

**Untersuchungen zur PAR₁-Typ-Thrombinrezeptor-
vermittelten EGFR-Transaktivierung
in humanen SK-HEP-1-Leberkarzinomzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Julia Hertel

geboren am 05.03.1982 in Werdau

Gutachter

1. Prof. Dr. Utz Settmacher, Jena
2. PD Dr. Martin Westermann, Jena
3. Prof. Dr. Reinhard Walther, Greifswald

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.12.2008

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
Arg	Arginin
ATP	5'-Adenosintrisphosphat
Blotto	Blocklösung für Nitrozellulosemembran
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Kalziumion
cAMP	zyklisches 3', 5'-Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerin
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor
EK	Endkonzentration
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FKS	Fetales Kälberserum
F VIII	Faktor 8, Antihämophiles Glutamin A
F XIII	Gerinnungsfaktor 13, Fibrin-stabilisierender Faktor
GDP	5'-Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotidphosphat-Austauschfaktor
Glu	Glutamat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	5'-Guanosintrisphosphat
GTPase	5'-Guanosintrisphosphatase
h	Stunde

H ⁺	Wasserstoffion
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	2-[4- (2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin
i.S.	im Serum
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
M	molar (mol/l)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase / MAP-Kinase
MEK	MAP-Kinase-Kinase
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar (mmol/l)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (µmol/l)
µm	Mikrometer
Na ⁺	Natriumion
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PAR	Proteinase-aktiverter Rezeptor
PAR-AK	gegen PAR gerichteter Antikörper

PAR-AP	PAR-aktivierendes Peptid
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTX	Pertussistoxin
RNA	Ribonukleinsäure
RTK	Rezeptortyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
siRNAs	Small interfering RNAs
SK-HEP-1	humane Leberkarzinomzelllinie
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered saline-buffer
TBS-T	TBS + Tween
Temed	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Unit (Einheit) pro Milliliter
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol%	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Das hepatozelluläre Karzinom	3
2.1.1. Epidemiologie und Ätiologie	3
2.1.2. Pathologie	4
2.1.3. Diagnostik und Therapie	4
2.2. Der Thrombinrezeptor PAR ₁	6
2.2.1. Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs)	6
2.2.1.1. PAR ₁	6
2.2.1.2. PAR ₂	6
2.2.1.3. PAR ₃ und PAR ₄	7
2.2.2. PAR ₁ -Struktur	7
2.2.3. PAR ₁ -Aktivierungsmechanismus	8
2.2.4. PAR ₁ -G-Protein-Kopplung	9
2.2.4.1. Heterotrimere G-Proteine	10
2.2.4.2. PAR ₁ -Signalweiterleitung	11
2.2.5. PAR ₁ und Karzinogenese	12
2.3. Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)	13
2.3.1. Aufbau	13
2.3.2. Aktivierung	14
2.3.3. GPCR-vermittelte RTK-Transaktivierung	15
2.3.4. Der EGFR als Ziel von Antitumorthapien beim HCC	16
3. Zielstellung	17
4. Material und Methoden	18
4.1. Material	18
4.1.1. Zelllinie	18
4.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	18
4.1.3. Rezeptoragonisten und -antagonisten	21
4.1.4. Puffer, Lösungen und Kulturmedien	21
4.1.5. Geräte	23
4.2. Methoden	24
4.2.1. Zellkultur	24
4.2.1.1. Kultivieren von Zellen	24
4.2.1.2. Einfrieren von Zellen	25
4.2.1.3. Auftauen von Zellen	25
4.2.1.4. Zellzahlbestimmung	25
4.2.2. Gewinnung von Zelllysaten	26
4.2.3. Proteinbestimmung	26
4.2.4. Immunpräzipitation	26

4.2.5. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	27
4.2.6. Western Blot	27
4.2.7. Membranstripping und erneute Antikörperauftragung	28
4.2.8. Gesamt-RNA-Isolierung	28
4.2.9. Polymerasekettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese	29
4.2.10. Untersuchungen zur chemotaktischen Migration	30
5. Ergebnisse	32
5.1. SK-HEP-1-Zellen exprimieren den PAR ₁ -Typ-Thrombinrezeptor	32
5.2. PAR ₁ -vermittelt in SK-HEP-1-Zellen eine Aktivierung des EGFRs	32
5.3. Die Aktivierung von PAR ₁ stimuliert die Migration von SK-HEP-1 durch eine Kollagen-beschichtete Membranbarriere	34
5.4. Die Aktivierung des EGFRs ist in das motogene Signaling von PAR ₁ in SK-HEP-1-Zellen involviert	35
6. Diskussion	37
6.1. Experimenteller Hintergrund und Auswahl des zellulären Modells	37
6.2. PAR ₁ vermittelt in SK-HEP-1-Leberkarzinomzellen eine EGFR- Phosphorylierung	38
6.3. Die Aktivierung von PAR ₁ fördert die chemotaktische Migration in SK-HEP-1-Zellen	39
6.4. Der EGFR ist in das PAR ₁ -vermittelte migratorische Signaling in SK-HEP-1-Zellen involviert	41
7. Schlussfolgerung	42
8. Literaturverzeichnis	43
9. Anhang	58

1. Zusammenfassung

Vor dem Hintergrund unzureichender Behandlungsmöglichkeiten für das hepatozelluläre Karzinom (HCC), einem der weltweit häufigsten Malignome, ist man gegenwärtig intensiv mit einer detaillierten Aufklärung der molekularen Mechanismen der Hepatokarzinogenese befasst, um daraus neue, spezifische Ansatzpunkte für systemische HCC-Therapieprinzipien abzuleiten. Dabei zeigt sich, dass Entstehung und Progression des HCCs mit einer Vielzahl komplexer Veränderungen auf molekularer und zellulärer Ebene verbunden sind, die u.a. auch verschiedene Membranrezeptorsysteme betreffen.

In vorangegangenen Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Proteinase-aktivierte Rezeptor 1 (PAR₁), der Prototyp einer neuen Unterfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), eine Steigerung der migratorischen Kapazität von Zellen der humanen Leberkarzinomzelllinie HEP-3B vermittelt. Daraus wurde auf eine mögliche Wirkung von PAR₁ im Prozess der HCC-Progression geschlossen. Mit Untersuchungen an SK-HEP-1, einer weiteren in der HCC-Forschung etablierten permanenten Leberkarzinomzelllinie, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung der Funktion von PAR₁ in HCC-Zellen fortgesetzt werden. Dazu wurde zunächst die Expression von PAR₁ auf RNA-Ebene mit Hilfe Reverser Transkriptase-PCR nachgewiesen. Damit eignete sich diese Zelllinie als Modell für Untersuchungen zu PAR₁ im HCC.

Den wesentlichen Schwerpunkt der Arbeit bildeten Untersuchungen zur Funktion von PAR₁ auf Ebene der intrazellulären Signalweiterleitung sowie auf zellulärer Ebene. Dabei wurde der Effekt einer PAR₁-Aktivierung auf die Transaktivierung des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) sowie eine Beteiligung dieses Mechanismus am migratorischen Signaling von SK-HEP-1-Zellen charakterisiert. Die Wechselwirkung zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und Wachstumsfaktorrezeptoren stellt ein fundamentales Prinzip in der zellulären Regulation dar und konnte für PAR₁ und den EGFR bereits in Zellen anderer Tumorentitäten nachgewiesen werden. Zum anderen wurde die Untersuchung dieser Rezeptor-Interaktion wegen der bekannten zentralen Rolle des EGFRs im Rahmen der Hepatokarzinogenese ausgewählt.

Um die Effekte von PAR₁ selektiv zu erfassen, fanden für die Experimente neben dem endogenen PAR₁-Agonisten Thrombin auch der PAR₁-selektive Agonist TFLLRN-NH₂ sowie der PAR₁-selektive Antagonist SCH 79797 Verwendung.

In den Experimenten zur Signalweiterleitung wurde die mit der Aktivierung des EGFRs verbundene Tyrosinphosphorylierung mit Hilfe von Immunpräzipitation und Western-Blotting

mit einem anti-EGFR-Antikörper sowie einem gegen phosphoryliertes Tyrosin gerichteten Antikörper bestimmt. Es zeigte sich, dass sowohl Thrombin als auch der PAR₁-selektive Peptidagonist TFLLRN-NH₂ eine vergleichbare Phosphorylierungsaktivierung des EGFRs vermitteln. Da der PAR₁-selektive Antagonist SCH 79797 den Effekt von Thrombin auf die Aktivierung des EGFRs völlig hemmte, wurde geschlussfolgert, dass unter den gewählten Untersuchungsbedingungen PAR₁ in SK-HEP-1-Zellen als der wesentliche Rezeptor für die Thrombin-induzierte EGFR-Aktivierung fungiert.

Zur Erfassung der Effekte von PAR₁ auf zellulärer Ebene wurden Untersuchungen zur Zellmigration durch eine Kollagen-beschichtete Polycarbonatmembranbarriere in einer modifizierten Boyden-Kammer durchgeführt. Eine Stimulation von SK-HEP-1-Zellen sowohl mit Thrombin als auch mit dem PAR₁-selektiven Agonisten TFLLRN-NH₂ führte zu einer signifikanten Erhöhung der migratorischen Kapazität dieser Leberkarzinomzellen. Des Weiteren ergaben die Untersuchungen, dass der selektive PAR₁-Antagonist SCH 79797 den Thrombin-effekt hemmte. Da diese Inhibierung nicht vollständig war, ist von einer Beteiligung weiterer, PAR₁-unabhängiger Mechanismen an der Wirkung von Thrombin auf die Migration von SK-HEP-1-Zellen auszugehen. Hierbei kommen in erster Linie PAR₃ und PAR₄ in Frage. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass Thrombin als Serinproteinase durch katalytische Spaltung verschiedenster Proteine auch rezeptorunabhängige Prozesse auslösen kann, die ebenfalls an der Thrombin-induzierten migratorischen Wirkung in SK-HEP-1-Zellen involviert sein könnten. Die Untersuchungen zeigten auch, dass die PAR₁-vermittelte Transaktivierung des EGFRs am migratorischen PAR₁-Signaling in SK-HEP-1-Zellen beteiligt ist. Dies wurde geschlussfolgert, da der selektive EGFR-Inhibitor Tyrphostin (AG 1748) sowohl den Migrationseffekt von Thrombin als auch den des PAR₁-selektiven Agonisten TFLLRN-NH₂ hemmte.

Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der Proteinase-aktivierte Rezeptor 1 in Zellen der Leberkarzinomzelllinie SK-HEP-1 über eine Wechselwirkung mit dem EGFR in die Regulation zellulärer Eigenschaften eingreift. Da die Modulation der migratorischen Kapazität von Tumorzellen eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung invasiver Eigenschaften und damit eines metastatischen Phänotyps eines Tumors, auch des hepatozellulären Karzinoms, darstellt, ist eine Funktion von PAR₁ in diesem Szenario wahrscheinlich. Somit kann eine kombinierte Modulation des Thrombin/PAR₁-Systems und der PAR-vermittelten Transaktivierung der EGFR-Tyrosinkinase eine Grundlage für die Entwicklung eines neuen HCC-Therapiekonzepts darstellen.

2. Einleitung

2.1. Das Hepatozelluläre Karzinom

2.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Zu den häufigsten Tumorerkrankungen gehört das Leberzellkarzinom (hepatozelluläre Karzinom, HCC), welches weltweit betrachtet den fünfthäufigsten Tumor sowie die dritthäufigste tumorassoziierte Todesursache darstellt (Parkin et al., 2001) und dessen Inzidenz zwischen 500.000 und 1.000.000 neue Fälle pro Jahr beträgt (Bosch et al., 2005). Dabei ist die geographische Verteilung sehr uneinheitlich. Die höchste Neuerkrankungsrate findet man in Südostasien und den tropischen Gegenden Afrikas mit jährlich zwischen 50 und 120 Fällen pro 100.000 Einwohner. Westeuropa und Nordamerika hingegen weisen mit weniger als zehn Fällen pro 100.000 Einwohner eine deutlich geringere Erkrankungsrate auf (Branda & Wands, 2006). In Deutschland geht man derzeit von 4000 bis 6000 Neuerkrankungen jährlich aus. In neueren Studien zeigt sich ein Anstieg der Inzidenz in den Industrienationen von bis zu 25 % innerhalb der letzten 25 Jahre (Bruy et al., 2004; El-Serag, 2002, 2004; El-Serag & Mason, 1999; El-Serag et al., 2001).

Untersuchungen zufolge gibt es keine prädisponierten Rassen für diese Erkrankung. Die Inzidenzunterschiede werden durch eine unterschiedliche Exposition mit den bekannten Risikofaktoren wie HBV- und HCV-Infektion, Aflatoxinen, Alkohol, Chemikalien (Arsen, Vinylchlorid), Medikamenten (androgene Steroide), Strahlung und bestimmten Stoffwechselerkrankungen (Tyrosinämie, α -1-Antitrypsinmangel, Galaktosämie) erklärt. Allen Faktoren ist gemeinsam, dass sie mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit zu einer chronischen Entzündung und Leberzirrhose führen. Eine chronisch-inflammatorische Reaktion bewirkt einen durch Zytokine und oxidativen Stress ausgelösten Leberzelltod, gefolgt von einer aktiven Proliferation der residuellen Hepatozyten um den Parenchymverlust auszugleichen (Coleman et al., 2003; Thorgeirsson et al., 2002). Dies führt zur Leberfibrose und -zirrhose. Durch fortwährende Schädigung kommt es zudem zur Ausbildung von hyper- und dysplastischen Regeneratknoten und zur malignen Transformation (Coleman et al., 2003; Farazi & DePhino, 2006).

In Japan stehen 80 % der HCC-Fälle in einem Zusammenhang mit dem Hepatitis-C-Virus (Okuda et al., 1987). Eine Entwicklung aus dem Stadium einer HCV-bedingten Leberschädigung zum HCC erfordert mindestens einen Zeitraum von zwei Jahrzehnten (Bosch et al., 2004; Wands et al., 2004). Deshalb wird aufgrund der hohen Anzahl der HCV-Infektionen in

den 1980er Jahren eine weitere Zunahme der Häufigkeit von HCC-Fällen in den nächsten Jahren erwartet.

Auch die chronische Hepatitis-B-Virus-Infektion spielt bei der Ätiologie und Pathogenese des HCCs eine wichtige Rolle. Dies betrifft vor allem Manifestationen im Kindesalter in Afrika und Südostasien. Alle HCCs, die sich in der Kindheit dort manifestieren, sind ausnahmslos mit einer HBV-Infektion assoziiert (Chang et al., 1989; Chang et al., 1984; Wu et al., 1987). In diesen Gebieten sind bis zu 15 % der Bewohner mit HBV infiziert, wobei sich davon bei 10 % bis 20 % ein HCC manifestiert. Die Übertragung erfolgte meist via vertikale Transmission durch die Mutter.

2.1.2. Pathologie

Meist handelt es sich beim HCC um ein Adenokarzinom, in seltenen Fällen liegt eine fibrolamelläre Variante vor. Dieser Subtyp entwickelt sich in nicht-zirrhotischen Lebern (Dietrich et al., 2003). Insgesamt zeigt das makroskopische Bild entweder einen unilobulär (oft bei Patienten ohne Zirrhose) oder multizentrisch wachsenden Tumor (meist auf dem Boden einer Leberzirrhose). Histologisch wird das HCC grundsätzlich in gut, mittelgradig oder schlecht differenziert eingeteilt. Die Ausbreitung erfolgt meist auf hämatogenem Weg mit Metastasenbildung in Leber, Lunge (30-50 %), Zwerchfell (10-15 %), Skelett (5-20 %), Nebennieren, ZNS und Peritoneum (je 5-10 %). Eine lymphogene Metastasierung erfolgt zu einem kleinen Prozentsatz v.a. in die peripankreatischen, periepigastrischen und paraaortalen Lymphknoten sowie in die Lymphknoten im Leberhilus und Ligamentum hepatoduodenale. Die Stadieneinteilung erfolgt entsprechend der Ausbreitung nach der TNM- bzw. UICC-Klassifikation; klinische Parameter berücksichtigend werden Klassifikationssysteme nach Okuda, Child Pugh, CLIP (Italien) oder BCLC (Spanien) angewendet.

2.1.3. Diagnostik und Therapie

Das Leberzellkarzinom stellt nach wie vor ein großes therapeutisches Problem dar. Zum einen werden frühe Stadien aufgrund fehlender oder geringer Symptomatik selten diagnostiziert, zum anderen ist die Differentialdiagnose von Leberzirrhoseknoten schwierig. Als Marker für das HCC werden alpha-Fetoprotein (AFP), Des- γ -carboxy-Prothrombin (DCP) (Liebermann et al., 1984) und PIVKA (protein induced by vitamin K absence or antagonist II) (Motohara et al., 1985) verwendet. Allerdings ist die Spezifität dieser biochemischen Marker für eine klare Diagnosestellung nicht ausreichend, zumal AFP-negative HCC-Varianten existieren. Als bildgebende Diagnostik steht neben dem CT seit 1986 die Ultraschall-Angiographie zur Ver-

fügung. Mit Hilfe dieser sensitiven Methode ist es möglich, Tumorknoten ab einer Größe von 1 cm sichtbar zu machen (Matsuda & Yabuuchi, 1986; Takada et al., 1990). Zudem ist dieses Verfahren sehr hilfreich bei der Abgrenzung von Lebermetastasen, Hämangiomen und der fokalen nodulären Hyperplasie (Kudo et al., 1992; Nomura et al., 1993). Auch können so HCC-Herde in den Knoten einer fokalen nodulären Hyperplasie diagnostiziert werden (Nomura et al., 1993).

Insgesamt ist jedoch die Prognose des HCCs trotz der wissenschaftlichen Fortschritte auf diagnostischem Gebiet extrem schlecht. So sind chirurgische Verfahren wie Leberteileresektion und in ausgewählten Fällen die Lebertransplantation zwar potenziell kurativ (Mazzaferro et al., 1996), aber auch hier ist das HCC-Rezidiv bzw. die Filialisierung Prognose-limitierend (Wilson, 2005). Zudem kann eine solche chirurgische Therapie aufgrund eines meist fortgeschrittenen Tumorstadiums zum Zeitpunkt der Diagnose sowie einer häufig gleichzeitig vorliegenden Leberzirrhose mit ihren Komplikationen, einschließlich der reduzierten Leberfunktionsreserve, nur bei etwa 20 % der Betroffenen durchgeführt werden. Nichtoperative Behandlungsmethoden betreffen z.B. die perkutane Ethanolinjektion, die Radiofrequenz-, Mikrowellen- oder Laser-Tumorablation, die transarterielle Chemoembolisation und die Kryotherapie, die auch zur Überbrückung der Wartezeit auf ein Spenderorgan oder bei Kontraindikation für eine operative Methode eingesetzt werden. Sie besitzen deshalb lediglich palliativen Charakter. Aufgrund mangelnder Strahlensensibilität (Dietrich et al., 2003) kommt eine Radiotherapie nicht in Frage.

Es existiert zurzeit noch keine wirksame systemische/medikamentöse Therapie des HCC. Die Testung verschiedener Chemotherapeutika wie Doxorubicin, Cisplatin und 5-Fluorouracil sowie hormonelle Agenzien wie Tamoxifen und Immunmodulatoren wie alpha-Thymosin und Interferon erbrachte keinen signifikanten Überlebensvorteil (Castells et al., 1995; Ikeda et al., 2005; Llovet et al., 2003; Lu et al., 2004; Schwartz & Beutler, 2004).

