

수용성 EPCR에 의한 활성화된 단백질 C의 항염증 작용에 관한 연구

배종섭 · 박문기[†] · 박상욱*

대구한의대학교 한방계약공학과
712-715 경상북도 경산시 유곡동 290번지
*부산대학교 화학공학과
609-735 부산시 금정구 장전동 산 30
(2009년 3월 25일 접수, 2009년 7월 18일 채택)

Effect of Soluble EPCR on the Anti-Inflammatory Effects by Activated Protein C

Jong-Sup Bae, Moon-Ki Park[†] and Sang-Wook Park*

Department of Herbal Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, 290, Yugok-dong, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 712-715, Korea

*Division of Chemical Engineering, Pusan National University, San 30, Jangjun-dong, Gumjung-gu, Busan 609-735, Korea

(Received 25 March 2009; accepted 18 July 2009)

요 약

본 논문에서는 혈관내피세포에서 활성화된 단백질 C(Activated Protein C, APC)의 항염증 작용에서 수용성 EPCR(Soluble Endothelial Protein C Receptor, sEPCR)의 효과를 관찰하였다. sEPCR은 APC가 매개하는 항염증 작용에 있어 내피세포막의 보호효과를 저해하고, 혈관내피세포에 대한 백혈구의 부착저해 효과를 억제하며, 혈관내피세포를 관통하는 백혈구의 이동을 저해하는 효과를 억제한다. 그리고 흥미롭게도 sEPCR은 내피세포에서 TNF-alpha에 의한 세포부착단백질의 발현을 억제하는 APC의 기전을 저해함으로써 APC가 가지는 항염증 효과를 억제한다. 이것은 APC의 Gla 도메인이 내피세포의 수용체인 EPCR에 결합할 수 있는 부위에 sEPCR이 상호작용함으로써 더 이상 APC이 세포막에 존재하는 EPCR과 결합을 못함으로써 APC의 항염증 작용은 억제되는 것을 의미한다. 이 결과는 향후 중증 패혈증 및 염증질환을 효과적으로 치료할 수 있는 신약개발에 중요한 단서를 제공할 것이고 내피세포에서 아직 명확하게 밝혀지지 않은 APC의 항염증 작용의 기전을 밝히는 데 좋은 정보를 제공할 것이다.

Abstract – In this study, we evaluated the effect of soluble EPCR(Soluble Endothelial Protein C Receptor, sEPCR) on the anti-inflammatory activities by activated protein C(APC) in endothelium. We demonstrated that sEPCR inhibited the barrier protective activity, the inhibition of neutrophils adhesion toward endothelial cells and the inhibition of transendothelial migration by APC in endothelial cells. Interestingly, sEPCR also blocked the mechanism by which APC inhibited the expression of cell adhesion molecules(CAM) by TNF-alpha in endothelial cells. These results suggested that the anti-inflammatory activities of APC was inhibited by sEPCR which blocked the binding motifs of Gla domain of APC to membrane bound EPCR. This finding will provide the important evidence in the development of new medicine for the treatment of severe sepsis and inflammatory diseases and good clue for understanding unknown mechanisms by which APC showed the anti-inflammatory activities in endothelium.

Key words: sEPCR, APC, Thrombin, Inflammation, Endothelium

1. 서 론

혈액응고반응과정을 통해 생성된 트롬빈은 피브린을 생성할 뿐만 아니라 많은 세포를 자극하기도 한다[1]. 트롬빈은 내피세포막에 존재하는 트롬보모듈린(thrombomodulin, TM)을 통해 결합할 수 있다. 트롬보모듈린에 결합한 트롬빈은 불활성 상태인 단백질 C(Protein C, PC)를 활성화된 단백질 C(Activated Protein C, APC)로

