

## 2. Eigene Arbeiten zur Regulation und Funktion der Proprotein Convertasen Furin und PC5 in kardio-vaskulären Zellen

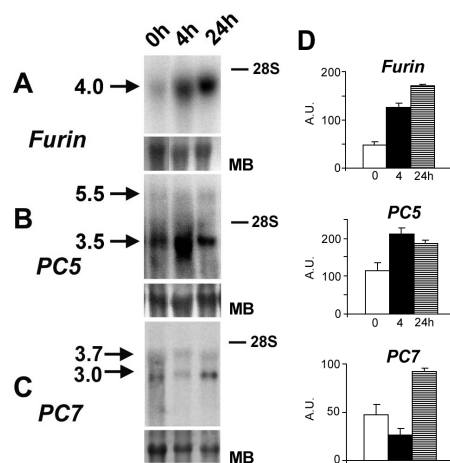
### 2.1 Expression und Regulation von Proprotein Convertasen in glatten Gefäßmuskelzellen

#### 2.1.1 Proprotein Convertasen in proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen: PI3-Kinase/p70<sup>S6</sup>-Kinase-abhängige Regulation von PC5 durch PDGF

Die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen spielt eine zentrale Rolle in der fibro-proliferativen Phase der Entstehung atherosklerotischer Plaques und von Restenosen nach therapeutischen Gefäßinterventionen <sup>2</sup>. Kennzeichnend ist die phänotypische Differenzierung der Gefäßmuskelzellen von einem metabolisch inaktiven, „kontraktilen“, zu einem proliferierenden, metabolisch aktiven, „sekretorischen“ Typ <sup>45</sup>. Wichtige Mediatoren/Modulatoren sind hierbei Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle <sup>2</sup>, die in der Regel als Proproteine synthetisiert werden und dann durch endoproteolytische Spaltung an bestimmten Aminosäuresequenzen von Proprotein Convertasen (PCs) biologisch aktiviert werden <sup>11-13</sup>. Aufgrund ihrer Aktivität und möglichen Substrate sind diese PCs potentielle Mediatoren in der Entstehung von Atherosklerose und Restenose.

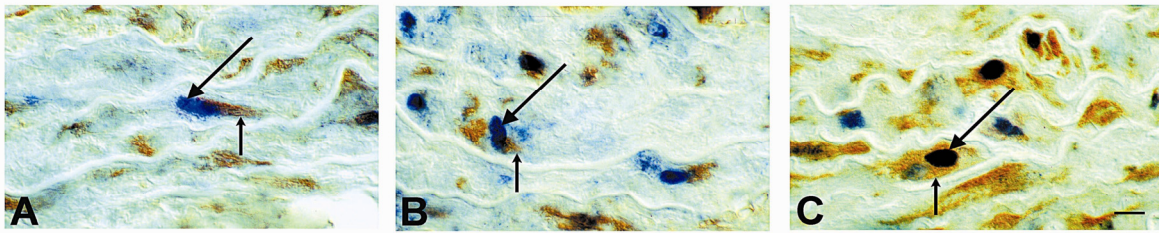
Zunächst haben wir die Genexpression und Genregulation von PCs in Arterien mit Hilfe eines Rattenaorta-Organkulturmodell untersucht <sup>46</sup>. Dieses Modell bietet die Möglichkeit, bei erhaltener Zell/Zell- und Zell/Matrix-Interaktion Genregulation <sup>47</sup> und de novo Proteinbiosynthese <sup>48</sup> zu analysieren.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Kultivierung arterieller Explantate von Rattenaorten in Serum-freiem Medium (4 und 24 Stunden) in einer raschen Induktion der Proliferation von Gefäßmuskelzellen resultiert (erkennbar an der Expression von PCNA; proliferating cell nuclear antigen). Diese Induktion der Proliferation von Gefäßmuskelzellen war begleitet von der mRNA (Abbildung 1) und Protein Induktion von Furin, PC5 und PC7 <sup>46</sup>.



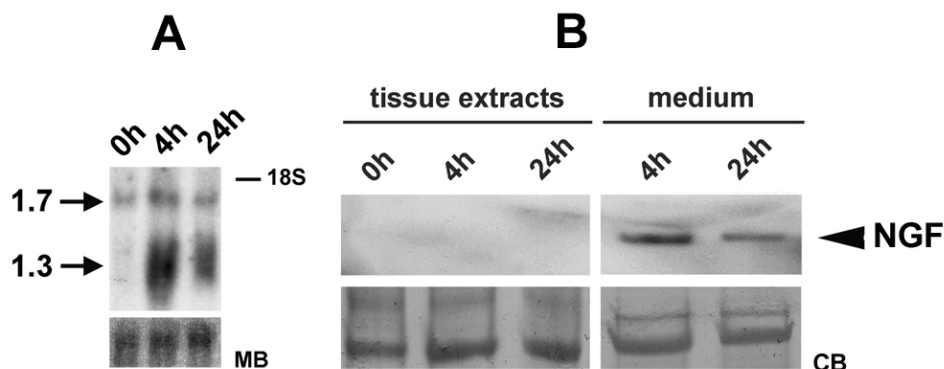
**Abbildung 1.** Northern Blot Experimente zeigen die mRNAs von Furin (A), PC5 (B) und PC7 (C) in Kontrollen (0h) und in Rattenaorten, welche 4 und 24 Stunden kultiviert wurden. Die Methylen Blau Färbungen (MB) der Membranen sind gezeigt. Die semiquantitative Densitometrie ist in (D) abgebildet. n = 3.

Furin, PC5 und PC7 fanden sich überwiegend in PCNA-positiven, proliferierenden Zellen induziert (Abbildung 2). Im Gegensatz hierzu waren die neuroendokrinen PC1 und PC2 nicht in Gewebeextrakten von Rattenaorten detektierbar <sup>46</sup>.



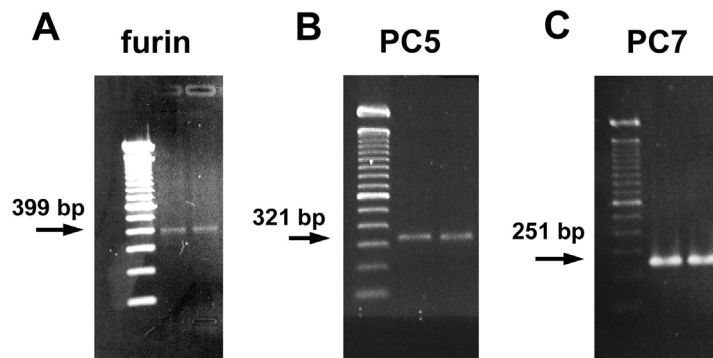
**Abbildung 2.** Immunocytochemische Kolokalisation von Furin (A), PC5 (B) und PC7 (C) mit PCNA in der Media von Rattenaorten, welche 24 Stunden kultiviert wurden. PCNA-positive Nuclei sind blau gefärbt. Furin, PC5 und PC7 sind braun gefärbt. Bar = 10 µm.

In weiteren Experimenten untersuchten wir, ob die Induktion von Furin, PC5 und PC7 auch von einer Neusynthese von Wachstumsfaktoren begleitet ist <sup>46</sup>. Hierzu wurde exemplarisch NGF (nerve growth factor) gewählt, welches von Gefäßmuskelzellen synthetisiert wird <sup>49</sup>. Um biologische Aktivität zu erlangen, muss NGF an der RSKR↓ Aminosäuresequenz in seinem Propeptid durch Furin, bzw. Furin-ähnliche PCs endoproteolytisch aktiviert werden <sup>31</sup>. Northern Blot und Western Blot Experimente zeigten die Hochregulation von NGF mRNA und die Abgabe von NGF Protein an das Kulturmedium (Abbildung 3). Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die Induktion der Proliferation von Gefäßmuskelzellen von einer Wachstumsfaktorsynthese, wie auch der Induktion der Wachstumsfaktoren-aktivierenden PCs Furin, PC5 und PC7 begleitet ist.



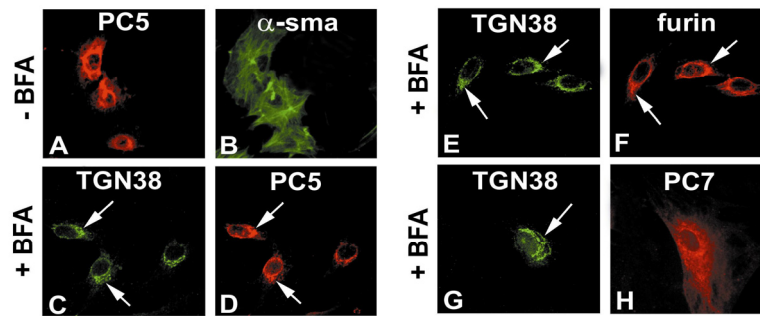
**Abbildung 3.** Northern Blot Experimente zeigen die mRNA Konzentrationen von NGF in Segmenten von Rattenaorten, die 0, 4 und 24 Stunden kultiviert wurden (A). Methylen Blau Färbung der 18S ribosomalen mRNA ist dargestellt. Western Blot Analysen zeigen, dass NGF in das Kulturmedium abgegeben wurde (B). n = 3.

Um in weiteren Studien die subzelluläre Lokalisation von Furin, PC5 und PC7, wie auch deren Regulation durch Wachstumsfaktoren zu untersuchen, wurden Experimente an Kulturen primärer Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten durchgeführt <sup>50</sup>. PCR-Analysen bestätigten zunächst die mRNAs von Furin, PC5 und PC7 in Gefäßmuskelzellen (Abbildung 4).



**Abbildung 4.** Das Vorliegen von Furin (**A**; 399 bp), PC5 (**B**; 321 bp) und PC7 (**C**; 251 bp) mRNAs in Kulturen von glatten Gefäßmuskelzellen wurde mittels PCR-Analysen bestätigt.

