

4. Diskussion

Der Fokus der derzeitigen Forschung im Bereich des Kinin-Kallikrein-Systems liegt hauptsächlich auf der physiologischen Wirkung von Bradykinin und den Aufgaben der Bradykinin-Rezeptoren als auch den anti-angiogenetischen und anti-proliferativen Eigenschaften von HMWK. Obwohl die Funktion von HMWK als Cystein-Proteasen-Inhibitor schon seit längerem bekannt ist (Abschnitt 1.2.), wurden Interaktionen im Gewebe- bzw. Zellsystem als auch die Involvierung in pathophysiologischen Vorgängen bisher nicht untersucht.

In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass HMWK-defiziente BN/Ka Ratten im Gegensatz zu BN und Wistar Ratten unter atherogener Diät AAA entwickeln. 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 festgestellt.¹⁷² Da die Apoptose von VSMC eine zentrale Stellung in der Pathogenese des AAA einnimmt und Cystein-Proteasen zentrale Effektoren in der Apoptose darstellen (Abschnitt 1.1.1.) wurde die Hypothese erstellt, dass der HMWK-Mangel zu einer erhöhten Aktivität der Cystein-Proteasen und damit zu einer erhöhten Induktion der Apoptose im Aortengewebe führt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HMWK konzentrationsabhängig sowohl die Aktivierung von Caspase-3 als auch die Gesamtapoptoserate, gemessen über den apoptotischen Index, gleichermaßen in VSMC von BN und BN/Ka verhinderte. In dem verwendeten Apoptoseinduktions-Modell konnte HMWK ebenfalls die Aktivierung der Caspase-8 und Caspase-9 als auch die Freisetzung von Cathepsin B und Cytochrom C in das Zytosol verringern. Darüberhinaus steigerte HMWK die Expression und den Proteingehalt des anti-apoptotischen Proteins Bcl-X_L. Die beobachteten Effekte waren unabhängig von Bradykinin. Der Vergleich der basalen Expressionslevel in VSMC von BN und den defizienten BN/Ka zeigte erhöhte Basal-Level in BN/Ka für die apoptotischen Proteine Caspase-3 und Cathepsin B sowie reduzierte Level für das anti-apoptotische Bcl-X_L. Expressionsuntersuchungen ergab keine HMWK mRNA Produktion in VSMC. In einem Rettungs-Experiment wurde

gezeigt, dass durch endogene HMWK-Produktion die Apoptoserate gesenkt wird. Durch Stimulationsexperimente mit fluoreszenzmarkiertem HMWK wurde eine zeitabhängige und irreversible Aufnahme von HMWK ins Zytosol der VSMC demonstriert. Dabei wurde eine hohe Kollokalisierung von HMWK mit aktiven apoptotischen Proteasen festgestellt. Der Prozess war desweiteren nicht durch einen Endozytose-Inhibitor blockierbar.

4.1. Die Auswahl der Zellmodelle

Zur Untersuchung der apoptotischen Vorgänge in VSMC und des Einflusses von HMWK stellte sich die Frage nach einem passenden Zellmodell.

Da Zelllinien zur stabilen Kultivierung teil-immortalisiert sind, stellen sie kein geeignetes System dar, das einen unverändertern Ablauf der Apoptose gewährleistet. Dementsprechend stellt nur die Primärzellkultur das geeignete Medium dar, um die grundlegenden apoptotischen Effekte valide zu untersuchen. Außerdem bietet sie die Möglichkeit des direkten Vergleiches apoptotischer Vorgänge in VSMC aus den Rattenstämmen Wistar, BN und BN/Ka und damit einen Vergleich unter Berücksichtigung des genetischen Hintergrundes.

Voll ausdifferenzierte VSMC proliferieren *in vivo* nur sehr langsam und nehmen einen kontraktile Zustand ein, welcher durch die Isolation und Kultivierungsbedingungen in einen synthetischen, proliferativen Zustand überführt wird und damit der Phänotyp unter Kulturbedingungen nur noch bedingt dem *in vivo* Phänoyp entspricht. Allerdings ist bekannt, dass unter pathophysiologischen Umständen, wie in der Atherosklerose als auch beim vaskulären Remodelling, die proliferativen Prozesse ebenfalls sehr beschleunigt sind.¹⁸² Dementsprechend wurde die Isolations- und Kultivierungsbedingte Veränderung des Phänotypes als tolerierbar angesehen und durch die Verwendung von frühen Passagen (Passage 3-7) in einem begrenzten Maß gehalten. Für die Isolation von primären VSMC existieren zwei anerkannte Methoden - der Enzymverdau und die Explantatmethode. Für diese Studie diente der Enzymverdau mit Elastase und Kollagenase als Isolierungsmethode, da sie einerseits hohe Ausbeuten und einen schnellen Einsatz der gewonnen Zellen bot und andererseits die differenzierten

Eigenschaften bei dieser Methode stärker erhalten bleiben,¹⁸² im Gegensatz zu der Explantatmethode, wo die Zellen erst aus dem Explantat herauswachsen müssen.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse von VSMC aus Ratten wurde später in humanen aortischen Primärzellen überprüft und diese wegen ihrer leichten Transfizierbarkeit für die Rettungs-Experimente verwendet.

4.2. Das Apoptoseinduktions-Modell

Die Apoptose kann abhängig vom jeweiligen Stimulus in VSMC über verschiedene apoptotische Signalwege ausgelöst werden. Klassischerweise werden zytotoxische Substanzen wie z.B. Staurosporine eingesetzt, oder der apoptotische Effekt einer zu evaluierenden Substanz beurteilt. Um den Einfluß von HMWK auf die Apoptose in VSMC *in vivo* möglichst valide *in vitro* nachzustellen, musste ein Apoptoseinduktions-Cocktail etabliert werden, der die pathophysiologischen Bedingungen möglichst genau in der Zellkultur nachstellen soll.