Insgesamt sind somit die therapeutischen Möglichkeiten für das HCC unzureichend und neue Ansätze dringend erforderlich. Deshalb ist man gegenwärtig u.a. intensiv mit einer detaillierten Aufklärung der molekularen Mechanismen der Hepatokarzinogenese befasst, um daraus neue Ansatzpunkte für systemische HCC-Therapieprinzipien abzuleiten. Die Untersuchungen der letzten Jahre machen deutlich, dass Entstehung und Progression des HCCs mit einer Vielzahl komplexer Veränderungen auf molekularer und zellulärer Ebene verbunden sind (Avila et al., 2006). Dabei ist auf der Ebene der intrazellulären Signalweiterleitung neben dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg offenbar insbesondere eine Rolle intrazellulärer Effektuierungsmechanismen kritisch, die durch Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) wie den Rezeptor für den epi-

dermalen Wachstumsfaktor (EGFR) initiiert werden (Villanueva et al., 2007). Deshalb sind gegenwärtig auch verschiedene Strategien zur Beeinflussung der RTKs selbst bzw. assoziierter Effektorsysteme z.B. mit Inhibitoren oder neutralisierenden Antikörpern in der Entwicklung (Avila et al., 2006). Dabei wird eine Kombinationstherapie zur Inhibierung mehrerer Rezeptorsysteme als ein sehr viel versprechendes Konzept mit Vorteilen gegenüber einer Monotherapie eingeschätzt (Höpfner et al., 2008).

2.2. Der Thrombinrezeptor PAR₁

2.2.1. Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs)

In den letzten Jahren haben sog. Proteinase-aktivierte Rezeptoren (PARs), eine neue Rezeptorgruppe aus der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), auf verschiedenen Forschungsfeldern zunehmend an Bedeutung gewonnen (Hollenberg & Compton, 2002; Ossovskaja & Bunnett, 2004; Steinhoff et al., 2005; Ramachandran & Hollenberg, 2007). Gegenwärtig sind vier PAR-Subtypen bekannt, die zelluläre Effekte verschiedener Serinproteinasen vermitteln.

PAR₁ (Vu et al., 1991a; Rasmussen et al., 1991), PAR₃ (Ishihara et al., 1997) und PAR₄ (Xu et al., 1998) sind in erster Linie Rezeptoren für Thrombin. PAR₂ (Nystedt et al., 1994) ist Target für Trypsin, Mastzell-Tryptase, Matriptase 1 und Faktor VIIa/Xa.

2.2.1.1. PAR₁

PAR₁ spielt eine Rolle bei der Blutplättchenaktivierung und ist an der Regulation von Endothelzellfunktionen beteiligt. Eine regulatorische Funktion bei der Wundheilung, der Embryonalentwicklung (Griffin et al., 2001) sowie im Prozess der Restenose nach Gefäßschädigung (Andrade-Gordon et al., 2001) wird diskutiert. Die ubiquitäre Gewebeverteilung, die von den Gefäßen über Gehirn bis hin zu Lunge und Gastrointestinaltrakt reicht, impliziert für PAR₁ eine multifaktorielle Rolle (de Garavilla et al., 2001).

2.2.1.2. PAR₂

Die bisherigen Untersuchungen zu PAR₂ sprechen vor allem für dessen Beteiligung an entzündlichen Vorgängen (Cocks & Moffatt, 2000; Bunnett, 2006), für Funktionen bei der Pankreassekretion (Kawabata et al., 1998) sowie bei der Leukozyteninfiltration (Vergnolle, 1999), der glattmuskulären Relaxation (Al-Ani et al., 1995), der Nozizeption (Vergnolle et al., 2001) und bei neurogenen Entzündungen (Steinhoff et al., 2000).

2.2.1.3. PAR₃ und PAR₄

Im Gegensatz zu PAR₁ und PAR₂ weiß man zu PAR₃ und PAR₄ wenig. Während von PAR₄ zumindest bekannt ist, dass er gemeinsam mit PAR₁ eine Rolle bei der Blutplättchenaktivierung spielt (Kahn et al., 1998, 1999; Sambrano et al., 2001; Hollenberg & Saifeddine, 2001), ist bisher die Funktion von PAR₃, dessen Vorkommen in zahlreichen Geweben nachgewiesen werden konnte (Ishihara et al., 1997), völlig unklar. Da für den murinen PAR₃ gezeigt wurde, dass dieser kein eigenes intrazelluläres Signal generiert, sondern bei der PAR₄-Aktivierung als Cofaktor agiert (Nakanishi-Matsui et al., 2000; Sambrano et al., 2001), ist diese Frage auch für den humanen PAR₃ noch prinzipiell zu klären.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Funktion des Thrombinrezeptors PAR₁ durchgeführt. Deshalb beschränken sich die nachfolgenden Ausführungen auf diesen PAR-Subtyp.

2.2.2. PAR₁-Struktur

Das PAR₁-Gen befindet sich auf Chromosom 5, Region q13 und kodiert für eine 3,4 kb-mRNA. Das Rezeptorprotein besteht aus 427 Aminosäureresten mit acht hydrophoben Regionen. Im extrazellulären Amino-Terminus befindet sich eine Spaltstelle für Thrombin (LDPR⁴¹/S⁴²FLLRN) und eine negativ geladene, Hirudin-ähnliche Domäne (K⁵²YEPF), die komplementär zur Anionenbindungsregion von Thrombin ist, wobei insbesondere durch letztere eine hochaffine Bindung ermöglicht wird (Abb. 1) (Rasmussen et al., 1991; Vu et al., 1991a, 1991b; Bahou et al., 1993; Ishii et al., 1995).

Weiterhin sind in Abb. 1 der extrazelluläre Loop 2 (ECL 2) sowie der intrazelluläre C-Terminus ersichtlich. Diese Strukturbereiche besitzen eine wesentliche Funktion im Rahmen der Ligandenbindung bzw. der Rezeptor-Signalweiterleitung und -Internalisierung (Rasmussen et al., 1991; Vu et al., 1991a, 1991b; Bahou et al., 1993; Ishii et al., 1995; Dery et al., 1998; Kahn et al., 1998; Schmidt et al., 1998; Macfarlane et al., 2001).

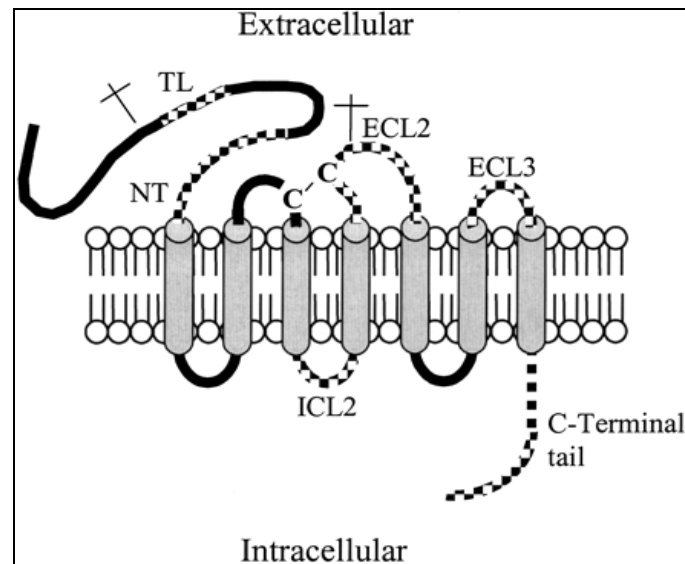


Abb. 1: Schematische Darstellung der PAR₁-Struktur. ECL: extrazellulärer Loop, NT: N-Terminus, TL: „tethered ligand“ (nach Hollenberg & Compton, 2002).

2.2.3. PAR₁-Aktivierungsmechanismus

PAR₁ besitzt einen für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ungewöhnlichen Aktivierungsmechanismus: Thrombin bindet am Rezeptor im extrazellulären N-terminalen Bereich. Durch proteolytische Spaltung zwischen den Aminosäuren Arg41 und Ser42 entsteht anschließend ein neuer N-Terminus, der als „tethered ligand“ („gebundener Ligand“) durch Bindung an eine Region des zweiten extrazellulären Loops zur Rezeptoraktivierung führt. Durch diese intramolekulare Rezeptor-Selbstaktivierung wird nachfolgend über eine Kopplung an regulatorische Membranproteine (G-Proteine) die intrazelluläre Signalweiterleitung initiiert (Abb. 2) (Vu et al., 1991b; Gerszten et al., 1994; Nanevicz et al., 1995; Hollenberg & Compton, 2002). Eine weitere Besonderheit im Aktivierungsmechanismus von PAR₁ besteht in der Möglichkeit, dass synthetische Peptide [PAR₁-aktivierende Peptide (PAR₁-APs)], die in ihrer Sequenz den ersten 5-14 Aminosäuren des gebundenen Liganden entsprechen, ebenfalls eine Aktivierung des Rezeptors induzieren können. Für eine derartige Aktivierung bedarf es im Gegensatz zur Proteinase-induzierten Aktivierung keiner proteolytischen Spaltung (Vu et al., 1991a; Nystedt et al., 1995; Faruqi et al., 2000; Hollenberg & Compton, 2002). Dabei konnte weiterhin gezeigt werden, dass im Falle der PAR₁-APs die Aminosäuren Serin (Position 1), Phenylalanin (Position 2) sowie Arginin (Position 5) für die Rezeptoraktivierung essentiell sind (Abb. 2) (Natarajan et al., 1995).

Thrombin scheint der entscheidende physiologische/pathophysiologische endogene Ligand für PAR₁ zu sein. Allerdings sind auch andere Serin-Proteinasen befähigt PAR₁ zu aktivieren: so z.B. Plasmin (Kuliopulos et al., 1999), Faktor Xa (McRedmond et al., 2000; Riewald et al.,

2001), aktiviertes Protein C (Riewald et al., 2002) sowie Matrix-Metalloproteinase (MMP)-1 (Boire et al., 2005).

Auf der Basis der Struktur der PAR₁-APs wurden die Rezeptor-Antagonisten RWJ 56110 und RWJ 58259 entwickelt. Diese chemischen Verbindungen auf Indol- bzw. Imidazolbasis sind potente und hoch-selektive PAR₁-Antagonisten (Andrade-Gordon et al., 1999, 2001; Zhang et al., 2001), die in Kombination mit den PAR₁-selektiven Agonist-Peptiden sehr häufig zur Untersuchung der Funktion von PAR₁ Verwendung finden.

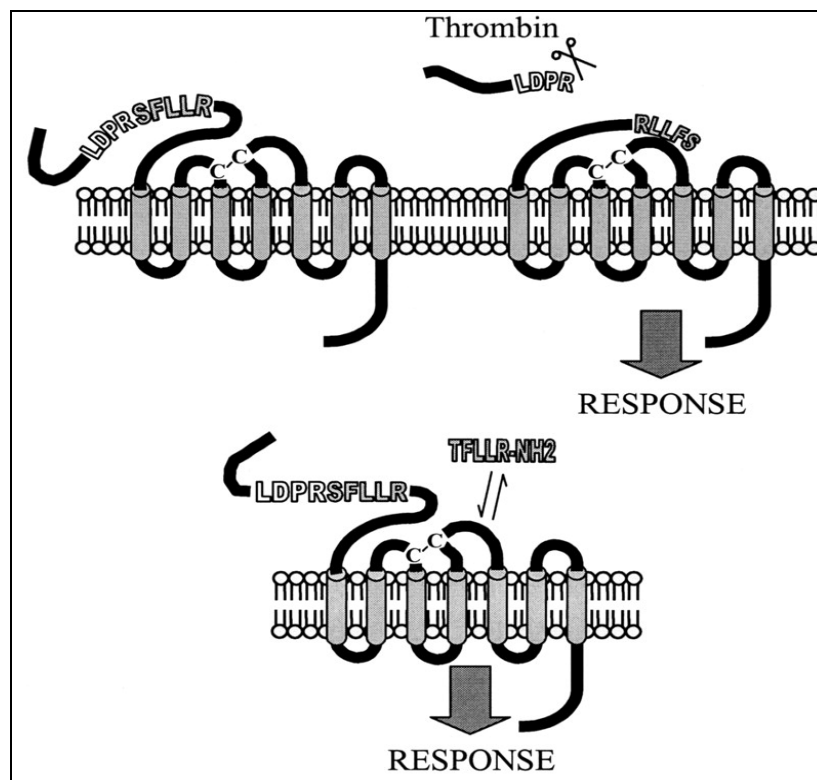


Abb. 2: Schematische Darstellung der Aktivierung des Proteinase-aktivierten Rezeptors 1. Nach proteolytischer Spaltung im extrazellulären N-terminalen Bereich induziert der neu entstandene N-Terminus als sog. „tethered ligand“ eine Rezeptoraktivierung mit nachfolgender Signaltransduktion. Synthetische PAR₁-aktivierende Peptide, wie z.B. TFLLR-NH₂, können ebenfalls eine Rezeptoraktivierung initiieren, allerdings ohne dass es einer Spaltung von PAR₁ bedarf (nach Hollenberg & Compton, 2002).

2.2.4. PAR₁-G-Protein-Kopplung

Nach intramolekularer Aktivierung von PAR₁ durch den „tethered ligand“ kommt es zur Bindung des Rezeptors an regulatorische Guanylnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine). Dabei spielen, wie bei den GPCRs allgemein, auch bei PAR₁ Ligand-induzierte Konformationsänderungen der transmembranalen Helices 3 und 6 eine entscheidende Rolle (Gether & Kobilka, 1998). Derartige helikale Bewegungen führen in der Folge zu konformationellen Änderungen der intrazellulären Loops, die eine Aktivierung assoziierter heterotrimerer G-Proteine initiie-

ren. Dabei ist insbesondere der dritte intrazelluläre Loop für die Kopplung Rezeptor-G-Protein wesentlich (Cotecchia et al., 1992).

2.2.4.1. Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten: einer α -Untereinheit, die GTP bindet und hydrolysiert, sowie je einer β - und γ -Untereinheit (Hepler & Gilman, 1992). Die β - und γ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine stellen eine funktionelle Einheit dar, da sie unter in vivo-Bedingungen einen nicht dissoziierbaren Komplex bilden. Im inaktiven Zustand ist der β/γ -Komplex mit der GDP-gebundenen α -Untereinheit assoziiert. In dieser Form kann das G-Protein von einem Agonist-aktivierten Rezeptor erkannt werden, der an das Heterotrimer bindet und die GDP-Dissoziation von der α -Untereinheit induziert. Dabei wird GDP durch GTP ersetzt. Die Bindung von GTP induziert eine Konformationsänderung der α -Untereinheit sowie deren anschließende Dissoziation vom Rezeptor und vom β/γ -Komplex (Abb. 3). Die GTP-gebundene α -Untereinheit sowie der β/γ -Komplex sind nun in der Lage, mit Effektorproteinen zu interagieren. Die Beendigung der G-Protein-Aktivierung erfolgt durch die Hydrolyse von GTP in GDP. Das aus der Hydrolyse von GTP entstehende GDP bleibt an der α -Untereinheit gebunden, die nun mit dem β/γ -Komplex reassoziiert. Diese durch die GTP-Hydrolyse ausgelöste Reassoziierung zum Heterotrimer stellt den entscheidenden Inaktivierungsmechanismus dar (Abb. 3).

Die $G\alpha$ -Untereinheiten der G-Proteine werden in vier Gruppen unterteilt: G_s , G_i , G_q und $G_{12/13}$ (Neves et al., 2002). Die G-Proteine der G_s -Familie sind Cholera-Toxin-Substrate und stimulieren die Adenylatzyklase, Ca^{2+} -Kanäle und möglicherweise auch andere Ionenkanäle. Die G_i -Familie stellt die größte Gruppe der α -Untereinheiten dar: sie ist Pertussis-Toxin (PTX)-sensitiv und hemmt die Adenylatzyklase. Die G_q -Familie ist Cholera-Toxin- und PTX-insensitiv und reguliert die Phospholipase C- β -Isoenzyme (PLC- β). G_{12} stimuliert die Phospholipase D und Proteinkinase C (PKC). Die Komplexität der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion wird noch durch die Existenz verschiedener Gene gesteigert, die für die β - und γ -Untereinheiten kodieren. So sind gegenwärtig sechs G-Protein- β -Untereinheiten und elf G-Protein- γ -Untereinheiten bekannt und die Mehrzahl von Kombinationen dieser β - und γ -Untereinheiten bilden funktionelle Dimere (Clapham & Neer, 1993, 1997; Neves et al., 2002).

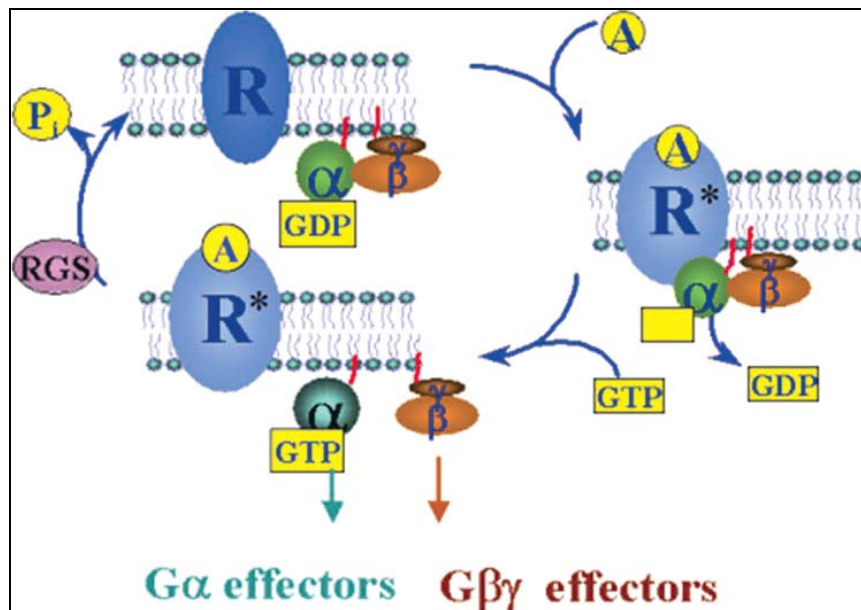


Abb. 3.: Die Rezeptor-vermittelte G-Protein-Aktivierung. Die Interaktion des Liganden (A) mit dem Rezeptor (R) fördert die Bindung des aktivierten Rezeptors (R*) an das G-Protein, wodurch es zum Austausch von GDP zu GTP an der α -Untereinheit kommt und $G\alpha$ sowohl vom Rezeptor als auch von $G\beta/\gamma$ dissoziiert. Durch beide Untereinheiten werden nun verschiedene intrazelluläre Effektoren reguliert. Termination des Signals erfolgt durch die Hydrolyse von GTP in GDP + P durch die intrinsischen GTPase, welche durch RGS-Proteine (GTPase-aktivierende Proteine) getriggert wird. $G\alpha$ und $G\beta/\gamma$ reassoziieren. Das System befindet sich wieder im Ruhezustand (nach Cabrera-Vera et al., 2003).

2.2.4.2. PAR₁-Signalweiterleitung

PAR₁ ist in der Lage an unterschiedliche G-Proteinspezies zu binden, wodurch eine Initiierung verschiedener intrazellulärer Signalweiterleitungswege möglich ist (Abb. 4). So vermittelt PAR₁ beispielsweise über eine Bindung an G_q die Mobilisierung von freiem intrazellulärem Ca²⁺. Über eine Kopplung an G_i kommt es zur Hemmung der Adenylatzyklase, die zur Verminderung der cAMP-Konzentration in der Zelle führt. Durch eine Wechselwirkung mit der β/γ -Untereinheit kann PAR₁ sowohl Tyrosinkinase der Src-Familie als auch die Phospholipase C- β (PLC- β) aktivieren und damit die endogenen Aktivatoren der Proteinkinase C (PKC), Ca²⁺ und Diacylglycerin (DAG), generieren (Hung et al., 1992; Macfarlane et al., 2001; Hollenberg & Compton, 2002). Über Ras, Raf-1 und MEK-1 werden verschiedene MAP-Kinasen stimuliert (Fukuhara et al., 2000; Macfarlane et al., 2001).