활성화시킨다[2]. 이때, PC 혹은 APC는 내피세포막에 있는 수용체인 EPCR(Endothelial Protein C Receptor)에 결합되어 있다. APC는 비타민 K 의존성 항응고 단백질로 응고인자 V와 VIII를 가수분해함으로써 응고 작용을 방해한다[1,2]. 두 개의 응고인자를 불활성화시키는 APC의 항응고 작용은 단백질 S(Protein S, PS)에 의해 촉진된다[3,4]. APC는 트롬빈 형성을 조절하는 역할뿐만 아니라 최근의 여러 논문에서 항염증 작용과 세포사멸억제기능을 보여주고 있다[5-11]. 이런 결과로 APC는 패혈증 치료제로서 미국연방 식품의약청(FDA)에서 유일하게 승인되었다[12]. APC의 세포보호 작용(항염증 작용 및 세포사멸억제작용)은 내피세포막에 존재하는 PC의 수용

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: moonki@dhu.ac.kr

*이 논문은 부산대학교 박상욱 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

체인 EPCR과 GPCR(G Protein-Coupled Receptor)의 한 종류인 PAR-1(Protease Activated Receptor-1)과의 상호작용을 통해 매개된다고 알려져 있다[13]. 특히, APC-EPCR-PAR-1 complex를 통해서 매개되는 세포보호작용은 (1) 항염증 및 세포사멸과 관련된 유전자 발현의 변화 (2) 항염증 작용 (3) 세포사멸 보호작용 (4) 내피세포막의 보호작용 등을 포함한다[13]. 이와 같은 APC의 각각의 작용들은 잠재적으로 서로 연관되어 있을지 모르지만, 각각의 작용은 완전히 구별이 되고 APC가 작용하는 특정 세포의 종류, 위치 및 조건 등에 따라서 같은 기전을 가지고 혹은 다른 기전을 통해서 작용한다[13]. 조직에서 EPCR과 PAR-1의 분포는 명확한데, 이들의 발현은 특히 혈관의 표면에서 그 발현은 상당히 높다[13,14]. 그리고 최근에 EPCR과 PAR-1이 혈관내피세포막의 지질뗏목에 분포한다는 것과 기능적으로 EPCR과 PAR-1이 상호작용하고 물리적으로 서로 결합되어 있다는 사실이 밝혀졌다[15].

EPCR은 제1종의 막통과단백질(Transmembrane Protein)으로서 PC 또는 APC의 Gla 도메인과 상호작용함으로써 높은 결합력($K_d=30$ nM)을 가진다[11,16,17]. 수용성 EPCR(sEPCR)은 인체의 혈장에서 처음 발견되었으며, 세포막에 박혀있는 EPCR과 거의 동일한 결합력으로 PC 또는 APC와 상호작용한다[18]. 건강한 인체에서 sEPCR은 약 2.5 nM 정도의 농도로 순환하고 있으며 폐혈증 환자에서는 그 농도가 5배까지 증가한다[19]. 내피세포막에 박혀있는 EPCR과는 달리 sEPCR은 PC의 활성화를 저해한다[20]. 이것은 아마 내피세포막의 EPCR과 sEPCR이 서로 경쟁적으로 작용하여 단백질 C의 활성화를 방해한다고 생각되고 있지만 그 정확한 기전은 잘 모르고 있다. 뿐만 아니라 sEPCR이 APC가 가지는 항염증 작용에서 어떤 작용을 하는지 아직 알려진 바가 없다. 그래서 이 논문에서는 sEPCR이 APC가 가지는 항염증 작용 즉, (1) 내피세포막 보호작용 (2) 백혈구의 내피세포에 대한 부착력을 저해하는 기능 (3) 백혈구가 내피세포막의 통과를 저해하는 기능 (4) 세포부착을 유도하는 단백질의 발현을 저해하는 기능에서 어떤 역할을 하는지를 연구하고자 한다.

