

1. Einleitung

1.1. Apoptose

Vielzellige Lebewesen sind oft in der Situation, sich von Zellen, die überflüssig, potentiell gefährlich oder einfach im Weg sind, befreien zu müssen. Für diesen Zweck benutzen sie einen aktiven molekularen Mechanismus, den programmierten Zelltod. Vielfach untersucht und benannt, wurde letztlich 1972 der Begriff Apoptose von Currie und seinen Kollegen geprägt.¹

Die Apoptose erlaubt dem Organismus, seine Zellanzahl und Gewebsgröße streng zu kontrollieren und sich selbst vor gefährlichen, die Homöostase gefährdenden Zellen zu schützen, und nimmt eine genauso wichtige Stellung wie Zellteilung und Zellmigration ein. Gemeinsames Merkmal dieser sterbenden Zellen sind morphologische Veränderungen, wie Blasenbildung der Zellmembran (*blebbing*), Schrumpfen des Zellkörpers (*shrinking*), Fragmentation des nukleären Genoms und Chromatinaggregation, die in ihrem Erscheinungsbild von den Merkmalen des pathologisch, nekrotischen Zelltodes abweichen, woraus ein endogenes, konserviertes Zelltodprogramm geschlussfolgert wurde.² Dieser Zellprozess kann durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst werden, wie z.B. Zytokine, Entzug von hormonellen und Wachstumsfaktoren, metabolischer und oxidativer Stress, immunologische Intoleranz von transplantierten Zellen und Geweben, Schäden am Zellgenom und verschiedenen Organellen als Resultat einer Exposition gegenüber natürlichen oder synthetischen zytotoxischen Substanzen, ultraviolette oder ionisierende Strahlung und pathogene Mikroorganismen und Parasiten.

1.1.1. Caspasen – Aufbau, Wirkung und Aktivierung

Viele der morphologischen Veränderungen der Apoptose werden durch eine Gruppe von Cystein-Proteasen verursacht, die spezifisch in apoptotischen Zellen aktiv sind. Diese Proteasen sind zueinander homolog und gehören zu der großen Familie der Caspasen,³ deren Name aus dem Term *cysteinyll-directed aspartate-specific protease* gebildet wurde. Caspasen sind evolutionär konserviert und sind daher im Menschen bis hin zu Insekten und Nematoden zu finden.⁴⁻⁶

Caspasen sind für die meisten sichtbaren Veränderungen verantwortlich, die den apoptotischen Zelltod charakterisieren. Daher kann man sie auch als zentrale Exekutive dieses Prozesses bezeichnen. Tatsächlich kann man durch Elimination der Caspasenaktivität, entweder durch Mutation oder durch den Gebrauch von pharmakologischen Inhibitoren, die Apoptose verlangsamen oder inhibieren.⁶

Alle bisher bekannten Caspasen besitzen ein Cystein in ihrem katalytisch aktiven Zentrum und spalten ihr Substrat nach Asparaginsäure-Resten an den Asp-Xxxx Bindungen, woraus die Begriffsbildung Caspase resultierte. Die jeweilige Substratspezifität der einzelnen Caspase wird über die vier amino-terminalen Aminosäuren neben der Spaltstelle definiert.⁷ Aufgrund ihrer Substratpräferenz, Ausmaß der Identität ihrer Sequenz und strukturellen Ähnlichkeiten, hat man die Caspasen in weitere Unterfamilien unterteilt, wie z.B. nicht-apoptotische (Caspase-4, -5, -11), Initiator-Caspasen (Caspase-8, -9, -10) und Effektor-Caspasen (Caspase-2, -3, -6, -7).⁸

Die Aktivierung von Caspasen führt zu einer selektiven Degradation von zellulären Zielproteinen. Dies führt entweder zur Inaktivierung bzw. Aktivierung des jeweiligen Proteins, woraus eine koordinierte Reihenfolge resultiert. Im bisherigen Rahmen der Apoptoseforschung hat man viele wichtige Substrate der Caspasen identifizieren können. Eine der Entdeckungen war die für die Entstehung der nukleosomalen Leiter verantwortliche Nuklease. Dabei wird die genomische DNA zwischen den Nukleosomen geschnitten und Fragmente, die Vielfache von 180 Basenpaaren darstellen, gebildet. Diese Nuklease, heute bekannt als Caspasen-aktivierte DNase oder CAD, existiert in lebenden Zellen als inaktive Vorstufe, deren inhibitorische Untereinheit durch die aktive Form der Caspase-3 abgespalten wird und somit die katalytische Untereinheit aktiviert.⁹⁻¹² Ebenso sind auch andere charakteristische Merkmale der Apoptose durch Caspasen vermittelt. Das nukleäre Schrumpfen wird durch die Spaltung von nukleärem Laminin bedingt. Der Verlust der allgemeinen Zellform wird durch die Spaltung von Proteinen des Zytoskeletts, wie Fodrin und Gelsolin, verursacht, und die konstitutive Aktivierung von PAK2 durch die Abspaltung der negativ regulatorischen Untereinheit vermittelt die charakteristische Blasenbildung der Membran (*membrane blebbing*).¹³⁻¹⁶

Wie viele andere Proteasen werden auch Caspasen als inaktive, enzymatisch inerte Zymogene, die Procaspasen, synthetisiert. Diese sind aus drei Domänen - die N-terminale Prodomäne, die p20- und die p10-Domäne, welche beide in dem reifen Enzym wiederzufinden sind - aufgebaut. Jede lebensfähige Zelle ist stets mit einer ausreichenden Menge an Procaspasen ausgestattet, um rapide den eigenen Zelltod zu induzieren.⁸ Bisher untersuchte aktive Caspasen zeigen den Aufbau eines Heterotetramers, bestehend aus zwei p20-p10-Heterodimeren und zwei aktiven Zentren.⁶

Für die Aktivierung der Caspasen wurden drei generelle Aktivierungsmechanismen postuliert. Die meisten Caspasen werden durch die Spaltung zwischen sowohl der p20- und der p10-Domäne als auch der Prodomäne und der p20-Domäne, welche durch eine vorangegangene aktivierte Caspase vermittelt wird, aktiviert. Diese Strategie der Kaskade als Aktivierung von Caspasen wird von den Zellen extensiv für die Aktivierung der kurzen Prodomän-Caspasen, Caspase-3, -6 und -7, genutzt. Die drei down-stream gelegenen Effektor-Caspasen werden als die „Arbeitstiere“ der Caspasenfamilie gesehen und sind daher häufiger vorhanden und aktiver als ihre langen Prodomän-Caspasen-Verwandten.¹⁷ Für die beiden Initiator-Caspasen, Caspase-8 und -9, werden die Modelle der induzierten Nähe und der Assoziation mit einer regulatorischen Einheit beschrieben. Das Modell der induzierten Nähe postuliert, dass unter Bedingung einer lokalen hohen Konzentration des Zymogens die schwache intrinsische Proteasenaktivität der Procaspase-8 ausreicht, um sich gegenseitig zu spalten und sich damit zu aktivieren.¹⁸ Caspase-9 benötigt als Schlüsselbedingung die Assoziation mit einem bestimmten Protein als Ko-Faktor - *apoptotic protease activating factor-1* (Apaf-1) - und man geht heute davon aus, dass dieser Komplex die aktive Form der Caspase-9 darstellt.¹⁹ Dementsprechend stellt Apaf-1 nicht nur einen Aktivator der Caspase-9 dar, sondern ist eine essentielle Untereinheit des Caspase-9-Holoenzym, dem Apoptosom (siehe 1.1.5.). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Effektor-Caspasen proteolytisch durch eine aufwärts gelegene Caspase aktiviert werden, wohingegen die Initiator-Caspasen durch regulatorische Protein-Protein-Interaktionen und Autoproteolyse aktiviert werden.

Die Aktivität der Caspasen wird durch die entgegengesetzten Effekte von Aktivatoren und Inhibitoren gesteuert. Die Transmission des apoptotischen Exekutionssignals

erfolgt durch sequentielle oder parallele Aktivierung der Procaspasen entweder durch den extrinsischen oder den intrinsischen Aktivierungsweg.