Über die Kopplung an G₁₂ aktiviert PAR₁ Ras, Rac und damit JNK. Ebenso wird Rho stimuliert, das wiederum die PI-3-Kinase aktiviert; die PI-3-Kinase kann auch durch die β/γ -Untereinheit von GPCRs aktiviert werden und als Bindeglied zur Aktivierung der MAP-Kinasen vom ERK-Typ dienen (Zhang et al., 1995; Collins et al., 1996; Macfarlane et al., 2001). Zudem kann PAR₁ die MAPK-Signalkaskade über eine Transaktivierung des EGFRs

beeinflussen (Darmoul et al., 2004; Ossovskaya & Bunnett, 2004). Schließlich kann PAR₁ über β/γ -Dimere der G-Proteine PI-3-Kinasen sowie Ionenkanäle und Tyrosinkinasen (Hung et al., 1992; Zhang et al., 1995; Coughlin, 2000; Macfarlane et al., 2001; Hollenberg & Compton, 2002) aktivieren.

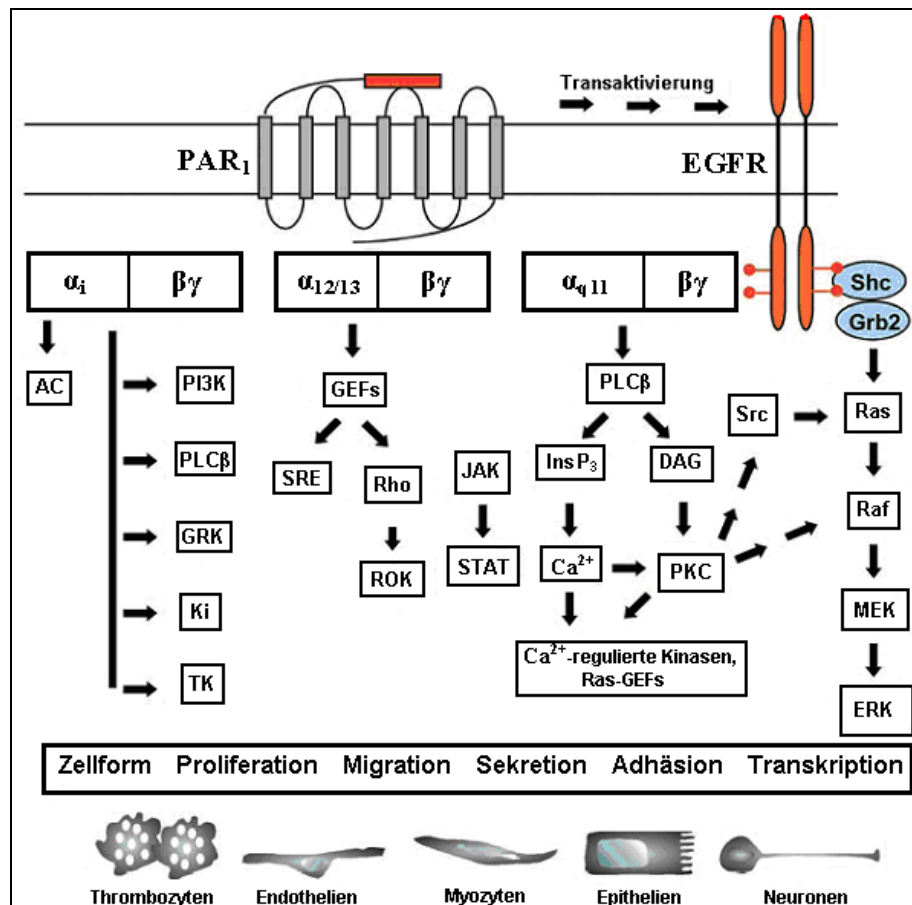


Abb 4: Schema wesentlicher PAR₁-Signaltransduktionswege. Durch die Kopplung von PAR₁ an die G-Proteinspezies G_i, G_{12/13} und G_{q11} werden verschiedene intrazelluläre Signalwege beeinflusst: G_i inhibiert Adenylatzyklasen (AC), wodurch es zu einer cAMP-Reduktion kommt. G_{12/13} koppeln an den Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF), dies führt zu einer Aktivierung des kleinen G-Proteins Rho, der Rho-Kinase (ROK) und des Serum-Response-Elements (SRE). G_{q11} aktiviert die Phospholipase C (PLC) und generiert Kalzium (Ca²⁺). Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade wird durch Transaktivierung des EGFRs oder z.B. durch die Aktivierung von PKC oder Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) aktiviert. γ/β -Untereinheiten koppeln PAR₁ an andere Signalwege, z.B. über die Aktivierung von G-Protein-Rezeptor-Kinasen (GRKs), Kaliumkanälen (KI) sowie Tyrosinkinasen (TK) (Rahn, 2007; modifiziert nach Ossovskaja and Bunnett, 2004).

2.2.5. PAR₁ und Karzinogenese

Seit dem Nachweis von PAR₁ auf Ratten-W256 Sarkom- und Maus-Melanomzellen im Jahre 1995 (Wojtukiewicz et al., 1995) konnte der Thrombinrezeptor PAR₁ in Zellen verschiedener Tumorentitäten wie z.B. in Zellen des Larynxkarzinoms (Kaufmann et al., 1997),

Pankreaskarzinoms (Rudroff et al., 1998), Nierenzellkarzinoms (Kaufmann et al., 2002), Lungenadenokarzinoms (Jin et al., 2003), Glioblastoms (Kaufmann et al., 1998), Kolonkarzinoms (Darmoul et al., 2003) und Mammakarzinoms (Even-Ram et al., 1998) nachgewiesen werden. Zudem existieren erste Hinweise, dass die Höhe der PAR₁-Expression im Mamma- und Pankreaskarzinom mit der metastatischen Kapazität dieser Tumoren korreliert (Even-Ram et al., 1998; Rudroff et al., 2002). Insgesamt wird gegenwärtig von einer Rolle von PAR₁ bei der Progression epithelialer Tumoren ausgegangen (Nierodzik et al., 1992; Rudroff et al., 1998; Even-Ram et al., 2001; Heider et al., 2004; Bergmann et al., 2006; Yin et al., 2003; Salah et al., 2007). Dabei zeigen die bisherigen Untersuchungen, dass unterschiedliche intrazelluläre Signalweiterleitungsmechanismen an den PAR₁-vermittelten Effekten auf zellulärer Ebene in Abhängigkeit der Tumorentität involviert sind (Ramachandran & Hollenberg, 2007). Dies unterstreicht die seit einigen Jahren in der Tumorforschung akzeptierte Vorstellung, dass jeder Tumor seine spezifische Biologie entwickelt und erfordert demzufolge die Klärung des PAR₁-gekoppelten Signalweiterleitungsnetzwerks spezifisch für jede Tumorart.

2.3. Der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)

Der EGFR gehört zur Superfamilie der membranständigen Rezeptor-Protein-Tyrosinkinase (RTK), von denen bisher 58 bekannt sind (Blume-Jensen & Hunter, 2001). Man unterscheidet vier weitgehend homologe epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren, die eine Familie bilden: EGFR (HER, ErbB₁), ErbB₂ (Neu, HER₂), ErbB₃ (HER₃) und ErbB₄ (HER₄). Der am besten charakterisierte Rezeptor dieser Familie ist der EGFR selbst.

2.3.1. Aufbau

Der EGFR hat eine molare Masse von ca. 170 kDa und besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette (Monomer) mit 1186 Aminosäuren. Er ist aus einer extrazellulären Ligand-bindenden Domäne und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase-Aktivität aufgebaut, wobei beide Domänen durch eine hydrophobe Sequenz (transmembranäre Domäne) miteinander verbunden sind (Abb. 5). Die extrazelluläre Domäne besteht aus 621 Aminosäuren, mehreren Oligosaccharidketten und hat zwei cysteinreiche Sequenzen (Σ10 Prozent), zwischen denen sich die eigentliche Ligand-bindende Domäne befindet (Salomon & Gullick, 2001). Die Transmembranregion ist aus 23, hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren aufgebaut und dient der Verankerung in der Membran und der Separierung von extrazellulärer und zytoplasmatischer Domäne. Die zytoplasmatische Domäne besteht aus 542 Aminosäuren und kann nochmals in

juxtamembrane Region, Tyrosinkinase-Domäne und carboxyterminalen Bereich unterteilt werden (Pederson & Poulson, 2002). Als juxtamembrane Region bezeichnet man die Sequenz zwischen Transmembran- und Tyrosinkinase-Domäne.

Die Tyrosinkinase-Domäne ist in allen RTKs weitgehend homolog. Sie enthält immer eine Sequenz GlyXGlyXXGlyX(15-20)Lys, die Teil der ATP-Bindungs tasche ist (Yarden & Ullrich, 1988). Neben der ATP-Bindungsstelle gibt es innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne eine Substratbindungsstelle und aufgrund der zentralen Rolle im Zellsignaling werden weitere Bindungsstellen für Regulationsfaktoren, Adapterproteine etc. postuliert. Der carboxyterminale Bereich ist durch Phosphorylierungsstellen charakterisiert, von denen bisher sechs identifiziert werden konnten (Tyr 992, Tyr 1045, Tyr 1068, Tyr 1086, Tyr 1148, Tyr 1173) (Harris, 2001; Schlessinger & Ullrich, 1992).

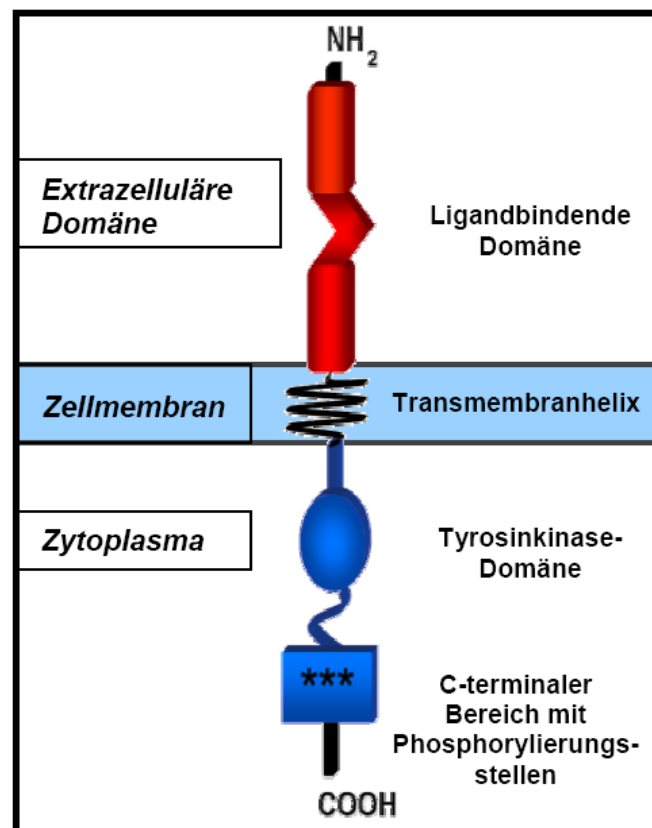


Abb. 5: schematischer Aufbau des EGFRs (aus Stryer, 1990).

2.3.2. Aktivierung

Klassischerweise erfolgt die Aktivierung des EGFRs durch Wachstumsfaktoren der EGF-Familie. Von dieser Familie konnten bisher u.a. EGF (*engl.*: epidermal growth factor = epidermaler Wachstumsfaktor), TGF- α (*engl.*: transforming growth factor-alpha = transformierender Wachstumsfaktor-alpha), AR (Amphiregulin; auch: Keratinozyten-autokriner Faktor,

Kolorektumzellenabstammender Wachstumsfaktor), HB-EGF (*engl.*: heparin binding EGF-like factor = Heparinbindender epidermaler Wachstumsfaktor-ähnlicher Faktor), BTC (Betacellulin), EPR (Epiregulin), EPI (Epigen) und Crypto als EGFR-Liganden charakterisiert werden (Riese & Stern, 1998; Salomon & Gullick, 2001).

Die Aktivierung des EGFRs ist ein Mehrschritt-Prozess. Zunächst kommt es nach Bindung eines Rezeptorliganden an einer spezifische Bindungsstelle zu einer Konformationsänderung und nachfolgenden Dimerisierung des Rezeptors. Dies führt zu einer Transphosphorylierung der beiden Rezeptor-Monomere. Die phosphorylierten Tyrosinreste fungieren als Bindungsstellen für weitere Proteine, die bei der Signalweiterleitung involviert sind (Schlessinger, 1993; van der Geer, 1995; Sasaoka et al., 1994; Krauss, 2003) (Abb. 6). Adapterproteine mit SH₂- oder PTB (Phosphotyrosin-binding)- Domänen, die über keine eigenen Signaleigenschaften verfügen, stehen zur Kopplung des aktivierten Rezeptors an spezielle Signalwege zur Verfügung (Schlessinger, 1993; Geer van der et al., 1995; Sasaoka et al., 1994).

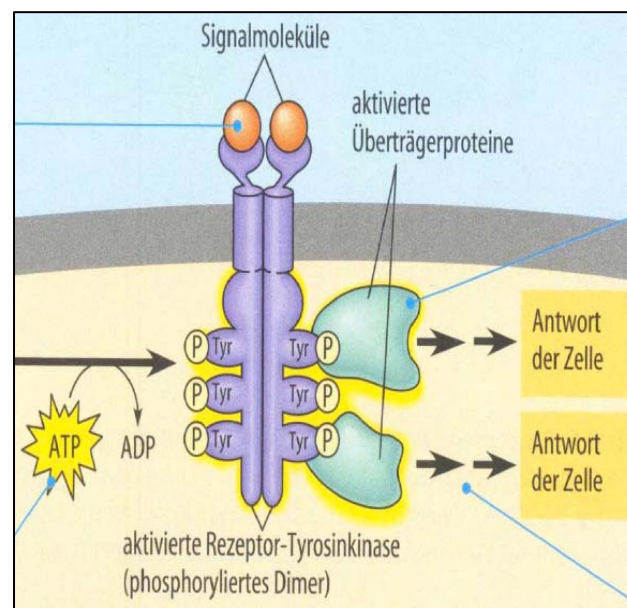


Abb. 6: Aktivierung des EGFRs. Durch Ligandenbindung kommt es zur Dimerisierung zweier Rezeptormonomere und anschließend zur Autophosphorylierung. Die phosphorylierten Tyrosinreste fungieren als Bindungsstellen für weitere Proteine (aus Homberg 2007).

2.3.3. GPCR-vermittelte RTK-Transaktivierung

Vor einigen Jahren ist eine neue Variante der Aktivierung von RTKs entdeckt worden, die so genannte Transaktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) (Daub et al., 1996). Danach kann die Aktivierung von GPCRs das Signaling verschiedener RTKs stimulieren, wobei insbesondere die Wechselwirkung mit dem EGFR intensiv charakterisiert wurde

(Gutkind, 2000; Kranenburg & Moolenaar, 2001; Pierce et al., 2001; Gschwind et al., 2001; Lowes et al., 2002; Carpenter et al., 2000).

Inzwischen ist dieses sog. Transaktivierungs-Konzept als fundamentales Prinzip in der intrazellulären Signalweiterleitung anerkannt und ständig erweitert worden. So konnten auch bereits verschiedene Ligand-abhängige und -unabhängige Mechanismen identifiziert werden (Wetzker & Böhmer, 2003; Fischer et al., 2003).

Die GPCR-induzierte EGFR-Transaktivierung konnte in verschiedenen Zellarten z.B. in glatten Muskelzellen, Keratinozyten sowie Mastrozyten nachgewiesen werden (Daub et al., 1997; Zwick et al., 1999; Eguchi et al., 1998) und jüngste Arbeiten zeigen, dass dieser Signalweg eine wichtige Funktion bei der Onkogenese verschiedener Krebsarten, darunter auch der des HCCs, spielt (Fischer et al., 2003, 2004; Han et al., 2006).

Schließlich konnte auch bereits eine PAR₁-initiierte Transaktivierung des EGFRs in Herzmuskelzellen (Sabri et al., 2002), Epithelzellen der Darmschleimhaut (Sekiguchi et al., 2007), Zellen des Intestinaltrakts (van der Merwe et al., 2007), Kolonkarzinomzellen (Darmoul et al., 2004) und Nierenkarzinomzellen nachgewiesen werden (Bergmann et al., 2006).

2.3.4. Der EGFR als Ziel von Antitumorthérapien beim HCC

In ca. 68 % der HCCs konnte eine EGFR-Überexpression nachgewiesen werden (Ito et al., 2001; Daveau et al., 2003), was mit einem aggressiverem Wachstum (Ito et al., 2001), höheren Rezidivraten (Kira et al., 1997) und verstärkter extrahepatischer Metastasierung (Daveau et al., 2003) assoziiert ist. Grosse Hoffnungen setzt man dabei auf die Entwicklung eines gegen EGFR/RTK-gerichteten Agens. Der Tyrosin-Kinase-Inhibitor Gefitinib (Iressa®) (Baselga & Averbuch, 2000) zeigte in experimentellen Untersuchungen eine Reduktion der Metastasenbildung beim HCC (Höpfner et al., 2004; Ueno et al., 2005). Auch der RTK-Inhibitor Erlotinib (OSL-774) bewirkt *in vitro* eine Wachstumsverminderung von HCC-Zellen, basierend auf einer gesteigerten Apoptoserate. In einer klinischen Studie der Phase II konnte beobachtet werden, dass durch eine 6-monatige Monotherapie mit Erlotinib bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC in 32 % eine Progressionshemmung, in 9 % eine partielle radiologische Remission und bei 59 % eine „disease-control“ erreicht wurde (Philip et al., 2005). GW₂₀₁₆ (Rusnak et al., 2001) und CI-1033 (Slichenmyer et al., 2001), weitere niedermolekulare Inhibitoren des EGFR-Signalweges, werden derzeit getestet.

3. Zielstellung

Thrombinrezeptoren vom Typ der Proteinase-aktivierten Rezeptoren (PARs) finden seit einigen Jahren zunehmende Beachtung in der Krebsforschung. Da für den Prototyp dieser Rezeptorfamilie, PAR₁, eindeutige Daten für eine Beteiligung an der Entwicklung invasiver Eigenschaften von Tumorzellen existieren, wird gegenwärtig dessen Funktion insbesondere in epithelialen Tumoren untersucht. Die bisher durchgeführten Untersuchungen machen allerdings deutlich, dass PAR₁ in unterschiedlichen Tumorentitäten verschiedene Effekte auf intrazellulärer Signalweiterleitungsebene sowie zellulärer Ebene vermitteln kann, so dass eine spezifische Charakterisierung seiner Funktion für jede einzelne Tumorart notwendig erscheint. Vor diesem Hintergrund konzentrieren sich die Forschungsarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zur Funktion der PARs in der Karzinogenese auf das hepatozelluläre Karzinom (HCC), das weltweit eines der häufigsten Malignome mit deutlich steigender Inzidenz darstellt und aufgrund bisher fehlender effektiver systemischer Therapieoptionen eine sehr schlechte Prognose aufweist. Somit ist die Erarbeitung neuer Therapieansätze dringend erforderlich.

In bisherigen Untersuchungen konnte die eigene Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass die Aktivierung von PAR₁ in Zellen der humanen Leberkarzinomzelllinie HEP-3B zu einer Steigerung der migratorischen Kapazität führt, so dass auf eine mögliche Wirkung von PAR₁ im Prozess der HCC-Progression geschlossen werden kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Untersuchungen an der permanenten Leberkarzinomzelllinie SK-HEP-1 einen weiteren Beitrag zur Charakterisierung der Funktion von PAR₁ in HCC-Zellen zu leisten. Nach Erfassung der Expression von PAR₁ auf RNA-Ebene ging es darum zu klären, ob PAR₁ auch in Zellen der Zelllinie SK-HEP-1 ein motogenes Signaling initiieren kann. Dabei wurde der Schwerpunkt auf eine mögliche Beteiligung des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) gelegt, welcher bekanntermaßen im Rahmen der Hepatokarzinogenese eine wesentliche Funktion besitzt.