In der vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe war die Apoptose bei der Entstehung der AAA in BN/Ka mit einer erhöhten Expression von FasL verbunden.¹⁷² Fas/FasL-induzierte Apoptose ist ebenfalls ein pathogenetisches Charakteristikum der Atherogenese,³⁵⁻³⁷ der atherosklerotischen Plaque-Instabilität,³⁸ der Fremdtransplantat-ausgelösten Arteriopathie³⁹ und der akuten inflammatorischen Reaktion auf Zytokine.⁴⁰ Der Fas-Rezeptor ist ein weitverbreiteter Rezeptor, der auch auf VSMC exprimiert ist. Im Gegenteil dazu ist sein Ligand FasL auf bestimmten Zelltypen, wie inflammatorische Zellen, beschränkt. Durch Stimulation von VSMC mit FasL zeigte sich, dass nur membrangebundene Formen von FasL, jedoch nicht lösliche Formen, potent genug, um die Apoptose in VSMC zu induzieren.^{41,42}

Weiterhin sind AAA durch eine chronische inflammatorische Infiltration gekennzeichnet.^{43,147,153} In Ko-Kultur Experimenten haben Boyle *et al.* gezeigt, dass Makrophagen durch direkten Zellkontakt Apoptose in VSMC über die Fas/FasL-Interaktion zu induzieren vermochten.⁴³ Weitergehende Analysen zeigten die NO Produktion durch iNOS in Makrophagen. Dies bewirkte einerseits die Zelloberflächen-Expression von Fas auf den VSMC durch die Translokation des Fas-Rezeptors aus dem Golgi-Apparat. Andererseits wurde eine erhöhte Oberflächen-Expression von FasL auf

Makrophagen bedingt durch NO festgestellt. Dieser Effekt konnte durch die synergistische Funktion von TNF- α , IFN- γ und IL-1 verstärkt werden.^{45,46,50} Die nachfolgende Abbildung 4.1 stellt zusammenfassend diesen möglichen Apoptoseinduktionsweg für VSMC im AAA dar.

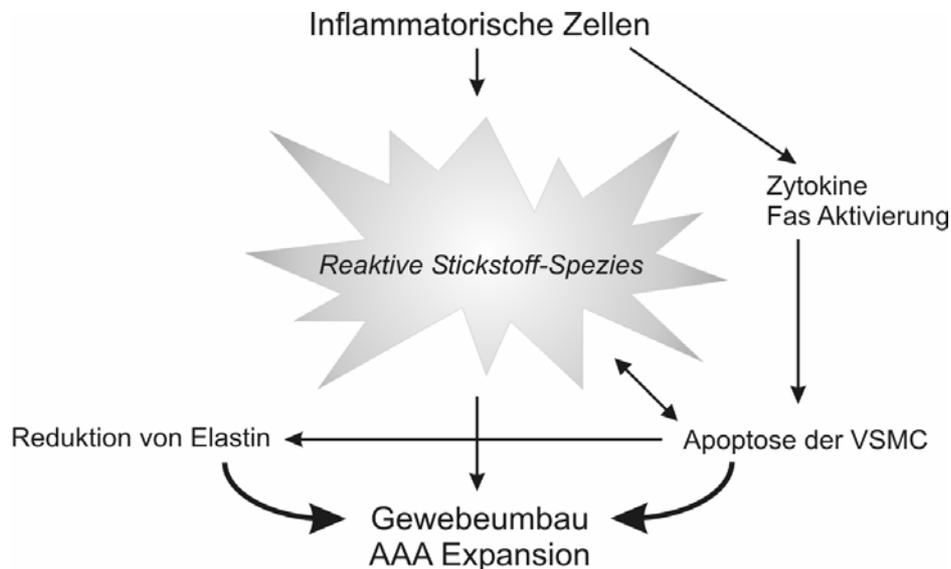


Abbildung 4.1: Interaktive Mechanismen die zur Apoptose der VSMC und somit zur Entstehung der AAA beitragen.

Dementsprechend zeigten Stimulationsversuche mit verschiedenen Konzentrationen und Inkubationsdauern von rekombinanten FasL kein Apoptoseinduktionsvermögen in VSMC. Entgegen den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen konnte mit den Zytokinen IFN- γ , TNF- α und IL-1 α ⁵⁸ oder in Kombination mit FasL keine Apoptose induziert werden. Erst durch die Stimulation von VSMC mit dem NO-Donor Natrium-Nitroprussid wurde die Aktivierung von Caspase-3 gezeigt, die durch Ko-Stimulation mit FasL deutlich weiter gesteigert werden konnte. Gleichermaßen wurden die synergistischen Effekte der Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-1 α mit NO und FasL bestätigt. Darauf basierend und in Kombination mit den vorher beschriebenen pathologischen Befunden wurde der Apoptoseinduktions-Cocktail bestehend aus dem NO-Donor Natrium-Nitroprussid, FasL und den oben genannten Zytokinen etabliert.

Für die Standardisierung der Western Blots wurde die Färbung mit Ponceau S herangezogen, da sich unter apoptotischer Stimulation eine Regulation der *housekeeping*-Proteine β -Actin und GAPDH zeigte, und diese somit nicht geeignet waren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zeigte sich in

der frühen Phase der Apoptose eine Erhöhung der Expression von GAPDH,¹⁸³⁻¹⁸⁵ die sich im späteren Verlauf der Apoptose sehr stark verringerte und somit das Kriterium der stabilen Expression unter Stimulationsbedingungen nicht gegeben ist.

4.3. Konzentrationsabhängiger inhibitorischer Effekt von HMWK auf die Apoptose

Da die meisten apoptotischen Signalwege bei der Effektor-Caspase Caspase-3 zusammenlaufen, stellt ihre Aktivierung ein zentrales Ereignis im apoptotischen Prozess dar. Viele der morphologischen Veränderungen in der Apoptose sind durch die Beeinflussung von Zielproteinen durch die aktive Caspase-3 vermittelt.¹⁷ Dementsprechend kann aus der Inhibierung der Aktivierung von Caspase-3 auf einen wichtigen Einfluß auf den apoptotischen Signalweg geschlossen werden.

Unter Ko-Stimulation von HMWK während der Induzierung der Apoptose zeigte sich eine signifikante Inhibierung der Aktivierung der Caspase-3 gleichermaßen in VSMC von BN und BN/Ka, die ihre stärkste Ausprägung bei einer Konzentration von 10 nM hatte. In Konzentrationfindungsstudien wurde festgestellt, dass dieser inhibitorische Effekt bei 100 nM vermindert bzw. nicht mehr vorhanden ist. Diese konzentrationsabhängige inhibitorische Wirkung von HMWK auf Caspase-3 und damit auf den apoptotischen Prozess bestätigte sich in Experimenten zur Bestimmung des apoptotischen Indexes so wie auch in der Übertragbarkeit auf primäre humane VSMC.

