Factor*

Der Transmembranrezeptor Tissue Factor (TF) ist nach Interaktion mit seinem Liganden FVIIa der Hauptauslöser der extrinsischen Gerinnung. Abgesehen von dieser hämostatischen Funktion wird TF mit verschiedenen pathophysiologischen Prozessen in Verbindung gebracht (Mackman, 2004; Pendurthi and Rao, 2002; Ruf and Mueller, 1996). Die Inaktivierung von TF im Mausmodell hat einen embryonal letalen Phänotyp aufgrund defizienter Blutgefäßentwicklung des Dottersacks zur Folge (Carmeliet et al., 1996). Im Gegensatz dazu beeinträchtigt die FVII-Defizienz die normale embryonale Entwicklung nicht, auch wenn perinatale schwere Blutungen zum Tod führen (Rosen et al., 1997). TF könnte daher unabhängig von der Fibrinbildung zur Embryogenese beitragen. Auch die Struktur eines Klasse II Zytokinrezeptors deutet darauf hin, dass TF als „echter“ Rezeptor wirksam ist, der - neben seiner Funktion als Auslöser der Gerinnung - intrazelluläre Signaltransduktion vermittelt (Bazan, 1990).

In zahlreichen *in vivo*- und *ex vivo*-Studien wurden Wirkungen von TF auf verschiedene biologische Prozesse wie Inflammation, Angiogenese, embryonale Vaskularisierung und Tumormetastasierung beschrieben, die das wachsende Interesse an einer TF-vermittelten Signaltransduktion begründen (Bromberg et al., 1995; Bromberg et al., 1999; Carmeliet et al., 1996; Erlich et al., 1999; Koomagi and Volm, 1998; Mueller and Ruf, 1998; Ruf and Mueller, 1996; Watanabe et al., 1999).

1.4.2 *TF/FVIIa-induzierte Signaltransduktion - Rolle von PAR-2*

Der Komplex aus TF und FVIIa induziert intrazelluläre Signale, die Kalziumströme mobilisieren und MAPK aktivieren (Camerer et al., 1996a; Poulsen et al., 1998; Rottingen et al., 1995; Sorensen et al., 1999). Um zu untersuchen, wie die TF/FVIIa-induzierte Signaltransduktion zu pathophysiologischen Veränderungen beitragen könnte, wurde die Regulation der Genexpression untersucht (Camerer et al., 2000a; Pendurthi et al., 2000; Pendurthi et al., 1997). Die Analyse spezifischer Transkripte zeigte dabei unter anderem eine verstärkte Expression des Urokinase Plasminogen-Aktivator-Rezeptors (uPAR), des Transkriptionsfaktors *early growth response 1* (*egr-1*)

und des Zytokins Interleukin-8 (IL-8) nach FVIIa-Stimulation TF-exprimierender Zellen wie Fibroblasten, Tumorzellen oder Keratinozyten (Camerer et al., 1999; Taniguchi et al., 1998; Wang et al., 2002).

Da die untersuchten TF/FVIIa-induzierten Signalkaskaden katalytisch aktiven FVIIa voraussetzten und unabhängig von der zytoplasmatischen Domäne von TF waren, vermuteten Camerer und Kollegen, dass die durch FVIIa ausgelösten Kalziumströme durch einen PAR vermittelt werden und gingen von TF als „Andockstation“ für FVIIa aus (Camerer et al., 1996b). Bis vor kurzem war unklar, ob einer der vier bekannten oder ein neuer PAR die Signale ins Innere der Zelle transduziert.

Nachfolgende Versuche identifizierten PAR-2 und, in geringerem Ausmaß, PAR-1 als die durch TF/FVIIa aktivierten PAR (Camerer et al., 2000b; Riewald and Ruf, 2001). Andere Studien zeigten eine PAR-2-abhängige TF/FVIIa-induzierte Migration von vaskulären glatten Muskelzellen (Marutsuka et al., 2002). Diese Daten lassen daher vermuten, dass der TF/FVIIa-Komplex über die Aktivierung von PAR-2 intrazelluläre Signalwege induziert.

1.4.3 Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von TF

Einige heterologe Expressionsstudien zeigten, dass die zytoplasmatische Domäne von TF nicht notwendigerweise für TF/FVIIa-induzierte Signalwege erforderlich ist (Camerer et al., 1999; Sorensen et al., 1999; Versteeg et al., 2002). Andere Studien lassen hingegen vermuten, dass TF als Rezeptor Signale über seine zytoplasmatische Domäne transduzieren kann bzw. ihr eine regulatorische Funktion zukommt.

Schon 1992 wurde in diesem Zusammenhang eine PKC-abhängige Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne als Reaktion auf Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) nachgewiesen, was auf Regulation der Rezeptoraktivität und Signaltransduktion hinweist (Zioncheck et al., 1992). Die Phosphorylierung konnte *in vitro* an den Aminosäureresten Ser253 und Ser258 gezeigt werden (Mody and Carson, 1997). Neuesten Daten zufolge wird durch eine PKC-abhängige Phosphorylierung an Ser253 eine darauf folgende Phosphorylierung an Ser258 durch eine Prolin-gerichtete Kinase verstärkt (Dorfleutner and Ruf, 2003). Die Phosphorylierung an Ser258 wird dabei durch eine Palmitoylierung an Cys245 gehemmt (siehe Schema Abb. 5). Die reversible Thioesterbindung von Palmitat an die Sulfhydrylgruppe eines Cysteins ist ein typisches Merkmal vieler membrangebundener Proteine und könnte der Verankerung von Signalmolekülen auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran dienen (Casey, 1995; Dunphy and Linder, 1998).

Funktionell wurde die Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von TF in einem Modell hämatogener Metastase aufgezeigt, da nach Deletion der zytoplasmatischen Domäne von TF bzw. nach Mutation der Phosphorylierungsstellen Ser253 und Ser258 die TF-induzierte Metastase reduziert wird (Bromberg et al., 1995; Bromberg et al., 1999; Mueller and Ruf, 1998). Abe und Kollegen wiesen nach, dass die zytoplasmatische Domäne von TF für die Produktion von vaskulo-endotheliale Wachstumfaktor (VEGF) in Melanomzellen essenziell ist, und zwar unabhängig von seinem Liganden FVIIa (Abe et al., 1999). Des Weiteren wurde die Interaktion der zytoplasmatischen TF-Domäne mit Aktin-bindendem Protein 280 (ABP-280) nachgewiesen, welche Abhängigkeit von den Phosphorylierungen von Ser253 und Ser258 aufwies (Ott et al., 1998). Über diese Wechselwirkung könnte TF die Zellmotilität bzw. Gewebeumbildungen beeinflussen (Cunningham et al., 1992; Ott et al., 1998). Studien an transgenen Mäusen, die TF mit deletierter zytoplasmatischer Domäne exprimieren (TF Δ zyt), lassen zudem eine Rolle der zytoplasmatischen Domäne bei der NF- κ B-Aktivierung, Zytokinproduktion und Leukozytenrekrutierung nach Sepsis vermuten (Sharma et al., 2004).

Interessanterweise gibt es erste Hinweise darauf, dass die zytoplasmatische Domäne von TF auf die PAR-2-vermittelte Signaltransduktion einwirken kann. So beschrieben Ahamed und Kollegen eine PKC α -abhängige Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von TF nach Aktivierung von PAR-2 durch den ternären Komplex aus TF/FVIIa/FXa (Ahamed and Ruf, 2004). Diese Phosphorylierung hebt dabei offenbar eine negativ regulatorische Wirkung der zytoplasmatischen Domäne von TF auf die PAR-2-vermittelten Angiogenese auf (Belting et al., 2004) (siehe Schema Abb. 5). In Okulargewebe wurde dabei die Kolo-kalisation von PAR-2 und phosphoryliertem TF gezeigt, die Voraussetzung für diese Interaktion wäre (Belting et al., 2004). Bislang ist allerdings unklar, ob sich diese Regulation der PAR-2-Wirkung durch die zytoplasmatische Domäne von TF auf andere Zellen und/oder zelluläre Prozesse übertragen lässt.

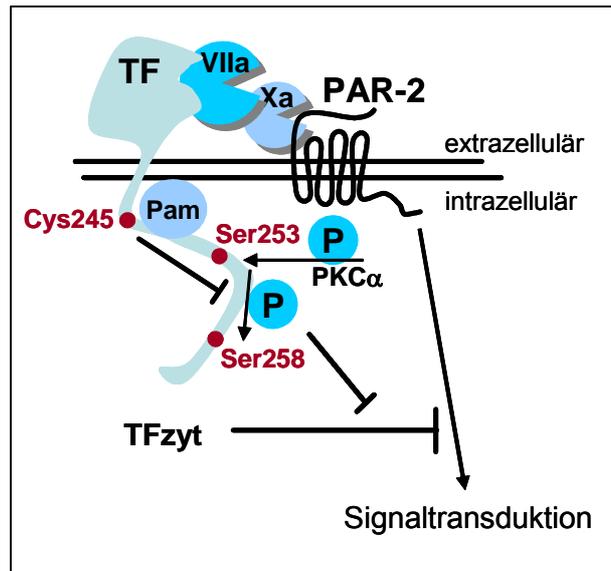


Abb. 5. Hypothetisches Schema der Regulation der PAR-2-vermittelten Signaltransduktion durch die zytoplasmatische Domäne von Tissue Factor (TFzyt)

Eine durch Aktivierung von PAR-2 ausgelöste PKC α -abhängige Phosphorylierung (P) an Ser253 der TFzyt und eine darauf folgende Phosphorylierung an Ser258 heben die negative Regulation der TFzyt auf die PAR-2-vermittelte Signaltransduktion auf. Die Phosphorylierung an Ser258 wird dabei wiederum negativ durch eine Palmitoylierung (Pam) an Cys245 reguliert. Das Schema zeigt die Aktivierung von PAR-2 durch den ternären Komplex aus TF, FVIIa und FXa. Pfeile bedeuten stimulierende Effekte, senkrecht aufeinander stehende Linien zeigen hemmende Effekte an.

1.5 MT-SP1/Matriptase – ein neuer PAR-2-Aktivator?

MT-SP1/Matriptase/*Suppressor of tumorigenicity 14 (ST14)/Tumor-associated differentially expressed gene-15 (TADG-15)* wurde ursprünglich in humanen Brustkrebszellen identifiziert und aufgrund des Molekulargewichtes und der Eigenschaft, Gelatine zu degradieren, zuerst als Gelatinase angesehen (Lin et al., 1997; Shi et al., 1993). Dabei wurden sowohl lösliche als auch membranständige Formen der Protease nachgewiesen. Die Isolierung aus humaner Milch und die nachfolgende Sequenzanalyse ergaben, dass es sich bei Matriptase um ein Trypsin-ähnliches Protein aus 683 Aminosäuren (AS) handelt, das mehrere unterschiedliche Domänen, unter anderem eine C-terminal gelegene Serinproteasedomäne, aufweist (Lin et al., 1999b). Die Bezeichnung Matriptase wurde zur Verdeutlichung der matrixdegradierenden und trypsinähnlichen Eigenschaften des Proteins gewählt (Lin et al., 1999b). Unabhängig von der Gruppe um Lin charakterisierten Takeuchi et al. eine trypsinähnliche Typ II transmembranäre Serinprotease in einer humanen Prostatakrebszelllinie, die von ihnen als MT-SP1 (*membrane-type serine protease 1*) bezeichnet wurde (Takeuchi et al., 1999). Diese Protease aus 855 AS verfügte über

zwei Tandemwiederholungen einer CUB-Domäne (Komplementfaktor C1r/C1s - embryonales Seeigelprotein UEGF - Knochen-morphogenetisches Protein BMP) und vier Tandemwiederholungen der *low-density lipoprotein*-Rezeptor (LDLR)-Domäne, die sich zwischen der N-terminalen zytosolischen und transmembranären und der C-terminalen katalytischen Domäne befinden (Abb. 6) (Lin et al., 1999b; Takeuchi et al., 1999). Die Aminosäuresequenz von MT-SP1/Matriptase weist eine N-terminale hydrophobe Sequenz aus 27 Aminosäureresten (AS 55-81) auf, die, vergleichbar zu Sequenzen in Hepsin oder Enterokinase, ein putatives Signalpeptid darstellt (Kitamoto et al., 1994; Leytus et al., 1988). Falls dieses nicht durch Signalpeptidasen geschnitten wird, könnte es der Verankerung in der Zellmembran dienen (Takeuchi et al., 1999). Das aktive Zentrum von MT-SP1/Matriptase weist die klassische katalytische Triade der Serinproteasen auf und besteht aus His656, Asp711 und Ser805. Das MT-SP1/Matriptase-Gen ist auf Chromosom 11q24-q25 lokalisiert und besteht aus 19 Exons (Zhang et al., 1998).

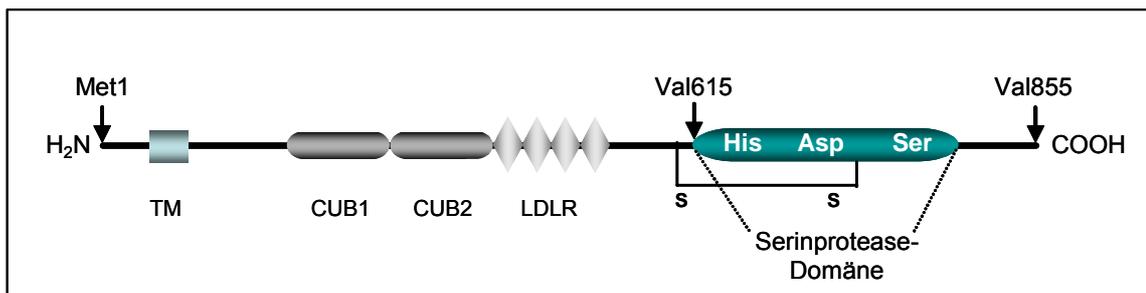


Abb. 6. Struktur von MT-SP1/Matriptase

Neben einer N-terminalen Transmembranregion (TM) verfügt MT-SP1/Matriptase über mehrere regulatorische Einheiten (zwei CUB-Domänen, vier Tandemwiederholungen einer LDL-Rezeptordomäne (LDLR)) und eine C-terminale extrazelluläre Serinproteasedomäne, die eine katalytische Triade (His656, Asp711, Ser805) im aktiven Zentrum aufweist. Die Aktivierung von MT-SP1/Matriptase erfolgt durch Proteolyse zwischen Arg614 und Val615, wobei das katalytische Fragment mit dem nichtkatalytischen N-terminalen Fragment über eine Disulfidbrücke (S-S) verbunden bleibt.

Es stellte sich heraus, dass es sich bei der löslichen, von Lin identifizierten Matriptase um ein Teilprotein des von Takeuchi beschriebenen membranständigen MT-SP1-Proteins handelte. Es wird vermutet, dass die kürzere Proteinform entweder durch Abspaltung der Ektodomäne entsteht oder dass es sich um das Produkt alternativen Spleißens handeln könnte (Benaud et al., 2001; Cho et al., 2001; Friedrich et al., 2002; Takeuchi et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wird MT-SP1/Matriptase aus Gründen der Übersichtlichkeit in Abbildungen als MT-SP1 bezeichnet.

1.5.1 Substratspezifität

Die Substratspezifität von MT-SP1/Matriptase wurde mit Hilfe einer *positional scanning synthetic combinatorial library* (PS-SCL) und durch Substrat-Phagendisplay ermittelt (Takeuchi et al., 2000). Dabei ergaben sich als bevorzugte Schnittstellen Arg/Lys an P4 und basische Reste oder Gln an P3, Aminosäuren mit kleinen Seitenketten für P2, Arg oder Lys an P1 und Ala an P1'. Dieses Spezifitätsprofil stimmte mit den Schnittstellen bekannter Proteine wie PAR-2, einzelkettigem Urokinase Plasminogen-Aktivator (uPA), Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) sowie der Vorläuferform von MT-SP1/Matriptase überein (Lee et al., 2000; Takeuchi et al., 2000). Die Proteolyse von uPA und HGF durch MT-SP1/Matriptase wurde mittels Western-Blot durch den Nachweis der jeweiligen Spaltprodukte bestätigt (Lee et al., 2000; Takeuchi et al., 2000). Die Proteolyse von PAR-2 durch MT-SP1/Matriptase wurde anhand von Kalziumoszillationen in *Xenopus*-Oozyten, die mit PAR-2-cDNA transfiziert wurden, indirekt nachgewiesen, wobei PAR-1-, -3- und -4-exprimierende Oozyten keine MT-SP1/Matriptase-induzierten Kalziumströme zeigten (Takeuchi et al., 2000).

1.5.2 HAI-1 als Inhibitor von MT-SP1/Matriptase

Während MT-SP1/Matriptase in humanen Brustkrebszellen als ungebundenes Enzym beschrieben wurde, findet sich MT-SP1/Matriptase in humaner Milch und normalem Gewebe komplexiert mit dem Inhibitor HAI-1 (HGF-Aktivator Inhibitor 1) (Lin et al., 1999a). In Brustepithelzellen wurde gezeigt, dass hauptsächlich die aktive Form von MT-SP1/Matriptase mit HAI-1 komplexiert ist (Lee et al., 2005b). Bei diesem Inhibitor handelt es sich um ein membrangebundenes Glykoprotein aus zwei extrazellulären Kunitz-Typ-Serinproteaseinhibitor-Domänen, einer extrazellulären LDLR-Domäne, einer Transmembrandomäne und einer kurzen, C-terminalen zytoplasmatischen Domäne. HAI-1 ist ein Typ I transmembranes Protein, dessen Struktur seine Wirkung an der Zelloberfläche sichert (Kataoka et al., 2003). Es wurden allerdings auch lösliche Formen von HAI-1 beschrieben, die vermutlich proteolytisch geschnitten sind und denen die C-terminale hydrophobe Region fehlt (Shimomura et al., 1999). Neben MT-SP1/Matriptase ist der Aktivator von HGF (HGFA) als Substrat von HAI-1 bekannt (Shimomura et al., 1997).

1.5.3 Expression

MT-SP1/Matriptase-mRNA findet sich in epithelialen Geweben wie Prostata, Niere, Lunge, Dünn- und Dickdarm, Magen und Plazenta, sowie in Milz, Leber, Leukozyten und Thymus (Takeuchi et al., 1999). Dabei ist MT-SP1/Matriptase in der Epithelschicht der epithelhaltigen Gewebe und dort in allen unterschiedlichen Epitheltypen lokalisiert (Oberst et al., 2003a; Satomi et al., 2001).

Die Expression von MT-SP1/Matriptase findet sich zudem in hohem Maße in Prostata-, Brust- und Kolonkarzinomen, und zwar sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Oberst et al., 2001). Nicht nur durch erhöhte MT-SP1/Matriptase-Expression zum Beispiel in Brustkrebsgewebe, sondern auch durch ein Ungleichgewicht zwischen MT-SP1/Matriptase und dem Inhibitor HAI-1 zugunsten einer verstärkten MT-SP1/Matriptase-Aktivität kann die Entstehung maligner Tumoren begünstigt werden (Kang et al., 2003a; Oberst et al., 2002). Auch eine deregulierte Aktivierung und eine veränderte subzelluläre Lokalisation der Protease könnte zur Brustkrebsprogression beitragen (Benaud et al., 2002a). In immortalisierten Brustepithelzellen wird MT-SP1/Matriptase an den Zell-Zell-Kontakten nach Stimulation mit Serum oder Sphingosin-1-Phosphat (S1P) aktiviert (Benaud et al., 2001; Benaud et al., 2002b; Hung et al., 2004). In Brustkrebszellen jedoch ist MT-SP1/Matriptase konstitutiv aktiv und befindet sich angesammelt in Membranauffaltungen (*membrane ruffles*) – eine Relokalisation, die MT-SP1/Matriptase von einer gut regulierten Protease zu einer invasiven Protease an den führenden Enden von Krebszellen konvertieren könnte (Benaud et al., 2002a).

Erst kürzlich wurde erstmalig die Expression von MT-SP1/Matriptase in mikrovaskulären Endothelzellen nachgewiesen, wodurch eine Bedeutung von MT-SP1/Matriptase im Gefäßsystem möglich erscheint (Aimes et al., 2003).

1.5.4 Funktion

Das Expressionsmuster in normalem Gewebe lässt eine ubiquitäre Funktion des Enzyms in der Biologie oberflächenauskleidender Epithelzellen vermuten. Tatsächlich wurde MT-SP1/Matriptase als essenzielle Komponente in der Profilaggrin-Prozessierung in Keratinozyten und als Hauptregulator der epidermalen Ausdifferenzierung beschrieben (List et al., 2003). Diese Bedeutung in der Ausbildung der Epidermis bestätigt sich in MT-SP1/Matriptase-defizienten Mäusen: Das Maushomolog zu MT-SP1/Matriptase wurde als Epithin bezeichnet und Epithin-

defiziente Mäuse zeigten die Bedeutung von MT-SP1/Matriptase für das postnatale Überleben auf, da die Mäuse binnen 48h nach der Geburt an einer unvollständigen epidermalen Grenzschicht der Haut durch Dehydrierung starben und zudem eine fehlerhafte Entwicklung der Haarfollikel und eine erhöhte Thymozytenapoptose aufwiesen (Kim et al., 1999; List et al., 2002).

Die Expression von MT-SP1/Matriptase in Tumorgewebe und Tumorzelllinien deutet auf eine wichtige Rolle bei Tumordinvasion und Metastasierung hin. Bestätigt wird dies durch die Reduktion von Tumorwachstum und Metastasierung im Rattenmodell nach Hemmung des Enzyms (Takeuchi et al., 1999). In der Tat wird MT-SP1/Matriptase bis zum heutigen Zeitpunkt ausschließlich mit tumorbiologischen Prozessen in Verbindung gebracht. Die Identifizierung der *in vitro*-Substrate von MT-SP1/Matriptase lässt vermuten, dass MT-SP1/Matriptase die durch diese Substrate vermittelten Funktionen *in vivo* regulieren könnte, wie Zell-Zell-Adhäsion, Tumorwachstum und Metastasierung im Falle von uPA und HGF (Gibson et al., 1998; Nusrat et al., 1994). Durch die Identifizierung von PAR-2 als potenziellem MT-SP1/Matriptase-Substrat erscheint auch eine Rolle von MT-SP1/Matriptase im kardiovaskulären System denkbar.

1.5.5 Aktivierung von MT-SP1/Matriptase

Die Aktivierung von MT-SP1/Matriptase erfordert die proteolytische Spaltung an einem kanonischen Aktivierungsmotiv und bewirkt die Konvertierung vom einzelkettigen Zymogen zur zweikettigen, aktiven Serinprotease (Benaud et al., 2001). Die Spaltung findet zwischen Arg614 und Val615 innerhalb eines ArgValValGlyGly-Motivs statt, das dem charakteristischen ArgIleValGlyGly-Motiv anderer Serinproteasen ähnelt (Lin et al., 1999b). Eine innerhalb der Serinproteasen konservierte intramolekulare Disulfidbrücke verbindet dabei das katalytische Fragment mit dem N-terminalen Rest und wird bei MT-SP1/Matriptase zwischen Cys604 und Cys731 ausgebildet (siehe Abb. 6). Cys731 entspricht dabei Cys122 gemäß Chymotrypsin-nomenklatur (siehe MT-SP1/Matriptase-Sequenz in Abschnitt 2.1.10.1).

Interessanterweise entsteht die aktivierende Spaltung vermutlich nicht durch andere Proteasen, da die MT-SP1/Matriptase-Aktivierung das eigene aktive Zentrum, die nichtkatalytischen Domänen und sogar seinen Inhibitor HAI-1 erfordert (Oberst et al., 2003b). Sphingosin-1-Phosphat scheint dabei die Translokation von MT-SP1/Matriptase und dessen Inhibitor HAI-1 in Zell-Zell-Kontakte zu vermitteln (Oberst et al., 2005). Es wäre möglich, dass der MT-SP1/Matriptase-Aktivierung eine Autoaktivierung durch schwach proteolytische MT-SP1/Matriptase-Zymogene

vorangeht, was die Dimerisierung oder Oligomerisierung von MT-SP1/Matriptase-Molekülen voraussetzen würde, wie dies zum Beispiel bei Caspase 8 beobachtet wird (Yang et al., 1998). Von Krebszelllinien wird vorrangig die unkomplexierte Zymogenform von MT-SP1/Matriptase sezerniert, wobei Krebszelllinien, die zusätzlich Trypsin sezernieren, die aktive Form von MT-SP1/Matriptase ohne den Inhibitor HAI-1 ins Medium abgeben (Jin et al., 2005; Lin et al., 1999b). Die beiden Serinproteasen Trypsin und MT-SP1/Matriptase könnten daher kooperativ die extrazelluläre Proteolyse im Gewebe steigern.

1.6 Zytokine als Modulatoren der Atherogenese

Zytokine, Chemokine (**chemotaktische Zytokine**) und ihre Rezeptoren spielen in den verschiedenen Phasen der Atherosklerose eine entscheidende Rolle als Modulatoren der Entzündungsreaktion. So verstärken Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und IL-6 die Bindung von *low-density lipoprotein* (LDL) an die Endothel- und glatten Muskelzellen der atherosklerotischen Gefäßwand (Gierens et al., 2000; Hajjar and Haberland, 1997; Hofnagel et al., 2004; Stopeck et al., 1993).

Chemokine stellen eine Untergruppe der Zytokine dar und bestehen aus kleinen Molekülen von 8 bis 10 kDa, die klassischerweise eine Rolle bei der Leukozytenrekrutierung spielen. In den letzten Jahren etablierte sich die Ansicht von Chemokinen als Aktivatoren von Leukozyten und Vermittlern von Entzündungsreaktionen, was ihre Bedeutung in der Atherosklerose begründet (Reape and Groot, 1999; Terkeltaub et al., 1998).

Interleukin-8 (IL-8 oder CXCL8) gehört zur Familie der CXC-Chemokine und wirkt als starker chemotaktischer Faktor für Neutrophile. Das inflammatorische Zytokin wird von vielen verschiedenen Zelltypen als Antwort auf proinflammatorische Stimuli wie IL-1, TNF, Lipopolysaccharide (LPS) und Viren produziert, unter anderem von Monozyten/Makrophagen, T-Zellen, Neutrophilen, Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten. Die Synthese von IL-8 kann dabei auf verschiedene Arten reguliert werden. In der Promotorregion des IL-8-Gens sind mehrere *cis*-Elemente wie Bindungsstellen für AP-1 (*activator protein-1*), C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) und NF- κ B (nukleärer Faktor κ B) lokalisiert, deren Regulation zelltypspezifisch zu sein scheint (Kunsch et al., 1994; Roebuck, 1999; Yasumoto et al., 1992). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B hat sich dabei als einer der wichtigsten Regulatoren in Entzündungsreaktionen herauskristallisiert. Er induziert nicht nur Chemokine wie IL-8,

IL-6 und IL-1, sondern auch TNF- α , Adhäsionsmoleküle (Selektine, vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1), interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1)) und Gerinnungsfaktoren (Tissue Factor, Plasminogen Aktivator Inhibitor-1) (Ferran et al., 1995; Umezawa et al., 2000).

Die Funktion von IL-8 besteht hauptsächlich im Anlocken von Neutrophilen an Entzündungsorte und in deren Aktivierung. IL-8 bindet an zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren heptahelikaler Struktur, die als CXCR-1 und CXCR-2 bezeichnet werden. Das atherogene Potenzial von IL-8 zeigt sich in seiner Induktion durch Cholesterinbeladung von Makrophagen und seiner Expression in den Schaumzellen von humanem Atherom (Wang et al., 1996). Diese Induktion konnte ebenfalls für *Monocyte Chemoattractant Protein 1* (MCP-1) gezeigt werden. Zudem vermittelt das Mausomolog zu humanem IL-8 die Akkumulation von Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen (Boisvert et al., 1998). Klinische Bedeutung erlangt IL-8 als diagnostischer Marker, da erhöhten IL-8-Plasmawerten eine wichtige Rolle bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit zugeschrieben wird (Boekholdt et al., 2004).

In vivo-Studien zeigen, dass das CC-Chemokin MCP-1, ein Schlüsselmediator in der Monozytenrekrutierung, zusammen mit seinem Rezeptor CCR2 einen Vermittler des atherogenen Prozesses darstellt (Aiello et al., 1999; Boring et al., 1998; Dawson et al., 1999; Gosling et al., 1999; Gu et al., 1998). Die Infiltration der Gefäßwand durch Monozyten wird dabei wesentlich durch MCP-1 vermittelt (Reckless et al., 1999). Zudem ist bekannt, dass MCP-1 zur erneuten Gefäßverengung (Restenose) nach Ballondilatation im Tiermodell beiträgt (Mori et al., 2002; Usui et al., 2002).

Interleukin-6 (IL-6) spielt eine Rolle bei der Akkumulation von Leukozyten und Makrophagen in der atherosklerotischen Plaque (Schieffer et al., 2004). Klinische Studien zeigen erhöhte IL-6-Spiegel im Blutkreislauf von Herzinfarktpatienten und schreiben IL-6 eine Rolle bei der erneuten Gefäßverengung nach Koronarintervention zu (Ikeda et al., 2001). Auch in der atherosklerotischen Gefäßwand findet sich eine erhöhte Expression von IL-6 und IL-8 (Rus et al., 1996). Chemokine und Zytokine spielen daher eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und Perpetuierung der Atherosklerose.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Atherosklerose wird heute als chronische Entzündung der betroffenen Gefäße angesehen und ursächlich auf einen Funktionsverlust der endothelialen Gefäßinnenwand zurückgeführt. Dabei scheint der Protease-aktivierte Rezeptor 2 (PAR-2) eine wichtige Rolle als Vermittler der inflammatorischen Reaktion zu spielen. PAR-2 ist ein G-Protein-gekoppelter heptahelikaler Rezeptor, der durch proteolytische Spaltung an seinem N-Terminus irreversibel aktiviert wird. Als einziger der vier bekannten Protease-aktivierten Rezeptoren wird PAR-2 nicht durch den Gerinnungsfaktor Thrombin, sondern durch Trypsin, Mastzell-Tryptase und die Gerinnungsfaktoren Tissue Factor/FVIIa und FXa aktiviert. PAR-2-Expression findet sich innerhalb des Gefäßsystems in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Leukozyten. In dieser Arbeit wurde die Frage nach einem neuen, selektiven physiologischen Agonisten von PAR-2 in der Vaskulatur aufgeworfen, welcher über Aktivierung von PAR-2 zum atherosklerotischen Entzündungsprozess beitragen könnte. Die Trypsin-ähnliche, transmembrane Serinprotease MT-SP1/Matriptase besitzt eine biochemisch gezeigte Substratspezifität für PAR-2, so dass eine kardiovaskuläre Bedeutung von MT-SP1/Matriptase möglich erscheint. Auch die kürzlich nachgewiesene Expression von MT-SP1/Matriptase in mikrovaskulären Endothelzellen könnte auf eine Rolle im Gefäßsystem hinweisen. Funktionell wird MT-SP1/Matriptase bis zum heutigen Zeitpunkt ausschließlich mit Tumorwachstum und Metastasierung in Verbindung gebracht, so dass geklärt werden sollte, inwieweit MT-SP1/Matriptase eine Bedeutung im Gefäßsystem bzw. bei der Pathogenese vaskulärer Erkrankungen zukommen könnte.

Diese Arbeit beschäftigte sich daher mit folgenden Fragestellungen:

1. Wirkt die rekombinant exprimierte katalytische Domäne von humaner MT-SP1/Matriptase proinflammatorisch und/oder prothrombotisch in primären humanen Endothelzellen?
2. Wird dieser zelluläre Effekt über die Aktivierung eines PAR vermittelt?
3. Welche intrazellulären Signalwege werden durch MT-SP1/Matriptase in Endothelzellen induziert, die diese Wirkungen vermitteln könnten?
4. Kommt MT-SP1/Matriptase in der atherosklerotischen Erkrankung eine Bedeutung zu?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, biochemische Reagenzien, „Kits“

Actinomycin D	Sigma, Taufkirchen
Agarose (SeaKem LE Agarose)	Cambrex, Verviers, Belgien
Ampicillin	Roche, Mannheim
Antioxidans (NuPAGE) für Western Blot	Invitrogen, Karlsruhe
Assays-on-Demand qPCR-Sonden	Applied Biosystems, Weiterstadt
Bacto-Agar	Difco, Sparks, MD, USA
BCA Proteinquantifizierungsreagenz	Pierce/Perbio, Bonn
BSA (Protease-frei)	Roth, Karlsruhe
dNTP	Roth, Karlsruhe
4',6'-Diamino-2-phenylindol (DAPI)	Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe
Diethylpyrokarbonat (DEPC)	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
D,L-Dithiothreitol (DTT)	Fluka, Taufkirchen
DNA-Längenstandard	Fermentas, St.Leon-Rot
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
ECL-Nachweissystem	Amersham, Freiburg
Effectene Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
ELISA (IL-8, IL-6, MCP-1)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
rekombinanter humaner FVIIa NovoSeven®	Novo Seven, Mainz
Faktor X	American Diagnostica, Pfungstadt
Ficoll-Paque Plus	Amersham, Freiburg
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Hamburg
Gelatine	Sigma, Taufkirchen
Gel-Extraktionskit MiniElute	Qiagen, Hilden
Hefeextrakt	Difco, Sparks, MD, USA
I-1550 (Boc-Gln-Ala-Arg-AMC·HCl)	Bachem, Weil am Rhein
IL-1 β	Calbiochem, Schwalbach
Immobilon P-Membran (PVDF)	Millipore, Eschborn
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
Lithiumdodecylsulfat-Probenpuffer	Invitrogen, Karlsruhe

β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
NuPAGE Bis-Tris Gele	Invitrogen, Karlsruhe
Oligohexamere (<i>random primer</i>)	Invitrogen, Karlsruhe
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Phenylmethylsulfoxid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S-Lösung	Sigma, Taufkirchen
Proteinmarker SeeBlue Plus2	Invitrogen, Karlsruhe
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
qPCR Mastermix Plus	Eurogentech, Köln
Re-Blot Plus Strong	Chemicon, Hampshire, UK
Red Chromogen	Dako, Hamburg
RNAiFect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
RNase AWAY	Roth, Karlsruhe
RNeasy-Mini Kit	Qiagen, Hilden
Röntgenfilme Super RX	Fujifilm, Düsseldorf
SDS-Lösung	Biomol, Hamburg
SPECTROZYME® FXa-Substrat	American Diagnostica, Pfungstadt
SUPERase-In	Ambion, Huntingdon, UK
Trypton Pepton	Difco, Sparks, MD, USA
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Vectastain ABC-AP Kit (Maus IgG)	Vector Laboratories/Axxora, Grünberg
Western Blot-Papier (Whatman)	Schleicher & Schuell, Dassel

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

2.1.2 *Pharmakologische Inhibitoren*

Inhibitor	Wirkung	Anbieter	Endkonzentration	Literatur
PD 98059 (2'-Amino-3'-Methoxyflavon)	Inhibiert die Aktivierung von p42/44 MAPK	Calbiochem, Schwalbach	20 µM	(Dudley et al., 1995; Waters et al., 1995)
SB 220025 (5-(2-Amino-4-Pyrimidinyl)-4-(4-Fluorophenyl)-1-(4-Piperidinyl)imidazol)	Inhibiert p38 MAPK	Calbiochem, Schwalbach	20 µM	(Jackson et al., 1998; Wang et al., 1998)

Safingol (L-threo-Dihydrosphingosin)	Inhibiert PKC α	Calbiochem, Schwalbach	20 μ M	(Ahamed and Ruf, 2004; Sachs et al., 1995)
Inhibitor der NF-κB-Aktivierung (6-Amino-4-(4-Phenoxyphenylethylamino) Quinazolin)	Inhibiert die Aktivierung von NF- κ B	Calbiochem, Schwalbach	1 μ M	(Tobe et al., 2003)

Tabelle 2. Pharmakologische Inhibitoren

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Abdeckfolien für qPCR-Platten	Applied Biosystems, Weiterstadt
Adhäsionsobjektträger Superfrost-Plus	Roth, Karlsruhe
Cellfunnel Probenkammer für Zytozentrifugation	Tharmac, Waldsolms
Durchsichtige 96er PCR-Platten	Applied Biosystems, Weiterstadt
FACS-Röhrchen	Beckton Dickinson, Heidelberg
Objektträger für Zytozentrifugation (Einzelkreis, unbeschichtet)	Tharmac, Waldsolms
Röhrchen für Luminometer	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturflaschen mit wachstumsunterstützender Oberfläche (CELL+)	Sarstedt, Nümbrecht
Zyto-Filterkarten	Tharmac, Waldsolms

2.1.4 Geräte

Blutzellzählgerät KX-21N	Sysmex, Norderstedt
CO ₂ -Brutschrank	Heraeus, München
Blotting Apparatur Western Blot	Sigma, Taufkirchen
Dispergierstation Ultra Turrax T8	IKA Labortechnik, Staufen
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Beckton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Lesegerät (Biotrak II)	Amersham Biosciences, Freiburg
Fluoreszenzmikroskop, invers	Leica, München
Gelelektrophoresekammer	MWG Biotech, Ebersberg
Lichtmikroskop Axiovert 100, invers	Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Tecan, Crailsheim
Kryostat LeicaCM1850	Leica, Wetzlar
PCR-Gerät	Applied Biosystems, Weiterstadt

Röhrchen-Luminometer AutoLumat Plus	Berthold Technologies, Bad Wildbad
SDS-PAGE-Kammer (Novex Mini-Cell)	Invitrogen, Karlsruhe
Spektrometer (Gene Quant pro)	Amersham Biosciences, Freiburg
Sterilbank	Heraeus, München
Real-Time PCR-Gerät (ABI Prism 7700)	PerkinElmer-Applied Biosystems, Weiterstadt
Zytozentrifuge (Cytospin2)	Shandon, Frankfurt

2.1.5 Bakterien

Max Efficiency DH5 α kompetente <i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe
TOP10 chemisch kompetente <i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe
XL10-Gold Ultrakompetente <i>E. coli</i>	Stratagene, La Jolla, USA

2.1.6 Primärzellen

Herkunft	Bezeichnung	Firma
humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene	HUVEC	Promocell, Heidelberg
humane Endothelzellen aus der Koronararterie	HCAEC	Promocell, Heidelberg
humane glatte Muskelzellen aus der Koronararterie	SMC	Clonetics, San Diego, USA

Tabelle 3. Primärzellen

2.1.7 Zellkulturmedien, Zusätze und Reagenzien

DMEM-Medium	Gibco, Karlsruhe
Endothelzellmedium für HUVEC (EGM-2) (Basalmedium+Supplemente)	Cambrex, Verviers, Belgien
Endothelzellmedium für HCAEC (ECGM-MV) (Basalmedium+Supplemente)	Promocell, Heidelberg
Fötale Rinderserum (FRS)	Gibco, Karlsruhe
Glattes Muskelzellmedium (SmGM-2) (Basalmedium+Supplemente)	Cambrex, Verviers, Belgien
L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe

Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640-Medium	Gibco, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
Zell-Dissoziationspuffer	Sigma, Taufkirchen

2.1.8 Allgemein benötigte Puffer

10x DNA Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese

Glyzerin	50%	
EDTA	20 mM	
Xylen Zyanol	FF	0,06%
Bromphenolblau		0,06%
Tris·Cl	180 mM	pH 7,5

LB-Medium zur Anzucht von Bakterien

Trypton	1%	
Hefeextrakt	0,5%	
NaCl	1%	pH 7,4

für **LB-Agar** 15 g/l Bacto-Agar hinzufügen

10x Tris-Borat-EDTA (TBE) für Agarosegelelektrophorese

Tris·Cl	1 M	
Borsäure	0,9 M	
EDTA	10 mM	pH 8,3

1x Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

KCl	2,7 mM	
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	
NaCl	137 mM	
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM	pH 7,4

2.1.9 Enzyme

Alkalische Phosphatase (Kalb, intestinal)	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Pfx</i> DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme	Fermentas, St.Leon-Rot
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

2.1.10 Rekombinante MT-SP1/Matriptase-Proteine

Die rekombinante Expression der katalytischen Domäne von MT-SP1/Matriptase (AS 596-855, Sequenz im Anhang 11.1) in *E. coli* wurde von Morphochem AG Basel durchgeführt. Durch die Klonierung der für die Serinproteasedomäne kodierenden cDNA von MT-SP1/Matriptase in pDS-6HisNdeI wurde ein 5'-Ende generiert, das einen N-Terminus aus 15 zusätzlichen Aminosäureresten kodiert und unter anderem 6 His-Reste in Folge aufweist. Generiert wurden die Punktmutanten MT-SP1/Matriptase Cys122Ser (Chymotrypsin-Nummerierung) und Cys122Ser, Ser195Ala (Chymotrypsin-Nummerierung). Die Mutante Cys122Ser wurde der Wildtyp-Form vorgezogen, da nach Aktivierung des Enzyms auf diese Weise ein kovalentes Anhaften des Pro-Peptides an die Serinproteasedomäne über eine Disulfidbrücke verhindert wurde. MT-SP1/Matriptase Cys122Ser und Wildtyp-MT-SP1/Matriptase waren dabei in ihrer Michaelis-Menten-Konstante für das Substrat Boc-Gln-Ala-Arg-AMC (I-1550) vergleichbar. Die Mutante Ser195Ala weist hingegen eine Mutation des Serinrestes der katalytischen Triade des aktiven Zentrums auf, wodurch katalytische Inaktivität erzeugt werden sollte (siehe Schema Abb. 7). Die Reinheit der Proteinpräparationen wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abb. 8 und 9). Die Pro-Peptide bestanden aus 275 Aminosäuren (theoretisches Molekulargewicht 30 kDa) und die aktivierten Enzyme aus 241 Aminosäuren (theoretisches Molekulargewicht 26 kDa). Die Enzyme wurden in 50% Glycerin bei -80°C aufbewahrt.

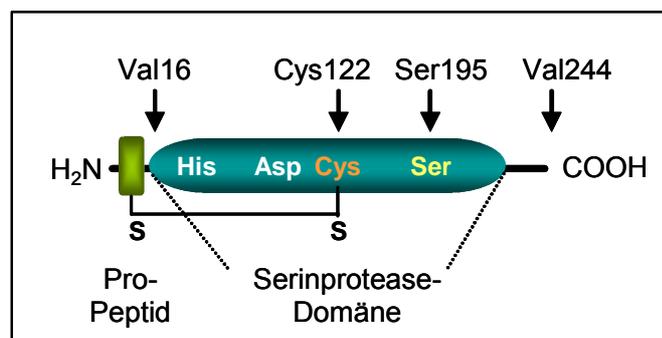


Abb. 7. Struktur der rekombinant exprimierten MT-SP1/Matriptase-Serinproteasedomäne vor Aktivierung (Chymotrypsin-Nomenklatur)

Nach Aktivierung durch Proteolyse zwischen Arg15 und Val16 blieb das Pro-Peptid über eine Disulfidbrücke an die katalytische Domäne von MT-SP1/Matriptase in der WT-Form gebunden. Durch die Mutation Cys122Ser konnte dieses kovalente Anhaften verhindert werden. Zusätzlich wurde eine katalytisch inaktive Mutante generiert, deren Ser195 zu Ala mutiert ist. Die Aminosäuren in der Abbildung sind nach Chymotrypsin-Nomenklatur nummeriert.

2.1.10.1 Aminosäuresequenz von MT-SP1/Matriptase Cys122Ser

Aminosäuresequenz des rekombinanten humanen Proteins nach Abspaltung der Pro-Domäne gemäß Chymotrypsin-Nomenklatur:

abgespaltete MT-SP1 Pro-Domäne (34 AS):

MRGSHHHHHHEIDHMGSDKDCD**C**GLRSFTRQAR

	16	26	36	46	56
MT-SP1 (615-855)	VVGGTDADEG	EWPWQVSLHA	LGQGHICGAS	LISPNNLVSA	A H CYIDDRGF
Chymotr (19-263)	IVNGEDAVPG	SWPWQVSLQD	KTGFHFCCGS	LISEDWVVTA	A H CGVRTSD.
		67	77	86	96
MT-SP1	RYSPTQWTA	FLGLHDQSQR	SAPGVQERRL	KRIISHPFFN	DFTFDY D IAL
ChymotrVV	VAGEFDQGS	EE.NIQVLKI	AKVFKNPKFS	ILTVN N DITL
	106	116	126	136	146
MT-SP1	LELEKPAEYS	SMVRPI S LPD	ASHVFPAGKA	IWVTGWGHTQ	YGG.TGALIL
Chymotr	LKLATPARFS	QTVSAVCLPS	ADDDFPAGTL	CATTGWGKTK	YNANKTPDKL
	156	166	175	185	193
MT-SP1	QKGEIRVINQ	TTCENLLPQ.	QITPRMMCVG	FLSGGVDSCQ	GD S GGPLSSV
Chymotr	QQAALPLLSN	AECKKS.WGR	RITDVMICAG	..ASGVSSCM	GD S GGPLVC.
	202	210	220	230	240
MT-SP1	EA..DGRIFQ	AGVVSWDGDC	AQRNKPGVYT	RLPLFRDWIK	ENTGV
Chymotr	..QKDGAWTL	VGIVSWGSDT	CSTSSPGVYA	RVTKLIPWVQ	KILAAN

Legende:

Chymotr Sequenz der Serinproteasedomäne von humanem Chymotrypsin (AS 19-263) zum Vergleich mit humaner MT-SP1/Matriptase. Zur deutlicheren Darstellung der Homologie sind die Sequenzen mit Lücken dargestellt.