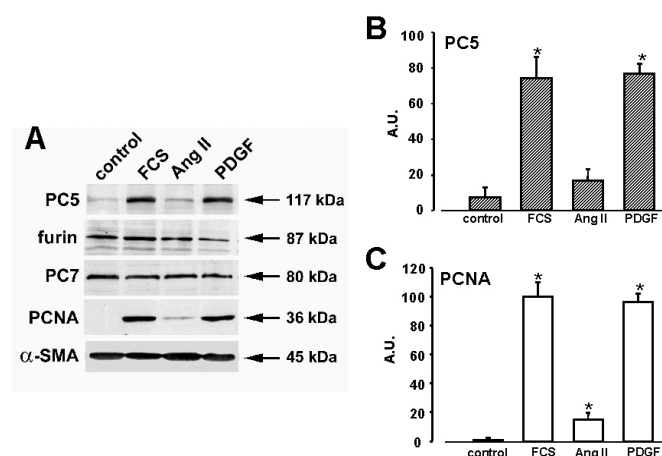
Im konstitutiven Weg der Proteinsekretion erfolgt die post-translatorische Aktivierung von Proproteinen durch PCs im *trans*-Golgi network (TGN; von wo aus Proteine unmittelbar nach ihrer Synthese in sekretorischen Vesikeln zur Membran geführt werden). Im regulierten Weg der Proteinsekretion (z. B. in neuroendokrinen Zellen) erfolgt die Aktivierung im TGN und/oder der sekretorischen Granula, wonach Proteine zunächst in größeren Vesikeln gespeichert werden, um dann auf ein Signal hin freigesetzt zu werden<sup>11</sup>. Zur Identifikation der subzellulären Lokalisationen von Furin, PC5 und PC7 führten wir Experimente mit Brefeldin A (BFA)-behandelten Gefäßmuskelzellen durch<sup>50</sup>. BFA stört den Golgi Transport und führt zum Auseinanderfallen des Golgi Apparates<sup>51</sup>, wobei ein Teil des TGN separat bestehen bleibt<sup>52</sup>. In BFA-behandelten Zellen zeigte sich eine Konzentrierung von PC5 in den paranukleären Kompartimenten, die charakteristisch für das TGN sind. Hier kolokalisierte PC5 mit dem Markerprotein TGN38 (Abbildung 5). Ohne BFA-Inkubation fand sich PC5 breiter intrazellulär verteilt. Dies lässt sich durch die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der PC5-Isoenzyme PC5A und PC5B erklären<sup>20</sup>. Der in diesen Experimenten benutzte polyklonale PC5-Antikörper erkennt beide Isoformen<sup>20</sup>. PC5B, eine Splice-Variante von PC5A, ist durch eine C-terminale Verlängerung und Transmembran-Domäne gekennzeichnet, welche seine intrazelluläre Sortierung regelt<sup>20,26</sup>. So zeigten Xiang et al.<sup>53</sup> mit Hilfe von Epitope-markierten PC5B Konstrukten, dass PC5B nach BFA-Behandlung nicht ausschließlich mit dem TGN kolokalisiert. Dies tritt auf, da PC5B in den frühen Lamellae des TGN lokalisiert ist, welche nach BFA-Behandlung kollabieren<sup>53</sup>. Im Gegensatz zu PC5B ist PC5A in konstitutiven Zelltypen im nicht-kollabierbaren TGN lokalisiert<sup>20</sup> und kolokalisiert so mit TGN38. Da PC5A in einigen Zelllinien auch in sekretorischen Vesikeln identifiziert wurde<sup>20</sup>, scheint dieses Enzym sowohl im konstitutiven wie auch regulierten Weg der Proteinsekretion zu funktionieren. Unsere Ergebnisse zeigen, dass beide PC5 Isoenzyme in Gefäßmuskelzellen lokalisiert sind. Ähnlich ist auch Furin im TGN lokalisiert<sup>50</sup>. PC7 zeigte jedoch keine Kolokalisation mit TGN38, was auf eine von Furin und PC5 differente subzelluläre Lokalisation schließen lässt (Abbildung 5).



**Abbildung 5.** Immunfluoreszenz-Kolokalisation von PC5 (A) und  $\alpha$ -smooth muscle ( $\alpha$ -sma; B) bestätigte die Präsenz von PC5 in Gefäßmuskelzellen. Nach Behandlung mit BFA kolokalisierte PC5 (C) mit TGN38 (D). Furin zeigte die gleiche Lokalisation (E und F); PC7 kolokalisierte nicht mit TGN38 (G und H).

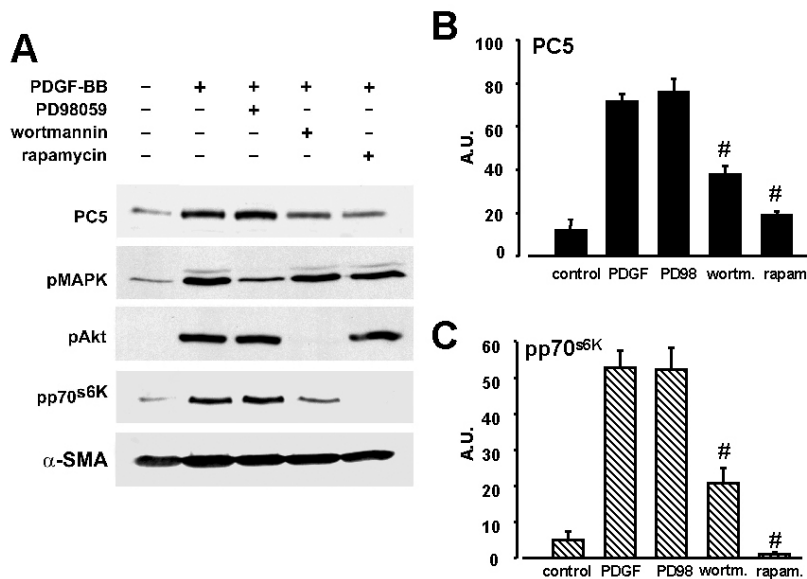
Zellen reagieren auf die Stimulation mit mitogenen und hypertrophen Wachstumsfaktoren mit der Initiierung der Proteinbiosynthese. Hierbei werden eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen stimuliert, von denen die ERK1/2 MAP-Kinase und ribosomale S6 Kinase (p70<sup>S6</sup>-Kinase) eine zentrale Stellung in der Regulation des Zellwachstums einnehmen<sup>54,55</sup>. ERK1/2 wird durch die Ras-Raf-Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (MEK-Signaltransduktion) Kaskade aktiviert und reguliert so eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und early responds Genen. Der ERK1/2 MAP-Kinase Weg ist an der Wachstumsfaktor-induzierten Proteinsynthese beteiligt<sup>55,56</sup>. Die ribosomale p70<sup>S6</sup>-Kinase, ein Ziel des Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase) → Akt Weges, ist der wichtigste in vivo Regulator des 40S ribosomalen Protein S6 und kontrolliert Proteinsynthese und Zellzyklusprogression<sup>54</sup>.

In unseren Experimenten untersuchten wir die Regulation von Furin, PC5 und PC7 durch Wachstumsfaktoren<sup>50</sup>. Hierzu wählten wir Angiotensin II als einen Wachstumsfaktor, der Proteinbiosynthese initiiert und zur Zellhypertrophie führt<sup>56</sup>, und PDGF-BB als starkes Mitogen<sup>2</sup>. PDGF, wie auch Angiotensin II induzierten DNA-Synthese in Gefäßmuskelzellen, wenn auch Angiotensin II deutlich schwächer war (Abbildung 6). PDGF induzierte PC5, wohingegen Angiotensin II keinen Effekt hatte. Zeitkinetik-Analysen zeigten, dass PDGF-BB PC5 bereits nach ca. 30 Minuten induziert<sup>50</sup>. Im Gegensatz zur PDGF-abhängigen Hochregulation von PC5 wurden Furin und PC7 nicht reguliert (Abbildung 6).



**Abbildung 6.** Repräsentative Western Blot Experimente zur Regulation von PC5, Furin, PC7 und PCNA nach 48 Stunden Stimulation von Gefäßmuskelzellen mit 10%FCS, PDGF-BB (20 ng/mL) oder Angiotensin II (1  $\mu$ mol/L) (A). Die Ergebnisse zeigen, dass PC5 durch FCS und PDGF induziert wurde. Furin und PC7 wurden nicht beeinflusst. Die Membranen sind mit  $\alpha$ -smooth muscle ( $\alpha$ -SMA) re-geblottet. Die semiquantitative Densitometrie von PC5 (B) und PCNA (C) ist abgebildet (\* $p < 0.05$  vs. Kontrollen).  $n = 3$ .

Zur Identifikation der an der PDGF-vermittelten PC5-Induktion beteiligten Signaltransduktionswege führten wir pharmakologische Inhibitionsexperimente durch<sup>50</sup>. Hierzu benutzten wir den selektiven ERK-MAP-Kinase Inhibitor PD98059, den PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin und den mTOR(mammalian target of rapamycin)/p70<sup>s6</sup>-Kinase Inhibitor Rapamycin<sup>57</sup>. Wortmannin hemmte die PDGF-vermittelte PC5 Expression in Gefäßmuskelzellen signifikant, PD98059 hatte keinen Effekt. Rapamycin war der stärkste Inhibitor (Abbildung 7). Somit zeigen diese Daten, dass PDGF die PC5 Expression in Gefäßmuskelzellen über den PI3-Kinase/p70<sup>s6</sup>-Kinase -abhängigen Signaltransduktionsweg, der eine zentrale Rolle in der Proteinsynthese, Zellzyklusprogression<sup>54</sup> und Migration<sup>58</sup> spielt, induziert.



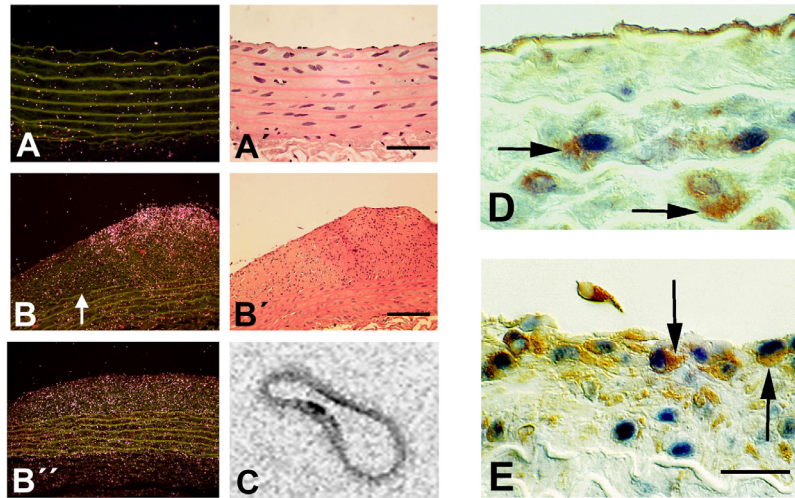
**Abbildung 7.** Repräsentative Immunoblots von PC5 Inhibitionsexperimenten (A). Die PDGF-stimulierte PC5-Induktion wurde signifikant durch den PI3-Kinase Wortmannin (200 nmol/L) und den Inhibitor von mTOR Rapamycin (10 ng/mL) gehemmt. Der ERK-MAPK-Inhibitor PD98059 (30  $\mu$ mol/L) hatte keinen Effekt. Die semiquantitative Densitometrie von PC5 (B) und phospho-(p)p70<sup>s6</sup>-Kinase (C) ist abgebildet (#p<0.05 vs. Kontrollen). n = 3.

### 2.1.2 Regulation von Furin und PC5 in glatten Gefäßmuskelzellen nach Ballon-Verletzung der Aorta im Tiermodell

Die Entstehung atherosklerotischer Plaques oder Restenosen nach therapeutischen Eingriffen ist durch die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen gekennzeichnet<sup>2</sup>. Um die Regulation von PCs in Gefäßmuskelzellen *in vivo* zu untersuchen, benutzten wir ein Rattenaorta Ballon-Verletzungsmodell<sup>50,59</sup>. In diesem Modell wird das Endothel entfernt und die Arterie überdehnt, was zur Induktion der Proliferation von Gefäßmuskelzellen in der Media und dann zur Migration der Zellen aus der Media durch die Lamina elastica interna in die Intima und Bildung der Neointima führt<sup>60</sup>.