Um die Effekte von PAR₁ selektiv zu erfassen, sollten für die Experimente neben dem endogenen PAR-Agonisten Thrombin der PAR₁-selektive Agonist TFLLRN-NH₂ sowie der PAR₁-selektive Antagonist SCH 79797 Verwendung finden.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Zelllinie

SK-HEP-1 (DSM ACC 141) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig bezogen. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um humane Leberadenokarzinomzellen, die im Jahre 1971 aus dem Aszites eines 52-jährigen Kaukasiers gewonnen wurden. Es wurde nachgewiesen, dass diese Zellen endothelialen Ursprungs sind (Heffelfinger et al., 1992). Die Zellen werden in RPMI-1640 mit 10 % FKS kultiviert. Sie wachsen schnell und können mit Trypsin/EDTA passagiert werden.

4.1.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
- Agarose 2 %	Life Technologies, Paisley, Schottland
- Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Ammoniumpersulfat (APS)	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
- AMV / Tfl 5x Reaction Buffer	Promega Corporation, Madison, USA
- AMV Reverse Transkriptase	Promega Corporation, Madison, USA
- Anti-EGFR, Ab-17	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
- Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10	Upstate, cell signaling solutions, Lake Placid, NY, USA
- Bacitracin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Beta-Actin-Primer	Gibco BRL Life Technologies
- Buffer RLT, Lysis buffer	QIAGEN GmbH, Hilden
- Buffer RPE, Wash buffer	QIAGEN GmbH, Hilden
- Buffer RW1, Wash buffer	QIAGEN GmbH, Hilden
- Centrifuge Tubes, 15 ml	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Cryo Tube™ Vials Nunc™	Brand Products, Roskilde, Dänemark
- DC Protein Assay, Reagent A, B, S	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning
- Deoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinlein
- Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
- Dimethylsulfoxid	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, Heidelberg

- DNA Molecular Weight Marker XIV, 100 base pair ladder
Roche Diagnostics GmbH, Steinheim
- dNTP Mix
Promega Corporation, Madison, USA
- ECL™ Western Blotting Detection Reagents
Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont Buckinghamshire, UK
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Elektrophorese-Pipettenspitzen
Sorenson™, Bioscience, Inc., Salt Lake City, USA
- Essigsäure
Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Filme, Kodak Biomax MR Film
Eastman Kodak Company, Rochester, USA
- Filterpapier
Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
- Flüssiger Stickstoff
Linde, Leuna
- Fetal Bovine Serum
Biochrom AG, Berlin
- Gel-Blotting-Papier, 300 x 600 mm
Schleicher & Schuell, Dassel
- Gewebekulturflaschen Cellstar®, 50 / 250 ml
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Giemsa Färbelösung
Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
- Glycerin, wasserfrei
Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Glycin
Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- goat-anti-mouse IgG, HRP conjugated
Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- goat-anti-rabbit IgG, HRP conjugated
Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
- Handschuhe Gentle Skin® classic small
Rösner-Mautby Meditrade GmbH, Kiefersfelden
- Humanes α -Thrombin
Haemochrom Diagnostika, GmbH, Essen
- Isotone Lösung ISOTON® II
Beckman Coulter, Euro Diagnostics GmbH, Krefeld
- Kollagen, rat tail
Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
- Kryoröhrchen
Nalgene, Rochester, USA
- Küvetten, 10 x 4 x 45 mm
Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht
- Leupeptin
Serba Electrophoretics GmbH, Heidelberg
- Magnesiumsulfat
Promega Corporation, Madison, USA

- Marker Precision Plus Protein™ Standards unstained	Bio-Rad Laboratories, Inc. GmbH, Ismaning
- Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- 2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Mitomycin	Calbiochem, San Diego, USA
- Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
- Natrium-Fluorid	Merck KGaA, Darmstadt
- Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Objektträger	Menzel, Braunschweig
- PAR ₁ -Primer	Gibco BRL Life Technologies
- PBS-Dulbecco	Biochrom-AG, Berlin
- Pepstatin A	Merck KGaA, Darmstadt
- Pipetten Cellstar® 2 / 5 / 10 / 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Polycarbonat Membran 25 x 80 mm	Neuro Probe Inc., Gaithersburg MD, USA
- Prestained SDS-PAGE Standard, Low Range Marker	Bio-Rad Laboratories, Ismaning
- Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Proteinauftragspuffer Roti®-Load 1	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- PT-Test tubes Cellstar®, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- RNase-free Water	QIAGEN GmbH, Hilden
- RNeasy Mini Column	QIAGEN GmbH, Hilden
- RNeasy® Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
- Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
- Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Saran Folie	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- SDS ultra pure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- SybrGreen	Camrex Bio Science, Rockland Inc., Rockland ME, USA
- Temed p.a., 99 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

- Tfl DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, USA
- Trans-Blot [®] Transfer Medium	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning
- Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Tris Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Triton [®] x-100	Boehringer Ingelheim Bioproducts- Partnership, Heidelberg
- Trypsin-EDTA Solution (0,05 % / 0,02 %) in PBS	Biochrom AG, Berlin
- Tween 20 [®] (Polyethylensorbitan Monolaurat)	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
- Wattestäbchen	Apotheke, Universitätsklinikum, Jena
- Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen

4.1.3. Rezeptoragonisten und -antagonisten

PAR₁-aktivierende Peptide (PAR-APs):

Kauf 53: TFLLRN-NH₂ selektiver PAR₁-Agonist / PAR₁-AP

Das Peptid wurde von Dr. R. Kaufmann (Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, FSU Jena) in Zusammenarbeit mit Dr. Henklein (Institut für Biochemie, Charité, Berlin) mittels Festphasensynthese hergestellt.

PAR₁-inhibierende Peptide:

SCH 79797 (PAR₁-selektiver Antagonist), Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri, USA

EGFR-Kinase-Inhibitor:

AG 1478 (Tyrphostin) Merck KGaA, Darmstadt

4.1.4. Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Agarose-Gel 2 %: 20 g/l Agarose; SybrGreen Verdünnung 1:10000
TAE-Puffer

APS-Lösung: 100 g/l APS in Aqua dest.

Blocklösung (Blotto) 1,5 %: TBST; 1,5 % Albumin Fraktion V

BSA-Lösung: 1 g/l BSA in Lysispuffer

Einfríermedium:	RPMI plus FKS (90 Vol%); DMSO (10 Vol%)
Lysispuffer:	PBS; 1 % Triton 100; 0,5 % Deoxycholat; 0,1 % SDS
PBS-Puffer:	8,77 g/l NaCl; 1,29 g/l Na ₂ HPO ₄ ; 0,235 g/l NaH ₂ PO ₄ H ₂ O
Probenpuffer für Agarosegele:	0,05 % Bromphenolblau; 50 % Glycerin; 0,2 % SDS
SDS-Laufpuffer:	144 g Glycin; 10 g SDS; 30,3 g Tris Ultra in 1 l Aqua dest.
SDS-Lösung:	100 g/l SDS in Aqua dest.
SDS-PAGE-Sammelgel:	3,05 ml Aqua dest.; 1,25 ml Tris HCl 0,5 M pH 6,8 ; 0,65 ml Acrylamid 30 %; 50 µl SDS 10 %; 10 µl TEMED; 25 µl APS 10 %
SDS-PAGE-Trenngel (7,5 %):	4,85 ml Aqua dest.; 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 2,5 ml Acrylamid 30 %; 50 µl SDS 10 %; 15 µl TEMED; 25µl APS 10 %
Stripping-Puffer:	62,5 mM Tris-HCl pH 6,7; 100 mM 2-Mercaptoethanol; 2 % SDS in Aqua dest.
TAE-Puffer:	0,001 M EDTA; 0,114 Vol% Eisessig; 0,04 M Tris Ultra
TBS-Pufferlösung:	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl
TBS-T-Pufferlösung:	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 0,05Vol% Tween
Transferpufferlösung:	3,03 g Tris Ultra; 14,4 g Glycin; 200 ml Methanol mit Aqua dest. auf 1 l abfüllen

Tris-HCl-Puffer (0,5 M):	181,7 g Tris Ultra in 100 ml Aqua dest., mit 1M HCl auf pH 8,8 einstellen
Tris-HCl-Puffer (1,5 M):	6,06 g Tris Ultra in 100 ml Aqua dest., mit 1M HCl auf pH 6,8 einstellen
Zellkulturmedium:	RPMI mit 10Vol% FKS

4.1.5. Geräte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
- Autoclave-Steam Sterilizer 250 EL	Tuttnauer Europe BV, Breda, Niederlande
- Auto-Pipettierhilfe Pipetus [®] -akku	Hirschmann-Laborgeräte GmbH und Co.KG, Eberstadt
- Brutschrank BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
- Cleanbanch <i>Hera safe</i>	Heraeus Instruments, Osterode
- Coulter Z2, Particle count & size analyzer	Coulter Electronics LTD, Luton, England
- Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
- Elektrophorese-/Blot-Elektronik	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning
- Filmkassette X-omatic cassette	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
- Hyperprocessor / Automatix Autoradiography Film Processor	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
- Gefriercontainer	Nalgene, Rochester, USA
- -4 °C-Kühlschrank, Modell VS 8140S	C. Bormann GmbH, Kempten
- -20 °C-Kühlschrank: Premium no-frost	Liebherr Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen
- -86 °C FREEZER; Modell 917	Forma Scientific, Inc., Ohio, USA
- Magnetrührer IKAME [®] REO	IKA [®] -Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co., Staufen
- Mikroskop Axiolab	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
- Mikroskop Invers Durchlichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
- Mini Centrifuge C-1200	National Labnet Co., Woodbridge, USA
- Mini PROTEAN 3 Electrophoresis Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning

- Minishaker MS1 IKA[®]-Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co., Staufen
- Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad Laboratories GmbH, Ismaning
- Neuro Probe 48-well Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA
- Chemotaxiskammer AP 48
- PCR-Elektrophoresekammer, Boehringer Ingelheim Bioproducts-Partnership, Heidelberg
- Modell Nr. BM 100
- PCR-Stromversorgungsgerät Boehringer Ingelheim Bioproducts-Partnership, Heidelberg
- Peltier Thermal Cycler PTC-200 MJ Research, NC., Massachusetts, USA
- pH-Meter 320 Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Schweiz
- Pipettierhilfe 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl ABIMED, Langenfeld
- Schütteleinrichtung Unimax, Heidolph
- Spektrol UV-VIS Carl Zeiss Analytik Jena GmbH, Jena
- Stickstoffbehälter MVE XC 34/18 MVE, Inc., Burnsville, USA
- Thermoblock Boekel Scientific, Emersacker
- Tischzentrifuge Biofuge fresco Heraeus Instruments, Osterode
- Transluminator Image Master[®] VDS Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
- Überkopfschüttler Mixed Rote Variospeed Renner GmbH, Dannstadt
- Waage AC 211S Sartorius AG, Göttingen
- Waage LC 621S Sartorius AG, Göttingen
- Wasserbad MA 6 Lauda DR. R Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
- Wärmeschrank *Function line* Heraeus Instruments, Osterode
- Zentrifuge Megafuge 1.0R Heraeus Sepatech, Osterode

4.2. Methoden

4.2.1. Zellkultur

Für die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde die Zelllinie SK-HEP-1 verwendet.

4.2.1.1. Kultivieren der Zellen

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C mit 5,0 Vol% CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95 % in 250 ml Gewebekulturflaschen kultiviert. Als Zellkulturmedium diente

RPMI-1640 mit einem Zusatz von 10 % FKS. Mediumwechsel erfolgte routinemäßig alle drei bis vier Tage, ein Passagieren der Zellen, sobald ein konfluenten Zellrasen entstanden war. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit 10 ml PBS mit 4 ml Trypsin-EDTA für 5 min im Brutschrank inkubiert, wodurch sich die Zellen von der Unterlage ablösten. Anschließend wurden die in PBS aufgenommenen Zellen für 5 min bei 900 U/min zentrifugiert und das Zellpellet in RPMI-1640 (10 Vol% FKS) resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen in neue Gewebekulturflaschen 1:20 eingesät.

4.2.1.2. Einfrieren der Zellen

Die aus den Kulturflaschen abgelösten Zellen wurden nach Zentrifugation in Einfriermedium (90 % RPMI-1640, 10 Vol% FKS und 10 % DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen pipettiert. Das langsame Einfrieren der Zellsuspension bis auf -80 °C erfolgte mit Hilfe eines speziellen Gefriercontainers über Nacht im -80 °C Tiefkühlschrank. Kurzzeitlagerung der Zellen bis 2 Wochen erfolgte im -80 °C-Tiefkühlschrank, für längere Lagerzeiten wurde ein Flüssigstickstoffbehälter benutzt.

4.2.1.3. Auftauen der Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen aus dem Kryoröhrchen in eine 50 ml-Gewebekulturflasche mit 4 ml RPMI-1640 (10 Vol% FKS) ausgesät. Nach Anheftung der Zellen am Flaschenboden (nach ca. 24 h) wurde das DMSO durch zweimaliges Waschen mit 5 ml PBS entfernt und zur weiteren Kultivierung erneut RPMI-1640 (10 Vol% FKS) zugesetzt.

4.2.1.4. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte routinemäßig mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Coulter Z2). Bei der Verwendung der Zellen für Experimente wurde zusätzlich deren Vitalität überprüft. Dazu wurde ein Aliquot der jeweiligen Zellsuspension mittels Trypanblau gefärbt, 10 µl nach Verdünnung 1:2 in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und das Verhältnis lebende/tote Zellen durch Auszählen am Mikroskop ermittelt. Die toten Zellen waren als tiefblau (defekte Zellmembran, Trypanblau kann in die Zellen eindringen) und die lebenden Zellen (intakte Membran, Trypanblau kann nicht in die Zellen eindringen) als hell durchscheinend einfach voneinander zu unterscheiden. Für die Experimente wurden nur Zellsuspensionen mit einem Anteil lebender Zellen von > 95 % verwendet.

4.2.2. Gewinnung von Zelllysaten

Nach Aussaat der Zellen in eine 250 ml-Flasche und Inkubation mit RPMI-1640 (10 Vol% FKS) bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen mit PBS gewaschen und weitere 17 h in FKS-freiem RPMI-1640 kultiviert. Dann wurden die Zellen mit dem jeweiligen Stimulus im CO₂-Inkubator bei 37 °C behandelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die 250 ml-Flasche auf Eis gestellt. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen einmal mit PBS-Puffer [Zusatz von Bacitracin (EK 100 µg/ml), Leupeptin (EK 2 µg/ml), Pepstatin (EK 1 µg/ml), PMSF (EK 100 µg/ml), Na₃VO₄ (EK 1 mM), NaF (EK 1 mM)] gewaschen, anschließend mit Lysispuffer [Zusatz von Proteinase- und Phosphatase-inhibitoren: Bacitracin (EK: 100 µg/ml), Leupeptin (EK 2 µg/ml), Pepstatin (EK 1 µg/ml), PMSF (EK 100 µg/ml), Na₃VO₄ (EK 1 mM), NaF (EK 1 mM)] versetzt und mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst. Das gewonnene Lysat wurde in Microtube Reagiergefäße überführt, mittels Minishaker resuspendiert und anschließend weitere 10 min auf Eis gestellt. Zur Gewinnung eines zytosolischen Überstands wurden die Proben bei 13.000 g für 20 min zentrifugiert. Im Anschluss daran folgten die Bestimmung der Proteinkonzentration und Immunpräzipitation.

4.2.3. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Hilfe des Spektrol UV VIS bei einer Wellenlänge von 750 nm spektrophotometrisch in µg/µl ermittelt. Hierzu wurde das Proteinbestimmungssystem DC Protein-Assay der Firma Bio-Rad laut Herstellerprotokoll verwendet. Der Assay nutzt ein kolorimetrisches Verfahren, basierend auf der Methode nach Bradford (Bradford, 1976), bei dem die Intensität des Farbumschlages von Coomassie Brilliant Blau zur Quantifizierung der Proteinkonzentration verwendet wird. Eine zum Verfahren benötigte Bezugskurve wurde auf der Grundlage von BSA-Lösungen verschiedener definierter Konzentrationen erstellt. Die Bestimmung der Proben erfolgte mittels Spektrol UV VIS bei einer Wellenlänge von 750 nm spektrophotometrisch. Anschließend wurden alle Proben durch entsprechende Pufferzugabe auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt.

Es wurde nun Probenpuffer (Proteinauftragspuffer) im Verhältnis 1:4 zu den Zelllysaten pipettiert und anschließend für 5-8 min im Heizblock aufgeköcht. Danach wurden die Proben entweder tiefgefroren (-80 °C) oder unmittelbar weiterverarbeitet.

4.2.4. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ermöglicht die Isolierung und Anreicherung bestimmter Proteine aus Zelllysaten. Dazu „fischt“ man mit einem Antikörper das gesuchte Protein aus einem Zelly-

sat und fällt einen Immunkomplex mit Protein A, einem Membranprotein von *Staphylococcus aureus*, aus. Protein A ist kovalent an eine Sepharose 4B-Matrix (sog. „beads“) gebunden und kann an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen binden. Durch Bindung des Antikörpers an die Protein-A-Sepharose wird die Isolierung des Immunkomplexes Antikörper-Protein erleichtert (Chenais et al., 1977).

Für die Immunpräzipitation wurden SK-HEP-1-Zelllysate hergestellt und mit dem EGFR-Antikörper Ab-17 (1:250) für mind. 2 h bei 4 °C im Überkopfschüttler Mixed Rotor inkubiert. Zwischenzeitlich wurde die Sepharose durch mehrfaches Waschen mit Lysispuffer vorbereitet. Es wurden je 30 µl der vorbereiteten Sepharose zu den Zelllysaten pipettiert. Anschließend wurde das Gemisch über Nacht bei 4 °C in den Überkopfschüttler Mixed Rotor gestellt, damit die Immunpräzipitation erfolgen konnte. Am Folgetag wurden die Proben bei 3300 U/min 5 min zentrifugiert und dreimal mit Lysispuffer gewaschen. Nach Absaugen des Überstandes wurden je 10 µl SDS-Probenpuffer hinzugegeben und die Proben 8 min bei 95 °C im Heizblock gekocht. Abschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE und die Identifikation mittels Immunoblot.

4.2.5. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine der gewonnenen Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Hierzu wurden diskontinuierliche Gele verwendet: ein 4 %-iges Sammelgel wurde über ein 7,5 %-iges Trenngel gegossen. Zur gelelektrophoretischen Untersuchung der Proteine wurden nun die vorbehandelten Proben (siehe oben) zu jeweils 31 µl pro Tasche sowie ein Molekulargewichts-Marker zu 5 µl pro Tasche in 10er-Kamm-Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in der Sammelphase bei 150 V, später bei 200 V für ca. 45-60 min in einer mit Laufpuffer (0,1 % SDS) gefüllten Bio-Rad Elektrophoresekammer.