H, D, S: Aminosäuren der katalytischen Triade (His57, Asp102, Ser195)

C: Cys604, in Wildtyp-MT-SP1/Matriptase mit Cys731 (= Cys122 nach Chymotrypsin-Nomenklatur) über eine Disulfidbrücke verbunden

S: zu Serin mutiertes Cys122 (Chymotrypsin-Nomenklatur) zur Verhinderung der Disulfidbrückenbildung

2.1.10.2 Reinheit der MT-SP1/Matriptase-Proteine

2.1.10.2.1 *MT-SP1/Matriptase Cys122Ser*

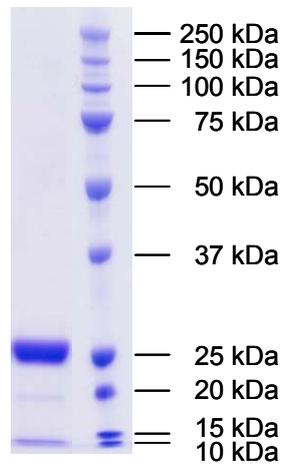


Abb. 8. MT-SP1/Matriptase Cys122Ser nach Gelfiltration, autoaktiviert

SDS-PAGE von autoaktivierter MT-SP1/Matriptase Cys122Ser im Anschluss an den letzten Reinigungsschritt. Gezeigt ist eine Fraktion des Eluats nach Gelfiltration. Das beobachtete Molekulargewicht stimmt mit dem errechneten Molekulargewicht von 26 kDa überein.

2.1.10.2.2 *MT-SP1/Matriptase Cys122Ser, Ser195Ala*

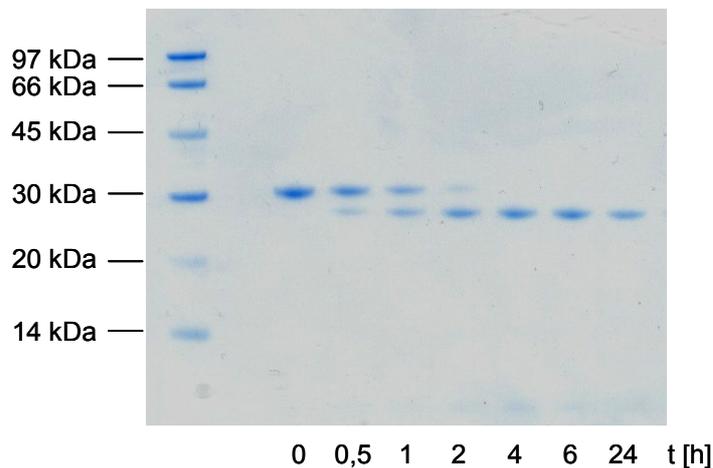


Abb. 9. Aktivierung von MT-SP1/Matriptase Cys122Ser, Ser195Ala

SDS-PAGE von MT-SP1/Matriptase Cys122Ser, Ser195Ala. Nach Aufreinigung von MT-SP1/Matriptase Cys122Ser, Ser195Ala über eine Anionenaustauschersäule erfolgte die Aktivierung durch Zugabe von MT-SP1/Matriptase Cys122Ser im Verhältnis 1:100 in 10 mM Tris·Cl, pH 8,5 und 10 mM NaCl bei Raumtemperatur. Die Probenentnahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Zu sehen ist der Zeitverlauf der Aktivierung. Die beobachteten Molekulargewichte stimmen mit den errechneten Molekulargewichten von 30 kDa für das Pro-Peptid und 26 kDa für die aktivierte Form überein.

MT-SP1/Matriptase Cys122Ser wird im Folgenden als **MT-SP1/Matriptase** und MT-SP1/Matriptase Cys122Ser, Ser195Ala als **MT-SP1/Matriptase Ser195Ala** bezeichnet.

2.1.11 Antikörper

2.1.11.1 Primärantikörper

Primärer Antikörper	polyklonal/ monoklonal	Spezies	Konjugat	Verwendung und Verdünnung	Herkunft
Anti-p38 #9212	polyklonal	Kaninchen	-	Western Blot 1:1000	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Phospho-p38 #9211	polyklonal	Kaninchen	-	Western Blot 1:1000	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-p42/44 #9102	polyklonal	Kaninchen	-	Western Blot 1:1000	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Phospho- p42/44 #9106	monoklonal	Maus IgG1	-	Western Blot 1:2000	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-human PAR-1 Klon WEDE15	monoklonal	Maus IgG1	PE	FACS 1:10	Beckman Coulter, Krefeld
Anti-human PAR-1 Klon SPAN12	monoklonal	Maus IgG1	PE	FACS 1:10	Beckman Coulter, Krefeld
Anti-human TF Klon VD8	monoklonal	Maus IgG1	FITC	FACS 1:10	American Diagnostica, Pfungstadt
Anti-human MT-SP1 M32	monoklonal	Maus IgG1	-	IHC 10 µg/ml IF 5 µg/ml	Chen-Yong Lin, Lombardi Cancer Center, Washington, USA
Anti-human CD14 Klon TÜK4	monoklonal	Maus IgG2a	PE	IF 6 µg/ml	Dako, Hamburg
Maus γ1		Maus IgG1	PE	Isotypkon- trolle für FACS, IF	Beckton Dickinson, Heidelberg
Maus γ1		Maus IgG1	FITC	Isotypkon- trolle für FACS	Beckton Dickinson, Heidelberg
Maus IgG		Maus IgG	-	Isotypkon- trolle für IF, IHC	Santa Cruz, Heidelberg

Tabelle 4. Primärantikörper

Abkürzungen: PE: Phycoerythrin, FITC: Fluoreszeinisothiozyanat

2.1.11.2 Sekundärantikörper

Sekundärer Antikörper	Spezies	Konjugat	Verwendung und Verdünnung	Herkunft
Anti-Maus IgG	Schaf	HRP	Western Blot 1:2000	Amersham, Freiburg
Anti-Kaninchen IgG	Esel F(ab') ₂	HRP	Western Blot 1:2000	Amersham, Freiburg
Anti-Maus IgG	Esel F(ab') ₂	FITC	IF 1:40	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK

Tabelle 5. Sekundärantikörper

Abkürzungen: HRP: Rettichperoxidase, FITC: Fluoreszeinisothiozyanat

2.1.12 Plasmide

pEYFP-C1	Clontech, Heidelberg
pTAL-Luc	Clontech, Heidelberg
pNF- κ B-Luc	Clontech, Heidelberg
pcDNA3.1(+)-PAR-1	UMR cDNA Resource Center, Rolla, USA
pcDNA3.1(+)-PAR-2	UMR cDNA Resource Center, Rolla, USA
pcDNA3.1(+)	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.13 Oligonukleotide

2.1.13.1 Primer und 6-Carboxy-Fluoreszein-markierte Sonden für die quantitative PCR (*Assay-on-Demand*)

Die von Applied Biosystems bezogenen Assays-on-Demand setzen sich aus unmarkierten Primern und einer am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (6-Carboxy-Fluoreszein, FAM) markierten Sonde zusammen. Die Sonde wies an ihrem 3'-Ende TAMRA (6-Carboxy-tetramethylrhodamin) als so genannten Quencher-Farbstoff auf. Die Anregung der beiden Farbstoffe findet bei 488 nm statt, die Emission von FAM bei 518 nm, von TAMRA bei 582 nm. Baut die *Taq* Polymerase die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende ab, entfernen sich dadurch Quencher und Fluorophor voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen

werden. Die Endkonzentration der Primer betrug 900 nM, die der Sonde 250 nM.

Gen	Assay-Bezeichnung	Sequenz der die Sonde umgebenden Region (5' → 3')	Größe des Amplikons	zugrundeliegende Nukleotidsequenz (Datenbank, Zugangsnummer)
GAPDH	Hs99999905_m1	GGGCGCCTGGTCACCAGG GCTGCTT	122 bp	GenBank, M33197.1
IL-8	Hs00174103_m1	GTGTGAAGGTGCAGTTTTG CCAAGG	101 bp	RefSeq, NM_000584.2
IL-6	Hs00174131_m1	TTC AATGAGGAGACTTGCC TGGTGA	95 bp	GenBank, X04430.1
MCP-1	Hs00234140_m1	TCAGCCAGATGCAATCAAT GCCCA	101 bp	RefSeq, NM_002982.3
MT-SP1	Hs00222707_m1	CACGCCCTGGTGCAGTTG TGTGGCA	68 bp	RefSeq, NM_021978.2
PAR-1	Hs00169258_m1	GCCCGCAGGCCAGAATCA AAAGCAA	74 bp	RefSeq, NM_001992.2
PAR-2	Hs00608346_m1	GCACCATCCAAGGAACCA ATAGATC	119 bp	RefSeq, NM_005242.3
TF	Hs00175225_m1	CCTTACCTGGAGACAAACC TCGGAC	118 bp	RefSeq, NM_001993.2

Tabelle 6. FAM-markierte qPCR-Sonden (Assays-on-Demand)

2.1.13.2 Primer zur Amplifikation der PCR-Produkte für die Standardkurven der qPCR

Primername	Orientierung	Sequenz (5' → 3')	Größe des Amplikons
GAPDH_Std	Sinn	GGACTCATGACCACAGTCC	256 bp
	Gegensinn	CAGGTCCACCACTGACACG	
IL-8_Std	Sinn	GGCAGCCTTCCTGATTTCTG	160 bp
	Gegensinn	GTTGGCGCAGTGTGGTCCAC	
MTSP1_Std	Sinn	CCGACTCAGTGCTGAGCCT	299 bp
	Gegensinn	GAATGTCCCCTGGGCTTTAC	
PAR-1_Std	Sinn	CAGAGCCCGGGACAATG	223 bp
	Gegensinn	CTGTATTCAGTTAACCCAC	
PAR-2_Std	Sinn	GATGCGGAGCCCCAGCGT	222 bp
	Gegensinn	GGTCAGTTTTCCAGTGAGG	

Tabelle 7. Primer zur Generierung der qPCR-Standards

2.1.13.3 Primer zur Klonierung der TF-Konstrukte

Primer	Orientierung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
4a	Sinn	GC AAGCTT AC ATG GAGACCCCTGCC	Klonierung TF-WT, Δ zyt, Ser253Ala, Ser258Ala, Ser253Ala/Ser258Ala in pEYFP-C1
4b	Gegensinn	GC GGATCC TTA TGAAACATTCAGTGG	Klonierung TF-WT in pEYFP-C1
5b	Gegensinn	GC GGATCC TTA GTGTAGAGATATAGC CAGG	Klonierung TF Δ zyt in pEYFP-C1
10b	Gegensinn	GC GGATCC TTA TGAAACATT CAGTGG GGC GTTCTCCTTCCAG GC CTG	Mutagenese TF Ser253Ala/Ser258Ala
12b	Gegensinn	GC GGATCC TTA TGAAACATT CAGTGGGAGTTCTCCTTCCAG GC CTG	Mutagenese TF Ser253Ala
14b	Gegensinn	GC GGATCC TTA TGAAACATT CAGTGG GGC GTTCTCCTTCCAGCTCTG	Mutagenese TF Ser258Ala
Cys245Ser-a	Sinn	CAAGAGTAGAAAGGCAGGAGTGGGGCAGAG	Mutagenese TF Cys245Ser
Cys245Ser-b	Gegensinn	GCCTTTCTACTCTTGTGTAGAGATATAGCC	Mutagenese TF Cys245Ser

Tabelle 8. Primer zur Klonierung der TF-Konstrukte

Neben der Primerbezeichnung, der Orientierung und der Verwendung ist die Sequenz angegeben, in der Start- bzw. Stopkodon umrandet sind und die zu mutierenden Kodons rot gekennzeichnet sind.

2.1.13.4 siRNA-Sequenzen

siPAR-1	Sinn	5'-GGUCAAGAAGCCGGCGGUGtt-3'
	Gegensinn	5'-CACCGCCGGCUUCUUGACctt-3'
siPAR-2	Sinn	5'-GGAAGAAGCCUUAUUGGUAtt-3'
	Gegensinn	5'-UACCAAUAAGGCUUCUUCctt-3'
unspezifische siRNA	Sinn	5'- UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3'
	Gegensinn	5'- ACGUGACACGUUCGGAGAAdTdT-3'

verwendet als Negativkontrolle und zur Überprüfung der Transfektionseffizienz (3'-Fluoreszein markiert)

2.1.14 *Charakteristika der Patienten mit arterieller Verschlusskrankheit (AVK)*

Die untersuchten Plaquematerialien entstammten 18 Patienten aus der Abteilung für Gefäßchirurgie des Krankenhauses München-Schwabing, bei denen aufgrund symptomatischer peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) eine Thrombendarterektomie (TEA) durchgeführt wurde. Die TEA stellt ein operatives Verfahren dar, bei dem bei starken Gefäßverengungen (Stenosen) die atherosklerotische Plaque inklusive Intima und Teilen der Media ausgeschält wird. Die Patienten wiesen dabei eine Verengung der Arteria carotis mit einem Stenosegrad über 85% oder einen Verschluss der Arteria femoralis im Stadium IIb (Gehstrecke ohne Belastungsschmerz unter 100 m) auf. Als Kontrolle wurde 10 Patienten im Rahmen einer Krampfaderoperation ein Segment der Arteria pudenda externa (äußere Schamarterie) entnommen.

Patientencharakteristika	AVK	Kontrolle
Anzahl der Patienten [n]	18	10
Alter im Mittel [a]	72,8 (49-90)	57,4 (47-72)
Geschlecht [m/w]	11/7	5/5
Karotis-TEA	17	-
Femorales-TEA	1	-

Tabelle 9. Patientencharakteristika

Aufgeführt sind die Patientencharakteristika von AVK-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten hinsichtlich Anzahl, mittlerem Alter und Geschlecht. Weiterhin sind die Anteile an Karotis- und Femorales-TEA angegeben.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit bis zur Subkonfluenz kultiviert und anschließend weiter passagiert. Nach Passagieren der Zellen mit Trypsin wurden alle Zelltypen mindestens 48 h inkubiert, um eine ausreichende PAR-2-Expression zu gewährleisten.

2.2.1.1.1 Endothelzellen (EC)

Die Anzucht von Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene (HUVEC) erfolgte auf CELL+-Wachstumsflächen in EGM-2-Basalmedium nach Zugabe von humanem epidermalen Wachstumsfaktor (hEGF), Hydrocortison, Gentamycin, Amphotericin-B9, vaskulo-endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF), humanem Fibroblastenwachstumsfaktor (hFGF-B), Heparin, *Insulin-like growth factor* (IGF-1), Ascorbinsäure und 2% FKS („EGM-2 SingleQuotes“). Die Kultivierung der humanen Endothelzellen aus der Koronararterie (HCAEC) erfolgte in Endothelial Cell Basal Medium MV (ECBM-MV) mit 0,4% *Endothelial Cell Growth Supplement*/Heparin, 5% FKS, 10 ng/ml hEGF und 1 µg/ml Hydrocortison ebenfalls auf auf CELL+-Wachstumsflächen. Vor einem Versuch wurden alle Endothelzellen 3 h serumfrei gehalten, um Hintergrundeffekte durch Bestandteile des FKS ausschließen zu können. Endothelzellen wurden zwischen Passage 2 und 8 für Versuche verwendet.

2.2.1.1.2 Glatte Muskelzellen (SMC)

Humane glatte Muskelzellen aus der Koronararterie (SMC) wurden in SmGM-2-Basalmedium kultiviert, das mit hEGF, hFGF-B, Insulin, Gentamycin, Amphotericin-B9 und 5% FKS ergänzt wurde („SmGM-2 SingleQuotes“). Die Versuche wurden mit Zellen zwischen Passage 5 und 10 durchgeführt. Dem jeweiligen Versuch vorangehend wurden die Zellen über Nacht serumfrei gehalten.

2.2.1.1.3 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC, Lymphozyten und Monozyten) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem Blut gesunder Probanden isoliert. 24 ml ungerinnbares CPDA (Citrat, Phosphat, Dextrose, Adenin)-Blut wurde

dabei auf 25 ml Ficoll-Paque geschichtet und 20 min bei 900 g und 20°C ohne Bremse zentrifugiert. PBMC werden aufgrund ihrer Dichte im Ficoll-Gradienten von Erythrozyten und Granulozyten separiert und lagern sich zusammen mit Thrombozyten in der Intermediärschicht zwischen Plasma und Ficoll ab. Diese Interphase wurde mit einer Transferpipette abgenommen, zur Trennung von Thrombozyten und Ficollresten zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in RPMI Basalmedium mit 10% FRS und 1% Penicillin/Streptomycin aufgenommen. Die Anzahl der gewonnenen Zellen wurde mit einem Zellzähler (Sysmex) bestimmt.

2.2.1.2 Transfektion adhärenter Zellen mit Plasmid-DNA

Um Primärzellen mit Plasmid-DNA zu transfizieren wurden $2,5 \cdot 10^5$ HUVEC pro 6-Loch-Platte, die im Vorfeld für 2 h bei 37°C mit 0,2% Gelatine beschichtet worden war, ausgelegt. Nach 24 h wurde 0,4 µg DNA ad 100 µl EC-Puffer (Effectene Transfektionskit) verdünnt und mit 3,2 µl Enhancer versetzt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde 10 µl Transfektionsreagenz Effectene zugegeben und der Ansatz 10 min bei RT zur Komplexbildung inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und mit 1,2 ml Vollmedium versetzt. Nach Zugabe von 300 µl Vollmedium zum Transfektionskomplex wurde das Gesamtvolumen langsam auf die Zellen getropft. Nach 8 h Inkubation erfolgten ein Waschschriff mit PBS und ein Mediumwechsel zur Minimierung zytotoxischer Effekte durch das Transfektionsreagenz. Der jeweilige Versuch wurde 24 h nach der Transfektion durchgeführt. Sofern die transfizierten Plasmide nicht EYFP-fusionierte Proteine kodierten, wurde zur Überprüfung der Transfektionseffizienz das Plasmid pEYFP-C1 kotransfiziert und die Effizienz fluoreszenzmikroskopisch ermittelt.

2.2.1.3 Transfektion adhärenter Zellen mit siRNA

Zum Einbringen von siRNA in die verwendeten Primärzellen wurden die Zellen in Kulturgefäße in einer Dichte ausgesät, dass nach 24 h eine Konfluenz von 80% erreicht wurde. Zur Komplexbildung von siRNA und Transfektionsreagenz wurde für eine Wachstumsfläche von 9,5 cm² 2,5 µg siRNA in 100 µl EC-R-Puffer (RNAiFect Transfection Kit) aufgenommen und nach Zugabe von 7,5 µl RNAiFect 12 min bei RT inkubiert. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS und Zugabe von 1,9 ml Vollmedium wurde der Komplex tropfenweise zu den Zellen gegeben. 5 h nach Transfektion erhielten die Zellen frisches Medium. Der maximale Effekt der RNA-Interferenz wurde 48 h nach Transfektion beobachtet, so dass Stimulationen zu diesem Zeitpunkt durchgeführt wurden.

2.2.1.4 Tissue Factor-Aktivitätstest

Verwendeter Puffer:

1x HBS + Ca⁺⁺

HEPES	21 mM	
NaCl	137 mM	
KCl	5 mM	
Na ₂ HPO ₄	0,73 mM	
Glukose	5,5 mM	
CaCl	2 mM	pH 7,4

Um die Funktionalität der verwendeten Tissue Factor (TF)-Konstrukte zu prüfen wurde ein chromogener Test durchgeführt, der über die fluorometrische Quantifizierung der Menge an gebildetem FXa auf die TF-Aktivität schließen lässt. Dazu wurden HUVEC in Mikrotiterplatten ausgesät, nach 24 h Inkubation mit den entsprechenden TF-Plasmiden transfiziert und nach weiteren 24 h dem Test unterworfen. Nach Waschen mit 100 µl HBS + Ca⁺⁺ wurden FVIIa (10 nM) und FX (200 nM) in HBS + Ca⁺⁺ zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die FXa-Bildung in 50 µl Zellüberstand durch 150 µl EDTA (100 mM) gestoppt und nach Zugabe von 50 µl chromogenem FXa-Substrat nach 60 min bei 405 nm (Referenz 630 nm) photometrisch gemessen.

2.2.1.5 Durchflusszytometrie/FACS

3-5*10⁵ Zellen wurden nach Abnehmen mit Zell-Dissoziationspuffer in FACS-Röhrchen sedimentiert (5 min, 1700 Upm, 4°C) und mit PBS gewaschen. In 50 µl PBS und dem jeweiligen direktmarkierten Antikörper in optimaler Verdünnung wurden die Zellen resuspendiert und 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Aufnahme in 150-200 µl PBS. Die Analyse wurde in einem FACSCalibur Gerät mit Cell Quest Software (Becton-Dickinson) durchgeführt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Alle nicht weiter aufgeführten molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Protokollen aus „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 1994) durchgeführt.

2.2.2.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus adhärennten Zellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit-Systems. Dabei wurden adhärennte Zellen direkt im Kulturgefäß lysiert. Nach Entfernen des Mediums wurde 350 µl RLT-Puffer, dem 1% (v/v) β-Mercaptoethanol zugesetzt war, auf die Zellen gegeben, die dann mit einem Zellschaber abgenommen wurden. Die Homogenisierung des Lysates erfolgte durch einminütiges Schütteln. Die weiteren Schritte der RNA-Isolierung erfolgten gemäß Herstellerangaben. Eluiert wurde die Gesamt-RNA von der Säule mit 30 µl RNase-freiem Wasser.

Die Quantifizierung der isolierten RNA wurde im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt, wobei der Reinheitsgrad aus dem Quotienten $A_{260/280}$ bestimmt wurde.

2.2.2.2 Extraktion von Gesamt-RNA aus Gewebe

Die Atherektomiegewebestücke aus der operierten Gefäßregion des Intima-Media-Komplexes und die gesunden Gefäße wurden sofort nach Gewinnung halbiert, eine Hälfte in RNAlater RNA-Stabilisierungsreagenz eingelegt und bei 4°C bis zur RNA-Präparation aufbewahrt. Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurden die Proben unter Zugabe von 600 µl RLT-Puffer + 1% (v/v) β-Mercaptoethanol mit Hilfe des Dispergiergerätes zerkleinert, wobei die Probe zwischendurch auf Eis gekühlt wurde. Die weitere Isolierung erfolgte gemäß RNeasy Mini Kit-Protokoll.

2.2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA (Minipräparation)

Verwendete Puffer:

Puffer P1

Tris·Cl	50 mM	pH 8
EDTA	10 mM	
RNase A	100 µg/ml	

Puffer P2

NaOH	200 mM	
SDS	1%	

Puffer P3

Kaliumazetat	3 M	pH 5,5
--------------	-----	--------

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen zum anschließenden Restriktionsverdau oder zur PCR beinhaltete eine alkalische Lyse mit darauf folgender Ethanol-fällung der DNA. Dazu wurde 2 ml LB-Medium mit entsprechendem

Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin) mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 200 Upm und 37°C inkubiert. 1,5 ml dieser Bakteriensuspension wurde anschließend bei 2500 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und die so gewonnenen Bakterien in 150 µl Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse wurde 150 µl Puffer P2 zugegeben, leicht geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe des neutralisierenden Puffers P3 (150 µl) und leichtem Schütteln wurde der Zellschrott 5 min bei 15000 g bei RT abzentrifugiert. 440 µl Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Ethanol (RT) zur DNA-Fällung versetzt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei RT und 15000 g wurde der entstandene DNA-Niederschlag mit 150 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, die DNA kurz bei RT getrocknet und schließlich in 40 µl Wasser resuspendiert.

2.2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Maxipräparation)

Nach Inokulieren von 100 ml LB und entsprechendem Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin) mit einer Vorkultur erfolgte die Isolierung von endotoxinfreier Plasmid-DNA im großen Maßstab unter Verwendung des „EndoFree Plasmid Maxi Kits“ und richtete sich im Prozedere nach den Herstellerangaben.

2.2.2.5 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription von Gesamt-RNA in cDNA wurde 400 ng RNA in einem Volumen von 20 µl mit 1x Omniscript RT-Puffer, 0,5 mM dNTP, 150 ng Oligohexameren, 10 U RNase-Inhibitor SUPERase-In und 4 U Omniscript Reverser Transkriptase für 1 h bei 37°C inkubiert und die cDNA anschließend in die PCR eingesetzt.

2.2.2.6 Quantitative Real-Time Polymerasen-Kettenreaktion (qPCR)

Die Methode der Real-Time PCR ermöglicht die Quantifizierung spezifischer Nukleinsäuren. Dabei wird bereits während der PCR-Zyklen („*real time*“) mittels Fluoreszenzmessung die Menge an gebildetem PCR-Produkt verfolgt. Im Anschluss kann die ursprünglich eingesetzte Menge an Transkript berechnet werden. Die in dieser Arbeit angewendete Methode der Real-Time PCR basierte auf der Verwendung zweier spezifischer Primer und einer am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) markierten Sonde (TaqMan™). Die Fluoreszenz des Donor-Fluorochroms (Reporter) wird bei intakten Sonden durch ein Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) aufgrund des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) unterdrückt. Erst bei

räumlicher Trennung der beiden Fluorochrome durch die Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Nukleaseaktivität der *Taq* Polymerase nimmt die Energieübertragung ab, wodurch das Fluoreszenzsignal des Reporters zunimmt. Die steigende Reporterfluoreszenz ist dabei proportional zur Anzahl der synthetisierten Fragmente (siehe Schema in Abb. 10).

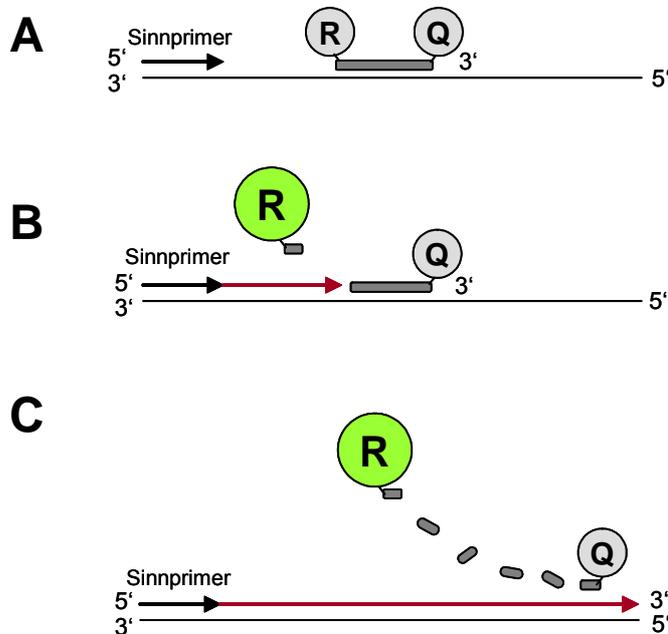


Abb. 10. Schematisches Prinzip der Real-Time PCR unter Verwendung einer fluorogenen Sonde

A. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde (grauer Balken) und der PCR-Primer (gezeigt ist hier der Sinnprimer als schwarzer Pfeil) an die Matrizen-DNA. Die Sonde ist mit einem 5'-Reporter-Farbstoff (R) und einem 3'-Quencher-Farbstoff (Q) markiert. **B.** Primerextension durch die *Taq* Polymerase (roter Pfeil). Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq* Polymerase kommt es zur Sondenhydrolyse, der Reporter-Farbstoff wird vom Quencher-Farbstoff getrennt und fluoresziert dadurch. **C.** Vollständige Synthese des PCR-Produktes mit kompletter Hydrolyse der Sonde. In Abhängigkeit von der Zahl freigesetzter Reportermoleküle wächst das Reportersignal.

Zur Durchführung einer quantitativen Real-Time PCR wurde 40 ng cDNA mit 1x qPCR Mastermix Plus und je 900 nM Primer und 250 nM 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM)-markierter Sonde (*Assay-on-Demand*) versetzt. Die PCR-Konditionen beinhalteten einen initialen Schritt von 2 min bei 50°C zur Optimierung der AmpErase UNG-Aktivität, die Aktivierung der im Reaktionsmix enthaltenen Hot GoldStar DNA Polymerase für 10 min bei 95°C und schließlich 40 Zyklen, die 15 s bei 95°C zur Denaturierung und 1 min bei 60°C zum Anlagern der Primer und zur Elongation umfassten.

Für die Auswertung wurde ein Schwellenwert (*threshold*) innerhalb der

exponentziellen Amplifikationsphase festgelegt, dessen definierte Fluoreszenzintensität deutlich über der Hintergrundfluoreszenz des ungebundenen Farbstoffes lag. Die Zyklusnummer, bei der dieser Schwellenwert erreicht wurde, wurde als C_T -Wert bezeichnet. Die Auswertung der erhaltenen C_T -Werte erfolgte nach dem $\Delta\Delta C_T$ -Berechnungsverfahren bestehend aus der Bildung der Mittelwerte identischer Replikate, Normalisierung auf das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) durch Subtraktion, Normalisierung auf die (unstimulierte) Kontrolle durch Subtraktion und Einsetzen in die Formel 2^{-x} . Anhand dieser Berechnung ist eine relative Quantifizierung möglich.

Die absolute Quantifizierung der in der Probe vorhandenen mRNA-Kopien eines Zielgens wurde mit Hilfe einer Standardkurve aus PCR-Fragmenten durchgeführt. Dazu wurden PCR-Fragmente amplifiziert, die eine cDNA-Region umfassten, in der die jeweiligen Primer und die Sonde hybridisierten. Aus HUVEC wurde dazu Gesamt-RNA isoliert, die einer reversen Transkription unterworfen wurde. Die so generierte cDNA diente als Matrize in einer PCR unter Verwendung der Primer für die Standardkurven (Tabelle 7). Mittels Agarosegelelektrophorese wurden diese PCR-Produkte nach Aufreinigung mit dem QIAquick *PCR Purification Kit* anhand von Markerbanden bekannter DNA-Konzentrationen quantifiziert (Abb. 11).

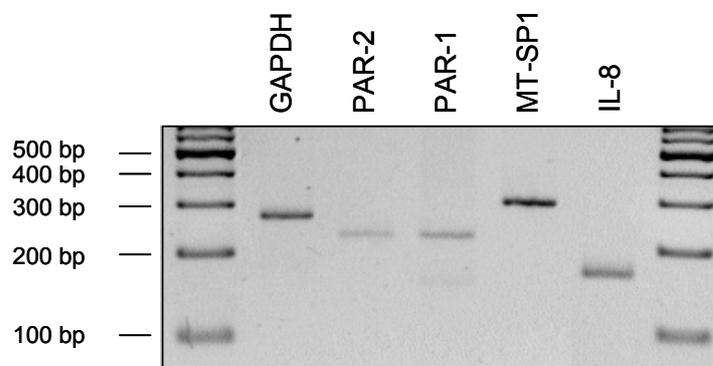


Abb. 11. PCR-Produkte als Standards für die qRT-PCR

Gezeigt ist ein 2%-iges Agarosegel. Die PCR-Produkte als Standards für die qPCR zeigten in der elektrophoretischen Auftrennung jeweils eine spezifische Bande der erwarteten Fragmentgröße. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte anhand des DNA-Markers bekannter Konzentration. Die 500 bp-Bande des Markers entspricht 41,7 ng DNA, die 200 bp-Bande 20 ng DNA.

Ausgehend von der Molmasse wurde die Molekülkonzentration des PCR-Produktes berechnet, so dass definierte Molekülmengen in die qPCR eingesetzt und eine Standardkurve erstellt werden konnte, da eine lineare, umgekehrt proportionale

Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem C_t -Wert besteht (Abb. 12).

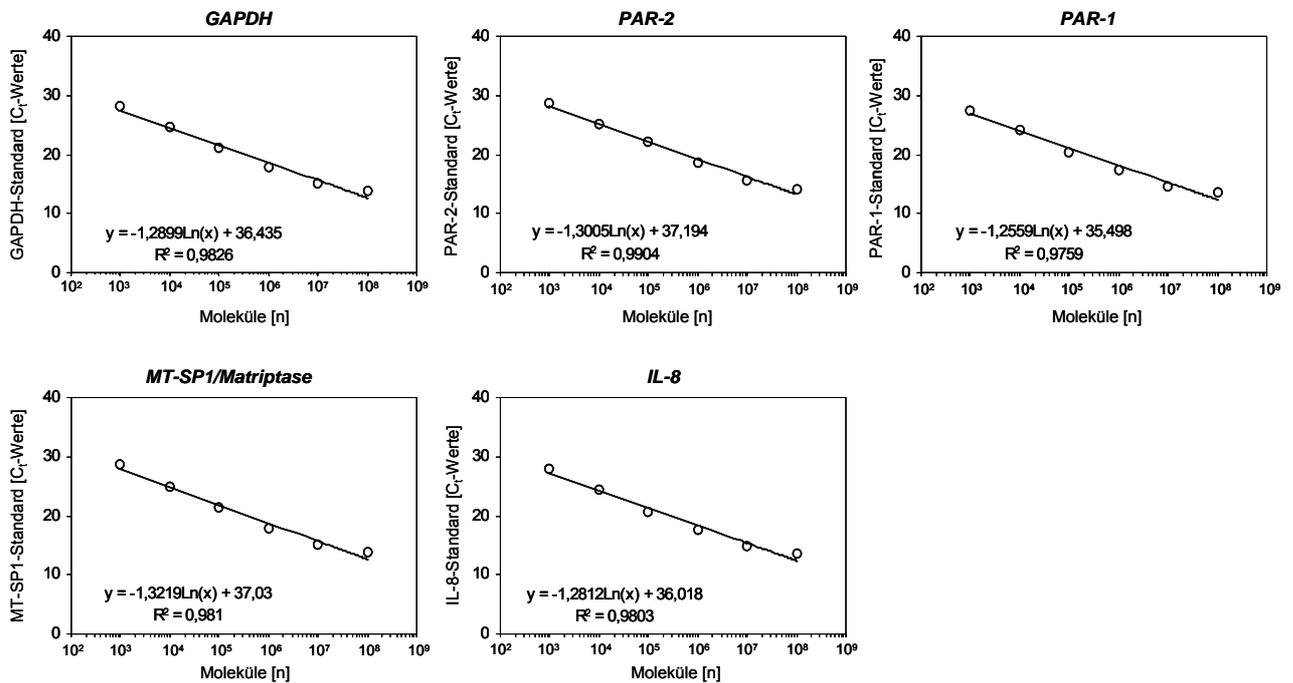


Abb. 12. qPCR-Standardkurve aus definierten Molekülzahlen

Definierte Molekülzahlen der PCR-Produkte für die qPCR-Standards zwischen 10³ und 10⁸ wurden in eine qPCR eingesetzt und mit dem jeweiligen Primer-Sonden-Mix (*Assay-on-Demand*) amplifiziert. Aus den C_t -Werten der jeweilig eingesetzten Molekülmenge wurde anschließend eine Standardkurve erstellt. Für jede Standardkurve sind die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß angegeben. Die Abszisse zeigt die eingesetzten Molekülzahlen, die Ordinate die C_t -Werte.

Über die Geradengleichung konnte für jede unbekannte Probe die ursprünglich vorhandene Kopienzahl der zu untersuchenden Ziel-mRNA bestimmt werden. Alle Proben wurden normalisiert, indem die errechnete Kopienzahl der Ziel-mRNA durch die Kopienzahl der GAPDH-Referenz geteilt wurde.

2.2.2.7 Klonierung von TF-WT und TF Δ zyt aus pCDM8 in pEYFP-C1

Zum Umklonieren von TF-WT und TF Δ zyt aus einem pCDM8- in einen pEYFP-C1-Vektor wurden die Primer TF 4a/4b bzw. 4a/5b (Anlagerung 58°C, Elongation 1 min) verwendet, die unmittelbar 5' vor dem Startkodon eine *Hind* III-Schnittstelle (4a) bzw. unmittelbar 3' nach dem Stopkodon eine *Bam*H I-Schnittstelle (4b bzw. 5b) einfügen (siehe Tabelle 8). Die Deletion der zytoplasmatischen Domäne von TF erfolgte dabei durch die Mutation TF-Lys244STOP. Nach PCR-Amplifikation wurden die Fragmente

mit *Bam*H I/*Hind* III verdaut, was ebenfalls für den Vektor pEYFP-C1 durchgeführt wurde. Nach Aufreinigung von PCR-Produkten und Vektor mit dem *PCR Purification Kit* wurde 5 µg des Vektors mit 25 U intestinaler alkalischer Phosphatase (Kalb) für 1 h bei 37°C dephosphoryliert und erneut aufgereinigt. Anschließend wurden Vektor und PCR-Fragmente ligiert und 10 ng Ligationsansatz in 50 µl kompetente Bakterien (DH5α) durch Hitzeschock bei 42°C für 90 s transformiert. Die Sequenzierung der DNA der einzelnen Konstrukte wurde von MWG Biotech (München) durchgeführt und mit Hilfe der Software Vector NTI ausgewertet.

2.2.2.8 Gerichtete Mutagenese der TF-Konstrukte

Zum gezielten Einführen von Mutationen in TF-Plasmide wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet:

A. Mutagenese TF Ser253Ala, TF Ser258Ala und TF Ser253Ala/Ser258Ala

Zur gerichteten Mutagenese der nahe am C-Terminus von TF lokalisierten Aminosäuren Ser253 und Ser258 wurde mit Wildtyp-pEYFP-TF als Matrize eine PCR mit den Primern 4a/10b, 4a/12b und 4a/14b durchgeführt, wobei die jeweiligen Mutationen in die Primer 10b, 12b und 14b integriert waren (siehe Tabelle 8). Nach Gelextraktion der Amplifikate wurden diese mit *Bam*H I/*Hind* III verdaut und mit dem ebenso verdauten und dephosphorylierten (1 h 37°C mit intestinaler alkalischer Phosphatase, Kalb) Vektor pEYFP-C1 ligiert. Nach Transformation in TOP10 kompetente *E. coli* durch Hitzeschock wurde DNA aus den gewachsenen Kolonien isoliert. Zum Überprüfen der erfolgreichen Mutagenese wurde eine PCR mit Primern angewendet, die auf das zu mutierende Kodon enden und dabei entweder die Wildtyp-Sequenz oder die mutierte Sequenz enthalten und somit unter stringenten PCR-Bedingungen nur die mutierten Plasmide amplifizierten. Nach DNA-Präparation in großem Maßstab wurde die Mutagenese durch Sequenzierung überprüft.

B. Mutagenese TF Cys245Ser

Da sich die Aminosäure Cys245 weiter entfernt vom C-Terminus von TF befindet als die oben beschriebenen Serinreste wurde ein modifiziertes *Quick-change*-Protokoll (Stratagene, La Jolla, USA) zur Mutagenese angewendet. Unter Verwendung von *Pfx* Polymerase wurde ausgehend von Wildtyp-pEYFP-TF mit den in 15 bp überlappenden komplementären Primern Cys245Ser-a und Cys245Ser-b (siehe Tabelle 8) eine PCR nach Herstellerangaben durchgeführt, um den vollständigen Vektor zu amplifizieren. Durch Verdau mit *Dpn* I (4 h bei 37°C) wurde anschließend die methylierte und

hemimethylierte DNA des Ursprungsplasmides verdaut, so dass lediglich die mutierten DNA-Stränge des PCR-Produktes verblieben. Diese wurden direkt in XL10-Gold kompetente *E. coli* durch Hitzeschock gemäß den Angaben des Herstellers transformiert. Aus den über Nacht gewachsenen Kolonien wurde die DNA isoliert, deren Mutagenese durch Sequenzierung überprüft wurde.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Messung der enzymatischen Aktivität von MT-SP1/Matriptase

Die Messung der katalytischen Aktivität der rekombinanten MT-SP1/Matriptase-Varianten erfolgte durch Versetzen von 1 nM Enzym mit 25 μ M I-1550 (Boc-Gln-Ala-Arg-AMC·HCl), einem hochreaktiven Substrat für Trypsin, in 50 mM Tris·Cl (pH 8,5), 100 mM NaCl, 0,1% PEG6000 und 0,05% Tween80. Das intakte Peptid-Coumarin-Konjugat besitzt nach Anregung keine Fluoreszenz bei 465 nm. Nach proteolytischer Spaltung des Peptides entsteht jedoch ein Coumarin-Produkt, das nach Exzitation bei 360 nm bei 465 nm emittiert. Die Kinetik der MT-SP1/Matriptase-Aktivität wurde daher durch fluorometrische Messung bei RT für 15 min in einem Tecan SpektrafluorPlus-Lesegerät bei $\lambda_{\text{ex}} = 360$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 465$ nm ermittelt.

2.2.3.2 Western Blot

Verwendete Puffer:

Lysepuffer

Tris·Cl	20 mM	pH 7,5
NaCl	150 mM	
Na ₂ EDTA	1 mM	
EGTA	1 mM	
Triton	1%	
Natriumpyrophosphat	2,5 mM	
β -Glyzerophosphat	1 mM	
Na ₃ VO ₄	1 mM	
Leupeptin	1 μ g/ml	
PMSF	1 mM	

Lithiumdodecylsulfat (LDS)-Puffer

Glyzerin	10%	
Tris Base	141 mM	
Tris·Cl	106 mM	
LDS	2%	
EDTA	0,51 mM	
SERVA Blue G250	0,22 mM	
Phenolrot	0,175 mM	pH 8,5

1x MOPS-SDS-Laufpuffer

MOPS	50 mM	
Tris Base	50 mM	
SDS	0,1%	
EDTA	1 mM	pH 7,7

Anode I

Tris·Cl	0,3 M	
Methanol	20%	pH 10,4

Anode II

Tris·Cl	0,025 M	
Methanol	20%	pH 10,4

Kathode

Tris·Cl	0,02 M	
6-Aminocaprinsäure	40 mM	
Methanol	20%	pH 10,4

10x Trisgepufferte Kochsalzlösung (TBS)

Tris·Cl	0,2 M	
NaCl	1,65 M	pH 7,5

TBS-Tween (TBS-T)

TBS	1x	
Tween20	0,05%	

Die Analyse von Proteinen mittels Western Blot erfolgte nach Waschen der zu untersuchenden Zellen in eiskaltem PBS und anschließendem Abschaben der Zellen in Lysepuffer. Das erhaltene Zelllysat wurde 2x10 s im Ultraschallbad behandelt und 10 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und in Flüssigstickstoff schockgefroren.

Die Proben wurden nach Quantifizierung mittels BCA-Test mit LDS-Puffer und 50 mM DTT als Reduktionsmittel versetzt und 10 min bei 70°C gekocht. Die Proteinauftrennung erfolgte im 4-12%-igen NuPAGE Bis-Tris-Gradientengel in MOPS-

Puffer mit 0,25% NuPAGE Antioxidans für 50 min bei 200 V in einer vertikalen SDS-PAGE-Gelkammer.

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde halbtrocken durchgeführt. Dazu wurden Whatman-Papiere in Anode I-, Anode II- und Kathoden-Puffer getränkt und die PVDF-Membran 20 s in Methanol geschwenkt. Auf die Anode der Blot-Apparatur wurden drei Anode I-Whatman-Papiere, drei Anode II-Whatman-Papiere, die PVDF-Membran, das SDS-Gel und zuoberst drei Kathode-Whatman-Papiere geschichtet. Der Transfer erfolgte bei 300 mA für 35 min.

Der Erfolg des Transfers wurde durch Ponceau S-Färbung der Membran überprüft. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran für 1 h bei RT mit 5% BSA in TBS-T abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C erfolgte in optimaler Verdünnung in TBS-T, 1% BSA. Nach 3 x 15 min Waschen der Membran in TBS-T, 1% BSA folgte die Inkubation mit dem Rettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:2000 in TBS-T, 1% BSA, 1 h RT). Nach erneutem Waschen der Membran (3 x 15 min in TBS-T, 1% BSA) und Schwenken in TBS-T erfolgte die Detektion der Antikörperbindung durch ECL (1 min bei RT) und Röntgenfilm-Exposition.

2.2.3.3 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Zur Quantifizierung in den Zellüberstand sezernierter Zytokine wurden HUVEC in Mikrotiterplatten (8*10³/Vertiefung) ausgesät und 48 h inkubiert. Nach dreistündigem Serumentzug erfolgte die Stimulation der Zellen über Nacht. Die entnommenen Überstände wurden anschließend in optimaler Verdünnung auf die Antikörperbeschichtete Platte des Kits transferiert. Der Antigennachweis wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3.4 Luciferase-Aktivität

Zur Bestimmung der Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren wurden Vektoren mit *cis*-aktivierenden Elementen von Clontech verwendet (*Mercury Signal Transduction Vectors*). Der Vektor pNF-κB-Luc enthält das *Photinus pyralis*-Luciferasegen sowie vier Tandemkopien der NF-κB-Konsensussequenz, die mit einer TATA-ähnlichen Promotorregion (pTAL) des Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Promotors (HSV-TK) fusioniert sind (Abb. 13). Nach Bindung von endogenem NF-κB an das κ-Enhancer-Element wird die Transkription induziert und es kommt zur Aktivierung des Reportergens. Als Kontrolle wurde der Vektor pTAL-Luc verwendet, der lediglich die TATA-ähnliche Promotorregion besitzt.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden oben genannte Vektoren mit dem Plasmid pEYFP-C1 kotransfiziert, um die Effizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüfen zu können.