Die konzentrationsabhängige Wirkung von HMWK könnte dadurch erklärt werden, dass bei höheren Konzentrationen die anti-angiogenetischen und anti-proliferativen Eigenschaften von HMWK den anti-apoptotischen Effekt überlagern. Bisher existieren nur sehr wenige Studien, die den Zusammenhang zwischen HMWK und Apoptose untersucht haben. Zudem waren dies nur sekundäre Befunde neben den anti-adhäsiven und anti-proliferativen Eigenschaften von HMWK. So induzierte HKa in EC bei einer Konzentration von 10 nM Apoptose. Dieser Effekt wurde aber sekundär zu einer Hemmung der Proliferation dieser Zellen beobachtet. In der gleichen Studie zeigten VSMC keine apoptotischen Veränderungen.¹¹⁷ Die Apoptose in EC und VSMC durch hohe HKa-Konzentrationen von 85 nM wurde mit der Beeinträchtigung der Zelladhäsion durch HMWK erklärt.¹⁷⁴ Entsprechend ist der pro-apoptotische Effekt

durch den Verlust der Zell-Matrix-Interaktion bedingt, der ein physiologischer Grund für die Induktion von Apoptose bei adhärennten Zellen und als Anoikis bekannt ist.¹⁸⁶ Die stärkere Induktion der Apoptose unter Ko-Stimulation mit 100 nM HKa im Vergleich zu 100 nM HK bei der Bestimmung des apoptotischen Indexes, kann über die stärkere anti-adhesive Eigenschaft von HKa erklärt werden. In einem Vitronectin-abhängigen Modell verhinderte HKa, jedoch nicht HK, die Zelladhäsion.^{187,188} Die Arbeitsgruppe um Motta *et. al.* zeigte in ihren Studien über das Bindungsverhalten von HMWK und Pre-Kallikrein an EC, dass 10 bis 20 nM HMWK eine physiologisch relevante Konzentration ist.^{175,176} Durch vergleichende Experimente von HMWK und seiner zweikettigen Form HKa in VSMC von Ratten und Mensch wurde die Unabhängigkeit des Effektes von Bradykinin gezeigt.

4.4. Einfluß von HMWK auf die extrinsische und intrinsische apoptotische Kaskade

Die Induzierung der Apoptose über die Fas/FasL-Interaktion ist durch die Aktivierung der Initiator-Caspase Caspase-8 charakterisiert (siehe 1.1.2.) (Abbildung 4.2). Nachfolgend werden die Effektoren, wie z.B. Caspase-3, gespalten und aktiviert.¹⁸⁹ In Aktivitäts-Untersuchungen der Caspase-8 mittels eines spezifischen Fluoreszenzassays zeigte sich eine deutliche Aktivierung unter apoptotischer Stimulation, die durch HMWK inhibiert wurde. Die Initiierung einer apoptotischen Kaskade stellt das kritische Ereignis der Apoptose dar, so dass die Inhibierung der Caspase-8 durch HMWK einen sehr frühen und wichtigen Eingriff am Anfang des apoptotischen Prozesses darstellt.

Die apoptotische Stimulierung und Ko-Stimulation mit HMWK hatte keinen Einfluss auf die Proteinexpression des Fas-Rezeptors. Ebenfalls konnten keine Unterschiede zwischen VSMC aus BN und BN/Ka gefunden werden. Die Stimulation mit den Zytokinen TNF- α und IFN- γ zeigten eine Erhöhung von Fas in EC jedoch nicht in VSMC.⁴¹ Der Vergleich von ruhenden und proliferierenden VSMC zeigte gleiche Expressions-Level von Fas,⁴¹ so dass anzunehmen ist, dass sich die unterschiedliche Ansprechbarkeit von VSMC auf die apoptotischen Stimuli, wie FasL, Zytokine und

NO-Donor, durch eine verschiedene zelluläre Lokalisation des Rezeptors in VSMC ergeben kann.⁴⁵

Weiterhin ist durch die aktive Form der Caspase-8 eine intrazelluläre Kommunikation zum intrinsischen Apoptoseweg möglich, indem das zytosolische Protein Bid gespalten wird, welches nachfolgend die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien initiiert.⁸⁰ Die Untersuchung der Freisetzung von Cytochrom C bestätigte auch eine Involvierung der intrinsischen Kaskade in dem verwendeten Apoptose-Modell in den VSMC. Dies konnte ebenfalls durch die Aktivierung der Caspase-9 belegt werden. Für den apoptotischen Verlauf stellt dies eine Verstärkung des apoptotischen Signals dar, da nun auch die zweite wichtige Initiator-Caspase in der Lage ist, die apoptotischen Effektoren zu aktivieren.

Verschiedene Studien postulierten eine Beteiligung der lysosomalen Cystein-Protease Cathepsin B in der Apoptose. Dabei nimmt man eine Beschädigung der lysosomalen Membran durch die aktive Caspase-8 an, die zu einer Freisetzung von Cathepsin ins Zytosol führte. Dort erfolgte ebenfalls die Spaltung des Proteins Bid mit nachfolgender Cytochrom C-Freisetzung.¹⁷⁷⁻¹⁸⁰ Die experimentelle Untersuchung von Cathepsin B zeigte eine Freisetzung ins Zytosol unter apoptotischen Bedingungen und bestätigte damit die vorher genannten Ergebnisse. Die Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK zeigte eine Inhibierung der Aktivierung von Caspase-9 als auch eine Reduktion der zytosolischen Freisetzung von sowohl Cathepsin B als auch Cytochrom C und veranschaulicht einen inhibitorischen Effekt von HMWK an den Schlüsselstellen des intrinsischen apoptotischen Signalweges. Da diese Effekte in der apoptotischen Kaskade nachfolgend der Aktivierung der Caspase-8 gelegen sind, bleibt die Frage offen, ob diese pro-apoptotischen Faktoren direkt durch HMWK inhibiert sind, oder nur einen sekundären Effekt zur Inhibierung der Caspase-8 durch HMWK darstellen. Untersuchungen der Aktivität von Cathepsin B in lebenden Zellen mittels eines Fluoreszenz-basierten Assays zeigten die Tendenz zur Inhibierung der Aktivität unter der Ko-Stimulation mit HMWK, die allerdings nicht signifikant war. Dies könnte man damit erklären, dass, wie in den Western Blots der fraktionierten Proteinisolation ersichtlich, nur ein kleiner Teil von Cathepsin B in das Zytosol freigesetzt wurde. Der Hauptanteil des zellulären Cathepsin B, der hinsichtlich der verschiedenen Stimuli unreguliert war, lag in den Lysosomen vor. Dadurch könnten direkte inhibitorische

Effekte durch HMWK auf die Aktivität des zytosolischen Cathepsin B durch die Aktivität von lysosomalem Cathepsin B überlagert sein.

Die nachfolgende Abbildung 4.2 fasst die inhibitorischen Angriffspunkte von HMWK zusammen.

