

Aus der Klinik für Innere Medizin/Kardiologie
des Deutschen Herzzentrum Berlin
Stiftung des Bürgerlichen Rechts

DISSERTATION

**Furin reguliert die Funktion von glatten Gefäßmuskelzellen
durch die Aktivierung von Pro-Nerve Growth Factor zu Nerve
Growth Factor**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Janina Sigrid Kohlhaas

aus Berlin

Datum der Promotion: 07.12.2018

Vorwort

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden im Februar 2013 veröffentlicht:

Urban D, **Lorenz J**, Meyborg H, Ghosh S, Kintscher U, Kaufmann J, Fleck E, Kappert K, and Stawowy P. *Proprotein convertase furin enhances survival and migration of vascular smooth muscle cells via processing of pro-nerve growth factor*. J Biochem, 2013. 153(2): p. 197-207.

Inhaltsverzeichnis

ABSTRAKT (DEUTSCH)	- 1 -
ABSTRACT (ENGLISH)	- 3 -
1 EINLEITUNG	- 4 -
1.1 Pathogenese von Atherosklerose und Restenose – Bedeutung von glatten Gefäßmuskelzellen	- 4 -
1.2 Proprotein Convertasen	- 9 -
1.3 Die Bedeutung von Integrinen für die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen	- 12 -
1.4 Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren	- 14 -
2 FRAGESTELLUNG UND ZIELE	- 19 -
3 MATERIAL UND METHODEN	- 21 -
3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial	- 21 -
3.1.1 Zellkultur	- 21 -
3.1.2 Gelelektrophorese/ <i>Western-Blot</i>	- 21 -
3.1.3 Quantitative <i>Real-Time</i> Polymerase Kettenreaktion	- 21 -
3.1.4 Geräte	- 21 -
3.1.5 Verbrauchsmaterialien.....	- 22 -
3.2 Chemikalien und Substanzen	- 22 -
3.2.1 Chemikalien.....	- 22 -
3.2.2 Inhibitoren.....	- 24 -
3.2.3 Proteine.....	- 24 -
3.2.4 Primärantikörper	- 25 -
3.2.5 Sekundärantikörper.....	- 25 -
3.2.6 Verwendete Primer	- 26 -
3.2.7 Verwendete Kits	- 26 -
3.2.8 Verwendete Software	- 26 -
3.3 Zellkultur	- 27 -
3.3.1 Isolation glatter Gefäßmuskelzellen aus der Aorta von Ratten	- 27 -
3.3.2 Zellkultur	- 27 -
3.3.3 Stimulation der glatten Gefäßmuskelzellen.....	- 28 -
3.3.4 <i>Checkerbox</i> -Experimente und Migrationsassay	- 29 -
3.4 Biochemische Methoden	- 30 -
3.4.1 Proteinextraktion und Proteinbestimmung.....	- 30 -
3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	- 31 -
3.4.3 <i>Western-Blot</i>	- 33 -
3.4.4 Immundetektion	- 33 -
3.4.5 Immunfluoreszenz.....	- 34 -
3.4.6 Furin Aktivitätsassay	- 35 -
3.4.7 β -NGF ELISA	- 36 -

	3.4.8 Zellproliferation ELISA, BrdU (kolorimetrisch)	- 37 -
	3.4.9 Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7 Assay	- 38 -
	3.4.10 proNGF1 ELISA	- 39 -
	3.5 Molekularbiologische Methoden	- 40 -
	3.5.1 RNA-Isolierung aus glatten Gefäßmuskelzellen	- 40 -
	3.5.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	- 41 -
	3.5.3 cDNA-Synthese	- 42 -
	3.5.4 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	- 43 -
	3.6 Statistik und Datenanalyse.....	- 46 -
4	ERGEBNISSE.....	- 47 -
	4.1 Einfluss von atherogenen Wachstumsfaktoren auf die β -NGF-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen	- 47 -
	4.2 Einfluss von PDGF-BB und TGF- β 1 auf die Expression und Aktivität der Proprotein-Convertase Furin in glatten Gefäßmuskelzellen	- 49 -
	4.3 Die Bedeutung von Furin für die Aktivierung von proNGF zu β -NGF	- 52 -
	4.4 Regulation der Neurotrophin-Rezeptor-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen.....	- 56 -
	4.5 Einfluss von β -NGF und proNGF auf die Zellproliferation und Apoptose	- 58 -
	4.6 Einfluss der Furin-abhängigen Synthese von β -NGF auf die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen	- 62 -
	4.7 β -NGF induziert die Formation von <i>focal adhesion sites</i>	- 68 -
	4.8 β -NGF-Rezeptorsignaling aktiviert Akt-, ERK1/2- und Paxillin-Signaltransduktionswege	- 70 -
	4.9 β -NGF induziert Zellmigration via Aktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionswegs und durch Integrin-Aktivierung	- 72 -
5	DISKUSSION	- 74 -
6	LITERATURVERZEICHNIS	- 85 -
7	ANHANG	- 100 -
	Abkürzungsverzeichnis	- 100 -
	Abbildungsverzeichnis	- 103 -
	Tabellenverzeichnis.....	- 104 -
	Curriculum vitae und Publikation	- 105 -
	Eidesstattliche Versicherung.....	- 107 -
	Danksagung	- 108 -

Abstrakt (deutsch)

Der *nerve growth factor* (NGF) gehört zur Familie der Neurotrophine (NTs), die in Neuronen Zellfunktionen wie Wachstum, Differenzierung und Zellviabilität beeinflussen. NGF wird als Proprotein *pro nerve growth factor* (proNGF) synthetisiert und mittels endoproteolytischer Spaltung durch die Proprotein Convertase (PC) Furin im trans-Golgi-Netzwerk aktiviert. Sowohl die aktive Untereinheit β -NGF als auch proNGF wirken als aktive Liganden für unterschiedliche NT-Rezeptoren und induzieren über die Bindung an ihre Rezeptoren gegensätzliche Zellfunktionen. β -NGF bindet mit hoher Affinität an den Tyrosinkinase-Rezeptor A (TrkA) und induziert Zellüberleben und Zellwachstum. ProNGF hingegen bindet an einen Rezeptorkomplex bestehend aus dem p75-NT-Rezeptor und dem Vps10p-Domänen-Rezeptor Sortilin und induziert hierdurch die Apoptose in neuronalen Zellen.

NTs wirken auch auf Zellen des kardiovaskulären Systems. So wurden NGF und proNGF auch in proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMCs) nachgewiesen. VSMCs tragen durch Migration und Proliferation sowie durch die Synthese von extrazellulären Matrix-Molekülen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen maßgeblich zur Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen bei.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkung einer Furin-abhängigen Aktivierung von proNGF zu β -NGF auf verschiedene Zellfunktionen von VSMCs. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten demonstrieren wir, dass die β -NGF-Expression in proliferierenden VSMCs durch Wachstumsfaktoren induziert werden kann. Die Expression von Furin, das proNGF zu β -NGF prozessiert, korreliert dabei mit der β -NGF-Expression. Dementsprechend führt die Furin-Inhibition zu einer gesteigerten proNGF-Sekretion in VSMCs bei gleichzeitig verringerter β -NGF-Sekretion. Des Weiteren zeigen wir im Rahmen dieser Arbeit, dass β -NGF keinen Einfluss auf die Proliferation von VSMCs hat, jedoch die Zellmigration via TrkA und Phosphoinositid-3-Kinase/Protein-Kinase B (PI3K/Akt) abhängigem Integrin-*signaling* fördert. Die NGF-induzierte Migration der VSMCs erfordert dabei eine Aktivierung von proNGF durch Furin. Im Gegensatz dazu führt die Stimulation von VSMCs mit proNGF zur Induktion von Apoptose und fördert nicht die Proliferation oder Migration der Zellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrieren, dass Furin in proliferierenden VSMCs das Gleichgewicht von proNGF und NGF beeinflusst, darüber unterschiedliche Zellfunktionen wie Apoptose und Migration differentiell reguliert und so zur Entstehung und Progression von Atherosklerose beiträgt.

Abstract (english)

Nerve growth factor (NGF), a member of the neurotrophin (NT) superfamily, regulates key cellular functions in neurons including growth control, differentiation and survival. NGF is synthesized as proprotein pro nerve growth factor (proNGF) and processed by endoproteolytic cleavage via the proprotein convertase (PC) furin in the trans-Golgi network. Both the mature subunit β -NGF as well as proNGF are active ligands for different NT-receptors and elicit opposite cell functions by differing receptor binding. While β -NGF binds with high affinity to the tyrosine kinase receptor type 1 (TrkA) leading to cell survival and cell growth, binding of proNGF to a heterodimer of sortilin, a member of the Vps10p-domain receptor family, and p75-NT-receptor promotes apoptosis in neuronal cells.

NTs also affect the cellular functions of cardiovascular cells. Studies demonstrated an expression of proNGF and NGF in proliferating vascular smooth muscle cells (VSMCs). VSMCs have a great impact on the initiation and progression of atherosclerosis through migration, proliferation, extracellular matrix production as well as synthesis of growth factors and cytokines in the arterial wall.

The aim of the present study was to analyze the impact of the furin-dependent processing of proNGF to β -NGF on different VSMC functions.

Our *in vitro* experiments demonstrate, first, that β -NGF-expression is upregulated in proliferating VSMCs, second, that the expression of furin and NGF is co-regulated and third, that furin is required for proNGF processing in VSMCs. Therefore, furin-inhibition increases proNGF-secretion and simultaneously reduces β -NGF-secretion in VSMCs. We found that β -NGF itself does not affect VSMC-proliferation, but promotes VSMC-migration via TrkA and phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) dependent integrin signaling. Furthermore, we showed that NGF induced VSMC-migration depends on processing of proNGF by furin. In contrast, stimulation of VSMCs with proNGF leads to apoptosis and not to migration or proliferation.

Consequently, furin determines the balance between NGF and proNGF in VSMCs, thereby affecting survival, migration or apoptosis of VSMCs, likely contributing to the progression of atherosclerotic lesions.

1 Einleitung

1.1 Pathogenese von Atherosklerose und Restenose – Bedeutung von glatten Gefäßmuskelzellen

Auch wenn in den letzten Jahren aufgrund innovativer medikamentöser und interventioneller Therapiestrategien eine deutliche Abnahme der Mortalität durch kardiovaskuläre Erkrankungen zu verzeichnen ist, gehören diese Erkrankungen noch immer zu den Haupttodesursachen in den westlichen Nationen [1, 2]. Im Rahmen der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen nimmt die Entstehung und Progression der Atherosklerose einen bedeutenden Stellenwert ein [3].

Die Atherosklerose ist eine komplexe, chronisch-inflammatorische Erkrankung der arteriellen Gefäßwand [4]. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Fettstoffwechselstörungen und arterielle Hypertonie tragen zu einer initialen Endothelverletzung bei [3]. Die Schädigung und Dysfunktion des Endothels hat eine Prozesskaskade zur Folge, die eine gesteigerte Adhäsion und transendotheliale Migration von Monozyten und Leukozyten in die erste Schicht der Gefäßwand, die Intima, nach sich zieht [3]. Dort differenzieren die Monozyten zu Makrophagen und tragen neben T-Zellen zur chronischen Entzündungsreaktion in den Läsionen bei [3]. Mittels *scavenger*-Rezeptoren, wie SR-A, CD36 und CD68, phagozytieren sie durch Oxidierung modifiziertes *low density lipoprotein* (oxLDL) und werden hierdurch zu Schaumzellen [3]. Durch Aggregation der lipidhaltigen Schaumzellen und Lymphozyten entstehen Lipidstreifen in der Intima, die als *fatty streaks* bezeichnet werden [3, 4]. Zudem sezernieren Makrophagen Wachstumsfaktoren und Zytokine, die eine gesteigerte Migration von glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMCs) aus der Media in die Läsion bewirken [3]. Die anschließende Proliferation der VSMCs, die Synthese von extrazellulären Matrix (EZM)-Molekülen und die Expression verschiedener Zytokine und Adhäsionsmoleküle beeinflussen maßgeblich die Progression der atherosklerotischen Plaques [3, 5].

Weiter sind VSMCs auch entscheidend an der Entwicklung von Restenosen des Gefäßlumens nach percutaner transluminaler Koronarangioplastie (*percutaneous transluminal coronary angioplasty*, PTCA) beteiligt [6]. Auch hierbei kommt es, ausgelöst durch eine interventionsbedingte Endothelverletzung, zu einer

inflammatorischen Reaktion, welche die Migration, Proliferation und EZM-Synthese von VSMCs nach sich zieht [7].

Unter dem Einfluss von atherogenen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und EZM-Molekülen kommt es im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose und von Restenosen zu einer phänotypischen Modulation der glatten Gefäßmuskelzellen [8, 9]. Anders als die meisten differenzierten Zellen behalten VSMCs eine phänotypische Plastizität und können als Reaktion auf verschiedene Stimuli ihren Phänotyp von einem inaktiven, kontraktilen zu einem proliferativen, sekretorischen Phänotyp verändern [8]. Zellen im kontraktilen Phänotyp (k-Phänotyp) exprimieren Proteine, die die Gefäßkontraktilität und den Gefäßtonus modulieren [4, 8]. In diesem Phänotyp liegen VSMCs in der Media der gesunden Gefäßwand vor [8]. Die Zellen weisen nur eine geringe Migrations- und Proliferationsrate auf und synthetisieren nur kleine Mengen von EZM-Proteinen [8]. Die glatten Gefäßmuskelzellen der Intima besitzen dagegen einen synthetischen Phänotyp (s-Phänotyp) und sind durch eine vermehrte Genexpression, eine gesteigerte Proliferation und Migration, eine erhöhte Sensibilität für mitogene Stimuli durch die Expression entsprechender Rezeptoren und eine gesteigerte Syntheserate von EZM-Molekülen charakterisiert [4, 5, 10].

Beispielsweise konnten Thyberg et al. mit Hilfe des Ballon-Gefäßverletzungs-Modells demonstrieren, dass es in VSMCs nach Ballon-Verletzung zu einer Vermehrung der an der Proteinsynthese beteiligten Zellorganellen wie dem rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat kommt [11].

Das erstmals durch Clowes et al. beschriebene Ballon-Gefäßverletzungs-Tiermodell ist ein *in vivo* Modell für die Neointima-Bildung [12]. In diesem Modell kommt es durch ein mechanisches Trauma zu Umbauprozessen in der Gefäßwand mit Bildung einer Neointima. Diese arterielle Reaktion auf die mechanisch induzierte Verletzung ähnelt den Prozessen bei der Entstehung von Restenosen [6, 12, 13].

Auch Chen et al. zeigten mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen an koronaren Gewebeproben von Patienten mit Restenosen, dass es in den VSMCs nach einer Angioplastie innerhalb der ersten sechs Monate zu einer Volumenzunahme der an der Proteinsynthese beteiligten Zellorganellen kommt [14]. Diese morphologischen Veränderungen in der Ultrastruktur der VSMCs weisen auf eine Verschiebung in Richtung des synthetisierenden Phänotyps hin [14].

Des Weiteren ist die Umwandlung vom kontraktilen zum synthetischen Phänotyp durch eine reduzierte Expression von VSMC-spezifischen Differenzierungsmarkern wie *smooth muscle myosin heavy chain* (SM-MHC) oder *smooth muscle α -actin* (SM- α A) charakterisiert [15]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten an humanen arteriellen Gewebeproben und in tierexperimentellen Versuchen zeigen, dass es in den VSMCs der Neointima nach Gefäßverletzung zu einer verminderten Expression von SM1 und SM2 (Isoformen von SM-MHC) sowie SM- α A kommt, was für eine Veränderung des Phänotyps der VSMCs spricht [15-17]. Gleichzeitig synthetisieren die VSMCs der Intima vermehrt *non-muscle-type* MHC (NM-B MHC), welche auch in undifferenzierten VSMCs exprimiert wird [16].

Das Wachstum der Intima während der Pathogenese der Atherosklerose wird primär durch die Synthese von EZM-Proteinen in VSMCs und durch die Migration und Proliferation dieser Zellen verursacht [6]. Die VSMC-Proliferation und -Migration werden durch Mitogene wie *platelet-derived growth factor* (PDGF) und *transforming growth factor beta* (TGF- β) beeinflusst [18]. PDGF wird vermehrt von aktiven Blutplättchen und Makrophagen sezerniert und ist sowohl an der VSMC-Proliferation, als auch über seine chemotaktische Wirkung an der Migration der Zellen in die Intima beteiligt [8]. Zudem konnte gezeigt werden, dass PDGF eine verminderte Expression von Differenzierungsmarkern wie SM- α A in kultivierten *smooth muscle cells* (SMCs) induziert und somit die phänotypische Modulation in Richtung eines proliferativen Phänotyps beeinflusst [19].

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen ergaben eine erhöhte PDGF-Expression in atherosklerotischen Plaques verglichen mit gesunden Arterien [20, 21]. Zudem konnten PDGF und sein Rezeptor in humanen Koronararterien nach Ballon-Angioplastie nachgewiesen werden [22]. In Tierversuchen konnte ein neutralisierender PDGF-Antikörper, der während der ersten sieben Tage nach Ballon-Verletzung infundiert wurde, die Akkumulation von VSMCs in der Neointima signifikant hemmen [23]. Diese Hemmung führte zu einer Reduktion der Ausdehnung der intimalen Läsionen in den Arterien [23].

Auch die Fähigkeit der VSMCs EZM-Proteine zu produzieren, die in den atherosklerotischen Läsionen akkumulieren, spielt bei der Entstehung der

Atherosklerose eine große Rolle [18]. VSMCs sind sowohl in gesunden wie auch in atherosklerotischen Gefäßen die Hauptproduzenten von EZM-Molekülen [5].

Eine Stimulation von VSMCs durch atherogene und pro-inflammatorische Zytokine wie TGF- β , *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) oder *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) steigert die Synthese von EZM-Molekülen und verändert die Zusammensetzung der Matrixproteine [5, 24, 25]. Diese Effekte beeinflussen wiederum den Lipidgehalt der Plaques, aber auch den Proliferationsindex der adhärennten Zellen und führen gleichzeitig zu einer starken Verdickung der Neointima [5, 24-26].

Während die EZM von gesunden Gefäßen größtenteils Kollagen Typ I und Typ III enthält, setzt sich in atherosklerotischen Läsionen die EZM vor allem aus Proteoglykanen mit verstreuten Kollagen Typ I Fibrillen und Fibronectin zusammen, was nicht nur die Architektur der Gefäßwand, sondern auch deren Lipidgehalt verändert [5, 18]. So konnte beispielsweise mittels Affinitätschromatographie gezeigt werden, dass die von proliferierenden VSMCs sezernierten Proteoglykane, die einen höheren Anteil langer Glykosaminoglykan-Ketten aufweisen, das *low density lipoprotein* (LDL) mit einer höheren Affinität binden als die von kontraktiven VSMCs sezernierten Proteoglykane und darüber eine verstärkte Lipidaufnahme von Makrophagen und die Bildung von Schaumzellen bewirken [5, 27].

In vitro Experimente demonstrierten außerdem, dass die Kultivierung von humanen *peripheral blood monocytes* (PBMCs) auf Kollagen Typ I zu einer gesteigerten Differenzierungsrate der Zellen sowie zu einer vermehrten intrazellulären Lipidbelastung führt [28]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in humanen und tierexperimentellen Studien zeigen, dass es nach Gefäßverletzung zu einer verstärkten Synthese von TGF- β kommt und dass TGF- β in VSMCs die Transkription von Kollagen Typ I und III Genen induziert [29, 30]. Mallat et al. demonstrierten, dass die Behandlung von Apolipoprotein E (ApoE) defizienten Mäusen mit einem neutralisierenden TGF-Antikörper eine signifikante Reduktion des Kollagengehalts in den Läsionen zur Folge hat [31].

VSMCs exprimieren auch Adhäsionsmoleküle wie *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und tragen so neben Endothelzellen möglicherweise zur Retention von Monozyten in die Intima und zu deren Differenzierung zu Makrophagen bei [5, 32]. So konnte die Expression von VCAM-1 in intimalen VSMCs in human atherosklerotischen Koronararterien nachgewiesen werden

[33]. Weiter besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von VCAM-1 auf der Oberfläche von VSMCs und der Anzahl intimaler Makrophagen [33].

Des Weiteren sind VSMCs in atherosklerotischen Läsionen in der Lage, die Apoptoserate von Monozyten und Makrophagen zu reduzieren. So demonstrierten Cai et al., dass die Kultivierung von PBMCs, aber auch von THP-1 Zellen, in 0%-igem Medium die Apoptoserate der Zellen steigert [34]. Durch gleichzeitige Kultivierung der Zellen mit VSMCs ließ sich eine signifikante Reduktion der Apoptoserate induzieren [34]. Gleichzeitig kam es nach Bindung der THP1-Zellen und PBMCs an die VSMCs zu einer signifikanten Steigerung der CD36-Expression als Zeichen einer gesteigerten Differenzierung [34].

VSMCs produzieren und sezernieren neben T-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen eine Reihe von atherogenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF- β , Interferon γ (IFN- γ), MIF oder MCP-1 und beeinflussen so maßgeblich die Funktion anderer Zellen [5]. Majesky et al. wiesen beispielsweise die Synthese von TGF- β in VSMCs in der Neointima nach Ballon-Dilatation von Rattenaorten nach, wobei die erhöhte TGF- β -Produktion mit einer gesteigerten Synthese von Kollagen I, III und Fibronectin korrelierte [29]. Andere Arbeitsgruppen konnten immunhistochemisch in humanen atherosklerotischen Plaques eine verstärkte MCP-1-Expression in VSMCs nachweisen, was eine gesteigerte Monozyteninfiltration und Lipidakkumulation zur Folge hat [25, 35].

Somit zeigen verschiedene Untersuchungen, dass VSMCs aufgrund ihrer Fähigkeit zum Wechsels ihres Phänotyps und einer daraus folgenden Modifikation der Sekretion von EZM-Molekülen sowie Steigerung der Migration und Proliferation entscheidend zur Entstehung und Progression von Atherosklerose beitragen [5, 6, 8, 11]. Darüber hinaus sezernieren VSMCs Adhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren, exprimieren Rezeptoren zur Lipidaufnahme und können daher maßgeblich die Gefäßarchitektur sowie die Zellfunktion von Endothelzellen und Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen beeinflussen [5, 27, 32, 34].

1.2 Proprotein Convertasen

Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle, chemotaktische Zytokine, Integrine und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), werden häufig als inaktive Vorläuferproteine (Proproteine) synthetisiert [36]. Biologisch aktiv werden diese Proteine erst durch posttranslationale Modifikationen und limitierte endoproteolytische Spaltung an spezifischen Aminosäuresequenzen durch sogenannte Proprotein Convertasen (PC) [36-38]. Proprotein Convertasen gehören zu den Ca^{2+} -abhängigen Serin-Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Serin aufweisen und die Hydrolyse von Peptidbindungen ihrer Substrate bewirken [38].

1984 entdeckten Julius et al. in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* das Kex2-Gen, das für die Ca^{2+} -abhängige membranständige Endoprotease Kexin kodiert [39]. Basierend auf dieser Arbeit wurde anhand von Sequenzhomologien Furin als erste PC in Säugetieren charakterisiert [40].

Seitdem wurden insgesamt neun PCs in Säugetieren identifiziert, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit der bakteriellen Endoprotease Subtilisin und dem aus Hefe stammenden Kexin zu der Familie der Kexin/Subtilisin-ähnlichen PCs gezählt werden. Hierzu gehören neben Furin, PC1, PC2, PC4, PC5-A und PC5-B, PC6 (*PACE4, paired basic amino acid cleaving enzyme 4*), PC7, SKI-1/S1P (*Subtilisin/Kexin-Isoenzym 1/Site-1-Protease*) und PCSK9 (*Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9*) [37, 38].

Die ersten sieben PCs spalten Vorläuferproteine an spezifischen basischen Aminosäureresten innerhalb des Motivs (Lys/Arg) - (X)_n - (Lys/Arg)_↓ ($n = 0, 2, 4, 6$ Aminosäuren, X = jede beliebige Aminosäure, ↓ = Ort der Spaltung) [38]. Zu den Proprotein Convertasen, die Vorläuferproteine an nicht-basischen Aminosäuresequenzen spalten, gehört SKI-1/S1P, die durch die Spaltung des Transkriptionsfaktors SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*) entscheidend an der Regulation der Cholesterin- und Fettsäuresynthese beteiligt ist [38, 41]. Die neunte Proprotein Convertase, PCSK9, induziert durch Bindung an LDL-Rezeptoren an der Oberfläche von Hepatozyten die intrazelluläre Degradation der LDL-Rezeptoren in Endosomen und Lysosomen und reguliert somit nicht-enzymatisch die LDL-Serumkonzentration [42, 43].

Die endoproteolytische Aktivierung der Proproteine erfolgt in der Zelle hauptsächlich im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) (Furin und PC7), in sekretorischen Granula (PC2, PC1) oder an der Zellmembran (Furin, PC5) [37, 38].

PC1 und PC2 kommen hauptsächlich in den sekretorischen Granula von neuronalen und endokrinen Zellen vor und sind für die Aktivierung diverser Polypeptid-Prohormone wie pro-Opiomelanocortin (POMC), pro-Insulin und pro-Glucagon verantwortlich [38]. Furin und PC5 hingegen, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit auch als *furin-like PCs* bezeichnet werden, werden ubiquitär in verschiedenen Geweben und Zelllinien exprimiert und sind hauptsächlich im TGN lokalisiert, wobei ein gewisser Anteil über den endosomalen Weg zwischen dem TGN und der Zelloberfläche zirkuliert [37, 38].

Furin ist an der Entwicklung und regelgerechten Funktion vieler Gewebe beteiligt [44]. So beeinflusst Furin über die Prozessierung von *repulsive guidance molecules* (RgMs) das axonale Wachstum und spielt somit eine entscheidende Rolle in der Hirnentwicklung [45]. Daneben ist Furin an der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz beteiligt. Die Deletion von Furin beeinträchtigt die Funktion von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unter anderem über eine verminderte Aktivierung des anti-inflammatorischen Zytokins TGF- β 1 [46].

PCs spielen auch eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen [36, 47]. Einige Untersuchungen legen nahe, dass Furin über die Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems sowie des Na⁺-Haushalts an der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist [47, 48]. Furin prozessiert zum einen den *prorenin receptor* (pRR) und aktiviert zum anderen den epithelialen Na⁺-Kanal (ENaC), der an der Na⁺-Homöostase und damit an der Blutdruckregulation beteiligt ist [48, 49]. Li et al. demonstrierten in einer Studie in der Xinjiang Kazakh Population, die eine hohe Hypertonieprävalenz aufweist, eine Assoziation zwischen Varianten des Furin-Gens und arterieller Hypertonie [47].

Unterschiedliche Arbeitsgruppen konnten zudem zeigen, dass PCs vermehrt in atherosklerotischen Läsionen nachweisbar sind [50, 51]. Furin und PC5 konnten beispielsweise immunhistochemisch in verschiedenen Zellarten in humanen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden, wobei sich besonders in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen in Makrophagen und VSMCs eine gesteigerte Expression von Furin und PC5 nachweisen ließ [50].

Sluijter et al. zeigten, dass eine Erhöhung der *Furin-messenger ribonucleic acid* (mRNA) nach Ballon-Dilatation nachweisbar ist und die Inhibierung von *furin-like PCs*

durch eine Transfektion von mutantern $\alpha 1$ -Antitrypsin [$\alpha 1$ -Antitrypsin Portland (alpha1-PDX, spezifischer Furin-Inhibitor)] zu einer Reduktion der Adventitia und Intima führt [51]. Auch Turpeinen et al. untersuchten in atherosklerotischen Plaques die Expression von PCs und wiesen mittels *Real-Time* Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) wie auch immunhistochemisch eine gesteigerte Expression von Furin in verschiedenen Zellen nach [52]. Untersuchungen am Tiermodell belegen, dass die Inhibition von Furin eine signifikante Reduktion der Atherosklerosebildung und eine Inhibition der Migration und Proliferation von VSMCs zur Folge hat [53].

Auch Wachstumsfaktoren und Peptidhormone wie TGF- $\beta 1$, PDGF-BB oder Endothelin-1 werden über eine endoproteolytische Spaltung durch PCs aktiviert [54-56]. So zeigten Siegfried et al. an ko-transfizierten LoVo Zellen, dass Furin proPDGF aktiviert [55].

Darüber hinaus zeigen Untersuchungen, dass PCs für die Aktivierung von Integrinen, speziell der αv -Untereinheit, und MMPs verantwortlich sind und so über die Beeinflussung der Zell-Matrix-Interaktion und der Zellmigration eine weitere entscheidende Rolle für die Pathogenese der Atherosklerose spielen [57-59]. MMPs sind Proteasen, die in den EZM-Abbau während der Zellmigration involviert und somit an der Zellrekrutierung in die Intima beteiligt sind [36]. Integrine sind transmembranäre Glykoprotein-Rezeptoren, die zu den Zelladhäsionsmolekülen gehören [60]. Sie verbinden die EZM mit dem Zytoskelett und ermöglichen so eine Interaktion zwischen einzelnen Zellen und der Matrix [60].