Die Transfektion erfolgte in 12-Loch-Platten mit 10^5 HUVEC/Vertiefung entsprechend der unter 2.2.1.2 beschriebenen Methode. Mit dem Mediumwechsel 8 h nach Beginn der Transfektion wurden zugleich die jeweiligen Stimulanzen in serumreduziertem Medium (0,1% FKS) zugegeben. Im Falle der Verwendung pharmakologischer Inhibitoren wurden diese 1 h vor Zugabe des Stimulans verabreicht. 20 h nach Beginn der Stimulation wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, mit 250 μ l 1x Passive Lysis Buffer (Dual-Luciferase Reporter Assay System) versetzt und das Lysat abgeschabt. 20 μ l des Lysates wurden anschließend in Sarstedt-Röhrchen transferiert und mit 100 μ l Luciferase Assay Reagens (LAR II) im Röhrchen-Luminometer versetzt.

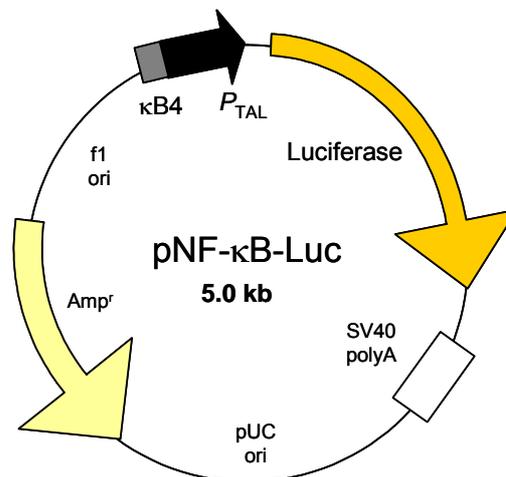


Abb. 13. Vektorkarte von NF- κ B-Luc

NF- κ B-Luc enthält vier Tandemkopien des κ -Enhancer-Elements (κ B4), das mit einer TATA-ähnlichen Promotorregion (P_{TAL}) des Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Promotors fusioniert ist. Kommt es zur Bindung von NF- κ B an die Konsensussequenz, wird die Transkription des Luciferasereporters induziert. Die Luciferase-kodierende Sequenz wird gefolgt von einem SV40 (Simian Virus 40)-Polyadenylierungssignal (SV40 poly A) zur vollständigen Prozessierung des Transkripts in eukaryotischen Zellen. $f1_{ori}$: Replikationsursprung für die Produktion einzelsträngiger DNA, pUC_{ori} : Replikationsursprung für die Replikation in *E. coli*, Amp^r : Ampicillinresistenzgen.

2.2.3.5 Immunfluoreszenzfärbung von MT-SP1/Matriptase

$3 \cdot 10^5$ Ficoll-isolierte humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) wurden in PBS mit 3% BSA mittels Zytocentrifugation (Cytospin) bei 100 g für 5 min auf Objektträger gebracht und mit 1% Paraformaldehyd 15 min bei RT fixiert. Nach

Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper M32 (5 µg/ml) für 1 h bei RT. Nach Waschen mit PBS wurde mit dem Sekundärantikörper FITC-konjugiertes F(ab')₂-Fragment Esel-anti-Maus IgG (1:40, 45 min bei RT) inkubiert. Zur Identifizierung der Monozyten und deren Unterscheidung zu Lymphozyten wurde nach einem erneuten Waschschrift mit CD14-Phycoerythrin (6 µg/ml) für 30 min bei RT gegengefärbt. Die Kernfärbung erfolgte im Anschluss durch DAPI (1:3000, 30 s). Abschließend wurden die Objektträger zweimal mit PBS gewaschen und luftgetrocknet. Zur Verstärkung der Fluoreszenz wurde ein Tropfen Mounting Medium zugegeben und das Präparat mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop.

2.2.3.6 Präparation von Gefrierschnitten und immunhistochemische Färbung von MT-SP1/Matriptase

Verwendete Puffer:

Trispuffer für Immunhistochemie

Tris·Cl	50 mM	
NaCl	150 mM	pH 7,6

Die nicht zur RNA-Isolierung verwendete Hälfte der Gewebeproben der pAVK-Patienten und der gesunden Probanden wurde sofort bei -80°C eingefroren und vor dem Einbetten über Nacht auf -20°C gebracht. Im Kryostat wurde bei -20°C Tissue Tek als Einbettmedium auf ein Korkplättchen gebracht und das Gefäß senkrecht auf dem Plättchen stehend komplett eingebettet. Von diesem Gewebblock wurden schließlich serielle, 8 µm-dicke Schnitte transversal zum Gefäß angefertigt, die auf Superfrost-Plus Adhäsionsobjektträger aufgebracht wurden.

Zum Nachweis von MT-SP1/Matriptase in Gefrierschnitten wurden die Schnitte 15 min bei RT in 1% Paraformaldehyd fixiert und anschließend dreimal vorsichtig mit Trispuffer gespült. Unspezifische Bindungsstellen wurden für 40 min bei RT mit 1,5% Blocking Serum aus dem Vectastain ABC-AP Kit abgesättigt, welches danach abgeschüttelt wurde. Die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper M32 erfolgte für 1 h bei RT in einer Konzentration von 10 µg/ml. Danach wurden die Schnitte erneut dreimal mit Trispuffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei RT mit 0,5% biotinyliertem IgG-Maus Sekundärantikörper. Nach einem weiteren Waschschrift wurde für 1 h mit dem Vectastain ABC-AP Reagenz inkubiert, das aus einem vorab gemischten Komplex aus 1% Avidin DH und 1% biotinylierter alkalischer Phosphatase H besteht, wobei Avidin mindestens eine freie Bindungsstelle für Biotin

behält. Die enzymatische Reaktion mit Red Chromogen (1:120) wurde danach für 10 min durchgeführt und durch drei Waschschrirte beendet. Die Blaufärbung der Nuklei wurde durch Hämalaun-Färbung (1 min) erreicht. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Lichtmikroskop.

3 ERGEBNISSE

3.1 Funktionalität der rekombinanten Serinproteasedomäne von MT-SP1/Matriptase

Die Wirkung von MT-SP1/Matriptase in Endothelzellen sollte anhand der Aktivität der Serinproteasedomäne des Enzyms untersucht werden. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde von Morphochem AG Basel die katalytische Domäne von MT-SP1/Matriptase Cys122Ser (Chymotrypsin-Nummerierung) rekombinant exprimiert, die nachfolgend als MT-SP1/Matriptase bezeichnet wird und die Aminosäuren 596-855 umfasst (siehe Anhang 11.1). Ebenso wurde dies für MT-SP1/Matriptase Cys122Ser, Ser195Ala (Chymotrypsin-Nummerierung) durchgeführt, nachfolgend als MT-SP1/Matriptase Ser195Ala bezeichnet. Die Mutation Cys122Ser hatte zum Ziel, nach Aktivierung von MT-SP1/Matriptase das kovalente Anhaften der Pro-Domäne an die katalytische Domäne (Aminosäuren 615-855, siehe Anhang 11.1) zu verhindern. Ser195 der katalytischen Triade wurde zu Ala mutiert, um eine proteolytisch inaktive MT-SP1/Matriptase-Form zu generieren.

Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität wurde 1 nM des jeweiligen rekombinanten Enzyms mit 25 µM synthetischem fluorogenem Substrat I-1550 versetzt und fluorometrisch gemessen. Abbildung 14 zeigt die Kinetik der katalytischen Aktivität von MT-SP1/Matriptase im Vergleich zur Mutante MT-SP1/Matriptase Ser195Ala. MT-SP1/Matriptase zeigte in Abhängigkeit von der gemessenen Zeit einen linearen Anstieg der Fluoreszenz, wohingegen MT-SP1/Matriptase Ser195Ala keine Umwandlung des Substrates katalysierte. Die enzymatische Aktivität von MT-SP1/Matriptase wurde auf diese Weise nachgewiesen. Zudem wurde die proteolytische Inaktivität von MT-SP1/Matriptase Ser195Ala gezeigt.

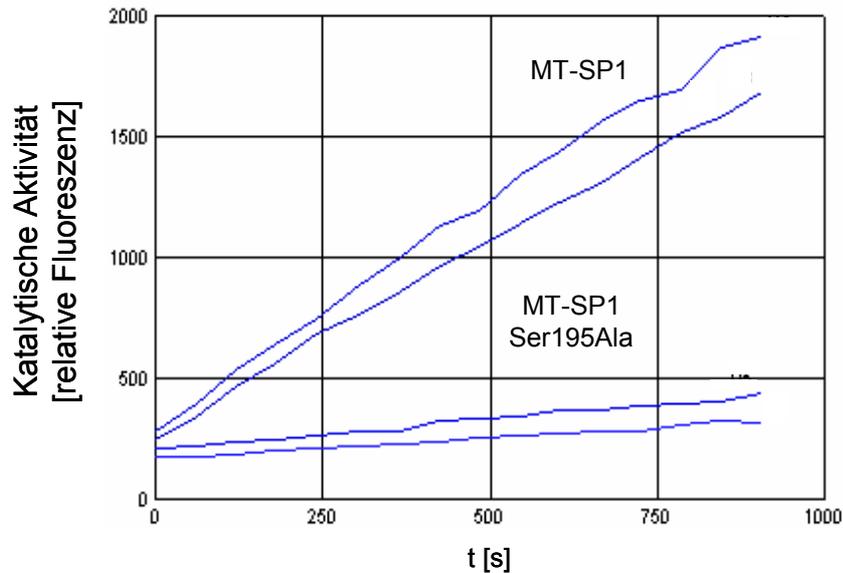


Abb. 14. Reaktionskinetiken von MT-SP1/Matriptase und MT-SP1/Matriptase Ser195Ala

Gezeigt ist die relative Fluoreszenz von MT-SP1/Matriptase und MT-SP1/Matriptase Ser195Ala nach Zugabe von 25 μ M Trypsinsubstrat I-1550 (Boc-Gln-Ala-Arg-AMC-HCl) zu 1 nM rekombinantem Protein im Zeitverlauf bis 900 s bei $\lambda_{\text{ex}}=360$ nm und $\lambda_{\text{em}}=465$ nm. Die Aktivität der beiden Proteine wurde zweimal jeweils in Doppelbestimmung überprüft. Die Abbildung zeigt einen dieser Versuche.

3.2 Proinflammatorische Wirkung von MT-SP1/Matriptase in humanen Endothelzellen

3.2.1 Induktion von IL-8

Zu Beginn dieser Arbeit war über die physiologische Wirkung der Serinprotease MT-SP1/Matriptase wenig bekannt. Die Funktion von MT-SP1/Matriptase wurde dabei vor allem Prozessen wie Tumorinvasion oder Metastasierung zugeschrieben. Der Transmembranrezeptor PAR-2 wird als potenzielles Substrat von MT-SP1/Matriptase beschrieben und mit Entzündungsprozessen assoziiert. Beide Kandidaten werden in Endothelzellen exprimiert, so dass eine mögliche inflammatorische Wirkung der katalytischen Domäne von MT-SP1/Matriptase in Endothelzellen untersucht werden sollte.

Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) wurden nach einer dreistündigen Serumdeprivation mit MT-SP1/Matriptase für 16 h stimuliert. Anschließend wurden die Überstände der Zellen mittels ELISA auf ihren Zytokingehalt hin analysiert. Zur Bestimmung der Transkriptmengen wurden die Zellen nach

dreistündigem Serumentzug für zwei Stunden mit MT-SP1/Matriptase behandelt. Die mRNA-Mengen wurden durch quantitative RT-PCR (qRT-PCR) ermittelt.

MT-SP1/Matriptase verstärkte in diesen Versuchen die Freisetzung des inflammatorischen Zytokins Interleukin-8 (IL-8) (Abb. 15 A). Dies konnte in Abhängigkeit von der eingesetzten MT-SP1/Matriptase-Dosis gezeigt werden, wobei eine signifikante Induktion ab einer Konzentration von 1 nM MT-SP1/Matriptase festgestellt wurde (Abb. 15 B). Die basalen IL-8-Konzentrationen in unstimulierten Endothelzellen betragen in diesen Versuchen $125 (\pm 33)$ pg/ml (Abb. 15 A) und $175 (\pm 20)$ pg/ml (Abb. 15 B).

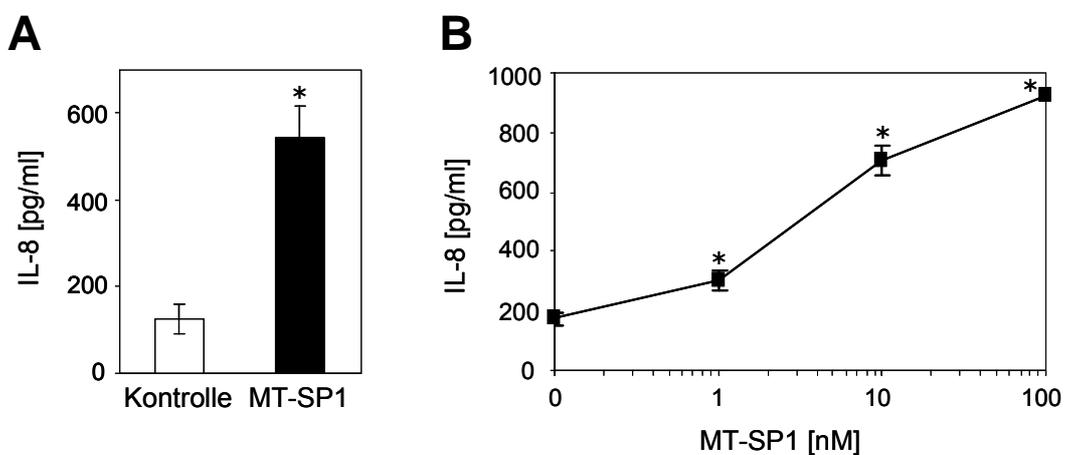


Abb. 15. MT-SP1/Matriptase erhöht die IL-8-Freisetzung in HUVEC in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis

A. HUVEC wurden 3 h serumfrei gehalten und mit 20 nM MT-SP1/Matriptase für 16 h inkubiert. In den Zellüberständen wurde mittels Sandwich-ELISA die IL-8-Konzentration ermittelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte HUVEC. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM dreier Versuche. *: $p < 0,05$ **B.** Behandlung von HUVEC nach dreistündigem Serumentzug mit ansteigenden MT-SP1/Matriptase-Konzentrationen für 16 h und Analyse der IL-8-Sekretion mittels ELISA. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SEM von vier Versuchen. *: $p < 0,05$

Nachfolgend wurde untersucht, ob der Erhöhung der Zytokinsekretion eine verstärkte mRNA-Expression zugrunde liegt. MT-SP1/Matriptase erhöhte die Transkriptmengen von IL-8 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 16). Durch Vorinkubation mit dem Antibiotikum Actinomycin D, das an doppelsträngige DNA bindet und dadurch Enzyme der Transkription inhibiert, und anschließender MT-SP1/Matriptase-Stimulation konnte gezeigt werden, dass die erhöhte IL-8-mRNA-Expression abhängig von transkriptioneller Aktivität war (Abb. 16).

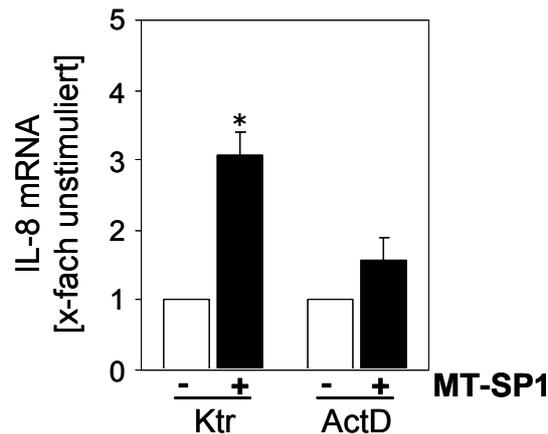


Abb. 16. MT-SP1/Matriptase induziert die IL-8-Transkription in HUVEC

Nach dreistündiger Serumdeprivation, die bei *ActD* 1 h Vorinkubation mit 5 µg/ml Actinomycin D enthielt, wurden HUVEC 2 h mit 20 nM MT-SP1/Matriptase behandelt. Nach RNA-Isolierung und anschließender quantitativer RT-PCR wurden die Werte auf GAPDH normalisiert. Im Diagramm ist der x-fache Anstieg im Vergleich zu unstimulierten Zellen zu sehen. Ktr: unbehandelte Kontrollzellen. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von drei bis sechs unabhängigen Versuchen. *: $p < 0,05$ versus unstimulierte Zellen

Die durch MT-SP1/Matriptase induzierte Zytokinfreisetzung resultierte daher nicht aus einer verstärkten Freisetzung des inflammatorischen Mediators IL-8 aus intrazellulären Speichern, sondern ist auf eine *de novo*-Synthese des Proteins zurückzuführen.

Um die Wirkung von MT-SP1/Matriptase in einem in der Atherosklerose relevanten Endothelzelltyp zu bestätigen, wurde die IL-8-Induktion zusätzlich in primären Endothelzellen der humanen Koronararterie (HCAEC) analysiert. Auch in diesem Zelltyp führte MT-SP1/Matriptase zu einer hochregulierten Expression der IL-8-mRNA (Abb. 17). Die atherosklerotisch wichtigen koronaren Endothelzellen waren daher mit den in den weiteren Versuchen verwendeten Nabelschnurendothelzellen in ihrer Stimulierbarkeit vergleichbar. Diese Versuche wurden zur Induktion des maximalen Effektes mit 100 nM MT-SP1/Matriptase durchgeführt, so dass HUVEC, die ebenfalls mit 100 nM MT-SP1/Matriptase stimuliert wurden, zum Vergleich gezeigt werden.

Die Quantifizierung der mRNA-Niveaus erfolgte absolut anhand einer Standardkurve (siehe Abb. 12), da in diesem Versuch verschiedene Zelltypen miteinander verglichen wurden.

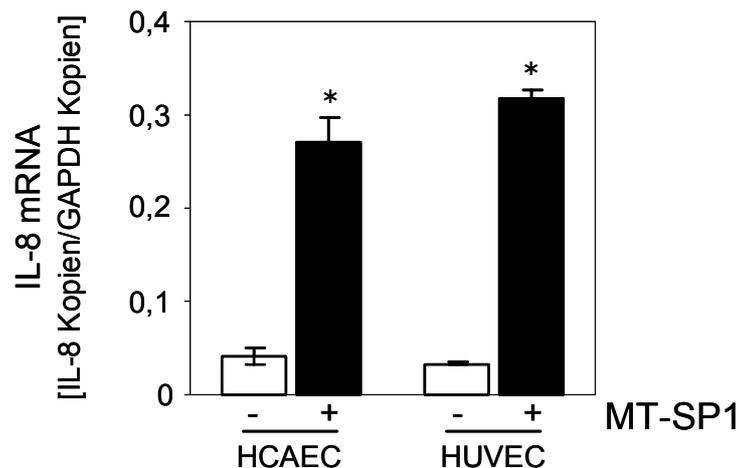


Abb. 17. MT-SP1/Matriptase induziert die IL-8-Expression in HCAEC

Nach 3 h serumfreier Inkubation wurden humane Endothelzellen aus der Koronararterie (HCAEC) oder humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) für 2 h mit 100 nM MT-SP1 behandelt. Die absolute Quantifizierung der IL-8-Kopien erfolgte unter Zuhilfenahme einer Standardkurve aus PCR-Fragmenten. Normalisiert wurden die Werte auf die GAPDH-Kopien der jeweiligen Probe. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SEM des Quotienten aus IL-8-mRNA-Kopienzahl und GAPDH-mRNA-Kopienzahl aus drei unabhängigen Versuchen. *: $p < 0,05$ versus unstimulierte Zellen

3.2.2 Induktion von IL-6 und MCP-1

Zusätzlich zur MT-SP1/Matriptase-Wirkung auf die IL-8-Produktion wurde der Einfluss von MT-SP1/Matriptase auf die Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) als weitere wichtige Mediatoren des atherogenen Prozesses untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Zytokinfreisetzung mittels Immunoassay und die Transkriptmengen durch quantitative RT-PCR festgestellt. Vergleichbar zur Induktion von IL-8 konnten ebenfalls für IL-6 eine verstärkte Sezernierung sowie erhöhte mRNA-Mengen nach Behandlung von HUVEC mit MT-SP1/Matriptase detektiert werden (Abb. 18 A und B).

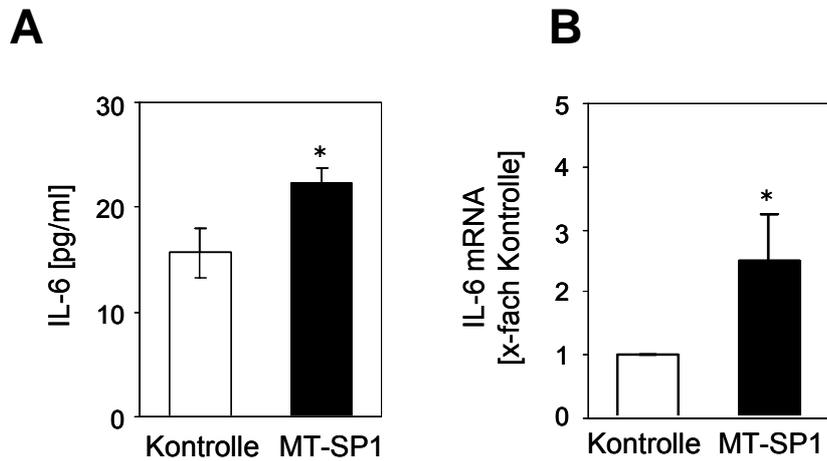


Abb. 18. MT-SP1/Matriptase induziert IL-6

HUVEC wurden nach dreistündigem Serumentzug für 16 h (**A**) oder 2 h (**B**) mit 20 nM MT-SP1/Matriptase behandelt. Mittels ELISA wurde im Anschluss der IL-6-Zytokingehalt der Zellüberstände (**A**) bzw. mittels qRT-PCR die IL-6-Transkriptmengen (**B**) bestimmt. Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei (**A**) bzw. fünf (**B**) unabhängigen Versuchen. *: $p < 0,05$

Zudem konnte eine verstärkte Genexpression von MCP-1 nach Stimulation von HUVEC mit MT-SP1/Matriptase, ebenfalls auf Protein- sowie auf mRNA-Ebene, beobachtet werden (Abb. 19 A und B).

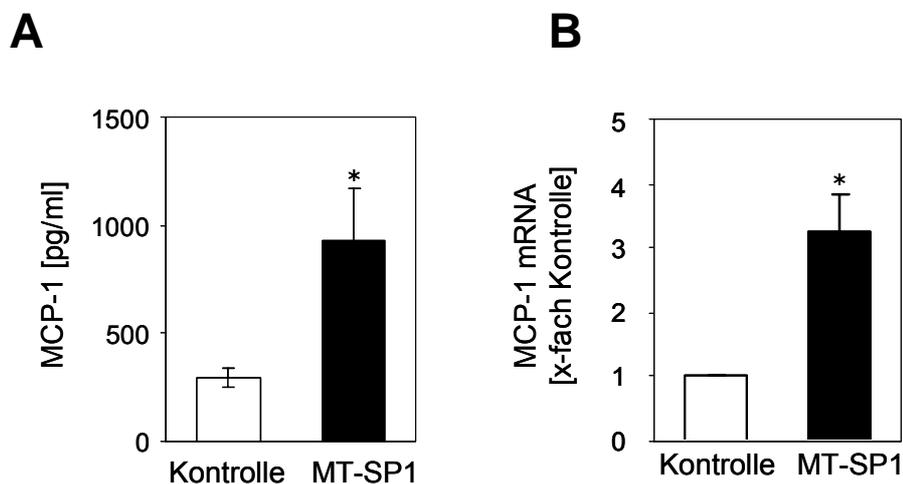


Abb. 19. MT-SP1/Matriptase induziert MCP-1

HUVEC wurden nach dreistündiger Serumdeprivation mit 20 nM MT-SP1/Matriptase für 16 h (**A**) oder 2 h (**B**) behandelt. **A.** Immunoassayanalyse der MCP-1-Freisetzung, als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen, *: $p < 0,05$). **B.** qRT-PCR der MCP-1-Gesamt-RNA, dargestellt als x-fach im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Mittelwerte \pm SEM aus fünf unabhängigen Versuchen, *: $p < 0,05$).

Die entzündungsfördernde Wirkung von MT-SP1/Matriptase in HUVEC beschränkt sich daher nicht auf die verstärkte Expression von IL-8, sondern beinhaltet ein breiteres Spektrum an induzierten Mediatoren der inflammatorischen Reaktion, was anhand der Zytokine IL-6 und MCP-1 gezeigt wurde. Durch die Induktion dieser Zytokine könnte MT-SP1/Matriptase die Rekrutierung inflammatorischer Zellen an die endotheliale Gefäßwand fördern und zur Progression der Atherosklerose beitragen.

3.3 Rezeptormechanismus der MT-SP1/Matriptase-induzierten IL-8-Expression

3.3.1 *MT-SP1/Matriptase induziert IL-8 abhängig von der katalytischen Aktivität*

Im Folgenden wurde auf die Induktion von IL-8 als Vertreter der inflammatorischen Zytokine fokussiert. Angesichts der IL-8-Induktion durch MT-SP1/Matriptase stellte sich die Frage nach der Bedeutung der Serinproteasedomäne von MT-SP1/Matriptase bei dieser Wirkung. Im Vergleich wurde daher die Wirkung von katalytisch aktiver MT-SP1/Matriptase und proteolytisch inaktiver MT-SP1/Matriptase Ser195Ala auf die IL-8-Sekretion analysiert. MT-SP1/Matriptase Ser195Ala bewirkte dabei im Gegensatz zur Wildtypform keinen signifikanten Anstieg der IL-8-Freisetzung und zeigt damit die Wichtigkeit der katalytischen Aktivität von MT-SP1/Matriptase bei der IL-8-Induktion auf (Abb. 20).

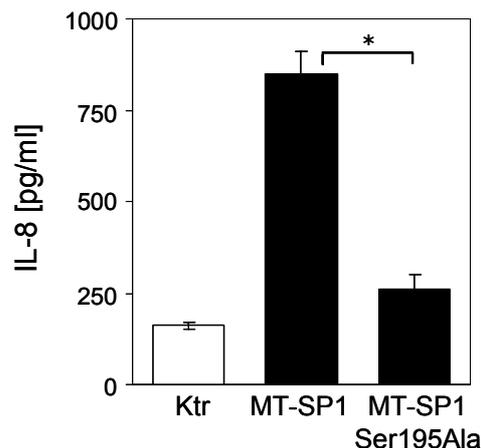


Abb. 20. Die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-Sezernierung ist abhängig von der katalytischen Aktivität des Enzyms

HUVEC wurden 3 h serumfrei gehalten und danach 16 h mit 20 nM MT-SP1/Matriptase oder enzymatisch inaktiver MT-SP1/Matriptase Ser195Ala (20 nM) behandelt. Mittels ELISA erfolgte die Quantifizierung der IL-8-Freisetzung im Vergleich zu unstimulierten HUVEC (Ktr). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen. *: $p < 0,05$

3.3.2 MT-SP1/Matriptase induziert IL-8 via PAR-2

PAR-2 wird als potenzielles Substrat von MT-SP1/Matriptase in einem *Xenopus*-Oozyten-Modell beschrieben und spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsvorgängen. Demzufolge war die Frage zu beantworten, ob PAR-2 als Vermittler der inflammatorischen MT-SP1/Matriptase-Wirkung in Endothelzellen fungiert. Da bestimmte PAR-2-Agonisten, wie zum Beispiel Gerinnungsfaktor Xa oder Trypsin, sowohl PAR-2 als auch PAR-1 aktivieren können, wurden parallel Versuche zur möglichen Beteiligung von PAR-1 durchgeführt. Von beiden PAR ist bekannt, dass sie auf Endothelzellen exprimiert werden. Zur Untersuchung der Rolle von PAR-2 bzw. PAR-1 sollte daher das Expressionsniveau der Rezeptorproteine durch RNA-Interferenz (RNAi) gesenkt werden. Die Expression von PAR-2 und PAR-1 wurde mittels qRT-PCR detektiert.

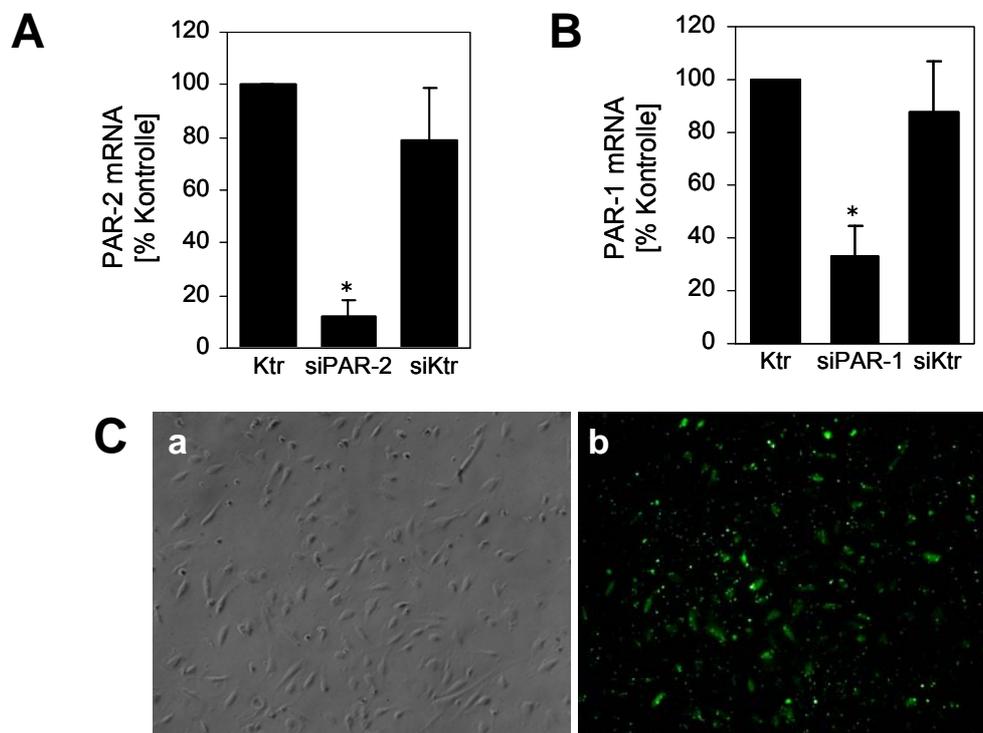


Abb. 21. Senkung der PAR-Expression mittels RNAi

Nach 24 h Inkubation unter Zellkulturbedingungen wurden HUVEC mit 100 nM spezifischen siRNAs gegen PAR-2 (siPAR-2) und PAR-1 (siPAR-1) oder mit unspezifischen siRNAs als Negativkontrolle (siKtr) transfiziert. Nach 5 h erfolgte ein Mediumwechsel zur Vermeidung zytotoxischer Effekte. 48 h nach Transfektion wurde die Gesamt-RNA präpariert und eine qRT-PCR zur Detektion der PAR-2- (**A**) und PAR-1-mRNA-Niveaus (**B**) durchgeführt. Dargestellt sind die mRNA-Niveaus als Prozent der untransfizierten Kontrollzellen (Ktr) als Mittelwerte \pm SEM aus 5-7 unabhängigen Versuchen, *: $p < 0,05$. **C**. Als Transfektionskontrolle wurden unspezifische, fluoreszenzmarkierte Kontroll-siRNAs verwendet. Die Auswertung der Transfektionseffizienz erfolgte fluoreszenzmikroskopisch und belief sich auf 74 (\pm 8)%. Die Abbildung zeigt HUVEC 6 h nach Transfektion als Phasenkontrast- (**a**) und als fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (**b**) mit einem 10x Objektiv.

Durch Einbringen spezifischer siRNAs konnte die Expression von PAR-2 auf mRNA-Ebene 48 h nach Transfektion auf 12,44% (\pm 5,43) im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle (Ktr) gesenkt werden (Abb. 21 A). Die PAR-2-Expression in Zellen mit unspezifischer Kontroll-siRNA (siKtr) lag dagegen bei 78,79% (\pm 20,17) im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Abb. 21 A).

Für PAR-1 wurde eine Reduktion der Expression auf 33,36% (\pm 11,04) im Vergleich zu untransfizierten Zellen festgestellt; die siKtr-Zellen wiesen 87,37% (\pm 19,62) der PAR-1-Expression untransfizierter Zellen auf (Abb. 21 B). Die Transfektionseffizienz in diesen Versuchen wurde durch Fluoreszenzmikroskopie ermittelt, da die verwendeten unspezifischen Kontroll-siRNAs mit Fluoreszein markiert waren, und betrug 74 (\pm 8)% (Abb. 21 C).

Wurden die so behandelten Endothelzellen mit MT-SP1/Matriptase stimuliert, zeigten Zellen mit unspezifischer siRNA (siKtr) und Zellen, deren PAR-1-Expression herunterreguliert war (siPAR-1), eine Induktion der IL-8-Expression. Zellen jedoch, in denen PAR-2 herunterreguliert war (siPAR-2), wiesen keine gesteigerte IL-8-Expression auf (Abb. 22).

Die Induktion von IL-8 auf mRNA-Ebene war in Zellen mit unspezifischer Kontroll-siRNA (siKtr) vergleichbar mit der Induktion in untransfizierten Zellen (vergleiche Abb. 16).

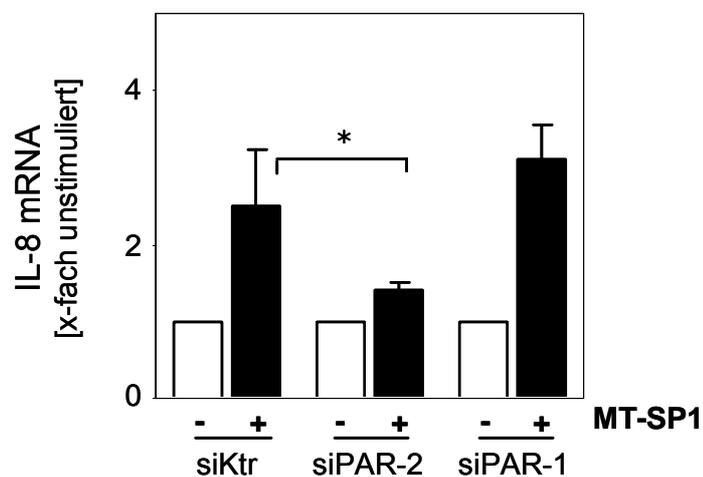


Abb. 22. HUVEC mit verminderter PAR-2-Expression zeigen eine Hemmung der MT-SP1/Matriptase-induzierten IL-8-Transkription

HUVEC wurden 24 h inkubiert und danach mit 100 nM spezifischen siRNAs gegen PAR-2 (siPAR-2) und PAR-1 (siPAR-1) oder mit unspezifischen siRNAs als Negativkontrolle (siKtr) transfiziert. 43 h nach Transfektion wurden die Zellen 3 h serumfrei gehalten und danach 2 h mit MT-SP1/Matriptase (20 nM) stimuliert, die Gesamt-RNA isoliert und eine qRT-PCR zur Analyse der IL-8-mRNA durchgeführt. Dargestellt sind die x-fachen Anstiege der mRNA-Niveaus im Vergleich zu unstimulierten Zellen als Mittelwerte \pm SEM von 5-7 unabhängigen Versuchen. *: $p < 0,05$

Diese Ergebnisse zeigen, dass PAR-2 essenziell für die inflammatorische Wirkung von MT-SP1/Matriptase in Endothelzellen ist, wohingegen PAR-1 keine Bedeutung bei diesem Effekt hat. Da zur Induktion der IL-8-Expression die katalytische Aktivität von MT-SP1/Matriptase sowie die Präsenz von PAR-2 essenziell sind, scheint MT-SP1/Matriptase über die proteolytische Aktivierung von PAR-2 Signaltransduktion zu induzieren und wirkt daher als selektiver PAR-2-Agonist.

Die spezifische Senkung der PAR-2-Expression führte also zur Hemmung der MT-SP1/Matriptase-induzierten IL-8-Transkription, wohingegen eine verringerte PAR-1-Expression ohne Wirkung blieb. Um eine mögliche Aktivierung von PAR-1 durch MT-SP1/Matriptase auszuschließen, wurden zusätzlich Versuche zum Aktivierungszustand von PAR-1 nach MT-SP1/Matriptase-Behandlung durchgeführt.

Als Positivkontrolle diente Thrombin als starker PAR-1-Agonist. Unter Verwendung der PAR-1-Antikörper SPAN12 und WEDE15 im Durchflusszytometer wurden der Aktivierungszustand und das Ausmaß der Internalisierung von PAR-1 ermittelt. SPAN12 erkennt ein Epitop des Rezeptors, das die Thrombinschnittstelle umfasst und bindet nur an ungeschnittenen PAR-1. WEDE15 hingegen richtet sich gegen ein Epitop, das entfernt von der Thrombinschnittstelle lokalisiert ist und weist somit intakten und geschnittenen PAR-1 nach (bezeichnet als Gesamt-PAR-1). Die Färbung mit der Isotypkontrolle Maus γ 1-Phycoerythrin erzeugte dabei keine unspezifischen Signale und entsprach der Autofluoreszenz der Zellen (nicht gezeigt). Da entsprechende Antikörper zum Nachweis des Aktivierungszustandes von PAR-2 nicht erhältlich sind, sind die entsprechenden Versuche nicht durchführbar.

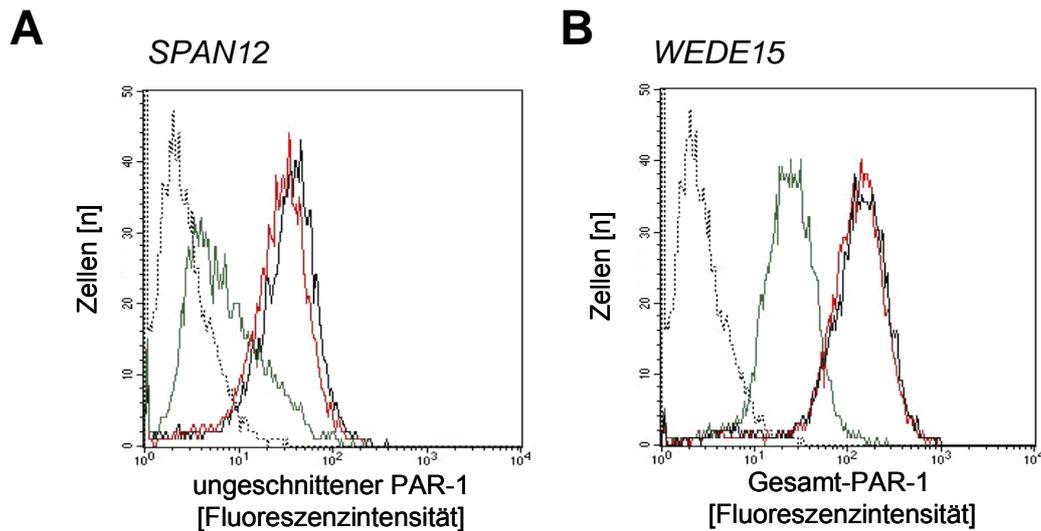


Abb. 23. MT-SP1/Matriptase proteolysiert PAR-1 minimal, ohne die Gesamtexpression zu beeinflussen

HUVEC wurden 48 h inkubiert und nach 3 h Serumentzug mit MT-SP1/Matriptase (20 nM) oder Thrombin (10 U/ml) für 2 h behandelt. Das Ablösen der Zellen erfolgte nichtenzymatisch unter Verwendung von Zell-Dissoziationspuffer. Im Anschluss wurden die Zellen 45 min bei RT mit Anti-PAR-1 SPAN12-Phycoerythrin (1:10) oder Anti-PAR-1 WEDE15-Phycoerythrin (1:10) inkubiert und die Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie bestimmt. **A.** Oberflächenexpression von ungeschnittenem PAR-1 in unbehandelten Zellen (schwarze Linie), in MT-SP1/Matriptase-behandelten Zellen (rote Linie) und in Thrombin-behandelten Zellen (grüne Linie). Der Nachweis erfolgte mit Anti-PAR-1 SPAN12-Phycoerythrin (1:10). Die gestrichelte Linie zeigt die Autofluoreszenz. **B.** PAR-1-Gesamtmenge in unbehandelten Zellen (schwarze Linie), in MT-SP1/Matriptase-behandelten Zellen (rote Linie) und in Thrombin-behandelten Zellen (grüne Linie). Der Nachweis erfolgte mit Anti-PAR-1 WEDE15-Phycoerythrin (1:10). Die gestrichelte Linie zeigt die Autofluoreszenz. Die Abbildungen A und B zeigen jeweils einen von drei unabhängigen Versuchen.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass MT-SP1/Matriptase PAR-1 minimal proteolysierte (Abb. 23 A). Die Gesamtmenge an PAR-1 wurde durch MT-SP1/Matriptase nicht verringert und entsprach damit der PAR-1-Expression in unbehandelten HUVEC (Abb. 23 B). Dies stand im Gegensatz zu Thrombin-behandelten HUVEC, die einen hohen Anteil an geschnittenem PAR-1 im Vergleich zu unbehandelten Zellen aufwiesen (Abb. 23 A), wobei ebenfalls die Gesamt-PAR-1-Menge deutlich reduziert war (Abb. 23 B), was auf ein hohes Ausmaß an Internalisierung der aktivierten Rezeptoren zur Beendigung der Signaltransduktion bzw. zur Desensitivierung schließen lässt. MT-SP1/Matriptase spaltete daher einen vernachlässigbaren Anteil an PAR-1. Die Internalisierung von PAR-1 wurde durch MT-SP1/Matriptase nicht induziert. MT-SP1/Matriptase zeigte damit keine wesentliche Substratspezifität für PAR-1.

3.3.3 Überexpression von PAR-2 verstärkt die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-Expression

Wird von der Hypothese ausgegangen, dass die MT-SP1/Matriptase-induzierte Steigerung der IL-8-Genexpression durch PAR-2 vermittelt wird, sollte die Überexpression von PAR-2 zu einer verstärkten inflammatorischen MT-SP1/Matriptase-Wirkung führen. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde humaner PAR-2 in HUVEC überexprimiert. Zum Vergleich wurde humaner PAR-1 in HUVEC überexprimiert. Als Kontrolle diente die Transfektion mit dem Leervektor pcDNA3.1. Anschließend erfolgte die Stimulation der transfizierten Zellen mit MT-SP1/Matriptase. Die Transfektionseffizienz wurde durch Kotransfektion mit einem EYFP-Plasmid und fluoreszenzmikroskopische Analyse ermittelt und lag bei 30 (\pm 6)% (Abb. 24 B). Das IL-8-mRNA-Niveau wurde im Anschluss durch qRT-PCR festgestellt.

HUVEC, die mit dem Leervektor pcDNA3.1 transfiziert wurden, und HUVEC mit einer erhöhten PAR-1-Expression wiesen in diesen Versuchen einen ähnlichen Anstieg der IL-8-Transkription auf, der 1,74- bzw. 1,84-fach im Vergleich zu unbehandelten Zellen war (Abb. 24 A). Die geringere IL-8-Induktion im Vergleich zu untransfizierten Zellen ist vermutlich auf zytotoxische Effekte der Transfektion zurückzuführen (vergleiche Abb. 16). HUVEC hingegen, die PAR-2 überexprimierten, zeigten deutlich gesteigerte IL-8-mRNA-Niveaus im Vergleich zu den pcDNA3.1-transfizierten Zellen (Abb. 24 A), was einen PAR-2-vermittelten MT-SP1/Matriptase-Effekt bestätigt und im Einklang mit den oben beschriebenen Ergebnissen steht.