In jeder gesunden Zelle sind die pro- und anti-apoptotischen Komponenten der Apoptose konstitutiv enthalten, um im Falle der Beschädigung sofort und schnell den apoptotischen Prozess einleiten zu können. Dementsprechend ist die Kontrolle der Caspasen-Aktivierung durch bereits existierende Inhibitoren streng reguliert. Im Falle einer koordinierten Beseitigung von spezifischen Zellen eines Gewebes sowie der synchronen Entfernung einer großen Zellzahl während der Entwicklung, Metamorphose oder des Gewebs-Remodeling, findet ebenfalls eine transkriptionelle Regulierung der Schlüsselkomponenten der Apoptose statt. Eine Veränderung der Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren ist dabei von gravierender Bedeutung in der Regulation der Apoptose. Vielfältige Faktoren, wie Hormone, Wachstumsfaktoren oder cytotoxische Einflüsse, kontrollieren diese Balance. Dabei agieren Hormone und Zytokine oft als Überlebensfaktoren, deren Entfernung die Expression von apoptotischen Genen oder die Repression von anti-apoptotischen Genen kontrolliert.²⁰

1.1.2. Die extrinsische apoptische Kaskade

Je nach apoptotischen Stimuli und nachfolgend aktivierter Caspasen können verschiedene apoptotische Wege unterschieden werden. Am Anfang der extrinsischen apoptotischen Kaskade steht die Bildung des *death-inducing signalling complex* (DISC), einem multimerischen Protein-Komplex.²¹⁻²⁴ Nach Bindung des jeweiligen Liganden aggregieren die sogenannten *death receptors*, wie der Fas-Rezeptor (Fas), und bilden einen membrangebundenen Signalkomplex. Dieser Komplex rekrutiert die *Fas-associated death domain* (FADD) aus dem Zytosol, die wiederum Procaspase-8-Moleküle aus dem Zytosol bindet.²²⁻²⁴

Caspase-8 besitzt lange Pro-Domänen mit zwei sich wiederholenden *death effector domains* (DED), welche die Interaktion mit der FADD als Adaptormolekül ermöglichen.^{25,26} FADD enthält ebenfalls eine DED sowie eine *death domain* (DD), die mit den *death receptors* geteilt wird, wodurch die Interaktion zwischen Rezeptor und FADD erfolgt.

Nach Bildung des DISC und der autoproteolytischen Aktivierung der Procaspase-8 nach dem Prinzip der Nähe-induzierten Aktivierung dissoziiert die aktivierte Form von Caspase-8 ins Cytosol²¹⁻²⁴ und aktiviert dort Effektor-Caspasen, wie Caspase-3 und -7.^{27,28} In Abbildung 1.1 ist die extrinsische apoptotische Kaskade zusammenfassend dargestellt.

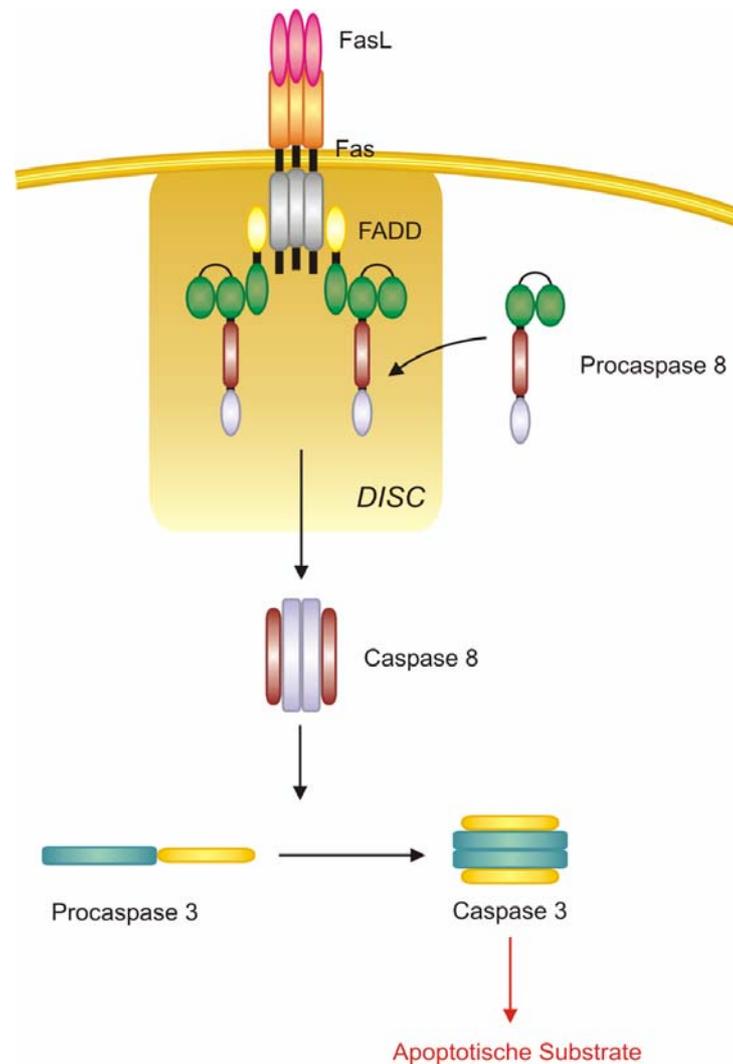


Abbildung 1.1: Signalweg der extrinsischen apoptotischen Kaskade.

1.1.3. Fas und FasLigand – Schlüssel und Schloß zur extrinsischen apoptotischen Kaskade

Der Fas-Rezeptor (Fas) gehört der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Familie an, die nach Bindung zu ihren Liganden die extrinsische apoptotische Kaskade aktivieren.²⁹ Der Rezeptor ist ubiquitär exprimiert, ganz im Gegensatz zu seinem Liganden, Fas Ligand (FasL). Dieser Ligand ist ein membrangebundenes Typ-II-Protein, das typischerweise auf inflammatorischen Zellen und deren Kontaktzellen zu finden ist.³⁰⁻³⁴

Sowohl Fas als auch sein Ligand FasL wurde in der gesunden und pathologischen Gefäßwand nachgewiesen und es wird angenommen, dass Fas-vermittelte Apoptose ein Merkmal der Atherogenese³⁵⁻³⁷, der atherosklerotischen Plaque-Instabilität³⁸, der Fremdtransplantat-bedingten Arteriopathie³⁹ und der akuten inflammatorischen Antwort auf Zytokine⁴⁰ ist.

Viele Studien haben die Rolle des Fas-vermittelten Zelltodes in Blutgefäßen untersucht.^{41,42} So findet man eine hohe Protein-Expression von Fas auf glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC), ohne Unterschied zwischen ruhenden als auch proliferierenden VSMC, wohingegen Endothelzellen (EC) kaum diesen Rezeptor exprimieren. Bei der Expressionsverteilung von FasL zeigt sich ein umgekehrtes Bild. Auf der Oberfläche von EC zu finden, kann man FasL auf VSMC trotz vorhandener mRNA nicht nachweisen, vermutlich als Folge einer postranskriptionellen Kontrolle. Für die Induzierung von Apoptose mittels des Fas-FasL-Weges in VSMC reicht die alleinige Stimulierung mit der löslichen Form von FasL bzw. eines anti-Fas-Antikörpers nicht zur Induzierung des Zelltodes aus, d.h. die Ko-Stimulation eines Proteininhibitors, wie Cycloheximid, oder inflammatorische Mediatoren, wie Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interferon-gamma (IFN- γ) oder Interleukin-1 (IL-1), sind zusätzlich erforderlich. In VSMC kann nur über die potentere membrangebundene Form von FasL die Apoptose ausgelöst werden. In EC kann weder mit der löslichen noch der membrangebundenen Variante von FasL Apoptose induziert werden. Obwohl die Fas-Rezeptor-Expression durch Stimulation mit Zytokinen, wie IFN- γ und TNF- α , auf EC stimuliert werden konnte, blieb die bereits hohe Expression auf VSMC davon unberührt.⁴¹

In Ko-Kultur-Experimenten aus Immunzellen und VSMC vermögen Makrophagen über direkten Zellkontakt bzw. Zellnähe Apoptose in VSMC durch Aktivierung des Fas-

FasL-Interaktionsweges auszulösen. Dabei reagiert der auf der Oberfläche der Makrophagen exprimierte FasL mit dem Fas-Rezeptor der VSMCs.⁴³

1.1.4. Stickstoffoxid - Involvierung in apoptotischen Mechanismen

Vaskuläre Zellen werden durch Stickstoffoxid (NO) auf den Ebenen der Replikation, Transkription, Translation, posttranslationelle Modifikation von Proteinen und Proteinfunktion beeinflusst.⁴⁴