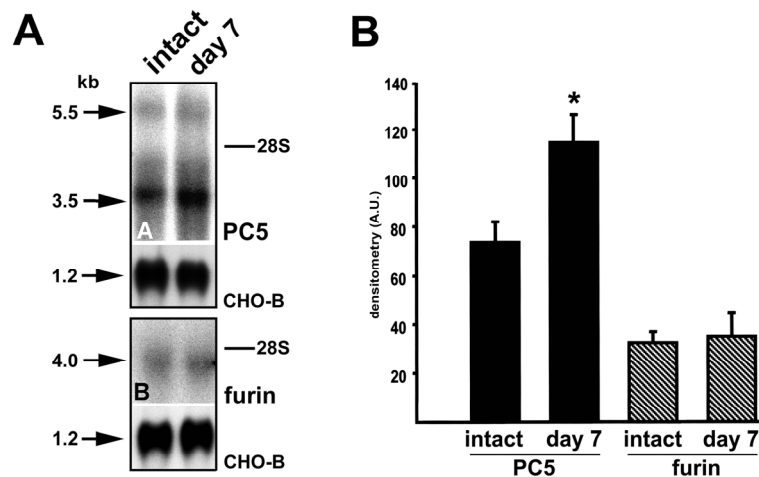
In nicht-verletzten Gefäßen fanden wir mit *in situ* Hybridisation nur eine geringe PC5 mRNA Expression in der Gefäßwand von Rattenarterien<sup>50</sup>. Im Gegensatz hierzu fand sich an Tag 28 nach Ballon-Verletzung, wenn also eine deutliche Neointima vorhanden ist, eine starke PC5 mRNA Induktion in den Gefäßmuskelzellen der Neointima (Abbildung 8). Immunohistochemische Untersuchungen zeigten eine vergleichbare Proteinregulation. PC5 Protein war vor allem in proliferierenden, PCNA-positiven

Gefäßmuskelzellen induziert, initial in der Media und später dann in der Neointima (Abbildung 8).



**Abbildung 8.** *In situ* Hybridisation der PC5 mRNA Lokalisation im Dunkelfeld (A und B) und Hellfeld (A' und B'). In intakten Gefäßen fand sich wenig PC5 mRNA (A und A'). Am Tag 28 nach Ballon-Verletzung (B und B') war PC5 mRNA stark in der Neointima induziert. Im Vergleich zeigte die PC5 sense Probe kein spezifisches Signal (B''). Der Röntgenfilm zeigt die selektive Hochregulation von PC5 mRNA in der Neointima (C). Immunocytochemische Kolokalisation von PC5 (Pfeile, braune Färbung) und PCNA (blaue Zellkerne) in Gefäßmuskelzellen am Tag 2 in der Media (D) und Tag 14 in der Neointima (E). Bar in A' = 50  $\mu$ m, in B' = 100  $\mu$ m und in E = 20  $\mu$ m.

Mit Northern Blot Experimenten verglichen wir die mRNA Regulation von PC5 und Furin in intakten und Ballon-verletzten Rattenarterien am Tag 7<sup>59</sup>, einem Zeitpunkt nach Verletzung, an dem die Proliferation der Gefäßmuskelzellen in der Neointima ein Maximum erreicht hat<sup>61</sup>. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die 3.5-kb PC5A mRNA<sup>20</sup> nach Ballon-Verletzung stark induziert war, wohingegen PC5B (5.5-kb) und Furin (4.0-kb) nicht signifikant reguliert wurden (Abbildung 9).



**Abbildung 9.** Northern Blot Analysen zeigen die Konzentrationen von PC5 (A) und Furin (B) in intakten Rattenarterien und nach Ballon-Verletzung am Tag 7. Im Gegensatz zu PC5A (3.5-kb) waren PC5B (5.5-kb) und Furin (4.0-kb) nicht signifikant induziert. Die Densitometrie ist in (B) dargestellt (\* $p < 0.05$  vs. intakte Gefäße;  $n = 3$ ).



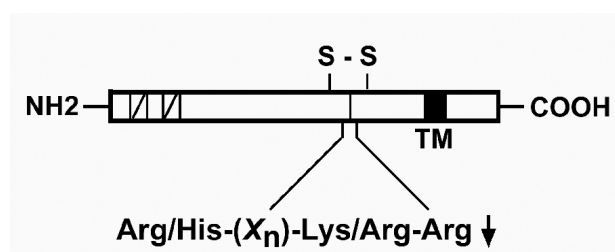
## 2.2 Aktivierung von Integrin $\alpha_v$ in glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen

### 2.2.1 Die endoproteolytische Aktivierung von $\alpha_v$ Integrin durch PC5 reguliert Adhäsion und Migration glatter Gefäßmuskelzellen und die Integrin-abhängige Signaltransduktion

Integrin-Rezeptoren sind eine Gruppe von über 15  $\alpha$ - und 20  $\beta$ - Untereinheiten, welche in über 20 Kombinationen heterodimerisieren. So kombiniert die  $\alpha_v$ -Untereinheit mit einer von 5  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta_1$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_5$ ,  $\beta_6$  oder  $\beta_8$ ) und erkennt die RGD (Arginin-Glycin-Aspartat) -Bindungsstelle in einer Vielzahl potentieller Liganden (z.B. Vitronectin, Fibronectin, Osteopontin oder Tenascin) <sup>62</sup>. Integrine stellen die Verbindung von ECM mit dem Zytoskelett dar und vermitteln so die dynamische Interaktion der Zelle mit der ECM, die für Adhäsion und Migration unabdingbar ist <sup>62</sup>. Integrin-Rezeptoren sind auch an der Mechanotransduktion und bi-direktionalen Signaltransduktion (*inside-out/outside-in signaling*) beteiligt <sup>63,64</sup>. Integrine besitzen selbst keine Tyrosin-Kinase Aktivität <sup>62</sup> und vermitteln Signaltransduktion durch Aktivierung von Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wie die fokale Adhäsions-Kinase (FAK) <sup>65</sup>. Aktivierung von Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen führt zur Induktion weiter distal gelegener Signaltransduktionswege, inklusive Ras/MEK und PI3-Kinase <sup>63</sup>.

Die Expression der  $\alpha_v$  Integrine  $\alpha_v\beta_3/\beta_5$  ist nach vaskulärer Verletzung in Nagern in vivo hochreguliert <sup>66,67</sup> und beide Integrine finden sich in humanen atherosklerotischen Läsionen <sup>68,69</sup>. In vitro regulieren  $\alpha_v\beta_3/\beta_5$  Integrine die Adhäsion und Migration von Gefäßmuskelzellen auf Vitronectin <sup>66,68</sup> und Osteopontin <sup>70</sup> und in vivo hemmt die Blockade von  $\alpha_v$  die Neointimabildung im Tiermodell <sup>66,71</sup>, was seine Bedeutung unterstreicht.

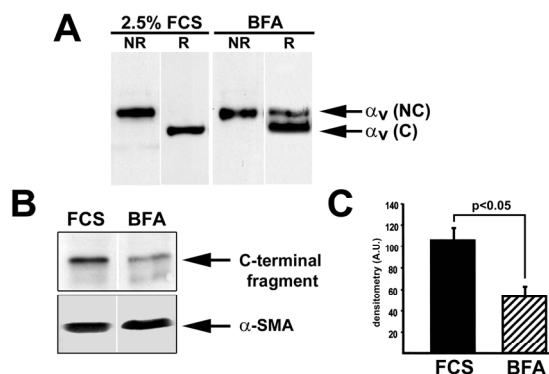
Eine Reihe von  $\alpha$ -Integrin Untereinheiten ( $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$ ,  $\alpha_{IIb}$  und  $\alpha_v$ ) bestehen aus Disulphid-gebundenen schweren und leichten Ketten <sup>62</sup>. So wurde gezeigt, dass die  $\alpha_v$  Untereinheit aus einer Disulphid-gebundenen leichten (25 kDa) und schweren (125 kDa) Kette besteht, welche aus einem 150 kDa pro- $\alpha_v$ -Integrin durch endoproteolytische Spaltung hervorgehen (Abbildung 10) <sup>72</sup>. Lissitzky et al. <sup>36</sup> zeigten in vitro/ex vivo, dass PC5 die wichtigste  $\alpha_v$ -Convertase ist, und fanden, dass Furin 3-mal schwächer war. Andere PCs (PC1, PC2 und PC7) waren gänzlich inaktiv <sup>36</sup>. Rigot et al. <sup>73</sup> fanden mit pulse-chase Experimenten, dass die Aktivierung von  $\alpha_6$  Integrin unmittelbar nach seiner Translokation zu Zellkompartimenten distal des endoplasmatischen Retikulums, wahrscheinlich im TGN, erfolgt.



**Abbildung 10.** Schematische Darstellung von  $\alpha_v$  Integrin (modifiziert nach Delwel et al. <sup>74</sup>). Der Spaltungssitz und die di-basische Aminosäuresequenz sind dargestellt. Die NH<sub>2</sub>-terminale (125 kDa) schwere Kette und die C-terminale 25 kDa leichte Kette sind nach endoproteolytischer Aktivierung durch eine Disulphid-Brücke miteinander verbunden. TM = Transmembran-Domäne.

Wir untersuchten zunächst die subzellulären Kompartimente der  $\alpha_v$  Integrin Aktivierung in Gefäßmuskelzellen <sup>59</sup>. Dies wurde mit Hilfe von BFA, was den Golgi Transport

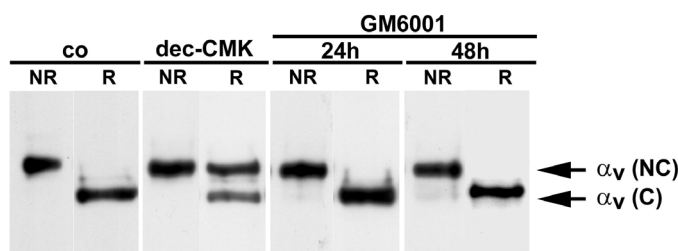
inhibiert<sup>51,52</sup>, durchgeführt. Unsere Daten zeigen, dass BFA die  $\alpha_v$  Aktivierung inhibiert, was darauf hinweist, dass  $\alpha_v$  im TGN aktiviert wird (Abbildung 11).