Lissitzky et al. demonstrierten in Untersuchungen an der Furin-defizienten Zelllinie LoVo, dass PC5 und Furin die entscheidenden PCs für die Aktivierung der αv -Integrine sind [57]. Auch Bergeron et al. zeigten mittels ko-infizierten LoVo-Zellen, dass Furin und PC5A verantwortlich für die Prozessierung von $\alpha 4\beta 1$ -Integrinen sind und dass die Furin-Expression dabei mit der Integrin-Prozessierung korreliert [61]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die PC-vermittelte Aktivierung von αv -Integrinen entscheidend für das αv -abhängige *outside-in-signaling* und die anschließende Aktivierung von Tyrosinkinase in VSMCs ist [62]. Die Inhibition von PCs verringert die Adhäsion der VSMCs an den $\alpha v\beta 3/\beta 5$ -Liganden Vitronectin und vermindert gleichzeitig die Migration [62]. Im Gegensatz dazu wurde die Adhäsion von VSMCs an Kollagen Typ I nicht beeinflusst, da diese durch $\alpha 2$ -Integrine vermittelt wird, die keiner endoproteolytischen Spaltung bedürfen [62].

1.3 Die Bedeutung von Integrinen für die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen

Die Migration von VSMCs ist ein komplexer Prozess, bei dem es durch Rekrutierung von Struktur- und Signalkomplexen und nachfolgender Aktivierung einer Kaskade von intrazellulären Signaltransduktionswegen zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und Ausbildung von fokalen Komplexen kommt [63]. Hierbei spielt die Aktivierung von Integrinen eine entscheidende Rolle [63].

Integrine sind nicht-kovalent gebundene Heterodimere, die aus je einer α - und einer β -Untereinheit bestehen [60]. In Säugetieren wurden bisher 18 α - und 8 β -Untereinheiten identifiziert [60]. Durch Kombinationen dieser Untereinheiten entstehen mehr als 20 Rezeptoren mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften und Gewebeverteilungen [60]. Jede Untereinheit besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, einer hydrophoben transmembranären Domäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne, die mit dem Aktin-Zytoskelett über eine Reihe von Verbindungsproteinen interagiert [60]. Die extrazellulären Domänen einiger α -Untereinheiten enthalten Ca^{2+} -Bindungsstellen, wobei die Ca^{2+} -Bindung an diese Domänen die Ligandenbindung beeinflusst. Integrin β -Untereinheiten bestehen aus sieben Domänen mit komplexen, variablen Querverbindungen. Die extrazellulären Domänen beider Untereinheiten bilden gemeinsam die spezifische Ligandenbindungsstelle [60]. Ein Großteil der Integrine bindet an die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (Arg-Gly-Asp = RGD), die in vielen EZM-Molekülen zu finden ist [64]. Daher zeichnen sich die meisten Integrin-Rezeptoren durch ihre Fähigkeit, verschiedene Liganden zu binden, aus [60]. Zu den Integrin-Liganden zählen EZM-Proteine wie Fibronectin, Kollagen und Laminin, andere Zelloberflächenrezeptoren wie ICAM-1 und VCAM-1 und lösliche Proteine wie beispielsweise Fibrinogen [65].

Die Integrin-Liganden-Interaktion spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktion, da durch sie zentrale Zellfunktionen wie Adhäsion, Zellmigration, Zytoskelett-Organisation sowie Proliferation und Differenzierung beeinflusst werden [64]. Eine Reihe von Erkrankungen wie Thrombose, Atherosklerose, Tumorentwicklung und chronisch-inflammatorische Erkrankungen sind mit einer Dysregulation verschiedener Integrine assoziiert [66]. Des Weiteren führt der Verlust einer adäquaten

Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Interaktion zur Apoptose-Induktion [67, 68]. Integrine stellen somit nicht nur Adhäsionsmoleküle dar, sondern dienen auch als Signalmoleküle, indem sie Mechanotransduktion und bi-direktionale Transduktion vermitteln [64, 69]. Unter bi-direktionaler Transduktion wird eine durch Integrine vermittelte Signalübertragung in zwei Richtungen verstanden – einerseits von der extrazellulären Umgebung nach intrazellulär (*outside-in-signaling*), andererseits vom Zytoplasma zur extrazellulären Rezeptordomäne (*inside-out-signaling*) [65].

Beim *outside-in-signaling* kommt es durch die Substratbindung an den jeweiligen Integrin-Rezeptor zur Veränderung der Interaktion zwischen den zytoplasmatischen Domänen der α - und β -Untereinheiten und zur Akkumulation der Integrine, wodurch ein intrazelluläres Signal ausgelöst wird [70]. Diese Signale werden über einen Komplex aus assoziierten Kinasen und Adapterproteinen vermittelt [64]. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die *focal adhesion kinase* (FAK), die zu den Nicht-Rezeptorkinasen gehört und mit der zytoplasmatischen Domäne verschiedener Integrine assoziiert ist [64]. Durch eine Integrin-vermittelte Autophosphorylierung an Tyrosin-397 wird FAK aktiviert, was die Phosphorylierung von Adapterproteinen wie Paxillin und Tensin zur Folge hat [64]. Dies führt zur Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionswege [64]. Dazu zählt der Phosphoinositid-3-Kinase/Protein-Kinase B (PI3K)/(Akt)-Signalweg, der die Formierung der fokalen Adhäsions-Komplexe (*focal adhesion complex*, FAC) und die Reorganisation des Zytoskeletts während der Migration reguliert [70].

Die Bedeutung von FAK für die Migration von VSMCs wird dadurch unterstrichen, dass die Überexpression des spezifischen FAK-Inhibitors FRNK (*FAK-related non-kinase*) die PDGF-BB-induzierte Migration von VSMCs inhibiert [71].

Hingegen führt beim *inside-out-signaling* die Stimulation durch Wachstumsfaktoren und die Induktion intrazellulärer Signaltransduktionswege – vermittelt durch die zytoplasmatische Domäne der Integrine – zu einer Konformationsänderung der extrazellulären Integrin-Domäne und folglich zur Aktivierung der Integrine [64]. Dadurch erhöht sich die Affinität der Integrine für ihre Liganden, was schnelle Änderungen der Zelladhäsion und Migration möglich macht [64, 65]. Die Aktivität der Integrin-Rezeptoren kann auch über Änderungen der Avidität moduliert werden. Die Umverteilung der Rezeptoren in der Plasmamembran führt zu einer Anhäufung von Integrinen in fokalen Komplexen, was eine multivalente Interaktion mit Liganden ermöglicht [64].

Auch glatte Gefäßmuskelzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche verschiedene Integrine mit unterschiedlichen Ligandenspezifitäten, die für die Zellmigration verantwortlich sind [63]. Verschiedene Untersuchungen belegen, dass das $\alpha\beta3$ -Integrin die VSMC-Migration induziert [72, 73]. Zudem konnten Srivatsa et al. *in vivo* mit dem koronaren Stentmodell am Schwein zeigen, dass sieben Tage nach Gefäßverletzung eine erhöhte Expression von $\alpha\beta3$ -Integrin in der Neointima und Adventitia nachzuweisen war [74]. Eine $\alpha\beta3$ -Integrin-Blockade mittels systemischer Applikation eines RGD-Peptidantagonisten führte in diesem *in vivo* Modell zu einer signifikanten Reduktion der Neointima und der Lumenstenose [74]. In einem weiteren Tiermodell führte eine Verletzung der arteriellen Gefäßwand zu einer $\alpha\beta3$ -Integrin vermittelten Akkumulation von VSMCs und dadurch zu einer Verdickung der Neointima [75]. Folglich führt die Inhibition von Integrinen zu einer Hemmung der VSMC-Migration. So konnten Baron et al. zeigen, dass die Anwendung des c7E3-FAB Antikörpers (Abciximab) sowie die Anwendung des anti- $\alpha\beta3$ -Integrin Antikörpers LM609 zu einer Reduktion der Osteopontin- und Vitronektin-abhängigen VSMC-Migration führt [76].

Somit tragen die Expression und Verteilung der unterschiedlichen Integrine auf VSMCs über die Verbindung der EZM mit dem Zytoskelett und über bi-direktionale Signaltransduktion entscheidend zur Migration der VSMCs im Rahmen der Entstehung von Atherosklerose bei [60, 63, 64, 74].

1.4 Neurotrophine und Neurotrophinrezeptoren

Neben Integrinen, Adhäsionsmolekülen und Zytokinen werden auch verschiedene Wachstumsfaktoren durch Proprotein Convertasen mittels limitierter endoproteolytischer Spaltung aktiviert [36, 38, 54]. Interessanterweise konnten verschiedene Arbeitsgruppen demonstrieren, dass Furin auch an der Aktivierung von Neurotrophinen (NTs) wie *pro nerve growth factor* (proNGF) beteiligt ist und in Neuronen durch Regulation der Aktivierung von proNGF zu *nerve growth factor* (NGF) entscheidende Zellfunktionen wie Zellüberleben und Apoptose beeinflusst [77-79].

Als Neurotrophine werden die Mitglieder einer Superfamilie von Signalmolekülen bezeichnet, die verschiedene Funktionen im Nervensystem beeinflussen [80]. NTs regulieren das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von Neuronen im

zentralen und peripheren Nervensystem während der Entwicklung oder nach Schädigung eines Nervs [80, 81]. NGF ist das am besten untersuchte Mitglied dieser Familie und wurde erstmals in den 1950er Jahren von Rita Levi-Montalcini und Stanley Cohen beschrieben [81].

Schon 1948 entdeckte Elmer Bueker, dass die Implantation von murinen Sarkom-Zellen in Hühnerembryonen eine Innervation des Tumorgewebes durch sensorische Nervenfasern aus angrenzenden sensorischen Nervenganglien zur Folge hat [82]. Basierend auf der Arbeit von Elmer Bueker gelang es der Arbeitsgruppe von Rita Levi-Montalcini, die Freisetzung eines löslichen Nervenwachstumsfaktors (NGF) aus neoplastischen Zellen nachzuweisen, der das Wachstum von Nervenfasern induziert [81]. Anhand von Sequenzhomologien wurden in Säugetieren neben NGF bisher drei weitere Mitglieder der NT-Proteinfamilie identifiziert, die alle eine zentrale Rolle für das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von neuronalen Zellen spielen [83]. Neben dem *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *neurotrophin-3* (NT-3) und *neurotrophin-4/5* (NT-4/5) wurden mit *neurotrophin-6* (NT-6) und *neurotrophin-7* (NT-7), zwei weitere NTs in Fischen identifiziert [84]. Die Isolation von NGF gelang zunächst aus Schlangengift und den submaxillären Speicheldrüsen der Maus, da NGF dort in hoher Konzentration vorkommt [81]. NGF aus den submaxillären Drüsen der Maus ist ein Komplex aus drei Untereinheiten (α , β , γ), wobei nur die β -Untereinheit für die biologische Aktivität von NGF verantwortlich ist [85]. Aktives β -NGF ist ein nicht-kovalent gebundenes, homodimeres Protein bestehend aus jeweils 118 Aminosäuren [86, 87].

Wie alle Neurotrophine wird NGF zunächst als Prä-Pro-Protein translatiert. Nach der anschließenden Translokation des *precursor*-Proteins in das ER wird die Prä-Sequenz abgespalten [88, 89]. Im ER wird durch Ausbildung von Disulfidbrücken und N-Glykosylierung das entstandene proNGF weiter posttranslational modifiziert, was zu einer Verbesserung des Transports von proNGF aus dem ER führt [77]. Die Prozessierung des Vorläuferproteins proNGF zum biologisch aktiven β -NGF im TGN erfordert die endoproteolytische Spaltung an hochkonservierten, di-basischen Aminosäuresequenzen durch Furin [77, 78].

Anfänglich wurde angenommen, dass die NGF-Pro-Domäne primär für die korrekte Proteinfaltung und für die Regulation der NT-Sekretion notwendig sei [90]. Die

Arbeitsgruppe um Lee et al. konnte jedoch demonstrieren, dass auch das Vorläuferprotein proNGF biologisch aktiv ist [79]. So sind proNGF und β -NGF aktive Liganden für verschiedene NT-Rezeptoren und regulieren über deren Aktivierung unterschiedliche Zellfunktionen [79].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Neuronen in Abhängigkeit von ihrem Aktivierungszustand proNGF und nicht NGF sezernieren [91]. Außerdem wiesen verschiedene Untersuchungen nach, dass im Gehirn die proNGF-Konzentration im Vergleich zur NGF-Konzentration höher ist und dass proNGF im Gehirn von Patienten mit Morbus Alzheimer akkumuliert [92, 93].

Die biologische Wirkung von NTs wird über zwei Klassen von transmembranären Zelloberflächen-Rezeptoren vermittelt – über Tyrosinkinase-Rezeptoren (TrkA, TrkB und TrkC) und über den p75-NT-Rezeptor (p75NTR). Je nach Rezeptorklasse werden verschiedene Signaltransduktionskaskaden induziert [94].

NGF bindet mit hoher Affinität an TrkA und induziert so das Wachstum, die Zelldifferenzierung und synaptische Plastizität in neuronalen Zellen [80]. Die Bindung führt wie bei anderen Tyrosinkinase-Rezeptoren zu einer Liganden-induzierten Rezeptor-Homodimerisierung sowie zur Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosin-Reste des Rezeptors [95]. Dies ermöglicht eine Rekrutierung von Adaptermolekülen, die über Aktivierung intrazellulärer Signalmoleküle zur Initiierung unterschiedlicher Signalwege führt [95]. Zu den wichtigsten durch die NGF-Bindung an den TrkA-Rezeptor aktivierten Signaltransduktionskaskaden gehören die Phospholipase C γ (PC γ), der PI3K/Akt sowie der *Ras/Raf-mitogen activated protein kinase* (MAPK)/*extracellular signal-regulated kinase* (ERK) [94].

ProNGF bindet hingegen mit hoher Affinität an den p75NTR, der zur Familie der Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptoren/FAS (TNF-Rezeptor) gehört, und führt über dessen Aktivierung zur Einleitung des programmierten Zelltods in neuronalen Zellen [96, 97]. Der p75NTR beinhaltet ähnlich wie andere TNF-Rezeptoren vier Cystein-reiche Motive, eine transmembranäre Domäne und eine zytoplasmatische Todesdomäne [89]. Die Liganden-vermittelte Aktivierung von p75NTR führt über die intrazellulären Domänen des Rezeptors zur Aktivierung von c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und *nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B* (NF- κ B) [94].

In genetischen Modellen an p75NTR-defizienten Mäusen zeigte sich beispielsweise eine geminderte Apoptoserate in sympathischen Neuronen und retinalen Ganglienzellen [98, 99].

Pedraza et al. zeigten, dass proNGF, welches aus Cerebra von Patienten mit Morbus Alzheimer isoliert und durch Chromatographie aufgereinigt wurde, in kultivierten sympathischen Neuronen Apoptose induziert [93]. Die proNGF-vermittelte Apoptose-Induktion konnte durch Blockade des p75NTR inhibiert werden [93]. Zudem konnten Volosin et al. zeigen, dass die Anwendung eines spezifischen, gegen die pro-Domäne von NGF gerichteten Antikörpers die proNGF-induzierte Apoptose von Neuronen im Hippocampus *in vitro* und *in vivo* vermindert [100]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass proNGF eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der NT-induzierten Apoptose spielt.

Durch die gleichzeitige Bindung an p75NTR und Sortilin, ein Mitglied der Familie der Vps10p-Domänen-Rezeptoren, bildet proNGF einen Signalkomplex, der für die proNGF-induzierte Apoptose verantwortlich ist [101]. NGF bindet dagegen nicht an Sortilin [101]. Ebenso konnten Domeniconi et al. zeigen, dass proNGF pro-apoptotisch auf kultivierte spinale Motoneuronen wirkt, die sowohl den p75NTR als auch den Sortilin-Rezeptor exprimieren [102].

Auch NGF bindet mit niedriger Affinität an den p75NTR. Die gleichzeitige Expression von p75NTR und TrkA scheint zu einer Konformationsänderung von TrkA zu führen, was über eine Erhöhung der Affinität der Bindungsstelle und der Spezifität für den Liganden NGF zu einer Verstärkung der durch TrkA-induzierten Signaltransduktionskaskade führt [103, 104]. Des Weiteren zeigte die Arbeitsgruppe von Epa et al., dass p75NTR an das TrkA-Adapterprotein Shc binden kann und darüber dessen Phosphorylierung stimuliert, was zu einer Verstärkung der TrkA-induzierten Signalwege führt [105].

Neben ihrer Funktion und Bedeutung im Nervensystem spielen NTs unter anderem auch eine Rolle im kardiovaskulären System. Experimente an *knockout*-Mausmodellen zeigen, dass NT-3 und BDNF für die Entwicklung des kardiovaskulären Systems wie des Herzens und der myokardialen Blutgefäße von Bedeutung sind [106, 107]. So reduziert der Verlust von BDNF den endothelialen Zell-Zell-Kontakt in Herzen von BDNF-defizienten Mausembryonen, was zu intraventrikulären Wandhämorrhagien und herabgesetzter kardialer Kontraktilität führt [106].

Creedon und Tuttle konnten zeigen, dass VSMCs *in vitro* NGF synthetisieren und dass dies das Zellüberleben von sympathischen Neuronen fördert [108]. Nachdem zunächst angenommen wurde, dass NGF als trophischer Faktor die Innervation und die Zellviabilität von Neuronen fördert, zeigte die Entdeckung der Expression des NT-Rezeptors TrkC im Gefäßmesenchym von Mausembryonen, dass NTs auch direkt auf VSMCs wirken [109]. Auch Nemoto et al. konnten mittels RT-PCR die Expression von NTs und ihrer Rezeptoren in kultivierten VSMCs nachweisen [110].

Darüber hinaus wurde die Expression von Neurotrophinen und ihrer Rezeptoren immunhistochemisch und durch RT-PCR in humanen atherosklerotischen Läsionen und in der Neointima nach Ballon-Verletzung im Tiermodell nachgewiesen [111]. Zudem konnten Donovan et al. zeigen, dass NGF die Migration von humanen VSMCs induziert [111].

Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass NGF eine bedeutende Rolle für die Zellfunktion von VSMCs spielt und darüber hinaus auch für die Pathogenese von Atherosklerose und Restenosen wichtig sein könnte.

2 Fragestellung und Ziele

Die Migration und Proliferation von VSMCs sind entscheidende Faktoren im Rahmen der Pathogenese von Atherosklerose und Restenosen nach PTCA [5]. Verschiedene Untersuchungen legen eine Beteiligung von Neurotrophinen an den pathologischen Prozessen nahe [110, 111]. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass NGF und sein Rezeptor in VSMCs der Neointima nach Ballon-Verletzung im Tiermodell verstärkt exprimiert werden [111]. Des Weiteren haben *in vitro* Experimente gezeigt, dass die Balance zwischen NGF und proNGF von großer Bedeutung ist, da sie gegensätzliche Effekte auf die Zellfunktion in Neuronen haben [79]. Während aktives β -NGF über eine hoch-affine Bindung an TrkA vor allem die Proliferation und das Zellüberleben vermittelt, weist proNGF eine höhere Affinität für den Rezeptorkomplex aus p75NTR und Sortilin auf als β -NGF und induziert über diese Rezeptor-Ligandenbindung Apoptose [79]. Furin aktiviert über endoproteolytische Spaltung an di-basischen Aminosäuresequenzen pro-NTs und könnte so entscheidend an der Regulation der VSMC-Funktion im Rahmen der Entwicklung und Progression von Atherosklerose und Restenose beteiligt sein [77].

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von *in vitro* Experimenten die Regulation der Expression von β -NGF und Furin in proliferierenden VSMCs zu untersuchen. Zudem sollte die Wirkung von β -NGF und seinem Vorläuferprotein proNGF auf die Zellfunktion von VSMCs analysiert werden. Weiterhin sollten die Mechanismen einer β -NGF-induzierten Migration identifiziert werden.

Im Einzelnen wurden daher untersucht:

1. die Wirkung der Wachstumsfaktoren PDGF-BB und TGF- β 1 auf die Expression von proNGF und seiner Proprotein Convertase Furin in VSMCs
2. die Bedeutung von Furin für die Aktivierung von proNGF zu β -NGF in VSMCs
3. die Regulation der Neurotrophin-Rezeptor Expression in VSMCs
4. der Einfluss von proNGF und β -NGF auf die Migration, Proliferation und Apoptose von VSMCs
5. die Bedeutung der Furin-Inhibition und damit der proNGF-Prozessierung auf die VSMC-Migration

6. die Mechanismen der β -NGF-abhängigen Migration von VSMCs hinsichtlich beteiligter Zellrezeptoren, Enzyme und Signaltransduktionswege.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

3.1.1 Zellkultur

Mikroskop	Axiovert S100, Zeiss
Neubauer Zählkammer	Brand (Tiefe 0,100 mm; Fläche 0,0025 mm ²)
Präparationsbesteck	Pinzette, kleine Schere, Skalpell
Zellkulturbank	Nuaire Class II, NU 437-300
Zellkulturschrank	Heraeus Instruments BB6220
Zentrifuge (groß)	Megafuge 1.0, Heraeus Instruments

3.1.2 Gelelektrophorese/*Western-Blot*

Elektrophorese-/Elektroblotkammer	Miniprotean 3, Biorad
Entwicklungsmaschine	Curix 60, Agfa
Heizblock	Test Tube Thermostat TCR 100, Roth
Netzgerät	Power pac 300, Biorad

3.1.3 Quantitative *Real-Time* Polymerase Kettenreaktion

Biophotometer	Eppendorf
PCR-Cycler	MX3000P® QPCR System, Stratagene Agilent Technology
Peltier Thermo Cycler	PTC-200, MJ Research
Thermo Printer	DPU 414, Seiko Instruments Inc.

3.1.4 Geräte

Autoklavenanlage	Varioclav 135T, H+P Labortechnik
ELISA-Reader	MR7000 Dynatech
FLUOstar OPTIMA	BMG Labtechnologies
<i>Hybridization oven</i>	Unitherm model 12/24, Uniequip
Mikroskop	Olympus BX61, analySIS Software
pH-Meter	Delta 320, Mettler
Pipetten	Eppendorf
Scanner	Scanject G2710, HP
Schüttler	Promax 1020/1040, Heidolph
Vortexer (Genie 2)	Scientific Industries

Wasserbad	GFL
Zentrifuge (klein)	Biofuge fresco, Heraeus Instruments

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

96-well <i>Multiply-PCR-Platte half skirt natural</i>	REF72.1979.202/Lot. T22810 Sarstedt
96-well Maxisorp Platte (β -NGF ELISA)	REF95.1994/Lot.2008.04:CA Nunc
96-well Platte (Caspase 3/7-Assay)	Microtest Flat Bottom 96-well Plates, 351172, Becton Dickinson
<i>Cell culture inserts</i>	BD Falcon
<i>Coverslides</i>	VWR International
Entwicklungsfilme	BioMax Light, Kodak
Eppendorfgefäße	Safe-Lock Tubes
Falcon-Röhrchen	Falcon
Filterpapier	Schleicher und Schuell
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt
Küvette (220 nm-1600 nm)	Eppendorf
Mikrotest 96 <i>Tissue Culture plate</i>	Falcon, #353072
Nitrozellulosemembran	Biorad
Objektträger/ <i>Chamberslides</i>	Nunc
Petrischale 60 cm ²	Falcon
Petrischale Primaria	Falcon
Pipettenspitzen	Roth, Biozym
Zellschaber	Techno Plastic Products

3.2 Chemikalien und Substanzen

3.2.1 Chemikalien

Alle aufgeführten Chemikalien wurden in bester verfügbarer Qualität von den angegebenen Firmen bezogen:

2-Propanol	Roth
Accutase	PAA
Acrylamid (Rotiphorese®Gel 30)	#3029.1, Roth

Albumin Standard (2 mg/mL)	Thermo Scientific
Amersham ECL Anti-Rabbit IgG	NA934, GE Healthcare
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth
<i>Bovine serum albumin</i> (7,5% BSA)	Roth
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Calbiochem
<i>Developer</i>	G153, AGFA
<i>Dimethyl-sulfoxid cell culture grade</i> (DMSO)	AppliChem
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (1x) <i>low glucose</i> (DMEM)	Biochrom
DMEM ohne Phenolrot	Biochrom
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraessigsäue (EDTA)	Calbiochem
Fetales Kälberserum (Gold EU) (FKS)	PAA Laboratories
Furin-Substrat (Pyr-RTKR-AMC)	Cat. Nr.: 344935, Calbiochem
Gelatine	Sigma Aldrich
Glycin	Sigma Aldrich
Hepes (1 M)	Biochrom
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom
Magermilchpulver	Roth
Methanol	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich
Natriumpyruvat	Biochrom AG
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS) (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	PAA Laboratories
PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem
Ponceau S	Roth
<i>Prestained Protein Ladder</i>	Fermentas Life Sciences

Primocin (<i>stock</i> 50 µg/mL)	Amaxa
<i>Rapid Fixer</i>	G354, AGFA
<i>Re-Blot Plus-Strong Solution</i> (10x)	Millipore
Salzsäure	Roth
<i>Substrate Solution</i>	R&D Systems
Tris-Base	Roth
Triton X-100	AppliChem
Trypan-Blau (0,4% Lösung)	Sigma Aldrich
Tween 20, SigmaUltra	Sigma Aldrich
<i>Vectashield Mounting Medium with DAPI</i>	Vector Laboratories
β-Mercaptoethanol	Roth

3.2.2 Inhibitoren

Decanoyl-RVKR-Chlormethylketon	N-1505, Bachem AG
K252a	Sigma Aldrich
LY 294002	Cat.Nr.: 440204, Calbiochem
PD 98059	Cat.Nr.: 513001, Calbiochem
Proteaseinhibitoren <i>7x Complete Mini</i>	Boehringer
RGD	H7630, Bachem
RGE	H3136, Bachem
<i>RNasin® Ribonuclease Inhibitor</i>	Promega
<i>Ro 32-0432 hydrochloride</i>	R137, Sigma
Staurosporin	#9953, Cell Signaling

3.2.3 Proteine

<i>Furin convertase recombinant</i>	ALX-201-002, Enzo
hβ-NGF	N-245, Alomone Labs
proNGF (Mut-human)	N-285, Alomone Labs
proNGF (WT-human)	N-280, Alomone Labs
<i>Recombinant Human TGF-β1</i>	Cat.Nr.: 100-21, PeproTech
<i>Recombinant rat PDGF-BB</i>	Cat.Nr.: 520-BB, R&D Systems
<i>SuperScript™ II Reverse Transcriptase</i>	Invitrogen

3.2.4 Primärantikörper

1. Antikörper	Spezies	Art.Nr.	Firma	Verdünnung	Medium
<i>Anti-Actin (42 kDa)</i>	<i>Rabbit pAb</i>	A 2066	Sigma-Aldrich	1:5.000	5% BSA in TBST
<i>Furin convertase (human) (MON-152)</i>	<i>Mouse mAb</i>	ALX-803-017	Alexis Biochemicals	1:1.000	5% BSA in TBST
<i>Anti-NGF-β (C-term), clone EP1320Y (32 kDa)</i>	<i>Rabbit mAb</i>	#04-1119	Millipore	1:250	5% BSA in TBST
<i>Anti-pro-NGF (N-term), clone EP1318Y (26 kDa)</i>	<i>Rabbit mAb</i>	#04-1142	Millipore	1:5.000	5% BSA in TBST
<i>Rhodamine Phalloidin</i>		R415	Invitrogen	1:40	1% BSA in PBS+ Ca ²⁺ /Mg ²⁺
<i>Phospho-Paxillin (Tyr118, 68 kDa)</i>	<i>Rabbit pAb</i>	#2541	Cell-Signaling	1:1.000	5% BSA in TBST
<i>Phospho-FAK (Tyr397, 125 kDa)</i>	<i>Rabbit pAb</i>	#3283	Cell-Signaling	1:1.000	5% BSA in TBST
<i>Phospho-Akt (Ser473, 60 kDa)</i>	<i>Rabbit pAb</i>	#9271	Cell-Signaling	1:500	5% BSA in TBST
<i>Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)</i>	<i>Rabbit mAb</i>	#4370	Cell-Signaling	1:4.000	5% BSA in TBST

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primärantikörper

3.2.5 Sekundärantikörper

2. Antikörper	Spezies	Art.Nr.	Firma	Verdünnung	Medium
<i>Fluorescein Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (FITC)</i>	<i>Rabbit pAb</i>	FI 1000	Vector Laboratories	Arbeitskonzentration 20 µg/mL	PBS + Ca ²⁺ /Mg ²⁺ / 0,01% Triton-X100
<i>Anti-Rabbit IgG</i>	<i>Rabbit</i>	NA934	GE Healthcare	1:10.000	5% BSA in TBST
<i>Anti-Mouse IgG</i>	<i>Mouse</i>	115-035-166	Jackson Immuno Research	1:5.000	5% BSA in TBST

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

3.2.6 Verwendete Primer

Primer	Sequenz
NGF <i>forward</i>	5'-ACCCAAGCTCACCTCAGTGT-3'
NGF <i>reverse</i>	5'-GTGGCCAGGATAGAAAGCTG-3'
Furin <i>forward</i>	5'-CCAGCACATCTCAACGCTAA-3'
Furin <i>reverse</i>	5'-GGCCACTGTTGTCCAGTTCT-3'
TrkA <i>forward</i>	5'-CCACTGGGACACAACAACAG-3'
TrkA <i>reverse</i>	5'-CCCCACTTCCACAGAGTCAT-3'
Sortilin <i>forward</i>	5'-AGACATCCTTGAGCGCAACT-3'
Sortilin <i>reverse</i>	5'-CGTAGCCGTAGGAACTGCTC-3'
HPRT <i>forward</i>	5'-CTCATGGACTGATATGGACAGGAC-3'
HPRT <i>reverse</i>	5'-GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC-3'

Tabelle 3: Übersicht der Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer

3.2.7 Verwendete Kits

<i>Pierce® BCA Protein Assay</i>	#23225, Thermo Scientific
<i>DuoSet® ELISA Development System Rat βNGF</i>	Cat No.: DY556, R&D Systems
<i>Rat pro-Nerve Growth Factor 1 ELISA Kit</i>	#E02P0698, BlueGene Biotech
<i>Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric)</i>	Cat No.:11 647 229 001, Roche
<i>Apo-ONE Homogeneous Caspase 3/7-Assay</i>	Promega
<i>RNase-Free DNase Set</i>	Qiagen
<i>RNeasy® Mini Kit</i>	Qiagen
<i>Power SYBR® Green PCR Master Mix</i>	Applied Biosystems

3.2.8 Verwendete Software

Optima Software Version 2.10R2	BMG Labtechnologies
Microsoft Word 2010	Microsoft Corp., Redmond, USA
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corp., Redmond, USA
<i>Image J</i>	National Institute of Health
<i>OriginPro 8.5</i>	OriginLab Corporation
Mx3000P QPCR Software	Stratagene

3.3 Zellkultur

3.3.1 Isolation glatter Gefäßmuskelzellen aus der Aorta von Ratten

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente erfolgten an Primärzellkulturen von glatten Gefäßmuskelzellen. Dazu erfolgte zunächst die Anlage einer Zellkultur durch Isolation von glatten Gefäßmuskelzellen aus den Aorten von Sprague-Dawley Ratten. Die Entnahme von Organen oder Geweben aus Ratten wurde vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (Tötungsanzeige T 0275/03) genehmigt. Nach Entnahme der thorakalen und abdominalen Aorten wurden diese in einem 15 mL Falcon-Röhrchen mit PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) und 200 μL Penicillin/Streptomycin (10.000 U/mL und 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) überführt. Zur Präparation wurde die Aorta in eine mit PBS (mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gefüllte Petrischale überführt, gesäubert, der Länge nach aufgeschnitten und ausgebreitet, so dass die Gefäßinnenseite nach oben zeigte. Im Anschluss daran wurde die Endothelschicht mit einem Skalpell vorsichtig abgetragen und das Gefäß in kleine Stücke zerteilt. Die einzelnen Aortenstücke wurden anschließend mit der Gefäßinnenseite nach unten auf einer Primaria Petrischale positioniert. Nach 5-10 min bei Raumtemperatur wurden die Aortenstücke mit 10 mL Nährmedium überschichtet. Während der Inkubation für 5-10 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 wurde das Nährmedium regelmäßig erneuert. Danach wurden die Aortenstücke verworfen und die verbleibenden ausgewachsenen VSMCs wie unten beschrieben passagiert.