Die Synthese von NO erfolgt in der Vaskulatur durch die Stickstoffoxid-Synthasen (nitric oxide synthases, NOS). Dabei unterscheidet man die neuronale NOS (nNOS), die induzierbare NOS (iNOS) und die endotheliale NOS (eNOS). Alle drei Formen katalysieren die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und NO. Die NO-Synthese durch eNOS resultiert in der Produktion von zytoprotektiven nanomolaren Konzentrationen von NO, die essentiell für die Regulation der vaskulären Homöostase sind. Der Substratfluss durch iNOS allerdings resultiert in der Produktion von mikromolaren Konzentrationen von NO, die mit den zytotoxischen Effekten von NO verbunden sind, und letztlich zu vaskulärer Pathologie führen.⁴⁴

Bedingt durch die Hochregulation der Expression des Fas-Rezeptors auf der Zelloberfläche von VSMC sowie der Expression von FasL auf Makrophagen, kann NO aktiv die Apoptose von VSMC fördern.^{45,46} Mediale VSMC exprimieren Fas hauptsächlich intrazellulär im Golgi-Komplex,^{43,47} und erst die Translokation zur Zelloberfläche durch NO ermöglicht die Bindung zu FasL. Makrophagen vermögen nach Stimulation während immunologischer bzw. inflammatorischer Reaktionen große Mengen von NO für mehrere Tage zu produzieren.^{48,49} Die Ko-Lokalisation von FasL und iNOS in Makrophagen als auch die NO-abhängige Expression von FasL auf der Zelloberfläche von Makrophagen⁴⁵ verdeutlichen ebenfalls die wichtige Rolle von NO in der Induktion des extrinsischen apoptotischen Signalweges in VSMC mittels Makrophagen. Dieser Effekt kann noch weiter durch TNF- α über eine autokrine Hochregulation von iNOS und FasL in Makrophagen als auch durch einen synergistischen Angriff von FasL und TNF- α an den *death receptors* verstärkt werden.⁵⁰ Weitere Faktoren in der Funktion von NO als pro-apoptotischer Modulator sind die Aktivierung der intrinsischen apoptotischen Signalkaskade durch eine p53-bedingte

Erhöhung des Bax/Bcl-X_L-Verhältnisses,⁵¹ als auch die Aktivierung verschiedener Kinasen, wie c-Jun N-terminale Kinase (JNK), Stress-aktivierte Protein-Kinase (SAPK) und p38-Kinase, mit nachfolgender Caspase-3-Aktivierung.^{49,52,53} Die Expression von iNOS ist auf der transkriptioneller Ebene durch Zytokine, wie IL-1 β , IFN- γ und TNF- α , und mikrobielle Produkte reguliert.⁵⁴⁻⁵⁸

1.1.5. Die intrinsische apoptotische Kaskade

Die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Cytosol stellt ein wichtiges intrazelluläres Todessignal dar und markiert den Anfangspunkt der intrinsischen apoptotischen Kaskade. Dieser Prozess kann durch C-terminale proteolytische Fragmente von Bid, dem sogenannten t(c)-Bid,⁵⁹⁻⁶¹ die pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder, wie Bax, Bad und Bak,⁶¹ Caspasen⁶² und weitere verschiedene molekulare und physikalische Stimuli erfolgen, die direkt oder indirekt die Mitochondrien angreifen.^{63,64} Einmal freigesetzt ins Zytosol, induziert Cytochrom C die Bildung eines multimerischen Proteinkomplexes - das Apoptosom. Dabei erfolgt zunächst die durch Cytochrom C und dATP/ATP-induzierte Hepta-Oligomerisation von Apaf-1-Monomeren, die wiederum sieben Dimere von Procaspase-9 Molekülen rekrutieren.^{19,65-67} Die Apoptosom-assoziierte Procaspase-9 unterläuft einer proteolytischen Autoprozessierung und wird teilweise ins Zytosol freigesetzt.^{19,66,67} Der gebundene Anteil von Caspase-9 führt die Prozessierung von weiteren Procaspase-9-Molekülen aus, als auch die effiziente Spaltung und Aktivierung der Vorstufen der Effektor-Caspasen Caspase-3 und -7 (Abbildung 1.2).^{19,65-68}

Caspase-9 enthält in ihrer langen Prodomäne ein Protein-Protein-Interaktions-Modul, die sogenannte *caspase recruitment domain* (CARD). Diese Domäne ermöglicht Caspase-9 die Interaktion mit Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor), allerdings nur in der Gegenwart von Cytochrom C und dATP/ATP. Die Bindung von dATP/ATP und nachfolgender Hydrolyse katalysiert Konformationsänderungen, die zur Exposition der CARD nötig sind.

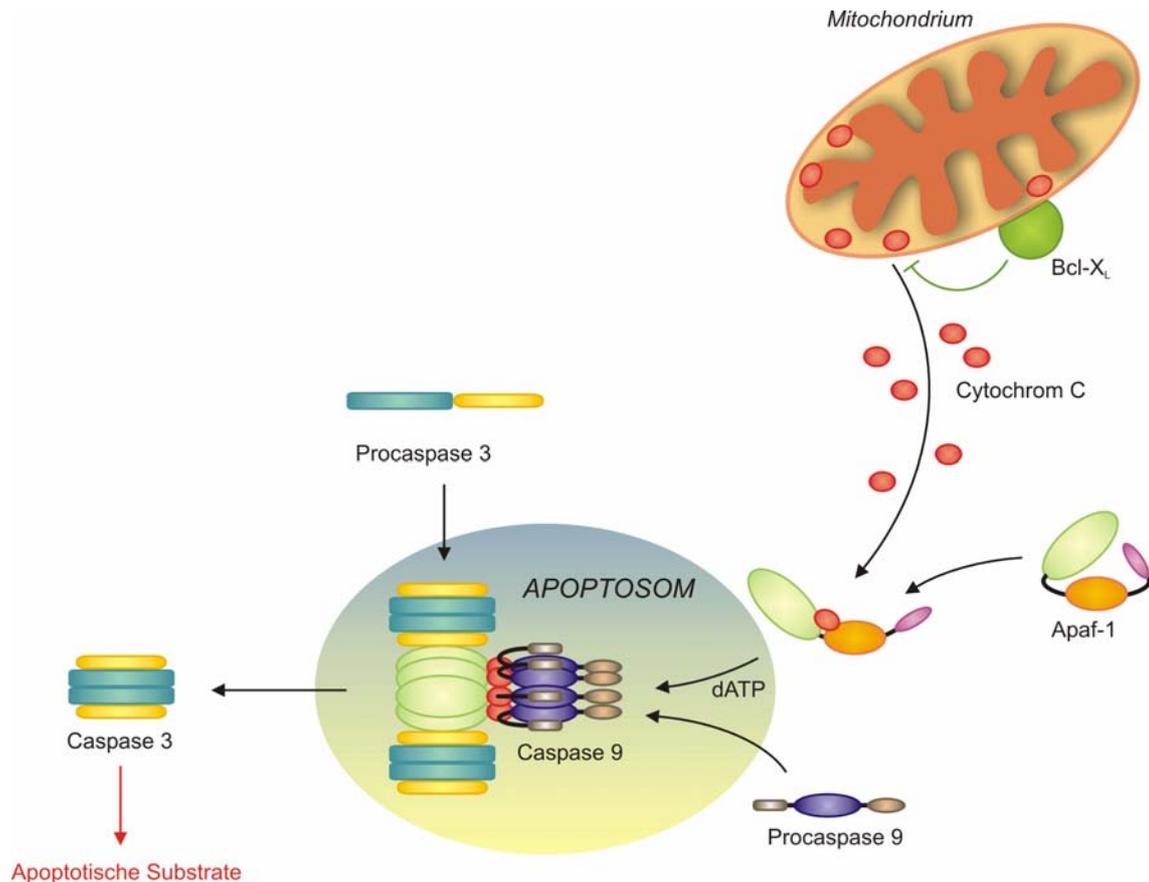


Abbildung 1.2: Signalweg der intrinsischen apoptotischen Kaskade.