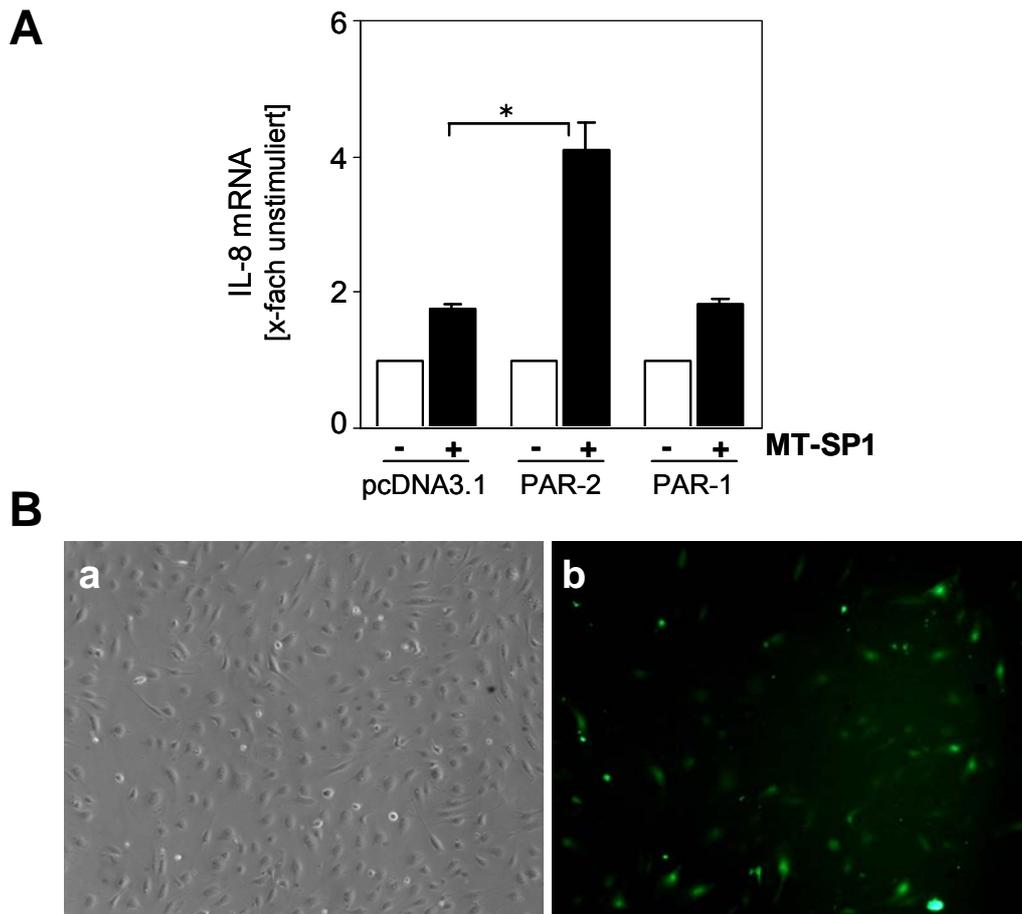


Abb. 24. Die Überexpression von PAR-2 in HUVEC steigert die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-Genexpression

A. Nach 24-stündiger Inkubation von HUVEC wurden humaner PAR-2, PAR-1 oder pcDNA3.1 als Kontrollvektor in die Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen 3 h serumdepriviert und anschließend mit 20 nM MT-SP1/Matriptase für 2 h stimuliert. Nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgte eine qPCR zur Quantifizierung der IL-8-Transkripte. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von vier Versuchen als x-fach im Vergleich zu unstimulierten Zellen. *: $p < 0,05$ **B.** Die Transfektionseffizienz wurde durch Kotransfektion mit einem EYFP-Plasmid überprüft und betrug 30 (\pm 6)%. Die Abbildung zeigt HUVEC 24 h nach Transfektion in der lichtmikroskopischen (a) und der fluoreszenzmikroskopischen (b) Aufnahme mit einem 10x Objektiv.

3.4 Endothelzellspezifische Induktion von PAR-2 durch IL-1 β

Da die erhöhte PAR-2-Expression in HUVEC die proinflammatorische Wirkung von MT-SP1/Matriptase verstärkte, sollte geklärt werden, ob die PAR-2-Expression in einem entzündlichen Umfeld gesteigert wird, wodurch die MT-SP1/Matriptase-Wirkung potenziert werden könnte. Ausgehend von Daten, die die PAR-2-Induktion durch Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 α (IL-1 α) und Lipopolysaccharide (LPS) in HUVEC beschrieben, wurde die PAR-2-Expression nach zweistündiger IL-1 β -Stimulation in HUVEC untersucht. Zudem wurde die PAR-2-Expression nach IL-1 β -

Behandlung in den ebenfalls atherosklerotisch relevanten vaskulären glatten Muskelzellen (SMC) und mononukleären Zellen (MNC) analysiert. Die Quantifizierung der mRNA-Niveaus erfolgte in diesen Versuchen absolut anhand einer Standardkurve (siehe Abb. 12), da verschiedene Zelltypen verglichen wurden. Es zeigte sich interessanterweise eine IL-1 β -induzierte 6,8-fache Hochregulierung von PAR-2-mRNA in HUVEC im Vergleich zu unbehandelten Zellen, wohingegen keine Veränderung der PAR-2-Expression in SMC oder MNC nach Behandlung mit IL-1 β festgestellt wurde (Abb. 25 A). Damit wird deutlich, dass PAR-2 in einem entzündlichen Umfeld, wie dies die Atherosklerose hervorbringt, zelltypspezifisch in Endothelzellen hochreguliert wird. PAR-1 hingegen erfährt keine Veränderung seiner Expression nach Behandlung der drei verschiedenen vaskulären Zelltypen mit IL-1 β (Abb. 25 B). Die im Vergleich zu PAR-1 basal geringe Expression von PAR-2 könnte dadurch im Rahmen der atherosklerotischen Entzündungsreaktion deutlich hochreguliert werden.

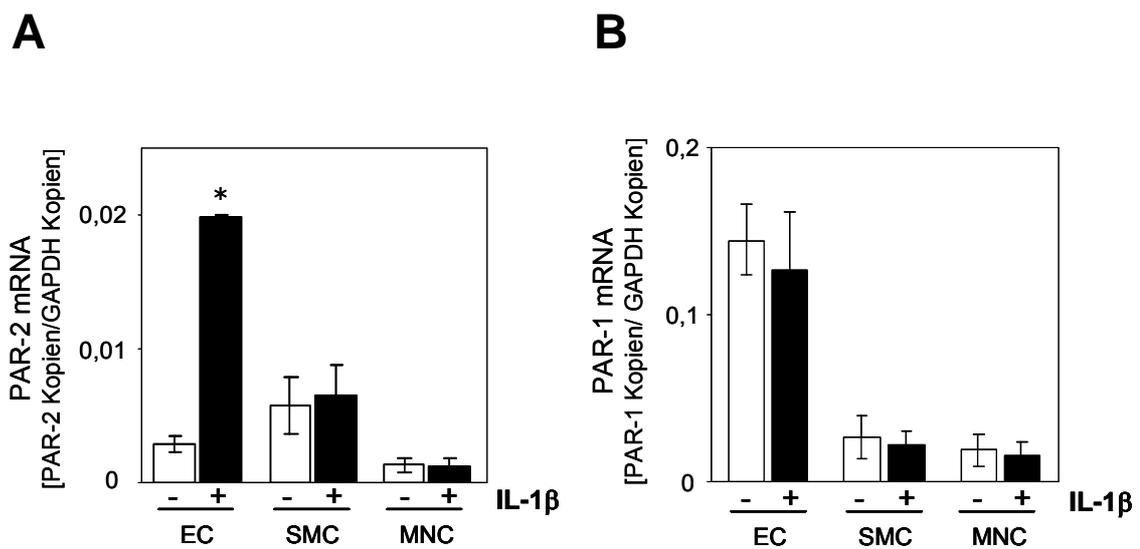


Abb. 25. IL-1 β verstärkt die PAR-2-Genexpression zelltypspezifisch in HUVEC, jedoch nicht die PAR-1-Expression

Nabelschnurendothelzellen (EC), glatte Muskelzellen der Koronararterie (SMC) und Ficoll-isolierte mononukleäre Zellen (MNC) wurden 3 h, 16 h bzw. 2 h serumfrei gehalten und anschließend 2 h mit IL-1 β (50 ng/ml) behandelt. Nach Präparation der RNA und reverser Transkription wurde eine qPCR durchgeführt. Aus den erhaltenen C_t -Werten wurde anhand einer Standardkurve aus spezifischen, vorher quantifizierten PCR-Produkten die Anzahl der PAR-2- (A) bzw. PAR-1- (B) mRNA-Kopien determiniert, die anschließend auf die entsprechenden GAPDH-Kopien normalisiert wurden. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte \pm SEM von 4-7 unabhängigen Versuchen. *: $p < 0,05$ versus unstimulierte Zellen

Wird dies vor dem Hintergrund der Ergebnisse aus Abbildung 24 A betrachtet, so kann vermutet werden, dass die inflammatorische Wirkung von MT-SP1/Matriptase potenziell ist, wenn PAR-2 durch Entzündungsmediatoren induziert wird. Durch diesen Mechanismus könnte zur positiven Rückkopplung der inflammatorischen Reaktion in der Gefäßwand beigetragen werden.

3.5 MT-SP1/Matriptase-induzierte intrazelluläre Signaltransduktion

3.5.1 *Sequenzielle Aktivierung der MAPK p38 und p42/44*

Zur Aufklärung der MT-SP1/Matriptase-induzierten intrazellulären Signalwege wurde die potenzielle Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) p38 und p42/44 analysiert. MAPK sind Serin-/Threoninkinasen, die als Antwort auf die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch Phosphorylierung aktiviert werden. MAPK besitzen eine Sequenz mit zweifachem Phosphorylierungsmotiv (TXY-Motiv), das bei p42/44 dem TEY-Motiv Thr185/Tyr187 bzw. Thr202/Tyr204 und bei p38 dem TGY-Motiv Thr180/Tyr182 entspricht. Unter Verwendung von Antikörpern, die MAPK nur in der zweifach phosphorylierten Form binden, kann die Aktivierung der MAPK durch den Nachweis der Phosphorylierung bestimmt werden.

Nach dreistündigem Serumentzug wurden die Zellen 0 min, 5 min, 10 min oder 30 min mit MT-SP1/Matriptase behandelt und dann auf Eis lysiert. Analysen mittels Western Blot zeigten eine Phosphorylierung von sowohl p38 als auch p42/44 mit einem Maximum bei einer Stimulationszeit von 5 min. Bis zum Erreichen der 30 min war das Aktivierungsniveau bereits wieder ähnlich dem Ausgangszustand (Abb. 26 A und B). MT-SP1/Matriptase aktivierte daher die MAPK p38 und p42/44 zeitabhängig.

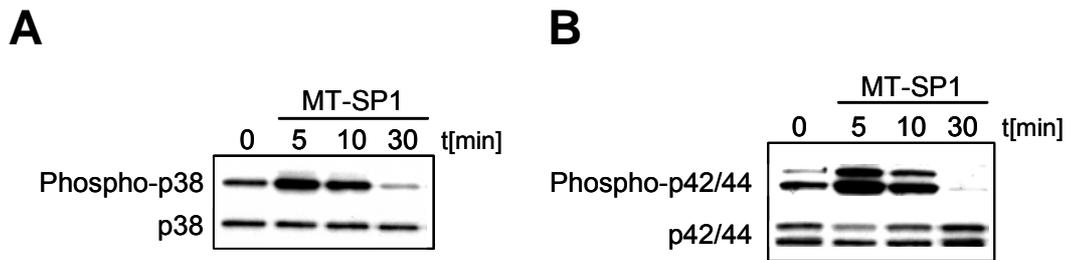


Abb. 26. MT-SP1/Matriptase aktiviert die MAPK p38 und p42/44

Die Stimulation der HUVEC erfolgte nach serumfreier Inkubation für 3 h gemäß den angegebenen Zeiten mit 20 nM MT-SP1/Matriptase. Nach Lyse auf Eis wurde ein Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern gegen (A) phosphoryliertes p38 (Anti-Phospho-p38, Verdünnung 1:1000) und (B) phosphoryliertes p42/44 (Anti-Phospho-p42/44, Verdünnung 1:2000) durchgeführt. Als Ladungskontrolle diente der Nachweis der Gesamtmenge an (A) p38 (Anti-p38, Verdünnung 1:1000) bzw. (B) p42/44 (Anti-p42/44, Verdünnung 1:1000). Die Abbildung zeigt einen Versuch von fünf.

Um eine mögliche sequenzielle Aktivierung von p38 und p42/44 zu untersuchen, wurden pharmakologische Inhibitoren der beiden MAPK verwendet. HUVEC wurden dazu mit dem Inhibitor von p38 MAPK SB 220025 oder mit PD 98059, einem Inhibitor der MAPK Kinase (MEK), welche die p42/44 MAPK aktiviert, vorinkubiert. Dabei zeigte sich eine Hemmung der p42/44-Phosphorylierung nach Inhibition von p38, wohingegen die Inhibition von p42/44 die Phosphorylierung von p38 nicht beeinflusste (Abb. 27 A bzw. B). p38 muss daher in der Signalkaskade vorangeschaltet sein, so dass MT-SP1/Matriptase erst p38 und danach p42/44 aktiviert.

Um die Aktivität des Inhibitors PD 98059 zu überprüfen, wurde die Phosphorylierung von p42/44 nach MT-SP1/Matriptase-Stimulation im Western Blot untersucht (Abb. 27 C). Dabei war eine vollständige Hemmung der p42/44-Phosphorylierung zu erkennen. SB 220025 beeinflusst nicht die Phosphorylierung von p38 selbst, so dass die Wirksamkeit dieses Inhibitors nicht anhand der Phosphorylierung von p38 nachgewiesen werden konnte.

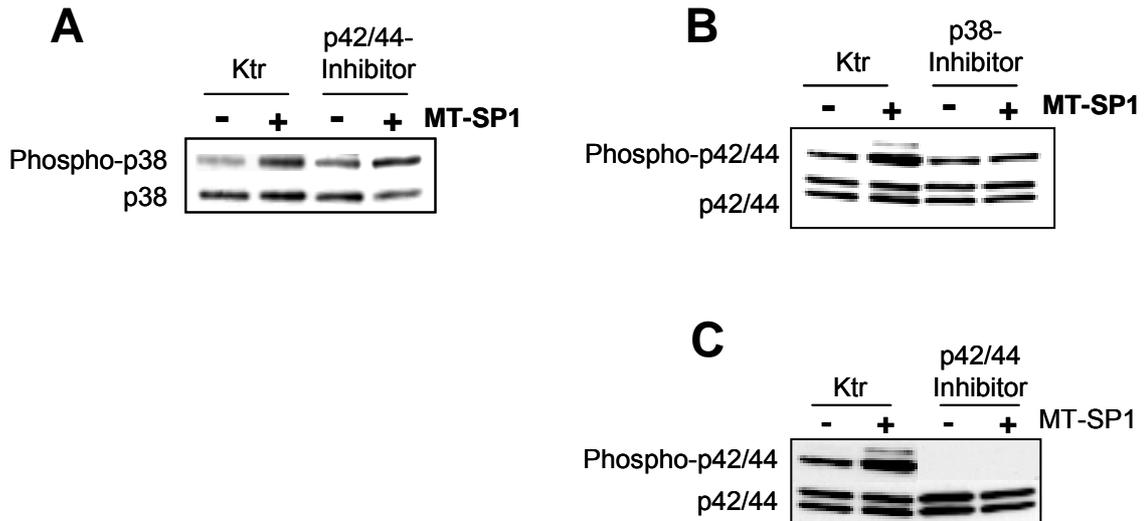


Abb. 27. MT-SP1/Matriptase aktiviert erst p38 und danach p42/44

HUVEC wurden für 2 h serumfrei inkubiert und danach 1 h mit p38-Inhibitor SB 220025 (20 μ M) oder p42/44-Inhibitor PD 98059 (20 μ M) behandelt. Im Anschluss erfolgte die Stimulation der Zellen mit 20 nM MT-SP1/Matriptase für 5 min. Nach Lyse auf Eis wurde ein Western Blot mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern gegen (A) Phospho-p38 (Anti-Phospho-p38, Verdünnung 1:1000) und (B, C) Phospho-p42/44 (Anti-Phospho-p42/44, Verdünnung 1:2000) durchgeführt. Als Ladungskontrolle diente der Nachweis der Gesamtmenge an (A) p38 (Anti-p38, Verdünnung 1:1000) bzw. (B, C) p42/44 (Anti-p42/44, Verdünnung 1:1000). Die Abbildung zeigt einen Versuch von vier.

3.5.2 Verstärkte Promotoraktivität von NF- κ B

Die Aufklärung der MT-SP1/Matriptase-induzierten intrazellulären Signaltransduktion umfasste zudem die Untersuchung der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Genexpression von IL-8 regulieren. Dabei wurde der Transkriptionsfaktor NF- κ B untersucht, der die wichtigsten Gene, die als Mediatoren einer Entzündungsreaktion bekannt sind, aktiviert und über eine Bindungsstelle in der IL-8-Promotorregion verfügt.

Zu diesem Zweck wurden die Plasmide pNF- κ B-Luc sowie pTAL-Luc (als Kontrollvektor) in HUVEC eingebracht. Die Transfektionseffizienz wurde durch Kotransfektion mit einem EYFP-Plasmid und anschließende Analyse am Fluoreszenzmikroskop ermittelt und betrug 30 (\pm 6)% (vergleiche Abb. 24 B). Im Anschluss an die Transfektion erfolgte die Behandlung mit MT-SP1/Matriptase für 20 h in serumreduziertem Medium (0,1% FKS). Die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion und die dadurch angeregte Transkription des Reportergens wurde

anhand der Luciferaseaktivität mittels enzymatischer Reaktion ermittelt.

MT-SP1/Matriptase aktivierte dabei die Bindung von endogenem NF- κ B an das κ B-Enhancer Element (Abb. 28). Die NF- κ B-Aktivierung war ca. 7-fach im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Verwendung des pTAL-Kontrollplasmides führte zu keiner erhöhten Luciferaseexpression durch MT-SP1/Matriptase.

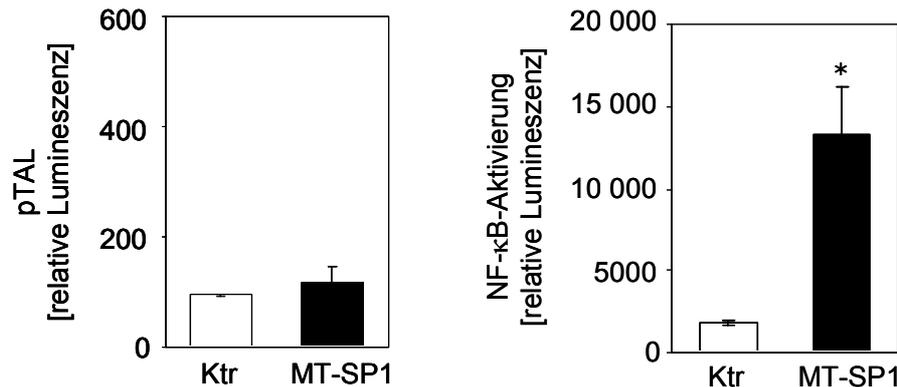


Abb. 28. MT-SP1/Matriptase induziert die Promotoraktivität von NF- κ B

Nach Transfektion von HUVEC mit den angegebenen Luciferasekonstrukten erfolgte die Stimulation mit 20 nM MT-SP1/Matriptase für 20 h in serumreduziertem Medium (0,1% FKS). Nach Lyse der HUVEC wurde die Promotoraktivität anhand der Lumineszenz des Luciferasesubstrates ermittelt. Dargestellt ist die relative Lumineszenz als Mittelwert \pm SEM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ktr) aus drei Versuchen. *: $p < 0,001$

3.5.3 Die NF- κ B-Aktivierung ist abhängig von p38 und p42/44

MT-SP1/Matriptase aktivierte erst p38 und weiter stromabwärts p42/44. Es stellte sich daher die Frage, ob die MT-SP1/Matriptase-induzierte Aktivierung der Promotoraktivität von NF- κ B Abhängigkeit von MAPK aufwies. Zur Untersuchung der Beteiligung von MAPK an der verstärkten NF- κ B-Aktivierung wurden oben genannte pharmakologische Inhibitoren von p38 und p42/44 eingesetzt. Des Weiteren wurde der NF- κ B-Aktivierungsinhibitor 6-Amino-4-(4-Phenoxyphenylethylamino)-Quinazolin auf seine Aktivität hin getestet. In den Versuchen zeigte sich eine Reduktion der MT-SP1/Matriptase-induzierten NF- κ B-Aktivierung nach Hemmung von p38 sowie nach Hemmung von p42/44 (Abb. 29). Die Aktivierung von NF- κ B durch MT-SP1/Matriptase ist daher abhängig von einer stromaufwärts gelegenen Aktivierung von p38 und p42/44. Ob dieser Signalweg in Zusammenhang mit der erhöhten IL-8-Expression

steht, war die zu beantwortende Frage der folgenden Versuche. In diesem Versuch wurde zudem die Wirksamkeit des später verwendeten NF- κ B-Aktivierungsinhibitors nachgewiesen (Abb. 29).

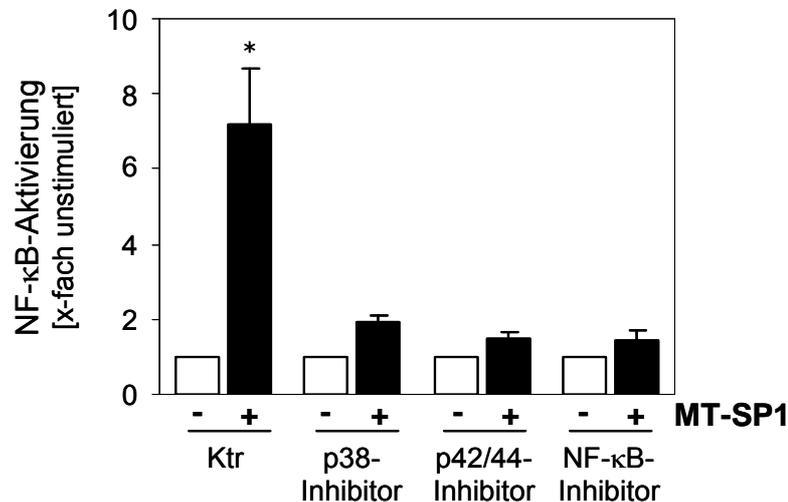


Abb. 29. Die MT-SP1/Matriptase-induzierte NF- κ B-Aktivierung ist abhängig von p38 und p42/44

Nach Transfektion von HUVEC mit pNF- κ B-Luc erfolgte die Vorinkubation mit p38-Inhibitor SB 220025 (20 μ M), p42/44-Inhibitor PD 98059 (20 μ M) bzw. einem Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung (6-Amino-4-(4-Phenoxyphenylethylamino)-Quinazolin, 1 μ M) für 1 h in serumreduziertem Medium (0,1% FKS), gefolgt von der Stimulation mit 20 nM MT-SP1/Matriptase für 20 h in serumreduziertem Medium (0,1% FKS). Die Transkriptionsfaktoraktivität wurde anhand der Luciferaseaktivität luminometrisch ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus drei Versuchen. *: $p < 0,05$ versus unstimuliert

3.5.4 Die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-Expression erfordert p38, aber nicht p42/44 und NF- κ B

Spielt die aufeinander folgende Aktivierung der MAPK p38 und p42/44 durch MT-SP1/Matriptase und die davon abhängige erhöhte NF- κ B-Aktivität eine Rolle bei der proinflammatorischen Wirkung von MT-SP1/Matriptase? Zur Klärung dieser Frage wurden Versuche mit pharmakologischen Inhibitoren von p38 und p42/44 und dem NF- κ B-Aktivierungsinhibitor 6-Amino-4-(4-Phenoxyphenylethylamino)-Quinazolin in HUVEC durchgeführt. In diesen Versuchen zeigte sich die Hemmung der IL-8-Induktion durch MT-SP1/Matriptase durch den p38-Inhibitor, nicht aber durch den p42/44-Inhibitor (Abb. 30). Da SB 220025 im aktiven Zentrum von p38 bindet und dort seine inhibitorische Wirkung ausübt, ist die stimulierende Wirkung von MT-

SP1/Matriptase auf die IL-8-Genexpression abhängig von der enzymatischen Aktivität der MAP-Kinase p38. Die p42/44-Aktivierung hingegen blieb ohne Einfluss auf die IL-8-Induktion durch MT-SP1/Matriptase. Weiterhin zeigte sich, dass IL-8 unabhängig von der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B als Antwort auf MT-SP1/Matriptase exprimiert wird (Abb. 30). MT-SP1/Matriptase aktiviert daher p38, p42/44 und NF- κ B aufeinander folgend, wobei lediglich p38 bei der IL-8-Induktion eine Rolle spielt.

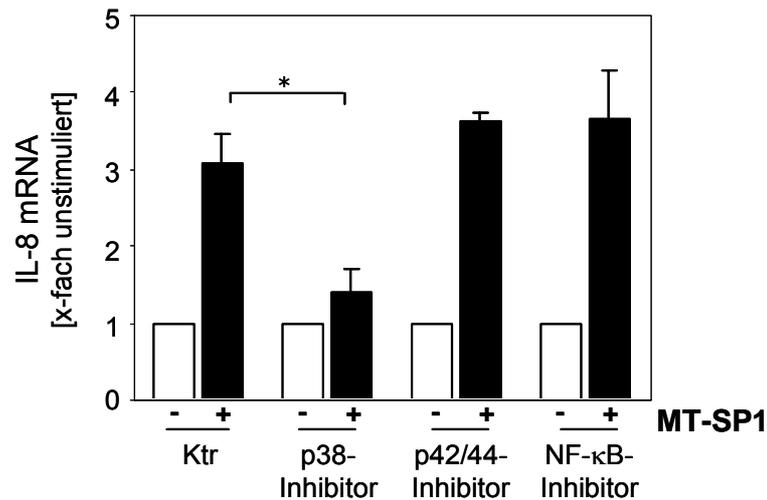


Abb. 30. Die IL-8-Induktion durch MT-SP1/Matriptase ist abhängig von p38, aber nicht von p42/44 und NF- κ B

Vor der Stimulation von HUVEC mit 20 nM MT-SP1/Matriptase für 2 h wurden die Zellen 2 h serumfrei gehalten und dann für 1 h mit den pharmakologischen Inhibitoren von p38 (SB 220025, 20 μ M), p42/44 (PD 98059, 20 μ M) oder einem Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung (6-Amino-4-(4-Phenoxyphenylethylamino)-Quinazolin, 1 μ M) vorinkubiert. Die Analyse der IL-8-mRNA-Niveaus erfolgte mittels qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM als x-facher Anstieg im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle von vier unabhängigen Versuchen. Ktr: Mediumkontrolle, *: $p < 0,05$

In den vorangehenden Versuchen wurde gezeigt, dass MT-SP1/Matriptase die *de novo*-Synthese von IL-8 anregt. Die Transkriptionssteigerung wird daher nicht, oder nicht nur, über die Aktivierung von NF- κ B reguliert. Die IL-8-Promotorregion verfügt zudem über Bindungsstellen für AP-1 und C/EBP, so dass vermutet werden kann, dass bei der IL-8-Transkription durch MT-SP1/Matriptase weitere Transkriptionsfaktoren beteiligt sind.

3.5.5 *PKC α -abhängige IL-8-Induktion ohne Beteiligung von p38, p42/44 oder NF- κ B*

Kürzlich wurde die Aktivierung von PKC α nach PAR-2-Aktivierung beschrieben. Aufgrund dieser Daten wurde eine mögliche Beteiligung dieser PKC-Isoform bei MT-SP1/Matriptase-induzierten Signalwegen untersucht. Zu diesem Zweck wurden die MT-SP1/Matriptase-induzierte p38- und p42/44-Aktivierung, die NF- κ B-Aktivierung und die IL-8-Hochregulierung auf eine PKC α -Abhängigkeit hin analysiert. In diesen Experimenten wurde der PKC α -Inhibitor Safingol verwendet. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich eine PKC α -abhängige Erhöhung der IL-8-mRNA-Expression nach MT-SP1/Matriptase-Stimulation (Abb. 31 A), wobei die MT-SP1/Matriptase-induzierte p38-, p42/44- und NF- κ B-Aktivität unabhängig von PKC α war (Abb. 31 B, C und D). Der PKC α -Inhibitor Safingol selbst aktivierte dabei p38 und p42/44 in geringem Maße, ohne den Effekt durch MT-SP1/Matriptase zu beeinflussen (Abb. 31 C und D). In diesen Versuchen wurde damit ein zweiter, von p38 offenbar unabhängiger Signalweg zur MT-SP1/Matriptase-induzierten IL-8-Hochregulierung identifiziert.

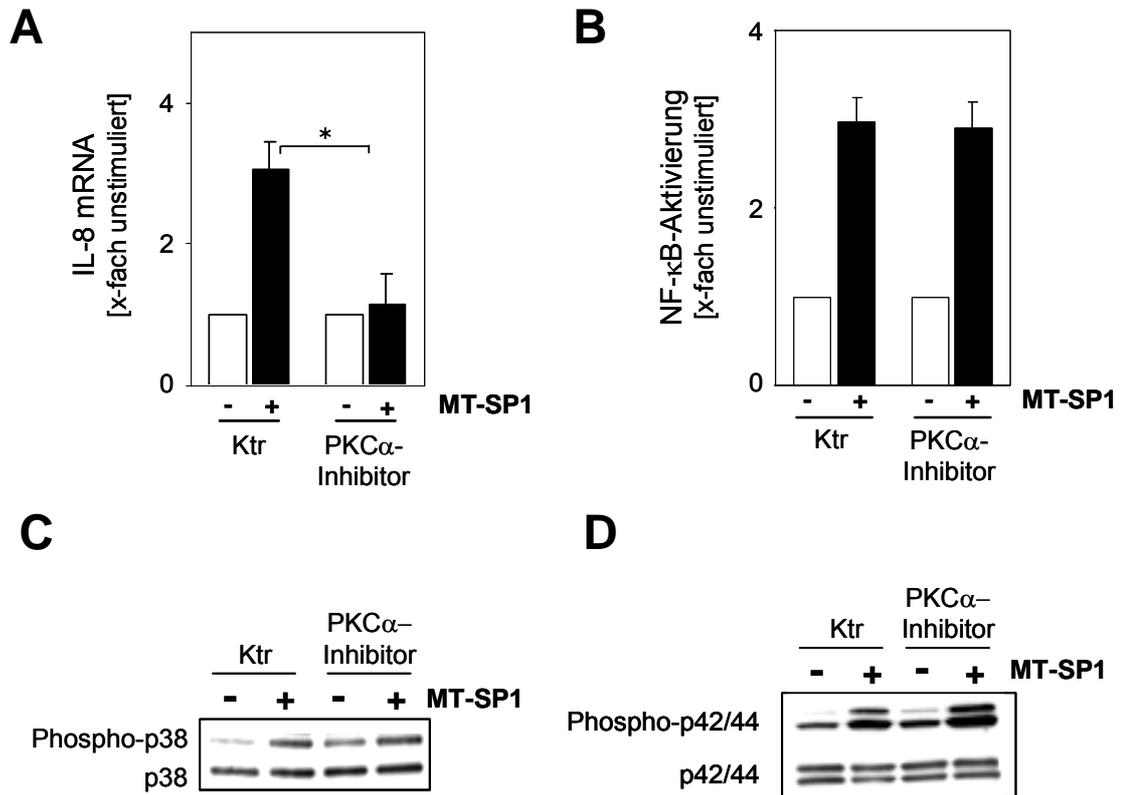


Abb. 31. Die IL-8-Induktion durch MT-SP1/Matriptase ist PKC α -abhängig ohne Beteiligung von NF- κ B, p38 oder p42/44

A. IL-8-mRNA-Expression: HUVEC wurden 2 h serumfrei gehalten und danach 1 h mit dem pharmakologischen PKC α -Inhibitor (Safingol, 20 μ M) behandelt. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit 20 nM MT-SP1/Matriptase für 2 h. Die Analyse der IL-8-mRNA-Niveaus erfolgte mittels qRT-PCR. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM als x-facher Anstieg im Vergleich zu unstimulierten Zellen aus vier Versuchen. Ktr: Mediumkontrolle, *: $p < 0,05$ **B.** NF- κ B-Aktivierung: Nach Transfektion von HUVEC mit pNF- κ B-Luc und einstündiger Vorinkubation mit dem PKC α -Inhibitor (Safingol, 20 μ M) wurden die Zellen 20 h mit 20 nM MT-SP1/Matriptase in serumreduziertem Medium (0,1% FKS) behandelt. Nach Lyse der Zellen wurde die Induktion des Luciferase-Reportergens durch Substratzugabe ermittelt. Dargestellt ist die relative Lumineszenz als Mittelwert \pm SEM als x-facher Anstieg im Vergleich zu unstimulierten HUVEC aus drei Versuchen. Ktr: Mediumkontrolle, *: $p < 0,05$ **C.** und **D.** Western Blot-Analyse der Phosphorylierung von p38 (**C**) und p42/44 (**D**): HUVEC wurden 2 h serumfrei gehalten, 1 h mit PKC α -Inhibitor (Safingol, 20 μ M) versetzt und anschließend mit 20 nM MT-SP1/Matriptase für 5 min stimuliert. Der Nachweis der MAPK erfolgte mit den AK gegen phosphoryliertes (Phospho-)p38 (Verdünnung 1:1000) (**C**) bzw. Phospho-p42/44 (Verdünnung 1:2000) (**D**). Als Ladungskontrolle wurden AK gegen Gesamt-p38 (**C**, Verdünnung 1:1000) und Gesamt-p42/44 (**D**, Verdünnung 1:1000) eingesetzt.

Die in Kapitel 3.5 beschriebenen Ergebnisse deuten daher auf unterschiedliche intrazelluläre Signalwege zur MT-SP1/Matriptase-induzierten IL-8-Expression in Endothelzellen hin: Zum einen aktiviert MT-SP1/Matriptase die MAPK p38, deren Aktivität essenziell für die IL-8-mRNA-Expression ist. Zum anderen scheint ein separater, PKC α -abhängiger Signalweg an der IL-8-Induktion beteiligt zu sein. Zusätzlich wurde nach Stimulation mit MT-SP1/Matriptase eine Aktivierung der MAPK p42/44 sowie eine verstärkte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B beobachtet, ohne dass hier ein Zusammenhang mit der IL-8-Synthese hergestellt werden konnte.

3.6 Rolle von Tissue Factor bei der MT-SP1/Matriptase-induzierten IL-8-Expression

3.6.1 *Tissue Factor beeinflusst nicht die PAR-2-vermittelte IL-8-Expression*

Neueste Daten lassen vermuten, dass PAR-2-vermittelte Signalwege durch die zytoplasmatische Domäne von Tissue Factor (TFzyt) reguliert werden können. Beschrieben wurde eine negative Regulation der PAR-2-vermittelten Angiogenese durch TFzyt, die möglicherweise durch Phosphorylierung der TFzyt an Ser253 und Ser258 aufgehoben wird. Die Phosphorylierung der TFzyt kann dabei durch PAR-2-Aktivierung induziert werden und wird durch eine Palmitoylierung an Cys245 gehemmt (siehe Schema in Abb. 5).

Ausgehend von dieser Hypothese wurde der Effekt der zytoplasmatischen Domäne von TF auf die PAR-2-vermittelte IL-8-Transkription in HUVEC untersucht. PAR-2 wurde dabei durch MT-SP1/Matriptase aktiviert. TF-Wildtyp (Aminosäuren 1-263) und TF mit deletierter zytoplasmatischer Domäne (TF Δ zyt, Aminosäuren 1-243) wurden zu diesem Zweck in einen pEYFP-C1-Vektor kloniert, um die Transfektionseffizienz in den anschließenden Versuchen fluoreszenzmikroskopisch oder durchflusszytometrisch überprüfen zu können (pEYFP-C1 wird bezeichnet als **YFP**, pEYFP-TF Wildtyp als **YFP-TF** und pEYFP-TF Δ zyt als **YFP-TF Δ zyt**). Durch die Fusion des extrazellulären N-Terminus von TF mit YFP sollte keine Beeinträchtigung der intrazellulären Signaltransduktion der TFzyt eintreten.

Zur Untersuchung einer möglichen negativen Regulation der PAR-2-vermittelten IL-8-Induktion durch TFzyt wurden HUVEC 24 h nach Transfektion der Konstrukte YFP, YFP-TF und YFP-TF Δ zyt mit MT-SP1/Matriptase behandelt. Mittels qRT-PCR wurden

die IL-8-mRNA-Mengen analysiert. Die durchflusszytometrisch ermittelte Transfektionseffizienz in diesen Versuchen belief sich auf $28 (\pm 4)\%$ (siehe Abb. 34 B).

Die Transfektion von TF blieb dabei ohne Wirkung auf die IL-8-Induktion durch MT-SP1/Matriptase (Abb. 32), wobei die IL-8-Induktion geringer ausfiel als in untransfizierten Zellen (vergleiche Abb. 16). Dies war vermutlich auf zytotoxische Effekte durch die Transfektion zurückzuführen und wurde bereits in vorangehenden Transfektionsversuchen beobachtet (vergleiche Abb. 24 A).

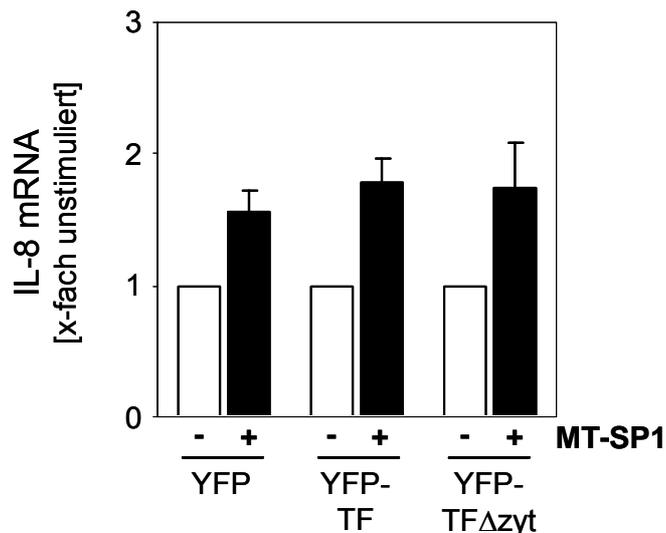


Abb. 32. TF reguliert nicht die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-Transkription

HUVEC wurden mit YFP, YFP-TF und YFP-TF Δ zyt transfiziert, 24 h nach Transfektion für 3 h serumdepriviert und anschließend 2 h mit 20 nM MT-SP1/Matriptase behandelt. Die IL-8-mRNA-Niveaus wurden mittels qRT-PCR festgestellt. Die Abbildung stellt die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Versuchen dar.

Eine mögliche Erklärung für den Mangel an Regulation wäre, dass durch die exogene Expression von TF keine Kolo-kalisation mit PAR-2 gewährleistet ist und somit keine intrazelluläre Interaktion zwischen beiden Transmembranproteinen stattfinden kann. Unter Umständen verhindert die Fusion von YFP an den N-Terminus von TF die Lokalisation von TF in räumlicher Nähe zu PAR-2, welche zum Beispiel in Okulargewebe beobachtet wurde. In einem anderen Erklärungsversuch könnte dieses Ergebnis die Hypothese unterstützen, dass durch PAR-2-Aktivierung die Phosphorylierung der TFzyt induziert wird, was deren negative Regulation der PAR-2-vermittelten Signalwege aufhebt. Durch Deletion der TFzyt würde dann ebenso die negative Regulation der PAR-2-vermittelten Signalwege verhindert, so dass beide Tissue Factor-Proteine die MT-SP1/Matriptase-induzierte, PAR-2-vermittelte IL-8-Hochregulierung nicht beeinträchtigen. Da die beobachtete IL-8-Induktion bedingt

durch die Transfektion relativ gering war, wurde dieser Ansatz jedoch nicht weiter verfolgt.

3.6.2 Tissue Factor induziert IL-8 in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne

In den unter 3.6.1 beschriebenen Versuchen fiel jedoch auf, dass die exogene Expression von YFP-TF die IL-8-Transkriptmenge 7,61 ($\pm 1,84$)-fach im Vergleich zu YFP erhöhte, wohingegen YFP-TF Δ zyt IL-8 nur 3,04 ($\pm 0,58$)-fach induzierte und damit eine um über 50% schwächere proinflammatorische Wirkung als Wildtyp-TF aufwies (Abb. 33). Um die diesen Effekt verursachenden Aminosäuren in der zytoplasmatischen Domäne von TF zu charakterisieren, wurden die für eine Phosphorylierung relevanten Serinreste Ser253 und Ser258 punktgerichtet mutiert. Zudem sollte die Palmitoylierung an Cys245 durch Mutation verhindert werden, um eine potenzielle negative Regulation der Ser258-Phosphorylierung zu supprimieren. Zu diesem Zweck wurden die Punktmutanten YFP-TF Ser253Ala, YFP-TF Ser258Ala, die Doppelmutante YFP-TF Ser253Ala/Ser258Ala, sowie YFP-TF Cys245Ser generiert. Wie in Abbildung 33 dargestellt, induzierten YFP-TF Ser253Ala/Ser258Ala, YFP-TF Ser253Ala und YFP-TF Ser258Ala IL-8 ähnlich der Mutante YFP-TF Δ zyt, d.h. nur zu ca. 50% verglichen mit YFP-TF (Wildtyp). Die Mutation von nur einem Serinrest induzierte dabei IL-8 etwas stärker als die Doppelmutante. Daher scheint die Phosphorylierung beider Serinreste (Ser253 und Ser258) essenziell für die IL-8-Induktion zu sein. YFP-TF Cys245Ser hingegen induzierte IL-8 ähnlich der Wildtypform von TF. Die Palmitoylierung an Cys245 spielt daher entweder keine Rolle bei der IL-8-Induktion oder TF-WT wird posttranslational nicht palmitoyliert, da kein inhibitorischer Effekt durch die Cys245-Mutation aufgehoben wurde.

Die Expression von TF induzierte daher IL-8 unabhängig von der Bindung seines Liganden Gerinnungsfaktor VIIa, wobei die volle Induktion abhängig von den beiden Serinresten der zytoplasmatischen Domäne von TF, Ser253 und Ser258, war. Der palmitoylierbare Cysteinrest (Cys245) der zytoplasmatischen Domäne von TF spielte bei der IL-8-Induktion keine Rolle.

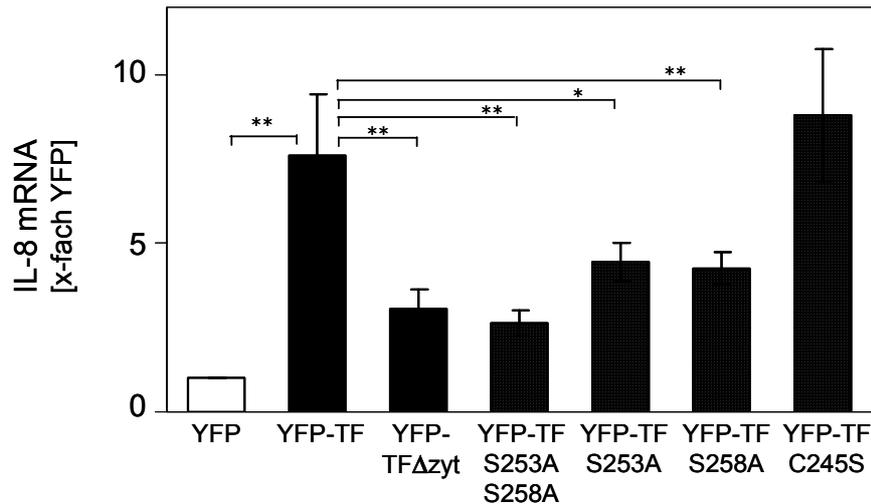


Abb. 33. Exogene Expression von TF induziert IL-8 in HUVEC in Abhängigkeit von Ser253 und Ser258 der zytoplasmatischen Domäne

HUVEC wurden mit den angegebenen TF-Konstrukten transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen 3 h serumfrei gehalten und danach die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und einer qRT-PCR unterworfen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 5-6 unabhängigen Versuchen. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,005$. Die IL-8-mRNA ist dargestellt als x-fach im Vergleich zur Leervektorkontrolle (YFP). Die Aminosäuren sind hier aus Platzgründen im Einbuchstabencode dargestellt.

Die Funktionalität bzw. Aktivität der verschiedenen TF-Mutanten wurde nach Transfektion mit Hilfe eines chromogenen Tests anhand der FXa-Bildung nach Zugabe von FVIIa und FX verifiziert. Die Transfektion der Konstrukte in HUVEC führte zu einer deutlichen FXa-Bildung im Vergleich zur Transfektion mit dem Leervektor YFP (Abb. 34 A). Da Unterschiede in den TF-Aktivitäten erkennbar waren, wurde zudem die Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie untersucht. Bei Messung der YFP-Fluoreszenz zeigte sich, dass alle Konstrukte mit einer vergleichbaren Effizienz transfiziert waren, wobei sich eine durchschnittliche Transfektionseffizienz von 28 (\pm 4)% ergab (Abb. 34 B). Die beobachtete erhöhte TF-Aktivität von YFP-TF Δ zyt war daher nicht auf eine höhere Transfektionseffizienz zurückzuführen. Die Ursache der leicht gesteigerten TF-Aktivität durch die Deletion der TFzyt ist unbekannt. Da jedoch die Funktion der TFzyt auf die intrazelluläre Signaltransduktion von PAR-2 untersucht werden sollte, wurden die Differenzen in der Aktivität der extrazellulären Domäne von TF vernachlässigt.