2. 실험재료 및 방법

2-1. 실험재료

APC, PC, PC의 활성부위 세린잔기(Ser)를 알라닌잔기(Ala)로 전환시켜 불활성화시킨 PC-S195A의 발현 및 분리의 방법은 이전의 방법에 따라 수행하였다[15]. 트롬빈은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 TNF-alpha(Tumor Necrosis Factor alpha)는 R&D System(Minneapolis, MN, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2-2. 실험방법

2-2-1. 세포배양

Ea.hy926 세포(혈관내피세포주, Dr. C. Edgell부터 얻음, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA)는 37 배양기에서 DMEM, 10% FBS(Fetal Bovine Serum)와 항생제(penicillin G와 streptomycin)를 넣어 배양하였다. 건강한 지원자로부터 얻은 백혈구와 단핵구 세포주인 THP-1 세포의 배양은 이전에 방법대로 배양하였다[21].

2-2-2. 투과성실험

세포의 투과성실험은 두 개의 chamber(transwell)를 이용하여 단층으로 된 Ea.hy926 세포를 투과하는 BSA(bovine serum albumin)

에 결합한 에반스 블루 염색약의 정도를 측정함으로써 수행하였다. 먼저 5,000개의 Ea.hy926 세포를 4일 배양해서 조밀한 단층의 세포군을 만들고, 시험할 단백질을 3시간 배양한다. 세포를 PBS(pH 7.4)로 씻은 후 5 nM의 트롬빈과 10분 동안 배양한다. 안쪽 chamber를 다시 PBS로 씻고 0.4% BSA와 0.67 mg/ml 에반스 블루(Sigma, St. Louis, MO, USA) 혼합물을 세포배양액과 함께 넣어준다. 10분 후, 바깥쪽 chamber로 스며 나오는 염색시약을 650 nm에서 흡광도를 측정한다[11-15].

2-2-3. 세포-세포간 부착력 실험

백혈구가 내피세포에 부착하는 실험은 백혈구 형광물질을 코팅시켜 진행하였다. 건강한 지원자로부터 얻은 백혈구를 5 μ M Vybrand DiD(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 37 배양기에서 20분간 배양한다. 조밀한 단층의 Ea.hy926 세포는 시험할 단백질과 미리 반응시키고, 10 ng/ml TNF-alpha와 4시간 반응시킨다. PBS로 씻은 후 1,500,000개의 백혈구를 조밀한 단층의 Ea.hy926 세포에 넣어준다. 이 때, 부착력의 전체신호를 흡광도를 측정하여 얻는다. 1시간 후 접촉하지 않은 백혈구는 씻어주고, 접촉한 백혈구의 부착력을 같은 방법으로 측정한다. 부착력(%)=(접촉신호/전체신호) \times 100 식으로 계산한다[11-15].

2-2-4. 내피세포를 통과하는 백혈구의 이동률(TEM)

백혈구의 이동실험은 두 개의 chamber(transwell)를 이용하여 단층으로 된 Ea.hy926 세포를 통과하는 백혈구의 수를 측정함으로써 수행하였다[11]. 먼저 60,000개의 Ea.hy926 세포를 3일 배양해서 조밀한 단층의 세포군을 만들고, Ea.hy926 세포는 시험할 단백질과 미리 반응시키고, 10 ng/ml TNF-alpha와 4시간 반응시킨다. PBS로 씻은 후 1,500,000개의 백혈구를 조밀한 단층의 Ea.hy926 세포에 넣어준다. 2시간 후 안쪽 chamber의 이동하지 않은 백혈구를 제거하고 chamber의 아래로 이동한 백혈구를 8% glutaraldehyde로 고정하고 0.25% crystal violet으로 염색한다. 고배율의 현미경으로 관찰하여 이동한 백혈구의 수를 계산한다(Migration Index).

2-2-5. 세포부착단백질의 발현

VCAM(Vascular Cell Adhesion Molecule), ICAM(InterCellular Adhesion Molecule)와 E-Selectin의 발현은 ELISA를 통해 측정하였다[11]. 조밀한 단층의 Ea.hy926 세포에 시험할 단백질을 24시간 처리한 후 10 ng/ml TNF-alpha를 4시간 처리한다. 세포를 PBS로 씻은 후 1% paraformaldehyde로 15분간 고정시킨다. 각각에 대한 1 차항체(1:50)를 넣어주고 1시간 배양하고 2차항체를 1시간 배양한다. 그 후 o-phenylenediamine 기질을 넣은 후 흡광도(490 nm)를 측정한다.