1.1.6. Die Bcl-2 Familie – Mit- und Gegenspieler der intrinsischen apoptotischen Kaskade

Die Proteine der Bcl-2-Familie sind durch Regulation der Permeabilisation der äußeren mitochondrialen Membran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) Mediatoren des Mitochondrien-abhängigen Signaltransduktionsweges.⁶⁹⁻⁷³ Aufgrund ihrer Bcl-2-Homologie-Domänen (BH-Domänen) und den resultierenden Funktionen kann man sie in drei Gruppen einteilen (Abbildung 1.3). Die anti-apoptotischen Mitglieder, wie Bcl-2 und Bcl-X_L, enthalten vier BH-Domänen, BH1 bis BH4. Die pro-apoptotischen Vertreter der Familie, wie Bax und Bak, besitzen drei BH-Domänen, BH1 bis BH3. Die pro-apoptotischen Proteine der letzten Gruppe, wie Bad, Bid und Bim, haben schließlich nur noch die BH3-Domäne gemeinsam.⁷³ Über ihre BH-

Domänen besteht für diese Proteine die Möglichkeit Homo- bzw. Heterokomplexe zu bilden, und sie übernehmen so verschiedene Rollen bei der Regulation der MOMP.

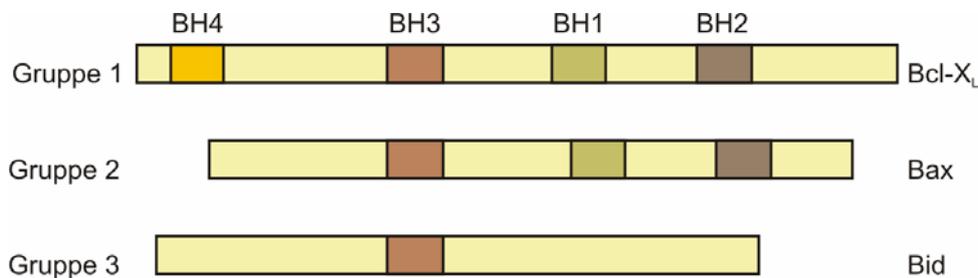


Abbildung 1.3: Aufbau der Bcl-2-Familien-Mitglieder [17].

Die Vertreter Bax und Bak sind essentiell für die MOMP, wie Experimente in doppeldefizienten Zellen gezeigt haben.⁷² Sie führen durch Porenbildung in der Membran zur Freisetzung von kleinen pro-apoptotischen Molekülen, wie z.B. Cytochrom C,⁷⁴ Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI*)⁷⁵ und Apoptose-induzierender Faktor (AIF),⁷⁶ was letztlich zu Caspasen-abhängigen und Caspasen-unabhängigen apoptotischen Signalwegen führt.^{77,78}

Als Gegenspieler treten Bcl-X_L und Bcl-2 in Erscheinung, welche die Translokation und nachfolgende Oligomerisation von Bax/Bak inhibieren, und deren Überexpression die MOMP stoppen kann.⁷³ Bcl-X_L inhibiert desweiteren die Bildung des DISC, wie auch die Aktivierung und Prozessierung von Bid,⁷⁹ was auf eine Involvierung in der extrinsischen apoptotischen Kaskade.

Der Gruppenvertreter Bid wird allgemein als wichtigste Verbindung zwischen dem extrinsischen und intrinsischen apoptotischen Signalweg gesehen. So vermag die aktive Caspase-8 Bid proteolytisch zu spalten und zu aktivieren. Das C-terminale Fragment von Bid, das sogenannte geschnittene Bid (truncated Bid, tBid), kann nachfolgend die Freisetzung von Cytochrom C fördern.⁸⁰ Bid kann ebenfalls von Cathepsinen, Granzym B und c-Jun N-terminale Kinase aktiviert werden (Abbildung 1.4).⁸¹⁻⁸⁴

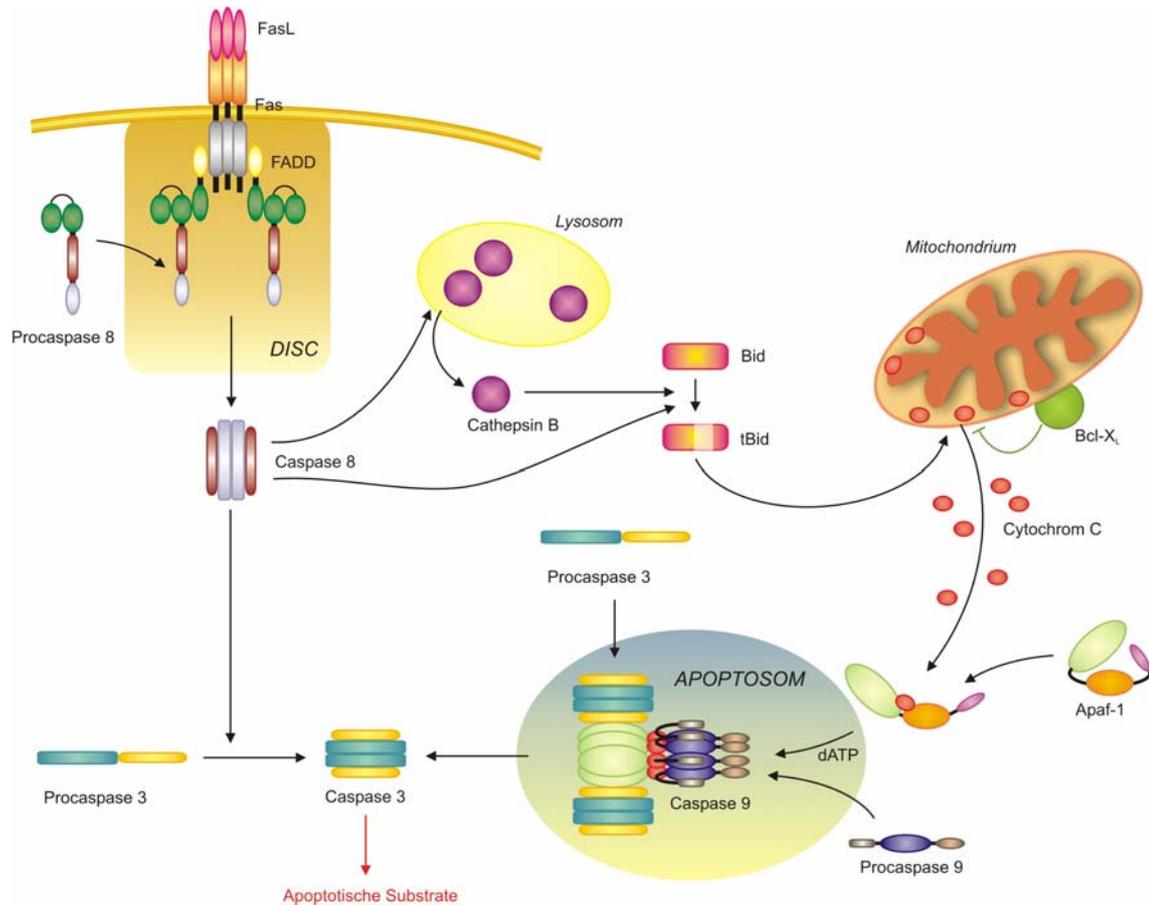


Abbildung 1.4: Verknüpfung zwischen den Signalwegen der extrinsischen und intrinsischen apoptotischen Kaskade.

Momentan wird vom Modell des *switched rheostat* ausgegangen (Abbildung 1.5). Dabei stellen Bax und Bak die positiven Effektoren des Systems dar, die von den anti-apoptotischen Verwandten Bcl-X_L und Bcl-2 inhibiert werden können. Weiterhin muss die Bax/Bak-vermittelte MOMP durch direkte Aktivatoren, wie die BH3-Proteine Bid oder Bim ausgelöst werden, die ebenfalls von den anti-apoptotischen Vertretern blockiert werden können.⁸⁵ Weiterhin agieren BH3-Proteine durch kompetitive Bindung an die anti-apoptotischen Proteine auch als Derepressoren.⁸⁶⁻⁸⁸

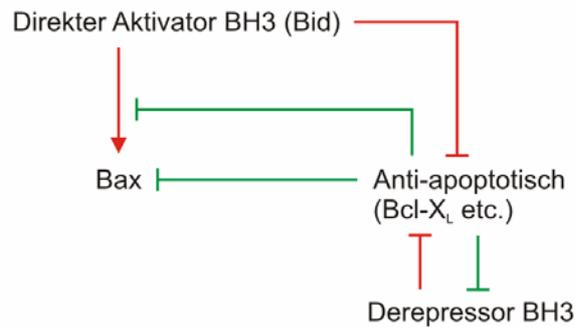


Abbildung 1.5: Modell des „wechselnden Regelwiderstandes“ der Bcl-2-Familien-Proteine [89].