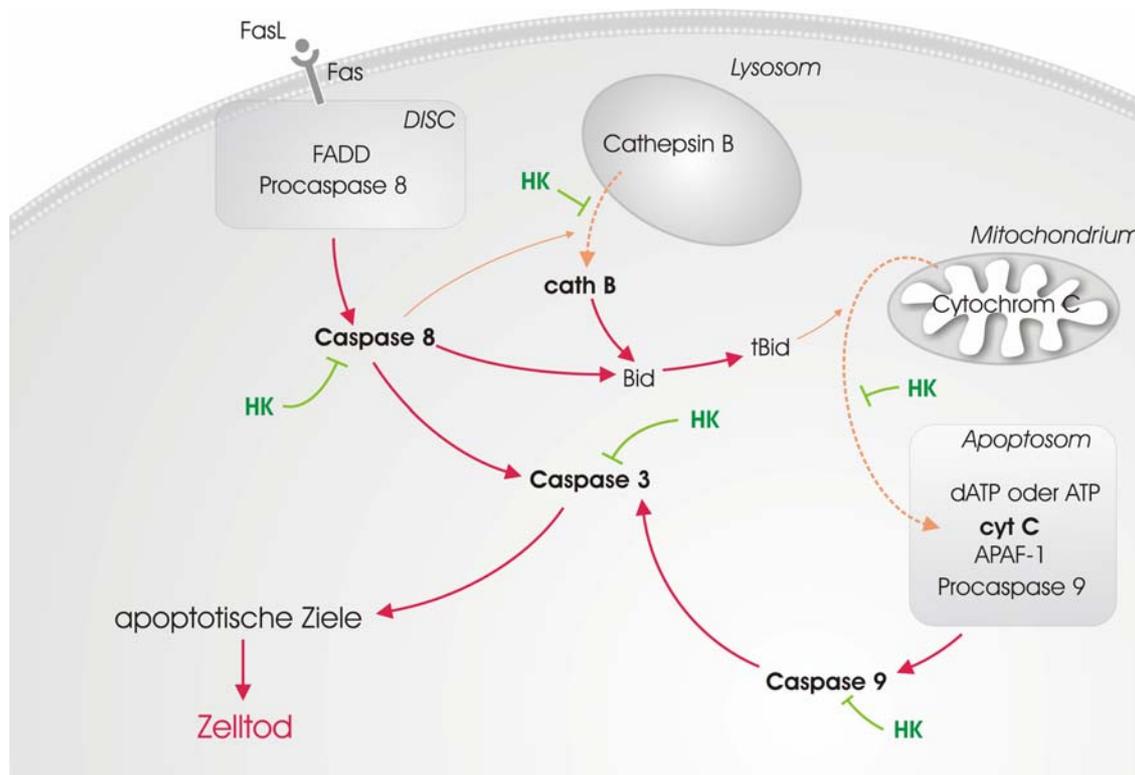


Abbildung 4.2: Apoptotische Kaskade in VSMC nach Stimulation mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail und inhibitorische Angriffspunkte von HMWK.

4.5. Involvierung von HMWK in anti-apoptischen Signalwegen

Viele Studien belegen, dass die endogenen Level der anti-apoptischen Proteine Bcl-X_L und Bcl-2 essentiell für die Lebensfähigkeit von VSMC und anderen Zellen sind. Verschiedene Stimuli, die die Expression von Bcl-X_L und Bcl-2 verändern, können demnach das Überleben der VSMC in der Gefäßwand beeinflussen. In normalen medialen VSMC ist Bcl-X_L abundant exprimiert, wohingegen nach einer Ballon-induzierten Verletzung eine verminderte Proteinexpression gefunden wurde, die zeitlich mit der frühen Welle des apoptotischen Zelltodes korrelierte.¹⁹⁰ Die Überexpression der

Proteine Bcl-X_L und Bcl-2 konnte das Eintreten des Zelltodes durch Inhibierung der MOMP und damit die Freisetzung mitochondrieller Proteine verhindern.⁷³ Ebenfalls wurde für Bcl-X_L eine Inhibierung der DISC-Formation mit anschließender Prozessierung von Bid⁷⁹ sowie die Suppression der TRAIL-induzierten Apoptose durch eine erhöhte Expression von Bcl-X_L, aber nicht von Bcl-2 gezeigt.¹⁹¹ Trotz gleicher Gruppenzugehörigkeit scheint das Ausmaß der inhibitorischen Funktion von Bcl-X_L und Bcl-2 in der Apoptose durch den Zelltyp und den Auslöser der Apoptose limitiert zu sein. Der inhibitorische Einfluss von Bcl-2 auf die MOMP fällt im Vergleich zu Bcl-X_L geringer aus. Entgegen seiner anti-apoptotischen Charakterisierung zeigte sich auch in einigen Studien, dass Bcl-2 ebenfalls eine pro-apoptotische Stellung einnehmen kann, die mit dem Ausmaß der Repression von Bcl-X_L korrelierte.¹⁹² In einer Tumorzell-Linie, die resistent gegenüber der Cisplatin-Therapie war, konnte durch die Transfektion mit Bcl-2 eine erneute Sensitivität gegenüber Cisplatin erreicht werden.¹⁹³ Dementsprechend scheinen verschiedene Regulationsmechanismen bei Bcl-X_L und Bcl-2 einzugreifen, die erklären, dass Bcl-X_L in Übereinstimmung mit anderen Studien unter apoptotischen Bedingungen erniedrigte Protein-Level in den VSMC aus BN und BN/Ka vorwies, ganz im Gegenteil zum unregulierten Bcl-2, dass scheinbar keine aktive Rolle in diesem Apoptoseinduktions-Schema einnimmt. Interessanterweise konnte HMWK auch einen Effekt auf Bcl-X_L ausüben, indem es zum Teil die Apoptose-bedingte verminderte Proteinexpression verhinderte. Die Regulation von Bcl-X_L durch HMWK ist ein komplett neuer Aspekt des anti-apoptotischen Effektes von HMWK, da HMWK scheinbar nicht nur in der Inhibierung von Cystein-Proteasen, sondern auch in der Förderung anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-X_L in einem synergistischen Prinzip involviert ist.

In der Annahme eines möglichen Interaktionspartners von HMWK und Bcl-X_L wurde die Interaktion zwischen Bcl-X_L und der 42/44 mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) gefunden. Die Signal-Kaskade der 42/44 MAPK, auch bekannt als extrazellulär-regulierte Kinase (ERK), ist ein zentraler MAPK-Signalweg, der eine Rolle in der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Zellüberleben, Lernvorgängen und auch der Apoptose spielt. In Abbildung 4.3 ist ein möglicher Regulationsweg von Bcl-X_L über die Aktivierung von 42/44 MAPK dargestellt. Nach eigener Aktivierung vermag die Phospho-42/44 MAPK

über die Phosphorylierung von Proteinen im Zytosol als auch nach eigener Translokation in den Nukleus verschiedene Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. Für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, CREB und Ets hat man eine protektive transkriptionelle Regulation von Bcl- X_L postuliert.¹⁹⁴