2-2-6. 통계처리

각 실험은 최소 3번 이상 검정하였고, 실험 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였고 non-paired Student's t test로 검정하여 P값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. sEPCR의 세포투과성 효과

APC는 세포막의 붕괴를 초래하는 외부의 자극으로부터 보호한다는 것은 이미 여러 차례 보고되었다[10,11,13,15,21]. APC에 의한 내피세포막의 보호효과에서 sEPCR의 효과를 관찰하였다(Fig. 1A). 결과에서 볼 수 있듯이 APC는 5 nM부터 100 nM의 범위에서 트

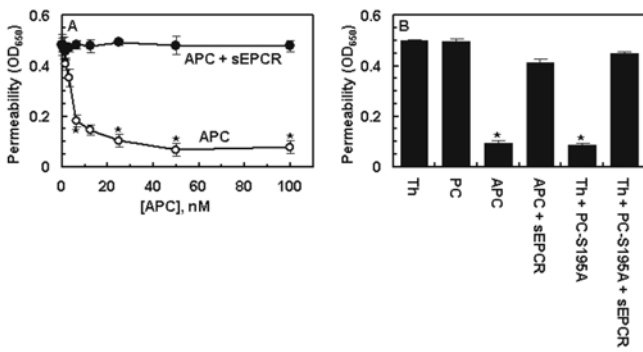


Fig. 1. Effect of sEPCR on the barrier protective activities of APC and Th with PC-S195A. (A) Confluent monolayers of Ea.hy926 cells were treated with indicated concentrations of APC in either absence (○) or presence (●) of a saturating concentration of sEPCR (500 nM) for 3 hours followed by cleavage of monolayer by 5 nM thrombin for 10 min as described under materials and methods. (B) Ea.hy926 cells were incubated with 80 nM PC, 20 nM APC, 2 nM thrombin + 80 nM PC-S195A with in the absence or presence of 500 nM sEPCR for 3 hours before inducing permeability with 5 nM thrombin for 10 min. *P < 0.05.

롬빈에 의한 세포막 갈라짐 반응에서 세포막 보호작용은 관찰되었고, 반면에 500 nM sEPCR과 미리 반응한 APC의 세포막 보호작용은 모든 범위에서 사라진 것으로 관찰할 수 있었다. PC의 활성부위인 세린(Ser)을 알라닌(Ala)으로 치환시킨 PC-S195A가 내피세포의 EPCR에 결합시키면 내피세포에서 트롬빈에 의한 염증자극반응을 항염증자극반응으로 바꾸어 준다는 사실도 보고되었다[10,21]. 이와 같은 반응에서 sEPCR이 트롬빈과 PC-S195A에 의한 세포막 보호 효과에서 어떤 효과가 있는지를 관찰하였다(Fig. 1B). 결과에서 볼 수 있듯이 500 nM sEPCR은 APC 또는 트롬빈과 PC-S195A에 의한 세포막 보호효과를 억제하였다. 이러한 결과는 PC-S195A 혹은 APC가 그들의 기능적인 수용체인 내피세포막의 EPCR에 결합할 수 있는 부위가 이미 sEPCR과 반응 및 결합함으로써 더 이상 내피세포막의 EPCR에 결합할 수 없기 때문이다. 즉 EPCR 의존적인 APC 또는 트롬빈과 PC-S195A에 의한 세포막 보호효과는 sEPCR에 의해 더 이상 내피세포막의 EPCR에 결합할 수 없기 때문에 그 효과는 사라진 것으로 보인다.