**Abbildung 11.** (A) Zur Identifikation der subzellulären Kompartimente der Integrin  $\alpha_v$  Aktivierung wurden Gefäßmuskelzellen mit BFA inkubiert. In den Kontrollen findet sich ein 125 kDa  $\alpha_v$  auf reduzierenden SDS-Gelen (der  $\alpha_v$  Antikörper ist gegen das NH<sub>2</sub>-terminale Ende gerichtet; NR = non-reducing; R = reducing). Nach BFA war die  $\alpha_v$  Aktivierung signifikant inhibiert, erkennbar an der Zunahme des nicht-gespaltenen 150 kDa  $\alpha_v$  (C = cleaved; NC = non-cleaved). (B) Diese Resultate wurden mit einem Antikörper, der das C-terminale Ende (25 kDa) von  $\alpha_v$  detektiert, bestätigt. Die Densitometrie von B ist in (C) abgebildet. n = 3.

Um die Bedeutung von Furin/PC5 für die  $\alpha_v$  Integrin Aktivierung in Gefäßmuskelzellen zu untersuchen, benutzten wir den selektiven furin-like PC-Inhibitor dec-CMK<sup>33</sup>. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition von Furin/PC5 die  $\alpha_v$  Aktivierung hemmt, erkennbar an der Zunahme des nicht-aktivierten 150 kDa pro- $\alpha_v$  (Abbildung 12)<sup>75</sup>. Somit zeigen unsere Daten<sup>59,75</sup>, dass die Aktivierung von  $\alpha_v$  Integrin in Gefäßmuskelzellen die Aktivität von Furin/PC5 voraussetzt und diese endoproteolytische Aktivierung im TGN erfolgt, wo wir zuvor Furin und PC5 in Gefäßmuskelzellen identifizierten<sup>50</sup>.

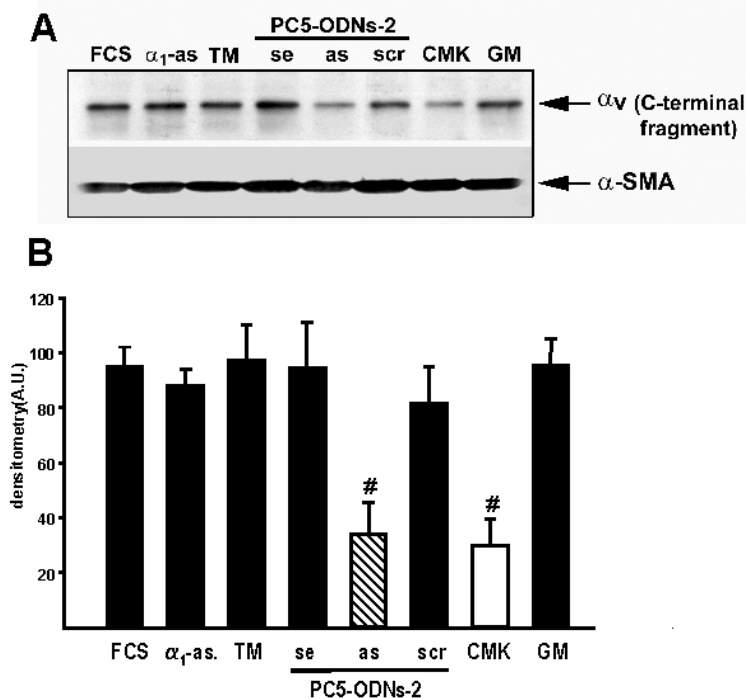
Es wurde jedoch auch ein Furin/PC5-unabhängiger, alternativer Weg der  $\alpha_v$  Aktivierung beschrieben. Dieser erfordert die Aktivität von Matrix Metalloproteinase MT1-MMP (MMP-14), welche pro- $\alpha_v$ -Integrin in eine Disulphid-gebundene 115 kDa schwere Kette (mit trunkiertem C-Terminus) und eine 25 kDa leichte Kette spaltet<sup>76</sup>. Die Autoren fanden, dass die pro- $\alpha_v$  Aktivierung durch MT1-MMP die Adhäsion und Migration von Karzinomzellen auf Vitronectin steigert<sup>76</sup>. Unsere Daten zeigen jedoch, dass, obwohl aktives MT1-MMP in proliferierenden Gefäßmuskelzellen vorhanden ist, der MMP-Inhibitor GM6001 (Ilomastat)<sup>76</sup> die  $\alpha_v$  Aktivierung nicht inhibierte<sup>75</sup>. Dies zeigt, dass MT1-MMP in Gefäßmuskelzellen keine bedeutende Integrin-Convertase darstellt (Abbildung 12).



**Abbildung 12.** In Kontrollen (co) detektierte der  $\alpha_v$ -Antikörper (gerichtet gegen das NH<sub>2</sub>-terminale  $\alpha_v$ ) nur aktiviertes  $\alpha_v$  (125 kDa; C = cleaved) auf reduzierende (R) SDS-Gelen (NR = non-reducing). Der PC-Inhibitor dec-CMK (50  $\mu$ mol/L; 24h) hemmte die  $\alpha_v$ -Aktivierung signifikant, erkennbar an der Zunahme des pro- $\alpha_v$  (150 kDa; NC = non-cleaved) auf reduzierenden Gelen. Der MMP-Inhibitor GM6001 (50  $\mu$ mol/L; 24 und 48h) hatte keinen Effekt. n = 3.

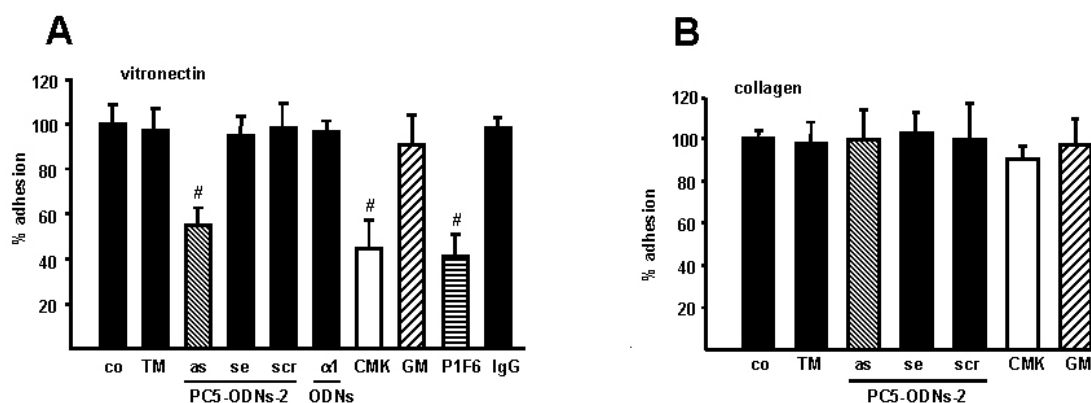


Da dec-CMK jedoch sowohl Furin als auch PC5 hemmt, benutzten wir PC5 spezifische antisense Oligonucleotide (asODNs), um die Bedeutung von PC5, der Haupt-Integrin  $\alpha_v$ -Convertase<sup>36</sup>, genauer zu untersuchen<sup>75</sup>. Die Transfektion von Gefäßmuskelzellen mit PC5 spezifischen antisense Oligonucleotiden zeigte, dass PC5 Aktivität zur  $\alpha_v$  Aktivierung in Gefäßmuskelzellen erforderlich ist (Abbildung 13).

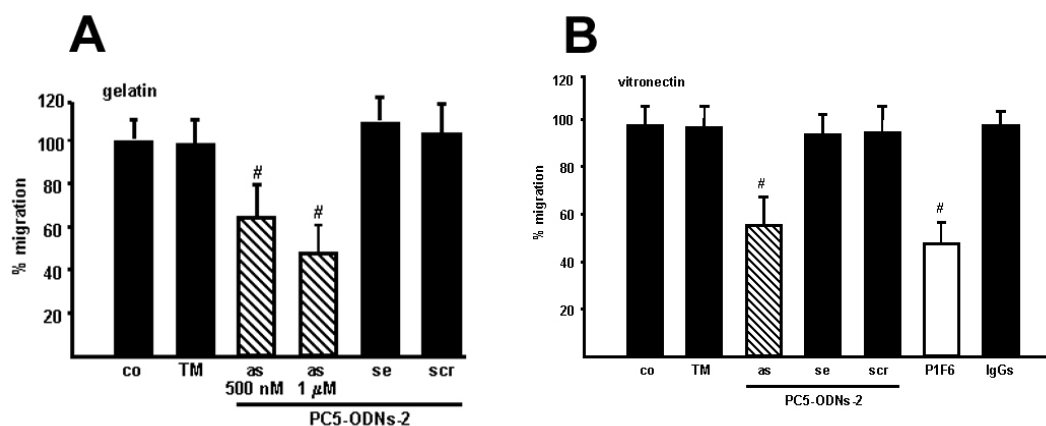


**Abbildung 13. (A)** Transfektion von Gefäßmuskelzellen mit PC5 antisense (as) Oligonucleotiden (ODNs) hemmt die  $\alpha_v$  Aktivierung, erkennbar an der signifikanten Abnahme der  $\alpha_v$  (25 kDa) leichten Kette (Immunodetektion mit einem Antikörper gegen das C-terminale  $\alpha_v$ ). Der Effekt von PC5 asODNs (1  $\mu$ mol/L; 24h) war dem des pharmakologischen PC-Inhibitor dec-CMK (CMK; 50  $\mu$ mol/L; 24h) vergleichbar. Der MMP-Inhibitor GM6001 (GM; 50  $\mu$ mol/L; 24h), sense (se) und scrambled (scr) PC5-ODNs hatten keinen Effekt. Ebenso zeigte die Transfektion mit einer gegen  $\alpha_1$ -Kollagen ( $\alpha_1$ -as.) gerichteten asODNs oder das Transfektionsmedium (TM) selbst keine Wirkung. Die Densitometrie ist in (B) abgebildet (# $p < 0.05$  vs. Kontrollen). n = 3.

Weiterführend untersuchten wir mit Hilfe von funktionellen Assays die Bedeutung der  $\alpha_v$  endoproteolytischen Aktivierung für die Funktionen von Gefäßmuskelzellen<sup>75</sup>. Unsere Daten zeigen, dass die Aktivierung von  $\alpha_v$  durch Furin/PC5 erforderlich ist für die Adhäsion auf dem  $\alpha_v$ -Liganden Vitronectin, nicht aber für die Adhäsion auf einer Kollagen Typ I Matrix (Abbildung 14). Dies erklärt sich dadurch, dass die Adhäsion an Typ I Kollagen  $\alpha_2$  Integrin vermittelt wird und dieses Integrin nicht endoproteolytisch aktiviert werden muss<sup>62</sup>. Vergleichbare Ergebnisse berichteten auch Berthet et al.<sup>77</sup>, welche die  $\alpha_v$  Aktivierung in Adenokarzinomzellen durch Transfektion mit dem Furin/PC5-Inhibitor  $\alpha_1$ -PDX ( $\alpha_1$ -Antitrypsin Portland)<sup>34,78</sup> hemmten. Unsere Ergebnisse zeigen auch, dass die Inhibition von Furin/PC5 und somit Inhibition der  $\alpha_v$  Aktivierung die Migration/Invasion von Gefäßmuskelzellen hemmt (Abbildung 15).