Wachstumsmedium

DMEM (1x) *low glucose* + 10% FKS + 1% L-Glutamin (200 mM) + 1% Penicillin/Streptomycin (10.000 U/mL und 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 1% HEPES (1 M) + 0,2% Primocin (*stock* 50 mg/mL, Endkonzentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

3.3.2 Zellkultur

Die glatten Gefäßmuskelzellen wurden in einem Zellkulturinkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO_2 -Gehalt kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturbank durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in 60 cm^2 - oder 21 cm^2 -großen Kulturschalen der Firma Falcon. Als Kulturmedium wurde DMEM (1x) *low glucose* Nährmedium mit 10% FKS, 1% L-Glutamin (200 mM) und 1% HEPES (1 M) verwendet. Zur Vorbeugung einer bakteriellen Kontamination der Zellkultur

wurde dem Nährmedium zusätzlich 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin beigefügt. Des Weiteren wurden dem Medium bis zur dritten Passage der Zellen 100 µg/mL Primocin zugesetzt, um eine Verunreinigung der Zellkultur mit Mycoplasmen zu verhindern. Das Wachstumsmedium wurde dreimal in der Woche ausgetauscht und der Zustand der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Passage erfolgte bei einer Konfluenz der Zellen von 80-90%. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gespült. Zum Ablösen wurden die adhären wachsenden glatten Gefäßmuskelzellen mit 5 mL Accutase für 5 bis maximal 10 min im Brutschrank inkubiert. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurde durch Zugabe von 7 mL Nährmedium die Aktivität der Accutase gestoppt und die gesamte Zellsuspension in ein steriles 15 mL Falcon-Röhrchen überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1.100 rpm und 4°C wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in neuem Nährmedium resuspendiert und die Zellen in neue Kulturschalen überführt.

3.3.3 Stimulation der glatten Gefäßmuskelzellen

Für die Untersuchungen wurden nur VSMCs der dritten bis siebten Passage verwendet. Alle verwendeten Zellen wurden, wie unter Punkt 3.3.2 beschrieben, kultiviert und bei Erreichen der Konfluenz abgelöst. Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 µL der Zellsuspension in 190 µL Trypan-Blau im Verhältnis 1:20 verdünnt. 10 µL der verdünnten Suspension wurden in die Kammer einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Aus acht ausgezählten Gesichtsfeldern wurde der Mittelwert der Zellzahl bestimmt. Zur Berechnung der Zellzahl pro mL Zellsuspension, wurde der Mittelwert mit dem Verdünnungsfaktor 20×10^4 multipliziert. Im Anschluss wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen in 3 mL Nährmedium auf eine 20 cm² große Schale ausgesetzt und zwei Tage im Brutschrank kultiviert. Vor den Stimulationsversuchen wurden die Zellen mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltigem PBS gewaschen und in serumfreiem Medium für 24 h inkubiert, um die Zellen vor Beginn des Versuchs zu synchronisieren. Im Anschluss wurden die VSMCs mit 20 ng/mL PDGF-BB und 10 ng/mL TGF-β1 für 2, 4, 8 oder 24 h stimuliert. In Experimenten mit dem Furin-Inhibitor Decanoyl-RVKR-Chlormethylketon (dec-CMK) wurden Zellen für 30 min mit 100 µmol/L dec-CMK vorinkubiert und anschließend mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF-β1 (10 ng/mL) für 24 h stimuliert.

3.3.4 *Checkerbox*-Experimente und Migrationsassay

Zu Beginn eines Migrationsexperiments wurden Migrationsfilter mit einer Porengröße von 8 μm und einer Porendichte von $6 \pm 2 \times 10^4 / \text{cm}^2$ in einer 24-*well* Platte ausgerichtet und mit 0,2%-iger Gelatinelösung bei 4°C inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Gelatine abgesaugt und die Filter mit 1%-igem BSA in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS für eine 1 h bei 37°C geblockt. Anschließend wurden 50.000 VSMCs in serumfreiem Medium in die obere Kammer eingebracht und die untere Kammer mit serumfreiem Medium befüllt. Nach einstündiger Adhäsion bei 37°C wurde das Nährmedium aus der unteren Kammer abgesaugt und durch neues, serumfreies Medium oder Kulturmedium mit rekombinantem β -NGF in einer Konzentration von 0,1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL oder 100 ng/mL ersetzt. Für einige Versuche wurden auch Überstände aus VSMC-Stimulationsversuchen mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) gesammelt. Diese, im Folgenden als *conditioned medium* (CM) bezeichneten Überstände, wurden dann im Migrationsversuch in die untere Kammer gegeben. In anderen Versuchen wurden VSMCs zunächst mit dec-CMK (100 $\mu\text{mol/L}$, 30 min) vorinkubiert, anschließend mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) stimuliert und dann erneut die Überstände gesammelt. Auch diese Überstände, die im Folgenden als *dec-conditioned medium* (dec-CM) bezeichnet werden, wurden in Migrationsversuchen eingesetzt.

Zur Untersuchung der Inhibition der Zellmigration durch verschiedene Inhibitoren wurden die VSMCs vor Beginn der Migration mit verschiedenen Inhibitoren (TrkA-Inhibitor K252a (200 μM), PI3K-Inhibitor LY294002 (10 $\mu\text{mol/L}$), MEK/ERK-Inhibitor PD98059 (10 $\mu\text{mol/L}$), α -Integrin blockierenden RGD-Peptid (100 $\mu\text{mol/L}$)) vorinkubiert. Anschließend wurde dann analog zu den oben beschriebenen Migrationsversuchen Medium mit 100 ng/mL β -NGF oder CM in die untere Kammer gegeben. Bei den *Checkerbox*-Experimenten wurden 100 ng/mL β -NGF bzw. proNGF in keine, nur die obere, nur die untere oder in beide Kammern gegeben. Als Positivkontrolle dienten Ansätze, bei denen Medium mit 10% FKS in die untere Kammer gefüllt wurde. Von jedem Ansatz wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Nach einer Migrationszeit von vier Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 wurden die Filter innen mit kaltem, $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltigem PBS gespült und mit einem Q-Tip geputzt. Die migrierten Zellen wurden mit 100% Methanol für mindestens 30 min bei -20°C fixiert. Das Anfärben der fixierten Zellen erfolgte im Anschluss mit Mayer-

Reagenz nach Gill II (Hämalaunlösung). Anschließend wurden zur Auswertung unter dem Lichtmikroskop mindestens drei Haupt Gesichtsfelder (*high power field*, HPF) pro Filter ausgezählt.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Proteinextraktion und Proteinbestimmung

Die Proteinexpression der VSMCs wurde mit Hilfe von *Western-Blots* analysiert. Hierzu war es nach erfolgter Zellyse zunächst notwendig, eine Proteinisolation und Proteinbestimmung durchzuführen. Nach der Zellyse wurden die Zellen zunächst auf Eis gestellt, mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gespült und anschließend mit 130 μL Proteinextraktionspuffers überschichtet. Anschließend wurden die Zellen zusammen mit dem Zellysepuffer mit Hilfe eines Zellschabers von der Petrischale gelöst, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C für 15 min wurde der Überstand in ein Eppendorf-Röhrchen überführt.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben mittels des *BCA Protein Assay Kit* von Thermo Scientific, um eine Beladung der Gele mit einer konstanten Proteinmenge sicherzustellen. Die *bicinchoninic acid* (BCA)-Methode zur Proteinbestimmung basiert auf einer Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu einwertigen Cu^{1+} -Ionen durch Peptide. Im zweiten Schritt bilden die entstandenen Cu^{1+} -Moleküle einen Komplex mit je zwei BCA-Molekülen. Diese Komplexverbindung zeigt eine starke Absorption bei 562 nm, die mit steigender Proteinkonzentration linear zunimmt. Mit Hilfe einer Standardkurve kann aus der gemessenen Absorption die Proteinkonzentration ermittelt werden. Zur Erstellung der Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA-Konzentrationen von 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bis 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hergestellt. Die Proteinproben wurden auf ein Gesamtvolumen von je 50 μL im Verhältnis 1:10 mit doppelt destilliertem Wasser (ddH_2O) verdünnt. Anschließend wurden zweimal je 20 μL einer Probe als Doppelansatz in die *wells* einer 96-*well* Platte pipettiert. Die Assay-Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 50:1 gemischt. Anschließend wurden 300 μL dieser Lösung pro *well* zu den Proben hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 37°C wurde die Proteinkonzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm im *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) Lesegerät bestimmt.

Proteinextraktionspufferstock

1,25 mL 0,5% Triton X-100 + 1,25 g 0,5% Deoxycholic acid + 7,5 mL NaCl (150 mM) + 5 mL Tris (20 mM, pH 7,5) + 5 mL EDTA (10 mM, pH 8) + 1,99 g Natriumpyruvat ad 250 mL mit ddH₂O, auf pH 7,5

Proteinextraktionspuffer (ad 2 mL)

1.680 µL Pufferstocklösung + 300 µL Complete Mini Mix (1 Tablette ad 1,5 mL ddH₂O) + 10 µL Natriumorthovanadat in ddH₂O (100 mM) + 10 µL PMSF in 2-Propanol (100 mM)

3.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Proteinproben mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu wurde ein 1,5 mm dickes, aus einem Trenngel und einem Sammelgel bestehendes Polyacrylamid-Gel verwendet. Je nach Größe der zu untersuchenden Proteine wurde ein Trenngel mit 8%-, 10%-, oder 14%-SDS hergestellt.

Um eine gleichmäßige Beladung der Gele sicherzustellen, wurden die Proben auf eine Proteinkonzentration von 50 µg bei einem Gesamtvolumen von 40 µL mit Hilfe von ddH₂O verdünnt und jeweils mit 10 µL fünffach Probenpuffer versehen. Die verdünnten Proben wurden 5 min im Heizblock auf 95°C erhitzt, gemischt und kurz zentrifugiert.

Die polymerisierten Gele wurden in eine Elektrophoresekammer eingespannt, die mit Elektrophoresepuffer gefüllt wurde. Die Gele wurden mit den Proteinproben und zusätzlich mit einem farbigen Molekülmasse-Marker beladen. Ein elektrisches Feld mit einer Spannung von 80 mV wurde angelegt. Nachdem die Proben das Sammelgel vollständig durchlaufen hatten, wurde die Spannung auf 110 mV erhöht. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden die Proteine unterschiedlich weit durch das Trenngel laufen gelassen und die Gelelektrophorese dann gestoppt.

Trenngel	8%	10%	14%
30% Acrylamid	5,3 mL	6,6 mL	9,3 mL
Trenngelpuffer	5 mL	5 mL	5 mL
ddH ₂ O	9,3 mL	8 mL	5,3 mL
10% SDS-Lösung	200 µL	200 µL	200 µL
TEMED	12 µL	8 µL	12 µL
10% APS	200 µL	200 µL	200 µL

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Trenngele (Mengenangaben für 2 Trenngele)

Trenngelpuffer (1,5 mol/L, pH 8,8)

181,71 g Tris-Base auf 1 L destilliertes H₂O

Sammelgel	5%
30% Acrylamid	1,3 mL
Sammelgelpuffer	1 mL
ddH ₂ O	5,5 mL
10% SDS-Lösung	80 µL
TEMED	8 µL
10% APS	80 µL

Tabelle 5: Zusammensetzung des verwendeten Sammelgels (Mengenangaben für 2 Sammelgele)

Sammelgelpuffer (1 mol/L, pH 6,8)

121,14 g Tris-Base auf 1 L destilliertes H₂O auffüllen

Elektrodenpuffer (5-fach)

30,2 g Tris-Base (25 mmol/L) + 188 g Glycin (250 mmol/L) + 100 mL 10% SDS auf 2 L mit destilliertem H₂O auffüllen (Arbeitslösung 1-fach)

3.4.3 Western-Blot

Im nächsten Schritt wurden die Proteine mittels *Tank-Blot* auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wird ein elektrisches Feld angelegt, durch das die Proteine vom Trenngel auf die Nitrocellulose-Membran bewegt werden.

Das Sammelgel wurde vom Trenngel abgelöst und verworfen. Direkt auf das Trenngel wurde eine Nitrocellulosemembran aufgelegt. Das Trenngel und die Nitrocellulosemembran wurden von beiden Seiten mit Filterpapier und einem Schwamm bedeckt und in die *Western-Blot*-Kammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit 4°C kaltem Transferpuffer befüllt, mit Eis gekühlt und auf einen Magnetrührer gestellt. Zum Transfer der Proteine wurde eine Spannung von 100 mV für eine Stunde angelegt.

Nach Abschluss der Proteinübertragung, wurde die Membran für 5 min in 0,1%-Ponceau-Lösung gefärbt, um den Erfolg der Proteinübertragung zu überprüfen.

Transferpuffer (5-fach)

30,3 g Tris-Base + 144 g Glycin auf 2 L mit destilliertem H₂O (Arbeitslösung 1-fach = 400 mL 5-fach Transferpuffer + 400 mL Methanol auf 2 L mit destilliertem H₂O auffüllen)

Proteinladepuffer (5-fach)

30 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 6,8) + 10 g SDS + 50 mL Glycerin + 20 mL β-Mercaptoethanol + 250 mg Bromphenolblau

0,1% Ponceau Lösung

0,5 g Ponceau S in 500 mL 5% CH₃COOH

3.4.4 Immundetektion

Im Anschluss an den Proteintransfer wurde die Nitrocellulosemembran eine Stunde in 5% Magermilch in *Tris Buffered Saline with Tween* (TBST)-Puffer inkubiert. Dies diente dazu, freie Bindungsstellen auf der Membran zu besetzen, um eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden.

Danach wurde die Membran kurz in TBST-Puffer gewaschen und anschließend mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Antikörper wurden unter Berücksichtigung der Angaben des Herstellers in 5% Magermilch in TBST oder in 5% BSA in TBST verdünnt.

Anschließend wurde die Membran dreimal für 15 min in TBST-Puffer auf dem Schüttler gewaschen, um alle überschüssigen Primärantikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem *horseradish*-Peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörpern inkubiert. Die Auswahl des Sekundärantikörpers richtete sich nach dem verwendeten Primärantikörper. Auch der Sekundärantikörper wurde entsprechend verdünnt. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Membran erneut dreimal je 15 min in TBST-Puffer auf dem Schüttler gewaschen und dann entwickelt. Hierfür wurde die Membran mit einer *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Lösung der Firma Amersham für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Umsetzung der ECL-Lösung durch die am Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase führt zur Freisetzung von Licht und dadurch zur Schwärzung des aufgelegten und entwickelten Röntgenfilms.

TBS-Puffer (5-fach, pH 7,6)

24,2 g Tris-Base + 80 g NaCl auf 2 L mit destilliertem H₂O auffüllen

TBST-Puffer (1-fach)

400 mL 5-fach TBS-Puffer + 4 mL 1:2 verdünntes Tween 20 hinzufügen auf 2 L mit ddH₂O auffüllen

3.4.5 Immunfluoreszenz

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fluoreszenzfärbungen zur *in situ* Darstellung zellulärer Proteine durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Bindung eines Antigens an einen spezifischen Antikörper, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops dargestellt und analysiert wird. Dazu wurden zunächst 8-*well* Kammern mit 0,2%-iger Gelatine beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Gelatine abgesaugt und jeweils 10.000 VSMCs in einem Volumen von 400 µL Nährmedium mit 10% FKS in die *wells* gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit Ca²⁺/Mg²⁺-haltigem PBS gewaschen anschließend zur Synchronisation der Proliferation mit 350 µL Medium mit 0,5% FKS überschichtet und für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nun wurden die Zellen mit β-NGF (100 ng/mL) für 4 h im Brutschrank stimuliert. Hiernach wurde erneut das Medium

abgesaugt, die Zellen mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltigem PBS gewaschen und mit 400 μL Paraformaldehyd für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen der fixierten Zellen mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltigem PBS wurden die Zellen mit dem Primärantikörper Anti-Paxillin, der im Verhältnis von 1:50 in *Ab-diluent* verdünnt wurde, inkubiert. Nach der Inkubation über Nacht bei 4°C erfolgten drei Waschgänge mit 1x PBS/0,01% Triton-X100 für je 5 min bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurden die VSMCs mit dem *fluorescein isothiocyanat* (FITC)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37°C wurden die Zellen erneut dreimal mit 1x PBS/0,1% Triton-X100 gewaschen und anschließend mit Phalloidin (Verdünnung 1:40 in PBS mit 1% BSA; 5 μL auf 200 μL) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 1x PBS/0,01% Triton-X100 wurden die Kammern vom Objektträger entfernt und der Objektträger mit *Mounting Medium* mit DAPI (Vectorshield) und einem Deckglas überschichtet. Dadurch wurde einerseits das Präparat konserviert und andererseits die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Anschließend erfolgte die Auswertung mit einem Fluoreszenzmikroskop.

Ab-diluent

10% Ziegen-Serum in 1x PBS + 0,3% Triton-X100

3.4.6 Furin Aktivitätsassay

Zur Bestimmung der Enzymaktivität von Furin wurde die Spaltung des Furin-Substrats Pyroglutaminsäure-Arginin-Threonin-Lysin-Arginin-7-Amino-4-Methylcoumarin (Pyr-RTKR-AMC) gemessen. An das verwendete Furinsubstrat ist dabei der Fluoreszenzfarbstoff 7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC) gebunden, der durch die Furin-abhängige Spaltung des Substrats frei wird und dessen Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzspektrometer bei einer Wellenlänge von 460 nm gemessen werden kann. Die Stärke des gemessenen Fluoreszenzsignals ist dabei abhängig von der Furin-Aktivität.

Zu Beginn des Versuchs wurden VSMCs für 24 h mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) stimuliert oder aber zunächst mit dec-CMK (100 $\mu\text{mol/L}$) für 30 min vorinkubiert (siehe Abschnitt 3.3.3). Die Zellen wurden dann zweimal mit kaltem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltigem PBS gespült und anschließend in 1.500 μL PBS von der Platte

gelöst. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 2.000 rpm und 4°C wurden die Pellets zweimal mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltigem PBS gespült und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Zur Lyse der Zellen wurden die Pellets dreimal abwechselnd bei -80°C eingefroren und im Heizblock bei 37°C wieder aufgetaut. Im Anschluss wurden die Zellen im Ultraschallbad für 30 s lysiert. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm und 4°C wurden die Überstände abgenommen, die Pellets in 50 μL 1x PBS gelöst und eine Proteinbestimmung des Zelllysats durchgeführt. Anschließend wurden 10 μg Protein mit 10 μL Reaktionspuffer und 0,5 $\mu\text{mol/L}$ Furin-Substrat versetzt. Die kontinuierliche Messung (1 h bei 37°C) im Fluostar-Spektrometer erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Emissionswellenlänge von 430 nm.

Reaktionspuffer

25 mmol/L MES + 25 mmol/L Tris-HCl + 2,5 mmol/L CaCl_2 (pH 7,4)

3.4.7 β -NGF ELISA

Für die Quantifizierung der β -NGF-Konzentration im Überstand der VSMCs wurde das *DuoSet ELISA Development* Kit für natürliches und rekombinantes Ratten β -NGF von R&D Systems verwendet. Das Prinzip dieses Enzymimmunoassays beruht auf einer Antikörper-Antigen-Antikörper-Bindung (*Sandwich*-ELISA). Zunächst erfolgt die Bindung von anti-NGF-Antikörpern an eine Mikrotiterplatte. Diese gebundenen Antikörper dienen als Fangantikörper für das in den Proben enthaltene β -NGF. Der anschließend zugegebene Biotin-markierte β -NGF-Antikörper dient als Nachweisantikörper (Detektionsantikörper). Durch die Antigen-Antikörper-Bindung wird der Nachweisantikörper quantitativ entsprechend des β -NGF-Gehalts in der Probe immobilisiert. Nun erfolgt die Zugabe des Enzyms HRP, welches an Streptavidin gebunden ist. Über die Bindung von Streptavidin an Biotin erfolgt die Bindung des Enzyms an den Nachweisantikörper. Anschließend wird das HRP-Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben. Bei der HRP-katalysierten Umsetzung von TMB entsteht ein blauer Farbstoff. Die Farbentwicklung ist proportional zum β -NGF-Gehalt in den Proben. Nach dem Stoppen der Farbentwicklung wird die Absorption photometrisch gemessen.

Der Assay wurde mit Überständen von unbehandelten Zellen und von Zellen, die für 24 h mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) stimuliert wurden, durchgeführt. Außerdem wurden Überstände aus Inhibitionsversuchen mit dec-CMK untersucht (Vorinkubation für 30 min mit dec-CMK (100 μ mol/L) + Stimulation mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) für 24 h). Zu Beginn des Versuchs wurde der *Capture*-Antikörper (Fangantikörper) in 1x PBS verdünnt, die 96-*well*-Platte mit 100 μ L/*well* des verdünnten Antikörpers befüllt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die Platte mit 300 μ L/*well* Reagenzverdünnungspuffer geblockt. Nach 1½-stündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur und drei Waschgängen mit Waschpuffer, wurden je 100 μ L der Proben in Doppelansätzen in die *wells* der Platte gegeben. Zusätzlich wurde eine Standardkonzentrationsreihe von 0 bis 1.000 pg/mL β -NGF in Reagenzverdünnungspuffer untersucht. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte erneut dreimal gewaschen, um ungebundene Antigene zu entfernen. Danach wurde die ELISA-Platte mit je 100 μ L des Nachweisantikörpers (100 ng/mL) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der überschüssige Detektionsantikörper wurde wiederum durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Danach wurde die Platte mit Streptavidin-HRP (1:200 verdünnt) für 20 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach folgten erneut ein dreimaliger Waschschrift und eine 20-minütige Inkubation mit der Substratlösung in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Die Enzymreaktion wurde anschließend mit 2 N H₂SO₄ gestoppt. Sofort im Anschluss wurde die optische Dichte bei 450 nm im ELISA-Lesegerät gemessen und die β -NGF-Konzentration in pg/mL mit Hilfe der Standardkurve berechnet.

3.4.8 Zellproliferation ELISA, BrdU (kolorimetrisch)

Für die Quantifizierung der Zellproliferation der VSMCs wurde das *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)* Kit von Roche benutzt. Das Prinzip dieses Immunoassays basiert auf der Inkorporation des Pyrimidin-Analogons 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin während der *deoxyribonucleic acid* (DNA)-Synthese proliferierender Zellen. Das in die DNA eingebaute BrdU wird anschließend immunhistochemisch mittels eines spezifischen Peroxidase-konjugierten Antikörpers (Anti-BrdU-POD) im Immunoassay nachgewiesen.

Zunächst wurden 8.000 VSMCs in 200 μ L Nährmedium mit 10% FKS *pro well* auf einer 96-*well* Mikrotiterplatte bis zum Erreichen der Subkonfluenz inkubiert. Anschließend erfolgte zur Synchronisation des Wachstums der Zellen eine Inkubation für 24 h mit FKS-freiem Nährmedium bei 37°C. Je nach Versuch wurden die Zellen anschließend für 24 h mit β -NGF (1 ng/mL; 100 ng/mL) bzw. proNGF (1 ng/mL; 100 ng/mL) in 100 μ L serumfreiem Nährmedium stimuliert.

Nach 8 h Inkubation wurde 10 μ L BrdU-Reagenz (Endkonzentration 10 μ mol/L) zu den Zellen hinzugeben und die Zellen für weitere 16 h im Brutschrank inkubiert. Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Zellen unter Verwendung der im Kit enthaltenen FixDenat-Lösung fixiert. Gleichzeitig wurde die DNA denaturiert, um eine Bindung des BrdU-Antikörpers an das in die neusynthetisierte DNA eingebaute Bromdesoxyuridins zu ermöglichen. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Fixationslösung abgesaugt und die Platte mit 100 μ L *pro well* Anti-BrdU-POD (1:100 verdünnt mit Ab-Lösung) für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit dem mitgelieferten Waschpuffer (1:10 verdünnt) wurden die ungebundenen Antikörper entfernt. Hiernach wurden *pro well* 100 μ L TMB hinzugegeben und die Mikrotiterplatte für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Umsetzung des Substrats TMB durch die Peroxidase führt zu einer Farbentwicklung proportional zur Anzahl der Immunkomplexe. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 15 μ L *pro well* Stopplösung (1 mol/L H₂SO₄) beendet. Daraufhin wurde die Absorption bei 450 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers gemessen, wobei die gemessene Absorption mit der Menge an neusynthetisierter DNA und somit mit der Anzahl proliferierender Zellen korrelierte.

3.4.9 Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7 Assay

Die Apoptoserate in den VSMCs wurde über die Messung der Caspase 3/7-Aktivität mit Hilfe des *Apo-ONE® Homogeneous Caspase 3/7-Assay* von Promega bestimmt. Caspasen sind Aspartat-spezifische Cysteinproteasen, die über eine intrazelluläre proteolytische Kaskade schließlich zur Spaltung von Proteinen des Zytoskeletts (z.B. Aktin, Laminin) sowie zum Abbau von DNA und damit zur Apoptose führen [112]. Das Prinzip des Assays beruht auf dem Umsatz von profluoreszierendem Rhodamin 110 (*bis-N-CBZ-L-aspartyl-L-glutamyl-L-valyl-L-aspartic acid amide*; Z-DEVD-R110) durch aktive Caspasen 3/7. Zunächst werden die aktiven Caspasen 3/7 mit Hilfe eines

Lysepuffers aus den Zellen freigesetzt. Durch die Abspaltung der DEVD-Peptide von Rhodamin 110 beginnen die Rhodamin-Spaltprodukte zu fluoreszieren, wobei das Emissionsmaximum bei 521 nm liegt. Die Menge des fluoreszierenden Produkts ist proportional zur Aktivität der Caspasen 3/7 in der Probe.

Zunächst wurden 8.000 Zellen pro *well* in 200 μ L Nährmedium mit 10% FKS auf eine 96-*well* Platte ausgesetzt und für 48 h im Brutschrank inkubiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen je nach Versuch mit β -NGF (1 ng/mL oder 100 ng/mL) bzw. proNGF (1 ng/mL oder 100 ng/mL) in Phenolrot-freiem Nährmedium für 24 h stimuliert, da Phenolrot die Messung der Fluoreszenz behindert. Als Positivkontrolle diente Staurosporin (4 μ mol/L), welches 4 h vor Ende der Stimulation zu den Kontrollzellen hinzugefügt wurde. Nach der Inkubation wurden 100 μ L Caspase-Substrat (1:100 in Caspase 3/7-Puffer verdünnt) pro *well* hinzugegeben. Die Platte wurde nun für 30 min auf einem Schüttler bei 500 rpm inkubiert. Die Fluoreszenzmessung im Probenmaterial erfolgte über eine Dauer von 18 h mit Hilfe des Fluoreszenz-Lesegeräts FLUOstar OPTIMA im Abstand von 60 min, bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm.

3.4.10 proNGF1 ELISA

Die proNGF-Sekretion in VSMCs wurde mit Hilfe des *Rat pro-Nerve Growth Faktor 1 (proNGF) ELISA* Kits der Firma BlueGene Biotech gemessen.