4.2.6. Western Blot

Die entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden nun durch Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran mit Hilfe einer Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell der Firma Bio-Rad transferiert. Dabei erfolgte der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulose-Membran in einem sog. Sandwich-System mit folgender Anordnung der Materialien: Fiberpad - Filterpapier - Gel - Membran - Filterpapier - Fiberpad (alle in Transferpuffer getränkt). Nach Auffüllen der Transblot-Kammer mit Transferpuffer (4 °C) wurde durch Einhängen eines Eiscontainers und die Verwendung eines Magnetührers eine im System gleichmäßig niedrige Temperatur sichergestellt. Das Blotten der Proteine erfolgte bei

100 V in 30 min. Unspezifische Bindungsstellen der Nitrozellulose-Membran wurden mit Blotto, nachdem sie für 1 h bei Raumtemperatur auf einer Schütteleinrichtung standen, über Nacht bei 4 °C blockiert. Die Membranen wurden anschließend je 1 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Primär-Antikörper (anti-Phosphotyrosin-Antikörper, clone 4G10; 1:500) und nach zweimaligem Waschen mit TBS mit dem Sekundär-Antikörper (goat-anti-mouse-IgG-HRP-Konjugat; 1:500) je 45 min auf der Schütteleinrichtung inkubiert. Daraufhin wurden die Membranen jeweils dreimal 10 min in TBS und einmal 10 min in TBS-T gewaschen, bevor sie mit einer ECL-Lösung (1:1-Ansatz) für 1 min benetzt wurden. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte über Chemolumineszenz unter Verwendung von Biomax MR-Filmen der Firma Kodak. Dabei bewirkte die an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase in Anwesenheit von H₂O₂ unter alkalischen Bedingungen eine Oxidation von Luminol, so dass es dadurch zu einer durch Licht-Emission induzierten Schwärzung der Filme an definierter Stelle kam.

4.2.7. Membran-Stripping und erneute Antikörperauftragung

Zur Überprüfung einer gleichmäßigen Beladung der Probenspuren mit EGFR-Protein wurde nach Membranstripping ein erneutes Blotting der Membranen durchgeführt. Für das Membranstripping wurde eine Standardvorschrift der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet (im Handbuch ECL Western Blotting detection systems).

Zunächst wurde die Nitrocellulose-Membran mit TBS-T gespült, um das ECL-Reagenz zu entfernen. Dann wurde die Membran zur Entfernung der darauf haftenden Antikörper und Sekundär-Antikörper in Stripping-Puffer für 30 min bei 50 °C inkubiert, anschließend für 2x10 min mit TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen und danach mit Blotto für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Jetzt konnte die Inkubation mit einem anti-EGFR-AK (Ab-17, 1:500) sowie einem HRP-konjugierten goat-anti-rabbit IgG (1:1000) vorgenommen werden. Die Detektion erfolgte wie oben beschrieben.

4.2.8. Gesamt-RNA-Isolierung

Um die gesamte RNA aus den SK-HEP-1-Zellen zu isolieren, wurde der RNeasy[®]-Mini-Kit der Firma Qiagen verwendet und entsprechend dem Herstellerprotokoll vorgegangen. Diese Methode nutzt die selektiven Bindungseigenschaften einer Silikat-Gel-Membran in Kombination mit Mikrozentrifugationstechnik. Um einen hohen Anteil von mRNA zu erhalten und gleichzeitig andere RNA-Formen auszusparen, ermöglicht ein spezielles Puffersystem mit hohem Salzgehalt die separate Bindung von RNA mit einer Länge von mind. 200

Basenpaaren an diese Membran. Aufgrund der Abhängigkeit der Affinität der RNA vom pH-Wert und Ionengehalt, kann durch Veränderung derselben die RNA, nachdem sie von anderen Zellanteilen gereinigt wurde, eluiert werden. Die erhaltene RNA-Konzentration ließ sich mit Hilfe des Spektrol UV-VIS bei einer Wellenlänge von 260 nm spektrophotometrisch ermitteln, wobei jeweils 50 ng mRNA zur weiteren Verarbeitung verwendet wurden.

4.2.9. Polymerasekettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR), die von K. Mullis in den 80er Jahren erstmals beschrieben wurde, liegt eine Methode zur in-vitro-Vermehrung von DNA-Abschnitten vor, die sich durch ihre hohe Geschwindigkeit sowie Sensitivität und Spezifität auszeichnet (Mullis et al., 1986). Zur Synthese der zur mRNA komplementären cDNA und deren Amplifizierung in einem Schritt wurde das Access RT-RCR-System der Firma Promega verwendet. Dabei wird durch die Reverse Transkriptase (ein aus Retroviren isoliertes Enzym) die mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. In den vorliegenden Versuchen wurde dafür die Avian Myeloblastosis Virus (AMV)-Reverse Transkriptase benutzt. Anschließend synthetisiert die thermostabile DNA-Polymerase an der einzelsträngigen cDNA den komplementären Strang (das Access RT-System nutzt die *Thermus flavus* (Tfl) DNA-Polymerase). Nach Hitzedenaturierung bei 92-95 °C wird die nun doppelsträngige DNA in Einzelstränge gespalten, welche dann als Matrizen zur weiteren Amplifikation fungieren. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes hybridisieren zwei Oligonukleotide („sense- und anti-sense-Primer“) an den komplementären Sequenzen der Einzelstränge. Danach wird die Polymerase im Bereich ihrer Optimaltemperatur aktiviert und katalysiert in 5'-3'-Richtung die Synthese eines neuen komplementären Strangs, indem sie freie Desoxyribonukleotidtriphosphate verknüpft. Als Startpunkt hierfür dient der von den Primern hybridisierte Bereich. Die im ersten Reaktionszyklus entstandenen Reaktionsprodukte dienen in den nachfolgenden Zyklen als Matrize. Die so in großen Mengen produzierten Amplifikate lassen sich in einer Gelelektrophorese nachweisen.

Für die Synthese wurden folgende Primer benutzt:

PAR₁: sense: 5'-TTC AGT CTG TGC GGC CCG CTG TT-3'
 anti-sense: 5'-CCA GGT GCA GCA TGT ACA CCA CC-3'

Als interne Kontrolle wurde ein β -Aktinfragment amplifiziert. Folgende Primer wurden verwendet:

β -Aktin: sense: 5'-CGG GAA ATC GTC CGT GAC AT-3'

anti-sense: 5'-GAA CTT TGG GGG ATG CTC GC-3'

Zur Auswertung mittels Gel-Elektrophorese (2 %-iges Agarose-Gel mit SybrGreen I im Verhältnis 1:10000) wurden anschließend 7 µl der erhaltenen PCR-Proben mit 1 µl PCR-Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit TAE-Puffer über einen Zeitraum von 1 h bei 100 V. Die PCR-Fragmente (396 bp für PAR₁, 712 bp für β-Aktin) wurden mittels UV-Transillumination visualisiert.

4.2.10. Untersuchungen zur chemotaktischen Migration

Unter Chemotaxis versteht man die Abhängigkeit einer aktiven zellulären Bewegung vom Gradienten einer chemischen Substanz (Debvreotes & Zigmond, 1988). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Untersuchung dieses zellulären Phänomens an SK-HEP-1-Zellen eine 48-well Chemotaxis-Kammer der Firma Neuro Probe verwendet. Dieses System besteht aus zwei Kammerteilen. Im Experiment werden die Zellen erfasst, die durch einen mit Kollagen-beschichteten Polykarbonatfilter, der zwischen diesen beiden Kammerteilen als Membranbarriere dient, wandern. Die Porengröße des Polykarbonatfilters beträgt 8 µm, so dass die Zellen nur aktiv und nicht passiv durch die Poren gelangen können. Zur experimentellen Durchführung erfolgte zunächst die Beschichtung des Polycarbonatfilters über Nacht bei 4 °C mit Kollagen (Kollagen 1:10 mit PBS). In die Kavitäten des unteren Teils der Migrationskammer wurden jeweils 27 µl des chemotaktischen Stimulus (in RPMI-1640) vorgelegt, im Falle der Kontrollen das Zellkulturmedium RPMI-1640. Nach Auflegen der Kollagen-beschichteten Membran wurde der obere Kammerteil aufgesetzt und die Kammer verschraubt. In jedes der wells des oberen Kammerteils wurden nun 51 µl der Zellsuspension mit oder ohne Inhibitor pipettiert (die SK-HEP-1-Zellkultur wurde vor Versuchsbeginn mindestens 17 h in FKS-freiem RPMI-1640-Medium einer Hungerphase ausgesetzt). Nach 48 h im CO₂-Inkubator wurde die Migrationskammer demontiert, die an der Membran haftenden Zellen in 96 %-igem Ethanol fixiert, mit Aqua dest. gewaschen und mit GiemsaLösung gefärbt. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit Aqua dest. wurden die nicht gewanderten Zellen auf der Oberseite der Polykarbonatmembran mit einem angefeuchtetem Wattestäbchen entfernt. Zum Schluss wurde die Membran auf einem Objektträger platziert und die Anzahl der migrierten Zellen unter einem Zeiss Axiolab Mikroskop im gesamten Lochfeld ausgezählt. Alle Versuchsansätze wurden pro Experiment achtfach ausgeführt. Um die Ergebnisse zu verifizieren wurden die Experimente zweimal wiederholt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SPSS 13 (Windows computer programm, SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Es wurde der nichtpara-

metrische Mann Whitney U-Test verwendet, da bei den Datenreihen keine Normalverteilung vorlag. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant eingestuft.

5. Ergebnisse

5.1. SK-HEP-1-Zellen exprimieren den PAR₁-Typ-Thrombinrezeptor

Um PAR₁ in SK-HEP-1-Leberkarzinomzellen nachzuweisen, erfolgte die Bestimmung der Rezeptorexpression auf RNA-Ebene mittels Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion. Dazu wurde die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA mittels AMV-Reverse-Transkriptase in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, die als Template für die PCR verwendet wurde.

Wie in Abb. 7 dargestellt, war für PAR₁ eine einzelne Bande mit der erwarteten Fragmentgröße im Bereich von 396 bp im Agarosegel nachweisbar. Als interne Kontrolle erfolgte die Amplifizierung eines PCR-Produktes für ein Fragment des ubiquitär vorkommenden beta-Aktins. Es ergab sich ebenfalls die korrekte Fragmentgröße von 712 bp (Abb. 7).

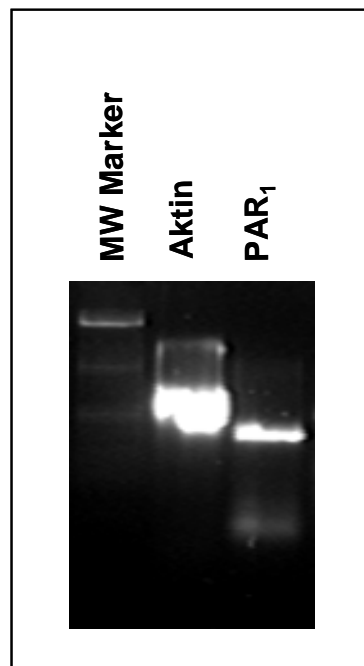


Abb. 7: Expression von PAR₁-RNA in SK-HEP-1-Zellen. Nach Gesamt-RNA-Isolation und cDNA-Synthese erfolgte eine RT-PCR mit Hilfe spezifischer Primer für PAR₁ und beta-Aktin. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Transilluminators visualisiert. Die Darstellung zeigt repräsentative Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten. MW Marker: Molekulargewichtsmarker.

5.2. PAR₁ vermittelt in SK-HEP-1-Zellen eine Aktivierung des EGFRs

Zur Charakterisierung der Funktion von PAR₁ auf der Ebene der intrazellulären Signalweiterleitung wurde dessen Wechselwirkung mit der EGFR-Aktivierung untersucht. Da dieser Aktivierungsmechanismus mit der Phosphorylierung von Tyrosinresten des EGFRs verbun-

den ist, erfolgte dies experimentell mittels Immunpräzipitation mit einem anti-EGFR-Antikörper (Ab-17) und nachfolgendem Western Blot mit Hilfe eines anti-phospho-Tyrosin (p-Tyr)-Antikörpers. Als Kontrolle einer gleichmäßigen Proteinbeladung der Proben wurden jeweils das Gesamtprotein unter Verwendung eines anti-EGFR-Antikörpers bestimmt.

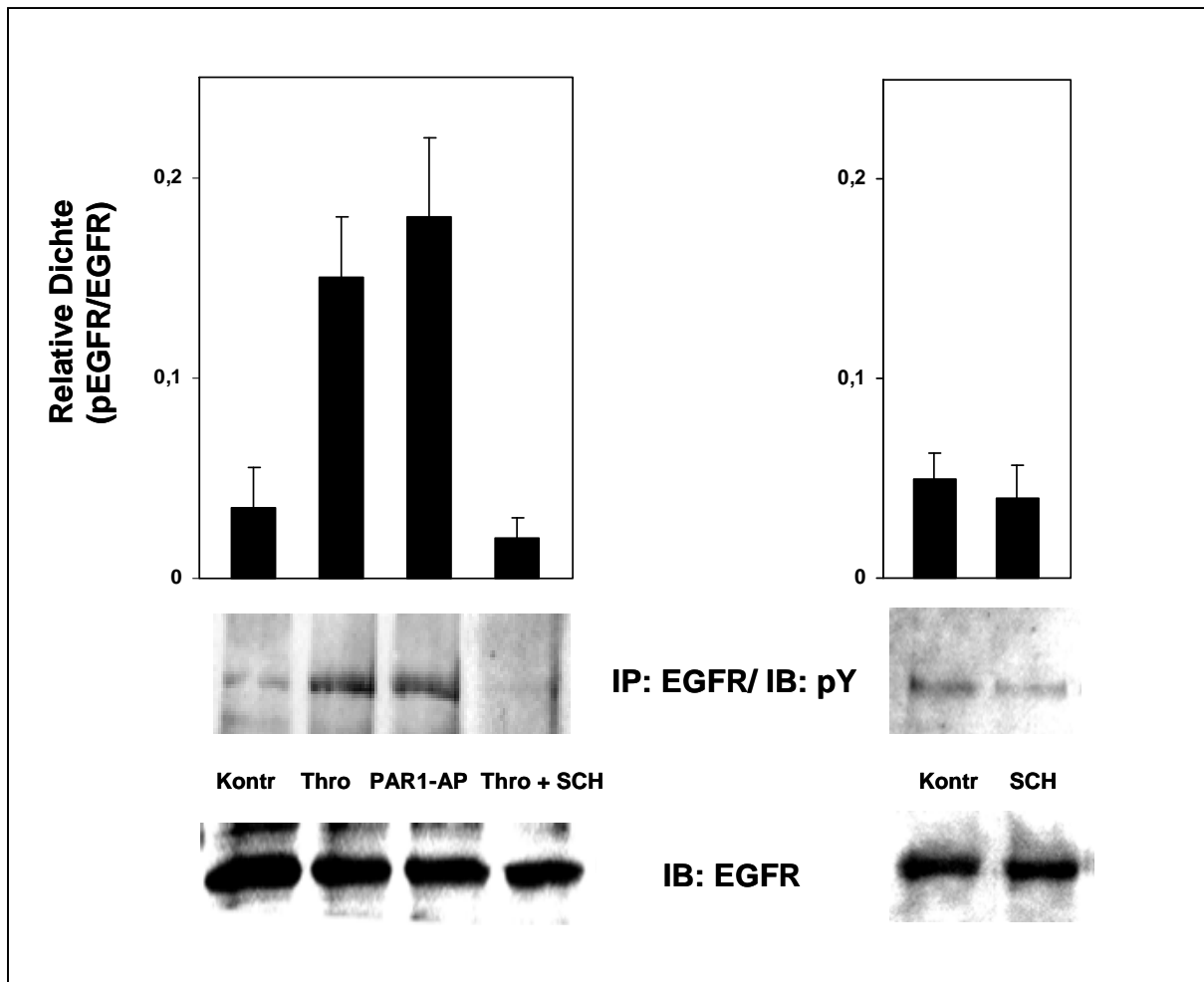


Abb. 8: Thrombin und der PAR_1 -selektive Agonist $TFLLRN-NH_2$ induzieren eine Phosphorylierungs-Aktivierung des EGFRs in SK-HEP-1-Zellen. Der PAR_1 -selektive Antagonist SCH 79797 inhibiert den Effekt von Thrombin. SK-HEP-1-Zellen wurden 17 h serumfrei kultiviert und anschließend, wie angezeigt, 3 min bei 37 °C stimuliert. Nach Zellyse, Elektrophorese und Western Blot bzw. Stripping und Western Blot wurden die Ergebnisse mittels Chemolumineszenz visualisiert und mit Hilfe eines densitometrischen Verfahrens (AIDA image analyzer v.3.22 program) quantifiziert. Der PAR_1 -selektive Antagonist SCH 79797 (10 μM) wurde 10 min vorinkubiert. Thrombin: 1,0 NIH-U/ml; $TFLLRN-NH_2$: 100 μM ; Normalisierte Daten (EGFR-phosphorylierte / EGFR-Gesamtproteinen) von drei unabhängigen Experimenten \pm SD sind in den Histogrammen oberhalb der Blots dargestellt.

In einem ersten experimentellen Design wurden SK-HEP-1-Zellen 3 min mit Thrombin (1.0 NIH-U/ml) stimuliert und der Effekt auf die EGFR-Tyrosinphosphorylierung untersucht.

Wie aus Abb. 8 ersichtlich, induziert Thrombin eine ca. 4,2-fache Erhöhung der EGFR-Phosphorylierung im Vergleich zu nichtstimulierten SK-HEP-1-Zellen und damit eine starke Aktivierung.

Thrombin ist zwar der wesentliche endogene Ligand für den PAR₁-Typ-Thrombinrezeptor, jedoch ist diese Serinproteinase in ihrer Rezeptorwirkung nicht PAR₁-selektiv, sondern kann auch noch die Thrombinrezeptoren PAR₃ und PAR₄ aktivieren. Um den Effekt einer PAR₁-Aktivierung auf die EGFR-Aktivierung selektiv zu erfassen, wurden zwei weitere Versuchsvarianten durchgeführt. Einmal wurde der synthetisch hergestellte selektive PAR₁-Agonist TFLLRN-NH₂ (100 µM), zum anderen der selektive PAR₁-Antagonist SCH 79797 (10 µM) verwendet. Für den selektiven PAR₁-Agonisten TFLLRN-NH₂ konnte gezeigt werden, dass es nach einer Behandlungszeit von 3 min ebenfalls zu einer verstärkten EGFR-Phosphorylierung und damit zu dessen Aktivierung in SK-HEP-1-Zellen kam. Dieser Effekt war in seiner Höhe (ca. 5-fach im Vergleich zu nicht stimulierten SK-HEP-1-Zellen) mit dem nach Thrombinstimulation vergleichbar (Abb. 8). Die Experimente mit dem PAR₁-Antagonisten ergaben, dass Thrombin nach 10-minütiger Vorinkubation der Zellen mit SCH 79797 nicht mehr in der Lage war, eine Phosphorylierung und damit Aktivierung des EGFRs zu induzieren (Abb. 8).

5.3. Die Aktivierung von PAR₁ stimuliert die Migration von SK-HEP-1-Zellen durch eine Kollagen-beschichtete Membranbarriere

Um Effekte von PAR₁ auf zellulärer Ebene zu erfassen, wurden Migrationsuntersuchungen unter Verwendung von Thrombin sowie des selektiv PAR₁-aktivierenden Peptids TFLLRN-NH₂ und des PAR₁-Antagonisten SCH 79797 durchgeführt. Dabei erfolgte die quantitative Bestimmung der migrierten Zellen nach chemotaktischer Migration der SK-HEP-1-Zellen durch eine Kollagen-beschichtete Polycarbonatmembranbarriere (Porendurchmesser 8 µm) in einer modifizierten Boyden-Kammer.

Die Zellen wurden 17 h in serumfreiem RPMI-1640-Medium kultiviert und danach mit Thrombin (1,0 NIH-U/ml) oder dem PAR₁-aktivierenden Peptid TFLLRN-NH₂ (100 µM) 48 h stimuliert. Im Falle von Thrombin erfolgte in einer Versuchsvariante eine Vorinkubation der Zellen (10 min) mit dem PAR₁-Antagonisten SCH 79797 (10 µM).