1.1.7. Die physiologischen Cystein-Proteasen-Inhibitoren

Die physiologische Aktivität von Cystein-Proteasen wird durch die Interaktion mit verschiedenen Proteininhibitoren reguliert. Eine Störung der Homöostase aus Protease und Inhibitor führt nicht selten zu pathologischen Veränderungen, die sich z.B. in der Entstehung von Tumoren oder neurodegenerativen Veränderungen äußert. Dabei kommt den Proteasen-Inhibitoren nicht nur eine wichtige Rolle in der endogenen Kontrolle der Aktivität von Proteasen zu, sondern ebenfalls in der Bekämpfung der durch Pathogene, wie z.B. Viren, Bakterien oder Parasiten, freigesetzten Proteasen, welche die Verteidigungsmechanismen des Zielorganismus angreifen sollen. Der erste isolierte und charakterisierte Inhibitor war Cystatin, der Pate für den Namen der Superfamilie der strukturell verwandten Proteine der Cystein-Proteasen-Inhibitoren stand. Momentan wird die Familie basierend auf ihrer Sequenzhomologie in drei Untergruppen unterteilt: Familie I wird aus den Stefinen, Familie II aus den Cystatinen und Familie III aus den Kininogenen gebildet.⁹⁰⁻⁹³

Stefine der Familie I werden primär intrazellulär, wie in Epithelzellen und polymorphen-nukleären Leukozyten, angetroffen, obwohl sie auch in extrazellulären Flüssigkeiten nachgewiesen wurden. Ihre defensive Rolle umfasst die Inhibierung von Cystein-Proteasen, die von eindringenden Pathogenen produziert werden. So wird Stefin A mit den bakteriostatischen Eigenschaften der Haut in Verbindung gebracht.⁹⁴⁻⁹⁶ Eine Stefin B-Defizienz im Mausmodell äußerte sich in dem apoptotischen Verlust von Körnerzellen des Kleinhirns.⁹⁷

Die Mitglieder der Familie II, die Cystatine, sind in hohen Konzentrationen in den Körperflüssigkeiten zu finden. Der bekannteste Vertreter dieser Unterfamilie ist das

humane Cystatin C. Trotz seiner weiten Verbreitung im Körper zeigen sich besonders hohe Konzentrationen in der Samenflüssigkeit, in der zerebrospinalen Flüssigkeit und der Milch,^{98,99} woraus man auf eine regulatorische und defensive Rolle gegenüber eigenen und fremden Cystein-Proteasen in Körperflüssigkeiten schließt. Es inhibiert Papain-ähnliche Enzyme mit einer Bindungsstöchiometrie von 1:1.¹⁰⁰ Stark erniedrigte Werte von Cystatin C konnten in Zusammenhang mit Atherosklerose, abdominellen Aortenaneurysmen, inflammatorische Erkrankungen mit extensiver extrazellulärer Matrixdegradation und Remodelling der Gefäßwand gefunden werden.¹⁰¹

Die Kininogene als Vertreter der Familie III sind intravaskuläre multifunktionelle Proteine, die nachfolgend genauer beschrieben werden (siehe 1.2.). Sie sind hochspezifische Inhibitoren für Papain-ähnliche Cystein-Proteasen und Calpaine, und binden in einem Verhältnis von Cystein-Protease:Inhibitor von 2:1.¹⁰²

Calpastatine sind eine Gruppe thermostabiler endogener Proteine, die spezifisch Calpaine inhibieren. Für die Bildung des stabilen 1:4 Komplexes ist Calcium notwendig.¹⁰³ Das proteolytische System von Calpain-Calpastatin nimmt eine überlebenswichtige Funktion im Organismus ein und ist an Vorgängen der Signaltransduktion, Apoptose, Proliferation und Differenzierung und der Remodellierung des Zytoskeletts beteiligt. Verschiedene *knockout*-Systeme dieses Systems zeigten embryonische Letalität.^{104,105} Eine Imbalance mit nachfolgender exzessiver Proteolyse sowie die Bildung von Autoimmun-Antikörpern gegen Calpastatine konnte bei rheumatoider Arthritis in der Synovialflüssigkeit der Gelenke, bei venöser Thrombose und systemischer Sklerose nachgewiesen werden.^{106,107} Ebenfalls wurde eine Imbalance des Calpain-Calpastatin-Systems bei essentieller Hypertonie,¹⁰⁸ Morbus Alzheimer,¹⁰⁹ Morbus Parkinson¹¹⁰ und Muskeldystrophien detektiert.

Die Deregulation der Familie der Inhibitoren der Apoptose (IAP) wird in der Pathologie vieler verschiedener Erkrankungen, wie z.B. Krebs, Autoimmunerkrankungen und Immunodefizienzen, neurodegenerativen Erkrankungen und viralen Infektionen, beobachtet. Dabei werden Caspasen spezifisch von den IAP reguliert, wobei sich jeweils die Spezifität und das inhibitorische Potential der Inhibitoren unterscheiden.

Inhibitor	inhibitorischer Einfluß
α_2 -Makroglobulin	genereller Inhibitor von Endopeptidasen unspezifisch für Cystein-Proteasen
Calpastatine	selektiv für Calpaine (Ca^{2+} -abhängige Cystein-Proteasen)
Cystatine	spezifisch für Papain-ähnliche Cystein-Proteasen
Kininogene	Inhibitor von Calpainen und Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen

Tabelle 1.1: Übersicht über die physiologischen Cystein-Proteasen-Inhibitoren.

Das Verstehen der verschiedenen molekularen Prozesse öffnet die Möglichkeit für externe Interventionen bei pathologischen Veränderungen. Der Einsatz von rekombinanten oder modifizierten Proteinen bereitet allerdings pharmazeutische Probleme, bedingt durch raschen proteolytischen Abbau und schlechter zellulärer Permeabilität. Nicht-peptidische oder peptid-nachahmende Proteasen-Inhibitoren stellen daher einen Fokus der Forschung in der pharmazeutischen Industrie dar. Der molekulare Angriffspunkt liegt an dem Cystein auf der allosterischen Seite der Ziel-Caspase, so dass diese ihre aktive Konformation nicht mehr einnehmen kann. Verschiedene synthetische Inhibitoren (Compound 34¹¹¹, M867¹¹², Idun¹¹³, Pralnacasan¹¹⁴) wurden schon bis zur Phase II der klinischen Prüfung getestet, jedoch hat bisher kein Wirkstoff die Phase III erreicht. Bisherige Erfolge in der Forschung auf dem Gebiet der Proteasen-Inhibitoren lassen auf eine zukünftige klinische Applikation hoffen.

1.2. Kininogen

Noch vor 30 Jahren glaubte die wissenschaftliche Welt, dass die einzige Funktion von Kininogenen in der Freisetzung von Bradykinin liegt. Die enzymatische Proteolyse der Kininogene durch Plasma- oder Gewebe-Kallikrein setzt Kinine mit potenter Bioaktivität frei, wie z.B. die Stimulation der VSMC Kontraktion, Vasodilatation und Induktion der vaskulären Permeabilität.¹¹⁵ Plasma enthält zwei verschiedene Formen von Kininogen: hochmolekulares Kininogen (*high molecular weight kininogen*, HMWK) und niedermolekulares Kininogen (*low molecular weight Kininogen*, LMWK). Kininogene sind multifunktionelle Glykoproteine, die aus einer identischen schweren Kette und einer sich unterscheidenden leichten Kette bestehen. Beide repräsentieren das Produkt eines einzelnen Gens. Die Unterschiede der leichten Kette entstehen durch

differenziertes Splicing der primären Transkripte, wodurch zwei verschiedene mRNAs entstehen.¹¹⁶ HMWK besteht aus sechs Domänen, den sogenannten Domänen D1 bis D6, wohingegen LMWK aus den gleichen ersten vier Domänen D1 bis D4 besteht, gefolgt von der speziellen leichten Kette D5_L. Der Aufbau von HMWK und LMWK ist in Abbildung 1.6 dargestellt.