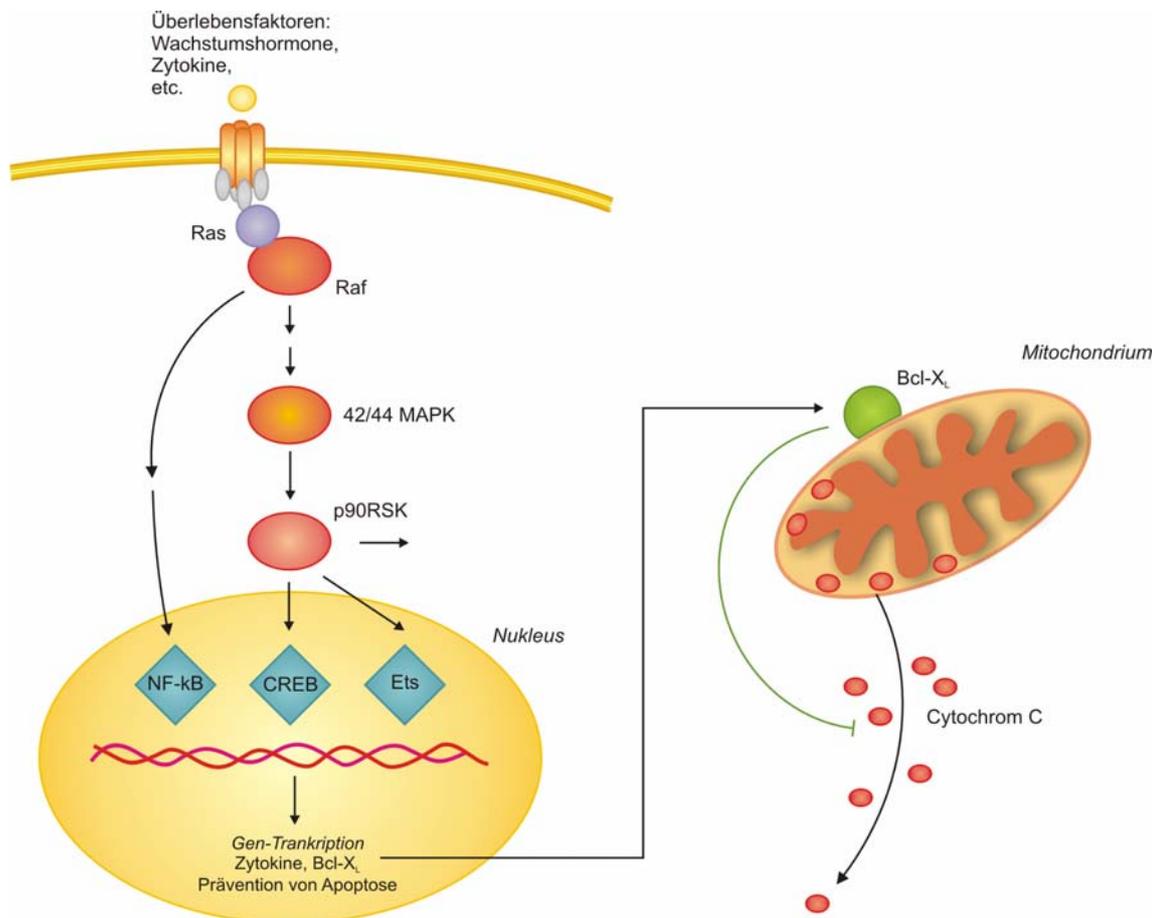


Abbildung 4.3: Transkriptionelle Kontrolle von Bcl- X_L durch Phosphorylierung der 42/44 MAPK.

In VSMC nahm der Anteil der phosphorylierten Form der 42/44 MAPK unter apoptotischer Stimulation zu, parallel begleitet von einer Erniedrigung der Bcl- X_L Proteinwerte, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien steht. In apoptotischen Madin-Darby canine kidney-Zellen wurden erhöhte phospho-42/44 MAPK-Werte gefunden, die in Zusammenhang mit einer Inhibierung der Caspase-8-Aktivierung gebracht wurden. Ebenfalls war ein erniedrigter Proteingehalt von Bcl-2 in apoptotischen MDCK-Zellen zu verzeichnen.¹⁹⁵ Diese Korrelation aus erhöhten phospho-42/44 MAPK- und erniedrigten Bcl- X_L -Level unter apoptotischen

Bedingungen wurde in weiteren Studien bestätigt.¹⁹⁶ Phospho-42/44 MAPK zeigte auch eine direkte Inhibierung der Caspase-9 durch Phosphorylierung¹⁹⁷ und unterdrückte die durch Wachstumsfaktor-Entzug, Matrix-Ablösung und zytotoxische Drogen induzierte Apoptose.¹⁹⁸⁻²⁰² Dementsprechend stellt die Zunahme der phospho-42/44 MAPK-Werte eine zelluläre protektive Maßnahme auf den apoptotischen Stimulus dar. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Unter Ko-Stimulation mit HMWK wurde eine weitere Erhöhung der phospho-42/44 MAPK-Werte beobachtet, die im Zusammenhang mit der teilweisen Erhöhung der Bcl-X_L-Proteinlevel nach der apoptotischen Herunter-Regulation stand. Demnach hatte HMWK einen zusätzlich aktivierenden Einfluss auf den 42/44 MAPK-Signalweg, der zu einer teilweisen Restauration der Bcl-X_L Protein-Level beitrug und auch auf diesem Wege einen anti-apoptotischen Einfluß auf die VSMC ausübte. Da dieser Effekt nur für VSMC in BN signifikant war, kann man annehmen, daß dieser Signalweg in den BN/Ka nur vermindert ansprechbar ist und es somit zu einer verminderten endogenen anti-apoptotischen Antwort der VSMC führt. Ob HMWK die Signalkaskade direkt über einen bestimmten extrazellulären Rezeptor aktiviert, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.6. mRNA Expression von apoptotischen Schlüsselproteinen und basale Unterschiede in VSMC von BN und BN/Ka

Im Falle der Beschädigung müssen lebende Zellen in der Lage sein, rapide den Zelltod einzuleiten, um die defekte Zelle aus dem Verband zu entfernen und damit z.B. mögliche krebsauslösende Mutationen zu vermeiden. Aus diesem Grunde sind in den meisten Zellen die pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Komponenten der Zelltod-Maschinerie konstitutiv exprimiert. Eine Veränderung der Balance zwischen den pro- und anti-apoptotischen Faktoren, die durch verschiedene Signale, wie Hormone, Wachstumsfaktoren oder zytotoxische Substanzen reguliert wird, ist demzufolge entscheidend in der Regulation der Apoptose. Die koordinierte Entfernung von spezifischen Zellen eines Gewebes oder die synchrone Entfernung einer großen Zellzahl während der Entwicklung, der Metamorphose oder des Gewebeumbaus bedingt allerdings auch eine Regulation auf der Ebene der Transkription der Schlüsselkomponenten der Zelltod-Maschinerie. Dabei agieren viele Hormone und

Zytokine hauptsächlich als Überlebensfaktoren, deren Entfernung die Expression von apoptotischen Genen aktivieren und/oder die Gene, die für die Inaktivierung der Zelltod-Maschinerie benötigt werden, repressieren kann.²⁰ Der Fokus der Forschung hat bisher jedoch nicht die transkriptionelle Kontrolle der Cystein-Proteasen oder auch anderer Faktoren der Apoptose unter pathophysiologischen Bedingungen beleuchtet.