**Abbildung 14.** (A) PC5-asODNs (1  $\mu\text{mol/L}$ ), dec-CMK (CMK; 50  $\mu\text{mol/L}$ ) und der  $\alpha\beta 5$  blockierende Antikörper P1F6 (25  $\mu\text{g/mL}$ ) hemmten signifikant die Adhäsion von Gefäßmuskelzellen auf Vitronectin (10  $\mu\text{g/mL}$ ; # $p < 0.05$  vs. Kontrollen), wohingegen Transfektionsmedium (TM), sense (se) und scrambled (scr) PC5-ODNs,  $\alpha_1$ -Kollagen asODNs ( $\alpha_1$ -as.) und der MMP-Inhibitor GM6001 (GM; 50  $\mu\text{mol/L}$ ) keinen Effekt hatten. Nicht-spezifische IgGs (50  $\mu\text{g/mL}$ ) hatten keinen Effekt auf die Adhäsion.  $n = 6$ . (B) Keiner der Inhibitoren hemmte die Adhäsion auf Typ I Kollagen (20  $\mu\text{g/mL}$ ).  $n = 6$ .

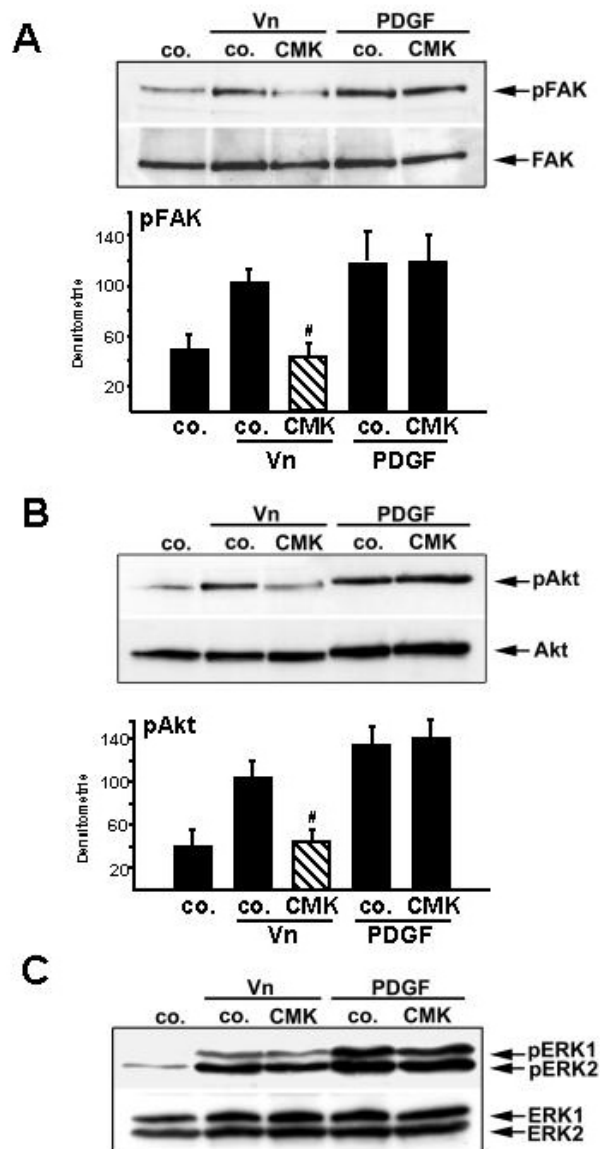


**Abbildung 15.** (A) PC5-asODNs (0.5 und 1  $\mu\text{mol/L}$ ) hemmten signifikant die Migration von Gefäßmuskelzellen auf einer Gelatine-beschichteten (0.2%) Membran in Konzentrations-abhängiger Weise (# $p < 0.05$  vs. Kontrollen), wohingegen das Transfektionsmedium alleine (TM), sense (se) oder scrambled (scr) PC5-ODNs keinen Effekt hatten ( $n = 4$ ). (B) PC5-asODNs und der  $\alpha\beta 5$  blockierende Antikörper P1F6 (25  $\mu\text{g/mL}$ ) hemmten die Migration von Gefäßmuskelzellen auf Vitronectin (10  $\mu\text{g/mL}$ ) (beide # $p < 0.05$  vs. Kontrollen). Nicht-spezifische IgGs (50  $\mu\text{g/mL}$ ), Transfektionsmedium (TM), sense (se) oder scrambled (scr) PC5-ODNs hatten keinen Effekt. co = Kontrollen.  $n = 4$ .

Eine Reihe von Daten lassen vermuten, dass die endoproteolytische Aktivierung von  $\alpha$ -Integrinen nicht nur der pro- $\alpha$ -Integrin Biosynthese dient, sondern auch die Integrin-abhängige Signalverarbeitung reguliert<sup>74,76,77</sup>. In Tumorzellen sind nicht-aktivierte pro- $\alpha$ -Integrin Untereinheiten, bei erhaltener RGD-Bindungskompetenz, auf der Zellmembran lokalisiert<sup>74,76,77</sup>.

Wir untersuchten deshalb die Konsequenzen der Inhibition der  $\alpha\upsilon$  Aktivierung für die  $\alpha\upsilon$ -abhängige Signaltransduktion in Gefäßmuskelzellen<sup>75</sup>. Eine zentrale Rolle in der Regulation Integrin-abhängiger Signaltransduktion spielt die Autophosphorylierung von FAK an Tyr<sup>397</sup>, was Zellmotilität fördert<sup>79</sup>. Autophosphoryliertes FAK bindet PI3-Kinase, induziert deren Aktivität<sup>80</sup> und verstärkt so migratorische Signale<sup>58</sup>. Im Gegensatz zur PI3-Kinase kann die Integrin-abhängige ERK1/2-Aktivierung unabhängig von FAK erfolgen<sup>81</sup>. Zur Untersuchung der Integrin-abhängigen Signaltransduktion wurden Gefäßmuskelzellen unter Serum-freien Bedingungen mit dec-CMK behandelt und dann auf Vitronectin ausgesetzt. Das Aussetzen von unbehandelten Gefäßmuskelzellen

fürte zur Adhäsions-abhängigen Phosphorylierung von FAK, Akt und ERK1/2 (Abbildung 16). Die Hemmung von Furin/PC5, und somit konsequenterweise auch Hemmung der  $\alpha_v$  Aktivierung, hemmte die Adhäsions-abhängige FAK-Autophosphorylierung, wie auch die nachfolgende Akt Aktivierung, hemmte jedoch nicht die Adhäsions-vermittelte ERK1/2 Phosphorylierung. In PDGF-stimulierten Kontrollen waren alle Signaltransduktionswege stimulierbar, was zeigt, dass sie prinzipiell intakt sind. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die PC5-abhängige Aktivierung von Integrin  $\alpha_v$  die Adhäsion und Migration von Gefäßmuskelzellen reguliert und zur differentiellen Regulation Integrin-abhängiger Signaltransduktionswege beitragen kann.

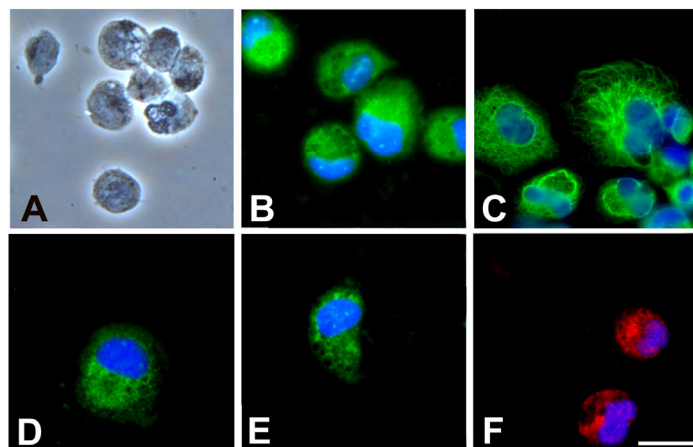


**Abbildung 16.** Um den Effekt der Furin/PC5-Inhibition und damit auch konsequenterweise Hemmung der  $\alpha_v$  Aktivierung auf die Integrin-abhängige Signaltransduktion zu untersuchen, wurden Gefäßmuskelzellen mit dec-CMK (CMK; 50  $\mu\text{mol/L}$ ; 24h) behandelt, dann gelöst und auf Vitronectin (10  $\mu\text{g/mL}$ ) für 45 Minuten ausgesetzt. Die Inhibition der  $\alpha_v$  Aktivierung hemmte die Adhäsions-bedingte FAK<sup>Y397</sup>-Autophosphorylierung (**A**) und nachfolgende Akt-Phosphorylierung (**B**) (beide # $p < 0.05$  vs. Kontrollen). Im Gegensatz hierzu wurde die ERK1/2-Phosphorylierung nicht beeinflusst (**C**). Die totalen Konzentrationen von FAK, Akt und ERK1/2 änderten sich nicht. Die PDGF-BB (5 ng/mL)-induzierte Phosphorylierung der Signalproteine war nicht gehemmt in dec-CMK behandelten Zellen.  $n = 3$ .

## 2.2.2 Aktivierung von $\alpha v$ Integrin in Makrophagen durch Furin/PC5

Mononukleäre Zellen (Monozyten/Makrophagen) sind sowohl an der Initiierung, Progression wie auch den Komplikationen der Atherosklerose beteiligt<sup>1</sup>. Die Expression von Adhäsionsmolekülen auf mononukleären Zellen ist essentiell für deren Antigenpräsentation, Zytotoxizität, Phagozytose und Chemotaxis<sup>3</sup>. Adhäsion und Diapedese der Gefäßwand werden durch die Expression von Adhäsionsmolekülen (z. B. VCAM-1 und  $\alpha$ -Integrine) auf mononukleären Zellen und Endothelzellen vermittelt<sup>3</sup> und werden gefördert durch Zytokine, wie z.B. MCP-1, dass von Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen synthetisiert wird<sup>82</sup>. Parallel zur Transmigration differenzieren Monozyten zu Makrophagen, was sie befähigt aktiv am Entzündungsprozess teilzunehmen<sup>4</sup>. In vitro reguliert  $\alpha v \beta 3$  die  $\alpha L \beta 2$ -abhängige Adhäsion und Migration mononukleärer Zellen und vermittelt so deren Diapedese<sup>83</sup>. In vivo führte die Inhibition der  $\alpha$ -Integrine  $\alpha v \beta 3$ <sup>84</sup> oder  $\alpha 4$ <sup>85</sup> zur Hemmung der Makrophagen-Infiltration nach Ballon-Verletzung von Arterien hypercholesterinämischer Hasen.

