

## 1. Einführung

Atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwände sind die Ursache kardio-vaskulärer Erkrankung, wie koronare Herzerkrankung und Myokardinfarkt. Unter Atherosklerose versteht man eine progressive inflammatorische Erkrankung, welche gekennzeichnet ist durch die Akkumulation von Lipiden, glatten Gefäßmuskelzellen und mononukleären Zellen in der Gefäßwand<sup>1,2</sup>. Initiiert wird Atherosklerose durch die Adhäsion und Diapedese von Monozyten durch die Endothelzell-Barriere<sup>3</sup>, was von der Transdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen begleitet ist<sup>4</sup>. Dies befähigt sie zur aktiven Teilnahme am Entzündungsprozess und zur Endozytose modifizierter Lipoproteine<sup>1,4</sup>. Das Wachstum der atherosklerotischen Läsion erfolgt durch die Akkumulation von Lipiden, aber auch durch Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen und deren Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM; fibroproliferative Phase)<sup>1,2</sup>. Die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen und deren gesteigerte ECM-Synthese ist auch von zentraler Bedeutung bei der Entstehung von Restenosen nach therapeutischen Eingriffen<sup>2</sup>.

Die koronare Herzerkrankung ist die häufigste Ursache der Herzinsuffizienz. Herzinsuffizienz führt zum kardialen Remodeling, worunter man verschiedenste molekulare und Zell-biologische Veränderungen des Myokards, welche im Sinne einer Adaptation auftreten, verstehen kann<sup>5</sup>. Wichtig ist hierbei die Proliferation/Migration kardialer Fibroblasten und deren gesteigerte Synthese, aber auch Abbau der ECM<sup>6</sup>. Diese Imbalance im Matrix-Remodeling mündet in der Regel in der Fibrose und damit verbunden veränderter LV-Geometrie und Funktionsstörung.

Eine Vielzahl der an kardio-vaskulären Erkrankungen beteiligten Prozesse werden durch Wachstumsfaktoren, Chemokine und Adhäsionsrezeptoren reguliert<sup>1,2</sup>, von denen die Mehrzahl als inaktive Proproteine synthetisiert werden. Proproteine unterliegen unterschiedlichsten post-translatorischen Modifikationen (wie z.B. N-terminale Acetylierung), müssen aber auch durch spezifische endoproteolytische Spaltung in ihrem Propeptid aktiviert werden.

So zeigte Steiner et al.<sup>7</sup>, dass Insulin aus einem Proinsulin Vorläuferprotein entsteht. Zeitgleich identifizierten Chrétien und Li<sup>8</sup> die Aminosäuresequenzen von  $\beta$ -Lipotropin ( $\beta$ -LPH),  $\gamma$ -LPH und  $\beta$ -Melanotropin ( $\beta$ -MSH) und fanden, dass die  $\beta$ -MSH Sequenz in den  $\beta$ -LPH und  $\gamma$ -LPH Sequenzen enthalten ist. Sie schlussfolgerten, dass  $\beta$ -MSH durch endoproteolytische Spaltung an basischen Aminosäuren in den LPHs entsteht<sup>8</sup>. Erst 20 Jahre später isolierten Julius et al.<sup>9</sup> aus Pilzen das *KEX2* Gen, dessen Produkt Kexin (EC 3.4.21.61) Proopiomelanocortin (POMC) aktivieren kann<sup>10</sup>. Die Entdeckung von Kexin war die Basis zur Identifikation weiterer humaner Isoenzyme, die heute in der Familie der Subtilisin/Kexin-ähnlichen Proprotein Convertasen (PCs) zusammengefasst sind (Subtilisin ist die bakterielle Protease)<sup>11-13</sup>. Bisher wurden sieben verschiedene Kalzium-abhängige Serin-Proteasen charakterisiert, die Proproteine an Sitzen di-basischer Aminosäuresequenzen (generelles Motiv: (K/R)-(Xn)-(K/R)↓) aktivieren können<sup>11-13</sup>. Zu diesen PCs zählen: PC1 (auch PC3 genannt), PC2, PC4, PACE4, Furin, PC5A&B (auch PC6 genannt) und PC7/LPC<sup>11-13</sup>. Darüber hinaus wurden kürzlich zwei weitere PC-Isoenzyme identifiziert. Die Pyrolysin-ähnliche Subtilase SKI-1/S1P<sup>11,14</sup> aktiviert Proproteine an nicht-basischen Aminosäuren mit dem Konsensus-Motiv: (R/K)-X-(hydrophob)-Z↓ (wobei Z variabel ist). Von der neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1)/PC8 ist bisher bekannt, dass sie ihr eigenes Pro-Segment an VFAQ<sup>153</sup>↓ spaltet<sup>15</sup>. Alle PCs bestehen aus einem Propeptid, gefolgt von einer katalytischen Domäne, einer so genannten HomoB Domäne und einer Carboxy-terminalen Domäne, welche für jedes Isoenzym individuell ist<sup>11,12</sup>. Die katalytische Domäne zeigt die höchste Homologie (ca. 55%)<sup>11,12</sup>. Das Propeptid dient

als intramolekulares Chaperone, wird im endoplasmatischen Retikulum autokatalytisch abgespalten und funktioniert hiernach als Inhibitor, bis das Enzym seinen Wirkungsort erreicht hat <sup>16</sup>.