Der Vergleich der mRNA Expression in VSMC von BN und BN/Ka zeigte deutliche Unterschiede, im Gegensatz zu den Regulationen auf Protein-Ebene. In BN war die Expression der Procaspase-3 unter stimulatorischen Bedingungen unreguliert entsprechen der konstitutiven Natur der Expression von Caspasen. Dazu im Gegensatz zeigte die mRNA der Procaspase-3 in VSMC von BN/Ka bereits unter basalen Bedingungen eine erhöhte Expression, die unter apoptotischen Stimuli noch weiter gesteigert werden konnte. Die Ko-Stimulation mit HMWK vermochte die mRNA Expression in VSMC von BN/Ka auf Werte, die denen in VSMC von BN vergleichbar waren, zu senken. Das inhibitorische Vermögen lag erneut bei 10 nM HMWK. Weiterhin zeigte auch der Vergleich der basalen Expression der mRNA von Cathepsin B erhöhte Werte in VSMC von BN/Ka. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen auf der Transkriptionsebene, wurden in dem Vergleich der Aktivitäten von Caspase-3 und Cathepsin B gleichermaßen erhöhte Werte in VSMC von BN/Ka im Vergleich zu BN gefunden. Die gefundenen Daten der mRNA Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-X_L zeigten dagegen ein umgekehrtes Bild der Regulation. In VSMC von BN/Ka war die Bcl-X_L mRNA Expression deutlich erniedrigt und nicht regulierbar unter den verschiedenen stimulierenden Bedingungen. Dagegen zeigte sich in VSMC von BN eine Herunter-Regulation der Level unter apoptotischen Bedingungen, die mit der Ko-Stimulation von HMWK vermindert werden konnte. Dies lässt vermuten, dass die VSMC-Kulturen von BN/Ka *in vivo* durch die vorherrschende HMWK-Defizienz beeinflusst wurden und dieser Effekt als Prägung *ex vivo* bestehen blieb. Zusammengefasst scheint die transkriptionelle Kontrolle der apoptotischen Komponenten in VSMC von BN/Ka Ratten sowohl aktiviert als auch hinsichtlich einer Produktion von pro-apoptotischen und Deaktivierung von anti-apoptotischen Faktoren verschoben zu sein. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass VSMC aus BN/Ka sensitiver gegenüber apoptotischen Stimuli durch das Fehlen von HMWK reagieren.

Dies bestätigt die früheren *in vivo* Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, dass in den Aorten aus BN/Ka eine deutlich erhöhte Apoptose-Rate von VSMC gefunden wurde.¹⁷²

4.7. endogene HMWK Expression in VSMC

Die Frage der endogenen Expression von HMWK durch VSMC wird kontrovers diskutiert. Bisher konnte die mRNA Expression von HMWK in der Leber, Niere, Lunge, Neutrophilen und spezifischen Regionen des Gehirns nachgewiesen werden (siehe 1.2.). Die Analyse von Gewebeproben aus Leber und Aorta wie auch Zellextrakten von VSMC aus Ratten der Stämme Wistar, BN und BN/Ka ergab eine starke HMWK Expression in den Leberproben und eine schwache Expression in den Gewebeproben der Aorten ohne erkennbare Unterschiede zwischen den verschiedenen Ratten-Stämmen. Es wurde jedoch keinerlei HMWK mRNA in den VSMC detektiert. Die Untersuchung von stimulierten Proben, wie apoptotisch stimulierte Proben in Abwesenheit oder Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen HMWK als auch die Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS), zeigte ebenfalls kein spezifisches Amplikon für HMWK. Es wurde lediglich die T-Kininogen-Formen gefunden, die unter Stimulation mit LPS weiter induziert werden konnten. Die T-Kininogene stellen eine Ratten-spezifische Sonderform der Kininogene dar, die durch Gen-Duplikation entstanden sind und als Akute-Phase-Proteine fungieren.²⁰³ Durch den Verdau mit Trypsin können aus diesen Kininogen-Formen Kinine freigesetzt werden.¹²⁸ Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Studie von Okamoto *et al.*, der ebenfalls in VSMC aus Ratten 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 detektierte.¹²⁹ In den Experimenten von Oza *et al.* wurde die Anwesenheit von Kininogen in VSMC aus der Aorta von Ratten demonstriert, allerdings indirekt über die Freisetzung von Kininen nach dem Verdau mit Trypsin ohne eine weitere Spezifikation der gefundenen Form des Kininogens.¹³⁰ Aufgrund der vorher erläuterten Sachverhalte ist es jedoch möglich, dass die T-Kininogene mit diesem Experiment erfasst wurden. Zum heutigen Zeitpunkt deutet die Lage der Daten daher auf keine endogene Produktion von HMWK durch die 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. Die Frage nach einem lokalen HMWK-System wird ebenfalls kontrovers diskutiert. In EC konnte lediglich eine Speicherung von HMWK ohne endogene Produktion nachgewiesen werden.^{204,205} Desweiteren bedingt die Mutation in den BN/Ka nicht eine gestörte Transkription bzw. Translation, sondern eine fehlende Sekretion von HMWK und LMWK in den Hepatozyten.¹⁶⁹ Die Ursachen können einerseits in einer konformationellen Änderung des Proteins liegen oder aber in der Lokalisation des Aminosäureaustausches in der für die Bindung an einen spezifischen Transporter notwendigen Erkennungssequenz, so dass in beiden Fällen die Sekretion unterbleibt. Es ist demnach anzunehmen, dass dieser Defekt der Sekretion auch in anderen synthetisierenden Zellen vorhanden wäre, und die VSMC auch aus einem lokalen System keine Versorgung mit HMWK erhalten würden.

Aus diesem Grunde diente das Transfektions-Experiment von VSMC mit einem HMWK-Expressionsvektor der Untersuchung, ob eine endogene Produktion von HMWK die VSMC vor der Apoptose schützen würde. Es konnte eine Verringerung der Apoptose bestimmt über den apoptotischen Index als auch in der Aktivierung der zentralen Caspase-3 gezeigt werden, wodurch die Hypothese der protektiven anti-apoptotischen Rolle von HMWK weiter bestärkt wurde.