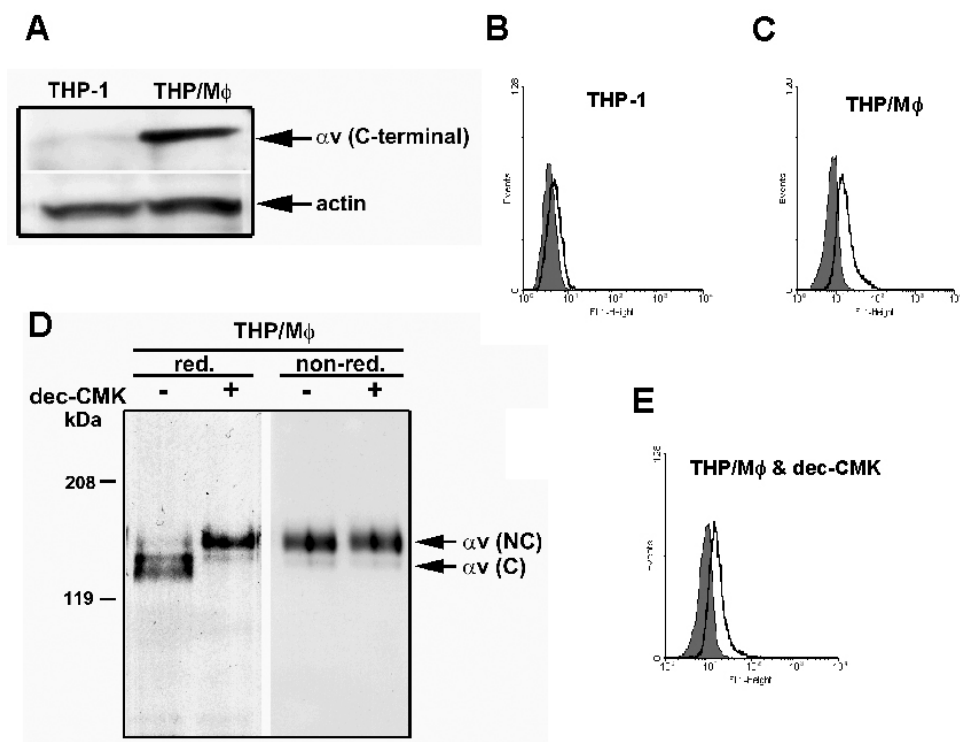
Um die Bedeutung von Furin/PC5 für die  $\alpha v$  Aktivierung in Monozyten/Makrophagen zu untersuchen, benutzten wir<sup>86</sup> die humane monozytäre Zelllinie THP-1, welche durch PMA-Stimulation zu Makrophagen differenzieren<sup>87</sup>. Verglichen mit anderen mononukleären Zelllinien verhalten sich THP-1/Makrophagen den aus humanen Monozyten gewonnenen Makrophagen am ähnlichsten<sup>87</sup>. Im Gegensatz zu monozytären THP-1 Zellen sind THP-1/Makrophagen adhärent, haben einen prominenten Golgi-Apparat, rauhes endoplasmatisches Retikulum, sowie freie Ribosomen und Mikrovilli<sup>87</sup>. Abbildung 17 zeigt die Expression und Lokalisation von Furin und PC5 in THP-1/Makrophagen.



**Abbildung 17.** (A) zeigt das typische Phasenkontrastbild von THP-1/Makrophagen. Diese Zellen exprimieren CD68 (B) und Vimentin (C), zwei Makrophagen-Markerproteine. Es finden sich ein prominentes TGN (D = TGN38 Färbung), wie auch Furin (E) und PC5 (F). Bar = 25  $\mu$ m.

Western Blot Analysen ergaben, dass die Transdifferenzierung von monozytären THP-1 Zellen zu THP-1/Makrophagen von einer Hochregulation von  $\alpha v$  Integrin begleitet ist (Abbildung 18). Auch in Makrophagen war die endoproteolytische Aktivierung von  $\alpha v$  Furin/PC5 abhängig, erkennbar an der Zunahme des 150 kDa pro- $\alpha v$  Integrins nach Hemmung von Furin/PC5 mit dec-CMK (Abbildung 18). Zur Untersuchung der Zellmembran-Expression des  $\alpha v \beta 3$  Heterodimers führten wir FACS Analysen durch. Die Transformation von Monozyten zu Makrophagen war von einer gesteigerten Lokalisation des Integrin  $\alpha v \beta 3$  auf der Zellmembran begleitet (Abbildung 18). Die

Inhibition der endoproteolytischen Aktivierung der  $\alpha_v$ -Untereinheit hatte keinen Effekt auf die Zellmembran-Lokalisation von  $\alpha_v\beta_3$ . Dies bedeutet, dass die endoproteolytische Aktivierung von  $\alpha_v$  nicht notwendig ist für seine Sortierung/Leitung zur Zellmembran und auch nicht Voraussetzung zur Heterodimerisierung der  $\alpha_v$ -Kette mit der  $\beta_3$ -Kette ist. Diese Daten unterstützen unsere bisherigen Arbeiten<sup>75</sup> und die anderer Arbeitsgruppen<sup>74,76,77</sup>, welche zeigen, dass nicht-aktivierte  $\alpha$ -Integrine Signalkompetenz besitzen können.



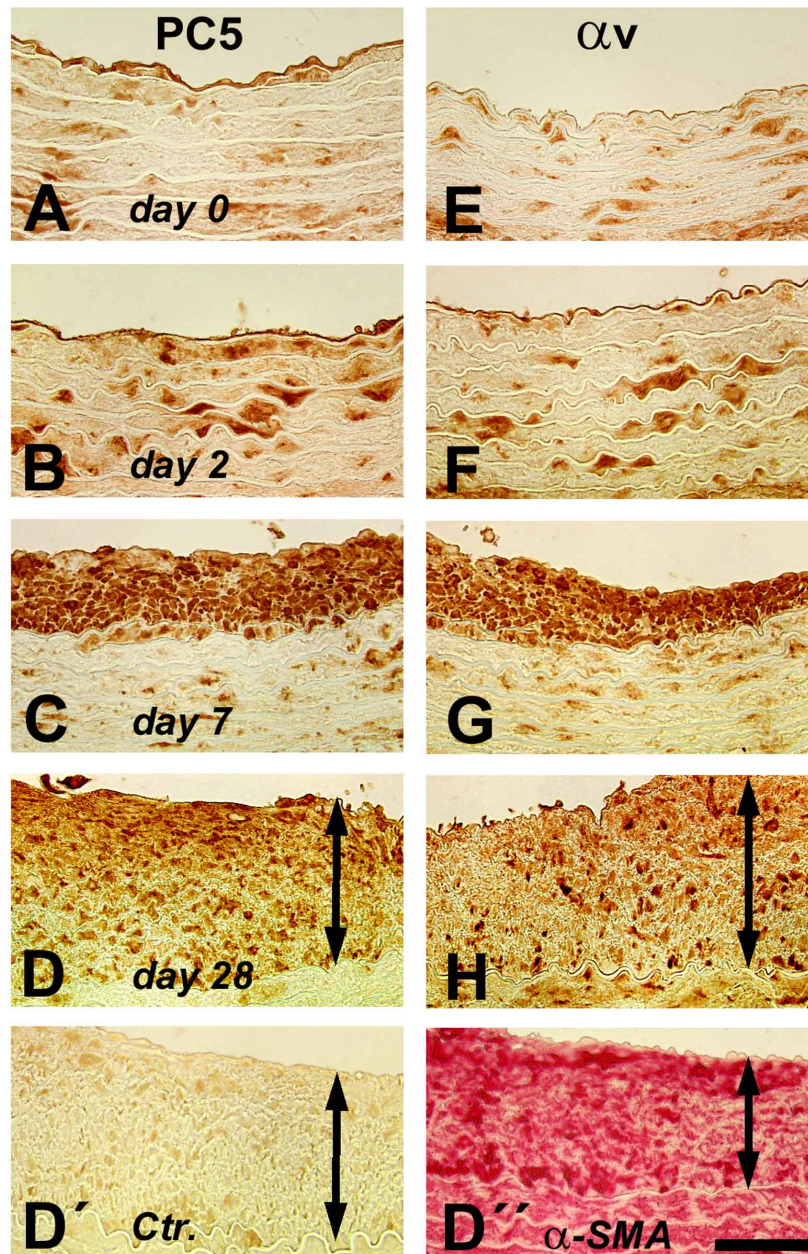
**Abbildung 18.** Die phänotypische Differenzierung von THP-1 Zellen zu THP-1/Makrophagen (THP/M $\phi$ ) war von einer gesteigerten  $\alpha_v$  Expression gekennzeichnet (A; Antikörper erkennt das C-terminale 25 kDa  $\alpha_v$ ). Dies ist begleitet von einer gesteigerten  $\alpha_v\beta_3$  Zellmembran-Lokalisation (B = THP-1; C = THP/M $\phi$ ). Der PC-Inhibitor dec-CMK (50  $\mu$ mol/L; 24 Stunden) inhibierte die endoproteolytische Aktivierung des 150 kDa (NC = non-cleaved)  $\alpha_v$  zu seiner 125 kDa (C = cleaved) Integrin Untereinheit (D; Antikörper gegen das NH<sub>2</sub>-terminale  $\alpha_v$  gerichtet). Dec-CMK hatte keinen Effekt auf die  $\alpha_v\beta_3$  Zellmembran-Expression in THP/M $\phi$  (E). n = 3.

### 2.2.3 Kolokalisation und Koregulation von Furin, PC5 und $\alpha_v$ Integrin in vivo nach Ballon-Verletzung im Tiermodell und Koexpression in humanen atherosklerotischen Läsionen

Die Koexpression und Koregulation von  $\alpha_v$  Integrin und seinen aktivierenden Convertasen Furin/PC5 in vivo ist eine wichtige Voraussetzung für die biologische Bedeutung der erhobenen in vitro Daten. Wir untersuchten deshalb die Expression und Regulation von Furin, PC5 und  $\alpha_v$  im Neointima-Tiermodell wie auch in humanen atherosklerotischen Läsionen<sup>59,75,86</sup>.

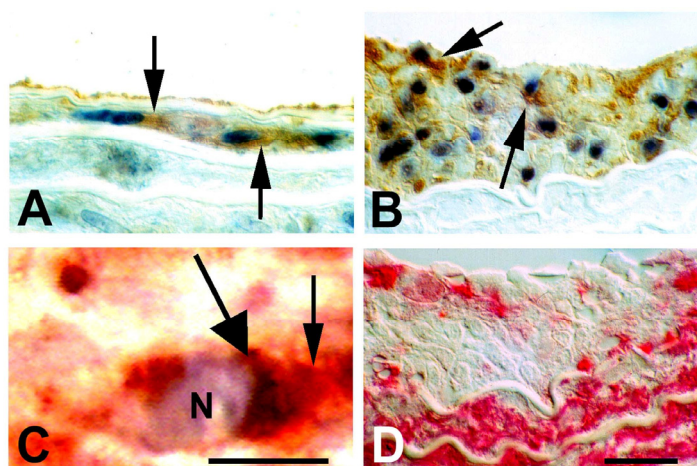
Zunächst verglichen wir die Regulation von PC5 und  $\alpha_v$  Integrin nach Ballon-Verletzung von Rattenaorten in vivo<sup>59</sup>. Immunohistochemie-Untersuchungen zeigten eine geringe PC5 und  $\alpha_v$  Proteinexpression in intakten Gefäßen (Abbildung 19). Bereits am Tag 2 nach Ballon-Verletzung fand sich die Hochregulation von PC5 und  $\alpha_v$  in der Media. Nach Ausbildung der Neointima am Tag 7 und auch darauf folgend,

fanden sich PC5 und  $\alpha v$  vor allem in Gefäßmuskelzellen der Neointima. Vergleichbar zu PC5 war auch  $\alpha v$  Integrin vor allem in proliferierenden, PCNA-positiven Gefäßmuskelzellen lokalisiert. Integrin  $\alpha v$  und PC5 kolokalisierten in Gefäßmuskelzellen (Abbildung 20).