Bei diesem Immunoassay wird eine Mikrotiterplatte verwendet, auf der ein polyklonaler, spezifischer Anti-proNGF-Antikörper gebunden ist. Diese Platte wird gleichzeitig mit den zu bestimmenden Proben und einem enzymmarkierten proNGF1-HRP-Konjugat (Tracer) inkubiert. Dies führt dazu, dass das in den Proben enthaltene proNGF und das proNGF1-HRP-Konjugat um die begrenzten proNGF-Antikörper-Bindungsstellen konkurrieren. Anschließend erfolgt die Zugabe eines geeigneten Enzymsubstrats für das an den Tracer gebundene Enzym. Bei der Spaltung des Substrats durch die HRP entsteht ein Farbstoff. Die Intensität des Farbstoffes wird anschließend photometrisch gemessen. Das gemessene Signal ist dabei proportional zu der Menge an gebundener HRP und umgekehrt proportional zu der Menge an proNGF im Probenmaterial. Die Durchführung des Assays erfolgte nach Herstellerangaben und unter Verwendung der im Kit enthaltenen Substrate und Antikörper. Gemessen wurde die proNGF-Konzentration in Überständen aus verschiedenen VSMC-Stimulationsversuchen (siehe

Abschnitt 3.3.3). Zunächst wurden 250 μL der zu messenden Probe bzw. 250 μL der mitgelieferten Standardproben mit 25 μL Lysepuffer versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden je 100 μL einer Probe im Duplikat auf die mitgelieferte Mikrotiter-Platte aufgetragen. Parallel wurde eine Standardkonzentrationsreihe mit Konzentrationen von 0 pg/mL bis 250 pg/mL erstellt. Nun wurden 50 μL des Konjugats zu jeder Probe hinzugefügt und mit dieser vermischt. Die abgedeckte Platte wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Im folgenden Waschschrift wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit Hilfe des Waschpuffers gewaschen. Danach wurden je 50 μL des Substrats A und B zu jedem *well* hinzugefügt. Nach einer erneuten Inkubation für 10 min bei 20-25°C wurde die Reaktion mit 50 μL Stopplösung beendet und die optische Dichte bei 450 nm im Photometer gemessen. Die proNGF-Konzentration in den einzelnen Proben konnte dann mit Hilfe der Standardreihe ermittelt werden.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 RNA-Isolierung aus glatten Gefäßmuskelzellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus primären VSMCs erfolgte mit Hilfe *des RNeasy Mini Kits* der Firma Qiagen. Hierbei werden die Zellen lysiert und homogenisiert. Die RNA wird durch Zugabe von Ethanol selektiv an eine Silica-Gel Membran im Inneren einer Säule gebunden, während andere Zellbestandteile (z.B. DNA, Proteine) ausgewaschen werden. Mit Hilfe von RNase-freiem H_2O kann anschließend die membrangebundene RNA eluiert werden.

Vor Beginn der RNA-Isolation wurden VSMCs nach obigem Protokoll stimuliert (siehe Kapitel 3.3.3). Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit Hilfe des im Kit enthaltenen RLT-Puffers lysiert. Dieser Puffer enthält Guanidinisothiocyanat, welches Proteine denaturiert und somit auch RNasen inaktiviert, die intrazellulär liegen und bei der Zellyse freigesetzt werden. Vor Verwendung wurden zu je 1 mL RLT-Puffer zusätzlich noch 10 μL 2-Mercaptoethanol hinzu pipettiert, um eine komplette Inaktivierung aller RNasen zu gewährleisten und die RNA sicher vor einem Verdau zu schützen.

Die zuvor nach obigem Protokoll stimulierten VSMCs wurden zunächst zweimal mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltigem PBS gespült und anschließend in 600 μL RLT-Puffer mit einem Zellspatel von der Zellkulturplatte abgeschabt und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt.

Das Zelllysate wurde anschließend homogenisiert, indem es zehnmal durch eine 20 Gauge Nadel gezogen wurde. Nun wurden je 600 μL 70% Ethanol in DEPC- H_2O (RNase-freies Wasser) zu den Proben hinzu pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Anschließend wurden 700 μL der Probe auf die Silica-Gel Membran einer RNeasy-Säule geladen. Bei der anschließenden Zentrifugation für 15 s bei 13.000 rpm verblieb die RNA auf der Membran, während die nicht-gebundenen Bestandteile des Lysats abzentrifugiert wurden. Das entstandene Eluat wurde verworfen und der Arbeitsschritt mit den restlichen 700 μL der Probe wiederholt. Danach wurden die Säulen mit jeweils 350 μL RW1-Puffer gewaschen, um Rückstände zu entfernen. Im nächsten Schritt erfolgte mit Hilfe der DNase I aus dem *RNase free DNase Set* ein DNA-Verdau, um mögliche Kontaminationen der Probe durch unspezifische genomische DNA zu entfernen. Dazu wurden 10 μL DNase I mit 70 μL des mitgelieferten RDD-Puffers gemischt und je 80 μL direkt auf die Mitte der Membran der Säule pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Säulen mit 350 μL RW1-Puffer gewaschen. Anschließend wurden in einem zweimaligen Waschschrift je 500 μL des RPE-Puffers auf die Säule pipettiert und diese für 15 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säule mit der gebundenen RNA wurde in ein neues 2 mL-Eppendorf-Röhrchen überführt und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Zur Eluation der RNA wurde die Säule erneut in ein 1,5 mL-Eppendorf-Röhrchen platziert und 30 μL DEPC- H_2O auf die Mitte der Membran pipettiert. Im Anschluss an eine fünfminütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Proben für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, so dass sich nun die isolierte RNA im Zentrifugat befand.

3.5.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Um bei der folgenden cDNA-Synthese die gleiche Menge RNA einsetzen zu können, erfolgten die Quantifizierung der RNA und die gleichzeitige Überprüfung der Reinheit der Proben mit Hilfe einer spektralphotometrischen Messung. Dazu wurden 5 μL der Probe mit 55 μL sterilem H_2O im Verhältnis 1:12 verdünnt und die optische Dichte bei 260, 280 und 320 nm im Photometer gemessen. Verwendet wurden spezielle Quarzküvetten, die keine Eigenabsorption aufweisen. Mit Hilfe einer mit dd H_2O gefüllten Quarzküvette wurde ein Leerwert bestimmt, mit dem die Kalibrierung des Photometers durchgeführt wurde. Die optische Dichte der Probe bei 260 nm (OD_{260}) diente als Maß für die Konzentration an Nukleinsäuren, da bei dieser Welllänge das

Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren liegt. Im Gegensatz dazu liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm Wellenlänge.

Zum Ausschluss einer möglichen Proteinkontamination und somit zur Überprüfung der Reinheit der Probe wurde der Quotient OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Werte zwischen 1,7 und 1,8 sprechen dabei gegen eine Proteinkontamination.

Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass der Messwert bei 320 nm nahe 0 lag. Dieser Wert ist ein Maß für die Trübung der Probe und gibt Hinweis darauf, ob die Probe durch Schwebstoffe verunreinigt ist.

3.5.3 cDNA-Synthese

Im folgenden Arbeitsschritt wurde die gewonnene RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies ist notwendig, da nur DNA als Substrat für die PCR verwendet werden kann.

Jeweils 1 µg der eluierten RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Ausgangsvolumen von 10 µL verdünnt. Anschließend wurden je 2 µL des *Master Mix I* zu jeder Probe hinzu pipettiert. Der *Master Mix I* enthält einen unspezifischen Primer (*random primer*), der sich an die komplementären Abschnitte der RNA anlagert und somit den notwendigen Startpunkt bildet, an den die Reverse Transkriptase weitere Nucleotide anheften kann. Nun wurden die Proben zur Auflösung aller Sekundärstrukturen für 5 min bei 65°C inkubiert und im Anschluss auf Eis gestellt. Danach wurden je 7 µL des *Master Mix II* zu den Proben hinzugegeben und durch vorsichtiges Pipettieren vermischt. Nach erneuter Inkubation der Proben für 2 min bei 25°C wurde je 1 µL *SuperScript II* zu den RNA-Proben hinzu pipettiert, welches die Reverse Transkriptase enthielt. Die Proben wurden in den *ThermoCycler* gestellt, in dem die cDNA-Synthese stattfand.

Zunächst wurden die Proben 10 min bei 25°C inkubiert, was der Primerbindung an die RNA diente. Im zweiten Schritt wurden die Proben für 50 min auf 42°C erhitzt, wobei der Aufbau der komplementären DNA durch die Reverse Transkriptase stattfand. Danach wurde die Reverse Transkriptase durch eine Erhöhung der Temperatur auf 70°C für 15 min inaktiviert. Anschließend wurden die Proben mit der neu synthetisierten cDNA im *ThermoCycler* auf 4°C abgekühlt und bis zur Verwendung für die PCR bei -20°C gelagert.

Master Mix I

1 μL *random primer* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + 1 μL dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) (je 10 mol/L dATP, dCTP, dGTP und dTTP)

Master Mix II

4 μL 5x *first strand buffer* + 2 μL DTT (1,4 Dithiothreitol) (0,1 mol/L) + 1 μL RNasin Ribonuclease Inhibitor

3.5.4 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein zyklisches Verfahren zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Sequenzen. Das Prinzip der PCR beruht auf der DNA-Replikation und wurde 1985 von Kary Mullis et al. beschrieben [113]. Während eines Reaktionszyklus werden drei Schritte durchlaufen. Im ersten Schritt werden bei 95°C die DNA-Doppelstränge denaturiert. Im zweiten Schritt lagern sich bei 50-70°C die spezifischen Primer an die komplementäre jetzt einzelsträngige DNA an (*annealing*). Im letzten Schritt wird dann bei 72°C mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase ein neuer komplementärer DNA-Strang synthetisiert, wobei die Polymerase neue Triphosphat-Nukleotide an den Primer anfügt. Da auch die neu synthetisierte DNA im nächsten Zyklus als DNA-Matrize dient, kommt es beim Durchlaufen von 30-40 PCR-Zyklen zu einer exponentiellen Vervielfältigung der DNA [114].

Bei der qRT-PCR besteht zudem die Möglichkeit einer Quantifizierung des Ausgangs-RNA-Gehalts mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung in Echtzeit. Verwendet wurde dafür der fluoreszierende Farbstoff *SYBR-Green*, der in die doppelsträngige DNA interkaliert, was eine Steigerung der Fluoreszenz zur Folge hat. Dabei verhält sich die Fluoreszenzintensität proportional zur neugebildeten DNA [115].

Da der Farbstoff auch an unspezifische PCR-Nebenprodukte oder Primer-Dimere bindet, wird am Ende der PCR die Spezifität des Amplifikationsprodukts durch eine Dissoziationskurvenanalyse (Schmelzkurvenanalyse) überprüft [115]. Hierbei werden die DNA-Fragmentdoppelstränge durch eine langsame, kontinuierliche Temperaturerhöhung aufgeschmolzen, wobei die Temperatur, bei der die DNA denaturiert, von der Basensequenz abhängt [115]. Die Schmelztemperatur (T_m) ist definiert als die Temperatur, bei der die DNA zur Hälfte aufgeschmolzen ist. Liegen

nach Abschluss der PCR also neben der Ziel-DNA noch weitere DNA-Fragmente vor, ergeben sich in der Schmelzkurvenanalyse verschiedene Schmelztemperaturen [115]. Der verwendete *Power SYBR®Green PCR Master Mix* der Firma Applied Biosystems enthält *SYBR®Green I Dye*, die DNA-Polymerase *AmpliTaq Gold®*, dNTPs, eine passive Referenz und eine Pufferlösung. Die thermostabile DNA-Polymerase *AmpliTaq Gold®* ist bei Raumtemperatur inaktiv und wird erst bei hohen Temperaturen (95°C für 10 min) aktiviert. Diese Eigenschaft reduziert die Entstehung von unspezifischen Amplifikaten. Zudem wird gewährleistet, dass mehrere Zyklen hintereinander durchlaufen werden können, ohne dass die Polymerase in der Denaturierungsphase bei 95°C inaktiviert wird.

Zunächst wurde ein *Master Mix* bestehend aus H₂O, *SYBR Green Master Mix* sowie dem *forward* und dem *reverse* Primer hergestellt. Anschließend wurden zu je 17 µL des *Master Mix* 3 µL der entsprechenden cDNA-haltigen Probe hinzugefügt. Die Proben wurden im Doppelansatz auf eine 96-well Platte aufgetragen. Als Negativkontrollen dienten H₂O sowie Proben, die ohne die Reverse Transkriptase in die cDNA-Synthese eingesetzt wurden. Die Platte wurde dann mit einer Klebefolie sorgfältig verschlossen und kurz zentrifugiert. Hiernach erfolgte die DNA-Amplifikation im *PCR-Cycler*, wobei folgendes Temperaturprofil durchlaufen wurde.

50°C	2 min	} Hiervon 50 Zyklen
95°C	10 min	
95°C	15 s	
60°C	1 min	
95°C	1 min	
55°C	30 s	
95°C	20 s	

Tabelle 6: Thermoprofil für die quantitative *real-time*-PCR

Master Mix

6,6 µL H₂O + 10 µL 2x *SYBR Green* + 0,2 µL *forward* Primer (10 µmol/L) + 0,2 µL *reverse* Primer (10 µmol/L)

Die Aufbereitung der gemessenen Fluoreszenzwerte erfolgt automatisch durch das Mx3000P PCR-Softwareprogramm. Die Software ermittelt zunächst für jeden Zeitpunkt ein normiertes Reporter-Signal (R_n). Dieses ergibt sich aus der Emissionsintensität des Reporter-Farbstoffs *SYBR-Green* bezogen auf das Signal der Referenz, die im PCR-Puffer enthalten ist. Im nächsten Schritt wird die Differenz (ΔR_n) aus dem jeweiligen normierten Reporter-Signal und dem Hintergrundsignal gebildet. Durch Auftragung der ΔR_n -Werte gegen die Zyklusanzahl entsteht der Amplifikationsplot [115].

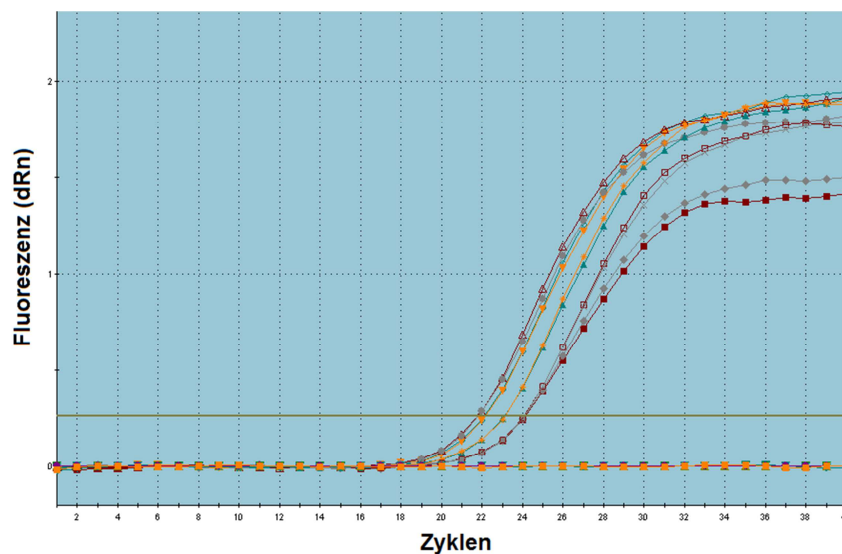


Abbildung 1: Beispielhafter Amplifikationsplot der Gene TrkA, NGF, HPRT, Furin, p75NTR und TGF- β in stimulierten VSMCs.

Zu Beginn der PCR ist die *Template*-Menge begrenzt, so dass das Fluoreszenzsignal kaum ansteigt. Erst ab einer bestimmten Anzahl an Zyklen erfolgt der Übergang in eine exponentielle Amplifikationsphase, in der sich bei einer angenommenen Effizienz von 100% die Zielsequenz mit jedem Zyklus verdoppelt. Im dritten Abschnitt der Amplifikation tritt eine Sättigung des Fluoreszenzsignals ein. Dabei kommt es aufgrund des starken Anstiegs der DNA-Menge immer häufiger zu einer Hybridisierung der Produktfragmente sowie zu einer Abnahme der Substratmenge und somit zu einer Hemmung der PCR. Der Anstieg über die *threshold line* markiert den Beginn der exponentiellen Amplifikation. Der Zyklus, bei dem es erstmalig zu einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz über die Hintergrundfluoreszenz kommt, wird als C_T -Wert

(*threshold cycle*) bezeichnet. Der C_T -Wert ist abhängig von der Anzahl der Startkopien in der jeweiligen Probe und dient zur Quantifizierung des PCR-Produkts [115].

Zur relativen Quantifizierung der Genexpression ist zudem die Normalisierung der Expression des Zielgens auf die Expression eines Referenzgens notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde das Gen für das Enzym Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) verwendet. HPRT wird als „*house-keeping gene*“ ubiquitär in allen Zellen exprimiert, da es für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion notwendig ist. Als konstitutiv exprimiertes Gen unterliegt es keiner Regulierung durch äußere oder innere Einflüsse [116, 117].

Die relative Quantifizierung erfolgte über die sogenannte $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Dabei wird die relative Expression des Zielgens in den Proben auf die relative Expression einer Kontrollprobe bezogen. Ausgehend von einer optimalen Effizienz der PCR, ergibt sich dabei folgende Rechnung [115]:

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen (HPRT)}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Probe} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

3.6 Statistik und Datenanalyse

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten erhoben. Die gezeigten Messdaten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die statistische Untersuchung erfolgte mit Hilfe einer Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und anschließendem *post-hoc* Test nach Bonferroni beziehungsweise beim Mittelwertsvergleich für zwei unabhängige Stichproben mittels Student's *t*-Test. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

Zur statistischen Auswertung und zur Erstellung der Balkendiagramme wurde das Programm *OriginPro 8.5* verwendet.

Die Densitometrie der *Western-Blots* wurde mit dem *National Institute of Health* Programm *ImageJ* durchgeführt, wobei die Darstellung in arbiträren Einheiten erfolgt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von atherogenen Wachstumsfaktoren auf die β -NGF-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen

Zur Untersuchung des Einflusses von atherogenen Wachstumsfaktoren auf die Regulation der β -NGF-Synthese in glatten Gefäßmuskelzellen wurden *in vitro* Experimente durchgeführt. Hierzu erfolgte die Anlage einer primären Zellkultur aus aortalen, glatten Gefäßmuskelzellen von Sprague-Dawley Ratten. Untersucht wurde die Wirkung der atherogenen Wachstumsfaktoren PDGF-BB und TGF- β 1 auf die β -NGF-Expression, da verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt haben, dass PDGF-BB und TGF- β 1 nach Ballon-Verletzung verstärkt exprimiert werden [22, 29].

Subkonfluente VSMCs (Zelldichte 75%) wurden mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -haltigem PBS gewaschen und in serumfreiem Medium für 24 h inkubiert, um ihr Wachstum zu synchronisieren. Nach einer Stimulation der Zellen mit 20 ng/mL PDGF-BB und 10 ng/mL TGF- β 1 für 2 h, 4 h, 8 h oder 24 h wurden die RNA bzw. Proteine aus den Zellen isoliert. Die im Anschluss durchgeführte qRT-PCR-Analyse ergab, dass die β -NGF-Genexpression nach zweistündiger Kostimulation mit den Wachstumsfaktoren auf das Sechsfache im Vergleich zur Kontrolle anstieg (Abb. 2A). Anschließend wurde der Einfluss von PDGF-BB und TGF- β 1 auf die Synthese von proNGF mittels SDS-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen untersucht. Dazu wurde ein spezifischer Antikörper eingesetzt, welcher an die C-terminale Region bindet und somit sowohl zum Nachweis von β -NGF mit einer Molekülmasse von 13 kDa, als auch von proNGF (26 kDa) verwendet werden kann. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung wurden die *Blots* mit einem Antikörper gegen das Zytoskelettprotein Aktin geblottet. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der qRT-PCR-Analyse zeigte sich auch im *Western-Blot* ein deutlicher zeitabhängiger Anstieg der proNGF-Expression nach Stimulation mit PDGF-BB und TGF- β 1 in den VSMCs, wobei der größte Anstieg der Proteinmenge nach 24 h detektiert wurde (Abb. 2B und C).

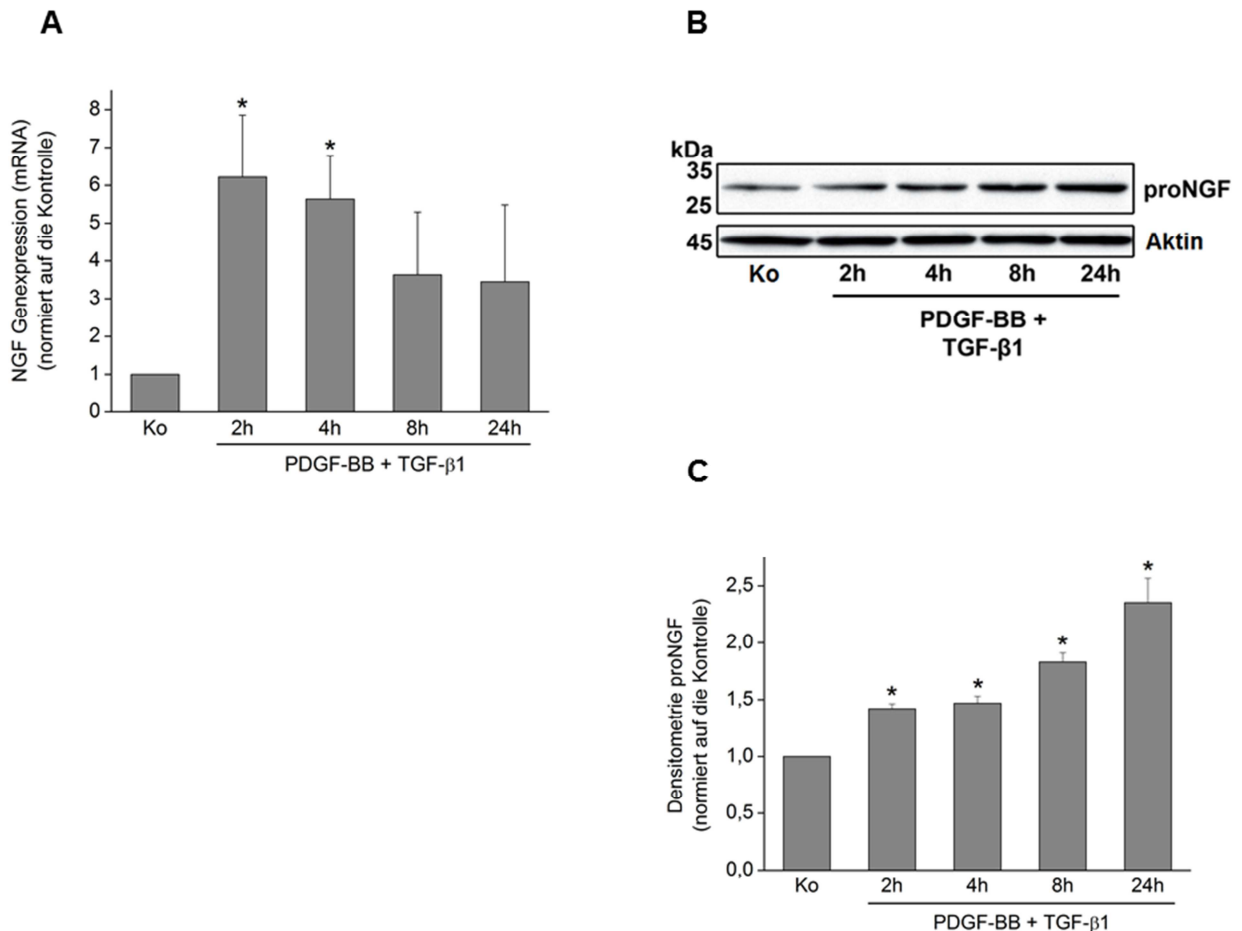


Abbildung 2: Einfluss von PDGF-BB und TGF- β 1 auf die mRNA- und Protein-Expression von NGF.

VSMCs wurden mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) für 2 h, 4 h, 8 h oder 24 h stimuliert. **(A)** zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR. Hierbei war ein Anstieg der NGF-mRNA-Expression nach Stimulation mit den Wachstumsfaktoren PDGF-BB und TGF- β 1 mit einem Maximum nach 2 h nachweisbar. **(B)** zeigt einen repräsentativen *Western Blot* unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen proNGF. Die *Western-Blot*-Analyse demonstriert einen Anstieg der proNGF-Proteinmenge nach Stimulation der VSMCs mit PDGF-BB und TGF- β 1. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente das Zytoskelettprotein Aktin. **(C)** zeigt die densitometrische Auswertung der proNGF-Proteinexpression aus drei unabhängigen *Western-Blot*-Experimenten.

Daten werden gezeigt als Mittelwert \pm SD, n = 3 unabhängige Experimente, * p-Wert < 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle, Ko = Kontrolle.

4.2 Einfluss von PDGF-BB und TGF- β 1 auf die Expression und Aktivität der Proprotein-Convertase Furin in glatten Gefäßmuskelzellen

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung einer Kostimulation mit PDGF-BB und TGF- β 1 auf die Expression der Proprotein Convertase Furin in VSMCs untersucht. Dazu wurden erneut subkonfluente VSMCs gewaschen, anschließend für 24 h serumfrei synchronisiert und mit 20 ng/mL PDGF-BB und 10 ng/mL TGF- β 1 für 2 h, 4 h, 8 h oder 24 h stimuliert. Nach RNA- oder Protein-Extraktion wurden erneut qRT-PCR- bzw. Immunoblot-Analysen durchgeführt.

Im *Western-Blot* ließ sich ein signifikanter Anstieg von Furin nach Stimulation der VSMCs mit den Wachstumsfaktoren für 24 h nachweisen (Abb. 3A und B).

Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen ebenfalls einen zeitabhängigen Anstieg der Furin-mRNA in VSMCs nach Kostimulation mit PDGF-BB und TGF- β 1 im Vergleich zur Kontrolle, wobei das Maximum nach 4 h Stimulation zu verzeichnen war (Abb. 3C). Somit kam es nach Stimulation mit PDGF-BB und TGF- β 1 gleichzeitig zu einer erhöhten Expression von proNGF und der Proprotein Convertase Furin in VSMCs.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass die gleichzeitige Stimulation mit PDGF-BB und TGF- β 1 zu einer Steigerung der Expression von Furin in VSMCs führt, sollte nachfolgend untersucht werden, ob die Kostimulation mit PDGF-BB und TGF- β 1 auch einen Anstieg der Enzymaktivität von Furin zur Folge hat. Hierzu wurde die Spaltung des fluoreszenzmarkierten PC-Substrates Pyr-RTKR-AMC durch Furin gemessen. Wie in Abbildung 3D dargestellt, zeigte sich nach Stimulation von VSMCs mit 20 ng/mL PDGF-BB und 10 ng/mL TGF- β 1 eine Steigerung der Enzymaktivität von Furin auf mehr als das Doppelte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurden VSMCs mit dem spezifischen Furin-Inhibitor dec-CMK (100 μ mol/L) für 30 min vorinkubiert und nach anschließender Kostimulation mit den Wachstumsfaktoren (20 ng/mL PDGF-BB und 10 ng/mL TGF- β 1, 24 h) erneut die Furin-Aktivität gemessen. Durch die Vorinkubation mit dem pharmakologischen Inhibitor dec-CMK kam es zu einer signifikant verringerten Spaltung des Substrats Pyr-RTKR-AMC, was einer Hemmung der Enzymaktivität von Furin durch dec-CMK in den VSMCs im Vergleich zu kostimulierten VSMCs ohne Vorinkubation mit dec-CMK entspricht.

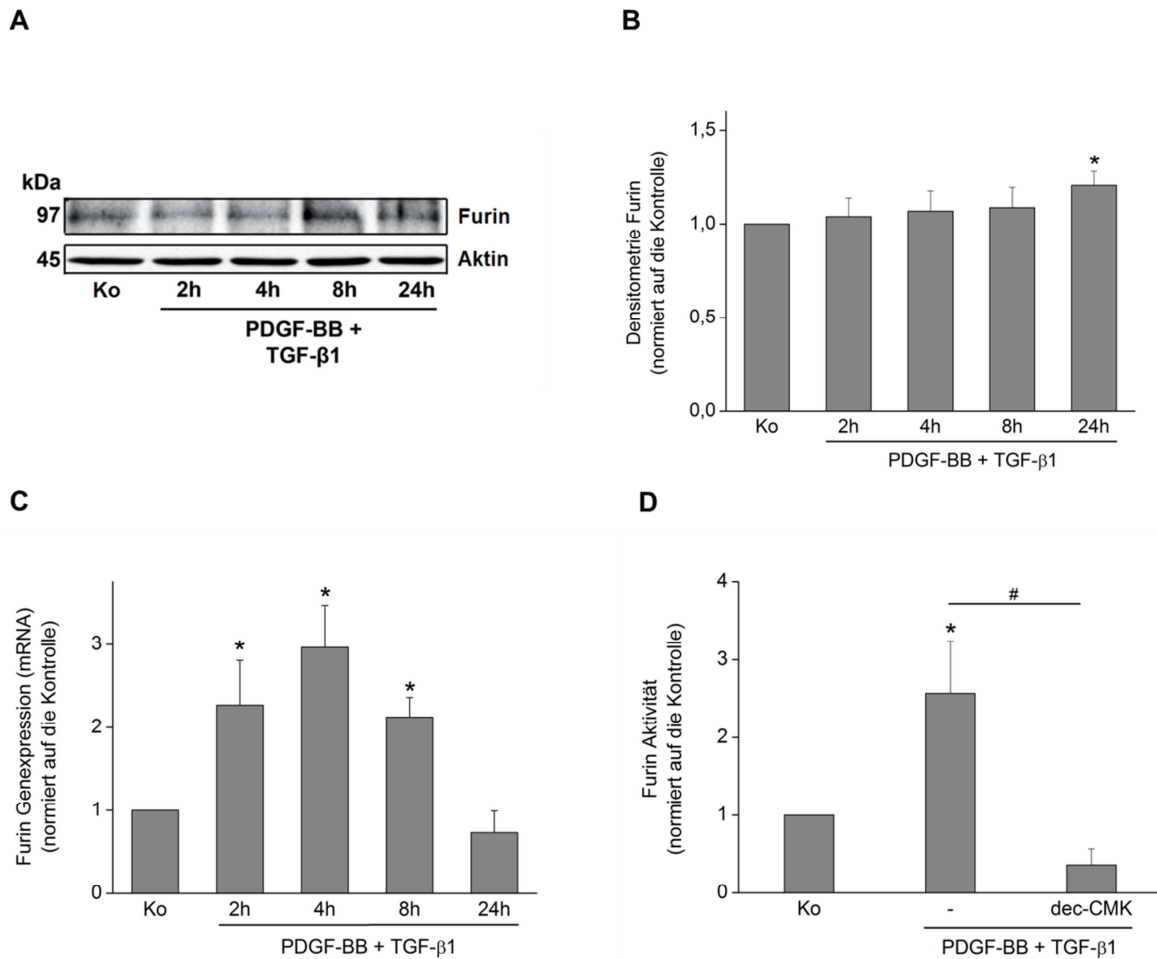


Abbildung 3: Einfluss von PDGF-BB und TGF- β 1 auf die Expression und Aktivität von Furin.