4.8. Zelluläre Aufnahme von HMWK und möglicher Interaktionsmechanismus

HMWK stellt den einzigen physiologischen Inhibitor dar, der sowohl Calpaine als auch Papain-ähnliche Cystein-Proteasen zu inhibieren vermag (siehe 1.3.7.).²⁰⁶ Die Genanalyse von HMWK ergab 3 Cystatin-homologe Segmente, von denen jedoch nur die Segmente auf den Domänen 2 und 3 in der Bestimmung der Bindungskonstanten K_i ein starkes Bindungsvermögen für Cystein-Proteasen aufwiesen. In weiteren zellfreien *in vitro* Untersuchungen konnte man die direkte Interaktion von HMWK und Cathepsinen zeigen.^{175,207} Ebenfalls wurde ein Assay für die Bestimmung von Plasma-HMWK basierend auf seiner Aktivität als Cystein-Proteasen-Inhibitor entwickelt.²⁰⁸

Daraus schlussfolgernd ergab sich die Hypothese, dass die Inhibierung der Proteasen durch HMWK durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion im Zytosol erfolgen muss. Bisher wurde eine Bindung^{176,205,209} und Aufnahme von HMWK durch Zellen nur an EC untersucht, die im Rahmen des Kontaktsystems der Blutgerinnung eine zentrale Stellung einnehmen. Über ¹²⁵I-markiertes proteolytisch gespaltenes HKa wurde eine spezifische und zeitlich gesättigte Bindung und Aufnahme in EC gezeigt.²⁰⁵

Es konnte mittels fluoreszenzmarkiertem HMWK bzw. HKa erstmalig gezeigt werden, dass auch VSMC in der Lage sind, HMWK sehr schnell an die Oberfläche zu binden und es nachfolgend intrazellulär aufzunehmen. Dabei wurde kein Unterschied zwischen VSMC von BN und BN/Ka festgestellt, welches weiter die These bestärkt, dass der Plasma-Mangel an HMWK nicht durch einen Defekt an den Zellen sondern durch den Aminosäureaustausch im HMWK bedingt ist. Dieser Prozess war irreversibel, so dass man davon ausgehen kann, dass VSMC in der Lage sind, zirkulierendes HMWK intrazellulär zu speichern. Die Untersuchung der Kolo-kalisation zwischen HMWK und aktiver Caspase-3 bzw. Cathepsin B ergab einen hohen Kolo-kalisationsgrad nach apoptotischer Induktion, so dass die zytosolische Verteilung des Proteins die vorher postulierte direkte Inhibierung der zytosolischen Proteasen durch HMWK erlaubt. Die Vorbehandlung mit dem Endozytose-Inhibitor Phenylarsinoxid ergab keine Unterschiede in der Aufnahme von HMWK durch VSMC. Dies deutet auf einen Endozytose-unabhängigen Aufnahmeprozess hin, der, zusammen mit der fehlenden Sekretion in Hepatozyten von BN/Ka, weiter auf einen möglichen spezifischen Transporter hindeutet. Um dies zu verifizieren, sind Untersuchungen mit verändertem HMWK aus BN/Ka nötig, da nach vorliegender Datenlage von einer fehlenden Aufnahme analog der fehlenden Sekretion auszugehen wäre.

4.9. Ausblick und mögliche therapeutische Ansätze

Diese Arbeit lieferte erste Daten zur inhibitorischen Wirkung auf die Apoptose und zellulären Aufnahme und Speicherung von HMWK in einem VSMC-Zellmodell. Die herausgestellten Ergebnisse bei der Überprüfung der Hypothese dieser vorliegenden Arbeit ergaben weiterführende Fragestellungen, die in nachfolgenden Projekten der Klärung bedürfen.

Die laut Literatur verantwortlichen Domänen für die inhibitorischen Eigenschaften von HMWK auf Cystein-Proteasen sind die Domänen 2 und 3. Über die rekombinante Synthese dieser einzelnen Domänen – Domäne 2, Domäne 3 und in Kombination – sollte verifiziert werden, ob der Einsatz der isolierten Domänen die gleichen inhibitorischen Eigenschaften aufweisen oder ob andere bzw. die Synergie mit anderen Domänen für die anti-apoptischen Eigenschaften von HMWK verantwortlich sind.

Desweiteren wirkt sowohl die intrazelluläre Aufnahme und Speicherung von HMWK als auch das Ergebnis der fehlenden Blockade der Aufnahme von HMWK durch einen Endozytose-Inhibitor zusammen mit der fehlenden Sekretion in Hepatozyten in BN/Ka Ratten die Frage nach dem zellulären Aufnahme- und Sekretionsmechanismus von HMWK auf. Für diesen Mechanismus wäre sowohl ein Rezeptor-vermittelter Vorgang als auch ein spezifischer Transporter denkbar, die die Passage der Zellmembran vermitteln.

Für die Überprüfung der *in vitro* Ergebnisse stehen noch *in vivo* Experimente aus, die aufgrund von externen Problemen bei der Zucht der BN/Ka im Rahmen dieser Arbeit nicht realisiert werden konnten, da die Tiere nicht verfügbar waren. Dabei sind mehrere experimentelle Ansätze denkbar.

Da die Hauptversorgung eines Organismus mit HMWK durch die hepatische Synthese und Sekretion erfolgt, die durch den genetischen Defekt in BN/Ka ausbleibt, sollte eine *in vivo* Transfektion mit dem HMWK-Gen den Plasma-HMWK-Mangel beseitigen und die Inzidenz von AAA durch Normalisierung der HMWK Plasma-Werte drastisch verringern. Ebenso denkbar wäre die externe Zufuhr von HMWK in diesen Tieren, die allerdings über implantierte Pumpen bzw. intravenös erfolgen müsste, da HMWK als Protein oral nicht verfügbar ist, um die Plasma-Werte zu normalisieren. Da die Gabe des nativen Proteins aufgrund der finanziellen, physiologischen und technischen Möglichkeiten zur Zeit nicht realisierbar ist, wäre es in der Zukunft denkbar, durch Gabe eines vor Abbau geschützten rekombinanten modifizierten Proteins bzw. der spezifischen inhibitorischen Domäne, den HMWK-Plasma-Mangel zu beseitigen.

Für die Übertragbarkeit dieses Rattenmodells auf den Menschen existieren bisher keine Daten. Es sind nur wenige Fälle von humaner Kininogen-Defizienz bekannt. Der Williams-Fall ist durch einen molekularen Defekt mit einem Basenaustausch von Cytosin nach Thymin am Nukleotid 586 charakterisiert. Dies führt zu einem Stop-

Codon im Exon 5, wodurch die Biosynthese der RNA nach der Aminosäure 195 vorzeitig gestoppt wird. Ob diese gekürzte mRNA-Form überhaupt translatiert wird oder das daraus gebildete Protein in den Hepatozyten akkumuliert und abgebaut wird, ist nicht bekannt. Die fehlende Sekretion von Kininogenen führt zu einem totalen Defizit von HMWK und LMWK im Plasma.¹⁷⁰ Im Fitzgerald-Fall wird eine 28kDa-kleinere 92 kDa-Form von HMWK synthetisiert und sezerniert, die jedoch funktionell inaktiv ist. Da die komplette Domäne 4 vorhanden ist, kann durch Kallikrein nach wie vor Bradykinin freigesetzt werden, für das man normale Plasma-Level detektiert. Für die niedermolekulare Form LMWK werden ca. 40% der normalen Plasma-Werte gemessen.²¹⁰ Die klinische Relevanz dieser Mutationen stellte sich hauptsächlich in Störungen des Blutgerinnungs-Systems, wie z.B. einer deutlich verlängerten partiellen Thromboplastinzeit, dar, es wurden aber auch Fälle von Arteriendissektionen beobachtet.²¹⁰