3-2. sEPCR의 세포부착성 효과

염증반응에서 중요한 한 가지 반응은 염증반응의 신호를 받은 백혈구 세포가 혈관 내피세포에 부착하는 것이다[10-13]. APC 혹은 트롬빈과 PC-S195A는 염증반응 조건에서 백혈구가 혈관내피세포에 부착하는 것을 저해함으로써 항염증 효과가 있다는 것은 이미 보고되었다[10,11]. 본 실험에서는 이와 같은 APC 혹은 트롬빈과 PC-S195A에 의한 백혈구의 내피세포에 대한 부착성 저해효과에 있어 sEPCR의 효과를 보기 위해 500 nM sEPCR을 APC 혹은 PC-S195A와 미리 반응한 후 세포부착력을 실험하였다. 결과에서 볼 수 있듯이 인체의 혈액에서 분리한 백혈구(Fig. 2A) 혹은 백혈구 세포주(THP-1 cells, Fig. 2B)에서 TNF-alpha에 의한 염증반응조건에서 sEPCR은 APC 혹은 트롬빈과 PC-S195A에 의한 백혈구의 내피세포에 대한 부착성 저해효과를 억제하였다.

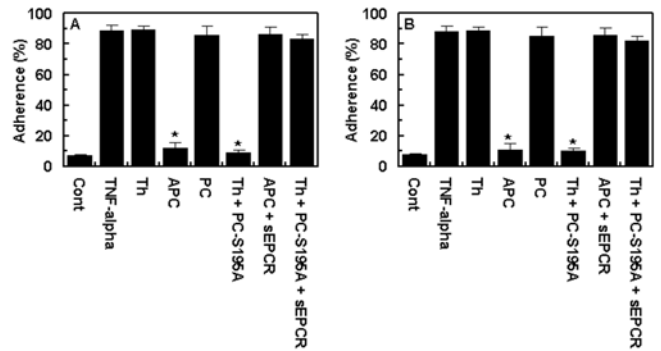


Fig. 2. Effect of sEPCR on the inhibition of neutrophil adhesion to endothelial cells by APC and Th with PC-S195A. (A) TNF-alpha mediated adherence of primary neutrophil to Ea.hy926 cells was analyzed after treating monolayers with 80 nM PC, 20 nM APC, 2 nM thrombin + 80 nM PC-S195A with in the absence or presence of 500 nM sEPCR as described under materials and methods. (B) the same as (A) except that cell type is THP-1 cells. *P < 0.05.

3-3. sEPCR의 세포이동성 효과

염증반응에 있어 또 다른 중요한 반응은 염증반응신호를 받은 백혈구가 일단 혈관내피세포에 부착한 다음 염증반응부위로 이동하기 위해 혈관내피세포간의 결합을 뚫고 이동하는 transendothelial migration(TEM)이다[11]. APC 혹은 트롬빈과 PC-S195A는 염증반응 조건에서 백혈구의 TEM 효과를 저해한다는 것은 이미 보고되었다[11]. 본 실험에서는 이와 같은 APC 혹은 트롬빈과 PC-S195A에 의한 백혈구의 내피세포에 대한 TEM 저해효과에 있어 sEPCR의 효과를 보기 위해 500 nM sEPCR을 APC 혹은 PC-S195A와 미리 반응한 후 TEM 실험하였다. 결과에서 볼 수 있듯이 TNF-alpha에 의한 염증반응조건에서 인체의 혈액에서 분리한 백혈구(Fig. 3A) 혹은 백혈구 세포주(THP-1 cells, Fig. 3B)에서 sEPCR은 APC 혹은 트롬빈과 PC-S195A에 의한 백혈구의 내피세포에 대한 TEM 저해효과를 억제하였다.