VSMCs wurden mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) für 2 h, 4 h, 8 h oder 24 h stimuliert. **(A)** zeigt einen repräsentativen *Western Blot* unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen Furin. Die *Western-Blot*-Analyse zeigt einen signifikanten Anstieg der Furin Proteinmenge nach Stimulation der VSMCs mit PDGF-BB und TGF- β 1 für 24 h. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente das Zytoskelettprotein Aktin. n = 4. **(B)** zeigt die zu dem exemplarischen *Western Blot* aus **(A)** korrespondierende densitometrische Auswertung der Furin-Proteinkonzentration aus vier unabhängigen *Western Blot* Experimenten. **(C)** zeigt einen Anstieg der Furin mRNA-Expression in der qRT-PCR-Analyse nach Kostimulation mit den Wachstumsfaktoren PDGF-BB und TGF- β 1 mit einem Maximum nach 4 h Stimulationszeit. n = 3. **(D)** zeigt, dass es nach der Stimulation der VSMCs mit PDGF-BB und TGF- β 1 zu einem signifikanten Anstieg der proteolytische Aktivität von *furin-like* PCs im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kommt. Gemessen wurde die

Enzymaktivität mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten PC-Substrats Pyr-RTKR-AMC. Die Vorinkubation der VSMCs mit dem spezifischen PC-Inhibitor dec-CMK (100 µmol/L, 30 min) vor Kostimulation führte zu einer signifikanten Hemmung der Enzymaktivität von Furin. n = 4.

Daten werden gezeigt als Mittelwert ± SD, * p-Wert < 0,05 vs. unbehandelte Kontrolle, # p-Wert < 0,05 vs. Stimulation mit PDGF-BB/TGF-β1, Ko = Kontrolle.

4.3 Die Bedeutung von Furin für die Aktivierung von proNGF zu β -NGF

Die post-translatorische Aktivierung des Proproteins proNGF zu β -NGF im TGN erfolgt durch Abspaltung der Pro-Region am N-terminalen Ende durch PCs [77]. Um die Bedeutung von Furin für die endoproteolytische Aktivierung von proNGF zu β -NGF näher zu bestimmen, wurde die Wirkung von rekombinantem Furin auf rekombinantes proNGF mittels *Western-Blot*-Experimenten untersucht. Abbildung 4A zeigt rekombinantes proNGF mit einer Molekülmasse von 26 kDa (links) und rekombinantes β -NGF mit einer Molekülmasse von 13 kDa (rechts) im *Western Blot*. Durch die Bindung des spezifischen Antikörpers an die identische C-terminale Region der Proteine wird sowohl proNGF als auch das biologisch aktive β -NGF detektiert.

Der repräsentative *Western-Blot* in Abbildung 4B zeigt, dass die Inkubation von *wild-type* proNGF (proNGF wt) mit Furin zur Synthese von aktivem NGF führt. Dies wird im *Western Blot* am Abfall der proNGF Proteinmenge mit einer Molekülmasse von 26 kDa und dem gleichzeitigen Anstieg der β -NGF zugehörigen Bande bei 13 kDa ersichtlich. Durch Vorinkubation von proNGF mit dem Furin-Inhibitor dec-CMK konnte die Prozessierung von proNGF zu β -NGF durch Inhibition der Furin-Aktivität gehemmt werden (Abb. 4B, links).

Bei der Verwendung von Furin-resistentem, mutiertem proNGF (proNGF mt; K-R¹⁰⁶ \rightarrow A-A¹⁰⁶) konnte nach Inkubation mit Furin keine Synthese von β -NGF nachgewiesen werden (Abb. 4B, rechts).

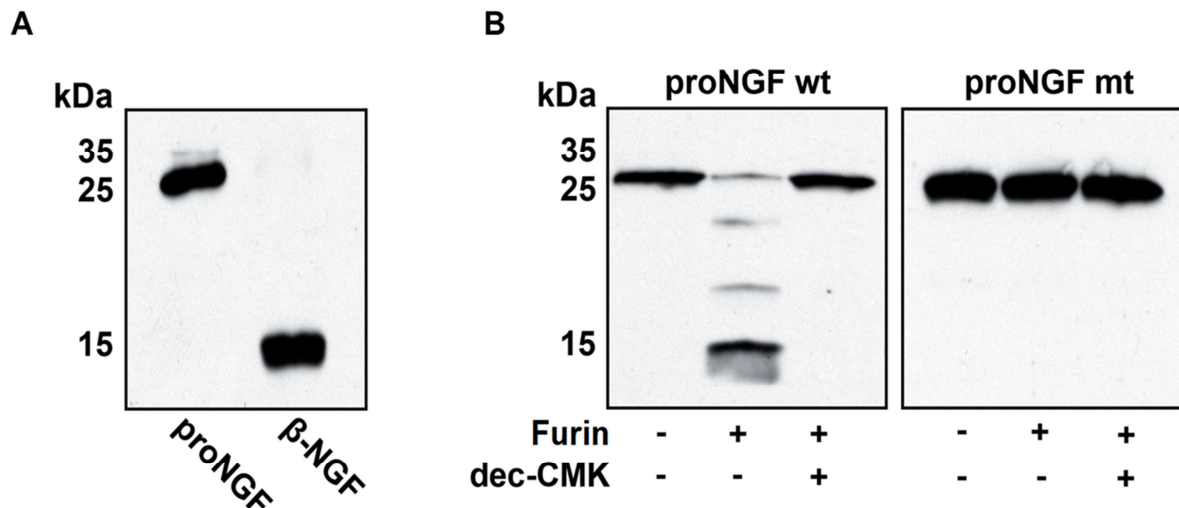


Abbildung 4: Furin führt zu einer Aktivierung von proNGF zu β -NGF.

(A) Der repräsentative *Western-Blot* zeigt rekombinantes proNGF bei 26 kDa und β -NGF bei 13 kDa unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-Gelelektrophorese. Der hier verwendete NGF-Antikörper bindet an die C-terminale Region und dedektiert so proNGF (links) und β -NGF (rechts). n = 3. **(B)** Der repräsentative *Western-Blot* demonstriert, dass die Inkubation von rekombinatem *wild-type* proNGF (proNGF wt) (26 kDa) mit Furin zu einer Aktivierung von proNGF zu β -NGF (13 kDa) führt. Bei der gleichzeitigen Inkubation von proNGF mit Furin und dessen Inhibitor dec-CMK kam es zu keiner Spaltung von proNGF. Die Inkubation von Furin-resistentem, mutantem proNGF (proNGF mt, K-R¹⁰⁶ \rightarrow A-A¹⁰⁶) mit Furin führte zu keiner Aktivierung von proNGF zu NGF. proNGF wt n = 4; proNGF mt n = 1.

Anschließend wurde die β -NGF-Sekretion von VSMCs durch Bestimmung der β -NGF-Konzentration im Überstand von mit PDGF-BB und TGF- β 1 kostimulierten VSMCs mit Hilfe eines β -NGF-ELISAs quantifiziert. Dazu wurden subkonfluente VSMCs gewaschen und nach Wachstumssynchronisation für 24 h in serumfreiem Medium für 24 h mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) stimuliert. Danach wurde aus den Überständen die β -NGF-Konzentration ermittelt. Eine 24-stündige Inkubationszeit wurde gewählt, da in Zusammenschau der erhobenen Ergebnisse (siehe Abbildung 2C) bei dieser Stimulationszeit der größte Anstieg der NGF-Konzentration zu erwarten war. Entsprechend den vorherigen Ergebnissen kam es zu einem signifikanten Anstieg der β -NGF-Konzentration im Überstand nach Stimulation der VSMCs mit PDGF-BB und TGF- β 1. Die Vorinkubation der VSMCs mit dec-CMK (100 μ mol/L, 30 min) führte zu einer signifikanten Reduktion der β -NGF-Sekretion von VSMCs im Vergleich zur Sekretion nach Stimulation mit PDGF-BB und TGF- β 1 (Abb. 5A).

In einem weiteren Schritt wurde mit Hilfe eines proNGF-ELISAs die Konzentration von proNGF im Überstand der VSMCs nach ebenfalls 24-stündiger Stimulation bestimmt. Wie Abbildung 5B zeigt, ergab sich hier eine basale Sekretion von proNGF in unstimulierten VSMCs von 4,85 pg/mL \pm 0,2 pg/mL. Die Stimulation mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) für 24 h führte zu einer signifikanten Reduktion der Sekretion von proNGF. Nach Inhibition der Furin-Aktivität durch Präinkubation mit dec-CMK (100 μ mol/L, 30 min) ergab sich eine mit in unbehandelten VSMCs vergleichbare proNGF-Sekretion der VSMCs.

Die Kostimulation mit den Wachstumsfaktoren PDGF-BB und TGF- β 1 führt somit zu einer Reduktion der proNGF-Sekretion in VSMCs bei gleichzeitiger Steigerung der β -NGF-Sekretion. Gleichzeitig hat die Inhibition von Furin eine Steigerung der proNGF-Sekretion und eine Reduktion der β -NGF-Sekretion der VSMCs zur Folge. Diese Befunde unterstützen die Hypothese einer gesteigerten Aktivierung von proNGF zu β -NGF in VSMCs durch Furin.

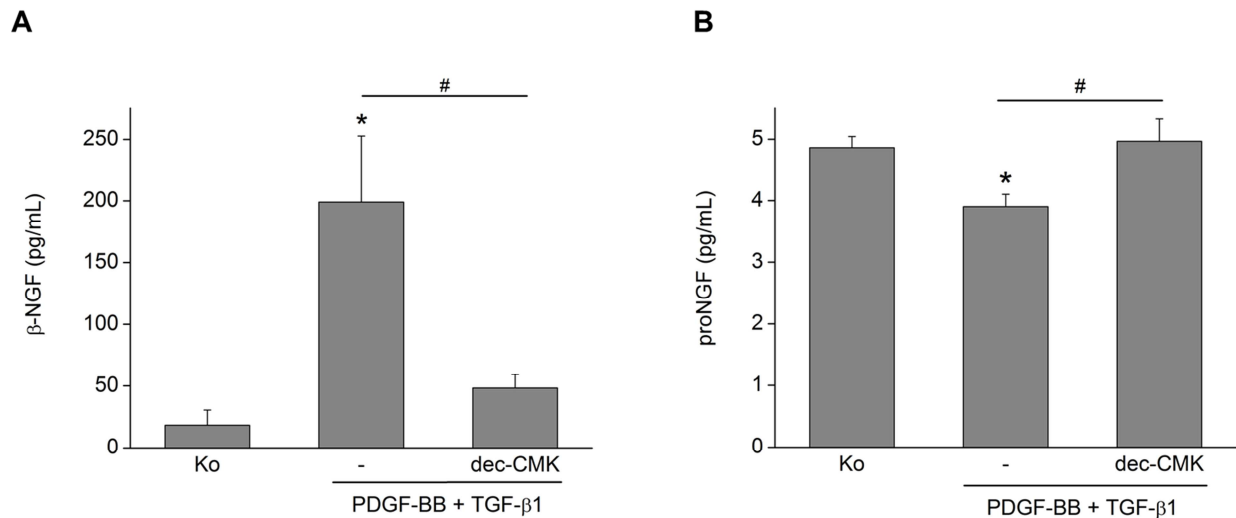


Abbildung 5: Furin-Inhibition führt zu einer gesteigerten Sekretion von proNGF bei gleichzeitiger Reduktion der β -NGF-Sekretion in proliferierenden VSMCs.

(A) VSMCs wurden für 24 h mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) stimuliert. Die β -NGF-Konzentration in den gesammelten Überständen wurde mithilfe eines β -NGF-ELISA ermittelt. Es zeigte sich eine Erhöhung der β -NGF-Konzentration in den Überständen nach Stimulation mit den Wachstumsfaktoren PDGF-BB und TGF- β 1. Durch die Vorinkubation der Zellen mit dem PC-Inhibitor dec-CMK (100 μ mol/L, 30 min) wurde die β -NGF Konzentration im Überstand im Vergleich zur β -NGF Konzentration nach Kostimulation signifikant gehemmt. $n > 3$. **(B)** Die Ergebnisse des proNGF-ELISAs zeigen, dass die Kostimulation mit den Wachstumsfaktoren (20 ng/mL PDGF-BB und 10 ng/mL TGF- β 1) für 24 h zu einer signifikanten Reduktion der proNGF-Konzentration im Überstand im Vergleich zur Kontrolle führt. Nach Präinkubation der Zellen mit dec-CMK (100 μ mol/L, 30 min) ergab sich eine mit der Kontrolle vergleichbare proNGF-Sekretion der VSMCs. $n = 3$.

Daten werden gezeigt als Mittelwert \pm SD, * p-Wert < 0,05 vs. Kontrolle, # p-Wert < 0,05 vs. Stimulation mit PDGF-BB/TGF- β 1, Ko = Kontrolle.

4.4 Regulation der Neurotrophin-Rezeptor-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen

NGF bindet mit hoher Affinität an den Neurotrophin-Rezeptor TrkA und fördert über diese Liganden-Rezeptorbindung Zellviabilität und Zellwachstum. Im Gegensatz dazu bindet proNGF mit hoher Affinität an einen Rezeptorkomplex bestehend aus dem p75NTR und Sortilin und induziert so Apoptose in neuronalen Zellen [80, 101].

In den nachfolgend dargestellten Experimenten untersuchten wir die Wirkung von PDGF-BB und TGF- β 1 auf die Expression der Neurotrophin-Rezeptoren in glatten Gefäßmuskelzellen. Nach Synchronisation subkonfluenten VSMCs für 24 h in serumfreiem Medium wurden die Zellen 4 h mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Isolation der RNA. Mittels qRT-PCR wurde zunächst die Genexpression des TrkA-Rezeptors in VSMCs untersucht. Wie Abbildung 6A zeigt, kam es in den stimulierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einem signifikanten Anstieg der TrkA-Genexpression. Gleichzeitig kam es zu einer signifikanten Abnahme der Sortilin-Genexpression in den mit PDGF-BB/TGF- β 1 stimulierten Zellen (Abb. 6B). Somit führt die Stimulation von VSMCs mit PDGF-BB und TGF- β 1 zu einer signifikanten Expressionssteigerung des NGF-Rezeptors TrkA bei gleichzeitiger Abnahme der Expression des proNGF-Rezeptors Sortilin.

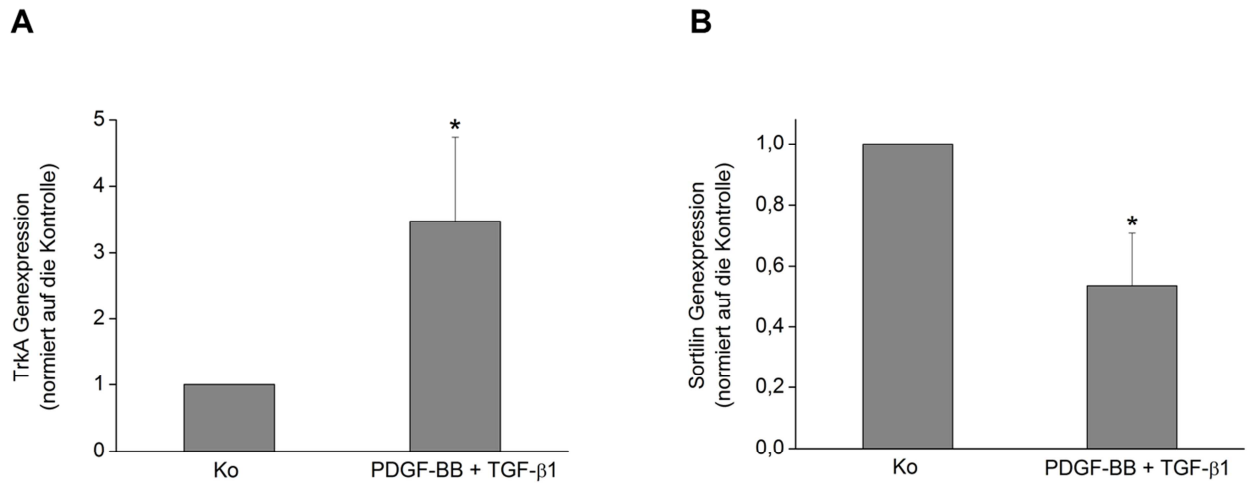


Abbildung 6: Einfluss von PDGF-BB und TGF-β1 auf die Expression von Neurotrophin-Rezeptoren in VSMCs.

VSMCs wurden mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF-β1 (10 ng/mL) für 4 h stimuliert. **(A)** Die qRT-PCR Analyse zeigt eine Steigerung der Genexpression des NT-Rezeptors TrkA in den VSMCs nach Stimulation. **(B)** zeigt, dass die Stimulation der VSMCs mit den Wachstumsfaktoren gleichzeitig eine signifikante Verminderung der Genexpression des NT-Rezeptors Sortilin zur Folge hat. Daten werden gezeigt als Mittelwert ± SD, n = 3 unabhängige Experimente, *p-Wert < 0,05 vs. Kontrolle, Ko = Kontrolle.

4.5 Einfluss von β -NGF und proNGF auf die Zellproliferation und Apoptose

Um die Wirkung von proNGF und NGF auf die Zellfunktion von glatten Gefäßmuskelzellen zu bestimmen, untersuchten wir die Auswirkung von rekombinantem β -NGF und proNGF auf die Zellproliferation von kultivierten VSMCs.

Hierzu wurden subkonfluente VSMCs für 24 h in serumfreiem Nährmedium synchronisiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit rekombinantem β -NGF oder proNGF (jeweils 1 ng/mL und 100 ng/mL) stimuliert. Die Proliferation wurde mit Hilfe eines BrdU-Immunoassays, bei dem der Einbau von BrdU in neu synthetisierte DNA photometrisch ermittelt wird, gemessen. Abbildung 7 zeigt, dass weder eine Stimulation der VSMCs mit rekombinantem β -NGF noch mit proNGF zu einer signifikanten DNA-Synthesesteigerung – als Maß für die Zellproliferation – führte. Als Positivkontrolle dienten Ansätze mit einem Nährmedium mit 10% FKS. In diesen Ansätzen konnte eine signifikante Steigerung der DNA-Neusynthese nachgewiesen werden.

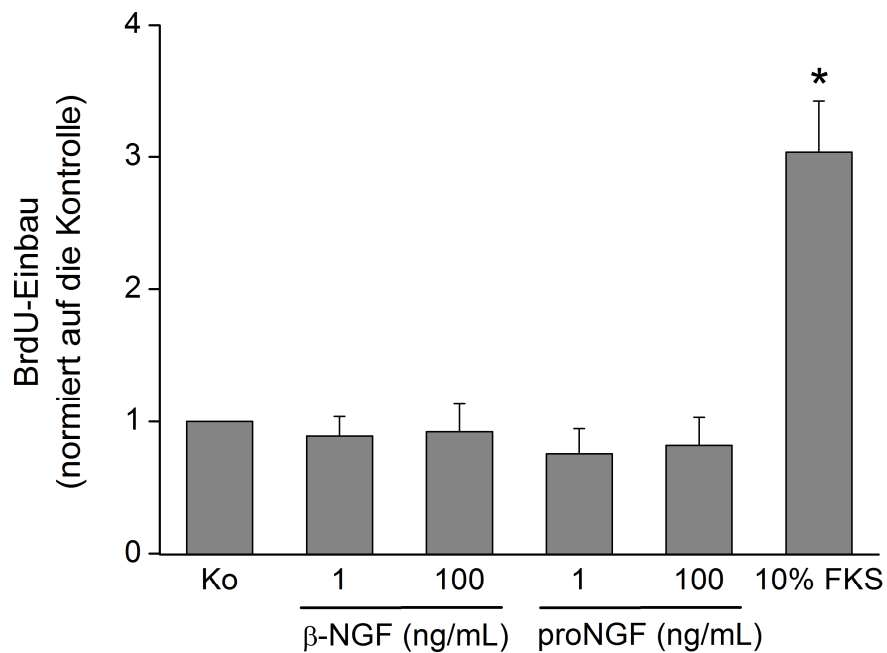


Abbildung 7: Einfluss von β -NGF und proNGF auf die Proliferation von VSMCs.

VSMCs wurden für 24 h mit rekombinantem β -NGF oder proNGF inkubiert (jeweils 1 ng/mL und 100 ng/mL). Die Quantifizierung der Proliferation erfolgte mit Hilfe eines BrdU-ELISAs. Das Versuchsprinzip beruht auf dem Einbau von BrdU während der DNA-Neusynthese, welcher anschließend photometrisch gemessen wird. Die Inkubation von VSMCs in 10%-FKS-Nährmedium (10% FKS) diene als Positivkontrolle. Abbildung 7 zeigt, dass weder die Stimulation mit rekombinantem β -NGF noch mit proNGF einen signifikanten Einfluss auf die DNA-Neusynthese und somit auf die Proliferation der VSMCs hatte. Daten werden gezeigt als Mittelwert \pm SD, n = 4 unabhängige Experimente, *p-Wert < 0,05 vs. Kontrolle, Ko = Kontrolle.

Nachdem gezeigt wurde, dass proNGF und β -NGF in VSMCs keine Steigerung der Proliferation induzieren, sollte der Einfluss von proNGF und β -NGF auf die Zellapoptose untersucht werden. Dazu wurde mit einem ELISA die Caspase 3/7-Aktivität in den VSMCs bestimmt. Caspasen sind Cystein-abhängige, Aspartat-spezifische Proteasen, die in ihrer aktiven Form in apoptotischen Zellen nachweisbar sind und eine zentrale Rolle im Prozess der Apoptose spielen [112]. Die Aktivierung einzelner Proteasen dieser Familie führt zu einer Kaskade, in deren Verlauf weitere Caspasen aktiviert werden. Aktive Effektorcaspasen, wie die Caspasen 3/7, führen dann zu einer Fragmentierung von intrazellulären Proteinen und zur Aktivierung spezieller Nukleasen, die die nukleäre DNA spalten, wodurch es zum apoptotischen Tod der Zelle kommt [112].

VSMCs wurden in Nährmedium mit 10% FKS für 48 h inkubiert und anschließend, je nach Versuch, mit β -NGF oder proNGF (1 ng/mL oder 100 ng/mL) für 24 h stimuliert. Die Quantifizierung der Caspase 3/7-Aktivität diente als Indikator für die Apoptoserate in den Zellen. Abbildung 8 zeigt, dass die Inkubation der glatten Gefäßmuskelzellen mit proNGF für 24 h zu einem signifikanten Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität führte. Die Stimulation mit β -NGF (1 oder 100 ng/mL) hatte hingegen keinen Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität in den VSMCs zur Folge. Als Positivkontrolle wurden Zellen für 4 h mit 4 μ mol/l Staurosporin inkubiert. Bei Staurosporin handelt es sich um einen Breitspektrum-Proteinkinase-Inhibitor, der Apoptose induziert [118].

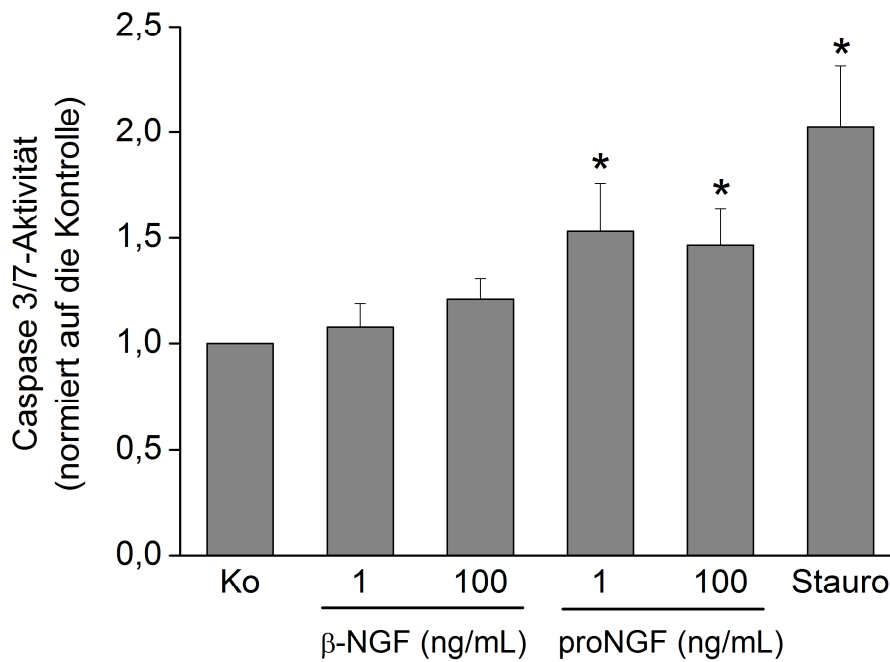


Abbildung 8: Einfluss von proNGF und β -NGF auf die Apoptose in VSMCs.

Die Inkubation von VSMCs mit rekombinalem proNGF (1 ng/mL oder 100 ng/mL für 24 h) führte zu einem signifikanten Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität in den VSMCs. Hingegen führte die Stimulation mit rekombinalem β -NGF (1 ng/mL oder 100 ng/mL für 24 h) zu keinem signifikantem Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität in den glatten Gefäßmuskelzellen. Die Inkubation von VSMCs mit Staurosporin (Stauro, 1 μ mol/L, 4 h) diente als Positivkontrolle. Daten werden gezeigt als Mittelwert \pm SD, n = 3 unabhängige Experimente, *p-Wert < 0,05 vs. Kontrolle, Ko = Kontrolle.

4.6 Einfluss der Furin-abhängigen Synthese von β -NGF auf die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen

Die Migration von VSMCs aus der Media in die Intima unter dem Einfluss chemotaktisch wirkender Moleküle ist ein entscheidender Prozess während der Entstehung und Progression atherosklerotischer und restenotischer Läsionen [6]. Daher untersuchten wir mit Hilfe von Checkerbox-Experimenten die chemotaktische Wirkung von NGF und proNGF auf glatte Gefäßmuskelzellen. Hierzu wurden zunächst 500.000 Zellen in serumfreiem Nährmedium in die obere Kammer einer Boyden-Kammer ausgesetzt. Es wurde ein Konzentrationsgefälle erzeugt, indem rekombinantes β -NGF beziehungsweise proNGF (je 100 ng/mL) in die untere Kammer gegeben wurde, während die Zellen – gelöst in serumfreiem Medium – in die obere Kammer gesetzt wurden. Durch die alleinige Zugabe von β -NGF bzw. proNGF zu den glatten Gefäßmuskelzellen in die obere Kammer ließ sich das Vorkommen einer chemokinetischen Zellmotilität untersuchen. Zur Kontrolle wurde serumfreies Zellmedium in beide Kammern gegeben, um eine ungerichtete Eigenbewegung der VSMCs auszuschließen. In weiteren Ansätzen wurden β -NGF und proNGF in beide Kammern in gleicher Konzentration gegeben, womit ebenfalls eine ungerichtete Eigenbewegung der VSMCs untersucht wurde. Als Positivkontrolle diente die Zugabe von Nährmedium mit 10% FKS in die untere Kammer. Nach einer Migrationszeit von 4 h bei 37°C und 5% CO₂ durch den mit Gelatine beschichteten Migrationsfilter mit einer Porengröße von 8 μ m wurden die migrierten Zellen fixiert und angefärbt. Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der Zellen pro Haupt Gesichtsfeld, wobei immer mindestens drei HPF je Filter ausgezählt wurden.

Hierbei zeigte sich, dass die Herstellung eines β -NGF-Konzentrationsgradienten durch Zugabe von β -NGF in die untere Kammer zu einer signifikanten Steigerung der Zellmigration der VSMCs führte. Wurde β -NGF dagegen nur in die obere Kammer gegeben, kam es zu keiner Migration der Zellen, so dass eine β -NGF-induzierte chemokinetische Zellmotilität ausgeschlossen werden kann. Auch die Zugabe von β -NGF in beide Kammern sowie die Zugabe von serumfreiem Medium in beide Kammern führten zu keiner Migration der Zellen, sodass eine ungerichtete Eigenbewegung als Ursache für die gemessene Zellmigration vernachlässigt werden kann. Die Herstellung eines proNGF-Konzentrationsgradienten durch Hinzugabe von rekombinantem proNGF

in die untere Kammer führte hingegen zu keiner Steigerung der VSMC-Migration (Tab. 7).