In der Betrachtung physiologischer Cystein-Proteasen-Inhibitoren (siehe 1.1.7.) wurde eine Verbindung von Cystatin C-Defizienz und atherosklerotischen und aneurysmatischen Läsionen gefunden. Dabei zeigte sich eine hohe Expression von Cystatin C in gesunden VSMC, die invers mit dem Fortschritt der Erkrankung korrelierte.¹⁰¹ Begründet auf den hohen Konzentrationen in Körperflüssigkeiten, schreibt man Cystatin C die Rolle eines der wichtigsten extrazellulären Cystein-Proteasen-Inhibitors zu.^{101,211-213} Demnach ist die detektierte Korrelation von Cystatin C-Defizienz und AAA im Menschen mit der Situation in den BN/Ka vergleichbar, da in beiden Fällen die physiologische Balance aus Proteasen und Inhibitor gestört ist, deren Restauration eine therapeutische Strategie darstellen könnte. Ein momentan limitierender Faktor stellt die pharmazeutische Verfügbarkeit solcher Cystein-Proteasen-Inhibitoren, wie HMWK oder Cystatin C, dar.

Bisherige therapeutische Überlegungen basieren auf allgemeinen pathophysiologischen Beobachtungen. In einem Tier-Modell von hyperlipidämischen Apolipoprotein E-defizienten Mäusen konnte durch eine kurzfristige 4-wöchige Infusion von Angiotensin II ein erhöhter Schweregrad an aortischen atherosklerotischen Läsionen als auch die Entstehung von AAA induziert werden. Dies war mit einer erhöhten Infiltration von Makrophagen in den Raum der Adventitia als auch mit Durchbrüchen in der Media assoziiert.²¹⁴ Dies ist kohärent mit den Beobachtungen in BN/Ka, die ebenso unter

Hochfett-Diät exzessive AAA entwickelten.¹⁷² Mit dem AT₁-Rezeptorblocker Losartan konnte erstmalig in einem Maus-Modell des Marfan-Syndroms gezeigt werden, dass Losartan die Entstehung von Aortenaneurysmen verhindert.²¹⁵ Daraus lassen sich Ansätze für Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Systems, mit bevorzugtem Augenmerk auf die AT₁-Rezeptorblocker, als auch für Medikamente, die in den Fettstoffwechsel eingreifen, wie Statine und Fibrate ableiten, deren Auswirkung auf die Inzidenz und das Fortschreiten von AAA im Tiermodell getestet werden sollten.

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) und das Kinin-Kallikrein-System sind durch die Enzyme Kallikrein und Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) eng miteinander verbunden. Neue Untersuchungen ergaben eine Hochregulation von Angiotensin II in humanen AAA sowie eine Korrelation von Polymorphismen des ACE-Gens mit aortischen, zerebralen und koronaren Aneurysmen.²¹⁶⁻²¹⁹ Es konnte gezeigt werden, dass in AAA Patienten mit vorangegangener ACE-Inhibitor-Behandlung die Inzidenz der Ruptur des Aneurysmas signifikant geringer war.²²⁰ Desweiteren verringerten der ACE-Inhibitor Enalapril und der AT₁-Rezeptor-Blocker Losartan die Ruptur von Läsionen der internen elastischen Lamina von BN Ratten unabhängig von der Reduktion des systolischen Blutdruckes.²²¹ In einem Elastase-Perfusion-Modell in Ratten verhinderte die Vorbehandlung mit den ACE-Inhibitoren Captopril, Lisinopril bzw. Enalapril die Entstehung von AAA und verzögerte die Degradation der elastischen Media.²²² Auf der anderen Seite verstärkte der AT₂-Rezeptor-Antagonist die Entstehung von Angiotensin II-induzierten AAA und Atherosklerose.

Ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt stellt die Therapie mit Tetracyclinen dar. Doxycyclin inhibierte in einem Elastase-induzierten Rattenmodell die Entstehung von AAA,^{223,224} welches sowohl in einem Maus-Modell²²⁵ als auch in einer kleinen randomisierten Studie von AAA-Patienten unter Standarddosen-Therapie mit Doxycyclin (200 mg/ Tag)²²⁶ bestätigt werden konnte. Der funktionelle Mechanismus wurde auf die Inhibierung von MMP unabhängig von den antibiotischen Eigenschaften zurückgeführt.²²³ Allerdings stellt eine langfristige Gabe von Antibiotika hinsichtlich der Gefahr von Resistenzbildungen keine zukunftsreiche Therapiemöglichkeit für AAA dar.

Desweiteren schien die Behandlung mit Propanolol ein aussichtsreicher Ansatz zu sein. Bisher werden β -Blocker zur Prevention der Aortenbogendilatation in Patienten mit

Marfan-Syndrom eingesetzt und eine kleine retrospektive Studie mit Patienten mit kleinen AAA als auch Ergebnisse aus tierexperimentellen Versuchen ließen eine Inhibierung der AAA Entstehung vermuten.²²⁷ Nachfolgende prospektive, randomisierte, Placebo-kontrollierte und multizentrisch durchgeführte klinische Studien konnten allerdings keinen Vorteil von Propanolol hinsichtlich der AAA Wachstumsrate, operative Reparatur von AAA und Mortalität aufzeigen.²²⁸ Neben hohen Studienabbruchsraten aufgrund der starken Nebenwirkungen, konnte in einer weiteren Studie sogar eine Steigerung der Mortalität in der Propanolol-Gruppe festgestellt werden,²²⁷ so dass dieser therapeutische Ansatz als nicht effektiv und ratsam einzustufen ist.

Zusammengefasst bieten sich verschiedene therapeutische Strategien, in den Krankheitsverlauf von AAA und anderen vaskulären Pathologien einzugreifen. Bisherige Ansätze basieren jedoch nur auf experimentellen Beobachtungen ohne Kenntnis der dahinterstehenden Mechanismen oder sind therapeutisch nicht realisierbar. Durch die zunehmende Aufklärung der pathologischen Mechanismen und darin involvierter Proteine werden sich neue Strategien und Angriffspunkte aufzeigen, die die Möglichkeit der medikamentösen Therapie von kleinen AAA bieten. Im Falle des Verlustes von VSMC bedeutet es einerseits in den apoptotischen Verlauf einzugreifen und diesen aufzuhalten bzw. zu stoppen, und andererseits durch Kenntnis der Apoptose-auslösenden Umstände, diese bereits zu therapieren, um den Start der apoptotischen Kaskade von vornherein zu unterbinden.