Jedes dieser Enzyme, alleine oder in Kombination mit anderen, ist verantwortlich für die Gewebe-spezifische Aktivierung unterschiedlicher Polypeptid-Vorläufer. Die Interaktion von PCs mit Proproteinen ist streng reguliert durch deren individuelle Gewebeverteilung und subzelluläre Lokalisation, sowie eine Reihe von Sequenz- und Strukturerefordernissen <sup>11,12,17-19</sup>. Furin, dessen Kristallstruktur vor kurzem aufgeklärt wurde, aktiviert Proproteine mit hoher Spezifität an di-basischen R-Xaa-K/R-R-ähnlichen Motiven <sup>19</sup>. PC5 zeigt eine vergleichbare Aktivität und beide Isoenzyme finden sich im *trans*-Golgi Network (TGN) und an der Zellmembran <sup>11,20,21</sup>. PC4 ist nur in Keimzellen zu finden <sup>22</sup> und PC1, PC2 sind fast ausschließlich in neuroendokrinen Zellen zu finden <sup>23</sup>, wo sie in der sekretorischen Granula lokalisiert sind <sup>24</sup>. PC7 ist besonders stark in lymphatischen Geweben vorhanden <sup>25</sup>. Im Gegensatz hierzu zeigen Furin und das biochemisch und Zell-biologisch eng verwandte PC5 <sup>26</sup> (beide werden auch als „furin-like PCs“ bezeichnet) eine breite Zell- und Gewebeverteilung <sup>11,12</sup>. Die physiologische Bedeutung von PCs wird unterstrichen durch die Untersuchungen von knockout Tieren. Furin defiziente Mäuse sind embryologisch letal (e10.5 - e11.5) und vor allem charakterisiert durch Defekte der Morphogenese des Herzens und der Vaskulatur <sup>27</sup>. PC4 knockout Tiere sind infertil <sup>22</sup> und PC1 Defizienz ist charakterisiert durch postnatalen Kleinwuchs und multiple endokrinologische Defekte, insbesondere der hypothalamischen und adrenokortikotropen Hormone, wie auch der Insulinbiosynthese <sup>28</sup>. Beim Menschen wurde eine Mutation im PC1 Gen identifiziert, die gekennzeichnet ist durch Adipositas in früher Kindheit, gestörte Glukosetoleranz, hypogonadotropen Hypogonadismus, Hypokortisolismus, erhöhte Plasma Proinsulin- und POMC-Spiegel, sowie ein Malabsorptionssyndrom <sup>29,30</sup>.

Die Bedeutung von PCs für die Aktivierung von Proproteinen wie Wachstumsfaktoren (z.B. NGF, TGF- $\beta$ 1) <sup>31,32</sup>, viralen Glykoproteinen (z.B. HIV gp160) <sup>33,34</sup>, pro-Matrix Metalloproteinasen (MMPs, z.B. MT-MMPs) <sup>35</sup> oder auch pro- $\alpha$ -Integrinen <sup>36</sup>, wird in der Regel an ko-infizierten bzw. ko-transfizierten Zelllinien untersucht. Diese Untersuchungen haben zur Identifikation von PCs als zentrale Regulatoren bei Tumorerkrankungen beigetragen <sup>37</sup>: Furin, welches sich in normalen Zellen gering exprimiert findet, ist in Tumorzellen stark induziert und steigert die Invasion von Tumorzellen durch die Aktivierung von pro-TGF- $\beta$ 1 und/oder pro-MT1-MMP (MMP-14) *in vitro* und *in vivo* <sup>38,39</sup>.

Aufgrund ihrer Aktivität und Substrate sind PCs auch potentielle Regulatoren/Mediatoren bei kardio-vaskulären Erkrankungen. Negishi et al. <sup>40</sup> zeigten, dass fluid shear stress in Endothelzellen TGF- $\beta$ 1 und seine aktivierende Convertase Furin induziert. *In vitro* aktivieren PCs den Wachstumsfaktor Endothelin 1 <sup>41</sup>, wie auch die Protease Prorenin <sup>42</sup>, was von potentieller Bedeutung für die Blutdruckregulation sein kann. Furin und BNP sind nach Myokardinfarkt in Ratten koinduziert und koreguliert <sup>43</sup> und das Spannungs-induzierte hypertrophe Wachstum neonataler Kardiomyozyten der Ratte ist von der Induktion von BNP und Furin begleitet <sup>44</sup>.

Das Ziel der hier dargestellten Arbeiten war es die Expression, Regulation und Funktion von Furin und PC5 in kardio-vaskulären Zellen, insbesondere Gefäßmuskelzellen, Monozyten/Makrophagen und kardialen Fibroblasten zu untersuchen.