Die Ergebnisse der *Checkerbox*-Experimente demonstrieren eine chemotaktische Wirkung von rekombinantem β -NGF, nicht aber von proNGF, auf VSMCs.

Obere Kammer	Untere Kammer	Zellen/HPF
-	-	47 ± 5
-	FKS	105 ± 24 *
-	β-NGF	85 ± 5 *
β-NGF	-	50 ± 5
β-NGF	β-NGF	52 ± 5
-	proNGF	53 ± 18
proNGF	-	53 ± 11
proNGF	proNGF	55 ± 14

Tabelle 7: Ergebnisse der Checkbox-Experimente zur Untersuchung der chemotaktischen Wirkung von proNGF und β-NGF auf VSMCs.

Die Zellen wurden in die obere Kammer einer Boyden-Kammer gesetzt, 10% FKS, proNGF oder β-NGF (je 100 ng/mL) wurden in keines, nur das obere, nur das untere oder in beide Kompartimente hinzugegeben. Nach einer Migrationszeit von 4 h bei 37°C und 5% CO₂ wurden die migrierten Zellen fixiert, gefärbt und als Zellen pro HPF ausgezählt, wobei je Filter 3 HPF ausgezählt wurden. Dabei zeigte sich eine β-NGF-induzierte Steigerung der Migration von VSMCs, während proNGF zu keiner Migrationssteigerung führte. Eine ungerichtete Zellbewegung oder eine chemokinetische Wirkung von proNGF oder β-NGF konnte ausgeschlossen werden. Daten werden gezeigt als Mittelwert ± SD, n = 4, *p-Wert < 0,05 vs. Kontrolle.

Im Folgenden wurde die chemotaktische Wirkung von β -NGF in unterschiedlichen Konzentrationen im Migrationsversuch untersucht. Hierzu wurde NGF in den Konzentrationen 0,1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL und 100 ng/mL in die untere Kammer der Boyden-Kammer gegeben und die Zellmigration durch den Migrationsfilter nach 4 h gemessen. Wie Abbildung 9A zeigt, induziert β -NGF die Zellmigration der VSMCs konzentrationsabhängig.

Anschließend untersuchten wir, ob die Furin-abhängige Sekretion von β -NGF eine autokrine Wirkung hat. Subkonfluente VSMCs wurden nach Wachstumssynchronisation in serumfreiem Medium für 24 h mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF β 1 (10 ng/mL) stimuliert. Anschließend wurden die Überstände (*conditioned medium*, CM) gesammelt. Das CM wurde für einen weiteren Migrationsversuch in die untere Kammer gegeben. Hierbei zeigte sich, dass der Einsatz der Überstände im Migrationsversuch ebenfalls eine Steigerung der VSMC-Migration zur Folge hatte. Die durch das CM ausgelöste Steigerung der Migration der VSMCs war vergleichbar mit der durch rekombinantes β -NGF induzierten Migrationssteigerung (Abb. 9B). Des Weiteren wurden subkonfluente VSMCs mit 100 μ mol/L dec-CMK für 30 min präinkubiert, um die Furin-Aktivität zu inhibieren. Anschließend wurden die Zellen mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) für 24 h stimuliert. Auch hier wurden nach Ablauf der Stimulationszeit die Überstände gesammelt und im Migrationsversuch eingesetzt (CM + dec-CMK). Der Einsatz dieser Überstände mit vorheriger Inhibition von Furin hatte keine Steigerung der Migrationsrate zur Folge (Abb. 9B). Dies zeigt, dass die Migration der VSMCs von einer Furin-induzierten Aktivierung von proNGF zu β -NGF abhängig ist. In einem weiteren Versuch wurde die Migration von VSMCs untersucht, die zuvor mit dem TrkA-Inhibitor K252a inkubiert wurden (200 nmol; 30 min). Diese Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion der durch β -NGF und CM induzierten Zellmigration (Abb. 9B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die NGF-vermittelte VSMC-Zellmigration durch die Bindung von NGF an den hoch-affinen NT-Rezeptor TrkA induziert wird.

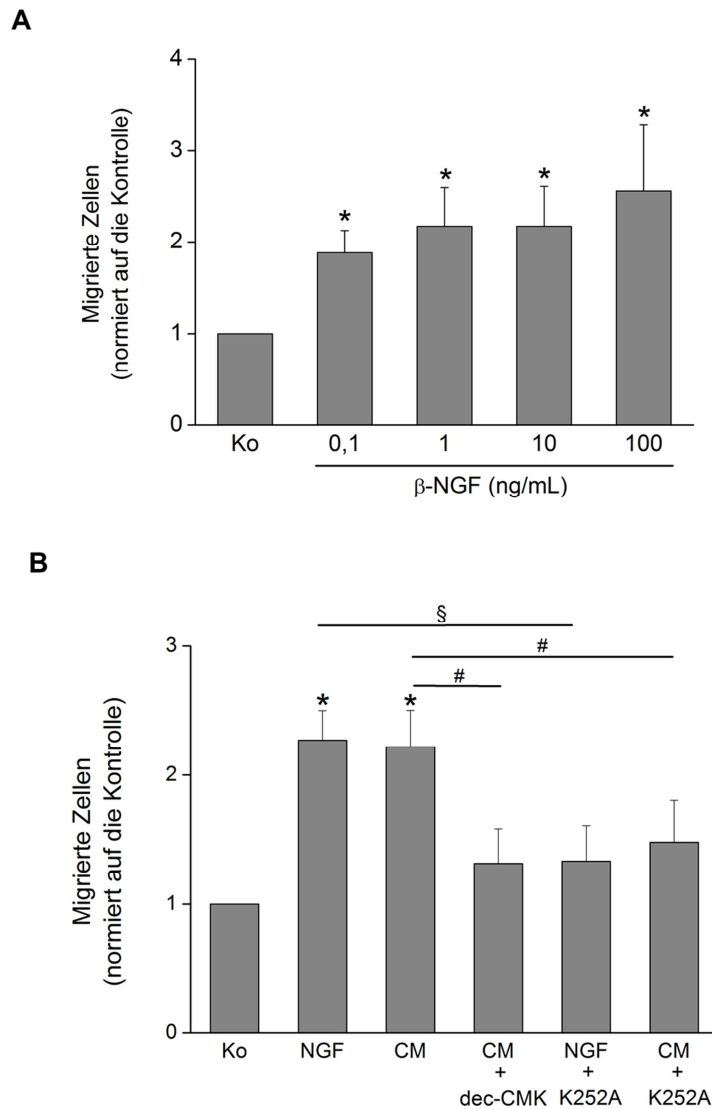


Abbildung 9: Einfluss der Furin-abhängigen β -NGF-Sekretion auf die Migration von VSMCs.

(A) zeigt die Migration von VSMCs bei verschiedenen Konzentrationen von rekombinatem β -NGF (0,1 ng/mL, 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL; Migrationszeit 4 h). Die Migrationsexperimente zeigen eine β -NGF-induzierte, konzentrationsabhängige Steigerung der VSMC-Migration. Daten werden gezeigt als Mittelwert \pm SD, $n = 4$ mit Auszählung von je 4 HPF, * p-Wert $< 0,05$ vs. Kontrolle. **(B)** VSMCs wurden mit PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) für 24 h stimuliert und die Überstände anschließend gesammelt (*conditioned medium*, CM). Die Verwendung von CM führte zu einer Steigerung der Migration der VSMCs – vergleichbar mit der durch rekombinantes β -NGF (100 ng/mL) induzierten Migration. Zudem wurden VSMCs vor Stimulation mit

PDGF-BB (20 ng/mL) und TGF- β 1 (10 ng/mL) mit dec-CMK (100 μ mol/L, 30 min) präinkubiert und erneut die Überstände gesammelt (CM + dec-CMK). Der Einsatz dieser Überstände im Migrationsversuch führte zu einer signifikanten Reduktion der VSMC-Migration im Vergleich zu der durch CM induzierten Migration. Eine Präinkubation der VSMCs mit dem TrkA-Inhibitor K252a (200 nmol/L, 30 min) vor der Migration führte ebenfalls zu einer Reduktion der durch rekombinantes β -NGF und CM induzierten Zellmigration.

Daten werden gezeigt als Mittelwert \pm SD, n = 4 mit Auszählung von je 3 HPF, * p-Wert < 0,05 vs. Kontrolle, § p-Wert < 0,05 vs. Stimulation mit 100 ng/mL β -NGF, # p-Wert < 0,05 vs. CM, Ko = Kontrolle.

4.7 β -NGF induziert die Formation von *focal adhesion sites*

Zur Untersuchung der Mechanismen der NGF-induzierten Zellmigration wurde in Immunfluoreszenz-Experimenten die Anordnung des Zytoskeletts und die Phosphorylierung des Integrin-assoziierten Adapterproteins Paxillin untersucht. Dazu wurden Immunfluoreszenzkammern über Nacht mit Gelatine beschichtet und 10.000 VSMCs je Kammer ausgesetzt. Nach der Synchronisation der Zellen für 24 h wurden die VSMCs mit 100 ng/mL β -NGF 4 h inkubiert und anschließend fixiert. Unter Verwendung eines spezifischen Immunfluoreszenz-Antikörpers wurde das Zytoskelett-Protein Aktin und mittels eines phosphospezifischen Antikörpers die Phosphorylierung des Integrin-assoziierten Adapterproteins Paxillin untersucht. Wie Abbildung 10A und D zeigen, führte die Stimulation mit β -NGF zu einer vermehrten Polymerisation von F-Aktin unter Ausbildung von *stress-fibers* und somit zu einem *rearrangement* des Zytoskeletts. Gleichzeitig kam es zu einer Zunahme der Phosphorylierung von Paxillin (Tyr¹¹⁸) in den fokalen Adhäsionsregionen (Abb. 10B und E).

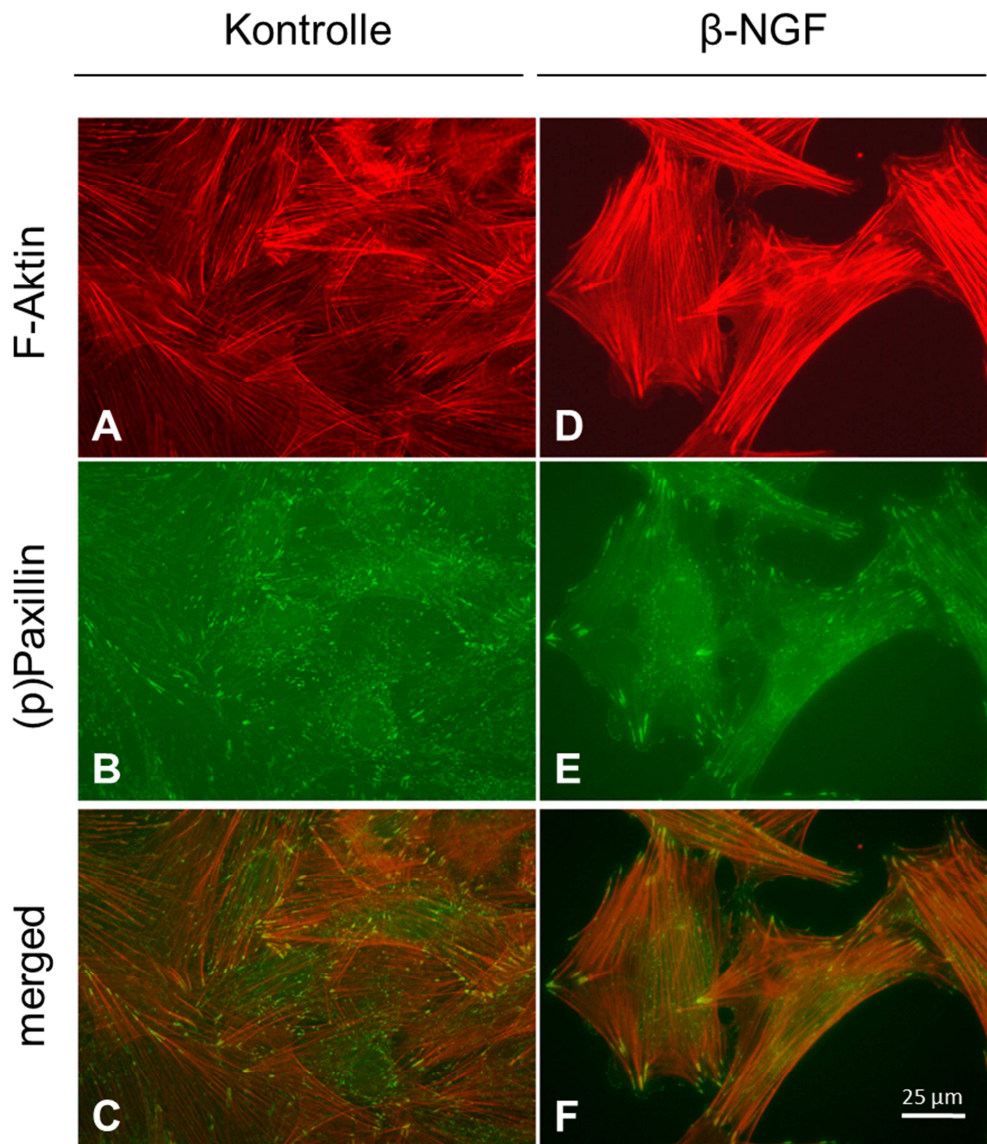


Abbildung 10: NGF induziert die Ausbildung von *focal adhesion sites*.

(A+D) Die Experimente mit dem Aktin-Immunfluoreszenz-Antikörper Phalloidin zeigen, dass die Stimulation von VSMCs mit rekombinatem β -NGF (100 ng/mL, 4 h) eine Neuordnung von F-Aktin induziert. **(A)** zeigt die Verteilung von F-Aktin in unstimulierten VSMCs. **(D)** zeigt die Anordnung von F-Aktin nach der Stimulation der VSMCs mit β -NGF. **(B+E)** zeigen eine gesteigerte Phosphorylierung des Adapterproteins Paxillin in den fokalen Adhäsionsregionen (*focal adhesion sites*) nach Stimulation von VSMCs mit rekombinatem β -NGF (100 ng/mL, 4 h) unter Verwendung des spezifischen Antikörpers gegen phosphoryliertes Paxillin. In **(C)** ist die Überlagerung von A+B und in **(F)** die Überlagerung von D+E dargestellt. Messbalken = 25 μ m, n = 3.

4.8 β -NGF-Rezeptorsignaling aktiviert Akt-, ERK1/2- und Paxillin-Signaltransduktionswege

Nachfolgend sollten die Signaltransduktionswege der β -NGF-vermittelten Zellmigration näher analysiert werden. Dazu untersuchten wir zunächst, ob es nach Stimulation mit β -NGF zu einer Aktivierung von Signalmolekülen kommt, die bekanntermaßen am Integrin-*signaling* beteiligt sind. Die Aktivierung dieser Signalmoleküle erfolgt über eine Phosphorylierung, so dass wir spezifische Antikörper verwendeten, die selektiv gegen phosphorylierte Moleküle gerichtet sind.

Das Wachstum subkonfluenten VSMCs wurde für 24 h in serumfreiem Medium synchronisiert. Danach wurden die Zellen mit rekombinantem β -NGF (1 ng/mL oder 100 ng/mL) für 15 min oder 30 min stimuliert. Nach der Proteinisolation erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese. Die Ergebnisse der *Western-Blot*-Experimente sind in Abbildung 11 exemplarisch dargestellt. Es zeigte sich, dass es in Folge einer Stimulation mit β -NGF zu einer Phosphorylierung von Akt (Ser⁴⁷³), ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), und Paxillin (Tyr¹¹⁸) kam. Die Phosphorylierung von Paxillin wurde erst nach 30 min Inkubationszeit sichtbar. Im Gegensatz dazu kam es durch Stimulation der VSMCs mit β -NGF zu keiner gesteigerten Phosphorylierung und somit zu keiner Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase FAK (Tyr³⁹⁷).

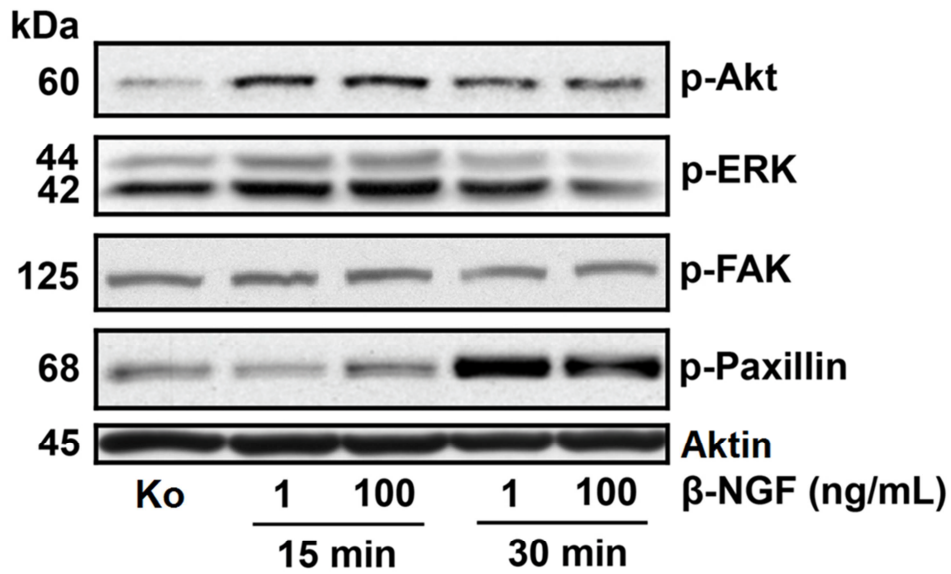


Abbildung 11: β -NGF-Stimulation führt zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung von Akt, ERK1/2 und Paxillin in VSMCs.

Die Abbildung zeigt einen exemplarischen *Western-Blot* mit spezifischen Antikörpern gegen Phospho-Akt, Phospho-ERK1/2, Phospho-Paxillin und Phospho-FAK. VSMCs wurden für 15 min oder 30 min mit rekombinantem β -NGF stimuliert (1 ng/mL oder 100 ng/mL). Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung diente das Zytoskelett-Protein Aktin. Die Stimulation der VSMCs führte nach 15 min zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung von Akt und ERK1/2. Eine Phosphorylierung von Paxillin war nach 30 min sichtbar. Die Phosphorylierung von FAK wurde durch die Stimulation nicht beeinflusst. n = 3, Ko = Kontrolle.

4.9 β -NGF induziert Zellmigration via Aktivierung des PI3K/Akt-Signaltransduktionswegs und durch Integrin-Aktivierung

Zur Identifikation der an der NGF-induzierten Zellmigration beteiligten Signaltransduktionswege wurden VSMCs mit dem PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 (10 μ mol/L), dem MEK/ERK-Inhibitor PD98059 (10 μ mol/L) und den Integrin-blockierenden RGD-Peptiden (100 μ mol/L) vorinkubiert und danach in einen Migrationsversuch mit β -NGF (100 ng/mL) eingesetzt. Nach 4 h Migrationszeit erfolgte eine Fixierung und Färbung der Zellen.

Wie Abbildung 12 zeigt, wurde die VSMC-Migration durch Hemmung des PI3-Kinase-Signalwegs mit Hilfe des Inhibitors LY294002 signifikant gehemmt. Die Inhibition von ERK1/2 durch PD98059 hatte dagegen keinen Einfluss auf die NGF-induzierte Zellmigration. Auch die Vorinkubation der Zellen mit RGD-Peptiden (Arg-Gly-Asp), die die α -Integrin Bindungsstelle blockieren, führte zu einer signifikanten Reduktion der Migration in den VSMCs.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Rezeptor-Liganden-Bindung von β -NGF an den TrkA-Rezeptor zu einer Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs führt, was eine gesteigerte Phosphorylierung des Integrin-Adapterproteins Paxillin zur Folge hat. Zudem scheint die α -Integrin-Aktivierung für die β -NGF-vermittelte Zellmigration von Bedeutung zu sein.

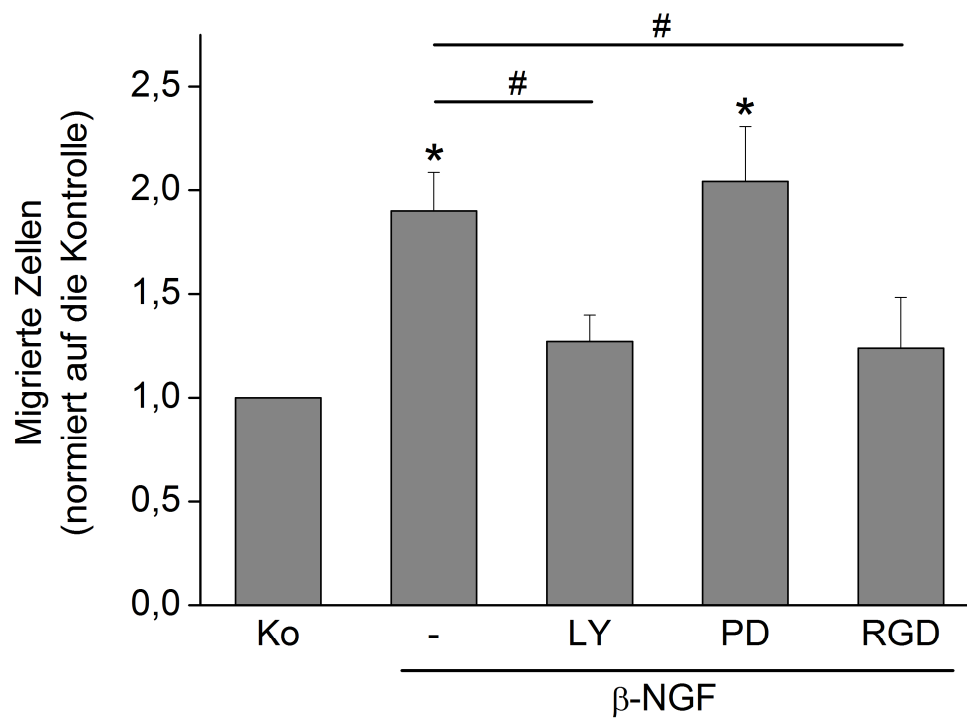


Abbildung 12: NGF induziert Zellmigration via PI3K/Akt und Integrin-Aktivierung.

Die β -NGF-induzierte Migration von VSMCs wurde durch Vorinkubation mit dem PI3K-Inhibitor LY294002 (LY; 10 μ mol/L) und α v-Integrin-blockierenden RGD-Peptiden (RGD; 100 nmol/l) signifikant gehemmt. Die Vorinkubation mit dem MEK/ERK-Inhibitor PD98059 (PD; 10 μ mol/L) hatte dagegen keinen Einfluss auf die β -NGF-vermittelte Zellmigration. Daten werden gezeigt als Mittelwert \pm SD, n = 3 unabhängige Experimente, *p-Wert < 0,05 vs. Kontrolle, #p-Wert < 0,05 vs. Stimulation mit β -NGF, Ko = Kontrolle.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkung einer Furin-abhängigen Prozessierung von proNGF zu NGF auf verschiedene Zellfunktionen von VSMCs. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten demonstrierten wir, dass eine Stimulation mit den Wachstumsfaktoren PDGF-BB und TGF- β 1 die β -NGF-Expression in proliferierenden VSMCs erhöht und dass die PC Furin dabei mit NGF koreguliert ist. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass Furin in proliferierenden VSMCs proNGF zu NGF aktiviert. Dementsprechend führte eine Furin-Inhibition zu einer gesteigerten proNGF-Sekretion bei gleichzeitig verringerter NGF-Sekretion in proliferierenden VSMCs. Zudem zeigten die proliferierenden VSMCs bei einer Stimulation mit den Wachstumsfaktoren PDGF-BB und TGF- β 1 eine erhöhte Expression des NGF-Rezeptors TrkA bei einer parallelen Abnahme der Expression des proNGF-Rezeptors Sortilin.

Des Weiteren konnten wir im Rahmen dieser Arbeit nachweisen, dass β -NGF keinen Einfluss auf die Proliferation von VSMCs hat, jedoch die Migration der Zellen via TrkA-, PI3K/Akt- und Integrin-abhängigem *signaling* induziert, und dass die β -NGF-vermittelte Migration die Aktivierung von proNGF durch die PC Furin erfordert. Im Gegensatz dazu induzierte die Stimulation von VSMCs mit proNGF die Apoptose in den Zellen und förderte nicht deren Proliferation oder Migration. Somit zeigten wir, dass Furin das Gleichgewicht zwischen proNGF und NGF in proliferierenden VSMCs beeinflusst und darüber unterschiedliche Zellfunktionen wie Apoptose und Migration reguliert.

Die meisten Untersuchungen zu NGF und proNGF wurden an Zellen des Nervensystems durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass NGF und sein Vorläuferprotein proNGF entgegengesetzte Effekte auf die Zellfunktion von Neuronen haben – während NGF Zellviabilität, Differenzierung und synaptische Plastizität vermittelt, führt proNGF zur Induktion von Apoptose [80, 96]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass NTs ebenfalls die Funktion vieler anderer Zellen beeinflussen und beispielsweise bei physiologischen und pathologischen Prozessen im kardiovaskulären System eine bedeutende Rolle spielen [89]. So konnte beispielsweise eine Beteiligung von NGF in der Angiogenese nachgewiesen werden, womit NGF ein therapeutisches *Target* in der Therapie ischämischer vaskulärer Erkrankungen darstellen könnte [119]. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass Neurotrophine auch bei der Entstehung von Atherosklerose eine zentrale Rolle spielen, da sie zum einen die Zellfunktion von

endothelialen Zellen regulieren [120, 121], zum anderen auch einen Einfluss auf Zellfunktionen wie Migration oder Apoptose in glatte Gefäßmuskelzellen ausüben [111, 122].

Von den sechs bisher identifizierten NTs wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von NGF auf VSMCs untersucht. Donovan et al. demonstrierten, dass die Expression von NGF und des hoch-affinen NGF-Rezeptors TrkA im Tiermodell nach Ballon-Dilatation in VSMCs ansteigt [111]. Parallel dazu kommt es auch zu einer vermehrten Expression von BDNF und seinem TrkB-Rezeptor in der Neointima, sodass in Zukunft weitere Untersuchungen zur Differenzierung zwischen der Wirkung von NGF und BDNF auf VSMCs notwendig sind [111]. Des Weiteren ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt, inwieweit sich gerade die gleichzeitige Stimulation mit verschiedenen NTs auf die Zellfunktionen von VSMCs auswirkt. So konnten Chen et al. zeigen, dass gerade der kombinierte Einsatz von NGF, BDNF und *basic fibroblast growth factor* (bFGF) die Proliferation und Differenzierung von neuronalen Stammzellen fördert [123].

VSMCs spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Progression von Atherosklerose und Restenose nach PTCA, da gerade die Migration und anschließende Proliferation der Zellen sowie die Produktion von EZM bedeutend zum Wachstum der atherosklerotischen Plaques und zur Bildung der Neointima beitragen [7, 8]. An der Regulation dieser Prozesse sind eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen beteiligt, da sie in den Läsionen von endothelialen Zellen, Makrophagen aber auch von VSMCs exprimiert werden und durch Induktion von Migration, Proliferation und phänotypischer Modulation die VSMCs beeinflussen [8, 9]. PDGF-BB und TGF- β 1 spielen bei diesen Prozessen eine Schlüsselrolle, da sie über die Beeinflussung des VSMC-Phänotyps auch zur Induktion der Synthese weiterer Wachstumsfaktoren und pro-inflammatorischer Mediatoren führen [8, 124]. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir daher die Wirkung einer gleichzeitigen Stimulation der VSMCs mit den atherogenen Wachstumsfaktoren PDGF-BB und TGF- β 1 auf die NGF-Synthese mit Hilfe von Zellkulturexperimenten. Die Experimente demonstrieren, dass es nach Stimulation mit diesen Wachstumsfaktoren in den VSMCs zu einem zeitabhängigen Anstieg von NGF kommt.

Es ist bekannt, dass Proprotein Convertasen für die Aktivierung einer Reihe von Wachstumsfaktoren, Matrix-Metalloproteinasen und Adhäsionsmolekülen, die an der

Entstehung und Progression von Atherosklerose beteiligt sind, verantwortlich sind [54, 57, 125]. Verschiedene Daten zeigen, dass Furin in der Lage ist, das Pro-Neurotrophin proNGF zu aktivieren [77, 78]. So demonstrierten Seidah et al. mit Hilfe des Vaccinia-Virus-Expressionssystems, dass Furin und im geringeren Ausmaß auch PACE4 und PC5/6 in Zellen mit konstitutiver und regulierter Sekretion proNGF prozessieren [77]. Auch die Arbeitsgruppe von Mowla et al. zeigte, dass in neuroendokrinen AtT20 Zellen (hypophysäres Adrenocorticotropes Hormon-(ACTH)-produzierendes Adenokarzinom der LAF1-Mauslinie) und in Neuronen des Hippocampus proNGF wirksam durch die PC Furin im TGN gespalten wird und dass das entstehende NGF über den konstitutiven Weg sezerniert wird [126]. Entsprechend führte eine Furin-Inhibierung mit alpha1-PDX Portland in AtT20-Zellen durch die verminderte Prozessierung von proNGF zu NGF im TGN zu einem Anstieg von proNGF im Zellkulturmedium [126]. Alpha1-PDX Portland wird mittels biotechnologischer Veränderung des reaktiven Zentrums von alpha1-Antitrypsin, eines der Hauptinhibitoren von Serinproteasen im Plasma, hergestellt und hemmt die Furin-Aktivität durch Komplexbildung [127]. In Übereinstimmung mit diesen Untersuchungen konnte auch in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass Furin die Aktivierung von rekombinantem proNGF zu NGF induziert und dass diese Prozessierung von proNGF durch den pharmakologischen Furin-Inhibitor dec-CMK gehemmt wird. Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen ebenfalls, dass eine Furin-Inhibition eine vermehrte Sekretion von proNGF bei gleichzeitiger Reduktion der β -NGF-Sekretion in VSMCs zur Folge hat.