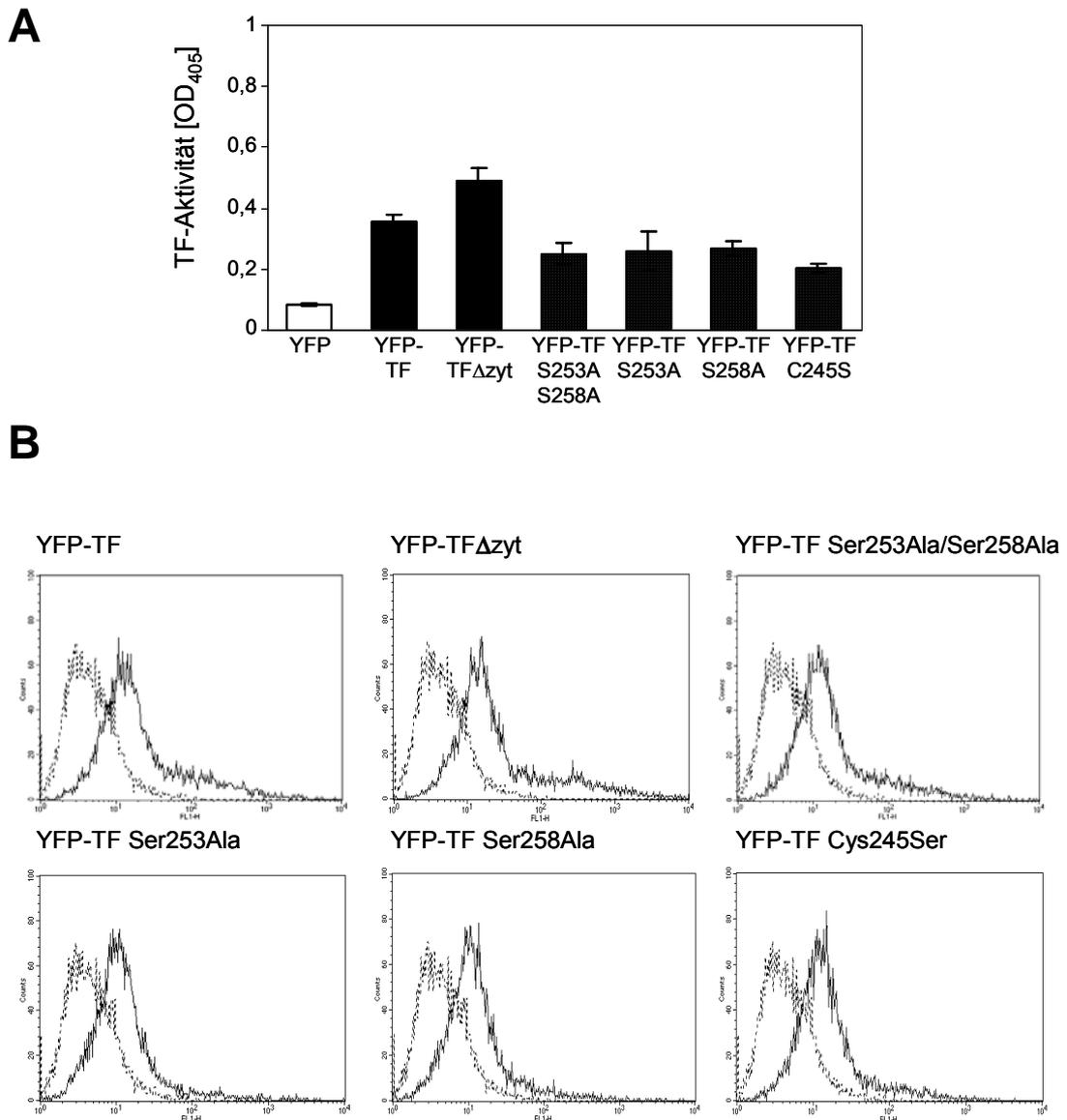


Abb. 34. TF-Aktivität und YFP-Fluoreszenz der transfizierten YFP-TF-Konstrukte

A. TF-Aktivität, gemessen an der FXa-Bildung 24 h nach Transfektion von HUVEC mit den YFP-TF-Konstrukten nach Zugabe von 10 nM FVIIa und 200 nM FX für 30 min bei 37°C. Die Menge an gebildetem FXa in 50 μ l Zellüberstand wurde nach Zugabe von 50 μ l chromogenem FXa-Substrat nach 60 min bei RT bei 405 nm quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von vier Versuchen. **B.** Transfektionseffizienz der YFP-TF-Konstrukte. 24 h nach Transfektion wurden HUVEC abgelöst und im Durchflusszytometer auf ihre YFP-Fluoreszenz hin analysiert. Die Abszisse zeigt die YFP-Fluoreszenzintensität an, die Ordinate die gemessenen Ereignisse (Zellen), die gestrichelte Linie zeigt die Autofluoreszenz. Gezeigt ist ein Experiment von vier unabhängigen Versuchen.

3.7 MT-SP1/Matriptase reguliert Tissue Factor

Ausgehend von der Erkenntnis, dass TF IL-8 in HUVEC induziert, wurde die Regulation der TF-Expression durch MT-SP1/Matriptase als Teil einer möglichen positiven Rückkopplungsschleife untersucht.

Die TF-Expression wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie festgestellt und auf RNA-Ebene durch qRT-PCR überprüft. Dabei zeigte sich, dass MT-SP1/Matriptase die TF-Oberflächenexpression in HUVEC hochregulierte (Abb. 35 A), was auf mRNA-Niveau bestätigt werden konnte (Abb. 35 B). Versuche, in denen die Transkriptionsaktivität durch Actinomycin D unterbunden wurde, zeigten eine Hemmung der TF-Induktion nach MT-SP1/Matriptase-Stimulierung der Zellen. Dies machte deutlich, dass der verstärkten TF-Expression eine Neusynthese des Rezeptors zugrunde lag (Abb. 35 B).

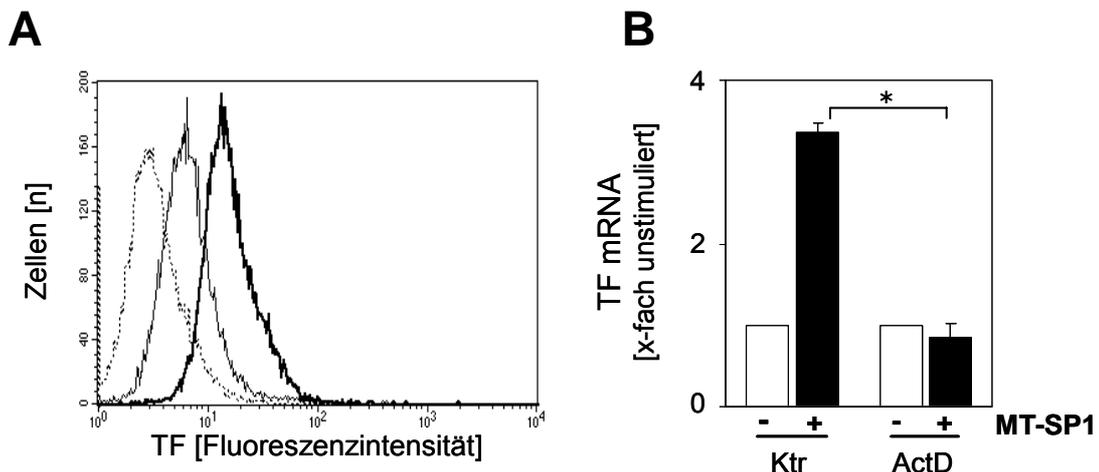


Abb. 35. MT-SP1/Matriptase induziert die Genexpression von Tissue Factor

A. Durchflusszytometrische Messung der Tissue Factor (TF)-Oberflächenexpression. HUVEC wurden 3 h serumfrei gehalten und danach 16 h mit 20 nM MT-SP1/Matriptase in serumreduziertem Medium (0,1% FKS) inkubiert. Der TF-Nachweis erfolgte mit monoklonalem Anti-TF-FITC (VD8, 10 µg/ml). Die fette Linie zeigt die TF-Expression der MT-SP1/Matriptase-stimulierten HUVEC an, die dünne Linie die TF-Expression der unstimulierten Kontrollzellen und die gestrichelte Linie zeigt die Autofluoreszenz der Zellen, die vergleichbar zur Isotypkontrolle Maus γ 1-FITC war. Die Abbildung zeigt einen von vier unabhängigen Versuchen. **B.** qRT-PCR von TF-Gesamt-RNA in HUVEC nach dreistündiger Serumdeprivation, die in einem Teil der Zellen 1 h Vorinkubation mit Actinomycin D (Act D, 5 µg/ml) enthielt, und anschließender Stimulation mit 20 nM MT-SP1/Matriptase für 2 h. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Versuchen. *: $p < 0,05$

Damit wird deutlich, dass die Serinprotease MT-SP1/Matriptase nicht nur die wichtigsten proinflammatorischen Zytokine des atherosklerotischen Prozesses,

sondern auch den prothrombotischen Mediator TF in Endothelzellen hochreguliert und damit zur atherosklerotischen Veränderung in der Gefäßwand beitragen könnte.

Des Weiteren induziert MT-SP1/Matriptase daher IL-8 zum einen direkt, und zum anderen indirekt über die Expressionssteigerung von TF, welcher seinerseits die IL-8-Expression erhöht.

3.8 Vaskuläres Expressionsmuster von MT-SP1/Matriptase

3.8.1 *MT-SP1/Matriptase-Expression in humanen Thrombendarterektomien*

Um zu untersuchen, ob MT-SP1/Matriptase - bislang assoziiert mit Tumorinvasion und Metastasierung - eine Bedeutung in der Atherosklerose zukommt, wurde die Expression von MT-SP1/Matriptase in Proben humaner Thrombendarterektomien (TEA) analysiert. Bei der Thrombendarterektomie handelt es sich um ein Verfahren, bei hochgradigen Gefäßverengungen der Arteria carotis oder Arteria femoralis die atherosklerotische Plaque operativ auszuschälen. Aus dem dabei gewonnenen Komplex aus Gefäßneointima, Teilen der Media und Plaquematerial wurde die Gesamt-RNA gewonnen, die nach reverser Transkription einer qPCR unterworfen wurde, um die Kopienzahlen von MT-SP1/Matriptase bestimmen zu können. Als Kontrollen wurden gesunde Gefäßstücke aus der Arteria pudenda externa (äußere Schamarterie) verwendet.

Die aus den atherosklerotischen und gesunden Gefäßen isolierte Gesamt-RNA wurde zusätzlich auf deren PAR-2-Expression hin untersucht, da PAR-2 aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse eine Rolle als Vermittler der MT-SP1/Matriptase-Wirkung im Endothel spielt.

Wie im Methodenteil beschrieben, wurden zur exakten Bestimmung der in den Gewebeproben vorhandenen Kopienzahlen im Vorfeld PCR-Fragmente generiert, die eine Region umfassten, in der die qPCR-Sonde an die Ziel-cDNA hybridisierte. Nach Aufreinigung der Fragmente wurden diese mittels Agarosegelelektrophorese durch Vergleich mit einem bekannten DNA-Standard quantifiziert. Anhand der Molmasse wurde die Molekülkonzentration des PCR-Produktes berechnet, so dass definierte Molekülzahlen in die qPCR eingesetzt und eine Standardkurve erstellt werden konnte (siehe Abb. 12).

Die Auswertung der ermittelten MT-SP1/Matriptase-Kopienzahlen in den

untersuchten atherosklerotischen Gewebestücken ergab eine signifikant erhöhte Menge an MT-SP1/Matriptase-mRNA in den atherosklerotischen Gefäßen im Vergleich zu gesundem Gefäß (Abb. 36 A). Die hohe Variabilität der MT-SP1/Matriptase-Transkriptmengen in den atherosklerotischen Proben ist vermutlich auf die unterschiedliche Zusammensetzung der gewonnenen Gewebestücke zurückzuführen, die im prozentualen Anteil des Plaquematerials differierten. Ungeachtet dessen weist die aberrante MT-SP1/Matriptase-Expression im erkrankten Gefäß auf eine Bedeutung von MT-SP1/Matriptase in der Atherosklerose hin. Ebenso wurde eine erhöhte mRNA-Expression von PAR-2 in den erkrankten Gefäßen nachgewiesen, was in Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Daten von Napoli und Kollegen steht (Abb. 36 B).

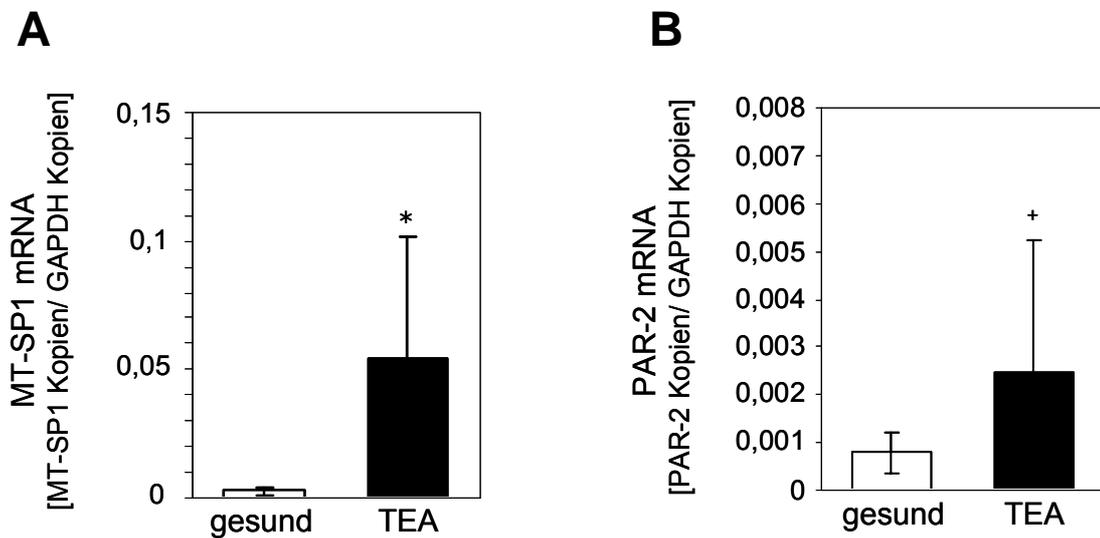


Abb. 36. Erhöhte MT-SP1/Matriptase- und PAR-2-mRNA im atherosklerotischen im Vergleich zu gesundem Gefäß

Nach RNA-Isolierung aus Atherektomiegeweben wurde eine qRT-PCR zur Detektion der jeweiligen Kopienzahlen durchgeführt. Die absolute Quantifizierung erfolgte unter Zuhilfenahme einer Standardkurve aus PCR-Fragmenten. Normalisiert wurden die Werte auf die GAPDH-Kopien, die sich in der untersuchten Probe befanden. Die Darstellung zeigt die Mittelwerte \pm SEM des Verhältnisses aus **A**. MT-SP1/Matriptase-Kopien und GAPDH-Kopien und des Verhältnisses aus **B**. PAR-2-Kopien und GAPDH-Kopien. n (gesund) = 10, n (TEA) = 18. *: $p < 0,01$, +: $p < 0,1$

Zur Untersuchung der MT-SP1/Matriptase-Expression auf Proteinebene wurden immunhistochemische Färbungen von MT-SP1/Matriptase mit der anderen Hälfte der Thrombendarterektomien und mit gesundem Gefäß als Kontrolle durchgeführt, die als Gefrierschnitte präpariert waren. Der verwendete monoklonale Antikörper M32 erkennt dabei sowohl die einzelkettige Vorläuferform von MT-SP1/Matriptase als auch das

aktivierte Enzym. Die Zellkerne wurden mit Mayers Hämalaun sichtbar gemacht. Wie in Abbildung 37 erkennbar, zeigten die erkrankten Gefäße MT-SP1/Matriptase-Expression an der endothelialen Innenwand sowie eine diffuse Färbung der subendothelialen Schicht (Abb. 37 A, D). Interessanterweise wiesen an das Endothel adhärenzte Blutzellen ebenfalls deutliche MT-SP1/Matriptase-Expression auf (Abb. 37 E und F, Pfeile). Aufgrund deren Nukleusmorphologie wurde vermutet, dass es sich in diesen Fällen um Monozyten handeln könnte. Im gesunden Gefäß zeigte sich MT-SP1/Matriptase-Expression in der adventitialen Schicht sowie schwach exprimiert in den medialen glatten Muskelzellen und in der Gefäßinnenwand (Abb. 37 B). Die Färbung mit der Isotypkontrolle Maus IgG wurde als Negativkontrolle verwendet und erzeugte keine chromogenen Signale (Abb. 37 C).

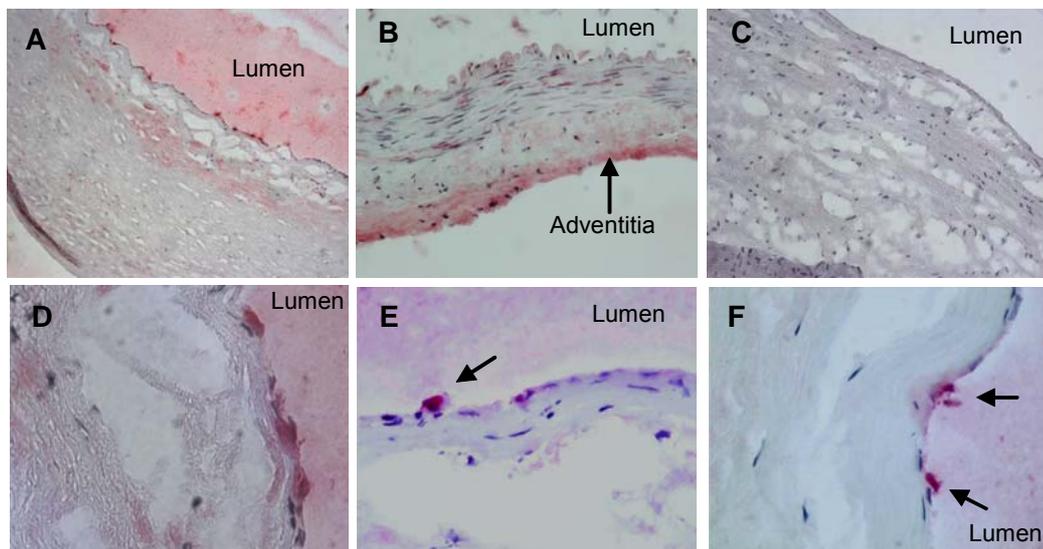


Abb. 37. Immunhistochemische Färbung von MT-SP1/Matriptase in Atherektomiegewebe und gesundem Kontrollgefäß

A.-F. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Gefrierschnitten nach Färbung mit monoklonalem Anti-MT-SP1/Matriptase M32 (10 µg/ml) (**A, B, D-F**) bzw. mit der Isotypkontrolle Maus IgG (**C**), gefolgt von einer ABC-alkalischen Phosphatase-Färbung. Die Kernfärbung wurde mit Hämalaun erzielt. Die Aufnahme der Abbildungen erfolgte an einem inversen Mikroskop. Die Lumenseite der Gefäße ist jeweils bezeichnet. **A.** Atherektomie. Aufnahme mit einem 10x Objektiv. **B.** Gesundes Gefäß. Aufnahme mit einem 20x Objektiv. Die Adventitia ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. **C.** Isotypkontrolle. Aufnahme mit einem 20x Objektiv. **D.-F.** Atherektomien. Aufnahmen mit einem 40x Objektiv. Die Pfeile weisen auf Blutzellen hin, die an das Endothel adhärenzte sind.

Die Untersuchung der MT-SP1/Matriptase-Expression in Gefäßproben humaner Thrombendarterektomien zeigte also eine erhöhte MT-SP1/Matriptase-mRNA-

Expression in atherosklerotischen im Vergleich zu gesunden Gefäßen, wobei sich MT-SP1/Matriptase in den erkrankten Gefäßen hauptsächlich in der atherosklerotischen Endothelwand präsentierte und zudem von mit dem Endothel interagierenden Blutzellen exprimiert wurde.

3.8.2 Basale MT-SP1/Matriptase-Expression in vaskulären Zellen

Die Analyse der atherosklerotischen Gefäßproben ließ vermuten, dass MT-SP1/Matriptase in mit dem Endothel in Kontakt tretenden Blutzellen exprimiert wird. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob MT-SP1/Matriptase in kultivierten Endothel- und glatten Muskelzellen exprimiert wird, da gesunde Gefäßproben basale MT-SP1/Matriptase-Expression aufwiesen (siehe Abb. 36 A und 37 B), wenngleich die Expression deutlich geringer als im erkrankten Gefäß war. Aus diesen Gründen wurde die Basalexpression von MT-SP1/Matriptase in Endothelzellen (aus der Nabelschnurvene/HUVEC und aus der Koronararterie/HCAEC), vaskulären glatten Muskelzellen und mononukleären Zellen untersucht. Nach RNA-Isolierung aus den verschiedenen Zelltypen wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt und die MT-SP1/Matriptase-Kopienzahl anhand einer Standardkurve bestimmt (siehe Abb. 12). Dabei wurde deutlich, dass weder Endothelzellen (HUVEC oder HCAEC) noch glatte Muskelzellen (SMC) detektierbare Mengen an MT-SP1/Matriptase-mRNA aufwiesen, wohingegen mononukleäre Zellen (Monozyten/Lymphozyten, MNC) MT-SP1/Matriptase in hohem Maße exprimierten (Abb. 38). Die MT-SP1/Matriptase-Expression in MNC ist dabei konsistent mit den Ergebnissen der Northern-Analysen von Takeuchi und Kollegen, die MT-SP1/Matriptase-Expression in Leukozyten nachwiesen. Die mangelnde Expression in HUVEC ähnelt RT-PCR-Daten von Aimes und Kollegen, die MT-SP1/Matriptase-Expression nur in sehr geringem Ausmaß in kultivierten HUVEC feststellten (Aimes et al., 2003).

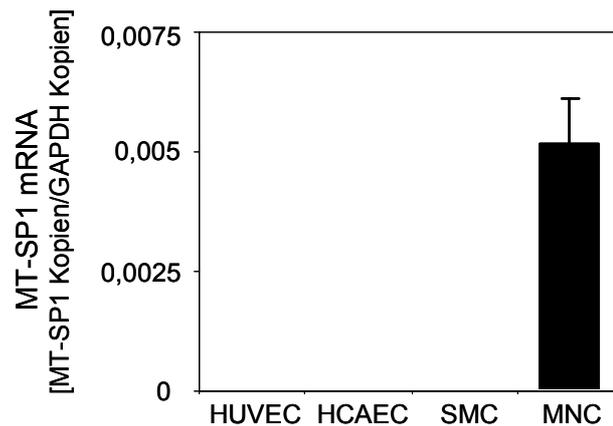


Abb. 38. Basalexpression von MT-SP1/Matriptase-mRNA in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und mononukleären Zellen

RNA wurde aus unter Standardbedingungen kultivierten Endothelzellen (HUVEC und HCAEC), glatten Muskelzellen (SMC) und Ficoll-isolierten mononukleären Zellen (MNC) isoliert und in eine qRT-PCR zur Detektion der MT-SP1/Matriptase-mRNA eingesetzt. Die absolute Quantifizierung erfolgte über eine Standardkurve aus PCR-Fragmenten bekannter Molekülzahlen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Quotienten aus MT-SP1/Matriptase-Kopien und GAPDH-Kopien aus vier bis sieben unabhängigen Versuchen.

Die Immunfluoreszenzfärbung mit dem monoklonalen Antikörper M32 in mononukleären Zellen, welcher die Zymogenform und die aktivierte Form von MT-SP1/Matriptase nachweist, zeigte die Proteinexpression von MT-SP1/Matriptase. Mononukleäre Zellen wurden dazu mittels Zytozentrifugation auf einen Objektträger aufgebracht und mit Paraformaldehyd fixiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit M32 und einem FITC-konjugierten Anti-Maus IgG. Zur Kernfärbung wurde DAPI verwendet.

Ficoll-isolierte mononukleäre Blutzellen setzen sich aus Monozyten und Lymphozyten zusammen. In diesem Versuch sollte daher nicht nur der Nachweis der MT-SP1/Matriptase-Proteinexpression in MNC erbracht werden, sondern gleichzeitig festgestellt werden, ob MT-SP1/Matriptase in Monozyten und/oder Lymphozyten exprimiert wird. Zu diesem Zweck wurde zusätzlich die selektive Färbung der Monozyten mit CD14-Phycoerythrin durchgeführt, die somit eine Diskriminierung der beiden Leukozytentypen erlaubt. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Abbildung 39 zeigt die Expression von MT-SP1/Matriptase (grün) in Monozyten (positiv für rote Fluoreszenz und blaue Kernfärbung), wohingegen Lymphozyten (blaue Kernfärbung ohne rote Fluoreszenz) keinerlei Expression aufwiesen.

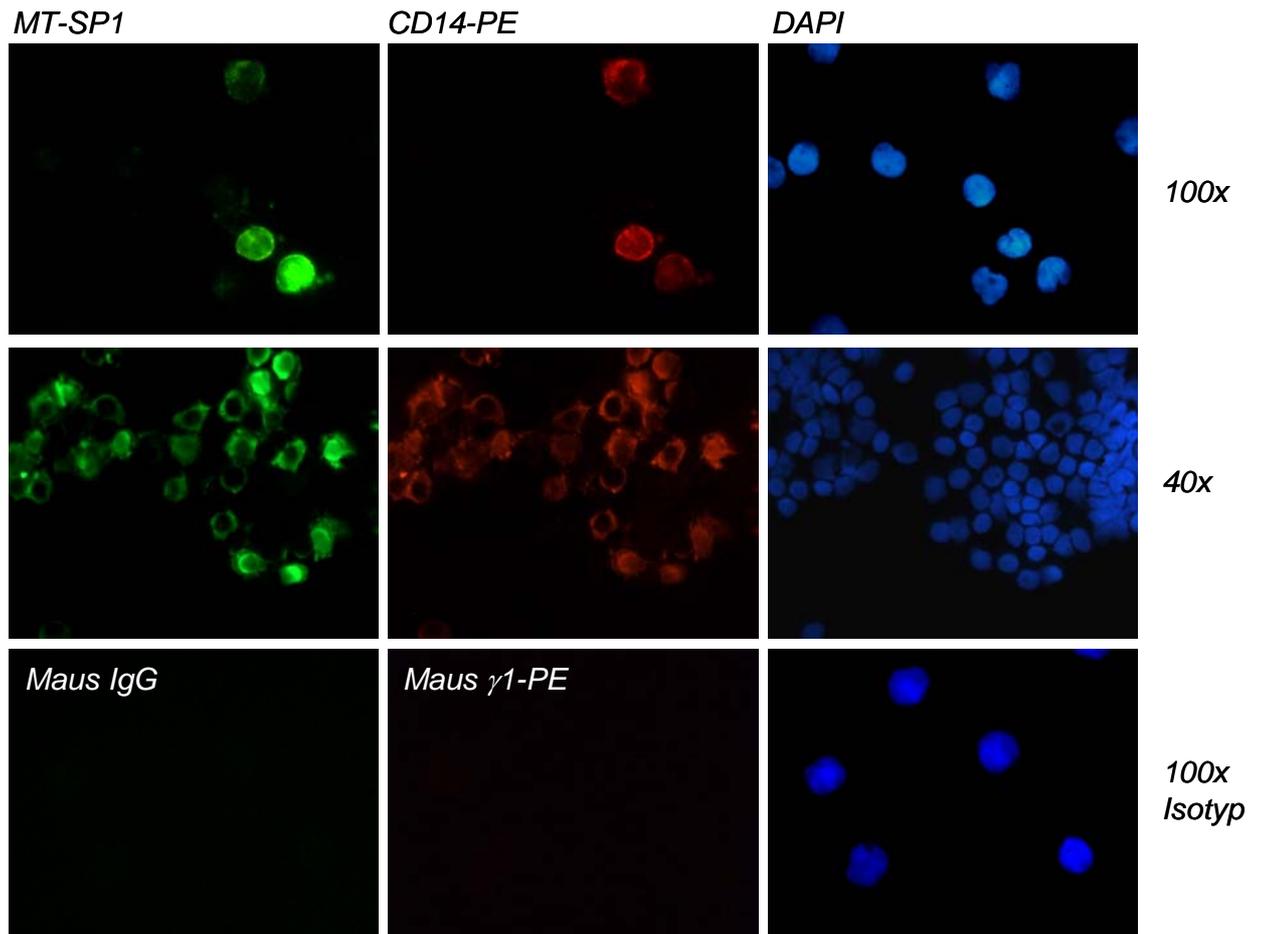


Abb. 39. Immunfluoreszenzfärbung von MT-SP1/Matriptase in humanen mononukleären Zellen

Mittels Zytozentrifugation (5 min, 100 g) wurden $3 \cdot 10^5$ Ficoll-isolierte humane mononukleäre Zellen (MNC) auf Objektträger verbracht, mit 1% Paraformaldehyd für 15 min fixiert und mit monoklonalem Anti-MT-SP1 M32 (5 $\mu\text{g/ml}$) 1 h bei RT inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde Anti-IgG-Maus-FITC (1:40) verwendet (45 min bei RT) (**MT-SP1**). Die Diskriminierung von Monozyten und Lymphozyten erfolgte anhand des monozytären Oberflächenmarkers CD14 (6 $\mu\text{g/ml}$, Phycoerythrin-markiert, 30 min bei RT) (**CD14-PE**). Kerne sind durch DAPI-Färbung (1:1000) kenntlich gemacht (**DAPI**). Negativkontrolle: Kernfärbung mit DAPI, Isotypkontrolle Maus γ 1-Phycoerythrin (**Maus γ 1-PE**), Isotypkontrolle Maus IgG (**Maus IgG**). Dargestellt ist ein Versuch von vier. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop mit einem 40x- und einem 100x-Objektiv (**40x**, **100x**).

Werden diese Ergebnisse zusammen mit den Resultaten der immunhistochemischen Färbung von MT-SP1/Matriptase in den Atherektomieproben betrachtet, so ist zu vermuten, dass es sich bei den am Endothel anhaftenden, MT-SP1/Matriptase-positiven Zellen um Monozyten handelt. MT-SP1/Matriptase wird in Monozyten exprimiert und könnte hypothetisch nach Adhärenz der Monozyten an das

dysfunktionelle Endothel mit endothelial exprimiertem PAR-2 (siehe Abb. 25 A) interagieren und zum proinflammatorischen und prothrombotischen Prozess in der Gefäßwand beitragen. Besonders nach Hochregulierung von PAR-2 durch Entzündungsmediatoren (siehe Abb. 25 A) könnte damit der entzündliche Prozess verstärkt werden.

Des Weiteren ist interessant, dass in Kultur weder Endothelzellen noch glatte Muskelzellen MT-SP1/Matriptase exprimieren, wohingegen in gesundem Gefäß, das ebendiese Zelltypen enthält, MT-SP1/Matriptase-mRNA exprimiert wird. Erklärt werden könnte dies durch die immunhistochemisch gezeigte, relativ starke Expression von MT-SP1/Matriptase in der adventitialen Gefäßaußenwand.

4 DISKUSSION

Auch wenn inzwischen Einigkeit über die kardiovaskulären Risikofaktoren herrscht, die die Entstehung der Atherosklerose begünstigen, sind die pathophysiologischen Prozesse, die schließlich im akuten Koronarsyndrom oder im Schlaganfall münden, bislang ungeklärt. Aufgrund der Beteiligung von Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Monozyten/Makrophagen und Thrombozyten sowie Lipoproteinen, Cholesterin, Wachstumsfaktoren und Zytokinen geht man von einem komplexen Geschehen aus. Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand haben jedoch alle aufgeführten Risikofaktoren ein gemeinsames Zielorgan: sie beeinträchtigen die Funktion des die innere Gefäßwand auskleidenden Endothels. Diese endotheliale Dysfunktion begünstigt als initialer, kausaler Faktor die Entstehung atherosklerotischer Läsionen und zeichnet sich unter anderem durch den Verlust der antiinflammatorischen und antikoagulatorischen Eigenschaften des Endothels aus.

Der Protease-aktivierte Rezeptor 2 (PAR-2) wird in Arterien und im Herz exprimiert und spielt eine Rolle bei Entzündungsprozessen (Hamilton et al., 2001; Hamilton et al., 1998; Hwa et al., 1996; Kawabata et al., 1998; Lindner et al., 2000; Molino et al., 1998; Napoli et al., 2000; Napoli et al., 2002; Nystedt et al., 1996; Sabri et al., 2000; Vergnolle, 1999). Der zur Superfamilie der heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehörende PAR-2 wird, ebenso wie die anderen bislang identifizierten Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR-1, PAR-3 und PAR-4), durch proteolytische Spaltung an seinem N-Terminus irreversibel aktiviert. Als aktivierende Proteasen wurden Trypsin, Mastzell-Tryptase, die Gerinnungsfaktoren Tissue Factor/FVIIa sowie FXa identifiziert. Mittels *positional scanning synthetic combinatorial library* (PS-SCL) wurde zudem die transmembrane Serinprotease MT-SP1/Matriptase als potenzieller Ligand von PAR-2 identifiziert, was in einem heterologen Expressionssystem in *Xenopus*-Oozyten anhand von Kalziumoszillationen bestätigt wurde (Takeuchi et al., 2000). MT-SP1/Matriptase weist ein ähnliches Expressionsmuster und die gleiche membranständige Lokalisation wie PAR-2 auf und stellt damit einen interessanten physiologischen Liganden für PAR-2 dar. Bislang wird MT-SP1/Matriptase ausschließlich eine Rolle bei der Tumordinvasion und Metastasierung zugeschrieben (Benaud et al., 2002a; Johnson et al., 2003; Kang et al., 2003a; Lee et al., 2005a; List et al., 2005; Oberst et al., 2001; Oberst et al., 2002; Santin et al., 2003; Suzuki et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher 1.) eine mögliche proinflammatorische und prothrombotische Wirkung der rekombinant exprimierten, katalytischen Domäne von

MT-SP1/Matriptase in primären humanen Endothelzellen sowie die an dieser Wirkung beteiligten Rezeptoren, 2.) die MT-SP1/Matriptase-induzierte Signaltransduktion und 3.) das vaskuläre Expressionsmuster von MT-SP1/Matriptase untersucht. Die Ergebnisse sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

4.1 Proinflammatorische Wirkung von MT-SP1/Matriptase in Endothelzellen

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen führte die katalytische Domäne von MT-SP1/Matriptase in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis zu einer gesteigerten Genexpression der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-8 (IL-8), IL-6 und *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1). IL-8, IL-6 und MCP-1 erfuhren dabei eine Erhöhung der mRNA-Niveaus sowie eine vermehrte Sezernierung in den extrazellulären Raum. Weiterhin wurde gezeigt, dass die erhöhten mRNA-Mengen durch eine verstärkte transkriptionelle Aktivität verursacht wurden, da die Hemmung der Transkription durch Actinomycin D die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-mRNA-Synthese inhibierte. Die basale Freisetzung von IL-8 in unstimulierten Endothelzellen bewegte sich mit 125 (\pm 33) pg/ml bis 175 (\pm 20) pg/ml in einem vergleichbaren Rahmen mit bekannten basalen endothelialen IL-8-Konzentrationen (Lukacs et al., 1995).

Diese und die nachfolgenden Versuche wurden in primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) durchgeführt. Humane Primärzellen als *in vitro*-Modell bieten im Gegensatz zu Tiermodellen und immortalisierten humanen Zelllinien die Möglichkeit, die *in vivo*-Situation sehr gut zu simulieren. Um die entzündungsverstärkende Wirkung von MT-SP1/Matriptase auch in den in der Atherosklerose wichtigen arteriellen Endothelzellen nachzuweisen, wurden humane primäre Endothelzellen aus der Koronararterie (HCAEC) zum Vergleich herangezogen, die eine ähnliche MT-SP1/Matriptase-induzierte inflammatorische Reaktion wie HUVEC zeigten.

IL-8, ein CXC-Chemokin, spielt neben IL-1, Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und IL-6 eine Hauptrolle als Vermittler der akuten Entzündungsreaktion. Zusammen mit anderen Chemokinen wie MCP-1 und *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted* (RANTES) ist IL-8 verantwortlich für die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und anderer Zelltypen, wie Monozyten, Lymphozyten, Basophilen und Eosinophilen, sowie für deren Chemotaxis an Entzündungsorte (Miller and Krangel,

1992; Stoeckle and Barker, 1990). Zudem induziert IL-8 die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) oder VCAM-1 (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1) und von β 2-Integrin auf Leukozyten, was die Adhärenz von Neutrophilen an das Endothel sowie deren Diapedese durch die Gefäßwand reguliert (Huber et al., 1991; Manna and Ramesh, 2005).

Bei IL-6 handelt es sich um ein Zytokin, das an der B- und T-Zellaktivierung und -differenzierung beteiligt ist und zusammen mit IL-1 und TNF wesentlich an der Regulation der akuten Phase-Reaktion beteiligt ist (Fattori et al., 1994; Song and Schindler, 2004).

MCP-1, ein CC-Chemokin, wird als Antwort auf inflammatorische Zytokine von Monozyten sezerniert und trägt aufgrund seiner migrationsfördernden Wirkung zur akuten Entzündungsreaktion bei.

Durch die Induktion dieser Mediatoren könnte MT-SP1/Matriptase in den Endothelzellen der Gefäßwand die akute Entzündungsreaktion verstärken. Diese Arbeit beschreibt erstmalig eine proinflammatorische Wirkung von MT-SP1/Matriptase in vaskulären Zellen. Durch die Identifizierung von PAR-2 als putativem MT-SP1/Matriptase-Substrat wurde bereits gemutmaßt, dass MT-SP1/Matriptase über diesen Rezeptor, dessen Expression im vaskulären Endothel bekannt war, zu Entzündungsreaktionen beitragen könnte (Takeuchi et al., 2000). Diese Hypothese konnte in dieser Arbeit bestätigt werden.

In den im Rahmen dieser Arbeit unternommenen Versuchen wurde die Wirkung der katalytischen Domäne von MT-SP1/Matriptase auf Endothelzellen untersucht. Das von Lin und Kollegen identifizierte lösliche, und von Takeuchi und Kollegen identifizierte membranständige MT-SP1/Matriptase-Protein weist allerdings zusätzlich zu der von uns untersuchten C-terminalen Serinproteasedomäne mehrere regulatorische Domänen auf (Lin et al., 1999b; Takeuchi et al., 1999). Dabei handelt es sich unter anderem um zwei Tandemwiederholungen einer CUB-Domäne (Komplementfaktor C1r/C1s - embryonales Seeigelprotein UEGF - Knochen-morphogenetisches Protein BMP), die auch in anderen Serinproteasen wie zum Beispiel Enterokinase vorkommen (Kitamoto et al., 1994). Es wird vermutet, dass dieses Modul eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen spielt (Bork and Beckmann, 1993; Cseh et al., 1996). Des Weiteren besitzt MT-SP1/Matriptase vier Tandemwiederholungen einer *low-density lipoprotein*-Rezeptor-Klasse A-Domäne (LDLR-Domäne), die im LDL-Rezeptor als Domäne für die Ligandenbindung fungiert und daher ebenso MT-SP1/Matriptase der Interaktion mit Makromolekülen dienen könnte (Lin et al., 1999b). Oberst und Kollegen

zeigten in diesem Zusammenhang, dass die Glykosylierung der ersten CUB-Domäne sowie die LDLR-Domänen für die Aktivierung der Vorläuferform von MT-SP1/Matriptase essenziell sind und hier zudem Hepatozyten-Wachstumsfaktor Aktivator Inhibitor-1 (HAI-1), der physiologische Inhibitor von MT-SP1/Matriptase, erforderlich ist. Außerdem ist die Aktivierung von MT-SP1/Matriptase abhängig vom eigenen aktiven Zentrum, so dass sich MT-SP1/Matriptase vermutlich selbst transaktivieren muss, wobei mindestens zwei MT-SP1/Matriptase-Zymogene und weitere Proteine wie zum Beispiel HAI-1 miteinander interagieren (Oberst et al., 2003b). Diese Hypothese wurde durch den Nachweis gestützt, dass MT-SP1/Matriptase in Brustepithelzellen zusammen mit HAI-1 in so genannte „Aktivierungsfoci“ transloziert, dort aktiviert wird und sofort im Anschluss durch HAI-1 inhibiert wird (Lee et al., 2005b). Die enge zeitliche und räumliche Kopplung von Aktivierung und Hemmung von MT-SP1/Matriptase deutet darauf hin, dass die proteolytische Aktivität des Enzyms äußerst genau kontrolliert wird.

Diese Regulierungsmöglichkeiten von MT-SP1/Matriptase wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, sind aber für die Aufklärung der *in vivo*-Situation unerlässlich und bieten einen interessanten Ausblick auf weitere mögliche Untersuchungen. Vor allem in Anbetracht des identifizierten vaskulären Expressionsmusters von MT-SP1/Matriptase stellt sich die Frage nach der Regulation der Aktivität von basal exprimierter MT-SP1/Matriptase auf Monozyten. Ebenso bedarf die vaskuläre Expression des MT-SP1/Matriptase-Inhibitors HAI-1 der Aufklärung.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurden in serumfreiem oder serumreduziertem Medium durchgeführt und entsprechen daher nicht den Begebenheiten *in vivo*. Untersucht werden sollte in dieser Arbeit die isolierte Wirkung der Serinproteasedomäne von MT-SP1/Matriptase, so dass potenzielle weitere Substrate von MT-SP1/Matriptase, wie Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) oder Urokinase Plasminogen-Aktivator (uPA), durch die Verwendung von Basalmedium ausgeschlossen wurden (Lee et al., 2000; Takeuchi et al., 2000). In Vorversuchen zeigte MT-SP1/Matriptase jedoch auch in serumhaltigem Medium einen 1,5-fachen Anstieg der IL-8-mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen (nicht gezeigt), so dass bei einer deregulierten Aktivität von MT-SP1/Matriptase, wie dies für Brustkrebszellen gezeigt wurde, trotz des Vorhandenseins weiterer Substrate die entzündungsverstärkende Wirkung von MT-SP1/Matriptase zum Tragen kommen könnte (Benaud et al., 2002a).

4.2 PAR-2 als Vermittler der proinflammatorischen MT-SP1/Matriptase-Wirkung

Mittels RNA-Interferenz wurde PAR-2 als Vermittler der MT-SP1/Matriptase-induzierten IL-8-Expression identifiziert. Im Gegensatz zur gesenkten PAR-1-Expression, die ohne Einfluss auf die IL-8-Transkription blieb, führte die Herunterregulierung von PAR-2 zu einer deutlichen Hemmung der IL-8-mRNA-Synthese in HUVEC. PAR-1 wurde in diesem Zusammenhang im Vergleich zu PAR-2 untersucht, da mehrere PAR-2-aktivierende Proteasen ebenso PAR-1 als Substrat erkennen, wie zum Beispiel Trypsin oder Gerinnungsfaktor Xa (O'Brien et al., 2001). Für Faktor Xa wurde dies von unserer Arbeitsgruppe in einer weiteren Arbeit in Endothelzellen bestätigt (Busch et al., 2005). FXa induzierte dabei IL-8 und MCP-1 ausschließlich über Aktivierung von PAR-1.

Die Wirkung von MT-SP1/Matriptase auf die IL-8-Produktion war zudem abhängig von der katalytischen Aktivität des Enzyms. Daher kann von einer proteolytischen Spaltung von PAR-2 durch MT-SP1/Matriptase ausgegangen werden. Diese Ergebnisse zeigen die Aktivierung von PAR-2 durch MT-SP1/Matriptase erstmalig in Endothelzellen, die PAR-2 endogen exprimieren, und bestätigen damit die heterologen Expressionsstudien von Takeuchi und Kollegen (Takeuchi et al., 2000).

Die Induktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-8, IL-6, MCP-1 oder IL-1 β nach Aktivierung von PAR-2 wurde bereits in verschiedenen Zelltypen wie Keratinozyten, Lungenepithelzellen, Fibroblasten, eosinophilen Granulozyten, dermalen mikrovaskulären Endothelzellen oder immortalisierten Endothelzellen beschrieben (Asokanathan et al., 2002; Hou et al., 1998; Lu et al., 2005; Shpacovitch et al., 2002; Temkin et al., 2002; Uehara et al., 2003; Wakita et al., 1997). Dabei wurde PAR-2 durch Trypsin, Mastzell-Tryptase oder agonistische Peptide (AP), die dem N-Terminus nach Aktivierung entsprechen, aktiviert. In einem HUVEC-Primärzellmodell wurde die Induktion von IL-6 nach Stimulation mit dem synthetischen PAR-2-Peptidagonisten SLIGKV gezeigt (Chi et al., 2001). Erst kürzlich wurde eine PAR-2-vermittelte Entzündungsreaktion in primären Endothelzellen aus der Koronararterie (HCAEC) durch Stimulation mit Mastzell-Tryptase und PAR-2-AP nachgewiesen, welche sich in der Aktivierung Kalzium-unabhängiger Phospholipase A2 (PLA2), in Arachidonsäurefreisetzung, der Produktion von Plättchen-aktivierendem Faktor, der erhöhten Oberflächenexpression von P-Selektin und der vermehrten Adhärenz von Neutrophilen manifestierte (Meyer et al., 2005). Auf eine PAR-2-vermittelte inflammatorische Wirkung wurde in diesen Studien allerdings ausschließlich aufgrund

der verwendeten Agonisten geschlossen. Die Herunterregulierung von PAR-2 durch RNA-Interferenz liefert im Gegensatz dazu einen direkten Nachweis der PAR-2-vermittelten Entzündungsreaktion.