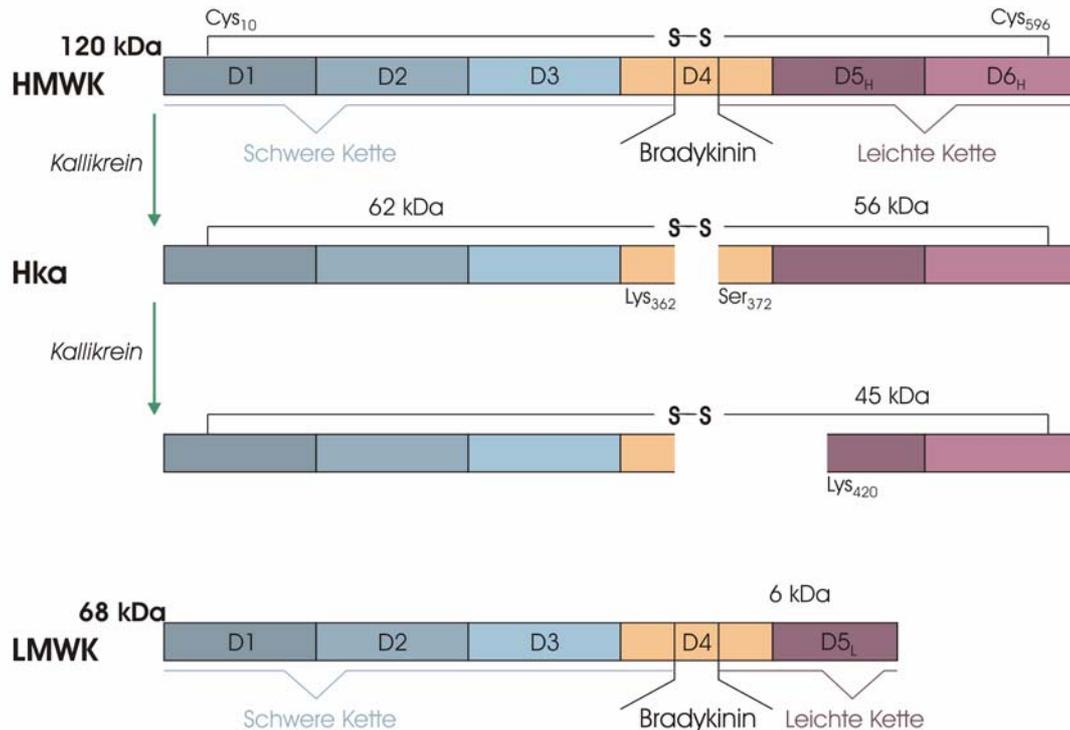


Abbildung 1.6: Aufbau von HMWK und LMWK [nach ¹¹⁷].

Das Gen für Kininogen ist 27 kb lang und besteht aus 11 Exons. Exon 1 bis 10 kodieren für HMWK, welches nach der Entfernung des Signalpeptides und Glykolisierung eine molekulare Masse von 120 kDa besitzt. LMWK ist durch Exon 1 bis 9, ein Teil des 10. Exons sowie weitere 12 Aminosäuren des 11. Exons kodiert und besitzt daher nur eine molekulare Masse von 68 kDa. Der vordere Bereich des 10. Exons kodiert für das Nonapeptid Bradykinin.¹¹⁸

Aus den verschiedenen Funktionen der einzelnen Domänen ergeben sich unterschiedliche Eigenschaften für HMWK und LMWK, die nachfolgend in Tabelle 1.2 zusammengefasst sind.

Domäne	Eigenschaft	Wirkung	HMWK	LMWK
D1	▫ Ca ²⁺ -Bindungsmotiv		✓	✓
D2	▫ Inhibierung von Cystein-Proteasen		✓	✓
D3	▫ Inhibierung von Cystein-Proteasen ▫ Bindung an Blutplättchen, Neutrophile und EC ▫ Inhibierung der Bindung von Thrombin an Blutplättchen und EC durch Blockade der Bindung von Glykoprotein Ib-IX-V	Inhibierung thrombin-induzierter Blutplättchen-Aktivierung	✓	✓
D4	▫ Bradykinin	Freisetzung von Bradykinin	✓	✓
D5	▫ Bindung an anionische Oberflächen und Zellen des vaskulären Kompartimente ▫ Komplexbildung mit Vitronectin ▫ Bindung von Heparin	pro-koagulante Aktivität anti-adhäsiv anti-proliferativ anti-angiogenetisch	✓	✗
D6	▫ Bindung an (Pre-) Kallikrein oder Faktor XI	pro-fibrinolytisch pro-koagulant (Kontaktsystem)	✓	✗

Tabelle 1.2: Funktionen der Domänen von Kininogen [119,118].

Es wird davon ausgegangen, dass die Domänen D1, D2 und D3 evolutionär aus dem mehr primitiven Cystatin durch Genduplikation entstanden sind.¹¹⁸ Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt eine größere Sequenz-Übereinstimmung der Domänen D2 und D3 als mit D1. Vermutlich erfolgte erst eine Duplikation des genetischen Materials, um D1 und den Vorläufer der Domänen D2 und D3 zu bilden, mit einer nachfolgenden zweiten Duplikation zur Entstehung von D2 und D3. Diese Unterschiede setzen sich auch in den Funktionen der Domänen fort, da nur noch die Domänen D2 und D3 in der Lage sind, Cystein-Proteasen zu inhibieren. Sowohl D2 als auch D3 vermögen Papain-ähnliche Cystein-Proteasen zu inhibieren, obwohl D3 die stärkeren Bindungskonstanten aufweist. Eine Einzigartigkeit der Domäne D2 ist es, auch Calpaine zu inhibieren.¹⁰²

Der Hauptteil des im Blut zirkulierenden HMWK wird von den Hepatozyten synthetisiert und nach Glykosilierung sezerniert. Extrahepatische lokale Systeme wurden in der Niere, in der Lunge, in Speichel- und Schweißdrüsen, in neutrophilen

Granulozyten und in spezifischen Regionen des Gehirns gefunden.¹²⁰⁻¹²⁵ Weiterhin konnte HMWK intrazellulär in Blutplättchen und EC lokalisiert werden.¹¹⁵

Eine genetische Besonderheit in der Spezies Ratte ist das Vorkommen von zwei Gruppen von Kininogen-Genen.¹²⁶ Das sogenannte K-Gen kodiert für die beiden verschiedenen mRNAs von HMWK und LMWK, wie es auch im Menschen und anderen Spezies zu finden ist. Die zwei T-Gene, T-I und T-II, generieren jeweils nur die niedermolekulare Form der mRNA. Obwohl diese beiden Gruppen sehr homolog zueinander sind, unterscheiden sie sich stark in ihrer Expression und Funktion. So wird nach Induktion von akuten inflammatorischen Reaktionen eine unterschiedliche Regulation der T- und K-Kininogen mRNAs gefunden, die schlussfolgern lässt, dass T-Kininogene die Funktion von Akut-Phase-Proteinen übernehmen.¹²⁷

Durch den Verdau mit Trypsin können ebenso aus T-Kininogen Kinine freigesetzt werden.¹²⁸ In VSMC aus Ratten konnte die mRNA der T-Kininogene, mit einer Induktion der Expression durch Stimulation mit LPS oder Angiotensin II, jedoch nicht die mRNA der HMWK- bzw. LMWK-Formen detektiert werden.¹²⁹ Über die Freisetzung von Kininen wurde die Anwesenheit von Kininogen in VSMC aus der Aorta von Ratten demonstriert, allerdings indirekt nach dem Verdau mit Trypsin ohne eine weitere Spezifikation der detektierten Form des Kininogens.¹³⁰ Aufgrund der vorher erläuterten Sachverhalte ist es jedoch möglich, dass T-Kininogene mit diesem Experiment erfasst wurden. Zum heutigen Zeitpunkt deutet die Lage der Daten daher auf keine endogene Produktion von HMWK durch VSMC hin. Eine Versorgung dieser Zellen mit HMWK müsste daher hauptsächlich über den Blutstrom erfolgen. Für VSMC aus BN/Ka bedeutet dies aufgrund des Plasma-Mangels an HMWK, bedingt durch den Defekt der Sekretion in den synthetisierenden Leberzellen,¹³¹ keine bzw. eine sehr geringe Versorgung mit HMWK.

1.3. Vaskuläre glatte Gefäßmuskelzellen

Die glatten VSMC sind der vorwiegende Zelltyp in der Media der Blutgefäße und die Hauptquelle für die Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), wie Elastin, Kollagen, Laminin, Fibronectin und Glukosaminoglykane,¹³² die der Aortenwand Widerstandskraft und Elastizität verleihen. Da die Balance der Homöostase innerhalb

der ECM durch ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Abbau und Synthese der Matrix-Komponenten bestimmt wird, bedingt eine erhöhte Apoptoserate von VSMC nicht nur ein Verschwinden dieses Zelltypes, sondern auch den Verlust der Fähigkeit für die Produktion von ECM Proteinen.