Um Effekte durch Zellproliferation ausschließen zu können, wurden Kontrollexperimente unter Verwendung des Proliferationshemmers Mitomycin durchgeführt. Sowohl eine Thrombin- als auch eine PAR₁-AP-Behandlung führte zu signifikant erhöhten Migrationsraten im Vergleich zu nicht stimulierten SK-HEP-1-Zellen und der PAR₁-Antagonist SCH 79797 hemmte den Migrationseffekt von Thrombin partiell (Abb. 9). In Abb. 9 ist weiterhin ersicht-

lich, dass eine 30-minütige Vorbehandlung der SK-HEP-1-Zellen mit dem Proliferationshemmer Mitomycin (10 μ M) keinen signifikanten Einfluss auf die Thrombin- und TFLLRN-NH₂-induzierten Effekte auf die Migration von SK-HEP-1-Zellen durch eine Kollagenbeschichtete Membranbarriere hat.

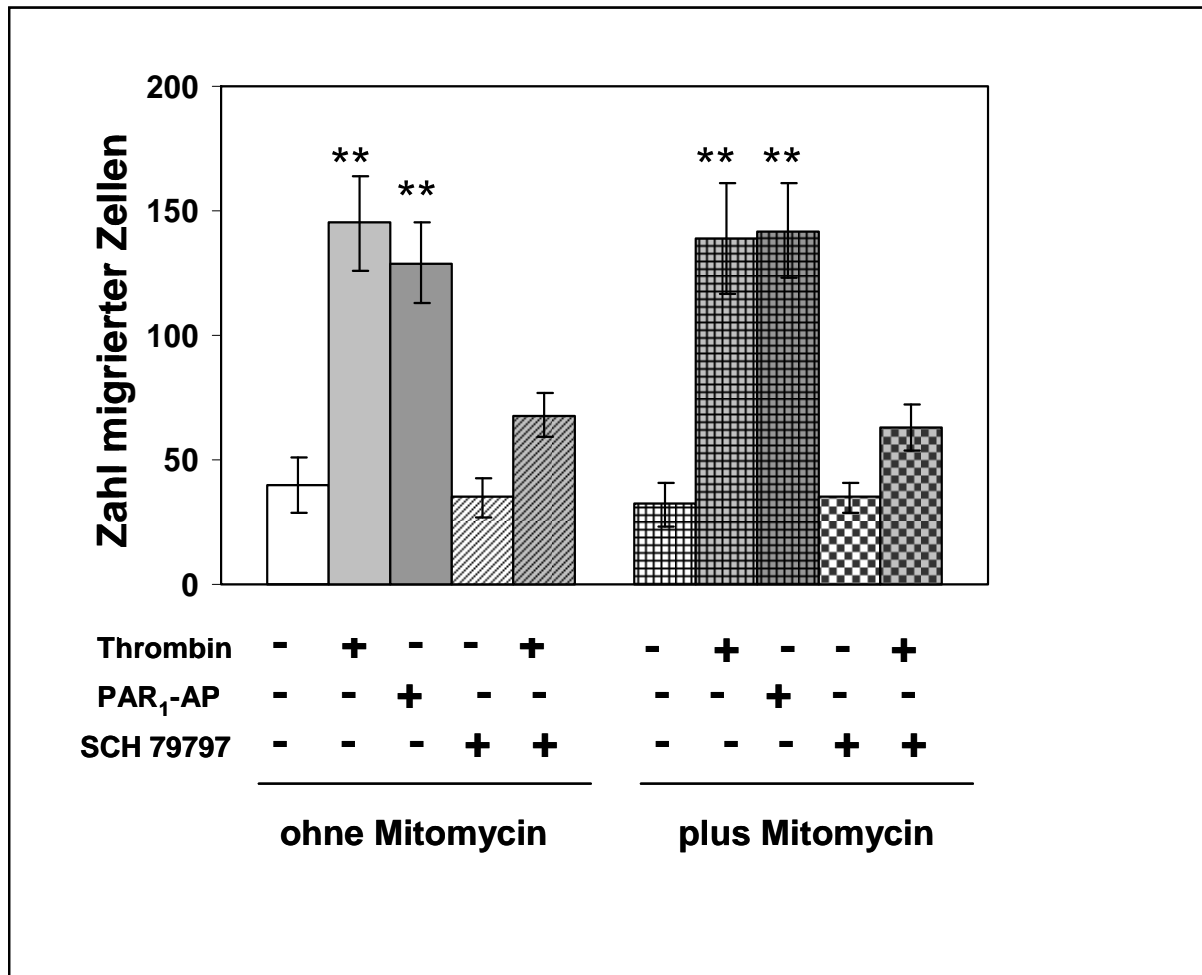


Abb. 9: Thrombin- und PAR₁-AP-induzierte Migration von SK-HEP-1-Zellen sowie der Effekt des PAR₁-Antagonisten SCH 79797 und des Proliferationshemmers Mitomycin. Die Zellen wurden nach einer 17-stündigen Hungerphase 48 h mit Thrombin (1.0 NIH-U/ml) bzw. dem PAR₁-selektiven Agonisten TFLLRN-NH₂ (100 μ M) stimuliert. Der PAR₁-selektive Antagonist (10 μ M) wurde 10 min und Mitomycin (10 μ M) 30 min vorinkubiert, bevor die jeweilige Stimulation erfolgte. Nach Fixierung der durch die Kollagen-beschichtete Membran gewanderten Zellen erfolgte deren Färbung mit Giemsa und Quantifizierung durch Auszählen am Mikroskop. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SD von jeweils acht Einzelbestimmungen eines Experiments dar, das repräsentativ für drei unabhängige Assays ist. **P-Wert = 0,001 vs. nicht stimuliert (Mann Whitney U-Test).

5.4. Die Aktivierung des EGFRs ist in das motogene Signaling von PAR₁ in SK-HEP-1-Zellen involviert

Um die Beteiligung der Aktivierung des EGFRs am PAR₁-vermittelten Effekt auf die Migration von SK-HEP-1-Zellen zu untersuchen, wurden Experimente mit Tyrphostin

(AG 1478, 1 μ M), einem Inhibitor der EGFR-Aktivierung, durchgeführt. Wie in Abb. 10 dargestellt, hemmt AG 1478 sowohl den Effekt von Thrombin als auch den des PAR₁-selektiven Agonisten TFLLRN-NH₂ auf die Migration von SK-HEP-1-Zellen durch die Kollagenbeschichtete Membranbarriere.

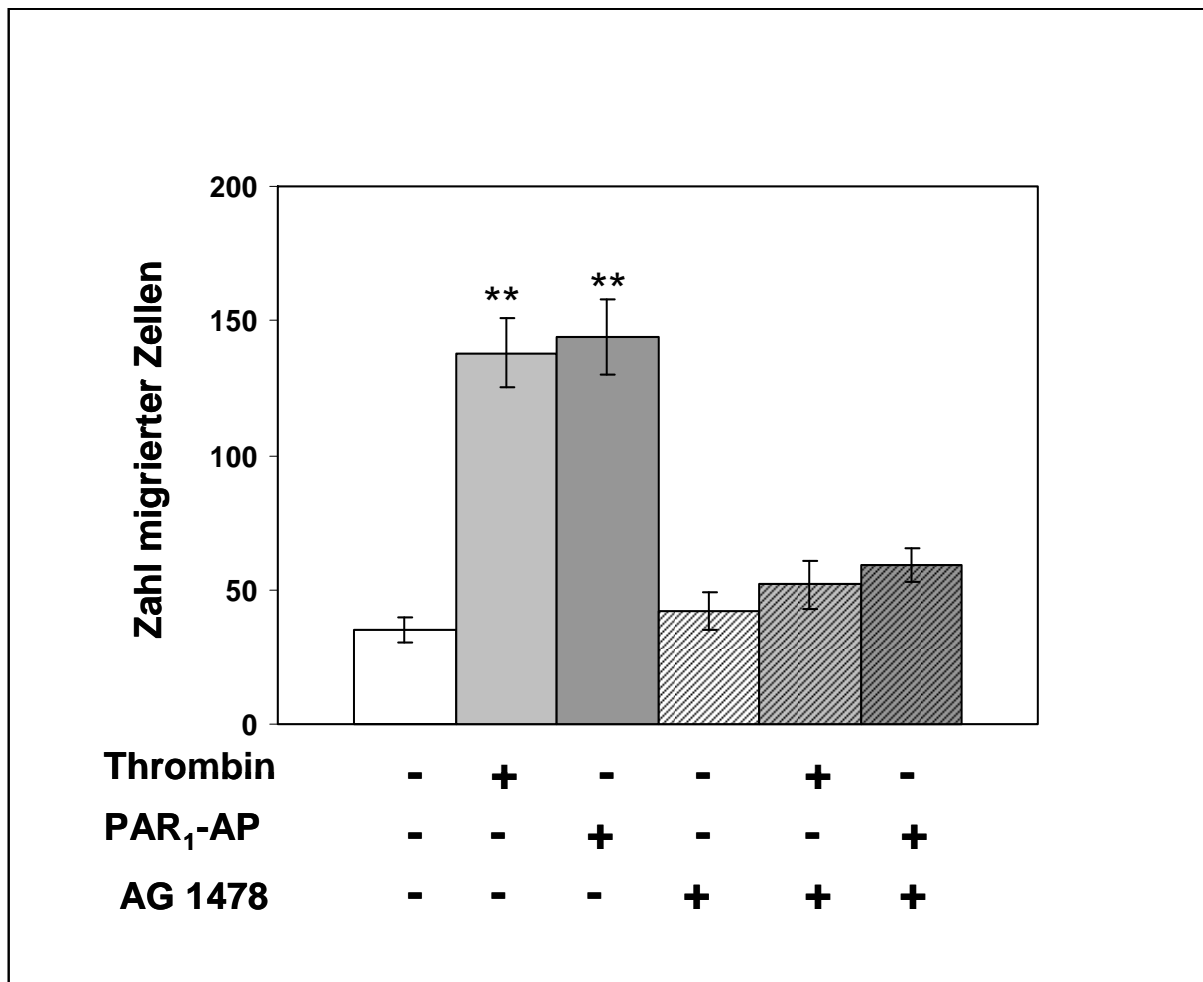


Abb. 10: Der EGFR-Inhibitor Tyrphostin AG 1478 hemmt die Thrombin- und PAR₁-AP-induzierte Migration von SK-HEP-1-Zellen. Die Zellen wurden nach einer 17-stündigen Hungerphase 48 h mit Thrombin (1.0 NIH-U/ml) bzw. dem PAR₁-selektiven Agonisten TFLLRN-NH₂ (100 μ M) stimuliert. AG 1478 (1 μ M) wurde 10 min vorinkubiert, bevor die jeweilige Stimulation erfolgte. Nach Fixierung der durch die Kollagen-beschichtete Membran gewanderten Zellen erfolgte deren Färbung mit Giemsa und Quantifizierung durch Auszählen am Mikroskop. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SD von jeweils acht Einzelbestimmungen eines Experiments dar, das repräsentativ für drei unabhängige Assays ist. **P-Wert = 0,001 vs. nicht stimuliert und vs. AG 1478-behandelt (Mann Whitney U-Test).

6. Diskussion

Das HCC gehört weltweit zu den häufigsten malignen Tumoren und zeigt sowohl in den Endemiegebieten Asien und Afrika als auch in Europa eine steigende Inzidenz (El-Serag et al., 1999). Die Diagnosestellung erfolgt oft erst in einem fortgeschrittenen Stadium. Tumorresektion und Lebertransplantation gelten in frühen Krankheitsstadien als einzige potenziell kurative Therapieverfahren, jedoch besteht auch hier das Problem der Rezidivbildung (Poon et al., 2001; Wilson, 2005). Eine effektive medikamentöse/systemische Therapie existiert bis dato nicht. Und so ist das HCC gegenwärtig die dritthäufigste tumorassoziierte Todesursache (Parkin et al., 2001). Vor diesem Hintergrund ist eine intensive Forschung im Hinblick auf die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden dringend erforderlich (Liu et al., 2006).

Tumorstadium und -progression sind wesentlich von der Aktivität verschiedener Membranrezeptoren abhängig, welche die intrazelluläre Signaltransduktion und nachfolgend Proliferation, Apoptose, Angiogenese, Adhäsion und Motilität verschiedener Zellarten in der Tumormikroumgebung regulieren (Hanahan & Weinberg, 2000). In den letzten Jahren wurden Fortschritte bei der Aufklärung der molekularen Mechanismen des HCCs erzielt, wobei man gegenwärtig intensiv mit der Entwicklung gezielter molekularer Krebstherapien beginnt (Kern et al., 2007). In den bisherigen Untersuchungen haben sich u.a. Rezeptortyrosinkinasen, insbesondere das intrazelluläre Signaling des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR), als eine bedeutsame Targetstruktur erwiesen (Berasain et al., 2007; Ito et al., 2001), wobei ein wesentlicher Mechanismus im EGFR-gekoppelten Signalweiterleitungsnetzwerk die sog. Transaktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) darstellt (Daub et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals gezeigt, dass der Proteinase-aktivierte Rezeptor 1 eine EGFR-Transaktivierung in Leberkarzinomzellen vermittelt und dieser Mechanismus am migratorischen Signaling in diesen Zellen beteiligt ist.

6.1. Experimenteller Hintergrund und Auswahl des zellulären Modells

Für die Experimente wurde SK-HEP-1, eine permanente humane Leberkarzinom-Zelllinie verwendet, die 1971 von einem humanen Leberadenokarzinom abgeleitet und durch Fogh sowie Heffelfinger und Kollegen gut charakterisiert wurde (Fogh, 1977; Heffelfinger et al., 1992). Diese Zelllinie ist ein gängiges zelluläres Modell für Untersuchungen zum hepatozellulären Karzinom (Liu et al., 2000; Takeuchi et al., 1999; Lin et al., 1998). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Expression von PAR₁ in SK-HEP-1-Zellen mit Hilfe

von RT-PCR nachgewiesen, so dass diese Zellen für die nachfolgenden Untersuchungen zur PAR₁-Funktion in Leberkarzinomzellen geeignet waren.

PAR₁ wurde bereits in Zellen verschiedener Tumorentitäten nachgewiesen (Kaufmann et al., 1997; Kaufmann et al., 2000; Kaufmann et al., 2002; Schafberg et al., 1997; Even-Ram et al., 1998; Rudroff et al., 1998; Darmoul et al., 2003). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Höhe der PAR₁-Expression im Mamma- und Pankreaskarzinom mit der metastatischen Kapazität dieser Tumoren korreliert (Even-Ram et al., 1998; Rudroff et al., 2002), weswegen gegenwärtig eine Rolle von PAR₁ bei der Progression epithelialer Tumoren diskutiert wird (Nierodzik et al., 1992; Fischer et al., 1995; Rudroff et al., 1998; Even-Ram et al., 2001; Heider et al., 2004; Bergmann et al., 2006; Yin et al., 2003; Salah et al., 2007). In vorangegangenen Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass PAR₁ in der permanenten Leberkarzinomzelllinie HEP-3B, einer für Untersuchungen zur Hepatokarzinogenese ebenfalls häufig verwendeten Zelllinie, vorkommt (Rahn, 2007; Kaufmann et al., 2007). Von permanenten Zelllinien ist bekannt, dass sie sich vor allem durch das notwendige ständige Passagieren häufig von ihren ursprünglichen Eigenschaften im Tumor erheblich unterscheiden. Aufgrund dessen ist der Aussagewert von Ergebnissen, die an einer einzigen Zelllinie erarbeitet werden, relativ begrenzt und eine Bestätigung durch Verwendung mindestens einer weiteren permanenten Zelllinie der jeweiligen Tumorentität erforderlich. Mit den hier durchgeführten Untersuchungen wurde einer derartigen experimentellen Strategie Rechnung getragen. Unter diesem Aspekt ist der Nachweis der Expression von PAR₁ in SK-HEP-1-Zellen einerseits eine Validierung der Befunde an HEP-3B-Zellen und zum anderen wird das Konzept einer Funktion von PAR₁ im HCC in vivo gestärkt.

6.2. PAR₁ vermittelt in SK-HEP-1-Leberkarzinomzellen eine EGFR-Phosphorylierung

Auf der Ebene der intrazellulären Signalweiterleitung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass der Proteinase-aktivierte Rezeptor 1 in SK-HEP-1-Zellen die Thrombin-induzierte Phosphorylierungsaktivierung des EGFRs vermittelt. Dies wurde aus folgenden Befunden abgeleitet: (I) sowohl der endogene PAR₁-Ligand Thrombin als auch das selektiv PAR₁-aktivierende Peptid TFLLRN-NH₂ induzierten eine EGFR-Aktivierung und (II) der PAR₁-selektive Antagonist SCH 79797 (Ahn et al., 1999, 2000) inhibierte den Effekt von Thrombin vollständig.

Zu berücksichtigen ist, dass in SK-HEP-1-Zellen drei weitere PAR-Subtypen vorkommen: PAR₂, PAR₃ und PAR₄ (Kaufmann et al., 2007; Kaufmann et al., 2008, eingereichtes Manuskript). PAR₂ (Nystedt et al., 1994) ist von Thrombin in einer Konzentration von

1.0 NIH-U/ml nicht aktivierbar (Ossovskaia & Nigel, 2004), so dass seine Beteiligung an den Thrombin-induzierten Effekten prinzipiell auszuschließen ist. PAR₃ und PAR₄ können zwar durch Thrombin aktiviert werden (Hollenberg & Compton, 2002), jedoch sind sie in diesen Signalingmechanismus offensichtlich ebenfalls nicht involviert, da es durch Vorinkubation mit dem PAR₁-Antagonisten SCH 79797 zu einer vollständigen Hemmung des Thrombin-effekts auf die Aktivierung des EGFRs in SK-HEP-1-Zellen kam.

Allerdings kann die Möglichkeit einer Beteiligung von PAR₃- und/oder PAR₄ an der Thrombin-initiierten EGFR-Tyrosinphosphorylierung in SK-HEP-1-Zellen nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden, da zwar nach einer wie in dieser Arbeit verwendeten Stimulationszeit von 3 min eine Aktivierung des EGFRs üblicherweise zu beobachten ist, jedoch beispielsweise auch längerfristige Aktivierungseffekte bekannt sind (Sabri et al., 2003; Ando et al., 2007). Dies sollte in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden, wobei neben PAR-Subtyp-selektiven Agonisten und Antagonisten vor allem auch PAR-Subtyp-spezifische siRNAs Verwendung finden sollten, die das Ausschalten der Expression des jeweiligen PAR-Subtyp-Gens erlauben.

Insgesamt lässt sich daraus ableiten, dass unter den verwendeten Untersuchungsbedingungen PAR₁ der entscheidende Rezeptor für die Vermittlung des Effekts von Thrombin auf die EGFR-Aktivierung in SK-HEP-1-Zellen ist.

Mit den hier vorgestellten Untersuchungen zum PAR₁-Typ-Thrombinrezeptor in HCC-Zellen auf Signalweiterleitungsebene kann demzufolge ein weiteres Beispiel für den cross-talk zwischen Proteinase-aktivierten Rezeptoren und dem Rezeptor für den Wachstumsfaktor EGF charakterisiert werden. Da eine derartige PAR₁-EGFR-Tyrosinkinase-Interaktion auch in Zellen anderer epithelialer Tumorarten nachgewiesen wurde (Darmoul et al., 2004; Bergmann et al., 2006), könnte es sich um einen grundsätzlichen und essentiellen Signalweiterleitungsmechanismus in der Onkogenese solcher Tumoren handeln.