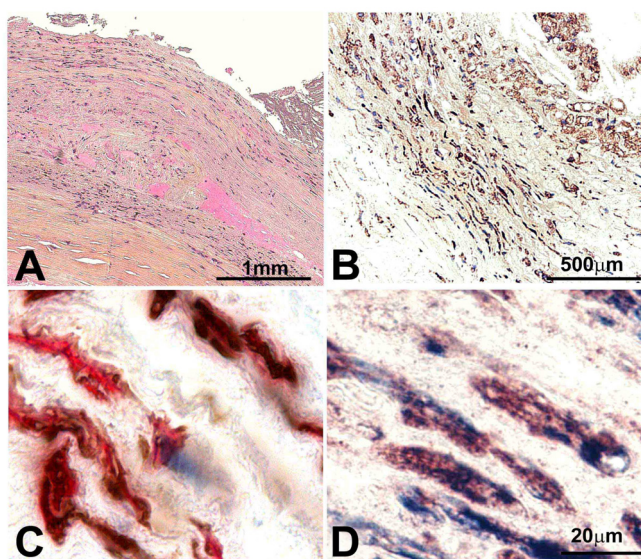
**Abbildung 19.** Vergleichende Analyse der PC5 und  $\alpha v$  Integrin Regulation während des vaskulären Remodeling. Wenig PC5 immuno-reaktive Zellen wurden in intakter (Tag 0) Rattenaorta (**A**) gefunden, wohingegen eine deutliche Steigerung an Tag 2 (**B**) in der Media und später (Tag 7 = **C** und Tag 28 = **D**) in der Neointima gefunden wurde. Vergleichbar war die Regulation von  $\alpha v$  Integrin in der intakten Rattenaorta (**E**) und in den Gefäßen an Tag 2 (**F**), Tag 7 (**G**) und Tag 28 (**H**) nach Ballon-Verletzung. Pfeile zeigen die Neointima. Kontrollfärbungen (Ctr.) nach Pre-Absorption des PC5 Antikörpers mit synthetischem PC5 Peptid ( $10^{-6}$  M) sind in (**D'**) abgebildet. Immunofärbungen für  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) auf konsekutiven Schnitten sind gezeigt (**D''**). Bar (in **D''**) = 50  $\mu$ m.





**Abbildung 20.** Nach Ballon-Verletzung fand sich  $\alpha v$  Integrin (braune Färbung, Pfeile) in PCNA-positiven (blaue Nuclei) Gefäßmuskelzellen zunächst in der Media (**A**; Tag 2) und dann in der Neointima (**B**; Tag 7) induziert. Doppel-Immunohistochemische Färbungen demonstrierten die Kolokalisation von  $\alpha v$  (rot, schmaler Pfeil) und PC5 (violett/schwarz, größerer Pfeil) in den Gefäßmuskelzellen der Neointima (**C**; Tag 14). **D** =  $\alpha$ -smooth muscle. Zellkerne sind mit Hämatoxylin gefärbt. Bar (in C) = 10  $\mu\text{m}$  und in D (für A, B und D) = 20  $\mu\text{m}$ .

Die Lokalisation von Furin/PC5 und  $\alpha v$  Integrin wurde auch an menschlichen atherosklerotischen Läsionen untersucht<sup>75,86</sup>. Hierzu wählten wir zwei unterschiedliche Wege: Zum einen wurden A. carotis Endarterektomien untersucht, zum anderen unterschiedliche Plaquestadien von A. femoralis Präparaten. Die A. carotis Läsionen stammten von Patienten, die aufgrund einer symptomatischen Stenose operiert wurden und zeigten alle ein fortgeschrittenes Plaquestadium (Stary IV/V). In diesen Plaques fand sich PC5 vor allem in der Media unterhalb von fibrösen und Fett-reichen Läsionen, wie auch in den Ecken des Lipidkerns<sup>75</sup>. Immunohistochemische Kolokalisationsstudien identifizierten PC5 und  $\alpha v$  in Gefäßmuskelzellen (Abbildung 21). PC5 und  $\alpha v$  fanden sich auch in Makrophagen.

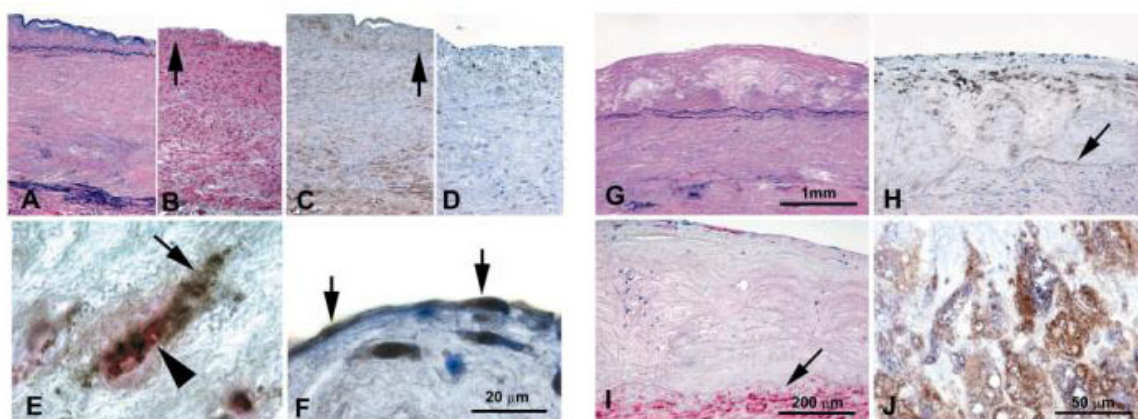


**Abbildung 21.** A. carotis Läsionen (**A** = Hämatoxylin Phloxine Saffron Färbung) zeigten PC5 (braun) in der Media unterhalb fibröser und Fett-reicher Läsionen und in den Ecken des Lipidkerns (**B**). PC5 (braun) kolokalisierte mit  $\alpha$ -smooth muscle (rot) (**C**). In diesen Gefäßmuskelzellen kolokalisierte PC5 (blau) mit  $\alpha v$  (braun/rot) (**D**).



Weitere Untersuchungen wurden an verschiedenen Plaquestadien von humanen A. femoralis Präparaten durchgeführt<sup>86</sup>. In intakten Gefäßen (Stary Typ I atherosklerotische Läsion; charakterisiert durch die Akkumulation von Gefäßmuskelzellen in der Intima, ohne Lipid oder Makrophagen Akkumulation) kolokalisierten PC5 und Furin überwiegend mit  $\alpha$ -smooth muscle, dem Markerprotein für Gefäßmuskelzellen (Abbildung 22). Beide PCs fanden sich auch in Endothelzellen von atherosklerotischen und nicht-atherosklerotischen Läsionen.

Mit der Zunahme des Plaquestadiums (Präatheroma/Atheroma, Stary Typ III/IV Läsion) fand sich auch eine verstärkte Expression von Furin und PC5 in Makrophagen/Schaumzellen (Abbildung 22).

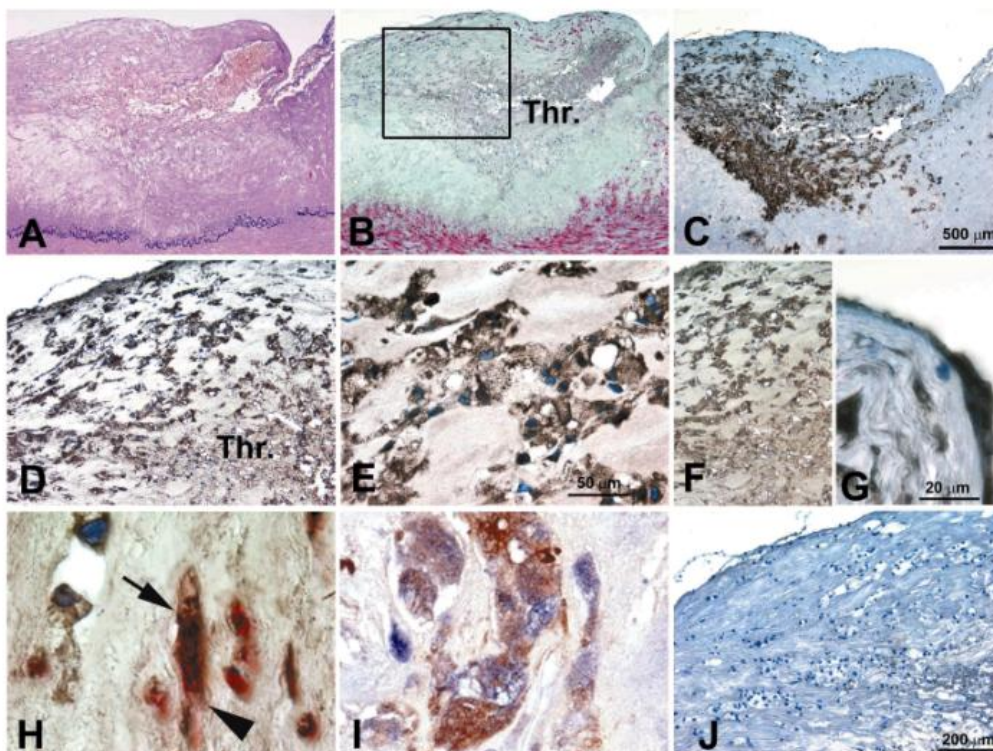


**Abbildung 22.** PC5 in intakten humanen Arterien (serielle Schnitte; Typ I Läsion): **A** = van Gieson; **B** =  $\alpha$ -smooth muscle ( $\alpha$ -SMA); **C** = PC5 und **D** = Kontrolle. **E** = PC5 kolokalisierte mit  $\alpha$ -SMA (kleiner Pfeil = PC5, braun; großer Pfeil =  $\alpha$ -SMA, rot). PC5 Immunoreaktivität fand sich auch in Endothelzellen (**F**). PC5 Expression in einer Stary Typ III Läsion (serielle Schnitte): **G** = van Gieson; **H** = CD68, **I** =  $\alpha$ -SMA und **J** = Kolokalisation von PC5 (braun) mit CD68 (blau). Pfeile in B, C, H und I = Lamina elastica interna.