Pathologische Veränderungen der Gewebsintegrität durch proteolytische Prozesse und sinkende Synthese von Matrixkomponenten durch VSMC-Apoptose sind von zentraler Bedeutung in der arteriellen Degradation, die die Entstehung der abdominellen Aortenaneurysmen (AAA) begleiten.

Trotz der Akkumulation von VSMC in der Atherosklerose und Restenose nach einer Gefäßverletzung nimmt der Zelltod der VSMC durch Apoptose auch in anderen vaskulären Erkrankungen eine wichtige Rolle ein. Die Atherosklerose ist durch eine initiale Deposition und oxidative Modifikation von Lipiden im subendothelialen Raum der Blutgefäße gekennzeichnet. Der entstehende atherosklerotische Plaque bildet zunächst eine stabile Läsion, in welcher eine Kappe aus ECM und VSMC den Lipidkern überdeckt und diesen stabilisiert.¹³³ Der Plaque kann sich zu einer chronisch inflammatorischen Läsion weiterentwickeln, die durch eine Akkumulation von T-Zellen und Makrophagen, Neo-Angiogenese und Matrix-Umbau gekennzeichnet ist.¹³⁴⁻¹³⁷ Die inflammatorische Zerstörung im Gebiet der Plaques führt letztlich zu einer Ruptur der fibrösen Kappe mit nachfolgender Freisetzung von prothrombotischen Material, Atherothrombose und lumineller Okklusion. Die Plaque-Ruptur stellt den zugrundeliegenden Mechanismus des akuten Koronarsyndroms, wie instabile Angina pectoris, Herzinfarkt und plötzlicher Herztod, dar. VSMC leisten einen kritischen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Stabilität der Plaques. Die Apoptose von VSMC ist in die Destruktion der Plaque-Oberfläche involviert.^{138,139} Dabei erhöht sich die Sterberate der VSMC in der Entstehungsphase der atherosklerotischen Plaques mit einer weiteren Steigerung im Falle einer instabilen Läsion, welches die zentrale Beteiligung der VSMC Apoptose in der Plaque-Ruptur demonstriert.^{140,141}

Ebenfalls wird von einer Induktion der vaskulären Kalzifikation,¹⁴² einer sowohl lokalen als auch systemischen prokoagulanten Aktivität und einer Induktion von inflammatorischen Reaktionen durch Apoptose von VSMC ausgegangen.¹⁴³

Die Apoptose ist ein evolutionär konserviertes Zellprogramm, welches unabhängig vom Zelltyp abläuft. Oft sind die Ursachen für die pathologische Initiierung der Apoptose

nicht bekannt, wodurch nicht spezifisch in den Verlauf eingegriffen werden kann. Durch die hohe Expression des Fas-Rezeptors auf VSMC (siehe 1.1.3) kann man jedoch eine häufige Beteiligung des Fas-vermittelten Zelltodes in der Apoptose von VSMC vermuten. Bisher sind jedoch keine VSMC-spezifischen Apoptoseinhibitoren bekannt bzw. in pharmakologischer Untersuchung.

1.3.1. Das abdominelle Aortenaneurysma

Aneurysmen wurden schon vor Jahrhunderten als Ursache für Krankheit und Sterblichkeit erkannt. Beschreibungen erscheinen bereits in den Ebers Papyrus (ca. 2000 v. Chr.) und in den Arbeiten von Galen (131 bis 200 n. Chr.).¹⁴⁴

Obwohl inzwischen viele Fortschritte in der Therapie des AAA gemacht wurden, bleibt die Pathogenese der aneurysmatischen Erkrankung unbekannt.

Die Inzidenz des AAA liegt bei 1-2% der Bevölkerung mit einer deutlichen Androtropie (5:1) und einem Altersgipfel bei 70 Jahren.¹⁴⁵ Weitere beeinflussbare Risikofaktoren für die Entstehung eines AAA sind Rauchen, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie sowie eine familiäre Historie des Auftretens von AAA in einem (männlichen) Verwandten 1. Grades als nicht beeinflussbarer Risikofaktor (Abbildung 1.7).¹⁴⁶

Viele epidemiologische Studien haben eine erhöhte Inzidenz von AAA innerhalb von Blutverwandten aufgezeigt. Eine daraus geschlussfolgerte vererbare Komponente zur Prädisposition der AAA Entstehung hat den Anstoß für viele genetische Studien gegeben. Bisherige Ergebnisse zeigen allerdings eine multifaktorielle Vererbung aus einer komplexen Interaktion zwischen Umwelteinflüssen und konstitutioneller genetischer Anfälligkeit. Die genaue genetische Basis zur Entstehung von AAA ist nach wie vor unbekannt.¹⁴⁷

Das AAA ist durch eine tiefgreifende histopathologische Umgestaltung innerhalb der Aortenwand charakterisiert und mit einer progressiven aortischen Dilatation und eventueller Ruptur assoziiert.^{147,148}

Multiple Faktoren sind verantwortlich für die Pathogenese des AAA, wie die Degradation von Elastin und Kollagen und daraus folgendem mechanischem Versagen,^{147,148} erhöhte Level von Matrixmetalloproteinasen (MMP),^{149,150}

inflammatorische Infiltration^{147,148,151}, zusammengesetzt aus T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen,¹⁵² sowie die erhöhte Apoptoserate von VSMC.^{153,154} Die Fähigkeit der Aorta den Kräften des Blutstromes zu widerstehen ist abhängig von den strukturellen Proteinen der arteriellen Wand. Kollagen und Elastin sind die vorherrschenden Proteine innerhalb der Aorta und agieren, indem der gebildete Matrixverband für eine optimale Druckverteilung innerhalb des Gewebes sorgt und somit eine viskoelastische Antwort zur pulsatilen Oszillation aufrechterhält. VSMC sind der vorwiegende Zelltyp in der Aorta¹⁵⁵ und synthetisieren zusammen mit den adventitiellen Fibroblasten die extrazellulären Matrixkomponenten. In der gesunden infrarenalen Aorta ist die Media in einer Serie von klar definierten konzentrischen elastischen Lamellen aufgebaut, deren dichter Verband von Elastin, Kollagen und VSMC verantwortlich für die viskoelastischen Eigenschaften der adulten Aorta ist.¹⁴⁷

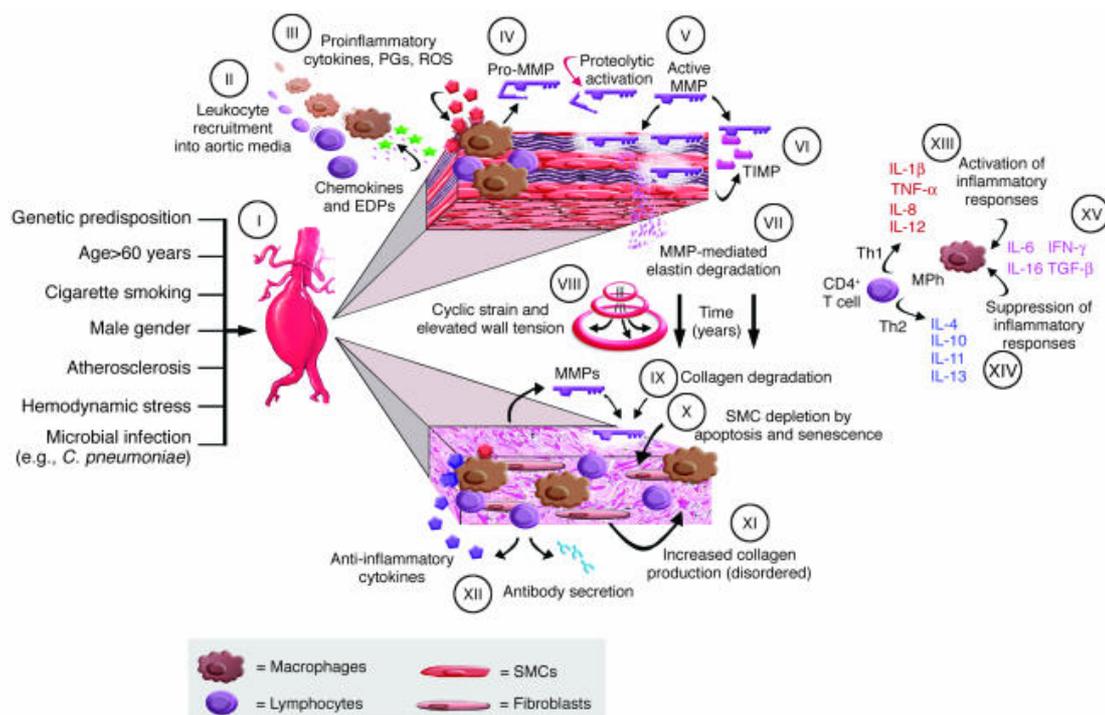


Abbildung 1.7: Einfluß- und Risikofaktoren bei der Entstehung von AAA [156]