이러한 결과는 sEPCR이 PC-S195A 혹은 APC가 내피세포의 EPCR에 결합할 수 있는 부위에 결합함으로써 더 이상 기능적인 내

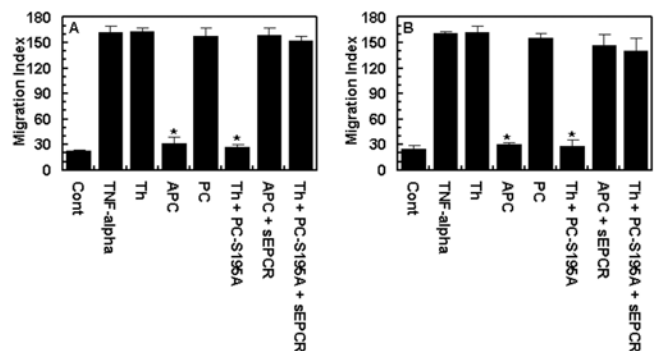


Fig. 3. Effect of sEPCR on the inhibition of transendothelial migration by APC and Th with PC-S195A. (A) TNF-alpha mediated migration of primary neutrophil through Ea.hy926 cells was analyzed after treating monolayers with 80 nM PC, 20 nM APC, 2 nM thrombin + 80 nM PC-S195A with in the absence or presence of 500 nM sEPCR as described under materials and methods. (B) the same as (A) except that cell type is THP-1 cells. *P < 0.05.

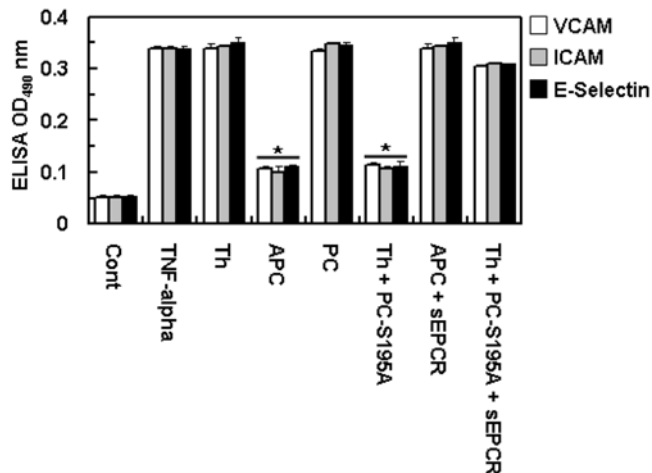


Fig. 4. Analysis of the effect of sEPCR on the inhibition of TNF-alpha induced expression of cell adhesion molecules in Ea.hy926 cells by APC and Th with PC-S195A. The expression of adhesion molecules VCAM (white bars), ICAM (gray bars) and E-selectin (black bars) in confluent Ea.hy926 cells was analyzed by ELISA after treating monolayers with 80 nM PC, 20 nM APC, 2 nM thrombin + 80 nM PC-S195A with in the absence or presence of 500 nM sEPCR. *P<0.05.

피세포막의 EPCR에 결합할 수 있는 부위는 없기 때문이다. APC-EPCR-PAR1으로 이어지는 항염증 작용의 기전에서 실질적인 수용체인 PAR-1이 작동되기 위해서 APC가 EPCR에 결합되어야 하는데 이 단계에서 APC가 EPCR에 결합할 수 없기 때문에 APC의 항염증 작용은 더 이상 기능을 발휘하지 못하게 된다.

3-3. sEPCR의 세포부착단백질 발현 효과

염증반응에서 백혈구의 혈관내피세포에 대한 부착력 증가와 TEM의 증가는 TNF-alpha에 의해 VCAM(Vascular Cell Adhesion Molecule), ICAM(Intercellular Adhesion Molecule) 그리고 E-Selectin 같은 세포부착단백질(Cell Adhesion Molecule, CAM)의 증가에 기인한다[11,21]. APC 혹은 트롬빈과 PC-S195A는 염증반응 조건에서 CAM의 발현을 저해한다는 것은 이미 보고되었다[11,21]. 본 실험에서는 이와 같은 APC 혹은 트롬빈과 PC-S195A에 의한 CAM 발현의 저해효과에 있어 sEPCR의 효과를 보기 위해 500 nM sEPCR을 APC 혹은 PC-S195A와 미리 반응한 후 CAM 발현을 ELISA를 통해 연구하였다. 결과에서 볼 수 있듯이 TNF-alpha에 의한 염증반응조건에서 sEPCR은 APC 혹은 트롬빈과 PC-S195A에 의한 CAM 발현의 저해효과를 억제하였다. 이러한 결과는 PC 혹은 APC가 내피세포막에 존재하는 기능적인 수용체인 EPCR에 결합한 후 PAR-1에 의한 항염증 작용에 있어서 sEPCR은 그 첫 단계인 PC 혹은 APC가 EPCR에 결합하는 것을 저해함으로써 APC 혹은 트롬빈과 PC-S195A의 항염증 작용을 억제하는 것으로 생각된다.