Diese Arbeit bestätigt daher PAR-2 in seiner Rolle als Vermittler von Entzündungsreaktionen, auch in Primärzellen wie den hier verwendeten HUVEC. MT-SP1/Matriptase wird als bislang unbekannter Ligand für die PAR-2-medierte Inflammation in der Vaskulatur vorgestellt und mit Entzündungsvorgängen in Verbindung gebracht.

Die Überexpression von PAR-2 und PAR-1 in HUVEC machte deutlich, dass eine erhöhte Expression von PAR-2 die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-Genexpression verstärkte, wohingegen die PAR-1-Überexpression keine Steigerung der IL-8-Expression verursachte. Damit wird die Hypothese einer PAR-2-vermittelten MT-SP1/Matriptase-Wirkung untermauert. Die zusätzlich gezeigte Hochregulierung von PAR-2 durch IL-1 β zelltypspezifisch in Endothelzellen lässt darüber hinaus eine interessante Interpretation zu: In einem entzündlichen Umfeld könnte über diesen Weg die proinflammatorische Wirkung von MT-SP1/Matriptase verstärkt und die Entzündungsreaktion in Gang gehalten werden. Eine ähnliche Regulierung von PAR-2 wurde von Nystedt und Kollegen nach Behandlung von HUVEC mit IL-1 α , bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) oder TNF- α berichtet (Nystedt et al., 1996). Eine Regulation von PAR-1 in Endothelzellen wurde hingegen weder von der Gruppe um Nystedt noch in dieser Arbeit beobachtet (Nystedt et al., 1996).

Im Gegensatz zu Endothelzellen zeigten mononukleäre Zellen des peripheren Blutes keine PAR-2-Regulation durch IL-1 β und bestätigen damit Daten, die ebenfalls keine PAR-2-Regulation durch IL-1 β in alveolären Makrophagen zeigten (Roche et al., 2003). Zudem wurde in dieser Arbeit keine Regulation von PAR-2 durch IL-1 β in vaskulären glatten Muskelzellen festgestellt. Damit wird die spezifische Bedeutung von PAR-2 - im Gegensatz zu PAR-1 - in der Endothelzellaktivierung durch inflammatorische Mediatoren hervorgehoben.

IL-1 und TNF- α stellen die proinflammatorischen Zytokine dar, die die erste Entzündungsphase vermitteln und Endothelzellen zur Sekretion von Zytokinen und zur Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin anregen (Bevilacqua et al., 1987; Bevilacqua et al., 1989; Osborn et al., 1989; Pober et al., 1987; Strieter et al., 1988). Wird PAR-2 daher bereits am Beginn der Entzündungsreaktion durch IL-1 β im Endothel hochreguliert, könnte dem Rezeptor eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung des positiven Rückkopplungsprozesses

der Inflammation zukommen und eine eventuelle Entzündungswirkung von MT-SP1/Matriptase würde potenziert.

Zum vollständigen Ausschluss einer PAR-1-Aktivierung durch MT-SP1/Matriptase wurden zudem Versuche zum Aktivierungszustand von PAR-1 nach MT-SP1/Matriptase-Inkubation durchgeführt. MT-SP1/Matriptase proteolytierte PAR-1 dabei minimal, während Thrombin die Menge an intaktem PAR-1 stark reduzierte. Die Gesamtexpression von PAR-1 blieb durch MT-SP1/Matriptase unverändert, während Thrombin diese stark verminderte. Es wird also offenbar keine Internalisierung des Rezeptors durch MT-SP1/Matriptase verursacht, die der Beendigung der Signalübertragung dienen würde. Im Vergleich zu 100 nM aktiviertem Protein C (APC), das nach 30 min 50% des intakten PAR-1 reduziert und als vergleichsweise schwacher PAR-1-Aktivator eingeschätzt wird, ist die PAR-1-Proteolyse durch MT-SP1/Matriptase daher als wenig bedeutsam einzuschätzen (Ludeman et al., 2005). Zudem hatten weder die Senkung der PAR-1-Expression noch die Überexpression Auswirkungen auf die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-Produktion. MT-SP1/Matriptase scheint daher keine wesentliche Substratspezifität für PAR-1 aufzuweisen.

4.3 MT-SP1/Matriptase-induzierte Signaltransduktion

Die durch MT-SP1/Matriptase ausgelösten intrazellulären Signalwege umfassten die zeitabhängige Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) p38 und p42/44, wobei die Hemmung von p38 die Aktivierung von p42/44 verhinderte, so dass p38 in der Signalkaskade stromaufwärts zu liegen scheint. Des Weiteren wurde eine erhöhte Promotoraktivität von NF- κ B durch MT-SP1/Matriptase festgestellt, wobei die Aktivität von NF- κ B fast 7-fach im Vergleich zu unbehandelten Zellen gesteigert war. Die NF- κ B-Aktivierung wies dabei Abhängigkeit von p38 und p42/44 auf. Die IL-8-Induktion durch MT-SP1/Matriptase hingegen war ausschließlich abhängig von p38, aber nicht von p42/44 oder NF- κ B. Die *de novo*-Synthese von IL-8 scheint folglich transkriptionell nicht über NF- κ B reguliert zu werden.

Über MT-SP1/Matriptase-induzierte Signalwege ist bislang wenig bekannt. So wurde die Mobilisation von Kalziumströmen und kürzlich die Aktivierung des Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K)-Akt-Signalweges berichtet (List et al., 2005; Takeuchi et al., 2000).

Im Gegensatz dazu sind die PAR-2-vermittelten Signalwege umfangreicher charakterisiert. Ein Überblick über die PAR-2-vermittelte Signaltransduktion in

vaskulären Zellen soll dazu in Tabelle 10 gegeben werden.

Zelltyp	PAR-2-Agonist	Aktivierte bzw. von der Aktivierung ausgeschlossene Signalmoleküle	Quelle
Neonatale Rattenkardiomyozyten	PAR-2-AP	p38 p42/44 Ausschluss von JNK	(Sabri et al., 2000)
Aortale SMC der Ratte	Trypsin PAR-2-AP	p38 (schwach) p42/44 Ausschluss von JNK	(Belham et al., 1996)
HDMEC HUVEC	FXa PAR-2-AP	Ausschluss von p38 p42/44 NF-κB	(Shimizu et al., 2004)
Eosinophile Granulozyten	Mastzell-Tryptase	p38 p42/44 JNK AP-1	(Temkin et al., 2002)
CASMC	FXa	p42/44	(Koo et al., 2002)
HDMEC	Trypsin	NF-κB	(Shpacovitch et al., 2002)
CASMC	Trypsin PAR-2-AP	NF-κB	(Bretschneider et al., 1999)

Tabelle 10. Überblick über die PAR-2-vermittelten Signalwege in Gefäß- und Blutzellen

Angegeben sind die verwendeten Zellen, die PAR-2-Agonisten und die aktivierten bzw. von der Aktivierung ausgeschlossenen Signalmoleküle. Abkürzungen: *AP* agonistisches Peptid, *CASMC* glatte Muskelzellen aus der Koronararterie, *HDMEC* humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen, *HUVEC* humane Umbilikalvenenendothelzellen, *JNK* c-jun N-terminale Kinase, *SMC* glatte Muskelzellen

Übereinstimmend wurde dabei eine PAR-2-medierte p42/44-Aktivierung berichtet, was nicht nur in Gefäßzellen, sondern ebenso in Epithelzellen der Atemwege und des Darms, in Nierenzellen, Fibroblasten oder Mastzellen nachgewiesen wurde (Belham et al., 1996; Chokki et al., 2005; Fyfe et al., 2005; Kang et al., 2003b; Kawao et al., 2005; Page et al., 2003; Tanaka et al., 2005). Über die Aktivierung von p38 und c-jun N-terminaler Kinase (JNK) bestehen im Gegensatz dazu widersprüchliche Daten, sowohl

in vaskulären Zellen als auch in Zellen anderer Gewebe (Belham et al., 1996; Kang et al., 2003b; Kanke et al., 2001; Kim et al., 2002; Sabri et al., 2000; Shimizu et al., 2004; Temkin et al., 2002). Ebenso widersprüchlich verhält es sich mit Daten zur Promotoraktivität von NF- κ B und AP-1 (Buddenkotte et al., 2005; Fyfe et al., 2005; Page et al., 2005). Die PAR-2-vermittelten Signalwege scheinen daher zum einen zelltypspezifisch reguliert zu sein und zum anderen vom PAR-2-Liganden abzuhängen. Die durch Verwendung peptidischer Agonisten für PAR-2 generierten Daten werfen zudem Fragen nach der Spezifität der Peptide auf, da zum Beispiel peptidische Agonisten für PAR-1 ebenso PAR-2 aktivieren können (Blackhart et al., 1996).

Hier stellt sich zudem die Frage, ob durch Trypsin-Stimulation PAR-2-exprimierender Zellen grundsätzlich auf eine PAR-2-vermittelte Zellantwort geschlossen werden kann, da Trypsin neben PAR-2 ebenso PAR-1 und PAR-4 aktiviert und zumindest glatte Muskelzellen und Endothelzellen neben PAR-2- auch PAR-1-Expression aufweisen (Kahn et al., 1998b; Vouret-Craviari et al., 1995; Xu et al., 1998).

Im Vergleich zu einer Arbeit von Temkin und Kollegen stehen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse in Einklang hinsichtlich einer p38-abhängigen IL-8-Hochregulierung nach PAR-2-Aktivierung, wohingegen eine p42/44-Abhängigkeit von uns nicht bestätigt werden konnte (Temkin et al., 2002). Frühere Analysen der p38- und p42/44-Signalwege legten nahe, dass es sich um opponierende Signalwege für zelluläres Überleben bzw. Zelltod handelt, die durch unterschiedliche Stimuli aktiviert werden. Es gibt entsprechend Nachweise einer negativen Regulation des p42/44-Signalweges durch p38 und umgekehrt (Zhang et al., 2001). Allerdings wurde auch eine parallele Aktivierung von p38 und p42/44 gezeigt, wie zum Beispiel bei der Inhibition der Stickstoffmonoxid (NO)-induzierten Apoptose in T-Zellen durch Aktivierung beider MAPK (Oh et al., 2004). Die sequenzielle Aktivierung von p38 und p42/44 stellt dabei einen neueren Signalweg der MAPK-Aktivierung dar, der bereits in Thrombin- bzw. von-Willebrand-Faktor-stimulierten Plättchen gezeigt wurde (Li et al., 2006).

Die Gruppe um Temkin zeigte des Weiteren eine AP-1-abhängige IL-8-Synthese. Die Rolle des Transkriptionsfaktors AP-1 bedarf daher der Aufklärung in dem von uns verwendeten System, da NF- κ B für die Induktion der IL-8-Genexpression keine Rolle spielte. Da zur optimalen IL-8-Expression unter Umständen sogar drei Transkriptionsfaktoren zusammen erforderlich sind, nämlich NF- κ B, AP-1 und nukleärer Faktor für IL-6 (NF-IL-6), blieb die NF- κ B-Inhibition in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen möglicherweise ohne Wirkung auf die MT-SP1/Matriptase-

induzierte IL-8-Synthese (Zhu et al., 2003). Auch die relativ geringe Steigerung der NF- κ B-Aktivität durch MT-SP1/Matriptase im Vergleich zu TNF oder LPS, die die NF- κ B-Aktivität 12- bzw. 28-fach verstärken, deutet darauf hin, dass mehrere Transkriptionsfaktoren beteiligt sind (Cooper et al., 1996). Die Wirkung der gleichzeitigen Hemmung von NF- κ B und AP-1 auf die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-Expression sollte daher in weiteren Versuchen aufgeklärt werden.

Die Rolle der MT-SP1/Matriptase-induzierten NF- κ B-Promotoraktivität in HUVEC könnte sich abgesehen davon ebenso auf andere inflammatorische Mediatoren erstrecken, die durch NF- κ B als Antwort auf MT-SP1/Matriptase reguliert werden, wie zum Beispiel Tissue Factor, dessen Promotor ebenso wie der IL-8-Promotor NF- κ B-Bindungsstellen aufweist (Mackman et al., 1991).

Als weiterer Signalweg wurde in der vorliegenden Arbeit die PKC α -abhängige IL-8-Hochregulierung durch MT-SP1/Matriptase identifiziert. Dieser Signalweg beeinflusste weder die Aktivierung von p38 und/oder p42/44 noch die erhöhte Promotoraktivität von NF- κ B. Eine PKC-abhängige Wirkung von MT-SP1/Matriptase war bislang nicht bekannt, allerdings wurden PAR-abhängige PKC-Aktivierungen beschrieben. Die Thrombin-induzierte Signaltransduktion über PAR-1 aktiviert zum Beispiel PKC α in Endothelzellen, was zur Permeabilitätssteigerung der Zellen führt, wohingegen die PAR-2-vermittelte PKC α -Aktivierung nur wenig charakterisiert ist (Ahamed and Ruf, 2004; Belting et al., 2004; Holinstat et al., 2003; Mehta et al., 2001; Oshiro et al., 2004). Es bleibt daher aufzuklären, mit welchen Signalwegen PKC α in HUVEC interagiert, die zur Induktion der IL-8-Expression führen könnten. Auch hier mag die Untersuchung des PKC α -Einflusses auf die AP-1-Aktivität interessante Ergebnisse hervorbringen.

Zusammenfassend werden die durch MT-SP1/Matriptase ausgelösten Signalwege in Abbildung 40 dargestellt, wobei die blau unterlegten Felder die zellulären Signalmoleküle darstellen, die für die IL-8-mRNA-Synthese durch MT-SP1/Matriptase von Bedeutung waren. Dass mehrere Signalwege zur IL-8-Induktion führen, wurde bereits beschrieben, wobei die Aktivierung des p38-, SAPK/JNK- und des NF- κ B-induzierende Kinase (NIK)-Signalweges angeführt wurden (Holtmann et al., 1999). Diese Signalwege wirkten synergistisch, was für die in dieser Arbeit identifizierten Signalwege nicht festgestellt wurde.

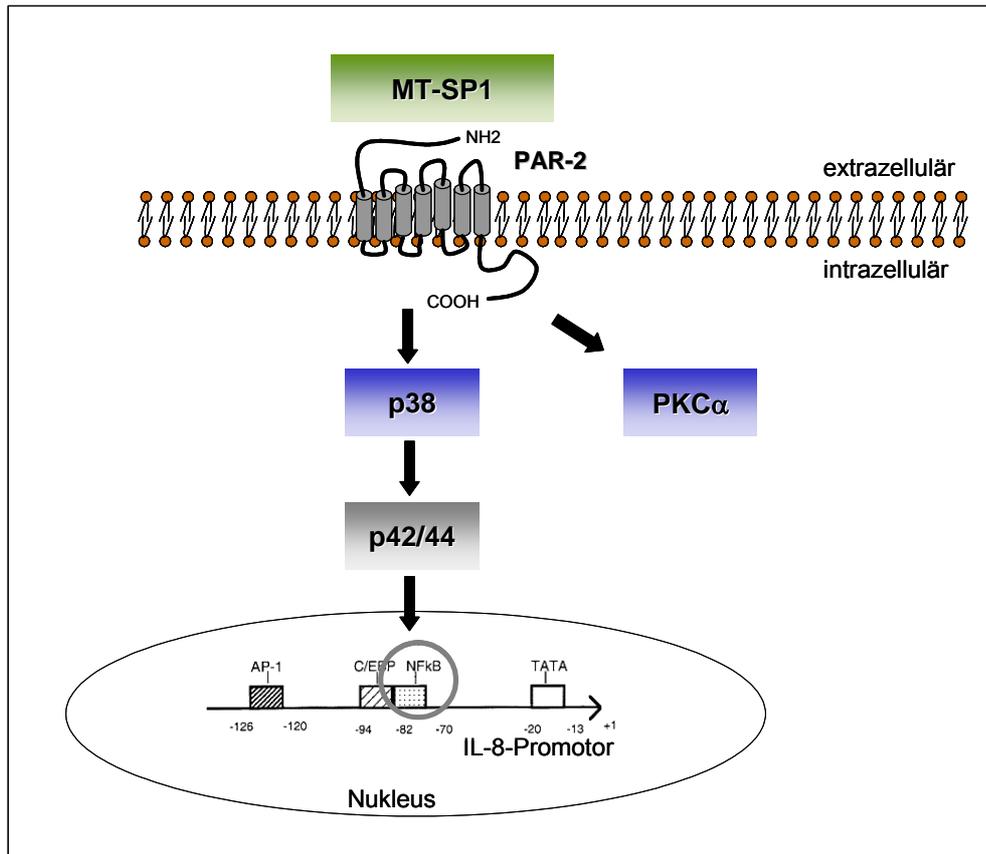


Abb. 40. Schema der MT-SP1/Matriptase-induzierten Signaltransduktion

MT-SP1/Matriptase induzierte die Aktivität der MAPK p38 sowie p42/44, wobei p38 vorangeschaltet war. Die Promotoraktivität von NF- κ B wurde ebenfalls gesteigert und war abhängig von p38 und p42/44. Die für die IL-8-mRNA-Expression essenziellen Signalüberträger sind blau unterlegt; hier wurde zudem PKC α identifiziert.

4.4 Tissue Factor und MT-SP1/Matriptase-Aktivierung von PAR-2

4.4.1 Tissue Factor beeinflusst nicht die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-Expression

Bereits 1996 spekulierten Camerer und Kollegen, dass der Gerinnungsfaktor VIIa (FVIIa) über einen Protease-aktivierten Rezeptor Signale transduzieren könnte und erwogen dabei PAR-2 als Vermittler (Camerer et al., 1996b). Tissue Factor (TF) wurde dabei als „Andockstation“ für FVIIa betrachtet. Einige Jahre später erfolgte der Nachweis der PAR-2-Aktivierung durch den TF/FVIIa-Komplex und den ternären Komplex aus TF/FVIIa/FX (Camerer et al., 2000b). TF/FVIIa steigerte in weiteren Untersuchungen die Migration von glatten Muskelzellen über PAR-2 und induzierte IL-8

in Brustkrebszellen, was in einer Migrationssteigerung der Zellen resultierte (Hjortoe et al., 2004; Marutsuka et al., 2002). In Endothelzellen, deren TF-Expression durch TNF- α induziert wurde, stimulierte TF/FVIIa die Synthese von Endothelin-1 via PAR-2; des Weiteren wurde die Proliferationssteigerung durch FVIIa in Abhängigkeit von TF und PAR-2 festgestellt (Fan et al., 2005; Sethi et al., 2005).

Dass die zytoplasmatische Domäne von TF (TFzyt) bei der Signaltransduktion über PAR-2 eine Rolle spielen könnte, wurde erst kürzlich durch eine PAR-2-abhängige Phosphorylierung der TFzyt gezeigt, wobei die PAR-2-Aktivierung durch TF/FVIIa/FXa, durch Trypsin oder agonistische PAR-2-Peptide erreicht wurde (Ahamed and Ruf, 2004). Es stellte sich heraus, dass TF/FVIIa via PAR-2 proangiogenetisch wirkt, wobei dem zytoplasmatischen Teil von TF eine negativ regulatorische Funktion zukommt, die vermutlich nach dessen Phosphorylierung aufgehoben wird (Belting et al., 2004) (siehe Schema Abb. 5).

Ausgehend von dieser Hypothese wurde in dieser Arbeit eine mögliche negativ regulatorische Wirkung der zytoplasmatischen Domäne von TF auf die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-Expression via PAR-2 untersucht. Dazu wurden ein Wildtyp-TF-Konstrukt und ein TF-Konstrukt mit deletierter zytoplasmatischer Domäne (TF Δ zyt) kloniert und in HUVEC transfiziert, die keine endogene TF-Expression aufweisen (Crossman et al., 1990). Die Konstrukte waren funktionell, was anhand der FXa-Bildung überprüft wurde. Wildtyp-TF übte dabei keinen negativen Effekt auf die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-mRNA-Synthese im Vergleich zu Leervektor- oder TF Δ zyt-transfizierten Zellen aus. Der Mangel an negativer Regulation der PAR-2-vermittelten IL-8-Expression durch TFzyt könnte folgende Ursachen haben:

1. Es kommt zu keiner Kolo-kalisation der beiden Rezeptoren PAR-2 und TF, was durch die N-terminale YFP-Fusion von TF bedingt sein könnte.
2. Die PAR-2-vermittelte IL-8-Induktion durch MT-SP1/Matriptase ist von TF bzw. von TFzyt unbeeinflusst.
3. Die PAR-2-Aktivierung durch MT-SP1/Matriptase führt zur Phosphorylierung der TFzyt im Wildtypprotein, was deren negative Regulation der PAR-2-vermittelten Signaltransduktion supprimiert. Das TF-Protein ohne zytoplasmatische Domäne kann ebenso wenig negativ regulatorisch auf PAR-2-vermittelte Signalwege einwirken, so dass beide Rezeptorvarianten ohne negativen Einfluss bleiben, und die MT-SP1/Matriptase-induzierte IL-8-Expression vergleichbar zu den Leervektor-transfizierten Zellen ausfällt.

Letztere Erklärung würde die von Belting und Ahamed postulierte Hypothese unterstützen und demzufolge die Untersuchung der Serinreste der zytoplasmatischen Domäne von TF im vorliegenden Versuchsaufbau erfordern (Ahamed and Ruf, 2004; Belting et al., 2004). Die Mutation der Serinreste würde deren Phosphorylierung verhindern, so dass eine negative Regulation der PAR-2-vermittelten IL-8-Induktion durch MT-SP1/Matriptase beobachtet werden müsste. In der Studie von Belting und Kollegen wurde die negative Regulation der PAR-2-vermittelten Angiogenese durch die TFzyt anhand der Gefäßausbildung der Retina neugeborener Mäuse nachgewiesen. TF Δ zyt-Mäuse zeigten in diesen Versuchen eine deutlich verstärkte Angiogenese im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, was in PAR-2-defizienten Mäusen revertiert war (Belting et al., 2004). Eine Aktivierung von PAR-2 fand in diesem Modell jedoch nicht gesichert statt, so dass TF in den Wildtyp-Tieren eventuell nicht phosphoryliert wurde, was den Unterschied zu den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen erklären würde.

Da jedoch die IL-8-Induktion durch MT-SP1/Matriptase in transfizierten HUVEC deutlich geringer als in untransfizierten HUVEC war (ca. 1,5-fach im Vergleich zu 3-fach in untransfizierten Zellen), was möglicherweise auf zytotoxische Effekte durch die Transfektion zurückzuführen war, wurde diese Fragestellung nicht weiter verfolgt.

Im Rahmen dieser Versuche fiel allerdings auf, dass die exogene Transfektion von TF in HUVEC die IL-8-Expression verglichen mit Leervektor-transfizierten Zellen deutlich erhöhte (7,6-fach). Um die Bedeutung der TFzyt bei diesem Effekt zu untersuchen, wurde die IL-8-Induktion durch Wildtyp-TF und TF Δ zyt verglichen. Außerdem wurden mutierte TF-Konstrukte zur Untersuchung einzelner Aminosäuren der zytoplasmatischen Domäne generiert, die ebenfalls hinsichtlich ihrer IL-8-Induktion analysiert wurden:

- TF Ser253Ala
- TF Ser258Ala
- TF Ser253Ala/Ser258Ala
- TF Cys245Ser

Die Mutation der Serinreste Ser253 und Ser258 verhindert die Phosphorylierung der TFzyt, wohingegen die Mutation von Cys245 die Palmitoylierung unmöglich macht, so dass deren mögliche negativ regulatorische Wirkung aufgehoben werden sollte.

Dabei zeigte sich, dass TF Δ zyt sowie die TF-Konstrukte, deren Serinreste mutiert waren, nur ca. 50% der IL-8-mRNA im Vergleich zu Wildtyp-TF induzierten. TF Cys245Ser induzierte im Gegensatz dazu IL-8 ähnlich Wildtyp-TF. Daraus resultiert,

dass die zytoplasmatische Domäne von TF die proinflammatorische TF-Wirkung reguliert, wobei sowohl Ser253 als auch Ser258 von Bedeutung sind. Die Palmitoylierung an Cys245 scheint dabei unwesentlich zu sein. Damit wird die Hypothese gestützt, dass der zytoplasmatischen Domäne von TF eine regulatorische Funktion in der Signaltransduktion zukommt, die unabhängig von der Interaktion zwischen dem Rezeptor Tissue Factor und seinem Liganden Faktor VIIa ist. Vergleichbare Daten zeigten die Produktion von vaskulo-endothelialeem Wachstumsfaktor (VEGF) in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Domäne von TF, ebenfalls unabhängig von der Faktor VIIa-Bindung (Abe et al., 1999). Diese Ergebnisse sind konsistent mit Daten aus Tiermodellen, die die Bedeutung der zytoplasmatischen Domäne von TF *in vivo* bzw. *ex vivo* aufzeigen (Belting et al., 2004; Ott et al., 2005a; Ott et al., 2005b; Yang et al., 2004).

4.4.2 MT-SP1/Matriptase reguliert TF

Allein die Expression von TF induzierte also IL-8 in Endothelzellen, wobei die Bindung des Liganden FVIIa an seinen Rezeptor TF für die proinflammatorische Wirkung von TF nicht notwendig war. Die Untersuchung des Einflusses von MT-SP1/Matriptase auf die TF-Expression zeigte, dass MT-SP1/Matriptase die *de novo*-Synthese von TF in HUVEC induzierte. Sollte diese Expressionssteigerung von TF durch MT-SP1/Matriptase über eine PAR-2-Aktivierung vermittelt werden (wie im Falle der IL-8-Induktion), so würde dies Daten bestätigen, die nach PAR-2-Aktivierung mit Trypsin, Tryptase oder agonistischen Peptiden die Synthese von TF zeigten und die Rolle von PAR-2 als Regulator der TF-Expression bekräftigen (Alm et al., 1999; Langer et al., 1999). Ob PAR-2 der Vermittler der MT-SP1/Matriptase-induzierten TF-Expression ist, sollte daher weiter geklärt werden. Auch die Untersuchung der Signaltransduktionswege, die zur gesteigerten TF-Synthese führen, steht dabei an und könnte interessante Ergebnisse im Vergleich zu den zur IL-8-Expression führenden Signalwegen hervorbringen.

Durch diese TF-Induktion könnte MT-SP1/Matriptase nicht nur zur Verschiebung des endothelialen Gleichgewichtes von anti- zu proinflammatorisch, sondern auch von antikoagulatorisch zu prothrombotisch führen. Da TF zudem promigratorisch wirkt, wäre eine Steigerung der Migration der medialen glatten Muskelzellen durch MT-SP1/Matriptase über die TF-Induktion in der endothelialen Läsion denkbar (Sato et al., 1996). Die gesteigerte Migration von glatten Muskelzellen trägt dabei wesentlich zur Progression des Gefäßverschlusses in der Atherosklerose bei (Haudenschild, 1990).

Einerseits trüge MT-SP1/Matriptase daher über folgende Mechanismen zur positiven Rückkopplung des Entzündungsprozesses bei:

- Induktion der inflammatorischen Mediatoren IL-8, IL-6 und MCP-1
- Induktion von TF, dessen Expression ebenfalls IL-8 hochreguliert
- Induktion von TF, der nach Bindung seines Liganden FVIIa wiederum IL-8 über PAR-2 induziert (de Jonge et al., 2003; Hjortoe et al., 2004; Wang et al., 2002)

Andererseits könnte MT-SP1/Matriptase über die Induktion von TF zur Migration der glatten Muskelzellen der medialen Gefäßwand beitragen und somit den Gefäßverschluss begünstigen (Dorfleutner et al., 2004; Hjortoe et al., 2004; Jiang et al., 2004; Marutsuka et al., 2002; Ott et al., 2005a).

4.5 Expression von MT-SP1/Matriptase

Die Expression von MT-SP1/Matriptase wurde bislang hauptsächlich in epitheliale Gewebe oder Epithelzellen beschrieben, wobei eine starke Expression im gastrointestinalen Trakt und in der Prostata nachgewiesen wurde (Oberst et al., 2003a; Takeuchi et al., 1999; Tsuzuki et al., 2005). Zudem wurde eine lösliche Form von MT-SP1/Matriptase in humaner Milch identifiziert (Lin et al., 1999a). In erkranktem Gewebe findet sich MT-SP1/Matriptase in verschiedenen Tumorgeweben (Brust, Ovar, Cervix, Prostata, Kolon), in Tumorzellen sowie sezerniert von Tumorzellen als lösliche Form (Bhatt et al., 2003; Jin et al., 2005; Kang et al., 2003a; Oberst et al., 2001; Oberst et al., 2002; Santin et al., 2003; Satomi et al., 2001; Suzuki et al., 2003; Tanimoto et al., 2005).

4.5.1 *MT-SP1/Matriptase-Expression in vaskulären Zellen*

Über die vaskuläre Expression von MT-SP1/Matriptase ist nur sehr wenig bekannt. So zeigten Aimes und Kollegen, dass MT-SP1/Matriptase-mRNA in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) und in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC), die auf Kollagen I kultiviert wurden, nur in äußerst geringem Ausmaß nachweisbar war (Aimes et al., 2003). Wurden HMEC stattdessen auf Matrigel kultiviert, war die MT-SP1/Matriptase-Expression deutlich gesteigert. Matrigel stellt eine Matrix aus Komponenten der Basalmembran dar, deren

Hauptbestandteile Laminin, Kollagen IV, Heparansulfatproteoglykane und Entaktin sind (Kleinman et al., 1982). Die Kultivierung von Endothelzellen auf Matrigel entspricht am ehesten der *in vivo*-Situation, in der die endotheliale Intima einer subendothelialen Basalmembran aufliegt, so dass die Expression von MT-SP1/Matriptase in den Endothelzellen der Gefäßwand *in vivo* vorstellbar ist.

Ein Teil dieser Arbeit hatte die Evaluierung der basalen MT-SP1/Matriptase-Expression in vaskulären Zellen wie glatten Muskelzellen, Endothelzellen und mononukleären Zellen zum Ziel. MT-SP1/Matriptase-mRNA wurde dabei weder in glatten Muskelzellen noch in venösen oder arteriellen Endothelzellen nachgewiesen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Zellen auf Oberflächen mit positiv geladenen Stickstoffverbindungen kultiviert wurden und nicht auf Elementen der Basalmembran, und bestätigt damit die von Aimes und Kollegen beschriebene schwache MT-SP1/Matriptase-Expression in HUVEC (Aimes et al., 2003).

Im Gegensatz dazu wurde eine deutliche Expression von MT-SP1/Matriptase in Ficoll-isolierten mononukleären Zellen, die sich aus Monozyten und Lymphozyten zusammensetzen, festgestellt. Anhand von Immunfluoreszenzfärbungen wurde MT-SP1/Matriptase dabei als Protease identifiziert, die selektiv von Monozyten exprimiert wird, was durch den monozytären Marker CD14 nachgewiesen wurde. Die in dieser Arbeit identifizierte MT-SP1/Matriptase-Expression in kultivierten Zellen bestätigt die mittels Northern Blot ermittelte Expression von MT-SP1/Matriptase in Leukozyten und weist die MT-SP1/Matriptase-Expression innerhalb der mononukleären Leukozyten den Monozyten zu (Takeuchi et al., 1999). Die physiologische Funktion von MT-SP1/Matriptase in Monozyten ist unklar. Da Monozyten die wichtigsten Zellen der unspezifischen Infektabwehr darstellen, könnte MT-SP1/Matriptase beispielsweise zur Degradation der extrazellulären Matrix bei der Infiltration ins Gewebe beitragen, wie dies zum Beispiel für das Urokinase Plasminogen-Aktivator-System gezeigt wurde (Gu et al., 2005).

4.5.2 MT-SP1/Matriptase-Expression in gesunden und atherosklerotischen Gefäßen

Kommt MT-SP1/Matriptase im atherosklerotischen Geschehen eine Bedeutung zu? Zur Beantwortung dieser Frage wurde die MT-SP1/Matriptase-Expression in humanen Thrombendarterektomieproben im Vergleich zu gesundem Gefäßgewebe evaluiert. Die Thrombendarterektomie stellt eine Technik dar, bei der das atherosklerotische Plaquematerial inklusive der umgebenden Gefäßneointima und -media aus der

verengten Arteria carotis oder femoralis ausgeschält wird. Dabei setzt sich das entfernte Plaquematerial im Wesentlichen aus Schaumzellen (lipidbeladene Makrophagen), Lymphozyten, eingewanderten glatten Muskelzellen der Media sowie Fett- und Kalkbestandteilen und Teilen der Gefäßwand zusammen. Die Gefäßproben wurden dabei halbiert, so dass eine Hälfte auf ihre RNA-Expression und die andere Hälfte auf ihre Proteinexpression hin untersucht werden konnte.

Die untersuchten Atherektomieproben wiesen eine deutlich gesteigerte MT-SP1/Matriptase-mRNA-Expression im Vergleich zu den gesunden Gefäßproben auf. Trotz der hohen Varianz der MT-SP1/Matriptase-Expression innerhalb der erkrankten Gefäße war die gesteigerte Expression signifikant. Die großen Expressionsunterschiede innerhalb der Plaqueproben erklären sich vermutlich dadurch, dass bei den einzelnen Eingriffen Plaques mit variabler Zusammensetzung entfernt werden, so dass diese teilweise hauptsächlich Kalkbestandteile oder in anderen Fällen vorrangig zelluläre Bestandteile aufweisen.

Die Untersuchung der MT-SP1/Matriptase-Expression auf Proteinebene erfolgte durch immunhistochemische Färbung von MT-SP1/Matriptase in Gefrierschnitten, die aus der anderen Hälfte der Atherektomieproben oder gesunden Gefäßen präpariert wurden. Der immunhistochemische Nachweis ermöglichte die Lokalisation der MT-SP1/Matriptase-Expression im atherosklerotischen Gefäß. Dabei zeigte sich, dass MT-SP1/Matriptase an der endothelialen Gefäßinnenwand exprimiert und zudem in an das Endothel anhaftenden Zellen nachweisbar war. Bei den adhären Zellen wurde anhand der Größe und Form ihres Zellkernes vermutet, dass es sich um Blutzellen wie Monozyten handeln könnte. Im Vergleich der Gewebeanalysen mit den Zellkulturergebnissen kann daher die Vermutung formuliert werden, dass es sich bei den am Endothel anhaftenden Zellen um Monozyten handelt, die bereits basal MT-SP1/Matriptase-Expression aufweisen, aber im gesunden Gefäß nicht mit dem Endothel interagieren.

Die gesunden Gefäße wiesen eine schwache Expression von MT-SP1/Matriptase im intimalen und medialen Bereich der Gefäßwand auf, so dass unter Umständen der Kontakt von Endothelzellen mit Basalmembrankomponenten zur MT-SP1/Matriptase-Expression führt, was die mangelnde MT-SP1/Matriptase-Expression in kultivierten Endothelzellen erklären würde (Aimes et al., 2003). Die adventitielle Schicht der gesunden Gefäße, die in atherosklerotischen Gefäßen durch das Ausschälen der Plaques nicht mitpräpariert wurde, zeigte hingegen eine deutliche MT-SP1/Matriptase-Expression. Dies erklärt auch den Nachweis von MT-SP1/Matriptase-mRNA in gesunden Gefäßen, wenngleich die MT-SP1/Matriptase-Kopienzahl wesentlich

geringer war als in den Atherektomieproben.

Was die Erhöhung der MT-SP1/Matriptase-Expression in der Endothelschicht der atherosklerotischen Gefäßinnenwand anbelangt, könnten Endothelzellen im Laufe des atherosklerotischen Geschehens zur Steigerung der MT-SP1/Matriptase-Expression durch noch zu identifizierende Mediatoren angeregt werden.

Die parallel durchgeführte Analyse der PAR-2-mRNA-Expression in Atherektomieproben im Vergleich zu gesundem Gefäß ergab auch für PAR-2 eine erhöhte mRNA-Expression im erkrankten verglichen mit gesundem Gefäß. Dieses Ergebnis bestätigt die von Napoli und Kollegen gezeigten Daten zur erhöhten Expression von PAR-2-Protein in humanen atherosklerotischen Läsionen der Koronararterie auf RNA-Ebene (Napoli et al., 2004).

Überraschenderweise zeigte der Vergleich zwischen der mRNA-Expression von MT-SP1/Matriptase und PAR-2 im gesunden Gefäß eine ca. 3,4-fach höhere Kopienzahl pro 100 000 GAPDH-Kopien von MT-SP1/Matriptase (270 Kopien) als von PAR-2 (78 Kopien), die im erkrankten Gefäß sogar 21,6-fach gesteigert war. Dies steht im Gegensatz zu den Expressionsniveaus in kultivierten glatten Muskelzellen und Endothelzellen. Im Falle von MT-SP1/Matriptase lässt sich diese Tatsache vermutlich darauf zurückführen, dass die Protease im Gefäß relativ stark in der adventitialen Schicht exprimiert wird. Für PAR-2 steht dieses Ergebnis im Gegensatz zu den *in vitro*-Ergebnissen, in denen Endothelzellen und glatte Muskelzellen eine deutliche PAR-2-Expression aufwiesen: So wurden für PAR-2 *in vitro* 290 Kopien in Endothelzellen und 580 Kopien pro 100 000 GAPDH-Kopien in glatten Muskelzellen ermittelt. Diese Werte liegen deutlich über den PAR-2-Kopienzahlen in den gesunden Gefäßproben. Über die PAR-2-Expression in humanen Gewebeproben herrscht allerdings Uneinigkeit über die Expression in glatten Muskelzellen. Wohingegen die Expression im Endothel als evident gilt, existieren sowohl Daten über eine Expression in glatten Muskelzellen als auch über eine Absenz von PAR-2 (Hamilton et al., 2001; Molino et al., 1998). Sollte PAR-2 nur in der Endothelzellschicht und nicht in den glatten Muskelzellen exprimiert werden, so würde dies erklären, dass das Expressionsniveau in den gesunden Gefäßen niedriger als in kultivierten Endothelzellen ist, da Endothelzellen nur einen geringen Teil eines kompletten Gefäßes ausmachen. Die PAR-2-Expression in den glatten Muskelzellen wäre damit auf ein Artefakt der Zellkultur zurückzuführen.

Grundsätzlich müssen die Ergebnisse der RNA-Analysen im atherosklerotischen im Vergleich zum gesunden Gefäß als aussagekräftiger gelten, da in diesen Fällen die gesamte Plaqueprobe untersucht wurde und nicht, wie im Falle des

immunhistochemischen Nachweises, ein selektiver Ausschnitt der atherosklerotischen Plaque. Der Nachweis einer erhöhten MT-SP1/Matriptase-Expression in atherosklerotischen Gefäßen im Vergleich zu gesundem Gefäß wurde mit dieser Arbeit erstmalig erbracht und zeigt die mögliche Bedeutung von MT-SP1/Matriptase im atherosklerotischen Geschehen auf. Durch die parallele Steigerung der Expression von PAR-2 im atherosklerotischen Gefäß ist eine proinflammatorische und prothrombotische Wirkung von MT-SP1/Matriptase durch Aktivierung von PAR-2 in der Vaskulatur denkbar, die zur Progression der Atherosklerose beitragen könnte. Da in dieser Arbeit nur ein begrenztes Patientenkontingent auf die Expression von MT-SP1/Matriptase in atherosklerotischen Gefäßen analysiert werden konnte, sollte eine Erhöhung der Probandenzahl angestrebt werden.

4.6 MT-SP1/Matriptase in der Atherosklerose und Ausblick

MT-SP1/Matriptase ist im atherosklerotisch veränderten Gefäß hochreguliert und präsentiert sich dabei an der inneren endothelialen Gefäßwand sowie in Blutzellen, die am Endothel anhaften. *In vitro* konnte die Expression von MT-SP1/Matriptase in Monozyten belegt werden. Der transmembrane Rezeptor PAR-2, über dessen Aktivierung MT-SP1/Matriptase IL-8 unter Kulturbedingungen in Endothelzellen induziert, weist ebenfalls eine Steigerung seiner Expression in atherosklerotisch veränderten Gefäßen im Vergleich zu gesundem Gefäß auf.

Während in kultivierten Endothelzellen und glatten Muskelzellen keine MT-SP1/Matriptase-Expression detektierbar war, zeigten gesunde humane Gefäßproben MT-SP1/Matriptase-Expression. PAR-2 findet sich ebenfalls basal in gesunden Gefäßproben, aber auch in kultivierten Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Werden diese mit IL-1 β behandelt, kommt es zu einer Steigerung der PAR-2-Expression in Endothelzellen, aber nicht in glatten Muskelzellen.

Im atherosklerotischen Prozess ist daher das Szenario denkbar, dass über eine Expressionssteigerung von MT-SP1/Matriptase und PAR-2 die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie IL-8 induziert wird. Weiterhin induziert MT-SP1/Matriptase die Zytokine IL-6 und MCP-1 sowie den Hauptauslöser der Gerinnungskaskade, Tissue Factor, und könnte somit zur Verschiebung der Endothel Eigenschaften in Richtung proinflammatorisch und prothrombotisch beitragen. Die Expression von Tissue Factor induziert wiederum, ohne Interaktion mit seinem Liganden FVIIa, IL-8. Zudem wird auch nach Bindung von FVIIa an Tissue Factor über

PAR-2 IL-8 induziert (Hjortoe et al., 2004; Wang et al., 2002). Damit zeigt sich die Möglichkeit einer positiven Rückkopplungsschleife, die den entzündlichen und prothrombotischen Prozess in der Gefäßwand in Gang halten und verstärken könnte.

Der Nachweis der Expression von MT-SP1/Matriptase in Monozyten und die Vermutung, bei den an das Endothel adhärennten Zellen mit hoher MT-SP1/Matriptase-Expression könne es sich um Blutzellen handeln, lässt eine weitere interessante Hypothese zu. So könnte nach der Adhärenz von Monozyten an das dysfunktionelle Endothel, noch vor der Infiltration in den subendothelialen Raum, durch eine Interaktion zwischen monozytärer MT-SP1/Matriptase und endotheliale PAR-2 zum Entzündungsprozess beigetragen werden.

Es gibt aktuelle Daten, die die IL-8-, IL-6- und IL-1 β -Produktion nach PAR-2-Aktivierung auf Monozyten beschreiben, so dass eine MT-SP1/Matriptase-induzierte Zytokinfreisetzung über PAR-2 auf Monozyten - unabhängig von der Adhärenz an das Endothel - ebenfalls denkbar wäre und Gegenstand weiterer Untersuchungen sein sollte (Johansson et al., 2005). Hier stellt sich die Frage nach dem Aktivierungszustand von MT-SP1/Matriptase und/oder nach der Regulation durch den Inhibitor HAI-1.

Die Rolle von HAI-1 als physiologischem Inhibitor von MT-SP1/Matriptase bedarf dabei prioritär der Aufklärung im vaskulären System. Der Mangel an MT-SP1/Matriptase-Regulation wurde zum Beispiel in Brustkrebszellen beschrieben und könnte auf die Situation im atherosklerotischen Gefäß übertragen werden (Benaud et al., 2002a). Die Bedeutung von HAI-1 bei der Inhibition, aber auch bei der Aktivierung und Expression von MT-SP1/Matriptase scheint offenkundig, so dass ein Funktionsverlust von HAI-1 oder ein Ungleichgewicht zwischen MT-SP1/Matriptase- und HAI-1-Expression leicht zu einer verstärkten MT-SP1/Matriptase-Aktivität führen könnte (Lee et al., 2005b; List et al., 2005; Oberst et al., 2005). Die Untersuchung der Bedeutung der regulatorischen Domänen von MT-SP1/Matriptase, unter Umständen auch hinsichtlich der Interaktion mit PAR-2, könnte Einblick in die Regulation von MT-SP1/Matriptase geben und Hinweise auf pathophysiologische Mechanismen in der Atherosklerose geben.

Von großer Bedeutung ist die Aufklärung der Rolle von MT-SP1/Matriptase sowie von PAR-2 in einem *in vivo*-Modell der Atherosklerose. So könnte der Einfluss einer MT-SP1/Matriptase- oder PAR-2-Defizienz in Apolipoprotein (Apo)E-defizienten Mäusen, die als Tiermodell für Atherosklerose etabliert sind, hinsichtlich einer veränderten Ausbildung atherosklerotischer Läsionen Ziel von Untersuchungen sein (Kashyap et al., 1995; Plump et al., 1992).