Andere Arbeiten konnten bereits Furin und NGF in humanen und tierischen Arterien nachweisen [51, 111]. Mithilfe eines Serum-freien Organkulturmodells wurde eine gesteigerte Expression von Furin, PC5 und PC7 in Rattenaorten nachgewiesen [128]. Zudem konnte eine Expressionssteigerung dieser PCs immunhistochemisch in Rattenaorten nach Ballon-Denudation detektiert werden [128]. Auch Sluijter et al. zeigten, dass Furin im Tiermodell nach Ballon-Dilatation hochreguliert wird und dass die Inhibition von PCs durch alpha1-PDX in adenoviral-transfizierten Arterien eine Reduktion der Neointima nach Ballon-Dilatation zur Folge hat [51]. Diese Befunde sprechen für eine Beteiligung von Furin an der arteriellen Gefäßreaktion nach Gefäßverletzung, so zum Beispiel bei der Entstehung von Restenosen. Andere *in vivo* Arbeiten im Tiermodell zeigten, dass NGF genau wie Furin nach Ballon-Dilatation induziert wird [111]. In Übereinstimmung mit den bisherigen Daten zeigten wir im

Rahmen dieser Arbeit, dass es unter dem Einfluss von PDGF-BB und TGF- β 1 zu einem Anstieg der Expression und Aktivität von Furin *in vitro* in kultivierten VSMCs kommt. Somit wird die Expression von Furin und seinem Substrat proNGF parallel reguliert, was die Bedeutung von Furin für die Aktivierung von proNGF in glatten Gefäßmuskelzellen unterstreicht.

Bruno et al. demonstrierten, dass NGF aktivitätsabhängig auch als proNGF in den extrazellulären Raum freigesetzt werden kann [91]. In reifen Neuronen des frontalen und parietalen Cortex von Ratten kam es nach Stimulation mit Carbachol, Glutamat und Kaliumchlorid zu einer vermehrten Sekretion von proNGF, während eine NGF-Sekretion nicht nachweisbar war [91]. Die Autoren schlossen daraus, dass NGF vor allem in seiner Vorläuferform proNGF sezerniert wird und dass die Sekretion von der Zellaktivität abhängt [91]. Im Gegensatz dazu führte in der vorliegenden Arbeit eine Stimulation mit Wachstumsfaktoren in VSMCs zu einer Steigerung der NGF- und Abnahme der proNGF-Sekretion. Die Vorinkubation der Zellen mit dem Furin-Inhibitor dec-CMK hingegen führte zu einer Verringerung der NGF-Sekretion in den Zellen bei gleichzeitigem Anstieg der proNGF-Sekretion. Auch diese Ergebnisse unterstreichen, dass Furin für die Aktivierung des Pro-Neurotrophins proNGF in VSMCs notwendig ist und dass eine Verringerung der Furin-Aktivität die proNGF- und NGF-Sekretion in diesen Zellen beeinflusst.

Interessanterweise beeinflussen NGF und sein Pro-Neurotrophin proNGF in unterschiedlichen Zellen gegensätzliche Zellfunktionen [80, 94]. Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass proNGF in Zellen des Nervensystems wie kortikospinalen Neuronen oder Oligodendrozyten Apoptose induziert [129, 130]. Beispielsweise wiesen Beatti et al. *in vitro* und *in vivo* nach, dass proNGF für die Apoptose von Oligodendrozyten nach Rückenmarksverletzung verantwortlich ist [130]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der p75NTR für die proNGF-vermittelte Apoptose-Induktion notwendig ist [98]. Untersuchungen am *knockout*-Tiermodell demonstrierten, dass sympathische Neuronen aus p75NTR-defizienten Mäusen eine geringere Apoptoserate in Entwicklungsphasen, in denen es zur Apoptose von sympathischen Neuronen kommt, aufweisen als die sympathischen Neuronen der p75NTR-exprimierenden Kontrollgruppe [98]. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine p75NTR-Aktivierung in differenzierten Oligodendrozyten oder retinalen Neuronen vor

allem dann zur Apoptose führt, wenn TrkA nicht exprimiert wird [131, 132]. Des Weiteren zeigte die Arbeitsgruppe von Lee et al., mittels *in vitro* Versuchen mit spaltungsresistentem, mutantem proNGF, dass proNGF vorrangig an den p75NTR und nicht an TrkA bindet und dass diese selektive Bindung von proNGF an p75NTR zur Induktion der Apoptose in embryonalen Zellen des peripheren Nervensystems, welche beide Rezeptoren exprimieren, führt [79].

In der vorliegenden Arbeit konnten wir ebenfalls nachweisen, dass die Stimulation von VSMCs *in vitro* mit rekombinantem proNGF zur Apoptose-Induktion führt, während β -NGF keinen Einfluss auf die Apoptoserate der VSMCs hat. In einer späteren Veröffentlichung bestätigten Campagnolo et al. die Induktion der Apoptose durch proNGF in intimalen VSMCs [133]. Sie zeigten außerdem, dass die proNGF-induzierte Apoptose mit einer verminderten Expression von NF- κ B assoziiert ist [133]. Weitere Untersuchungen sind in Zukunft zur Identifikation der Signaltransduktionswege, die der proNGF-induzierten Apoptose in VSMCs zugrunde liegen, notwendig.

Andere Studien belegen, dass die proNGF-vermittelte Apoptose die Heterodimerisation von p75NTR mit dem Sortilin-Rezeptor voraussetzt, der sowohl in embryonalem als auch in adultem Gewebe exprimiert wird [101, 134]. Mit Hilfe von Untersuchungen an Sortilin-*knockout*-Mäusen wurde die Bedeutung des p75NTR/Sortilin-Rezeptorkomplexes für die neuronale Viabilität näher untersucht [135]. Dabei wiesen Sortilin-defiziente Mausembryonen eine Verminderung der proNGF-vermittelten Apoptose in retinalen Ganglienzellen auf [135]. Die neuronale Viabilität war dagegen in den Sortilin-*knockout*-Tieren nicht beeinflusst [135]. Diese Daten verdeutlichen, dass die Sortilin-Expression keine Auswirkung auf die TrkA/NGF-vermittelte Zellviabilität hat [135]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression des Sortilin-Rezeptors auch für die proNGF-induzierte Apoptose in VSMCs erforderlich ist. Eine Inhibition der Sortilin-Produktion durch RNA-Interferenz hatte in VSMCs eine signifikante Reduktion der proNGF-induzierten Apoptose zur Folge [133].

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, dass es in proliferierenden VSMCs zu einer Herunterregulation der Sortilin-Genexpression bei gleichzeitig gesteigerter TrkA-Genexpression kommt. Diese Expressionsänderungen kennzeichnen eine Verschiebung der Empfindlichkeit von VSMCs von proNGF zu NGF und somit eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen einer pro-apoptotischen Wirkung (proNGF) und einer anti-apoptotischen Wirkung (NGF).

NGF, ist unter anderem für das Überleben der meisten Zellen im peripheren und zentralen Nervensystem verantwortlich [94]. So zeigte beispielsweise die Arbeitsgruppe von Ruit et al., dass die Behandlung von adulten Mäusen mit NGF zu einer Verlängerung von dendritischen Fortsätzen sympathischer Ganglienzellen führt, während die systemische Applikation eines NGF-Antikörpers für einen oder drei Monate eine Degeneration sympathischen Ganglienzellen zur Folge hat [136]. Dementsprechend wiesen verschiedene Untersuchungen an *knockout*-Tiermodellen nach, dass die Deletion von NT-Genen in einem selektiven Verlust bestimmter Populationen von Neuronen resultiert, deren Überleben von den NTs abhängig ist [137]. Belliveau et al. konnten demonstrieren, dass die TrkA-Aktivierung für das Zellüberleben notwendig ist und dass NGF über die Aktivierung eben dieses Rezeptors zum Zellüberleben von sympathischen Neuronen führt [138].

Aber auch in Zellen des kardiovaskulären Systems fördert NGF das Zellüberleben. So führt die Applikation des TrkA-Inhibitors K252a sowie eines NGF-Antikörpers in kultivierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratte zur Steigerung der Apoptoserate [139]. Dementsprechend führte eine Adenovirus-vermittelte NGF-Überexpression zur Reduktion der Apoptose in diesen Zellen, was zeigt, dass NGF als *pro-survival* Faktor für Kardiomyozyten wirkt [139].

Hingegen zeigten *in vitro* Experimente der Arbeitsgruppe von Bono et al., dass NGF in humanen, aortalen SMCs zu einem konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg der Apoptoserate führt [140]. Dabei ließ sich die Apoptoserate in den SMCs durch eine Blockade des PI3K- und (MEK)/MAP-Kinase-Signalwegs sowie durch den Einsatz des TrkA-Inhibitors K252a verringern. Die Autoren schlussfolgerten, dass eine NGF-Stimulation in kultivierten, humanen, aortalen SMCs zur Apoptose-Induktion führt und dass dies über den TrkA-Rezeptor vermittelt wird [140]. Im Gegensatz dazu zeigten wir im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe eines Caspase 3/7-Assays, dass β -NGF keinen Einfluss auf die Apoptoserate von VSMCs hat. Die bereits erwähnte Wachstumsfaktorbedingte Steigerung der TrkA-Expression bei gleichzeitiger Abnahme der Sortilin-Expression fördert zusätzlich das Zellüberleben der Zellen und verhindert den programmierten Zelltod, der durch die Ligandenbindung an den Sortilin-Rezeptor vermittelt wird [101].

Unsere Ergebnisse stehen dabei im Einklang mit den Untersuchungen anderer, die zeigen, dass die NT-induzierte Apoptose in VSMCs nur durch p75^{NTR} und nicht durch

TrkA vermittelt wird [122]. Wang et al. zeigten in kultivierten *human endarterectomy-derived cells* (HEDCs), welche p75NTR, aber keine aktiven Trk-Rezeptoren exprimieren, dass es nach Stimulation mit NGF, BDNF oder NT-3 für 24 h zu einer Verdrei- bis Vervierfachung der Anzahl apoptotischer Zellen kommt [122]. Auch die Arbeitsgruppe von Bamji et al. demonstrierte im Gegensatz zu den von Bono et al. erhobenen Daten, dass eine TrkA-Aktivierung durch NGF die über p75NTR vermittelte Apoptose in sympathischen Neuronen vermindert [98, 140]. Auch in TrkA-transduzierten Oligodendrozyten führte eine Aktivierung von TrkA zur Verhinderung der durch p75NTR induzierten Apoptose [141]. Dabei unterdrücken die durch TrkA-Aktivierung induzierten Signaltransduktionswege die JNK-Aktivität, die Bestandteil des p75NTR-abhängigen, pro-apoptotischen Signalwegs ist [141].

Andere Arbeiten zeigten, dass NGF hingegen in Zellen, die nur p75NTR nicht jedoch TrkA exprimieren, die Apoptose induziert [131]. So konnte beispielsweise in differenzierten Oligodendrozyten, die nur p75NTR, nicht jedoch TrkA exprimieren, mit Hilfe einer Fluoreszenz basierten TUNEL-Analyse eine NGF-abhängige Apoptose-Induktion nachgewiesen werden [132]. Jedoch waren in diesen Versuchen relativ hohe Konzentration an NTs notwendig, um Apoptose zu induzieren [132, 141, 142].

Des Weiteren belegen verschiedene Studien, dass NGF die Proliferation unterschiedlicher Zellen induziert [121, 123, 143]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass NGF *in vivo* und *in vitro* einen proliferativen Effekt auf endotheliale Zellen ausübt und dass die mitogene Wirkung von NGF über die Aktivierung von TrkA und die nachfolgende Aktivierung des Erk-Signalwegs vermittelt wird [121].

Im Gegensatz zu diesen Befunden hatten weder proNGF noch NGF in der vorliegenden Untersuchung einen Einfluss auf die Proliferation von VSMCs. Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, dass NGF, nicht jedoch proNGF, chemotaktisch auf VSMCs wirkt. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Arbeitsgruppe von Kraemer et al. überein, die ebenfalls in transfizierten, TrkA-exprimierenden *temperature sensitive mouse smooth muscle cell-* (TsTmSMC) und in *human aortic smooth muscle cell*-Zelllinien die chemotaktische Wirkung von NGF bei gleichzeitig fehlendem Einfluss auf die Proliferation nachweisen konnten [144]. NGF induziert dabei ähnliche Signaltransduktionswege wie der mitogene Wachstumsfaktor PDGF-BB [144]. So konnten Kraemer et al. demonstrieren, dass NGF zur Phosphorylierung von TrkA und der Signalmoleküle ERK1/2, Shc und PLC γ führt und somit die Aktivierung der PLC γ -

PI3K- und MAPK-Signaltransduktionswege induziert [144]. Unter dem Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren einzelner Signalmoleküle führte jedoch nur die Inhibition der PI3K und nicht die Inhibition der MAP-Kinase zur Verringerung der NGF-vermittelten Migration [144]. Die genauen Mechanismen der NGF-induzierten Migration sind jedoch nicht identifiziert.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass NGF die Migration von VSMCs über autokrine Mechanismen steuert. Weiterhin zeigen wir durch Einsatz von K252a, einem TrkA-Inhibitor, dass die Migration über eine Bindung von NGF an TrkA und eine nachfolgende Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs erfolgt. In Übereinstimmung damit führte in TrkA-defizienten TsTmSMC die Stimulation mit NGF zu keiner gesteigerten Migration [144].

Darüber hinaus zeigen wir, dass die Stimulation der VSMCs mit rekombinantem β -NGF zur Ausbildung von Stress-Filamenten sowie zur Phosphorylierung und Rekrutierung des Integrin-Adaptorproteins Paxillin in den fokalen Adhäsionskomplexen führt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen zudem die Hypothese, dass die Aktivierung des ERK-Signaltransduktionswegs keine wesentliche Rolle für die NGF-induzierte Migration spielt, da eine Inhibition von ERK1/2 keine signifikante Reduktion der Migration der VSMCs zur Folge hatte.

Im Gegensatz dazu zeigten Chen et al., dass die NGF-vermittelte Migration von dermalen Fibroblasten *in vitro* die Aktivierung der PI3K/Akt- und ERK-Signalwege zur Folge hatte [145]. Dabei führt nicht nur die Blockade des PI3K/Akt-Signalwegs, sondern auch die Inhibition des ERK-Signalwegs zu einer Reduktion der NGF-induzierten Zellmigration [145].

Neben Paxillin spielt auch FAK als Integrin-Adapterprotein eine bedeutende Rolle für die Migration verschiedener Zellen [64]. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Park et al., die demonstrierten, dass es nach NGF-Stimulation von PC12 Zellen zu keiner Phosphorylierung von FAK kommt [146], zeigten auch wir, dass die Stimulation von VSMCs mit NGF zu keiner Erhöhung der FAK-Phosphorylierung und Aktivierung führt. Diese Befunde sprechen dafür, dass die NGF-induzierte Migration unabhängig von FAK ist.

In den vorliegenden Versuchen reduzierte die Blockierung der Integrin-Liganden-Bindungsstelle mit Hilfe von RGD-Peptiden die NGF-vermittelte VSMC-Migration, was dafür spricht, dass diese Integrin-abhängig ist.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die TrkA-vermittelte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs, die nachfolgende Phosphorylierung des Integrin-Adaptermoleküls sowie die Organisation von fokalen Adhäsionskomplexen zur NGF-induzierten Migration von VSMCs beitragen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnten auch andere Arbeitsgruppen an unterschiedlichen Zelltypen zeigen, dass Integrine eine entscheidende Rolle bei NGF-induzierten Signaltransduktionswegen spielen [147, 148]. So konnten Mills et al. in Untersuchungen mit PC12-Zellen und Spinalganglienzellen zeigen, dass die Inhibition der *integrin-linked kinase*, die ein *downstream*-Signalmolekül des Integrin- und Wachstumsfaktor-induzierten PI3K/Akt-Signalwegs darstellt, das NGF-vermittelte Wachstum von Neuriten verhindert [147]. Interessanterweise interagiert NGF, wenn auch mit geringer Affinität, auch direkt mit $\alpha 9\beta 1$ -Integrinen und fördert so die Proliferation und Migration in Zellen der SW480 Colonkarzinomzelllinie [148].

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse wurden in Zellkulturexperimenten gewonnen und sind somit nicht ohne Weiteres auf die komplexen Bedingungen *in vivo* übertragbar. Jedoch sprechen die *in vivo* erhobenen Befunde aus Tiermodellen für die Relevanz der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den *in vitro* Experimenten, zeigten weiterführende *in vivo* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass es 14 Tage nach Ballon-Dilatation in der Neointima zu einer gesteigerten Expression von NGF, Furin und dem hoch-affinen NGF-Rezeptor TrkA kommt [149]. Des Weiteren war die gesteigerte TrkA-Genexpression begleitet von einer Herunterregulierung der Sortilin-Expression im Vergleich zu den unverletzten Gefäßen der kontralateralen Seite [149].

Die erhobenen Daten einer Furin-abhängigen Aktivierung von proNGF zu NGF und der damit verbundenen Regulation der VSMC-Funktion legen die Hypothese einer Beeinflussung der Furin-Expression als möglichen therapeutischen Ansatz zur Prävention und Therapie von Atherosklerose und Restenose nahe. Die breite Gewebeverteilung sowie die Vielzahl von PC-Substraten erschwert jedoch eine therapeutische Beeinflussung von Furin [150]. Zudem konnten Roebroek et al. anhand von *Furin-knockout* Experimenten die Bedeutung von Furin für die embryonale Entwicklung nachweisen [151]. Ein *Furin-knockout* im Mausmodell hatte dabei letale Fehlbildungen der embryonalen Mäuse wie Herzfehlbildungen mit daraus resultierender hämodynamischer Insuffizienz zur Folge [151]. Dies schränkt das therapeutische

Potential deutlich ein, beziehungsweise erfordert eine zeitlich begrenzte und gezielte Furin-Inhibition.

Eine therapeutische Furin-Inhibition wurde bereits zur Behandlung verschiedener Tumorerkrankungen vorgeschlagen, da eine erhöhte Expression von Furin in zahlreichen Tumoren, wie beispielsweise Plattenepithel-, Mamma-, Lungen- oder Colonkarzinomen, nachgewiesen werden konnte und ein beschleunigtes Tumorwachstum und eine erhöhte Invasion zur Folge hat [152, 153]. Furin aktiviert dabei EZM-degradierende Enzyme, wie die Membran-Typ 1 MMP (MT1-MMP), die wiederum extrazelluläre pro-MMP2 aktiviert [152]. Diese Prozesse spielen im Tumorwachstum und bei der Neovaskularisation eine Rolle [152, 154]. Des Weiteren demonstrierte die Arbeitsgruppe von De Vos et al. im *knockout*-Tiermodell, dass Furin eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung des Protoonkogens *pleiomorphic adenoma gene 1* (PLAG1) spielt, dessen Überexpression die Bildung von Speicheldrüsentumoren induziert [155].

Basierend auf Transfektionsexperimenten mit Tumorzellen konnten bereits verschiedene *in vivo* Untersuchungen zeigen, dass die alpha1-PDX-vermittelte Inhibition von Furin zu einer Verringerung der Proliferation und Invasion von Tumoren verschiedener Gewebe führt [152, 156]. Diese Befunde unterstützen die Möglichkeit eines therapeutischen Einsatzes von Furin-Inhibitoren im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen.

Zudem konnten Lei et al. zeigen, dass die Inhibition von Furin durch Überexpression von Pro-Furin mittels Adenovirus-vermittelter Transduktion in einem Atherosklerose-Modell zu einer signifikanten Reduktion der Atherosklerose-Entwicklung und einer Reduktion des Plasma LDL-Spiegels führt, was die Möglichkeit eines therapeutischen Einsatzes einer Furin-Inhibition in der Prävention und Therapie von Atherosklerose unterstreicht [53].

Da proNGF und NGF in den VSMCs unterschiedliche Zellfunktionen unterstützen, stellt das Verhältnis von proNGF und NGF einen entscheidenden regulatorischen Faktor für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Zellüberleben, Migration und Apoptose dar. Furin könnte somit als wirksamer Aktivator von proNGF über die Beeinflussung dieses Gleichgewichts ein mögliches Target in der Prävention und Therapie von atherosklerotischen und restenotischen Gefäßwandveränderungen darstellen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die molekularen

Mechanismen der NGF-vermittelten Zellfunktionen zu verstehen und die Möglichkeit einer therapeutischen Umsetzung der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten näher zu erforschen.

6 Literaturverzeichnis

1. Ford ES, Ajani UA, Croft JB, Critchley JA, Labarthe DR, Kottke TE, Giles WH, and Capewell S. *Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000*. N Engl J Med, 2007. 356(23): p. 2388-98.
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, Das SR, de Ferranti S, Despres JP, Fullerton HJ, Howard VJ, Huffman MD, Isasi CR, Jimenez MC, Judd SE, Kissela BM, Lichtman JH, Lisabeth LD, Liu S, Mackey RH, Magid DJ, McGuire DK, Mohler ER, 3rd, Moy CS, Muntner P, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Nichol G, Palaniappan L, Pandey DK, Reeves MJ, Rodriguez CJ, Rosamond W, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Woo D, Yeh RW, Turner MB, American Heart Association Statistics C, and Stroke Statistics S. *Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2016. 133(4): p. e38-e360.
3. Lusis AJ. *Atherosclerosis*. Nature, 2000. 407(6801): p. 233-41.
4. Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. 362(6423): p. 801-9.
5. Doran AC MN, McNamara CA. *Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. 28: p. 812-819.
6. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, and Sedding DG. *Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies*. Nat Med, 2002. 8(11): p. 1249-56.
7. Scott NA. *Restenosis following implantation of bare metal coronary stents: pathophysiology and pathways involved in the vascular response to injury*. Adv Drug Deliv Rev, 2006. 58(3): p. 358-76.
8. Owens GK, Kumar MS, and Wamhoff BR. *Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease*. Physiol Rev, 2004. 84(3): p. 767-801.
9. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, and Michel JB. *The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles*. Cardiovasc Res, 2012. 95(2): p. 194-204.
10. Saltis J, Thomas AC, Agrotis A, Campbell JH, Campbell GR, and Bobik A. *Expression of growth factor receptors in arterial smooth muscle cells. Dependency on cell phenotype and serum factors*. Atherosclerosis, 1995. 118(1): p. 77-87.

11. Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, and Dryjski M. *Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study.* Cell Tissue Res, 1995. 281(3): p. 421-33.
12. Clowes AW, Reidy MA, and Clowes MM. *Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium.* Lab Invest, 1983. 49(3): p. 327-33.
13. Muller DW, Ellis SG, and Topol EJ. *Experimental models of coronary artery restenosis.* J Am Coll Cardiol, 1992. 19(2): p. 418-32.
14. Chen YH, Chen YL, Lin SJ, Chou CY, Mar GY, Chang MS, and Wang SP. *Electron microscopic studies of phenotypic modulation of smooth muscle cells in coronary arteries of patients with unstable angina pectoris and postangioplasty restenosis.* Circulation, 1997. 95(5): p. 1169-75.
15. Regan CP, Adam PJ, Madsen CS, and Owens GK. *Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury.* J Clin Invest, 2000. 106(9): p. 1139-47.
16. Aikawa M, Sakomura Y, Ueda M, Kimura K, Manabe I, Ishiwata S, Komiyama N, Yamaguchi H, Yazaki Y, and Nagai R. *Redifferentiation of smooth muscle cells after coronary angioplasty determined via myosin heavy chain expression.* Circulation, 1997. 96(1): p. 82-90.
17. Aikawa M, Sivam PN, Kuro-o M, Kimura K, Nakahara K, Takewaki S, Ueda M, Yamaguchi H, Yazaki Y, Periasamy M, and et al. *Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis.* Circ Res, 1993. 73(6): p. 1000-12.
18. Ross R. *Atherosclerosis--an inflammatory disease.* N Engl J Med, 1999. 340(2): p. 115-26.
19. Corjay MH TM, Lynch KR, Owens GK. *Differential effect of platelet-derived growth factor- versus serum-induced growth on smooth muscle alpha-actin and nonmuscle beta-actin mRNA expression in cultured rat aortic smooth muscle cells.* J Biol Chem, 1989. 264: p. 10501-10606.
20. Wilcox JN, Smith KM, Williams LT, Schwartz SM, and Gordon D. *Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization.* J Clin Invest, 1988. 82(3): p. 1134-43.
21. Barrett TB and Benditt EP. *sis (platelet-derived growth factor B chain) gene transcript levels are elevated in human atherosclerotic lesions compared to normal artery.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(4): p. 1099-103.

22. Tanizawa S, Ueda M, van der Loos CM, van der Wal AC, and Becker AE. *Expression of platelet derived growth factor B chain and beta receptor in human coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty: an immunohistochemical study.* Heart, 1996. 75(6): p. 549-56.
23. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, and Ross R. *Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF.* Science, 1991. 253(5024): p. 1129-32.
24. Kanzaki T, Tamura K, Takahashi K, Saito Y, Akikusa B, Oohashi H, Kasayuki N, Ueda M, and Morisaki N. *In vivo effect of TGF- beta 1. Enhanced intimal thickening by administration of TGF- beta 1 in rabbit arteries injured with a balloon catheter.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. 15(11): p. 1951-7.
25. Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, Ishibashi M, Hiasa K, Nishida K, and Takeshita A. *Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice.* Circulation, 2002. 106(21): p. 2700-6.
26. Pan JH, Sukhova GK, Yang JT, Wang B, Xie T, Fu H, Zhang Y, Satoskar AR, David JR, Metz CN, Bucala R, Fang K, Simon DI, Chapman HA, Libby P, and Shi GP. *Macrophage migration inhibitory factor deficiency impairs atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice.* Circulation, 2004. 109(25): p. 3149-53.
27. Camejo G, Fager G, Rosengren B, Hurt-Camejo E, and Bondjers G. *Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells.* J Biol Chem, 1993. 268(19): p. 14131-7.
28. Wesley RB, 2nd, Meng X, Godin D, and Galis ZS. *Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. 18(3): p. 432-40.
29. Majesky MW, Lindner V, Twardzik DR, Schwartz SM, and Reidy MA. *Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury.* J Clin Invest, 1991. 88(3): p. 904-10.
30. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, and Libby P. *Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells.* Arterioscler Thromb, 1991. 11(5): p. 1223-30.
31. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamate C, Merval R, Fradelizi D, and Tedgui A. *Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice.* Circ Res, 2001. 89(10): p. 930-4.

32. Braun M, Pietsch P, Schror K, Baumann G, and Felix SB. *Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells*. Cardiovasc Res, 1999. 41(2): p. 395-401.
33. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD, and et al. *Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis*. J Clin Invest, 1993. 92(2): p. 945-51.
34. Cai Q, Lanting L, and Natarajan R. *Interaction of monocytes with vascular smooth muscle cells regulates monocyte survival and differentiation through distinct pathways*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. 24(12): p. 2263-70.
35. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, and Wilcox JN. *Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques*. J Clin Invest, 1991. 88(4): p. 1121-7.
36. Stawowy P and Fleck E. *Proprotein convertases furin and PC5: targeting atherosclerosis and restenosis at multiple levels*. J Mol Med (Berl), 2005. 83(11): p. 865-75.
37. Nakayama K. *Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins*. Biochem J, 1997. 327 (Pt 3): p. 625-35.
38. Seidah NG and Prat A. *The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases*. Nat Rev Drug Discov, 2012. 11(5): p. 367-83.
39. Julius D, Brake A, Blair L, Kunisawa R, and Thorner J. *Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor*. Cell, 1984. 37(3): p. 1075-89.
40. Fuller RS, Brake A, and Thorner J. *Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(5): p. 1434-8.
41. Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, and Brown MS. *Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells*. Mol Cell, 1998. 2(4): p. 505-14.
42. McNutt MC, Lagace TA, and Horton JD. *Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells*. J Biol Chem, 2007. 282(29): p. 20799-803.
43. Seidah NG, Awan Z, Chretien M, and Mbikay M. *PCSK9: a key modulator of cardiovascular health*. Circ Res, 2014. 114(6): p. 1022-36.