Die ECM ist ein komplexes Netzwerk aus Proteinen und Proteoglykanen, welches sich in einem Zustand von konstantem Umbau befindet. Pathologische Veränderungen in der Gewebsintegrität resultieren aus proteolytischen Vorgängen verursacht durch eine Imbalance der Homöostase bestehend aus MMPs, die selektiv die Komponenten der

ECM verdauen, und ihren physiologischen Gegenspielern, den Gewebsinhibitoren der Metalloproteinasen (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP).¹⁵⁷

Aneurysmen sind weiterhin durch eine chronische inflammatorische Infiltration innerhalb der Aortenwand charakterisiert,^{152,158,159} wobei davon ausgegangen wird, dass es sich um ein frühes Schlüsselereignis handelt.¹⁵⁶ Vermutlich werden die Infiltrate durch Chemokine und Peptide der Elastin-Degradation angezogen.^{160,161} In Homogenaten und Explantaten der aneurysmatischen Aortenwand wurden erhöhte Werte von Zytokinen, wie z.B. TNF- α ,¹⁶² IL-1,¹⁶² IL-6,¹⁶³ IFN- γ ,¹⁶³ Monozytenchemotaktisches-Protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)¹⁶⁰ und IL-8¹⁶⁰ detektiert, die von den infiltrierenden Makrophagen und Lymphozyten sezerniert werden und die inflammatorische Reaktion verstärken. Die Produktion von Prostaglandin-Derivaten¹⁶⁴ und reaktiven Sauerstoffspezies¹⁶⁵ stellen zusätzlich zu den proinflammatorischen Zytokinen einen Teil der inflammatorischen Reaktion dar.

Die meisten AAA verlaufen symptomlos und entstehen daher unbemerkt, weswegen sie oft zufällig bei radiografischen oder computertomografischen Untersuchungen entdeckt werden. Das Risiko der Ruptur eines AAA ist die wichtigste klinische Komplikation, so dass die chirurgische Reparatur von AAAs mit einem Durchmesser größer als 5,5 cm eine effektive Behandlung darstellt, wohingegen die operative Behandlung von kleineren Aneurysmen (Aortendurchmesser ≥ 3 cm) keinen Vorteil in der Überlebensrate birgt. Zum heutigen Zeitpunkt werden Patienten mit kleinen AAA konservativ behandelt, das heißt, regelmäßige ultrasonografische Untersuchungen zur Beobachtung des Fortschreitens des AAA.¹⁶⁶ Umfassende Screening-Programme sind nicht verfügbar und der derzeitige wissenschaftliche Wissensstand über die Mechanismen zur Entstehung und Expansion des AAA ist nicht ausreichend für die Entwicklung von Medikamenten und/oder klinischen Studien zur Prüfung der therapeutischen Effizienz bereits vorhandener Medikamente. Effektive nicht-operative Behandlungsmöglichkeiten zur Prävention der Expansion von AAAs würden daher eine viel versprechende Aussicht für Patienten mit kleinen AAAs darstellen.

1.4. Das BN-BN/Ka-Rattenmodell

Durch eine zufällige Selektion einer Mutante des Original-Stammes der Brown Norway-Ratten (BN) in der Zuchtstation der katholischen Universität von Leuven in Belgien, wurde der neue Stamm Brown Norway/ Katholiek (BN/Ka) gezüchtet. Das Plasma dieser Tiere ist fast vollständig defizient für HMWK und LMWK, es enthält jedoch normale Mengen T-Kininogen sowie niedrige Mengen von Plasma-Kallikrein.^{167,168} Die Vererbung der Kininogen-Defizienz erfolgt autosomal rezessiv, ähnlich der berichteten Fälle von menschlicher Kininogen-Defizienz.¹⁶⁷ Die Ursache der Defizienz liegt in einer einzigen Punktmutation von Guanin zu Adenin im Nukleotid 487, die wiederum zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin, an der Position 163, führt.¹⁶⁹ Untersuchungen an der Leber bzw. den Hepatozyten der beiden Rattenstämme BN und BN/Ka ergaben, dass beide Stämme die gleiche Menge an funktionell aktiver HMWK und LMWK mRNA enthalten und die Synthese von HMWK und LMWK in BN/Ka-Ratten vergleichbar der in BN-Ratten ist.^{131,169} Die Menge an sezerniertem Kininogen war in den BN/Ka jedoch deutlich reduziert.¹⁶⁹ T-Kininogen auf der anderen Seite wird in den Leberzellen gebildet und sezerniert, so dass der Defekt beim Molekül selbst und nicht bei den Zellen liegt. Transiente Transfektionsexperimente mit der normalen und der mutierten cDNA in COS-1-Zellen bestätigten, dass allein die Mutation die Ursache für die fehlende Sekretion ist.¹⁶⁹ Die vergesellschaftete Erniedrigung der Plasma-Kallikrein-Werte, die ebenfalls in menschlichen Patienten mit Kininogen-Defizienz zu beobachten ist,¹⁷⁰ kann seine Ursache in einer verkürzten Halbwertszeit oder ebenfalls einer Sekretionsstörung in der Leber haben. Tatsächlich zirkuliert Plasma-Kallikrein im Komplex mit HMWK im Blut.¹⁷¹ Dementsprechend könnte HMWK entweder den Export von Plasma-Kallikrein aus der Leber unterstützen oder es vor Inaktivierung schützen.

1.5. Hypothese und Zielsetzung

In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass BN/Ka Ratten im Gegensatz zu BN und Wistar Ratten unter atherogener Diät AAA entwickeln. Den Ratten wurde ab der 10. Lebenswoche für 12 Wochen eine Diät mit hohem Fett- und Cholesterolanteil verabreicht. Nachfolgende Untersuchungen ergaben

eine erhöhte Inzidenz für die Entwicklung von AAA in BN/Ka Ratten von 100 %, wohingegen die Inzidenz in BN bei 55 % und in Wistar bei 0 % lag. Gewebeuntersuchungen der Aorten ergaben in BN/Ka eine Aufweitung mit verstärktem Remodeling in der Adventitia. Die AAA waren weiterhin durch Fragmentation und Ruptur der elastischen Membranen innerhalb der Media charakterisiert, was zu einer Verdünnung der Aortenwand führte. Als Ursache hierfür wurde einerseits die erhöhte Apoptoserate in Media und Adventitia mit paralleler Erhöhung der FasL und Caspase-3 Expression als auch die erhöhte Expression von verschiedenen Matrix-Metalloproteinasen bei fehlender Induktion der Inhibitoren gezeigt.¹⁷² Ebenfalls wurde eine deutliche Infiltration von inflammatorischen Zellen im Raum zwischen der Adventitia und Media gefunden.

Daraus ergab sich die Hypothese, dass der HMWK-Mangel zu einer erhöhten Aktivität der Cystein-Proteasen und damit zu einer erhöhten Induktion der Apoptose im Aortengewebe führt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, an primären Zellkulturen die Beteiligung der Cystein-Proteasen und den Einfluss von HMWK an apoptotischen Prozessen in VSMC aufzuklären. Dabei sollte die Rolle und Beteiligung der apoptotischen Hauptsignalwege – extrinsische und intrinsische apoptotische Kaskade – definiert und der inhibitorische Einfluß von HMWK auf den apoptotischen Vorgang im Allgemeinen und auf Cystein-Proteasen und Cathepsinen im Speziellen unter Verwendung von Protein-, mRNA- und Aktivitätsuntersuchungen analysiert werden. Über Bindungs- bzw. Aufnahmestudien und Kolokalisationsuntersuchungen sollte ein mechanistischer Ansatz für die inhibitorische Wirkung von HMWK herausgestellt werden.