Bis zum heutigen Zeitpunkt sind keine PAR-2-Inhibitoren bekannt. Die Erforschung und Entwicklung spezifischer PAR-2-Antagonisten könnte daher eine große Bedeutung in der zukünftigen Therapie der Atherosklerose und anderer Gefäßkrankheiten erlangen (McGuire, 2004).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Atherosklerose wird heute als entzündliche Gefäßerkrankung verstanden, an deren Beginn ein Funktionsverlust des Endothels steht. Genablationsversuche zeigen, dass der Protease-aktivierte Rezeptor 2 (PAR-2) eine Rolle bei der Vermittlung inflammatorischer Reaktionen des Endothels spielt. PAR-2 gehört zur Familie der heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und wird durch proteolytische Spaltung seines N-Terminus aktiviert. Zusätzlich zu bekannten PAR-2-Liganden wie Trypsin und Gerinnungsfaktoren Xa und Tissue Factor/VIIa wurde mittels *positional scanning synthetic combinatorial library* die Typ II transmembrane Serinprotease Matriptase/MT-SP1 als PAR-2-aktivierende Protease identifiziert. MT-SP1/Matriptase wird bislang ausschließlich eine Rolle bei Tumorinvasion und Metastasierung zugeschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine entzündungsfördernde Wirkung der katalytischen Domäne von MT-SP1/Matriptase in primären Gefäßendothelzellen und der daran beteiligte Rezeptormechanismus untersucht. MT-SP1/Matriptase induzierte die *de novo*-Synthese der proinflammatorischen Mediatoren Interleukin-8 (IL-8), IL-6 und *Monocyte Chemoattractant Protein* (MCP)-1 abhängig von der katalytischen Aktivität und über die Aktivierung von PAR-2. Die MT-SP1/Matriptase-induzierten Signalwege beinhalteten die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Abhängigkeit von der sequenziellen Aktivität der MAPK p38 und p42/44. Die IL-8-Induktion durch MT-SP1/Matriptase erforderte dabei lediglich die Aktivität von p38. Zusätzlich wurde ein zweiter, PKC α -abhängiger Signalweg zur MT-SP1/Matriptase-induzierten IL-8-Expression nachgewiesen, der unabhängig von p38, p42/44 und NF- κ B war. Die endotheliale Dysfunktion in der Atherosklerose kennzeichnet sich nicht nur durch Inflammation, sondern auch durch prothrombotische Veränderungen. MT-SP1/Matriptase induzierte zusätzlich zu inflammatorischen Zytokinen die Neusynthese des Gerinnungsfaktors Tissue Factor und könnte dadurch proatherogen wirken. Tissue Factor selbst induzierte wiederum IL-8 unabhängig von seinem Liganden FVIIa, aber abhängig von den Serinresten 253 und 258 in der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors. Expressionsstudien zeigten die erhöhte Expression von MT-SP1/Matriptase in der endothelialen Innenwand atherosklerotischer Gefäße im Vergleich zu gesundem Gefäß. Auch am Endothel adhärenzte Blutzellen wiesen MT-SP1/Matriptase-Expression auf. Die Basalexpression von MT-SP1/Matriptase war nicht in Endothelzellen, aber in Monozyten nachweisbar, die im atherosklerotischen Prozess mit dem Endothel interagieren können. MT-SP1/Matriptase könnte daher eine Rolle bei der PAR-2-vermittelten Entzündungsreaktion in der atherosklerotischen Gefäßwand spielen.

6 SUMMARY

Atherosclerosis involves multiple processes including endothelial dysfunction and inflammation. Protease-activated receptor 2 (PAR-2), a seven transmembrane G-protein coupled receptor, is expressed in endothelial cells and plays an important role in inflammatory processes. Activation of PAR-2 occurs by cleavage of its N-terminus unmasking a new N-terminus, which serves as tethered ligand for its maternal receptor. Known activators of PAR-2 are trypsin, mast-cell tryptase and coagulation factors Xa and tissue factor-VIIa-complex. Using a positional scanning synthetic combinatorial library MT-SP1/matriptase, a type II transmembrane serine protease involved in cancer invasion and metastasis, has been identified as potential activator of PAR-2. The function of the protease in the cardiovascular system is currently unknown. Hence, we sought to investigate the effects of the catalytic domain of human MT-SP1/matriptase on cytokine expression in endothelial cells and examined the involvement of PAR-2. In addition, we analyzed the role of MT-SP1/matriptase in atherosclerosis by evaluating its expression in vascular cells and in human atherectomy samples.

In endothelial cells MT-SP1/matriptase dose-dependently induced interleukin (IL)-8, IL-6 and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 mRNA expression and protein release dependent on its proteolytic activity. MT-SP1/matriptase sequentially activated MAPK p38 and p42/44, however, only p38 activity was crucial for IL-8 induction. Furthermore, MT-SP1/matriptase-induced IL-8 expression was dependent on PKC α . Gene silencing of PAR-2, but not of PAR-1, completely abolished MT-SP1/matriptase-induced cytokine expression as evidence for PAR-2-mediated signalling. Endothelial dysfunction is not only characterized by proinflammatory but also by prothrombotic changes in the vessel wall. MT-SP1/matriptase induced tissue factor, the main initiator of the extrinsic coagulation cascade, and may, thereby, contribute to a prothrombotic environment. Tissue Factor also induced IL-8 up-regulation independent of its ligand factor VIIa but dependent on two serine residues (253 and 258) in the cytoplasmic tail of the receptor. Analysis of MT-SP1/matriptase expression in human atherectomy samples revealed enhanced expression of MT-SP1/matriptase as compared to non-diseased vessels. Immunohistochemical stainings showed that MT-SP1/matriptase was localized at the endothelial inner layer of the atherosclerotic vessel wall and in blood cells adhered to the endothelium. Basal MT-SP1/matriptase expression was detected in cultured monocytes, but not in cultured endothelial or smooth muscle cells.

MT-SP1/matriptase induces the release of proinflammatory cytokines and prothrombotic tissue factor in endothelial cells through activation of PAR-2. This mechanism may contribute to local inflammatory changes in atherosclerosis.

7 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt an erster Stelle Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß aus dem Institut für Anthropologie und Humangenetik der Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München für die freundliche Betreuung meiner Arbeit. Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Charles N. David für die freundliche Übernahme des Koreferates danken.

Frau PD Dr. Ilka Ott gilt mein besonderer Dank für die Ermöglichung meiner Arbeit und deren Betreuung am Deutschen Herzzentrum München, für die Anleitung zu selbstständiger Arbeit und für die visionären Anregungen. Besonders möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, an verschiedenen Symposien und Kongressen teilnehmen zu können und für die damit verbundene großzügige Unterstützung.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern der Firma Morphochem, Dr. Sibylle Hess, Dr. Robert Eckl und Dr. Henk Schulz, die jederzeit sehr hilfreich und unterstützend zur Seite standen.

Bei Prof. Dr. Richard Brandl und Dr. Hans Peter Montens aus der Abteilung für Gefäßchirurgie des Schwabinger Krankenhauses möchte ich mich für die Bereitstellung der Atherektomieproben bedanken.

Bei Annette Stobbe, Birgit Campbell und Christina Bauer möchte ich mich ganz herzlich bedanken für die Unterstützung meiner Arbeit und die sympathische und angenehme Zusammenarbeit im Labor. Danke an Sabine Merl und Birgit Jaschke für die gemeinsam verbrachte Zeit in und außerhalb des Labors. Allen weiteren Kolleg(inn)en der EXEK sowie der EXKK gilt ebenso ein großes Dankeschön für die sehr nette Zusammenarbeit.

Danke an Elke für die abendliche Unterhaltung und die Motivation.

Großen Dank schulde ich Mani, der mich mit viel Liebe und Geduld während meiner Arbeit unterstützt hat sowie ganz besonders meiner Familie, die sehr teilnehmend und motivierend war.

8 LEBENS LAUF

Name Isabell Seitz
Adresse Schleißheimer Str. 45
80797 München
geboren am 13. Mai 1975 in München

Schulbildung

1981-1985 Grundschole Germering
1985-1994 Max-Born-Gymnasium Germering
Juli 1994 Abitur (Note 1,3)

Studium

1994-1996 Studium der Biologie an der Technischen Universität München, Vordiplom
1996-2000 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Okt 1999-Juni 2000 Diplomarbeit am Institut Cochin de Génétique Moléculaire in Paris
Thema: Funktionelle Analyse einer neuen, mit dem Angiotensin II-Typ 2-Rezeptor interagierenden Proteinfamilie
Juli 2000 Diplom (Note 1,1)

Berufstätigkeit

Sep 2000-Mai 2002 Research Associate in dem Forschungsunternehmen Elegene AG im Bereich Neurodegenerative Erkrankungen (Parkinson, Trinukleotiderkrankungen)

Promotion

Mai 2002-März 2006 Doktorarbeit am Deutschen Herzzentrum München, Experimentelle Erwachsenenkardiologie, AG PD Dr. Ilka Ott
Thema: Proinflammatorische und prothrombotische Wirkung von MT-SP1/Matriptase in Endothelzellen über Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptors 2 - Bedeutung in der Atherosklerose

9 LITERATURVERZEICHNIS

Abe, K., Shoji, M., Chen, J., Bierhaus, A., Danave, I., Micko, C., Casper, K., Dillehay, D. L., Nawroth, P. P., and Rickles, F. R. (1999). Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8663-8668.

Ahamed, J., and Ruf, W. (2004). Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 279, 23038-23044.

Aiello, R. J., Bourassa, P. A., Lindsey, S., Weng, W., Natoli, E., Rollins, B. J., and Milos, P. M. (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1518-1525.

Aimes, R. T., Zijlstra, A., Hooper, J. D., Ogbourne, S. M., Sit, M. L., Fuchs, S., Gotley, D. C., Quigley, J. P., and Antalis, T. M. (2003). Endothelial cell serine proteases expressed during vascular morphogenesis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 89, 561-572.

Akers, I. A., Parsons, M., Hill, M. R., Hollenberg, M. D., Sanjar, S., Laurent, G. J., and McAnulty, R. J. (2000). Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, L193-L201.

Al-Ani, B., Hansen, K. K., and Hollenberg, M. D. (2004). Proteinase-activated receptor-2: key role of amino-terminal dipeptide residues of the tethered ligand for receptor activation. *Mol Pharmacol* 65, 149-156.

Alm, A. K., Gagnemo-Persson, R., Sorsa, T., and Sundelin, J. (2000). Extrapancreatic trypsin-2 cleaves proteinase-activated receptor-2. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 77-83.

Alm, A. K., Norstrom, E., Sundelin, J., and Nystedt, S. (1999). Stimulation of proteinase activated receptor-2 causes endothelial cells to promote blood coagulation in vitro. *Thromb Haemost* 81, 984-988.

- Asokanathan, N., Graham, P. T., Fink, J., Knight, D. A., Bakker, A. J., McWilliam, A. S., Thompson, P. J., and Stewart, G. A. (2002). Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol* 168, 3577-3585.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. Green and Wiley, New York.
- Bajaj, M. S., Kuppuswamy, M. N., Saito, H., Spitzer, S. G., and Bajaj, S. P. (1990). Cultured normal human hepatocytes do not synthesize lipoprotein-associated coagulation inhibitor: evidence that endothelium is the principal site of its synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8869-8873.
- Bazan, J. F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6934-6938.
- Belham, C. M., Tate, R. J., Scott, P. H., Pemberton, A. D., Miller, H. R., Wadsworth, R. M., Gould, G. W., and Plevin, R. (1996). Trypsin stimulates proteinase-activated receptor-2-dependent and -independent activation of mitogen-activated protein kinases. *Biochem J* 320, 939-946.
- Belting, M., Dorrell, M. I., Sandgren, S., Aguilar, E., Ahamed, J., Dorfleutner, A., Carmeliet, P., Mueller, B. M., Friedlander, M., and Ruf, W. (2004). Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med* 10, 502-509.
- Benaud, C., Dickson, R. B., and Lin, C. (2001). Regulation of the activity of matriptase on epithelial cell surfaces by a blood-derived factor. *Eur J Biochem* 268, 1439-1447.
- Benaud, C., Oberst, M., Dickson, R. B., and Lin, C. Y. (2002a). Deregulated activation of matriptase in breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 19, 639-649.
- Benaud, C., Oberst, M., Hobson, J. P., Spiegel, S., Dickson, R. B., and Lin, C. Y. (2002b). Sphingosine 1-phosphate, present in serum-derived lipoproteins, activates matriptase. *J Biol Chem* 277, 10539-10546.
- Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Mendrick, D. L., Cotran, R. S., and Gimbrone, M. A., Jr.

(1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 9238-9242.

Bevilacqua, M. P., Stengelin, S., Gimbrone, M. A., Jr., and Seed, B. (1989). Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* *243*, 1160-1165.

Bhatt, A. S., Takeuchi, T., Ylstra, B., Ginzinger, D., Albertson, D., Shuman, M. A., and Craik, C. S. (2003). Quantitation of membrane type serine protease 1 (MT-SP1) in transformed and normal cells. *Biol Chem* *384*, 257-266.

Blackhart, B. D., Emilsson, K., Nguyen, D., Teng, W., Martelli, A. J., Nystedt, S., Sundelin, J., and Scarborough, R. M. (1996). Ligand cross-reactivity within the protease-activated receptor family. *J Biol Chem* *271*, 16466-16471.

Boekholdt, S. M., Peters, R. J., Hack, C. E., Day, N. E., Luben, R., Bingham, S. A., Wareham, N. J., Reitsma, P. H., and Khaw, K. T. (2004). IL-8 plasma concentrations and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *24*, 1503-1508.

Böhm, S. K., Khitin, L. M., Grady, E. F., Aponte, G., Payan, D. G., and Bunnett, N. W. (1996a). Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2. *J Biol Chem* *271*, 22003-22016.

Böhm, S. K., Kong, W., Bromme, D., Smeekens, S. P., Anderson, D. C., Connolly, A., Kahn, M., Nelken, N. A., Coughlin, S. R., Payan, D. G., and Bunnett, N. W. (1996b). Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2. *Biochem J* *314*, 1009-1016.

Boisvert, W. A., Santiago, R., Curtiss, L. K., and Terkeltaub, R. A. (1998). A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* *101*, 353-363.

Bono, F., Lamarche, I., and Herbert, J. M. (1997). Induction of vascular smooth muscle cell growth by selective activation of the proteinase activated receptor-2 (PAR-2). *Biochem Biophys Res Commun* *241*, 762-764.

Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I. F. (1998). Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894-897.

Bork, P., and Beckmann, G. (1993). The CUB domain. A widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol* 231, 539-545.

Bretschneider, E., Kaufmann, R., Braun, M., Wittpoth, M., Glusa, E., Nowak, G., and Schror, K. (1999). Evidence for proteinase-activated receptor-2 (PAR-2)-mediated mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 126, 1735-1740.

Bromberg, M. E., Konigsberg, W. H., Madison, J. F., Pawashe, A., and Garen, A. (1995). Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8205-8209.

Bromberg, M. E., Sundaram, R., Homer, R. J., Garen, A., and Konigsberg, W. H. (1999). Role of tissue factor in metastasis: functions of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule. *Thromb Haemost* 82, 88-92.

Buddenkotte, J., Stroh, C., Engels, I. H., Moormann, C., Shpacovitch, V. M., Seeliger, S., Vergnolle, N., Vestweber, D., Luger, T. A., Schulze-Osthoff, K., and Steinhoff, M. (2005). Agonists of proteinase-activated receptor-2 stimulate upregulation of intercellular cell adhesion molecule-1 in primary human keratinocytes via activation of NF-kappa B. *J Invest Dermatol* 124, 38-45.

Busch, G., Seitz, I., Steppich, B., Hess, S., Eckl, R., Schomig, A., and Ott, I. (2005). Coagulation factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leukocytes: implications in acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 461-466.

Camerer, E., Gjernes, E., Wiiger, M., Pringle, S., and Prydz, H. (2000a). Binding of factor VIIa to tissue factor on keratinocytes induces gene expression. *J Biol Chem* 275, 6580-6585.

Camerer, E., Huang, W., and Coughlin, S. R. (2000b). Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5255-5260.

- Camerer, E., Kolsto, A. B., and Prydz, H. (1996a). Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 81, 1-41.
- Camerer, E., Rottingen, J. A., Gjernes, E., Larsen, K., Skartlien, A. H., Iversen, J. G., and Prydz, H. (1999). Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the *egr-1* gene. *J Biol Chem* 274, 32225-32233.
- Camerer, E., Rottingen, J. A., Iversen, J. G., and Prydz, H. (1996b). Coagulation factors VII and X induce Ca²⁺ oscillations in Madin-Darby canine kidney cells only when proteolytically active. *J Biol Chem* 271, 29034-29042.
- Carmeliet, P., Mackman, N., Moons, L., Luther, T., Gressens, P., Van Vlaenderen, I., Demunck, H., Kasper, M., Breier, G., Evrard, P., *et al.* (1996). Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 383, 73-75.
- Casey, P. J. (1995). Protein lipidation in cell signaling. *Science* 268, 221-225.
- Chi, L., Li, Y., Stehno-Bittel, L., Gao, J., Morrison, D. C., Stechschulte, D. J., and Dileepan, K. N. (2001). Interleukin-6 production by endothelial cells via stimulation of protease-activated receptors is amplified by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res* 21, 231-240.
- Cho, E. G., Kim, M. G., Kim, C., Kim, S. R., Seong, I. S., Chung, C., Schwartz, R. H., and Park, D. (2001). N-terminal processing is essential for release of epithin, a mouse type II membrane serine protease. *J Biol Chem* 276, 44581-44589.
- Chokki, M., Eguchi, H., Hamamura, I., Mitsuhashi, H., and Kamimura, T. (2005). Human airway trypsin-like protease induces amphiregulin release through a mechanism involving protease-activated receptor-2-mediated ERK activation and TNF alpha-converting enzyme activity in airway epithelial cells. *Febs J* 272, 6387-6399.
- Chung, A. W., Jurasz, P., Hollenberg, M. D., and Radomski, M. W. (2002). Mechanisms of action of proteinase-activated receptor agonists on human platelets. *Br J Pharmacol* 135, 1123-1132.
- Cicala, C., Pinto, A., Bucci, M., Sorrentino, R., Walker, B., Harriot, P., Cruchley, A., Kapas, S., Howells, G. L., and Cirino, G. (1999). Protease-activated receptor-2

involvement in hypotension in normal and endotoxemic rats in vivo. *Circulation* 99, 2590-2597.

Cocks, T. M., Fong, B., Chow, J. M., Anderson, G. P., Frauman, A. G., Goldie, R. G., Henry, P. J., Carr, M. J., Hamilton, J. R., and Moffatt, J. D. (1999). A protective role for protease-activated receptors in the airways. *Nature* 398, 156-160.

Compton, S. J., Sandhu, S., Wijesuriya, S. J., and Hollenberg, M. D. (2002). Glycosylation of human proteinase-activated receptor-2 (hPAR2): role in cell surface expression and signalling. *Biochem J* 368, 495-505.

Connolly, A. J., Ishihara, H., Kahn, M. L., Farese, R. V., Jr., and Coughlin, S. R. (1996). Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature* 381, 516-519.

Cooper, J. T., Stroka, D. M., Brostjan, C., Palmetshofer, A., Bach, F. H., and Ferran, C. (1996). A20 blocks endothelial cell activation through a NF-kappaB-dependent mechanism. *J Biol Chem* 271, 18068-18073.

Corvera, C. U., Dery, O., McConalogue, K., Böhm, S. K., Khitin, L. M., Caughey, G. H., Payan, D. G., and Bunnett, N. W. (1997). Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J Clin Invest* 100, 1383-1393.

Coughlin, S. R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407, 258-264.

Crossman, D. C., Carr, D. P., Tuddenham, E. G., Pearson, J. D., and McVey, J. H. (1990). The regulation of tissue factor mRNA in human endothelial cells in response to endotoxin or phorbol ester. *J Biol Chem* 265, 9782-9787.

Cseh, S., Gal, P., Sarvari, M., Dobo, J., Lorincz, Z., Schumaker, V. N., and Zavodszky, P. (1996). Functional effects of domain deletions in a multidomain serine protease, C1r. *Mol Immunol* 33, 351-359.

Cunningham, C. C., Gorlin, J. B., Kwiatkowski, D. J., Hartwig, J. H., Janmey, P. A., Byers, H. R., and Stossel, T. P. (1992). Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* 255, 325-327.

Cupit, L. D., Schmidt, V. A., and Bahou, W. F. (1999). Proteolytically activated receptor-3. A member of an emerging gene family of protease receptors expressed on vascular endothelial cells and platelets. *Trends Cardiovasc Med* 9, 42-48.

D'Andrea, M. R., Derian, C. K., Leturcq, D., Baker, S. M., Brunmark, A., Ling, P., Darrow, A. L., Santulli, R. J., Brass, L. F., and Andrade-Gordon, P. (1998). Characterization of protease-activated receptor-2 immunoreactivity in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 46, 157-164.

Damiano, B. P., Cheung, W. M., Santulli, R. J., Fung-Leung, W. P., Ngo, K., Ye, R. D., Darrow, A. L., Derian, C. K., de Garavilla, L., and Andrade-Gordon, P. (1999a). Cardiovascular responses mediated by protease-activated receptor-2 (PAR-2) and thrombin receptor (PAR-1) are distinguished in mice deficient in PAR-2 or PAR-1. *J Pharmacol Exp Ther* 288, 671-678.

Damiano, B. P., D'Andrea, M. R., de Garavilla, L., Cheung, W. M., and Andrade-Gordon, P. (1999b). Increased expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in balloon-injured rat carotid artery. *Thromb Haemost* 81, 808-814.

Darrow, A. L., Fung-Leung, W. P., Ye, R. D., Santulli, R. J., Cheung, W. M., Derian, C. K., Burns, C. L., Damiano, B. P., Zhou, L., Keenan, C. M., *et al.* (1996). Biological consequences of thrombin receptor deficiency in mice. *Thromb Haemost* 76, 860-866.

Dawson, T. C., Kuziel, W. A., Osahar, T. A., and Maeda, N. (1999). Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 143.

de Jonge, E., Friederich, P. W., Vlasuk, G. P., Rote, W. E., Vroom, M. B., Levi, M., and van der Poll, T. (2003). Activation of coagulation by administration of recombinant factor VIIa elicits interleukin 6 (IL-6) and IL-8 release in healthy human subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 495-497.

Derian, C. K., Eckardt, A. J., and Andrade-Gordon, P. (1997). Differential regulation of human keratinocyte growth and differentiation by a novel family of protease-activated receptors. *Cell Growth Differ* 8, 743-749.

Dery, O., Corvera, C. U., Steinhoff, M., and Bunnett, N. W. (1998). Proteinase-

activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 274, C1429-1452.

Dorfleutner, A., Hintermann, E., Tarui, T., Takada, Y., and Ruf, W. (2004). Cross-talk of integrin alpha3beta1 and tissue factor in cell migration. *Mol Biol Cell* 15, 4416-4425.

Dorfleutner, A., and Ruf, W. (2003). Regulation of tissue factor cytoplasmic domain phosphorylation by palmitoylation. *Blood* 102, 3998-4005.

Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J., and Saltiel, A. R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7686-7689.

Dugina, T. N., Kiseleva, E. V., Chistov, I. V., Umarova, B. A., and Strukova, S. M. (2002). Receptors of the PAR family as a link between blood coagulation and inflammation. *Biochemistry (Mosc)* 67, 65-74.

Dunphy, J. T., and Linder, M. E. (1998). Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim Biophys Acta* 1436, 245-261.

Erich, J., Parry, G., Fearn, C., Muller, M., Carmeliet, P., Luther, T., and Mackman, N. (1999). Tissue factor is required for uterine hemostasis and maintenance of the placental labyrinth during gestation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8138-8143.

Fan, L., Yotov, W. V., Zhu, T., Esmailzadeh, L., Joyal, J. S., Sennlaub, F., Heveker, N., Chemtob, S., and Rivard, G. E. (2005). Tissue factor enhances protease-activated receptor-2-mediated factor VIIa cell proliferative properties. *J Thromb Haemost* 3, 1056-1063.

Fattori, E., Cappelletti, M., Costa, P., Sellitto, C., Cantoni, L., Carelli, M., Faggioni, R., Fantuzzi, G., Ghezzi, P., and Poli, V. (1994). Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J Exp Med* 180, 1243-1250.

Ferran, C., Millan, M. T., Csizmadia, V., Cooper, J. T., Brostjan, C., Bach, F. H., and Winkler, H. (1995). Inhibition of NF-kappa B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 214, 212-223.

Friedrich, R., Fuentes-Prior, P., Ong, E., Coombs, G., Hunter, M., Oehler, R., Pierson, D., Gonzalez, R., Huber, R., Bode, W., and Madison, E. (2002). Catalytic Domain Structures of MT-SP1/Matriptase, a Matrix-degrading Transmembrane Serine Proteinase. *J Biol Chem* 277, 2160–2168.

Fyfe, M., Bergstrom, M., Aspengren, S., and Peterson, A. (2005). PAR-2 activation in intestinal epithelial cells potentiates interleukin-1beta-induced chemokine secretion via MAP kinase signaling pathways. *Cytokine* 31, 358-367.

Ghrib, F., Brisset, A. C., Dupouy, D., Terrisse, A. D., Navarro, C., Cadroy, Y., Boneu, B., and Sie, P. (2002). The expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in aortic smooth muscle cells is up-regulated in synthetic compared to contractile phenotype. *Thromb Haemost* 87, 1051-1056.

Gibson, P. R., Birchall, I., Rosella, O., Albert, V., Finch, C. F., Barkla, D. H., and Young, G. P. (1998). Urokinase and the intestinal mucosa: evidence for a role in epithelial cell turnover. *Gut* 43, 656-663.

Gierens, H., Nauck, M., Roth, M., Schinker, R., Schurmann, C., Scharnagl, H., Neuhaus, G., Wieland, H., and Marz, W. (2000). Interleukin-6 stimulates LDL receptor gene expression via activation of sterol-responsive and Sp1 binding elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1777-1783.

Girard, T. J., Warren, L. A., Novotny, W. F., Likert, K. M., Brown, S. G., Miletich, J. P., and Broze, G. J., Jr. (1989). Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature* 338, 518-520.

Gorlach, A., Brandes, R. P., Bassus, S., Kronemann, N., Kirchmaier, C. M., Busse, R., and Schini-Kerth, V. B. (2000). Oxidative stress and expression of p22phox are involved in the up-regulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response to activated platelets. *Faseb J* 14, 1518-1528.

Gosling, J., Slaymaker, S., Gu, L., Tseng, S., Zlot, C. H., Young, S. G., Rollins, B. J., and Charo, I. F. (1999). MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 103, 773-778.

Grand, R. J., Turnell, A. S., and Grabham, P. W. (1996). Cellular consequences of

thrombin-receptor activation. *Biochem J* 313, 353-368.

Gu, J. M., Johns, A., Morser, J., Dole, W. P., Greaves, D. R., and Deng, G. G. (2005). Urokinase plasminogen activator receptor promotes macrophage infiltration into the vascular wall of ApoE deficient mice. *J Cell Physiol* 204, 73-82.

Gu, L., Okada, Y., Clinton, S. K., Gerard, C., Sukhova, G. K., Libby, P., and Rollins, B. J. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2, 275-281.

Guyonnet Duperat, V., Jacquelin, B., Boisseau, P., Arveiler, B., and Nurden, A. T. (1998). Protease-activated receptor genes are clustered on 5q13. *Blood* 92, 25-31.

Hajjar, D. P., and Haberland, M. E. (1997). Lipoprotein trafficking in vascular cells. Molecular Trojan horses and cellular saboteurs. *J Biol Chem* 272, 22975-22978.

Hamilton, J. R., Frauman, A. G., and Cocks, T. M. (2001). Increased expression of protease-activated receptor-2 (PAR2) and PAR4 in human coronary artery by inflammatory stimuli unveils endothelium-dependent relaxations to PAR2 and PAR4 agonists. *Circ Res* 89, 92-98.

Hamilton, J. R., Nguyen, P. B., and Cocks, T. M. (1998). Atypical protease-activated receptor mediates endothelium-dependent relaxation of human coronary arteries. *Circ Res* 82, 1306-1311.

Haudenschild, C. C. (1990). Pathogenesis of restenosis. A correlation of clinical observations with cellular responses. *Z Kardiol* 79 Suppl 3, 17-22.

High, K. A. (1988). Antithrombin III, protein C, and protein S. Naturally occurring anticoagulant proteins. *Arch Pathol Lab Med* 112, 28-36.

Hirano, K., and Kanaide, H. (2003). Role of protease-activated receptors in the vascular system. *J Atheroscler Thromb* 10, 211-225.

Hjortoe, G. M., Petersen, L. C., Albrektsen, T., Sorensen, B. B., Norby, P. L., Mandal, S. K., Pendurthi, U. R., and Rao, L. V. (2004). Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in

increased cell migration. *Blood* 103, 3029-3037.

Hofnagel, O., Luechtenborg, B., Stolle, K., Lorkowski, S., Eschert, H., Plenz, G., and Robenek, H. (2004). Proinflammatory cytokines regulate LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1789-1795.

Holinstat, M., Mehta, D., Kozasa, T., Minshall, R. D., and Malik, A. B. (2003). Protein kinase C α -induced p115RhoGEF phosphorylation signals endothelial cytoskeletal rearrangement. *J Biol Chem* 278, 28793-28798.

Holtmann, H., Winzen, R., Holland, P., Eickemeier, S., Hoffmann, E., Wallach, D., Malinin, N. L., Cooper, J. A., Resch, K., and Kracht, M. (1999). Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 19, 6742-6753.

Hou, L., Kapas, S., Cruchley, A. T., Macey, M. G., Harriott, P., Chinni, C., Stone, S. R., and Howells, G. L. (1998). Immunolocalization of protease-activated receptor-2 in skin: receptor activation stimulates interleukin-8 secretion by keratinocytes in vitro. *Immunology* 94, 356-362.

Howells, G. L., Macey, M. G., Chinni, C., Hou, L., Fox, M. T., Harriott, P., and Stone, S. R. (1997). Proteinase-activated receptor-2: expression by human neutrophils. *J Cell Sci* 110 (Pt 7), 881-887.

Huang, C., De Sanctis, G. T., O'Brien, P. J., Mizgerd, J. P., Friend, D. S., Drazen, J. M., Brass, L. F., and Stevens, R. L. (2001). Evaluation of the substrate specificity of human mast cell tryptase beta I and demonstration of its importance in bacterial infections of the lung. *J Biol Chem* 276, 26276-26284.

Huber, A. R., Kunkel, S. L., Todd, R. F., 3rd, and Weiss, S. J. (1991). Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254, 99-102.

Hung, R. J., Hsu, I. a. W., Dreiling, J. L., Lee, M. J., Williams, C. A., Oberst, M. D., Dickson, R. B., and Lin, C. Y. (2004). Assembly of adherens junctions is required for sphingosine 1-phosphate-induced matriptase accumulation and activation at mammary

epithelial cell-cell contacts. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C1159-C1169.

Hwa, J. J., Ghibaudi, L., Williams, P., Chintala, M., Zhang, R., Chatterjee, M., and Sybertz, E. (1996). Evidence for the presence of a proteinase-activated receptor distinct from the thrombin receptor in vascular endothelial cells. *Circ Res* 78, 581-588.

Iaccarino, G., Tomhave, E. D., Lefkowitz, R. J., and Koch, W. J. (1998). Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by beta-adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation* 98, 1783-1789.

Ikeda, U., Ito, T., and Shimada, K. (2001). Interleukin-6 and acute coronary syndrome. *Clin Cardiol* 24, 701-704.

Ikonomidis, I., Andreotti, F., Economou, E., Stefanadis, C., Toutouzas, P., and Nihoyannopoulos, P. (1999). Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* 100, 793-798.

Ishihara, H., Connolly, A. J., Zeng, D., Kahn, M. L., Zheng, Y. W., Timmons, C., Tram, T., and Coughlin, S. R. (1997). Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386, 502-506.

Ishii, K., Chen, J., Ishii, M., Koch, W. J., Freedman, N. J., Lefkowitz, R. J., and Coughlin, S. R. (1994). Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 269, 1125-1130.

Jackson, J. R., Bolognese, B., Hillegass, L., Kassis, S., Adams, J., Griswold, D. E., and Winkler, J. D. (1998). Pharmacological effects of SB 220025, a selective inhibitor of P38 mitogen-activated protein kinase, in angiogenesis and chronic inflammatory disease models. *J Pharmacol Exp Ther* 284, 687-692.

Jiang, X., Bailly, M. A., Panetti, T. S., Cappello, M., Konigsberg, W. H., and Bromberg, M. E. (2004). Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex promotes cellular signaling and migration of human breast cancer cells. *J Thromb Haemost* 2, 93-101.

Jin, X., Hirosaki, T., Lin, C. Y., Dickson, R. B., Higashi, S., Kitamura, H., and Miyazaki, K. (2005). Production of soluble matriptase by human cancer cell lines and cell surface

activation of its zymogen by trypsin. *J Cell Biochem* 95, 632-647.

Johansson, U., Lawson, C., Dabare, M., Syndercombe-Court, D., Newland, A. C., Howells, G. L., and Macey, M. G. (2005). Human peripheral blood monocytes express protease receptor-2 and respond to receptor activation by production of IL-6, IL-8, and IL-1{beta}. *J Leukoc Biol* 78, 967-975.

Johnson, M. D., Oberst, M. D., Lin, C. Y., and Dickson, R. B. (2003). Possible role of matriptase in the diagnosis of ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 3, 331-338.

Kahn, M. L., Hammes, S. R., Botka, C., and Coughlin, S. R. (1998a). Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family. *J Biol Chem* 273, 23290-23296.

Kahn, M. L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M. J., Ishihara, H., and Coughlin, S. R. (1999). Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* 103, 879-887.

Kahn, M. L., Zheng, Y. W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., Farese, R. V., Jr., Tam, C., and Coughlin, S. R. (1998b). A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394, 690-694.

Kang, J. Y., Dolled-Filhart, M., Ocal, I. T., Singh, B., Lin, C. Y., Dickson, R. B., Rimm, D. L., and Camp, R. L. (2003a). Tissue microarray analysis of hepatocyte growth factor/Met pathway components reveals a role for Met, matriptase, and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 in the progression of node-negative breast cancer. *Cancer Res* 63, 1101-1105.

Kang, O. H., Jeong, H. J., Kim, D. K., Choi, S. C., Kim, T. H., Nah, Y. H., Kim, H. M., and Lee, Y. M. (2003b). Trypsin induces tumour necrosis factor-alpha secretion from a human leukemic mast cell line. *Cell Biochem Funct* 21, 161-167.

Kanke, T., Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Davenport, E., Paul, A., McKenzie, R. C., and Plevin, R. (2001). Proteinase-activated receptor-2-mediated activation of stress-activated protein kinases and inhibitory kappa B kinases in NCTC 2544 keratinocytes. *J Biol Chem* 276, 31657-61666.

- Kanke, T., Takizawa, T., Kabeya, M., and Kawabata, A. (2005). Physiology and pathophysiology of proteinase-activated receptors (PARs): PAR-2 as a potential therapeutic target. *J Pharmacol Sci* 97, 38-42.
- Kashyap, V. S., Santamarina-Fojo, S., Brown, D. R., Parrott, C. L., Applebaum-Bowden, D., Meyn, S., Talley, G., Paigen, B., Maeda, N., and Brewer, H. B., Jr. (1995). Apolipoprotein E deficiency in mice: gene replacement and prevention of atherosclerosis using adenovirus vectors. *J Clin Invest* 96, 1612-1620.
- Kataoka, H., Miyata, S., Uchinokura, S., and Itoh, H. (2003). Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. *Cancer Metastasis Rev* 22, 223-236.
- Kato, K., Elsayed, Y. A., Namoto, M., Nakagawa, K., and Sueishi, K. (1996). Enhanced expression of tissue factor activity in the atherosclerotic aortas of cholesterol-fed rabbits. *Thromb Res* 82, 335-347.
- Kaufmann, R., Schafberg, H., and Nowak, G. (1998). Proteinase-activated receptor-2-mediated signaling and inhibition of DNA synthesis in human pancreatic cancer cells. *Int J Pancreatol* 24, 97-102.
- Kawabata, A. (2002). PAR-2: structure, function and relevance to human diseases of the gastric mucosa. *Expert Rev Mol Med* 2002, 1-17.
- Kawabata, A., Kuroda, R., Minami, T., Kataoka, K., and Taneda, M. (1998). Increased vascular permeability by a specific agonist of protease-activated receptor-2 in rat hindpaw. *Br J Pharmacol* 125, 419-422.
- Kawao, N., Nagataki, M., Nagasawa, K., Kubo, S., Cushing, K., Wada, T., Sekiguchi, F., Ichida, S., Hollenberg, M. D., MacNaughton, W. K., *et al.* (2005). Signal transduction for proteinase-activated receptor-2-triggered prostaglandin E2 formation in human lung epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 315, 576-589.
- Kim, M. G., Chen, C., Lyu, M. S., Cho, E. G., Park, D., Kozak, C., and Schwartz, R. H. (1999). Cloning and chromosomal mapping of a gene isolated from thymic stromal cells encoding a new mouse type II membrane serine protease, epithin, containing four LDL receptor modules and two CUB domains. *Immunogenetics* 49, 420-428.

- Kim, M. S., Jo, H., Um, J. Y., Yi, J. M., Kim, D. K., Choi, S. C., Kim, T. H., Nah, Y. H., Kim, H. M., and Lee, Y. M. (2002). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce TNF-alpha secretion from astrocytoma cells. *Cell Biochem Funct* 20, 339-345.
- Kitamoto, Y., Yuan, X., Wu, Q., McCourt, D. W., and Sadler, J. E. (1994). Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7588-7592.
- Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Liotta, L. A., Robey, P. G., Tryggvason, K., and Martin, G. R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21, 6188-6193.
- Koo, B. H., Chung, K. H., Hwang, K. C., and Kim, D. S. (2002). Factor Xa induces mitogenesis of coronary artery smooth muscle cell via activation of PAR-2. *FEBS Lett* 523, 85-89.
- Koomagi, R., and Volm, M. (1998). Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis. *Int J Cancer* 79, 19-22.
- Krishnaswamy, G., Kelley, J., Yerra, L., Smith, J. K., and Chi, D. S. (1999). Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res* 19, 91-104.
- Kunsch, C., Lang, R. K., Rosen, C. A., and Shannon, M. F. (1994). Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* 153, 153-164.
- Langer, F., Morys-Wortmann, C., Kusters, B., and Storck, J. (1999). Endothelial protease-activated receptor-2 induces tissue factor expression and von Willebrand factor release. *Br J Haematol* 105, 542-550.
- Lee, J. W., Yong Song, S., Choi, J. J., Lee, S. J., Kim, B. G., Park, C. S., Lee, J. H., Lin, C. Y., Dickson, R. B., and Bae, D. S. (2005a). Increased expression of matriptase is associated with histopathologic grades of cervical neoplasia. *Hum Pathol* 36, 626-633.

- Lee, M. S., Kiyomiya, K., Benaud, C., Dickson, R. B., and Lin, C. Y. (2005b). Simultaneous activation and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1-mediated inhibition of matriptase induced at activation foci in human mammary epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C932-941.
- Lee, S. L., Dickson, R. B., and Lin, C. Y. (2000). Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J Biol Chem* 275, 36720-36725.
- Lerner, D. J., Chen, M., Tram, T., and Coughlin, S. R. (1996). Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function. *J Biol Chem* 271, 13943-13947.
- Leytus, S. P., Loeb, K. R., Hagen, F. S., Kurachi, K., and Davie, E. W. (1988). A novel trypsin-like serine protease (hepsin) with a putative transmembrane domain expressed by human liver and hepatoma cells. *Biochemistry* 27, 1067-1074.
- Li, Z., Zhang, G., Feil, R., Han, J., and Du, X. (2006). Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin α IIb β 3. *Blood* 107, 965-972.
- Libby, P. (2001). Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104, 365-372.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.
- Lin, C. Y., Anders, J., Johnson, M., and Dickson, R. B. (1999a). Purification and characterization of a complex containing matriptase and a Kunitz-type serine protease inhibitor from human milk. *J Biol Chem* 274, 18237-18242.
- Lin, C. Y., Anders, J., Johnson, M., Sang, Q. A., and Dickson, R. B. (1999b). Molecular Cloning of cDNA for Matriptase, a Matrix-degrading Serine Protease with Trypsin-like Activity. *J Biol Chem* 274, 18231-18236.
- Lin, C. Y., Wang, J. K., Torri, J., Dou, L., Sang, Q. A., and Dickson, R. B. (1997). Characterization of a novel, membrane-bound, 80-kDa matrix-degrading protease from human breast cancer cells. Monoclonal antibody production, isolation, and localization.

J Biol Chem 272, 9147-9152.

Lindner, J. R., Kahn, M. L., Coughlin, S. R., Sambrano, G. R., Schauble, E., Bernstein, D., Foy, D., Hafezi-Moghadam, A., and Ley, K. (2000). Delayed onset of inflammation in protease-activated receptor-2-deficient mice. *J Immunol* 165, 6504-6510.

List, K., Haudenschild, C. C., Szabo, R., Chen, W., Wahl, S. M., Swaim, W., Engelholm, L. H., Behrendt, N., and Bugge, T. H. (2002). Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis. *Oncogene* 21, 3765-3779.

List, K., Szabo, R., Molinolo, A., Sriuranpong, V., Redeye, V., Murdock, T., Burke, B., Nielsen, B. S., Gutkind, J. S., and Bugge, T. H. (2005). Deregulated matriptase causes ras-independent multistage carcinogenesis and promotes ras-mediated malignant transformation. *Genes Dev* 19, 1934-1950.

List, K., Szabo, R., Wertz, P. W., Segre, J., Haudenschild, C. C., Kim, S. Y., and Bugge, T. H. (2003). Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1. *J Cell Biol* 163, 901-910.

Lu, C., Zhao, F. D., Li, X. B., and Yin, L. H. (2005). Up regulation of interleukin-8 expressions induced by mast cell tryptase via protease activated receptor-2 in endothelial cell line. *Chin Med J (Engl)* 118, 1900-1906.

Ludeman, M. J., Kataoka, H., Srinivasan, Y., Esmon, N. L., Esmon, C. T., and Coughlin, S. R. (2005). PAR1 cleavage and signaling in response to activated protein C and thrombin. *J Biol Chem* 280, 13122-13128.

Lukacs, N. W., Strieter, R. M., Elnor, V., Evanoff, H. L., Burdick, M. D., and Kunkel, S. L. (1995). Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood* 86, 2767-2773.

Mackie, E. J., Pagel, C. N., Smith, R., de Niese, M. R., Song, S. J., and Pike, R. N. (2002). Protease-activated receptors: a means of converting extracellular proteolysis into intracellular signals. *IUBMB Life* 53, 277-281.

Mackman, N. (2004). Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular

development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1015-1022.

Mackman, N., Brand, K., and Edgington, T. S. (1991). Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. *J Exp Med* 174, 1517-1526.

Manna, S. K., and Ramesh, G. T. (2005). Interleukin-8 induces nuclear transcription factor-kappaB through a TRAF6-dependent pathway. *J Biol Chem* 280, 7010-7021.

Maree, A., and Fitzgerald, D. (2002). PAR2 is partout and now in the heart. *Circ Res* 90, 366-368.

Marmur, J. D., Thiruvikraman, S. V., Fyfe, B. S., Guha, A., Sharma, S. K., Ambrose, J. A., Fallon, J. T., Nemerson, Y., and Taubman, M. B. (1996). Identification of active tissue factor in human coronary atheroma. *Circulation* 94, 1226-1232.

Marutsuka, K., Hatakeyama, K., Sato, Y., Yamashita, A., Sumiyoshi, A., and Asada, Y. (2002). Protease-activated receptor 2 (PAR2) mediates vascular smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor VIIa complex. *Thromb Res* 107, 271-276.

McGuire, J. J. (2004). Proteinase-activated Receptor 2 (PAR2): a challenging new target for treatment of vascular diseases. *Curr Pharm Des* 10, 2769-2778.

McLean, P. G., Aston, D., Sarkar, D., and Ahluwalia, A. (2002). Protease-activated receptor-2 activation causes EDHF-like coronary vasodilation: selective preservation in ischemia/reperfusion injury: involvement of lipoxygenase products, VR1 receptors, and C-fibers. *Circ Res* 90, 465-472.

Mehta, D., Rahman, A., and Malik, A. B. (2001). Protein kinase C-alpha signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *J Biol Chem* 276, 22614-22620.

Meyer, M. C., Creer, M. H., and McHowat, J. (2005). Potential role for mast cell tryptase in recruitment of inflammatory cells to endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C1485-1491.