4. 결 론

본 논문에서는 APC 혹은 트롬빈과 PC-S195A의 조합이 가지는 항염증 작용에 있어서 sEPCR의 역할을 규명하고자 연구를 기술하였다. sEPCR은 APC의 항염증 작용 즉, (1) 내피세포막 보호작용 (2) 혈관내피세포에 대한 백혈구의 부착력 저해작용 (3) 혈관내피세포 화학공학 제47권 제4호 2009년 8월

포를 관통하는 백혈구의 이동성 저해작용 (4) 세포부착단백질의 발현을 억제하는 작용 등을 모두 저해한다. 이것은 APC 또는 PC-S195A이 내피세포막에 있는 그들의 수용체인 EPCR에 결합할 수 있는 부분과 미리 반응하기 때문에 더 이상 내피세포막의 EPCR에 결합할 수 없기 때문이다. 이로 인해 APC-EPCR-PAR1 복합체로 작용하는 APC의 항염증 작용에 있어 중요한 EPCR이 가용하지 않기 때문에 더 이상 PAR-1을 사용할 수 없게 되기 때문이다. 따라서 이 연구는 APC-EPCR-PAR1 복합체로 이뤄지는 APC의 기전연구와 혈액 내에 존재하는 수용성 EPCR(sEPCR)을 조절함으로써 패혈증을 포함하는 염증질환을 효과적으로 치료할 수 있는 방법이 있어 많은 방향성을 제시할 것으로 기대한다.

감 사

본 연구에 필요한 일부 연구재료는 대구한의대학교 국가지정 한약자원 향장소재은행으로부터 받아 사용하였습니다. 본 연구는 농림부 농림기술개발사업에 의해 선정된 고려인삼명품화사업단(GRCMVP)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Esmon, C. T., "The Roles of Protein C and Thrombomodulin in the Regulation of Blood Coagulation," *J. Biol. Chem.*, **264**, 4743-4746(1989).
2. Esmon, C. T., "Thrombomodulin as a Model of Molecular Mechanisms that Modulate Protease Specificity and Function at the Vessel Surface," *FASEB J.*, **9**(10), 946-955(1995).
3. Esmon, C. T., "Molecular Events that Control the Protein C Anticoagulant Pathway," *Thromb Haemostasis.*, **70**, 29-35(1993).
4. Stenflo, J., "Structure and Function of Protein C," *Semin. Thromb. Hemost.*, **10**(2), 109-121(1984).
5. Joyce, D. E., Gelbert, L., Ciaccia, A., DeHoff, B. and Grinnell, B. W., "Gene Expression Profile of Antithrombotic Protein c Defines New Mechanisms Modulating Inflammation and Apoptosis," *J. Biol. Chem.*, **264**(14), 11199-11203(2001).
6. Riewald, M., Petrovan, R. J., Donner, A., Mueller, B. M. and Ruf, W., "Activation of Endothelial Cell Protease Activated Receptor 1 by the Protein C Pathway," *Science*, **296**(5574), 1880-1882 (2002).
7. Mosnier, L. O. and Griffin, J. H., "Inhibition of Staurosporine-induced Apoptosis of Endothelial Cells by Activated Protein C Requires Protease-activated Receptor-1 And endothelial cell protein C receptor," *Biochem. J.*, **373**, 65-70(2003).
8. Cheng, T., Liu, D., Griffin, J. H., Fernandez, J. A., Castellino, F., Rosen, E. D., Fukudome, K. and Zlokovic, B. V., "Activated Protein C Blocks p53-Mediated Apoptosis in Ischemic Human Brain Endothelium and is Neuroprotective," *Nat. Med.*, **9**, 338-342(2003).
9. Guo, H., Liu, D., Gelbard, H., Cheng, T., Insalaco, R., Fernandez, J. A., Griffin, J. H. and Zlokovic, B. V., "Activated Protein C Prevents Neuronal Apoptosis Via Protease Activated Receptors 1 and 3," *Neuron*, **41**, 563-572(2004).
10. Bae, J. S., Yang, L., Manditody, C. and Rezaie, A. R., "The Ligand Occupancy of Endothelial Protein C Receptor Switches the Protease-activated Receptor 1-dependent Signaling Specific-