6.3. Die Aktivierung von PAR₁ fördert die chemotaktische Migration in SK-HEP-1-Zellen

Auf zellulärer Ebene wurden im Rahmen dieser Arbeit Experimente zur Thrombin-vermittelten chemotaktischen Migration an SK-HEP-1-Leberkarzinomzellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Stimulation von SK-HEP-1-Zellen sowohl mit Thrombin als auch mit dem PAR₁-selektiven Agonisten TFLLRN-NH₂ zu einer signifikanten Erhöhung der Migrationsrate von Zellen dieser Zelllinie durch eine Kollagen-beschichtete Membranbarriere führt. Des Weiteren ergaben die Untersuchungen, dass der selektive PAR₁-Antagonist SCH 79797 den

Thrombineffekt hemmte. Da diese Hemmung nicht vollständig war, scheinen noch weitere, PAR₁-unabhängige Mechanismen an der Wirkung von Thrombin auf die Migration von SK-HEP-1-Zellen beteiligt zu sein. Primär kommen dafür PAR₃ und PAR₄ in Frage. In weiterführenden Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass via PAR₄-Aktivierung ebenfalls eine Erhöhung der Migrationsrate in HCC-Zellen erreicht werden kann (Kaufmann et al., 2007). Zudem ist zu berücksichtigen, dass Thrombin als Serinproteinase auch rezeptorunabhängige Prozesse durch katalytische Spaltung auslösen kann. Bei Endothelzellen beispielsweise ist bekannt, dass Thrombin durch derartige Mechanismen das Zellwachstum beeinflusst (Herbert et al., 1994). Möglicherweise sind vergleichbare Vorgänge an den Migrationseffekten von Thrombin in SK-HEP-1-Zellen beteiligt.

Um Effekte durch Zellproliferation, die nach einer Inkubationszeit von 48 h denkbar waren und die zu einer Verfälschung der Migrationsdaten geführt hätten, ausschließen zu können, wurden analoge Kontrollexperimente mit dem Proliferationsinhibitor Mitomycin durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass eine Hemmung der Proliferation durch Mitomycin keinen signifikanten Einfluss auf die Migrationsergebnisse hatte. Daher konnte der Einfluss von Proliferationseffekten bei den Migrationsexperimenten ausgeschlossen werden.

Somit lassen die Resultate der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Migration von SK-HEP-1-Zellen darauf schließen, dass der PAR₁-Typ Thrombinrezeptor eine Funktion bei der Regulation der Migration dieser Lebertumorzellen besitzt. Ein solcher Effekt wurde ebenfalls an der Leberkarzinomzelllinie HEP-3B (Kaufmann et al., 2007) sowie an Zellen anderer Tumorentitäten nachgewiesen (Even-Ram et al., 1998, 2001; Kaufmann et al., 2002; Bergmann et al., 2006; Shi et al., 2004; Boire et al., 2005).

Von Thrombin gibt es bereits zahlreiche experimentelle Daten für eine Funktion im Rahmen des metastatischen Prozesses. Dies betrifft sowohl die Absiedlung der Tumorzellen aus dem Primärtumor als auch die zur Ausbildung einer Metastase notwendigen Epithel-Mesenchym-Übergänge, hier insbesondere die Phase des Transports der Tumorzellen im Blutstrom und ihre Anheftung an die Gefäßwand (Camerer et al., 2004). Dabei ist PAR₁ entscheidend an der Vermittlung der Thrombineffekte beteiligt und insgesamt wird gegenwärtig davon ausgegangen, dass PAR₁ bei der Progression epithelialer Tumoren eine wesentliche Rolle spielt (Henrikson et al., 1999; Even-Ram et al., 1998, 2001; Darmoul et al., 2003; Shi et al., 2004; Bergmann et al., 2006). Die im Rahmen der Arbeit erzielten Resultate zum Effekt von PAR₁ auf die Migration von SK-HEP-1-Zellen unterstützen dieses Konzept.

6.4. Der EGFR ist in das PAR₁-vermittelte migratorische Signaling in SK-HEP-1-Zellen involviert

Im Rahmen der Untersuchungen zur PAR₁-vermittelten chemotaktischen Migration konnte weiterhin gezeigt werden, dass die PAR₁-vermittelte Transaktivierung des EGFRs am migratorischen PAR₁-Signaling in SK-HEP-1-Zellen beteiligt ist. Dies zeigte sich daran, dass der selektive EGFR-Inhibitor Tyrphostin (AG 1748) sowohl den Effekt von Thrombin als auch den des PAR₁-selektiven Agonisten TFLLRN-NH₂ hemmte. Ein solcher PAR₁-vermittelter migratorischer Signalweiterleitungsmechanismus konnte auch in humanen Nierenzellkarzinomzellen nachgewiesen werden (Bergmann et al., 2006).

Es ist bekannt, dass die Aktivierung des EGFRs eine wichtige Rolle u.a. bei der Regulation von Tumorzellproliferation und -motilität spielt (Fischer et al., 2003). Da in ca. 68 % der HCCs eine EGFR-Überexpression vorkommt (Ito et al, 2001; Daveau et al., 2003) und bekannt ist, dass EGFR-gekoppelte Signalwege an der Entwicklung proliferativer und invasiver Eigenschaften von HCC-Zellen beteiligt sind (Breuhahn et al., 2006; Gotzmann et al., 2006; Fischer et al., 2006), ist auch deren Funktion in der Progression dieser Tumorentität zu vermuten. Die Ergebnisse dieser Arbeit an SK-HEP-1-Zellen sind ein Hinweis dafür, dass in diesem Szenario auch die PAR₁-vermittelte Transaktivierung des EGFRs eine Rolle spielen könnte.

Da die Transaktivierung des EGFRs durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ein komplexer Vorgang ist bei dem verschiedene Mechanismen wirken können (Böhmer & Wetzker, 2003), sollte dies in nachfolgenden Untersuchungen detailliert erforscht werden. Dabei lassen erste, nach Fertigstellung dieser Arbeit erfolgte Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe eine Beteiligung sowohl von Src-Kinase als auch von Matrix-Metalloproteinasen an der PAR₁-vermittelten EGFR-Transaktivierung in HCC-Zellen vermuten (Kaufmann et al., 2007), so dass damit Ansatzpunkte für die weitere experimentelle Strategie gegeben sind.

7. Schlussfolgerung

Im Rahmen der Arbeit wurde der PAR₁-Typ-Thrombinrezeptor in Zellen der permanenten humanen Leberkarzinomzelllinie SK-HEP-1 nachgewiesen. Somit stand mit dieser Zelllinie ein geeignetes zelluläres Modell für Untersuchungen zur Funktion von PAR₁ im hepatozellulären Karzinom zur Verfügung.

Die Untersuchungen zur Signalweiterleitung konzentrierten sich auf die Effekte der PAR₁-Aktivierung auf die Transaktivierung des EGFRs, der bekannterweise im Rahmen der Hepatokarzinogenese eine Rolle spielt. Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass unter den verwendeten Untersuchungsbedingungen PAR₁ der entscheidende Rezeptor für die Vermittlung des Effekts von Thrombin auf die EGFR-Aktivierung in SK-HEP-1-Zellen ist. Ein derartiger PAR₁-vermittelter Signalweiterleitungsmechanismus konnte somit erstmals in Leberkarzinomzellen nachgewiesen werden. Da es sich dabei um ein komplexes intrazelluläres Regulationssystem handelt, sind Nachfolgeuntersuchungen zur Detailaufklärung notwendig. Insbesondere sollten in diese Untersuchungen weitere permanente Leberkarzinom-Zelllinien sowie HCC-Primärkulturen einbezogen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf zellulärer Ebene ergaben, dass PAR₁ eine Steigerung der chemotaktischen Migration von SK-HEP-1-Zellen vermittelt, wobei eine EGFR-Transaktivierung am migratorischen PAR₁-Signaling beteiligt ist. Da die Fähigkeit von Tumorzellen zur Migration eine Voraussetzung für Invasion und Metastasierung eines Tumors darstellt, ist anzunehmen, dass die PAR₁-initiierte Signalweiterleitung bei der Progression des HCCs eine Rolle spielt.

Deshalb kann eine kombinierte Modulation des Thrombin/PAR₁-Systems mit der PAR₁-vermittelten Transaktivierung des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor die Grundlage für ein neues HCC-Therapiekonzept darstellen. Um dies zu realisieren, bedarf es jedoch noch intensiver Forschung mittels Zellkultur und Versuchstieren, bevor an einen Einsatz an Patienten gedacht werden kann.

8. Literaturverzeichnis

- Ahn HS**, Arik L, Boykow G, Burnett DA, Caplen MA, Czarniecki M, Domalski MS, Foster C, Manna M, Stamford AW, Wu Y (1999) Structure-activity relationships of pyrroloquinazolines as thrombin receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 9:2073-2078.
- Ahn HS**, Foster C, Boykow G, Stamford A, Manna M, Graziano M (2000) Inhibition of cellular action of thrombin by N3-cyclopropyl-7-[[4-(1-methylethyl) phenyl]methyl]-7H-pyrrolo[3,2-f]quinazoline-1,3-diamine (SCH 79797), a nonpeptide thrombin receptor antagonist. *Biochem Pharmacol* 60:1425-1434.
- Al-Ani B**, Saifeddine M, Hollenberg MD (1995) Detection of functional receptors for the proteinase-activated-receptor-2-activating polypeptide, SLIGRL-NH₂, in rat vascular and gastric smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 73:1203-1207.
- Andrade-Gordon P**, Maryanoff BE, Derian CK, Zhang HC, Addo MF, Darrow AL, Eckardt AJ, Hoekstra WJ, McComsey DF, Oksenberg D, Reynolds EE, Santulli RJ, Scarborough RM, Smith CE, White KB (1999) Design, synthesis, and biological characterisation of a peptide-mimetic antagonist for a tethered-ligand receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12257-12262.
- Andrade-Gordon P**, Derian CK, Maryanoff BE, Zhang HC, Addo MF, Cheung WM, Damiano BP, D'Andrea MR, Darrow AL, de Garavilla L, Eckardt AJ, Giardino EC, Haertlein BJ, McComsey DF (2001) Administration of a potent antagonist of protease-activated receptor-1 (PAR-1) attenuates vascular restenosis following balloon angioplasty in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 298:34-42.
- Ando S**, Otani H, Yagi Y, Kawai K, Araki H, Fukuhara S, Inagaki C (2007) Proteinase-activated receptor 4 stimulation-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells. *Respir Res* 16:8-31.
- Avila MA**, Berasain C, Sangro B, Prieto J (2006) New therapies for hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25:3866-3884.
- Bahou WF**, Nierman WC, Durkin AS, Potter CL, Demetrick DJ (1993) Chromosomal assignment of the human thrombin receptor gene: localization to region q13 of chromosome 5. *Blood* 82:1532-1537.
- Baselga J and Averbuch SD** (2000) ZD1839 (Iressa) as an antivancer agent. *Drugs* 60:33-40.

- Berasain C**, Castillo J, Pietro J, Avila MA (2007) New molecular targets for hepatocellular carcinoma: the ErbB1 signaling system. *Liver Int* 27:174-185.
- Bergmann S**, Junker K, Henklein P, Hollenberg MD, Settmacher U, Kaufmann R (2006) PAR-type thrombin receptors in renal carcinoma cells: PAR₁-mediated EGFR activation promotes cell migration. *Oncol Rep* 15:889-893.
- Blume-Jensen P and Hunter T** (2001) Oncogenic kinase Signaling. *Nature* 411:355-365.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Breuhahn K**, Longerich T, Schirmacher P (2006) Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 25:3787-37800.
- Boire A**, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherif S, Kuliopulos A (2005) PAR₁ is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 120:303-313.
- Bosch FX**, Ribes J, Diaz M, Cleries R (2004) Primary liver cancer, worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 127:5-6
- Bosch FX**, Ribes J, Cleries R, Diaz M (2005) Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 9:191-221.
- Branda M and Wands JR** (2006) Signal transduction cascades and hepatitis B and C related hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 43:891-902.
- Bruix J**, Boix L, Sala M, Llovet JM (2004) Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 5:215-219.
- Bunnet NW** (2006) Protease-activated receptors: how proteases signal to cells to cause inflammation and pain. *Semin Thromb Hemost* 1:39-48.
- Cabrera-Vera TM**, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Ham HE (2003) Insights into G-Protein structure, function and regulation. *Endocrine Rev* 24:765-781.
- Camerer E**, Qazi AA, Duong DN, Cornelissen I, Advincula R, Coughlin SR (2004) Platelets, protease-activated receptors and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood* 104:397-401.
- Carpenter G** (2000) EGF receptor transactivation mediated by the proteolytic production of EGF-like agonists. *Sci STKE* 2000:PE1.

- Castells A**, Bruix J, Bru C (1995) Treatment of hepatocellular carcinoma with tamoxifen: a double-blind placebo controlled trial in 120 patients. *Gastroenterology* 109:917-922.
- Chang MH**, Chen DS, Hsu HC, Hsu HY, Lee CY (1989) Maternal transmission of hepatitis B virus in childhood hepatocellular carcinoma. *Cancer* 64:2377-2380.
- Chang MH**, Hsu HC, Lee CY, Chen DS, Lee CH, Lin KS (1984) Fraternal hepatocellular carcinoma in young children in two families. *Cancer* 53:1807-1810.
- Chenais F**, Virella G, Patrick CC, Fudenberg HH (1977) Isolation of soluble immune complexes by affinity chromatography using staphylococcal protein-A-sepharose as substrate. *J Immunol Methods* 18:183-192.
- Clapham DE and Neer EJ** (1993) New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signaling. *Nature* 365:403-406.
- Clapham DE and Neer EJ** (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:167-203.
- Cocks TM and Moffatt JD** (2000) Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends Pharmacol Sci* 21:103-108.
- Collins LR**, Minden A, Karin M, Brown JH (1996) Galph12 stimulates c-Jun NH2-terminal kinase through the small G proteins Ras and Rac. *J Biol Chem* 271:17349-17353.
- Coleman WB** (2003) Mechanisms of human hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med* 3:573-588.
- Coughlin SR** (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407:258-264.
- Cotecchia S**, Ostrowski J, Kjelsberg MA, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Discrete amino acid sequences of the alpha 1-adrenergic receptor determine the selectivity of coupling to phosphatidylinositol hydrolysis. *J Biol Chem* 267:1633-1639.
- Darmoul D**, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M (2003) Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am J Pathol* 162:1503-1513.
- Darmoul D**, Gratio V, Devaud H, Peiretti F, Laburthe M (2004) Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation. *Mol Cancer Res* 2:514-522.
- Daub H**, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A (1997) Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *EMBO J* 16:7032-7044.

- Daub H**, Weiss U, Wallasch C, Ullrich A (1996) Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature* 379:557-560.
- Daveau M**, Scotte M, Francois A, Coulouarn C, Ros G, Tallet Y, Hiron M, Hellot MF, Salier JP (2003) Hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 36:60-64.
- De Garavilla L**, Vergnolle N, Young SH, Ennes H, Steinhoff M, Ossovskaya VS, D'Andrea MR, Mayer EA, Wallace JL, Hollenberg MD, Andrade-Gordon P, Bunnett NW (2001) Agonists of proteinase-activated receptor 1 induce plasma extravasation by a neurogenic mechanism. *Br J Pharmacol* 133:975-987.
- Dery O**, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW (1998) Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* 274:C1429-1452.
- Devreotes PN and Zigmond SH** (1988) Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and dictyostelium. *Annu Rev Biol* 4:649-686.
- Dietrich CG**, Geier A, Tacke J, Garton C, Matern S (2003) Therapie des hepatozellulären Karzinoms. *Dtsch Ärzteblatt* 12:772-782.
- Eguchi S**, Numaguchi K, Iwasaki H, Matsumoto T, Yamakawa T, Utsunomiya H, Motley El-Serag HB (1998) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273:8890-8896.
- El-Serag HB** (2004) Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology* 127:745-750.
- El-Serag HB and Mason AC** (1999) Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med* 340:745-750.
- El-Serag HB**, Mason AC, Key C (2001) Trends in survival of patients with hepatocellular carcinoma between 1977 and 1996 in the United States. *Hepatology* 33:62-65.
- Even-Ram SC**, Maoz M, Pokroy E, Reich R, Katz BZ, Gutwein P, Altevogt P and Bar-Shavit R (2001) Tumor cell invasion is promoted by activation of protease activated receptor-1 in cooperation with the $\alpha_v\beta_5$ -Integrin. *J Biol Chem* 276:10952-10962.
- Even-Ram S**, Uziely B, Cohen P, Grisaru-Granovsky S, Maoz M, Ginzburg Y, Vlodaysky I, Bar-Shavit R (1998) Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat Med* 4:909-914.

- Farazi PA and DePinho RA** (2006) Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 6:674-687.
- Faruqi TR**, Weiss EJ, Shapiro MJ, Huang W, Coughlin SR (2000) Structure-function analysis of proteinase-activated receptor 4 tethered ligand peptides. *J Biol Chem* 275:19728-19734.
- Fischer OM**, Giordano S, Comoglio PM, Ullrich A (2004) Reactive oxygen species mediate Met receptor transactivation by G protein-coupled receptors and the epidermal growth factor receptor in human carcinoma cells. *J Biol Chem* 279:28970-28978.
- Fischer OM**, Hart S, Gschwind A, Ullrich A (2003) EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans* 3:1203-1208.
- Fischer OM**, Hart S, Ullrich A (2006) Dissecting the epidermal growth factor receptor signal transactivation pathway. *Methods Mol Biol* 327:85-97.
- Fogh J**, Fogh JM, Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Natl Cancer Inst* 59:221-226.
- Fukuhara S**, Marinissen MJ, Chiariello M, Gutkind JS (2000) Signaling from G protein-coupled receptors to ERK5/Big MAPK 1 involves G-alpha q and G-alpha 12/13 families of heterotrimeric G proteins. Evidence for the existence of a novel Ras and Rho-independent pathway. *J Biol Chem* 275:21730-21736.
- Gerszten RE**, Chen J, Ishii M, Ishii K, Wang L, Nanevich T, Turck CW, Vu TK, Coughlin SR (1994) Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface. *Nature* 368:648-651.
- Gether U and Kobilka BK** (1998) G protein-coupled receptors II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 273:17979-17982.
- Gotzmann J**, Fischer AN, Zojer M, Mikula M, Proell V, Huber H, Jechlinger M, Waerner T, Weith A, Beug H, Mikulits W (2006) A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene* 25:3170-3185.
- Griffin CT**, Srinivasan Y, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR (2001) A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science* 293:1666-1670.

- Gschwind A**, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A (2001) Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* 20:1549-1600.
- Gutkind JS** (2000) Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Sci STKE* 2000:RE1.
- Han C**, Michalopoulos GK, Wu T J (2006) Prostaglandin E2 receptor EP1 transactivates EGFR/MET receptor tyrosine kinases and enhances invasiveness in human hepatocellular carcinoma cells. *Cell Physiol* 207:261-270.
- Hanahan D and Weinberg RA** (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
- Harris AL** (2001) EGFR Signal Transduction. *Signal* 2/3 (Poster-Beilage).
- Heffelfinger SC**, Hawkins HM, Barrish J, Taylor L, Darlington GJ (1992) SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin. *In Vitro Cell Dev Biol* 28:136-142.
- Heider I**, Schulze B, Oswald E, Henklein P, Scheele J, Kaufmann R (2004) PAR1-type thrombin receptor stimulates migration and matrix adhesion of human colon carcinoma cells by PKC ϵ -dependent mechanism. *Oncol Res* 14:475-482.
- Henrikson KP**, Salazar SL, Fenton JW 2nd, Pentecost BT (1999) Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. *Br J Cancer* 79:401-406.
- Herbert JM**, Dupuy E, Laplace JM, Bar-Shavit R, Tobelem G (1994) Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and a non-proteolytic pathway. *Biochem J* 303:227-231.
- Hepler JR and Gilman AG** (1992) G-proteins. *Trends Biochem Sci.* 17:383-387.
- Hollenberg MD and Comptom SJ** (2002) International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 54:203-217.
- Hollenberg MD and Saifeddine M** (2001) Proteinase-activated receptor 4 (PAR₄): activation and inhibition of rat platelet aggregation by PAR₄-derived peptides. *Can J Physiol Pharmacol* 79:439-442.
- Homberg U** (2007) *Biologie für Mediziner WS 2007/08 [Vorlesungsskript]*. Marburg: Philipps-Universität.
- Höpfner M**, Schuppan D, Scherübel H (2008) Growth factor receptors and related signalling pathways as targets for novel treatment strategies of hepatocellular cancer. *World J Gastroenterol* 14:1-14.