- Miike, S., McWilliam, A. S., and Kita, H. (2001). Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J Immunol* 167, 6615-6622.
- Miller, M. D., and Krangel, M. S. (1992). Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol* 12, 17-46.
- Mirza, H., Schmidt, V. A., Derian, C. K., Jesty, J., and Bahou, W. F. (1997). Mitogenic responses mediated through the proteinase-activated receptor-2 are induced by expressed forms of mast cell alpha- or beta-tryptases. *Blood* 90, 3914-3922.
- Mirza, H., Yatsula, V., and Bahou, W. F. (1996). The proteinase activated receptor-2 (PAR-2) mediates mitogenic responses in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 97, 1705-1714.
- Mody, R. S., and Carson, S. D. (1997). Tissue factor cytoplasmic domain peptide is multiply phosphorylated in vitro. *Biochemistry* 36, 7869-7875.
- Molino, M., Barnathan, E. S., Numerof, R., Clark, J., Dreyer, M., Cumashi, A., Hoxie, J. A., Schechter, N., Woolkalis, M., and Brass, L. F. (1997a). Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem* 272, 4043-4049.
- Molino, M., Raghunath, P. N., Kuo, A., M., A., Hoxie, J. A., Brass, L. F., and Barnathan, E. S. (1998). Differential expression of functional protease-activated receptor-2 (PAR-2) in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 825-832.
- Molino, M., Woolkalis, M. J., Reavey-Cantwell, J., Pratico, D., Andrade-Gordon, P., Barnathan, E. S., and Brass, L. F. (1997b). Endothelial cell thrombin receptors and PAR-2. Two protease-activated receptors located in a single cellular environment. *J Biol Chem* 272, 11133-11141.
- Moons, A. H., Levi, M., and Peters, R. J. (2002). Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 53, 313-325.
- Mori, E., Komori, K., Yamaoka, T., Tanii, M., Kataoka, C., Takeshita, A., Usui, M., Egashira, K., and Sugimachi, K. (2002). Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive

remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 105, 2905-2910.

Mueller, B. M., and Ruf, W. (1998). Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest* 101, 1372-1378.

Myatt, A., and Hill, S. J. (2005). Trypsin stimulates the phosphorylation of p42,44 mitogen-activated protein kinases via the proteinase-activated receptor-2 and protein kinase C epsilon in human cultured prostate stromal cells. *Prostate* 64, 175-185.

Nakanishi-Matsui, M., Zheng, Y. W., Sulciner, D. J., Weiss, E. J., Ludeman, M. J., and Coughlin, S. R. (2000). PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404, 609-613.

Napoli, C., Cicala, C., Wallace, J. L., de Nigris, F., Santagada, V., Caliendo, G., Franconi, F., Ignarro, L. J., and Cirino, G. (2000). Protease-activated receptor-2 modulates myocardial ischemia-reperfusion injury in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3678-3683.

Napoli, C., De Nigris, F., Cicala, C., Wallace, J. L., Caliendo, G., Condorelli, M., Santagada, V., and Cirino, G. (2002). Protease-activated receptor-2 activation improves efficiency of experimental ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H2004-2010.

Napoli, C., de Nigris, F., Wallace, J. L., Hollenberg, M. D., Tajana, G., De Rosa, G., Sica, V., and Cirino, G. (2004). Evidence that protease activated receptor 2 expression is enhanced in human coronary atherosclerotic lesions. *J Clin Pathol* 57, 513-516.

Nusrat, A., Parkos, C. A., Bacarra, A. E., Godowski, P. J., Delp-Archer, C., Rosen, E. M., and Madara, J. L. (1994). Hepatocyte growth factor/scatter factor effects on epithelia. Regulation of intercellular junctions in transformed and nontransformed cell lines, basolateral polarization of c-met receptor in transformed and natural intestinal epithelia, and induction of rapid wound repair in a transformed model epithelium. *J Clin Invest* 93, 2056-2065.

Nystedt, S., Emilsson, K., Larsson, A. K., Strombeck, B., and Sundelin, J. (1995a). Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human

proteinase-activated receptor 2. *Eur J Biochem* 232.

Nystedt, S., Emilsson, K., Wahlestedt, C., and Sundelin, J. (1994). Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9208-9212.

Nystedt, S., Larsson, A. K., Aberg, H., and Sundelin, J. (1995b). The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression. *J Biol Chem* 270, 5950-5955.

Nystedt, S., Ramakrishnan, V., and Sundelin, J. (1996). The proteinase-activated receptor 2 is induced by inflammatory mediators in human endothelial cells. Comparison with the thrombin receptor. *J Biol Chem* 271, 14910-14915.

O'Brien, P. J., Molino, M., Kahn, M., and Brass, L. F. (2001). Protease activated receptors: theme and variations. *Oncogene* 20, 1570-1581.

O'Brien, P. J., Prevost, N., Molino, M., Hollinger, M. K., Woolkalis, M. J., Woulfe, D. S., and Brass, L. F. (2000). Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. *J Biol Chem* 275, 13502-13509.

Oberst, M. D., Anders, J., Xie, B., Singh, B., Ossandon, M., Johnson, M., Dickson, R. B., and Lin, C. Y. (2001). Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 158, 1301-1311.

Oberst, M. D., Chen, L. Y., Kiyomiya, K., Williams, C. A., Lee, M. S., Johnson, M. D., Dickson, R. B., and Lin, C. Y. (2005). HAI-1 regulates activation and expression of matriptase, a membrane-bound serine protease. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C462-470.

Oberst, M. D., Johnson, M. D., Dickson, R. B., Lin, C. Y., Singh, B., Stewart, M., Williams, A., al-Nafussi, A., Smyth, J. F., Gabra, H., and Sellar, G. C. (2002). Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters. *Clin Cancer Res* 8, 1101-1107.

Oberst, M. D., Singh, B., Ozdemirli, M., Dickson, R. B., Johnson, M. D., and Li, C.

(2003a). Characterization of Matriptase Expression in Normal Human Tissues. *J Histochem Cytochem* 51, 1017-1025.

Oberst, M. D., Williams, C. A., Dickson, R. B., Johnson, M. D., and Lin, C. (2003b). The Activation of Matriptase Requires Its Noncatalytic Domains, Serine Protease Domain, and Its Cognate Inhibitor. *J Biol Chem* 278, 26773-26779.

Oh, H. M., Choi, S. C., Lee, H. S., Chun, C. H., Seo, G. S., Choi, E. Y., Lee, H. J., Lee, M. S., Yeom, J. J., Choi, S. J., *et al.* (2004). Combined action of extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase rescues Molt4 T cells from nitric oxide-induced apoptotic and necrotic cell death. *Free Radic Biol Med* 37, 463-479.

Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., and Lobb, R. (1989). Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59, 1203-1211.

Oshiro, A., Otani, H., Yagi, Y., Fukuhara, S., and Inagaki, C. (2004). Protease-activated receptor-2-mediated inhibition for Ca²⁺ response to lipopolysaccharide in Guinea pig tracheal epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 886-892.

Ott, I., Fischer, E. G., Miyagi, Y., Mueller, B. M., and Ruf, W. (1998). A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J Cell Biol* 140, 1241-1253.

Ott, I., Michaelis, C., Schuermann, M., Steppich, B., Seitz, I., Dewerchin, M., Zohlnhofer, D., Wessely, R., Rudelius, M., Schomig, A., and Carmeliet, P. (2005a). Vascular remodeling in mice lacking the cytoplasmic domain of tissue factor. *Circ Res* 97, 293-298.

Ott, I., Weigand, B., Michl, R., Seitz, I., Sabbari-Erfani, N., Neumann, F. J., and Schomig, A. (2005b). Tissue factor cytoplasmic domain stimulates migration by activation of the GTPase Rac1 and the mitogen-activated protein kinase p38. *Circulation* 111, 349-355.

Page, K., Hughes, V. S., Odoms, K. K., Dunsmore, K. E., and Hershenson, M. B. (2005). German cockroach proteases regulate interleukin-8 expression via nuclear factor for interleukin-6 in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32,

225-231.

Page, K., Strunk, V. S., and Hershenson, M. B. (2003). Cockroach proteases increase IL-8 expression in human bronchial epithelial cells via activation of protease-activated receptor (PAR)-2 and extracellular-signal-regulated kinase. *J Allergy Clin Immunol* 112, 1112-1118.

Parry, M. A., Myles, T., Tschopp, J., and Stone, S. R. (1996). Cleavage of the thrombin receptor: identification of potential activators and inactivators. *Biochem J* 320 (Pt 1), 335-341.

Pendurthi, U. R., Allen, K. E., Ezban, M., and Rao, L. V. (2000). Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. *J Biol Chem* 275, 14632-14641.

Pendurthi, U. R., Alok, D., and Rao, L. V. (1997). Binding of factor VIIa to tissue factor induces alterations in gene expression in human fibroblast cells: up-regulation of poly(A) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12598-12603.

Pendurthi, U. R., and Rao, L. V. (2002). Factor VIIa/tissue factor-induced signaling: a link between clotting and disease. *Vitam Horm* 64, 323-355.

Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M., and Breslow, J. L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343-353.

Pober, J. S., Lapierre, L. A., Stolpen, A. H., Brock, T. A., Springer, T. A., Fiers, W., Bevilacqua, M. P., Mendrick, D. L., and Gimbrone, M. A., Jr. (1987). Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol* 138, 3319-3324.

Poulsen, L. K., Jacobsen, N., Sorensen, B. B., Bergenhem, N. C., Kelly, J. D., Foster, D. C., Thastrup, O., Ezban, M., and Petersen, L. C. (1998). Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa

to tissue factor. *J Biol Chem* 273, 6228-6232.

Rasmussen, U. B., Vouret-Craviari, V., Jallat, S., Schlesinger, Y., Pages, G., Pavirani, A., Lecocq, J. P., Pouyssegur, J., and Van Obberghen-Schilling, E. (1991). cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilization. *FEBS Lett* 288, 123-128.

Reape, T. J., and Groot, P. H. (1999). Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 147, 213-225.

Reckless, J., Rubin, E. M., Verstuyft, J. B., Metcalfe, J. C., and Grainger, D. J. (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 but not tumor necrosis factor-alpha is correlated with monocyte infiltration in mouse lipid lesions. *Circulation* 99, 2310-2316.

Riewald, M., and Ruf, W. (2001). Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7742-7747.

Roche, N., Stirling, R. G., Lim, S., Oliver, B. G., Oates, T., Jazrawi, E., Caramori, G., and Chung, K. F. (2003). Effect of acute and chronic inflammatory stimuli on expression of protease-activated receptors 1 and 2 in alveolar macrophages. *J Allergy Clin Immunol* 111, 367-373.

Roebuck, K. A. (1999). Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 19, 429-438.

Rosen, E. D., Chan, J. C., Idusogie, E., Clotman, F., Vlasuk, G., Luther, T., Jalbert, L. R., Albrecht, S., Zhong, L., Lissens, A., *et al.* (1997). Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature* 390, 290-294.

Ross, R. (1999a). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126.

Ross, R. (1999b). Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138, S419-S420.

Ross, R., and Glomset, J. A. (1976a). The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med* 295, 369-377.

Ross, R., and Glomset, J. A. (1976b). The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med* 295, 420-425.

Rottingen, J. A., Enden, T., Camerer, E., Iversen, J. G., and Prydz, H. (1995). Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca²⁺ signals in J82 cells, transfected COS-1 cells, Madin-Darby canine kidney cells and in human endothelial cells induced to synthesize tissue factor. *J Biol Chem* 270, 4650-4660.

Ruf, W., Kalnik, M. W., Lund-Hansen, T., and Edgington, T. S. (1991). Characterization of factor VII association with tissue factor in solution. High and low affinity calcium binding sites in factor VII contribute to functionally distinct interactions. *J Biol Chem* 266, 15719-15725.

Ruf, W., and Mueller, B. M. (1996). Tissue factor in cancer angiogenesis and metastasis. *Curr Opin Hematol* 3, 379-384.

Rus, H. G., Vlaicu, R., and Niculescu, F. (1996). Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis* 127, 263-271.

Sabharwal, A. K., Birktoft, J. J., Gorka, J., Wildgoose, P., Petersen, L. C., and P., B. S. (1995). High affinity Ca(2+)-binding site in the serine protease domain of human factor VIIa and its role in tissue factor binding and development of catalytic activity. *J Biol Chem* 270, 15523-15530.

Sabri, A., Muske, G., Zhang, H., Pak, E., Darrow, A., Andrade-Gordon, P., and Steinberg, S. F. (2000). Signaling properties and functions of two distinct cardiomyocyte protease-activated receptors. *Circ Res* 86, 1054-1061.

Sachs, C. W., Safa, A. R., Harrison, S. D., and Fine, R. L. (1995). Partial inhibition of multidrug resistance by safinolol is independent of modulation of P-glycoprotein substrate activities and correlated with inhibition of protein kinase C. *J Biol Chem* 270, 26639-26648.

Santin, A. D., Cane', S., Bellone, S., Bignotti, E., Palmieri, M., De Las Casas, L. E., Anfossi, S., Roman, J. J., O'Brien, T., and Pecorelli, S. (2003). The novel serine protease tumor-associated differentially expressed gene-15 (matriptase/MT-SP1) is

highly overexpressed in cervical carcinoma. *Cancer* 98, 1898-1904.

Sato, Y., Asada, Y., Marutsuka, K., Hatakeyama, K., and Sumiyoshi, A. (1996). Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 75, 389-392.

Satomi, S., Yamasaki, Y., Tsuzuki, S., Hitomi, Y., Iwanaga, T., and Fushiki, T. (2001). A Role for Membrane-Type Serine Protease (MT-SP1) in Intestinal Epithelial Turnover. *Biochem Biophys Res Comm* 287, 995-1002.

Schechter, N. M., Brass, L. F., Lavker, R. M., and Jensen, P. J. (1998). Reaction of mast cell proteases tryptase and chymase with protease activated receptors (PARs) on keratinocytes and fibroblasts. *J Cell Physiol* 176, 365-373.

Schechter, A. D., Giesen, P. L., Taby, O., Rosenfield, C. L., Rossikhina, M., Fyfe, B. S., Kohtz, D. S., Fallon, J. T., Nemerson, Y., and Taubman, M. B. (1997). Tissue factor expression in human arterial smooth muscle cells. TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation. *J Clin Invest* 100, 2276-2285.

Schieffer, B., Selle, T., Hilfiker, A., Hilfiker-Kleiner, D., Grote, K., Tietge, U. J., Trautwein, C., Luchtefeld, M., Schmittkamp, C., Heeneman, S., *et al.* (2004). Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 110, 3493-3500.

Schmidt, V. A., Nierman, W. C., Maglott, D. R., Cupit, L. D., Moskowitz, K. A., Wainer, J. A., and Bahou, W. F. (1998). The human proteinase-activated receptor-3 (PAR-3) gene. Identification within a Par gene cluster and characterization in vascular endothelial cells and platelets. *J Biol Chem* 273, 15061-15068.

Schonbeck, U., Mach, F., Sukhova, G. K., Herman, M., Graber, P., Kehry, M. R., and Libby, P. (2000). CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol* 156, 7-14.

Schultheiss, M., Neumcke, B., and Richter, H. P. (1997). Endogenous trypsin receptors in *Xenopus* oocytes: linkage to internal calcium stores. *Cell Mol Life Sci* 53, 842-849.

Sethi, A. S., Lees, D. M., Douthwaite, J. A., and Corder, R. (2005). Factor VIIa

stimulates endothelin-1 synthesis in TNF-primed endothelial cells by activation of protease-activated receptor 2. *Clin Sci (Lond)* 108, 255-263.

Sharma, L., Melis, E., Hickey, M. J., Clyne, C. D., Erlich, J., Khachigian, L. M., Davenport, P., Morand, E., Carmeliet, P., and Tipping, P. G. (2004). The cytoplasmic domain of tissue factor contributes to leukocyte recruitment and death in endotoxemia. *Am J Pathol* 165, 331-340.

Shi, Y. E., Torri, J., Yieh, L., Wellstein, A., Lippman, M. E., and Dickson, R. B. (1993). Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells. *Cancer Res* 53, 1409-1415.

Shimizu, T., Nishihira, J., Watanabe, H., Abe, R., Honda, A., Ishibashi, T., and Shimizu, H. (2004). Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells. *J Biol Chem* 279, 13729-13737.

Shimomura, T., Denda, K., Kawaguchi, T., Matsumoto, K., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (1999). Multiple sites of proteolytic cleavage to release soluble forms of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 from a transmembrane form. *J Biochem (Tokyo)* 126, 821-828.

Shimomura, T., Denda, K., Kitamura, A., Kawaguchi, T., Kito, M., Kondo, J., Kagaya, S., Qin, L., Takata, H., Miyazawa, K., and Kitamura, N. (1997). Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor. *J Biol Chem* 272, 6370-6376.

Shpacovitch, V. M., Brzoska, T., Buddenkotte, J., Stroh, C., Sommerhoff, C. P., Ansel, J. C., Schulze-Osthoff, K., Bunnett, N. W., Luger, T. A., and Steinhoff, M. (2002). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce cytokine release and activation of nuclear transcription factor kappaB in human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 118, 380-385.

Smith, R., Ransjo, M., Tatarczuch, L., Song, S. J., Pagel, C., Morrison, J. R., Pike, R. N., and Mackie, E. J. (2004). Activation of protease-activated receptor-2 leads to inhibition of osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res* 19, 507-516.

Sobey, C. G., Moffatt, J. D., and Cocks, T. M. (1999). Evidence for selective effects of

chronic hypertension on cerebral artery vasodilatation to protease-activated receptor-2 activation. *Stroke* 30, 1933-1940; discussion 1941.

Song, L., and Schindler, C. (2004). IL-6 and the acute phase response in murine atherosclerosis. *Atherosclerosis* 177, 43-51.

Sorensen, B. B., Freskgard, P. O., Nielsen, L. S., Rao, L. V., Ezban, M., and Petersen, L. C. (1999). Factor VIIa-induced p44/42 mitogen-activated protein kinase activation requires the proteolytic activity of factor VIIa and is independent of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 274, 21349-21354.

Steinberg, S. F. (2005). The cardiovascular actions of protease-activated receptors. *Mol Pharmacol* 67, 2-11.

Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S. H., Tognetto, M., Amadesi, S., Ennes, H. S., Trevisani, M., Hollenberg, M. D., Wallace, J. L., Caughey, G. H., *et al.* (2000). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6, 151-158.

Stoeckle, M. Y., and Barker, K. A. (1990). Two burgeoning families of platelet factor 4-related proteins: mediators of the inflammatory response. *New Biol* 2, 313-323.

Stopeck, A. T., Nicholson, A. C., Mancini, F. P., and Hajjar, D. P. (1993). Cytokine regulation of low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 cells. *J Biol Chem* 268.

Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Showell, H. J., and Marks, R. M. (1988). Monokine-induced gene expression of a human endothelial cell-derived neutrophil chemotactic factor. *Biochem Biophys Res Commun* 156, 1340-1345.

Suzuki, M., Kobayashi, H., Kanayama, N., Saga, Y., Suzuki, M., Lin, C., Dickson, R. B., and Terao, T. (2004). Inhibition of Tumor Invasion by Genomic Down-regulation of Matriptase through Suppression of Activation of Receptor-bound Pro-urokinase. *J Biol Chem* 279, 14899–14908.

Suzuki, M., Kobayashi, H., Tanaka, Y., Hirashima, Y., Kanayama, N., Takei, Y., Saga, Y., Itoh, H., and Terao, T. (2003). Bikunin target genes in ovarian cancer cells identified

by microarray analysis. *J Biol Chem* 278, 14640-14646.

Takeuchi, T., Harris, J. L., Huang, W., Yan, K. W., Coughlin, S. R., and Craik, C. S. (2000). Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. *J Biol Chem* 275, 26333-26342.

Takeuchi, T., Shuman, M. A., and Craik, C. S. (1999). Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11054-11061.

Tanaka, M., Arai, H., Liu, N., Nogaki, F., Nomura, K., Kasuno, K., Oida, E., Kita, T., and Ono, T. (2005). Role of coagulation factor Xa and protease-activated receptor 2 in human mesangial cell proliferation. *Kidney Int* 67, 2123-2133.

Taniguchi, T., Kakkar, A. K., Tuddenham, E. G., Williamson, R. C., and Lemoine, N. R. (1998). Enhanced expression of urokinase receptor induced through the tissue factor-factor VIIa pathway in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 58, 4461-4467.

Tanimoto, H., Shigemasa, K., Tian, X., Gu, L., Beard, J. B., Sawasaki, T., and O'Brien, T. J. (2005). Transmembrane serine protease TADG-15 (ST14/Matriptase/MT-SP1): expression and prognostic value in ovarian cancer. *Br J Cancer* 92, 278-283.

Tashiro, H., Shimokawa, H., Yamamoto, K., Momohara, M., Tada, H., and Takeshita, A. (1997). Altered plasma levels of cytokines in patients with ischemic heart disease. *Coron Artery Dis* 8, 143-147.

Temkin, V., Kantor, B., Weg, V., Hartman, M. L., and Levi-Schaffer, F. (2002). Trypsin activates the mitogen-activated protein kinase/activator protein-1 pathway in human peripheral blood eosinophils, causing cytokine production and release. *J Immunol* 169, 2662-2669.

Terkeltaub, R., Boisvert, W. A., and Curtiss, L. K. (1998). Chemokines and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 9, 397-405.

Tiruppathi, C., Yan, W., Sandoval, R., Naqvi, T., Pronin, A. N., Benovic, J. L., and

- Malik, A. B. (2000). G protein-coupled receptor kinase-5 regulates thrombin-activated signaling in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7440-7445.
- Tobe, M., Isobe, Y., Tomizawa, H., Nagasaki, T., Takahashi, H., Fukazawa, T., and Hayashi, H. (2003). Discovery of quinazolines as a novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation. *Bioorg Med Chem* 11, 383-391.
- Tsuzuki, S., Murai, N., Miyake, Y., Inouye, K., Hirayasu, H., Iwanaga, T., and Fushiki, T. (2005). Evidence for the occurrence of membrane-type serine protease 1/matriptase on the basolateral sides of enterocytes. *Biochem J* 388, 679-687.
- Uehara, A., Muramoto, K., Takada, H., and Sugawara, S. (2003). Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through protease-activated receptor 2. *J Immunol* 170, 5690-5696.
- Umezawa, K., Ariga, A., and Matsumoto, N. (2000). Naturally occurring and synthetic inhibitors of NF-kappaB functions. *Anticancer Drug Des* 15, 239-244.
- Usui, M., Egashira, K., Ohtani, K., Kataoka, C., Ishibashi, M., Hiasa, K., Katoh, M., Zhao, Q., Kitamoto, S., and Takeshita, A. (2002). Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits restenotic changes (neointimal hyperplasia) after balloon injury in rats and monkeys. *Faseb J* 16, 1838-1840.
- van der Wal, A. C., Das, P. K., Tigges, A. J., and Becker, A. E. (1992). Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 141, 1427-1433.
- Vergnolle, N. (1999). Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J Immunol* 163, 5064-5069.
- Vergnolle, N., Hollenberg, M. D., Sharkey, K. A., and Wallace, J. L. (1999). Characterization of the inflammatory response to proteinase-activated receptor-2 (PAR2)-activating peptides in the rat paw. *Br J Pharmacol* 127, 1083-1090.
- Vergnolle, N., Wallace, J. L., Bunnett, N. W., and Hollenberg, M. D. (2001). Protease-activated receptors in inflammation, neuronal signaling and pain. *Trends Pharmacol Sci* 22, 146-152.

Versteeg, H. H., Sorensen, B. B., Slofstra, S. H., Van den Brande, J. H., Stam, J. C., van Bergen en Henegouwen, P. M., Richel, D. J., Petersen, L. C., and Peppelenbosch, M. P. (2002). VIIa/tissue factor interaction results in a tissue factor cytoplasmic domain-independent activation of protein synthesis, p70, and p90 S6 kinase phosphorylation. *J Biol Chem* 277, 27065-27072.

Vliagoftis, H., Befus, A. D., Hollenberg, M. D., and Moqbel, R. (2001). Airway epithelial cells release eosinophil survival-promoting factors (GM-CSF) after stimulation of proteinase-activated receptor 2. *J Allergy Clin Immunol* 107, 679-685.

Vliagoftis, H., Schwingshackl, A., Milne, C. D., Duszyk, M., Hollenberg, M. D., Wallace, J. L., Befus, A. D., and Moqbel, R. (2000). Proteinase-activated receptor-2-mediated matrix metalloproteinase-9 release from airway epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 106, 537-545.

Vouret-Craviari, V., Grall, D., Chambard, J. C., Rasmussen, U. B., Pouyssegur, J., and Van Obberghen-Schilling, E. (1995). Post-translational and activation-dependent modifications of the G protein-coupled thrombin receptor. *J Biol Chem* 270, 8367-8372.

Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I., and Coughlin, S. R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64, 1057-1068.

Wakita, H., Furukawa, F., and Takigawa, M. (1997). Thrombin and trypsin induce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 gene expression in cultured normal human keratinocytes. *Proc Assoc Am Physicians* 109, 190-207.

Wang, N., Tabas, I., Winchester, R., Ravalli, S., Rabbani, L. E., and Tall, A. (1996). Interleukin 8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma. *J Biol Chem* 271, 8837-8842.

Wang, X., Gjernes, E., and Prydz, H. (2002). Factor VIIa induces tissue factor-dependent up-regulation of interleukin-8 in a human keratinocyte line. *J Biol Chem* 277, 23620-23626.

Wang, Z., Canagarajah, B. J., Boehm, J. C., Kassisa, S., Cobb, M. H., Young, P. R., Abdel-Meguid, S., Adams, J. L., and Goldsmith, E. J. (1998). Structural basis of

inhibitor selectivity in MAP kinases. *Structure* 6, 1117-1128.

Watanabe, T., Yasuda, M., and Yamamoto, T. (1999). Angiogenesis induced by tissue factor in vitro and in vivo. *Thromb Res* 96, 183-189.

Waters, S. B., Holt, K. H., Ross, S. E., Syu, L. J., Guan, K. L., Saltiel, A. R., Koretzky, G. A., and Pessin, J. E. (1995). Desensitization of Ras activation by a feedback disassociation of the SOS-Grb2 complex. *J Biol Chem* 270, 20883-20886.

Weis, J. R., Pitas, R. E., Wilson, B. D., and Rodgers, G. M. (1991). Oxidized low-density lipoprotein increases cultured human endothelial cell tissue factor activity and reduces protein C activation. *Faseb J* 5, 2459-2465.

Welty-Wolf, K. E., Carraway, M. S., Miller, D. L., Ortel, T. L., Ezban, M., Ghio, A. J., Idell, S., and Piantadosi, C. A. (2001). Coagulation blockade prevents sepsis-induced respiratory and renal failure in baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 1988-1996.

Wilcox, J. N., Smith, K. M., Schwartz, S. M., and Gordon, D. (1989). Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2839-2843.

Xu, W. F., Andersen, H., Whitmore, T. E., Presnell, S. R., Yee, D. P., Ching, A., Gilbert, T., Davie, E. W., and Foster, D. C. (1998). Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6642-6646.

Yang, X., Chang, H. Y., and Baltimore, D. (1998). Autoproteolytic activation of procaspases by oligomerization. *Mol Cell* 1, 319-325.

Yang, Y. H., Hall, P., Milenkovski, G., Sharma, L., Hutchinson, P., Melis, E., Carmeliet, P., Tipping, P., and Morand, E. (2004). Reduction in arthritis severity and modulation of immune function in tissue factor cytoplasmic domain mutant mice. *Am J Pathol* 164, 109-117.

Yasumoto, K., Okamoto, S., Mukaida, N., Murakami, S., Mai, M., and Matsushima, K. (1992). Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J Biol Chem* 267,

22506-22511.

Yu, Z., Ahmad, S., Schwartz, J. L., Banville, D., and Shen, S. H. (1997). Protein-tyrosine phosphatase SHP2 is positively linked to proteinase-activated receptor 2-mediated mitogenic pathway. *J Biol Chem* 272, 7519-7524.

Zhang, H., Shi, X., Hampong, M., Blanis, L., and Pelech, S. (2001). Stress-induced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 276, 6905-6908.

Zhang, Y., Cai, X., Schlegelberger, B., and Zheng, S. (1998). Assignment of human putative tumor suppressor genes ST13 (alias SNC6) and ST14 (alias SNC19) to human chromosome bands 22q13 and 11q24-->q25 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 83, 56-57.

Zhu, Y. M., Bradbury, D. A., Pang, L., and Knox, A. J. (2003). Transcriptional regulation of interleukin (IL)-8 by bradykinin in human airway smooth muscle cells involves prostanoid-dependent activation of AP-1 and nuclear factor (NF)-IL-6 and prostanoid-independent activation of NF-kappaB. *J Biol Chem* 278, 29366-29375.

Zioncheck, T. F., Roy, S., and Vehar, G. A. (1992). The cytoplasmic domain of tissue factor is phosphorylated by a protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* 267, 3561-3564.

10 PUBLIKATIONEN

Nouet, S., Amzallag, N., Li, J. M., Louis, S., **Seitz, I.**, Cui, T. X., Alleaume, A. M., Di Benedetto, M., Boden, C., Masson, M., Strosberg, A. D., Horiuchi, M., Couraud, P. O., and Nahmias, C. (2004). Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem* 279, 28989-28997

Busch, G., **Seitz, I.**, Steppich, B., Hess, S., Eckl, R., Schömig, A., and Ott, I. (2005). Coagulation factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leukocytes: implications in acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 164-166

Ott, I., Weigand, B., Michl, R., **Seitz, I.**, Sabbari-Erfani, N., Neumann, F. J., and Schömig, A. (2005). Tissue factor cytoplasmic domain stimulates migration by activation of the GTPase Rac1 and the mitogen-activated protein kinase p38. *Circulation* 111, 349-355

Ott, I., Michaelis, C., Schuermann, M., Steppich, B., **Seitz, I.**, Dewerchin, M., Zohlnhofer, D., Wessely, R., Rudelius, M., Schömig, A., and Carmeliet, P. (2005). Vascular remodeling in mice lacking the cytoplasmic domain of tissue factor. *Circ Res* 97, 293-298

Eingereicht:

Seitz, I., Hess, S., Schulz, H., Eckl, R., Busch, G., Montens, H. P., Brandl, R., Seidl, S., Schömig, A., and Ott, I. Proinflammatory Effects of Membrane-type Serine Protease-1 by Activation of Protease Activated Receptor-2: Implications in Atherosclerosis

Kongresse und Symposien

DFG Graduate Program "Vascular Biology in Medicine" (GRK 438), 3. Symposium, 12. - 13. März 2005, Herrsching. Vortrag.

XI. Kardiologisch-Hämostaseologischer Workshop „Koronarthrombose: Pathophysiologie und klinische Konsequenzen“, 27. - 29. November 2005, Langenfeld. Vortrag.

Seitz, I., Busch, G., Fleck, M., and Ott, I. Proinflammatory effects of coagulation factor VIIa on vascular cells. *Hämostaseologie* 1/2004, A90. Poster.

Seitz, I., Hess, S., Eckl, R., Schulz, H. and Ott, I. The serine protease MT-SP1 induces cytokine release in human umbilical vein endothelial cells via activation of PAR-2. *Hämostaseologie* 1/2005, A18. Vortrag.

Seitz, I., Hess, S., Eckl, R., Schulz, H., Busch, G., and Ott, I. MT-SP1 induces expression of tissue factor in human endothelial cells in a PKC-alpha- and p38-dependent manner. *Hämostaseologie* 1/2006, A8. Vortrag.

11 ANHANG

11.1 Humane MT-SP1/Matriptase-Sequenz: cDNA und Protein

1 **atg**gggagc gatcgggccc gcaagggcggagggggcccgaaggacttcggcgcgggactc
1 M G S D R A R K G G G G P K D F G A G L

61 aagtacaactcccggcagcagaaaagtgaatggcttgagggaaggcgtggagttcctgcc
21 K Y N S R H E K V N G L E E G V E F L P

121 gtcaacaacgtcaagaaggtggaaaagcatggcccggggcgctgggtggtgctggcagcc
41 V N N V K K V E K H G P G R **W V V L A A**

181 gtgctgatcggcctcctcttggcttggctggggatcggcttcctggtggtggtcatttgcag
61 **V L I G L L L V L L G I G F L V W H L Q**

241 taccgggacgtgctgtccagaaggtcctcaatggctacatgaggatcacaatgagaat
81 **Y** R D V R V Q K V F N G Y M R I T N E N

301 tttgtggatgcctacgagaactccaactccactgagtttgtaagcctggccagcaagggtg
101 F V D A Y E N S N S T E F V S L A S K V

361 aaggacgcgctgaagctgctgtacagcggagtcctcattcctgggcccctaccacaaggag
121 K D A L K L L Y S G V P F L G P Y H K E

421 tcggctgtgacggccttcagcaggggcagcgtcatcgcctactactggtctgagttcagc
141 S A V T A F S E G S V I A Y Y W S E F S

481 atccccgcagcacctggtggaggagggccgagcgcgtcatggccgaggagcgcgtagtcag
161 I P Q H L V E E A E R V M A E E R V V M

541 ctgccccgcgggcgcgctccctgaagtcctttgtgggtcacctcagtggtggctttcccc
181 L P P R A R S L K S F V V T S V V A F P

601 acggactccaaaacagtacagaggaccaggacaacagctgcagctttggcctgcacgcc
201 T D S K T V Q R T Q D N S C S F G L H A

661 cgcggtgtggagctgatgcgcttcaccacgcccggcttcctgacagcccctaccccgct
221 R G V E L M R F T T P G F P D S P Y P A

721 catgcccgcctgccagtgggccctgcggggggacgccgactcagtgctgagcctcaccttc
241 H A R C Q W A L R G D A D S V L S L T F

781 cgcagctttgaccttgctcctgacgagcgcggcagcagcctggtgacggtgtacaac
261 R S F D L A S C D E R G S D L V T V Y N

841 accctgagccccatggagccccacgccttgggtgcagttgtgtggcacctaccctccctcc
281 T L S P M E P H A L V Q L C G T Y P P S

901 tacaacctgaccttcactcctcccagaacgtcctgctcatcacactgataaccaaacact
301 Y N L T F H S S Q N V L L I T L I T N T

961 gagcggcggcatcccggctttgaggccaccttctccagctgcctaggatgagcagctgt
321 E R R H P G F E A T F F Q L P R M S S C

1021 ggaggccgcttacgtaaagcccaggggacattcaacagcccctactaccagggccactac
341 G G R L R K A Q G T F N S P Y Y P G H Y

1081 ccaccaacattgactgcacatggaacattgaggtgcccaacaaccagcatgtgaaggtg
361 P P N I D C T W N I E V P N N Q H V K V

1141 egcttcaaattcttctacctgctggagcccggcgtgcctgcgggcacctgccccaggac
381 R F K F F Y L L E P G V P A G T C P K D

1201 tacgtggagatcaatggggagaaatactgaggagagaggtcccagttcgtcgtcaccagc
401 Y V E I N G E K Y C G E R S Q F V V T S

1261 aacagcaacaagatcacagttcgttccactcagatcagtcctacaccgacaccggcttc
421 N S N K I T V R F H S D Q S Y T D T G F

1321 ttagctgaatacctctcctacgactccagtgacccatgcccggggcagttcacgtgccgc
441 L A E Y L S Y D S S D P C P G Q F T C R

1381 acggggcggtgtatccggaaggagctgagctgtgatggctgggcccgactgcaccgaccac
461 T G R C I R K E L R C D G W A D C T D H

1441 agcgatgagctcaactgcagttgagcgcggccaccagttcacgtgcaagaacaagttc
481 S D E L N C S C D A G H Q F T C K N K F

1501 tgcaagcccctcttctgggtctgagacagtgatgaacgactgaggagacaacagcgacgag
501 C K P L F W V C D S V N D C G D N S D E

1561 caggggtgcagttgtccggcccagaccttcaggtgttccaatgggaagtgcctctcga
521 Q G C S C P A Q T F R C S N G K C L S K

1621 agccagcagtgcaatgggaaggacgactgtggggacgggtccgacgaggcctcctgcccc
541 S Q Q C N G K D D C G D G S D E A S C P

1681 aaggtgaacgtcgtcacttgtaccaaacacacctaccgctgcctcaatgggctctgcttg
561 K V N V V T C T K H T Y R C L N G L C L

1741 agcaagggaaccctgagtgtagcgggaaggaggactgtagcagcggctcagatgagaag
581 S K G N P E C D G K E D C S D G S D E K

1801 gactgcgactgtgggctgaggctcattcacgagacaggctcgtggttgggggacaggat
601 D C D **C** G L R S F T R Q A **R** ↓ **V V G G** T D

1861 gcggatgagggcgagtgccctggcaggtaagcctgcatgctctggggccagggccacatc
621 A D E G E W P W Q V S L H A L G Q G H I

1921 tgcgggtgcttccctcatctctcccaactggctgggtctctgcccgcacactgctacatgat
641 C G A S L I S P N W L V S A A **H** C Y I D

1981 gacagaggattcaggtactcagacccacgcagtgaggcggccttccctgggcttgacgac
661 D R G F R Y S D P T Q W T A F L G L H D

2041 cagagccagcgcagcggccctgggggtgcaggagcgcaggctcaagcgcacatcatctccac
681 Q S Q R S A P G V Q E R R L K R I I S H

2101 cccttcttcaatgacttcaccttcgactatgacatcgcgctgctggagctggagaaaccg
701 P F F N D F T F D Y **D** I A L L E L E K P

2161 gcagagtacagctccatgggtgcccctctgctgcccggacgcctcccatgtcttccct
721 A E Y S S M V R P I **C** L P D A S H V F P

2221 gccggcaaggccatctgggtcacgggctggggacacaccagatggaggcactggcgcg
741 A G K A I W V T G W G H T Q Y G G T G A

2281 ctgatcctgcaaaagggtgagatccgcgtcatcaaccagaccacctgcgagaacctcctg
761 L I L Q K G E I R V I N Q T T C E N L L

2341 ccgcagcagatcacgccgcgcatgatgtgctgggcttcctcagcggcggcgtggactcc
781 P Q Q I T P R M M C V G F L S G G V D S

2401 tgccagggtgattccgggggacccctgtccagcgtggaggcggatgggaggatcttcag
801 C Q G D **S** G G P L S S V E A D G R I F Q

2461 gccggtgtggtgagctggggagacggctgctcagaggaacaagccaggcgtgtacaca
821 A G V V S W G D G C A Q R N K P G V Y T

2521 aggtccctctgtttcgggactggatcaaagagaacactggggta**tag**
841 R L P L F R D W I K E N T G V

- atg, tag** Start- und Stopkodon
- XXX** vermuteter Membrananker aus 27 meist hydrophoben Aminosäuren
- ↓ Schnittstelle bei Aktivierung der MT-SP1/Matriptase und Beginn der katalytischen Domäne
- XXX** Aktivierungsmotiv von MT-SP1/Matriptase
- H, D, S:** Aminosäuren der katalytischen Triade
- C:** Cys604, mit Cys731 (= Cys122 nach Chymotrypsin-Nomenklatur) über Disulfidbrücke verbunden
- C:** Cys731 (= Cys122 nach Chymotrypsin-Nomenklatur), in rekombinant exprimierter katalytischer Domäne zu Ser mutiert

11.2 Humane PAR-2-Sequenz: cDNA und Protein

1 **atg**cgagccccagcgcggcgtggctgctggggccgccatcctgctagcagcctctctc
1 M R S P S A A W L L G A A I L L A A S L

61 tcctgcagtggcaccatccaaggaacc**aat**agatcctctaaaggaagccttattggg
21 S C S G T I Q G T **N** R S S K G R **S L I G**

121 aaggttgatggcacatcccacgtcactggaaaaggagttacagttgaaacagtcctttct
41 **K V** D G T S H V T G K G V T V E T V F S

181 gtggatgagttttctgcatctgtcctcactggaaaactgaccacggctcttccttccaatt
61 V D E F S A S V L T G K L T T V F L P I

241 gtctacacaattgtgtttgtggtgggtttgccaagtaacggcatggcctgtgggtcttt
81 V Y T I V F V V G L P S N G M A L W V F

301 cttttccgaactaagaagaagcaccctgctgtgatttacatggccaatctggccttggct
101 L F R T K K K H P A V I Y M A N L A L A

361 gacctcctctctgtcatctggttccccttgaagattgcctatcacatacatgccacaac
121 D L L S V I W F P L K I A Y H I H A N N

```

421  tggatttatggggaagctctttgtaatgtgcttattggctttttctatggcaacatgtac
141  W I Y G E A L C N V L I G F F Y G N M Y

481  tgttccattctcttcatgacctgcctcagtgtgcagaggattgggtcatcgtgaacccc
161  C S I L F M T C L S V Q R Y W V I V N P

541  atggggcactccaggaagaaggcaaacattgccattggcatctccctggcaatatggctg
181  M G H S R K K A N I A I G I S L A I W L

601  ctgattctgctggtcaccatccctttgtatgtcgtgaagcagaccatcttcattcctgcc
201  L I L L V T I P L Y V V K Q T I F I P A

661  ctgaacatcacgacctgtcatgatgttttgctgagcagctcttgggtgggagacatgttc
221  L N I T T C H D V L P E Q L L V G D M F

721  aattacttctctctctctggccattggggctctttctgttcccagccttcctcacagcctct
241  N Y F L S L A I G V F L F P A F L T A S

781  gcctatgtgctgatgatcagaatgctgcatcttctgccatggatgaaaactcagagaag
261  A Y V L M I R M L R S S A M D E N S E K

841  aaaaggaagagggccatcaaactcattgtcactgtcctggccatgtacctgatctgcttc
281  K R K R A I K L I V T V L A M Y L I C F

901  actcctagtaaccttctgcttgtggtgcattatcttctgattaagagccagggccagagc
301  T P S N L L L V V H Y F L I K S Q G Q S

961  catgtctatgccctgtacattgtagccctctgcctctctacccttaacagctgcatcgac
321  H V Y A L Y I V A L C L S T L N S C I D

1021 ccctttgtctattactttgtttcacatgatttcagggatcatgcaaagaacgctctcctt
341  P F V Y Y F V S H D F R D H A K N A L L

1081 tgccgaagtgtccgactgtaaagcagatgcaagtatccctcacctcaaagaaacactcc
361  C R S V R T V K Q M Q V S L T S K K H S

1141 aggaaatccagctcttactcttcaagttcaaccactgttaagacctcctat_tga
381  R K S S S Y S S S S T T V K T S Y

```

atg, tga Start- und Stopkodon

XXX Signalpeptid

★ Glykosylierungsstelle an Asn30

↓ Aktivierungsschnittstelle am N-Terminus von PAR-2

SLIGKV Sequenz des synthetischen agonistischen Peptides von PAR-2

XXX Transmembrandomänen 1-7

11.3 Humane TF-Sequenz: cDNA und Protein

TF-Protein aus 295 AS mit einer Leitsequenz (32 AS, rot). Das reife Protein besteht aus einer einzigen Polypeptidkette aus 263 AS, die sich aus einer extrazellulären (219 AS, schwarz), einer hydrophoben transmembranen (23 AS, grau unterlegt) und einer zytoplasmatischen Domäne (21 AS, grün) zusammensetzt.

1 atggagaccctgcctggccccgggtcccgcgccccgagaccgcccgtcgctcggacgctc
-32 M E T P A W P R V P R P E T A V A R T L

61 ctgctcggctgggtcttcgccaggtggccggcgcttcaggcactacaaatactgtggca
-12 L L G W V F A Q V A G A S G T T N T V A
-1 +1

121 gcatataatTTaacttggaaatcaactaatttcaagacaattttggagtgggaacccaaa
9 A Y N L T W K S T N F K T I L E W E P K

181 cccgtcaatcaagtctacactgttcaataagcactaagt caggagattggaaaagcaaa
29 P V N Q V Y T V Q I S T K S G D W K S K

241 tgcttttacacaacagacacagagtgtgacctcaccgacgagattgtgaaggatgtgaag
49 C F Y T T D T E C D L T D E I V K D V K

301 cagacgtacttggcaggggtcttctcctaccggcgaggaatgtggagagcaccggttct
69 Q T Y L A R V F S Y P A G N V E S T G S

361 gctggggagcctctgtatgagaactccccagagttcacaccttacctggagacaaacctc
89 A G E P L Y E N S P E F T P Y L E T N L

721 ggacagccaacaattcagagttttgaacaggtgggaacaaaagtgaatgtgaccgtagaa
109 G Q P T I Q S F E Q V G T K V N V T V E

781 gatgaacggacttttagtcagaaggaacaacactttcctaagcctccgggatgtttttggc
129 D E R T L V R R N N T F L S L R D V F G

841 aaggacttaatTTatacactttattattggaaatcttcaagttcaggaaagaaaaacagcc
149 K D L I Y T L Y Y W K S S S S G K K T A

901 aaaacaaacactaatgagtttttgattgatgtggataaaggagaaaactactgtttcagt
169 K T N T N E F L I D V D K G E N Y C F S

961 gttcaagcagtgattccctcccgaacagttaaccggaagagtacagacagcccggtagag
189 V Q A V I P S R T V N R K S T D S P V E

1021 tgtatgggcccaggagaaaggggaattcagagaaatattctacatcattggagctgtggta
209 C M G Q E K G E F R E I F Y I I G A V V

1081 tttgtgggtcatcatccttgtcatcatcctggctatatctctacacagtgtagaaaggca
229 F V V I I L V I I L A I S L H K C R K A

1141 ggagtggggcagagcagggaaggagaactcccactgaatgtttcat^{aa}
249 G V G Q S W K E N S P L N V S

atg, taa Start- und Stopkodon

His243 Position der C-terminalen AS in YFP-TF Δ zyt und erste AS der zytoplasmatischen Domäne (grün)

Cys245 Position des palmitoylierten Cysteinrestes in TF

Ser253 Position des phosphorylierbaren Ser253-Restes

Ser258 Position des phosphorylierbaren Ser258-Restes