- ity of Thrombin from a Permeability-enhancing to a Barrier-protective Response in Endothelial Cells; *Blood*, **110**(12), 3909-3916(2007).
11. Bae, J. S., Yang, L., Manditody, C. and Rezaie, A. R., "Engineering a Disulfide Bond to Stabilize the Calcium-binding Loop of Activated Protein C Eliminates Its Anticoagulant But not its Protective Signaling Properties;" *J. Biol. Chem.*, **282**(12), 9251-9259 (2007).
 12. Bernard, G. R., Vincent, J. L., Laterre, P. F., LaRosa, S. P., Dhainaut, J. F., Lopez-Rodriguez, A., Steingrub, J. S., Garber, G. E., Helterbrand, J. D., Ely, E. W. and Fisher, C. J. Jr; Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis(PROW-ESS) study group, "Efficacy and Safety of Recombinant Human Activated Protein C for Severe Sepsis;" *N. Engl. J. Med.*, **344**, 699-709(2001).
 13. Monnier, L. O., Zlokovic, B. V. and Griffin, J. H., "The Cytoprotective Protein C Pathway;" *Blood*, **109**(8), 3161-3172(2007).
 14. Esmon, S. T., "The Protein C Pathway;" *Chest*, **124**(3 suppl), 26S-32S(2003).
 15. Bae, J. S., Yang, L. and Rezaie, A. R., "Receptors of the Protein C Activation and Activated Protein C Signaling Pathways are Colocalized in Lipid Rafts of Endothelial Cells;" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**(8), 2867-2872(2007).
 16. Fukudome, K., Kurosawa, S., Stearns-Kurosawa, D. J., He, X., Rezaie, A. R. and Esmon, C. T., "The Endothelial Cell Protein C Receptor. Cell Surface Expression and Direct Ligand Binding by the Soluble Receptor;" *J. Biol. Chem.*, **271**, 17491-17498(1996).
 17. Regan, L. M., Mollica, J. S., Rezaie, A. R. and Esmon, C. T., "The Interaction Between the Endothelial Cell Protein C Receptor and Protein C Is Dictated by the gamma-Carboxyglutamic Acid Domain of Protein C;" *J. Biol. Chem.*, **272**, 26279-26284 (1997).
 18. Kurosawa, S., Stearns-Kurosawa, D. J., Hidari, D. and Esmon, C. T., "Identification of Functional Endothelial Protein C Receptor in Human Plasma;" *J. Clin. Invest.*, **100**(2), 411-418(1997).
 19. Kurosawa, S., Stearns-Kurosawa, D. J., Carson, C. W., D'Angelo, A., Della Valle, P. and Esmon, C. T., "Plasma Levels of Endothelial Cell Protein C Receptor are Elevated in Patients with Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus: Lack of Correlation with Thrombomodulin Suggests Involvement of Different Pathological Processes;" *Blood*, **91**(2), 725-727(1998).
 20. Regan, L. M., Stearns-Kurosawa, D. J., Kurosawa, S., Mollica, J., Fukudome, K. and Esmon, C. T., "The Endothelial Cell Protein C Receptor. Inhibition of Activated Protein C Anticoagulant Function Without Modulation of Reaction with Proteinase Inhibitors;" *J. Biol. Chem.*, **271**(29), 17499-17503(1996).
 21. Bae, J. S. and Rezaie, A. R., "Protease Activated Receptor 1(PAR-1) Activation by Thrombin is Protective in Human Pulmonary Artery Endothelial Cells If Endothelial Protein C Receptor is Occupied by Its Natural Ligand;" *Semin. Thrombo. Haemost.*, **100**(1), 101-109(2008).