- Höpfner M**, Sutter AP, Huether A, Schuppan D, Zeitz M, Scherübel H (2004) Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 41:1008-1016.
- Hung DT**, Wong YH, Vu TK, Coughlin SR (1992) The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 267:20831-20834.
- Ishihara H**, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR (1997) Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386:502-506.
- Ishii K**, Gerszten R, Zheng YW, Welsh JB, Turck CW, Coughlin SR (1995) Determinants of thrombin receptor cleavage. Receptor domains involved, specificity, and role of the P3 aspartate. *J Biol Chem* 270:16435-16440.
- Ito Y**, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Higashiyama K, Noda K, Miyoshi E, Monden M, Matsuura N (2001) Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 84:1377-1383.
- Jin E**, Fujiwara M, Pan X, Ghazizadeh M, Arai S, Ohaki Y, Kajiwara K, Takemura T, Kawamura O (2003) Protease-activated receptor (PAR)-1 and PAR-2 participate in the cell growth of alveolar capillary endothelium in primary lung adenocarcinomas. *Cancer* 97:703-713.
- Kahn ML**, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR (1999) Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* 103:879-887.
- Kahn ML**, Zhen YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV Jr, Tam C, Coughlin SR (1998) A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394:690-694.
- Kaufmann R**, Junker U, Nuske K, Westermann M, Henklein P, Scheele J, Junker K (2002) PAR-1- and PAR-3-type thrombin receptor expression in primary cultures of human renal cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 20:177-180.
- Kaufmann R**, Rahn S, Pollrich K, Hertel J, Dittmar Y, Hommann M, Henklein P, Biskup C, Westermann M, Hollenberg MD, Settmacher U (2007) Thrombin-mediated hepatocellular carcinoma cell migration: cooperative action via proteinase-activated receptors 1 and 4. *J Cell Physiol* 211:699-707.

- Kaufmann R**, Patt S, Schafberg H, Kalff R, Neupert G, Nowak G (1998) Functional thrombin receptor PAR1 in primary cultures of human glioblastoma cells. *Neuroreport* 9:709-712.
- Kaufmann R**, Schafberg H, Rudroff C, Nowak G (1997) Thrombin receptor activation results in calcium signaling and protein kinase C-dependent stimulation of DNA synthesis in HEP-2g laryngeal carcinoma cells. *Cancer* 80:2068-2074.
- Kawabata A**, Nishikawa H, Kuroda R, Kawai K, Hollenberg MD (1998) Proteinase-activated receptor-2 (PAR-2): regulation of salivary and pancreatic exocrine secretion in vivo in rats and mice. *Br J Pharmacol* 129:1808-1814.
- Kern MA**, Breuhahn K, Schuchmann M, Schirmacher P (2007) Molekulare Patholgenese des hepatozellulären Karzinoms. *Pathologie* 28:261-268.
- Kira S**, Nakanishi T, Suemori S, Kitamoto M, Watanabe Y, Kayijama G (1997) Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in human hepatocellular carcinoma. *Liver* 17:177-182
- Kranenburg O and Moolenaar W H** (2001) Ras-MAP kinase signaling by lysophosphatidic acid and other G protein-coupled receptor agonists. *Oncogene* 20:1540-1546.
- Kuliopulos A**, Covic L, Seeley SK, Sheridan PJ, Helin J, Costello CE (1999) Plasmin desensitization of the PAR1 thrombin receptor: kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. *Biochemistry* 38:4572-4585.
- Krauss G** (2003) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag.
- Kudo M**, Tomita S, Tochio H, Mimura J, Okabe Y, Kashida H (1992) Small hepatocellular carcinoma: diagnosis with US angiography with intraarterials CO₂ microbubbles. *Radiology* 187:155-160.
- Liebermann H**, Furie BC, Tong MJ, Blanchard RA, Ko KJ, Lee SD (1984) Des-γ-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 310:1427-1431.
- Lin LI**, Ke YF, Ko YC, Lin JK (1998) Curcumin Inhibits SK-Hep-1 Hepatocellular Carcinoma Cell Invasion in vitro and Suppresses Matrix Metalloproteinase-9 Secretion. *Oncology* 55:349-353.

- Liu P**, Menon K, Alvarez E, Lu K, Teicher BA (2000) Transforming growth factor-beta and response to anticancer therapies in human liver and gastric tumors in vitro and in vivo. *Int J Oncol*. 16:599-610.
- Liu Y**, Poon RT, Shao W, Sun X, Chen X, Kok TW, Fan ST (2006) Blockage of the epidermal growth factor receptor by quinazoline tyrosin kinase inhibitors suppresses growth of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 248:32-40.
- Llovet JM**, Burroughs A, Bruix J (2003) Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 362:1907-1917.
- Lowes VL**, Ip NY, Wong YH (2002) Integration of signals from receptor tyrosine kinases and G protein-coupled receptors. *Neurosignals* 11:5-19.
- Lu YS**, Hsu C, Li CC, Kuo SH, Yeh KH, Yang CH, Hsu CH, Wu CY, Cheng AL (2004) Phase II study of combination doxorubicin, interferon-alpha and high-dose tamoxifen treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 51:815-819.
- Macfarlane SR**, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R (2001) Protease-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53:245-282.
- Matsuda Y and Yabuuchi I** (1986) US contrast enhancement with CO₂ microbubbles. *Radiology* 161:701-705.
- Mazzaferro V**, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F (1996) Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 334:693-699.
- McRedmond JP**, Harriott P, Walker B, Fitzgerald DJ (2000) Streptokinase-induced platelet activation involves antistreptokinase antibodies and cleavage of protease-activated receptor-1. *Blood* 95:1301-1308.
- Motohara K**, Kuroki Y, Kann H, Endo F, Matsuda I (1985) Detection of vitamin K deficiency by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for circulating abnormal prothrombin. *Pediatr Res* 19:354-357.
- Mullis KB**, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24:17-27.
- Nakanishi-Matsui M**, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludemann MJ, Coughlin SR (2000) PAR₃ is a cofactor for PAR₄ activation by thrombin. *Nature* 404:609-613.

- Nanevicz T**, Ishii M, Wang L, Chen M, Chen J, Turck CW, Cohen FE, Coughlin SR (1995) Mechanisms of thrombin receptor agonist specificity. Chimeric receptors and complementary mutations identify an agonist recognition site. *J Biol Chem* 270:21619-21625.
- Natarajan S**, Riexinger D, Peluso M, Seiler SM (1995) 'Tethered ligand' derived pentapeptide agonists of thrombin receptor: a study of side chain requirements for human platelet activation and GTPase stimulation. *Int J Pept Protein Res* 45:145-151.
- Neves SR**, Ram PT and Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science* 296:1636-1639.
- Nierodzik ML**, Chen K, Takeshita K, Li JJ, Huang YQ, Feng XS, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, Kapatkin S (1998) Protease-activated receptor 1 (PAR-1) is required and rate-limiting for thrombin enhanced experimental pulmonary metastasis. *Blood* 92: 3694-3700.
- Nierodzik ML**, Kajumo F, Karparkin S (1992) Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. *Cancer Res* 52: 3267-3272.
- Nomura Y**, Matsuda Y, Yabuuchi I, Nishioka M, Tarui SI (1993) Hepatocellular carcinoma in adenomatous hyperplasia. Detection with contrast-enhanced US with carbon dioxide microbubbles. *Radiology* 187:353-356.
- Nystedt S**, Emilsson K, Wahlenstedt C, Sundelin J (1994) Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9208-9212.
- Okuda K**, Fujimoto I, Hanei A, Urano Y (1987) Changing incidence of hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer Res* 47:4967-4962.
- Ossovskaya V and Bunnet NW** (2004) Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* 84:579-621.
- Parkin DM**, Bray F, Ferlay F, Pisani P (2001) Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94:153-156.
- Pederson MW and Poulson HS** (2002) Epidermal growth factor receptor in cancer therapy. *Science & Medicine* 8:206-217.
- Pierce KL**, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2001) New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene* 20:1532-1539.
- Philip PA**, Mahoney MR, Allmer C, Thomas J, Pitot HC, Kim G, Donehower RC, Fitch T, Picus J, Erlichman C (2005) Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J Clin Oncol* 23:6657-6663.

- Poon RT**, Fan ST, Yu WC, Lam BK Chan FY, Wong A (2001) A prospective longitudinal study of quality of life after resection of hepatocellular carcinoma. *Arch Surg* 136:418-425.
- Rahn S** (2007) Untersuchungen zur Funktion von PAR-Typ-Thrombinrezeptoren in humanen Hep3B-Leberkarzinomzellen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Ramachandran R and Hollenberg MD** (2007) Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol* 153:263-282.
- Rasmussen UB**, Vouret-Craviare V, Jallat S, Schlesinger Y, Pages G, Pavirani A, Lecocq JP, Pouyssegur J, Van Obberghen-Schilling E (1991) cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca²⁺ mobilisation. *FEBS Lett* 288:123-128.
- Riese DJ and Stern DF** (1998) Specificity within the EGF family/ErbB receptor familysignaling network. *BioEssays* 20:41-48.
- Riewald M**, Kravchenko VV, Petrovan RJ, O'Brien PJ, Brass LF, Ulevitch RJ, Ruf W (2001) Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1. *Blood* 97:3109-3116.
- Riewald M**, Petrovan RJ, Donner A, Mueller BM, Ruf W (2002) Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway. *Science* 296:1880-1882.
- Rudroff C**, Schafberg H, Nowak G, Weinel R, Scheele J, Kaufmann R (1998) Characterization of functional thrombin receptors in human pancreatic tumor cells (MIA PACA-2). *Pancreas* 16:189-194.
- Rudroff C**, Striegler S, Schilli M, Scheele J (2001) Thrombin enhances adhesion in pancreatic cancer in vitro through the activation of the thrombin receptor PAR1. *Eur J Surg Oncol* 27:472-476.
- Rudroff C**, Seibold S, Kaufmann R, Zetina CC, Reise K, Schäfer U, Schneider A, Brockmann M, Scheele J, Neugebauer EA (2002) Expression of the thrombin receptor PAR-1 correlates with tumour cell differentiation of pancreatic adenocarcinoma in vitro. *Clin Exp Metastasis* 19:181-189.
- Rusnak DW**, Lackey K, Affleck K, Wood ER, Alligood KJ, Rhodes N, Keith BR, Murray DM, Knight WB, Mullin RJ, Gilmer TM (2001) The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosin kinase inhibitor, GW 2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 1:85-94.

- Sabri A**, Alcott SG, Elouardighi H, Pak E, Derian C, Andrade-Gordon P, Kinnally K, Steinberg SF (2003) Neutrophil cathepsin G promotes detachment-induced cardiomyocyte apoptosis via a protease-activated receptor-independent mechanism. *J Biol Chem* 278:23944-23954.
- Sabri A**, Short J, Guo J, Steinberg SF (2002) Protease-activated receptor-1-Mediated DNA synthesis in cardiac fibroblasts via epidermal growth factor receptor transactivation: distinct PAR-1 signaling pathways in cardiac fibroblasts and cardiomyocytes. *Circ Res* 91:532-539.
- Sambrano GR**, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR (2001) Role of thrombin signaling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 413:26-27.
- Salah Z**, Maoz M, Pokroy E, Lotem M, Bar-Shavit R, Uziely B (2007) Protease-activated receptor-1 (PAR₁), a survival factor eliciting tumor progression. *Mol Cancer Res* 5:229-240.
- Salomon D and Gullick W** (2001) The erbB family of receptors and their ligands: multiple targets for therapy. *Signal* 2/3:4-11.
- Sasaoka T**, Langlois WJ, Leitner JW, Draznin B, Olefsky JM (1994) The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. *J Biol Chem* 269:32621-32625.
- Schafberg H**, Nowak G, Kaufmann R (1997) Thrombin has a bimodal effect on glioma cell growth. *Br J Cancer* 76:1592-1595.
- Schlessinger J** (1993) How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* 18: 273-275.
- Schlessinger J and Ullrich A** (1992) Growth Factor Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Neuron* 9:383-391.
- Schwartz JD and Beutler AS** (2004) Therapy for unresectable hepatocellular carcinoma: review of the randomized clinical trials-II: systemic and local non-embolizations-based therapies in unresectable and advanced hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs* 15:439-452.
- Schmidt VA**, Nierman WC, Maglott DR, Cupit LD, Moskowitz KA, Wainer JA, Bahou WF (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.

Sekiguchi F, Saito S, Takaoka K, Hayashi H, Nagataki M, Nagasawa K, Nishikawa H, Matsui H, Kawabata A (2007) Mechanisms for prostaglandin E2 formation caused by proteinase-activated receptor-1 activation in rat gastric mucosal epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 73:103-114.

Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, Mueller BM (2004) Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res* 2:395-402.

Slichenmyer WJ, Elliot WL, Fry DW (2001) CI-1033, a pan-erbB tyrosine kinase inhibitor. *Semin Oncol* 28:407-412.

Steinhoff M, Buddenkotte J, Shpacovitch V, Rattenholl A, Moormann C, Vergnolle N, Luger TA, Hollenberg MD (2005) Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endoc Rev* 26:1-43.

Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, Tognetto M, Amadesi S, Ennes HS, Trevisani M, Hollenberg MD, Wallace JL, Caughey GH, Mitchell SE, Williams LM, Geppetti P, Mayer EA, Bunnett NW (2000) Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 6:151-158.

Stryer L (1990) *Biochemie*, Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH.

Takada T, Yasuda H, Uchiyama K, Hasegawa H, Shikata J (1990) Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography of small hepatocellular carcinoma. *Surgery* 107:528-532.

Takeuchi A, Kaneko S, Matsushita E, Urabe T, Shimoda A, Kobayashi K (1999) Interferon-alpha modulates resistance to cisplatin in three human hepatoma cell lines. *J Gastroenterol.* 34:351-358.

Thorgeirsson SS and Grisha JW (2002) Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 31:339-346.

Ueno Y, Sakurai H, Matsuo M, Choo MK, Koizumi K, Saiki I (2005) Selective inhibition of TNF-alpha-induced activation of mitogen-activated protein kinases and metastatic activities by gefitinib. *Br J Cancer* 92:1690-1695.

- Van der Geer P**, Wiley S, Lai VK, Olivier JP, Gish GD, Stephens R, Kaplan D, Shoelson S, Pawson T (1995) A conserved amino-terminal Shc domain binds to phosphotyrosine motifs in activated receptors and phosphopeptides. *Curr Biol* 5: 404-412.
- Van der Merwe JQ**, Hollenberg MD, Macnaughton WK (2007) EGF Receptor Transactivation and MAP Kinase Mediate Proteinase-Activated Receptor-2-Induced Chloride Secretion in Intestinal Epithelial Cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294:441-451.
- Vergnolle N** (1999) Proteinase-activated receptor-2-activating peptides induce leukocyte rolling, adhesion, and extravasation in vivo. *J Immunol* 163:5064-5069.
- Vergnolle N**, Bunnett NW, Sharkey KA, Brussee V, Compton SJ, Grady EF, Cirino G, Gerard N, Basbaum AI, Andrade-Gordon P, Hollenberg MD, Wallace JL (2001) Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. *Nat Med* 7:821-826.
- Villanueva A**, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM (2007) Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 27:55-76.
- Vu TK**, Hung DT, Wheaton VI and Coughlin SR (1991a) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057-1068.
- Vu TK**, Wheaton VI, Hung DT, Charo I, Coughlin SR (1991b) Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* 353:674-677.
- Wands JR** (2004) Prevention of hepatocellular carcinoma. *New Engl J Med* 351:1567-1570.
- Wetzker R and Böhmer FD** (2003) Transaktivierung joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade. *Nat Rev Mol Biol* 4:651-657.
- Wilson JF** (2005) Liver cancer on the rise. *Ann Intern Med* 142:1029-1032.
- Wojtukiewicz MZ**, Tang DG, Ben-Joef E, Renaud C, Walz DA, Honn KV (1995) Solid tumor cells express functional „tethered ligand“ thrombin receptors. *Cancer Res* 55:698-704.
- Wu TC**, Tong MN Hwang C, Les SD, Hu MM (1987) Primary hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus infection during childhood. *Hepatology* 7:46-48.
- Xu WF**, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Forster DC (1998) Cloning and characterization of human protease-activates receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6642-6646.
- Yarden Y and Ullrich A** (1988) Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases. *Ann Rev Biochem* 57:443-478.

- Yin YJ**, Salah Z, Grisaru-Granovsky S (2003) Human protease-activated receptor 1 expression in malignant epithelia: a role in invasiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:940-944.
- Zhang HC**, Derian CK, Andrade-Gordon P, Hoekstra WJ, McComsey DF, White KB, Poulter BL, Addo MF, Cheung WM, Damiano BP, Oksenberg D, Reynolds EE, Pandey A, Scarborough RM, Maryanoff BE (2001) Discovery and optimization of a novel series of thrombin receptor (par-1) antagonists: potent, selective peptide mimetics based on indole and indazole templates. *J Med Chem* 44:1021-1024.
- Zhang HC**, Zang J, Benovic JL, Sugai M, Wetzker R, Gout I, Rittenhouse SE (1995) Sequestration of a G-protein beta gamma subunit or ADP-ribosylation of rho can inhibit thrombin-induced activation of platelet phosphoinositide 3-kinases. *J Biol Chem* 270:6589-6594.
- Zwick E**, Hackel PO, Prenzel N, Ullrich A (1999) The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. *Trends Pharmacol Sci* 20:408-412.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und insbesondere bei:

Herrn Prof. Dr. U. Settmacher, Chefarzt der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie Jena, für die Überlassung des interessanten Themas, die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten im Labor und die stetige Förderung dieser Arbeit,

Herrn Dr. R. Kaufmann, Leiter des Forschungslabors der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie Jena, für die außerordentlich gute Betreuung dieser Arbeit, die mit viel Einsatz, wertvoller Kritik sowie viel Motivation und Geduld verbunden war,

den Mitarbeiterinnen des Forschungslabors der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie Jena, Frau B. Schulze und Frau E. Oswald, für die wertvolle Unterstützung beim Erlernen von Arbeitstechniken, die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre sowie ihre große Hilfsbereitschaft

und nicht zuletzt bei Max Stumpf, Kristin und Tobias Zwenzner sowie meiner Familie für ihre Unterstützung während dieser Zeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Julia Hertel
Geburtsdatum / -ort 05.03.1982 in Werdau, Deutschland
Familienstand ledig
Adresse Griesern-Weg 19, CH-8037 Zürich

Schullaufbahn und Studium

1992 - 2000 Julius-Motteler-Gymnasium in Crimmitschau
6/2000 Abitur
10/2000 - 12/2006 Medizinstudium, Friedrich-Schiller-Universität Jena
05/2005 - 03/2008 Doktorandin im Forschungslabor der Klinik für
Allgemein-, Viszeral- und Gefässchirurgie, Prof. Dr. U.
Settmacher, Universitätsklinikum Jena
17/2006 3. Staatsexamen

Berufliche Laufbahn

04/2007 bis 07/2008 Assistenzärztin in der Hals-Nasen-Ohren-Klinik / inter-
disziplinäres Zentrum für Schwindel und Gleichge-
wichtsstörungen, Universitätsspital Zürich, Schweiz

Seit 08/2008 Assistenzärztin in der Privatklinik Schlössli, Privatklinik
für Psychiatrie und Psychotherapie, Oetwil am See,
Schweiz

Ort, Datum:.....

Unterschrift:.....

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. U. Settmacher, Dr. R. Kaufmann, Frau B. Schulze und Frau E. Oswald,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar gegen geldwerte Leistung von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine anderer Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum..... Unterschrift des Verfassers.....