44. Thomas G. *Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3(10): p. 753-66.
45. Tassew NG, Charish J, Seidah NG, and Monnier PP. *SKI-1 and Furin generate multiple RGMa fragments that regulate axonal growth*. Dev Cell, 2012. 22(2): p. 391-402.
46. Pesu M, Watford WT, Wei L, Xu L, Fuss I, Strober W, Andersson J, Shevach EM, Quezado M, Bouladoux N, Roebroek A, Belkaid Y, Creemers J, and O'Shea JJ. *T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance*. Nature, 2008. 455(7210): p. 246-50.
47. Li N, Luo W, Juhong Z, Yang J, Wang H, Zhou L, and Chang J. *Associations between genetic variations in the *FURIN* gene and hypertension*. BMC Med Genet, 2010. 11: p. 124.
48. Hughey RP, Bruns JB, Kinlough CL, Harkleroad KL, Tong Q, Carattino MD, Johnson JP, Stockand JD, and Kleyman TR. *Epithelial sodium channels are activated by furin-dependent proteolysis*. J Biol Chem, 2004. 279(18): p. 18111-4.
49. Cousin C, Bracquart D, Contrepas A, Corvol P, Muller L, and Nguyen G. *Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma*. Hypertension, 2009. 53(6): p. 1077-82.
50. Stawowy P, Kallisch H, Borges Pereira Stawowy N, Stibenz D, Veinot JP, Grafe M, Seidah NG, Chretien M, Fleck E, and Graf K. *Immunohistochemical localization of subtilisin/kexin-like proprotein convertases in human atherosclerosis*. Virchows Arch, 2005. 446(4): p. 351-9.
51. Sluijter JP, Verloop RE, Pulskens WP, Velema E, Grimbergen JM, Quax PH, Goumans MJ, Pasterkamp G, and de Kleijn DP. *Involvement of furin-like proprotein convertases in the arterial response to injury*. Cardiovasc Res, 2005. 68(1): p. 136-43.
52. Turpeinen H, Raitoharju E, Oksanen A, Oksala N, Levula M, Lyytikainen LP, Jarvinen O, Creemers JW, Kahonen M, Laaksonen R, Pelto-Huikko M, Lehtimaki T, and Pesu M. *Proprotein convertases in human atherosclerotic plaques: the overexpression of *FURIN* and its substrate cytokines *BAFF* and *APRIL**. Atherosclerosis, 2011. 219(2): p. 799-806.
53. Lei X, Basu D, Li Z, Zhang M, Rudic RD, Jiang XC, and Jin W. *Hepatic overexpression of the prodomain of furin lessens progression of atherosclerosis and reduces vascular remodeling in response to injury*. Atherosclerosis, 2014. 236(1): p. 121-30.

54. Dubois CM, Blanchette F, Laprise MH, Leduc R, Grondin F, and Seidah NG. *Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme*. Am J Pathol, 2001. 158(1): p. 305-16.
55. Siegfried G, Basak A, Prichett-Pejic W, Scamuffa N, Ma L, Benjannet S, Veinot JP, Calvo F, Seidah N, and Khatib AM. *Regulation of the stepwise proteolytic cleavage and secretion of PDGF-B by the proprotein convertases*. Oncogene, 2005. 24(46): p. 6925-35.
56. Kim W, Essalmani R, Szumska D, Creemers JW, Roebroek AJ, D'Orleans-Juste P, Bhattacharya S, Seidah NG, and Prat A. *Loss of endothelial furin leads to cardiac malformation and early postnatal death*. Mol Cell Biol, 2012. 32(17): p. 3382-91.
57. Lissitzky JC, Luis J, Munzer JS, Benjannet S, Parat F, Chretien M, Marvaldi J, and Seidah NG. *Endoproteolytic processing of integrin pro-alpha subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7*. Biochem J, 2000. 346 Pt 1: p. 133-8.
58. Yana I and Weiss SJ. *Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases*. Mol Biol Cell, 2000. 11(7): p. 2387-401.
59. Stawowy P, Kallisch H, Veinot JP, Kilimnik A, Prichett W, Goetze S, Seidah NG, Chretien M, Fleck E, and Graf K. *Endoproteolytic activation of alpha(v) integrin by proprotein convertase PC5 is required for vascular smooth muscle cell adhesion to vitronectin and integrin-dependent signaling*. Circulation, 2004. 109(6): p. 770-6.
60. Campbell ID and Humphries MJ. *Integrin structure, activation, and interactions*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. 3(3).
61. Bergeron E, Basak A, Decroly E, and Seidah NG. *Processing of alpha4 integrin by the proprotein convertases: histidine at position P6 regulates cleavage*. Biochem J, 2003. 373(Pt 2): p. 475-84.
62. Stawowy P KH, Veinot JP, Kilimnik A, Prichett W, Goetze S, Seidah NG, Chrétien M, Fleck E, Graf K. *Endoproteolytic activation of alpha(v) integrin by proprotein convertase PC5 is required for vascular smooth muscle cell adhesion to vitronectin and integrin-dependent signaling*. Circulation 2004. 109: p. 770-776.
63. Louis SF and Zahradka P. *Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion*. Exp Clin Cardiol, 2010. 15(4): p. e75-85.
64. Coppolino MG and Dedhar S. *Bi-directional signal transduction by integrin receptors*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. 32(2): p. 171-88.

65. Faull RJ and Ginsberg MH. *Inside-out signaling through integrins*. J Am Soc Nephrol, 1996. 7(8): p. 1091-7.
66. Qin J, Vinogradova O, and Plow EF. *Integrin bidirectional signaling: a molecular view*. PLoS Biol, 2004. 2(6): p. e169.
67. Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, and Bissell MJ. *Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix*. Science, 1995. 267(5199): p. 891-3.
68. Jan Y, Matter M, Pai JT, Chen YL, Pilch J, Komatsu M, Ong E, Fukuda M, and Ruoslahti E. *A mitochondrial protein, Bit1, mediates apoptosis regulated by integrins and Groucho/TLE corepressors*. Cell, 2004. 116(5): p. 751-62.
69. Ingber DE. *Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology*. Circ Res, 2002. 91(10): p. 877-87.
70. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, and Horwitz AR. *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. 302(5651): p. 1704-9.
71. Hauck CR, Hsia DA, and Schlaepfer DD. *Focal adhesion kinase facilitates platelet-derived growth factor-BB-stimulated ERK2 activation required for chemotaxis migration of vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2000. 275(52): p. 41092-9.
72. Yue TL, McKenna PJ, Ohlstein EH, Farach-Carson MC, Butler WT, Johanson K, McDevitt P, Feuerstein GZ, and Stadel JM. *Osteopontin-stimulated vascular smooth muscle cell migration is mediated by beta 3 integrin*. Exp Cell Res, 1994. 214(2): p. 459-64.
73. Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresh DA, Schwartz SM, and Giachelli CM. *The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro*. J Clin Invest, 1995. 95(2): p. 713-24.
74. Srivatsa SS, Fitzpatrick LA, Tsao PW, Reilly TM, Holmes DR, Jr., Schwartz RS, and Mousa SA. *Selective alpha v beta 3 integrin blockade potently limits neointimal hyperplasia and lumen stenosis following deep coronary arterial stent injury: evidence for the functional importance of integrin alpha v beta 3 and osteopontin expression during neointima formation*. Cardiovasc Res, 1997. 36(3): p. 408-28.
75. Choi ET, Khan MF, Leidenfrost JE, Collins ET, Boc KP, Villa BR, Novack DV, Parks WC, and Abendschein DR. *Beta3-integrin mediates smooth muscle cell*

- accumulation in neointima after carotid ligation in mice.* Circulation, 2004. 109(12): p. 1564-9.
76. Baron JH, Moiseeva EP, de Bono DP, Abrams KR, and Gershlick AH. *Inhibition of vascular smooth muscle cell adhesion and migration by c7E3 Fab (abciximab): a possible mechanism for influencing restenosis.* Cardiovasc Res, 2000. 48(3): p. 464-72.
 77. Seidah NG BS, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chrétien M, Murphy RA. *Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases.* Biochem J, 1996. 314: p. 951-960.
 78. Bresnahan PA, Leduc R, Thomas L, Thorner J, Gibson HL, Brake AJ, Barr PJ, and Thomas G. *Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo.* J Cell Biol, 1990. 111(6 Pt 2): p. 2851-9.
 79. Lee R KP, Teng KK, Hempstead BL. *Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins.* Science, 2001. 294: p. 1945-1948.
 80. Chao MV. *Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways.* Nat Rev Neurosci, 2003. 4(4): p. 299-309.
 81. Levi-Montalcini R. *Growth Control of Nerve Cells by a Protein Factor and Its Antiserum: Discovery of This Factor May Provide New Leads to Understanding of Some Neurogenetic Processes.* Science, 1964. 143(3602): p. 105-10.
 82. Bueker ED. *Implantation of tumors in the hind limb field of the embryonic chick and the developmental response of the lumbosacral nervous system.* Anat Rec, 1948. 102(3): p. 369-89.
 83. Lu B, Pang PT, and Woo NH. *The yin and yang of neurotrophin action.* Nat Rev Neurosci, 2005. 6(8): p. 603-14.
 84. Sofroniew MV, Howe CL, and Mobley WC. *Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair.* Annu Rev Neurosci, 2001. 24: p. 1217-81.
 85. Varon S, Nomura J, and Shooter EM. *Subunit structure of a high-molecular-weight form of the nerve growth factor from mouse submaxillary gland.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1967. 57(6): p. 1782-9.
 86. Angeletti RH and Bradshaw RA. *Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. 68(10): p. 2417-20.
 87. McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, Gunning J, Wlodawer A, and Blundell TL. *New protein fold revealed by a 2.3-Å resolution crystal structure of nerve growth factor.* Nature, 1991. 354(6352): p. 411-4.

88. Edwards RH, Selby MJ, Mobley WC, Weinrich SL, Hrubby DE, and Rutter WJ. *Processing and secretion of nerve growth factor: expression in mammalian cells with a vaccinia virus vector*. Mol Cell Biol, 1988. 8(6): p. 2456-64.
89. Caporali A and Emanuelli C. *Cardiovascular actions of neurotrophins*. Physiol Rev, 2009. 89(1): p. 279-308.
90. Suter U, Heymach JV, Jr., and Shooter EM. *Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF*. EMBO J, 1991. 10(9): p. 2395-400.
91. Bruno MA and Cuello AC. *Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(17): p. 6735-40.
92. Fahnstock M, Michalski B, Xu B, and Coughlin MD. *The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease*. Mol Cell Neurosci, 2001. 18(2): p. 210-20.
93. Pedraza CE, Podlesniy P, Vidal N, Arevalo JC, Lee R, Hempstead B, Ferrer I, Iglesias M, and Espinet C. *Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR*. Am J Pathol, 2005. 166(2): p. 533-43.
94. Huang EJ and Reichardt LF. *Neurotrophins: roles in neuronal development and function*. Annu Rev Neurosci, 2001. 24: p. 677-736.
95. Schlessinger J. *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2000. 103(2): p. 211-25.
96. Hempstead BL. *Commentary: Regulating proNGF action: multiple targets for therapeutic intervention*. Neurotox Res, 2009. 16(3): p. 255-60.
97. Teng KK, Felice S, Kim T, and Hempstead BL. *Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges*. Dev Neurobiol, 2010. 70(5): p. 350-9.
98. Bamji SX, Majdan M, Pozniak CD, Belliveau DJ, Aloyz R, Kohn J, Causing CG, and Miller FD. *The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death*. J Cell Biol, 1998. 140(4): p. 911-23.
99. Frade JM and Barde YA. *Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina*. Neuron, 1998. 20(1): p. 35-41.
100. Volosin M, Trotter C, Cragolini A, Kenchappa RS, Light M, Hempstead BL, Carter BD, and Friedman WJ. *Induction of proneurotrophins and activation of*

- p75NTR-mediated apoptosis via neurotrophin receptor-interacting factor in hippocampal neurons after seizures.* J Neurosci, 2008. 28(39): p. 9870-9.
101. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, Jansen P, Madsen P, Nielsen MS, Jacobsen C, Kliemannel M, Schwarz E, Willnow TE, Hempstead BL, and Petersen CM. *Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death.* Nature, 2004. 427(6977): p. 843-8.
 102. Domeniconi M, Hempstead BL, and Chao MV. *Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death.* Mol Cell Neurosci, 2007. 34(2): p. 271-9.
 103. Esposito D, Patel P, Stephens RM, Perez P, Chao MV, Kaplan DR, and Hempstead BL. *The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor.* J Biol Chem, 2001. 276(35): p. 32687-95.
 104. Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, and Chao MV. *High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor.* Nature, 1991. 350(6320): p. 678-83.
 105. Epa WR, Markovska K, and Barrett GL. *The p75 neurotrophin receptor enhances TrkA signalling by binding to Shc and augmenting its phosphorylation.* J Neurochem, 2004. 89(2): p. 344-53.
 106. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, Wang S, Ibanez CF, Rafii S, and Hempstead BL. *Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization.* Development, 2000. 127(21): p. 4531-40.
 107. Donovan MJ, Hahn R, Tessarollo L, and Hempstead BL. *Identification of an essential nonneuronal function of neurotrophin 3 in mammalian cardiac development.* Nat Genet, 1996. 14(2): p. 210-3.
 108. Creedon D and Tuttle JB. *Nerve growth factor synthesis in vascular smooth muscle.* Hypertension, 1991. 18(6): p. 730-41.
 109. Tessarollo L, Tsoulfas P, Martin-Zanca D, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, and Parada LF. *trkC, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues.* Development, 1993. 118(2): p. 463-75.
 110. Nemoto K, Fukamachi K, Nemoto F, Miyata S, Hamada M, Nakamura Y, Senba E, and Ueyama T. *Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1998. 245(1): p. 284-8.

111. Donovan MJ MR, Kraemer R, McCaffrey TA, Tessarollo L, Mahadeo D, Sharif D, Kaplan DR, Tsoulfas P, Parada L. *Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury*. Am J Pathol 1995. 147: p. 309-324.
112. Chang HY and Yang X. *Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases*. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. 64(4): p. 821-46.
113. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, and Arnheim N. *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Science, 1985. 230(4732): p. 1350-4.
114. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, and Zoric N. *The real-time polymerase chain reaction*. Mol Aspects Med, 2006. 27(2-3): p. 95-125.
115. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, and Patel HR. *Basic principles of real-time quantitative PCR*. Expert Rev Mol Diagn, 2005. 5(2): p. 209-19.
116. Foss DL, Baarsch MJ, and Murtaugh MP. *Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues*. Anim Biotechnol, 1998. 9(1): p. 67-78.
117. Kozera B and Rapacz M. *Reference genes in real-time PCR*. J Appl Genet, 2013. 54(4): p. 391-406.
118. Zhang XD, Gillespie SK, and Hersey P. *Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways*. Mol Cancer Ther, 2004. 3(2): p. 187-97.
119. Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Graiani G, Manni L, and Madeddu P. *Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs*. Circulation, 2002. 106(17): p. 2257-62.
120. Kim H, Li Q, Hempstead BL, and Madri JA. *Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells*. J Biol Chem, 2004. 279(32): p. 33538-46.
121. Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombardo G, Lazarovici P, Zappala G, Pafumi C, and Bernardini R. *Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo*. FASEB J, 2002. 16(10): p. 1307-9.

122. Wang S, Bray P, McCaffrey T, March K, Hempstead BL, and Kraemer R. *p75(NTR) mediates neurotrophin-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells*. Am J Pathol, 2000. 157(4): p. 1247-58.
123. Chen SQ, Cai Q, Shen YY, Cai XY, and Lei HY. *Combined use of NGF/BDNF/bFGF promotes proliferation and differentiation of neural stem cells in vitro*. Int J Dev Neurosci, 2014. 38C: p. 74-78.
124. Chistiakov DA, Orekhov AN, and Bobryshev YV. *Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis*. Acta Physiol (Oxf), 2015. 214(1): p. 33-50.
125. Stawowy P, Margeta C, Kallisch H, Seidah NG, Chretien M, Fleck E, and Graf K. *Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF-beta1 involves furin-convertase*. Cardiovasc Res, 2004. 63(1): p. 87-97.
126. Mowla SJ, Pareek S, Farhadi HF, Petrecca K, Fawcett JP, Seidah NG, Morris SJ, Sossin WS, and Murphy RA. *Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons*. J Neurosci, 1999. 19(6): p. 2069-80.
127. Jean F, Stella K, Thomas L, Liu G, Xiang Y, Reason AJ, and Thomas G. *alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(13): p. 7293-8.
128. Stawowy P MJ, Graf K, Seidah N, Chrétien M, Fleck E, Marcinkiewicz M. *Selective expression of the proprotein convertases furin, pc5, and pc7 in proliferating vascular smooth muscle cells of the rat aorta in vitro*. J Histochem Cytochem 2001. 49: p. 323-332.
129. Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, Arevalo JC, Lee R, Morl K, Meyer M, Hempstead BL, Yoon SO, and Giehl KM. *Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(16): p. 6226-30.
130. Beattie MS, Harrington AW, Lee R, Kim JY, Boyce SL, Longo FM, Bresnahan JC, Hempstead BL, and Yoon SO. *ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury*. Neuron, 2002. 36(3): p. 375-86.
131. Frade JM, Rodriguez-Tebar A, and Barde YA. *Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor*. Nature, 1996. 383(6596): p. 166-8.
132. Casaccia-Bonnel P, Carter BD, Dobrowsky RT, and Chao MV. *Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75*. Nature, 1996. 383(6602): p. 716-9.

133. Campagnolo L, Costanza G, Francesconi A, Arcuri G, Moscatelli I, and Orlandi A. *Sortilin expression is essential for pro-nerve growth factor-induced apoptosis of rat vascular smooth muscle cells*. PLoS One, 2014. 9(1): p. e84969.
134. Hermans-Borgmeyer I, Hermey G, Nykjaer A, and Schaller C. *Expression of the 100-kDa neurotensin receptor sortilin during mouse embryonal development*. Brain Res Mol Brain Res, 1999. 65(2): p. 216-9.
135. Jansen P, Giehl K, Nyengaard JR, Teng K, Lioubinski O, Sjoegaard SS, Breiderhoff T, Gotthardt M, Lin F, Eilers A, Petersen CM, Lewin GR, Hempstead BL, Willnow TE, and Nykjaer A. *Roles for the pro-neurotrophin receptor sortilin in neuronal development, aging and brain injury*. Nat Neurosci, 2007. 10(11): p. 1449-57.
136. Ruit KG, Osborne PA, Schmidt RE, Johnson EM, Jr., and Snider WD. *Nerve growth factor regulates sympathetic ganglion cell morphology and survival in the adult mouse*. J Neurosci, 1990. 10(7): p. 2412-9.
137. Snider WD. *Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us*. Cell, 1994. 77(5): p. 627-38.
138. Belliveau DJ, Krivko I, Kohn J, Lachance C, Pozniak C, Rusakov D, Kaplan D, and Miller FD. *NGF and neurotrophin-3 both activate TrkA on sympathetic neurons but differentially regulate survival and neuritogenesis*. J Cell Biol, 1997. 136(2): p. 375-88.
139. Caporali A, Sala-Newby GB, Meloni M, Graiani G, Pani E, Cristofaro B, Newby AC, Madeddu P, and Emanuelli C. *Identification of the prosurvival activity of nerve growth factor on cardiac myocytes*. Cell Death Differ, 2008. 15(2): p. 299-311.
140. Bono F, Lamarche I, and Herbert JM. *NGF exhibits a pro-apoptotic activity for human vascular smooth muscle cells that is inhibited by TGFbeta1*. FEBS Lett, 1997. 416(3): p. 243-6.
141. Yoon SO, Casaccia-Bonnel P, Carter B, and Chao MV. *Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival*. J Neurosci, 1998. 18(9): p. 3273-81.
142. Kenchappa RS, Zampieri N, Chao MV, Barker PA, Teng HK, Hempstead BL, and Carter BD. *Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons*. Neuron, 2006. 50(2): p. 219-32.
143. Steinle JJ and Granger HJ. *Nerve growth factor regulates human choroidal, but not retinal, endothelial cell migration and proliferation*. Auton Neurosci, 2003. 108(1-2): p. 57-62.

144. Kraemer R, Nguyen H, March KL, and Hempstead B. *NGF activates similar intracellular signaling pathways in vascular smooth muscle cells as PDGF-BB but elicits different biological responses*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(4): p. 1041-50.
145. Chen JC, Lin BB, Hu HW, Lin C, Jin WY, Zhang FB, Zhu YA, Lu CJ, Wei XJ, and Chen RJ. *NGF accelerates cutaneous wound healing by promoting the migration of dermal fibroblasts via the PI3K/Akt-Rac1-JNK and ERK pathways*. *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 547187.
146. Park SY, Avraham H, and Avraham S. *Characterization of the tyrosine kinases RAFTK/Pyk2 and FAK in nerve growth factor-induced neuronal differentiation*. *J Biol Chem*, 2000. 275(26): p. 19768-77.
147. Mills J, Digicaylioglu M, Legg AT, Young CE, Young SS, Barr AM, Fletcher L, O'Connor TP, and Dedhar S. *Role of integrin-linked kinase in nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth*. *J Neurosci*, 2003. 23(5): p. 1638-48.
148. Staniszewska I, Sariyer IK, Lecht S, Brown MC, Walsh EM, Tuszynski GP, Safak M, Lazarovici P, and Marcinkiewicz C. *Integrin alpha9 beta1 is a receptor for nerve growth factor and other neurotrophins*. *J Cell Sci*, 2008. 121(Pt 4): p. 504-13.
149. Urban D, Lorenz J, Meyborg H, Ghosh S, Kintscher U, Kaufmann J, Fleck E, Kappert K, and Stawowy P. *Proprotein convertase furin enhances survival and migration of vascular smooth muscle cells via processing of pro-nerve growth factor*. *J Biochem*, 2013. 153(2): p. 197-207.
150. Seidah NG, Sadr MS, Chretien M, and Mbikay M. *The multifaceted proprotein convertases: their unique, redundant, complementary, and opposite functions*. *J Biol Chem*, 2013. 288(30): p. 21473-81.
151. Roebroek AJ, Umans L, Pauli IG, Robertson EJ, van Leuven F, Van de Ven WJ, and Constam DB. *Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin*. *Development*, 1998. 125(24): p. 4863-76.
152. Bassi DE, Lopez De Cicco R, Mahloogi H, Zucker S, Thomas G, and Klein-Szanto AJ. *Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(18): p. 10326-31.
153. Bassi DE, Fu J, Lopez de Cicco R, and Klein-Szanto AJ. *Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression*. *Mol Carcinog*, 2005. 44(3): p. 151-61.
154. Sounni NE, Baramova EN, Munaut C, Maquoi E, Frankenne F, Foidart JM, and Noel A. *Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in*

A2058 melanoma cells is associated with MMP-2 activation and increased tumor growth and vascularization. Int J Cancer, 2002. 98(1): p. 23-8.

155. De Vos L, Declercq J, Rosas GG, Van Damme B, Roebroek A, Vermorken F, Ceuppens J, van de Ven W, and Creemers J. *MMTV-cre-mediated fur inactivation concomitant with PLAG1 proto-oncogene activation delays salivary gland tumorigenesis in mice.* Int J Oncol, 2008. 32(5): p. 1073-83.
156. Scamuffa N, Siegfried G, Bontemps Y, Ma L, Basak A, Cherel G, Calvo F, Seidah NG, and Khatib AM. *Selective inhibition of proprotein convertases represses the metastatic potential of human colorectal tumor cells.* J Clin Invest, 2008. 118(1): p. 352-63.

7 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

(c)DNA	<i>(complementary-)deoxyribonucleic acid</i> = (komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
(m)RNA	<i>(messenger-)ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
(β-)NGF	<i>(beta-)nerve growth factor</i>
Akt	Protein-Kinase B
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> = Bicinchoninsäure
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CM	<i>conditioned medium</i>
C _T	<i>threshold cycle</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dec-CMK	Decanoyl-RVKR-Chlormethylketon = decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg- Chlormethylketone
DMEM	<i>Dulbecco´s modified Eagle medium</i>
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> = Enzymimmunoassay
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanat</i>
FKS	Fetales Kälberserum
Gly	Glycin
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure

HPF	<i>high power field</i> = Hauptgesichtsfeld
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HRP	<i>horseradish</i> -Peroxidase
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
mAb	<i>monoclonal antibody</i> = monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>Ras/Raf-mitogen activated protein kinase</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
MMP(s)	Matrix-Metalloproteinase(n)
NF-κB	<i>nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B</i>
NM-B MHC	<i>non-muscle-type myosin heavy chain</i>
NT(s)	Neurotrophin(e)
p75NTR	p75-Neurotrophin-Rezeptor
pAb	<i>polyconal antibody</i> = polyklonaler Antikörper
PACE4	<i>paired basic amino acid cleaving enzyme 4 = PC6</i>
PBMC(s)	<i>peripheral blood monocyte(s)</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PC(s)	Proprotein Convertase(n)
PCSK9	<i>Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
proNGF	<i>pro nerve growth factor</i>
proNGF mt	<i>proNGF mutant</i> = mutantes proNGF
PTCA	<i>percutaneous transluminal coronary angioplasty</i> , percutane transluminale Koronarangioplastie
Pyr-RTKR-AMC	Pyroglutaminsäure-Arginin-Threonin-Lysin-Arginin-7-Amino-4- Methylcoumarin
(q)RT-PCR	(Quantitative) Real-Time Polymerase Kettenreaktion
RGD	Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp
SD	Standardabweichung

SDS	Natriumdodecylsulfat
SKI-1/S1P	<i>Subtilisin/Kexin-Isoenzym 1/ Site-1-Protease</i>
SMC(s)	<i>smooth muscle cell(s)</i>
SM-MHC	<i>smooth muscle myosin heavy chain</i>
SM- α A	<i>smooth muscle α-actin</i>
TBST	<i>Tris Buffered Saline with Tween</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-Rezeptor	Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptoren/FAS
TrkA	Tyrosin-Kinase-Rezeptor A
TsTmSMC	<i>temperature sensitive mouse smooth muscle cell</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VSMC(s)	<i>vascular smooth muscle cell(s)</i> , glatte Gefäßmuskelzelle(n)
wt	<i>wild type</i> = Wildtyp
alpha1-PDX	alpha-1-Antitrypsin Portland

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Beispielhafter Amplifikationsplot der Gene TrkA, NGF, HPRT, Furin, p75NTR und TGF- β in stimulierten VSMCs. - 45 -
- Abbildung 2:** Einfluss von PDGF-BB und TGF- β 1 auf die mRNA- und Protein-Expression von NGF. - 48 -
- Abbildung 3:** Einfluss von PDGF-BB und TGF- β 1 auf die Expression und Aktivität von Furin. - 50 -
- Abbildung 4:** Furin führt zu einer Aktivierung von proNGF zu β -NGF. - 53 -
- Abbildung 5:** Furin-Inhibition führt zu einer gesteigerten Sekretion von proNGF bei gleichzeitiger Reduktion der β -NGF-Sekretion in proliferierenden VSMCs. - 55 -
- Abbildung 6:** Einfluss von PDGF-BB und TGF- β 1 auf die Expression von Neurotrophin-Rezeptoren in VSMCs. - 57 -
- Abbildung 7:** Einfluss von β -NGF und proNGF auf die Proliferation von VSMCs. - 59 -
- Abbildung 8:** Einfluss von proNGF und β -NGF auf die Apoptose in VSMCs. - 61 -
- Abbildung 9:** Einfluss der Furin-abhängigen β -NGF-Sekretion auf die Migration von VSMCs. - 66 -
- Abbildung 10:** NGF induziert die Ausbildung von *focal adhesion sites*. - 69 -
- Abbildung 11:** β -NGF-Stimulation führt zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung von Akt, ERK1/2 und Paxillin in VSMCs. - 71 -
- Abbildung 12:** NGF induziert Zellmigration via PI3K/Akt und Integrin-Aktivierung. - 73 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Primärantikörper.....	- 25 -
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper	- 25 -
Tabelle 3: Übersicht der Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer	- 26 -
Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Trenngele (Mengenangaben für 2 Trenngele)	- 32 -
Tabelle 5: Zusammensetzung des verwendeten Sammelgels (Mengenangaben für 2 Sammelgele)	- 32 -
Tabelle 6: Thermoprofil für die quantitative <i>real-time</i> -PCR	- 44 -
Tabelle 7: Ergebnisse der Checkerbox-Experimente zur Untersuchung der chemotaktischen Wirkung von proNGF und β -NGF auf VSMCs.	- 64 -

Curriculum vitae und Publikation

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Janina Sigrid Kohlhaas, geb. Lorenz, hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Urban D, **Lorenz J**, Meyborg H, Ghosh S, Kintscher U, Kaufmann J, Fleck E, Kappert K, and Stawowy P. *Proprotein convertase furin enhances survival and migration of vascular smooth muscle cells via processing of pro-nerve growth factor*. J Biochem, 2013. 153(2): p. 197-207.

Beitrag im Einzelnen: Beteiligt an der Erhebung der Primärdaten, eigenständige Durchführung von *in vitro* Experimenten (unter anderem Western-Blot-Experimente, Migrationsexperimente, verschiedene ELISA, Immunfluoreszenz-Experimente, Furin-Aktivitätsassay), Mitwirkung bei qRT-PCR-Experimenten sowie der anschließenden Auswertung der Primärdaten.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Janina Sigrid Kohlhaas, geb. Lorenz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Furin reguliert die Funktion von glatten Gefäßmuskelzellen durch die Aktivierung von Pro-Nerve Growth Factor zu Nerve Growth Factor* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Philipp Stawowy, Leiter der Arbeitsgruppe experimentelle Kardiologie des Deutschen Herzzentrum Berlin, für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit, die inhaltliche und organisatorische Betreuung sowie seine geduldige Unterstützung. Zudem möchte ich mich für zahlreiche Anregungen und Hilfestellungen sehr herzlich bedanken.

Herrn Dr. med. Daniel Urban danke ich für wichtige Hilfestellungen und die fortwährende Unterstützung während der Durchführung der Arbeit.

Frau Dipl. Ing. Heike Meyborg danke ich für die ausführliche Einarbeitung in die experimentellen Techniken, ihre engagierte Mitarbeit und Hilfe in allen labortechnischen Fragen sowie ihre freundliche, motivierende Art.

Auch meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere meinem Ehemann Robert möchte ich für ihre Liebe, Motivation und Geduld danken.