Die fortgeschrittene atherosklerotische Läsion (Fibroatheroma; Stary Typ V Läsion) ist gekennzeichnet durch einen Lipidkern unter einer Gefäßmuskelzell-reichen fibrösen Kappe. Immunohistochemie-Untersuchungen serieller Schnitte demonstrierten, dass Makrophagen in der Plaqueschulter PC5, Furin und  $\alpha v$  positiv sind<sup>86</sup>.

Die Vulnerabilität der atherosklerotischen Läsion wird durch die kritische Masse aus Lipidkern, Dicke der fibrösen Kappe und der Infiltration mit Makrophagen bestimmt<sup>88</sup>. Die Untersuchungen von komplizierten Plaques (Stary Typ VI Läsion) zeigten einen großen nekrotischen Kern, bedeckt von einer dünnen fibrösen Kappe mit wenigen Gefäßmuskelzellen, aber einer großen Anzahl an CD68-positiven Makrophagen am Ruptursitz / im Thrombus (Abbildung 23). Wir fanden, dass diese Makrophagen sowohl PC5 und Furin, als auch  $\alpha v$  positiv sind.

Die hier dargestellten Ergebnisse unterstützen somit die Hypothese, dass Furin/PC5 von funktioneller Bedeutung für die Aktivierung von  $\alpha v$  Integrin in Gefäßmuskelzellen und Makrophagen in der Atherosklerose sind.



**Abbildung 23.** Immunohistochemische Analyse von Furin und PC5 in einer komplizierten Stary Typ VI Läsion (serielle Schnitte): **A** = van Gieson, ein großer Lipidkern ist von einer dünnen fibrösen Kappe bedeckt, welche rupturiert ist. Es findet sich ein frischer Thrombus (Thr.). **B** =  $\alpha$ -smooth muscle ( $\alpha$ -SMA), **C** = CD68. **D** und **E** = PC5, **F** = Furin. (**G**) Furin fand sich auch in Endothelzellen. **H** = Furin (braun, kleiner Pfeil) kolokalisierte mit  $\alpha$ -SMA (rot; großer Pfeil). **I** =  $\alpha v$  (braun) kolokalisierte auch mit CD68 (blau). **J** = Kontrolle.

## 2.3 Regulation von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) durch Furin/PC5 in glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen

### 2.3.1 Furin/PC5 regulieren die MT1-MMP – pro-MMP-2 proteolytische Kaskade zwischen Makrophagen und Gefäßmuskelzellen

Matrix Metalloproteinasen (MMPs; Matrixine) sind eine Familie von > 20 verschiedenen beim Menschen identifizierten Enzymen, welche als Gruppe theoretisch in der Lage sind alle Moleküle der ECM abzubauen<sup>89,90</sup>. Biochemisch zeigen MMPs eine überlappende Substratspezifität zur perizellulären (z.B. Laminin, Vitronectin) und extrazellulären (z.B. Kollagen I, III) Matrix<sup>89</sup>. Neben ihrer ECM-abbauenden Wirkung können MMPs Zellfunktionen auch durch die Spaltung von „Nicht-Matrix-Substraten“, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Adhäsionsmolekülen, regulieren<sup>76,91-93</sup>.

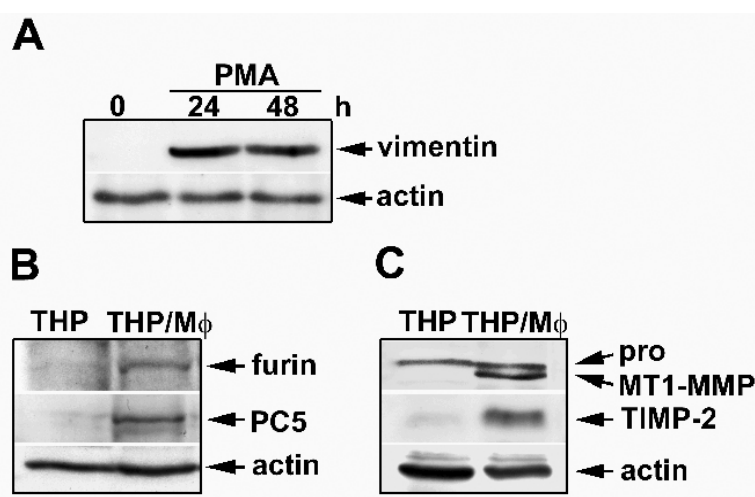
Unter physiologischen Bedingungen ist die Aktivität von MMPs präzise reguliert. MMP-Regulation erfolgt auf den Ebenen der Transkription, Zymogen Aktivierung oder durch die physiologischen MMP-Inhibitoren TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases), von denen vier Isoenzyme (TIMP-1, -2, -3, -4) identifiziert sind<sup>89,90</sup>.

Vereinfacht kann man MMPs entsprechend der Art ihrer Aktivierung in lösliche und Membran-gebundene MMPs einteilen. Lösliche MMPs wie MMP-2 oder MMP-9 werden als Zymogene von den Zellen abgegeben und müssen extrazellulär posttranslatorisch gespalten werden, um biologisch aktiv zu sein<sup>89</sup>.

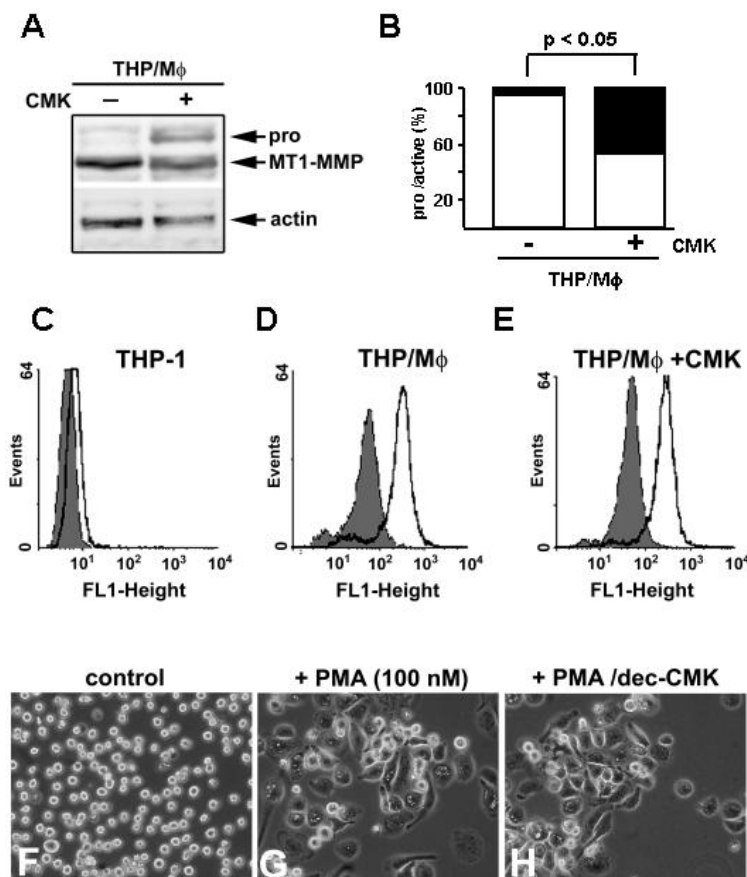
Im Gegensatz zu den löslichen MMPs werden Membran-gebundene MT-MMPs bereits intrazellulär aktiviert und als aktive Enzyme auf der Zellmembran gebunden<sup>35,89</sup>. Durch Rekonstitution von Furin mit MT1-MMP Mutanten in Furin/MT1-MMP-defizienten Zelllinien konnten Yana und Weiss<sup>35</sup> zeigen, dass Furin, bzw. Furin-ähnliche PCs die Aktivität von MT1-MMP durch endoproteolytische Abspaltung seines Propeptides an RRKR<sup>111</sup> kontrollieren können. Andere Proteasen, wie Plasmin, Trypsin oder Urokinase, waren inaktiv<sup>35</sup>. Jedoch war die MT1-MMP Aktivierung in Furin-defizienten Zelllinien nicht komplett supprimiert, was auf die Redundanz anderer PCs für Furin-ähnliche Spaltungssequenzen schließen lässt<sup>35</sup>. In der Tat sind Furin-defiziente LoVo-Zellen PC5<sup>94</sup> und PC7 kompetent<sup>25</sup>. Jedoch bevorzugt PC7 ein R oder K an P6 (= Aminosäure an Position 6 vom Spaltungsort zum N-terminalen Ende gezählt) für seine optimale Aktivität<sup>95</sup>, was sich in der MT1-MMP Proprotein Sequenz nicht findet<sup>35</sup>. Im Gegensatz dazu kann PC5 Vorläuferproteine an RXKR-, RXXR-, und KXXR-Aminosäuresequenzen aktivieren<sup>11-13</sup>, so dass Furin und PC5 die wahrscheinlichsten MT-MMP Convertasen darstellen. Aufgrund ihrer Substratspezifität, zellulären und subzellulären Verteilung werden diese PCs auch als „furin-like PCs“ bezeichnet.

MMPs sind wichtige Regulatoren der Plaquestabilität<sup>90</sup>. Ruptur-gefährdete Läsionen sind durch die Akkumulation von Makrophagen und eine gesteigerte MMP-Aktivität gekennzeichnet<sup>96</sup>. MT-MMPs finden sich in humanen atherosklerotischen Läsionen vor allem in Gefäßmuskelzellen der Media und den Makrophagen innerhalb des Plaques<sup>97,98</sup>.

Wir benutzten Makrophagen von PMA-stimulierten humanen monozytären THP-1 Zellen, um die Funktion von Furin/PC5 für die MT1-MMP Aktivierung in Makrophagen zu untersuchen<sup>99</sup>. Unsere Arbeiten zeigen, dass Makrophagen, welche reaktiver als Monozyten sind<sup>4</sup>, eine gesteigerte Expression von Furin, PC5 und MT1-MMP aufweisen (Abbildung 24). Mit Hilfe des furin-like PC-Inhibitors dec-CMK<sup>33</sup> zeigten wir, dass die Aktivität von Furin/PC5 die Aktivierung von MT1-MMP in Makrophagen kontrolliert (Abbildung 25). Die Inhibition der MT1-MMP Aktivierung hatte aber keinen Effekt auf dessen Zellmembran-Expression (Abbildung 25).



**Abbildung 24.** (A) Repräsentative Western Blots zeigen die Expression von Vimentin, einem Makrophagen Markerprotein in THP-1/Makrophagen (THP/M $\phi$ ). (B) Nach Makrophagen Differenzierung von Monozyten fand sich eine signifikante Steigerung von Furin (87 kDa) und PC5 (117 kDa). (C) In Monozyten fand sich MT1-MMP überwiegend in seiner Pro-Form (68 kDa), wohingegen in Makrophagen aktives MT1-MMP (63 kDa) detektiert wurde. TIMP-2 (21 kDa) war auch in Makrophagen induziert.

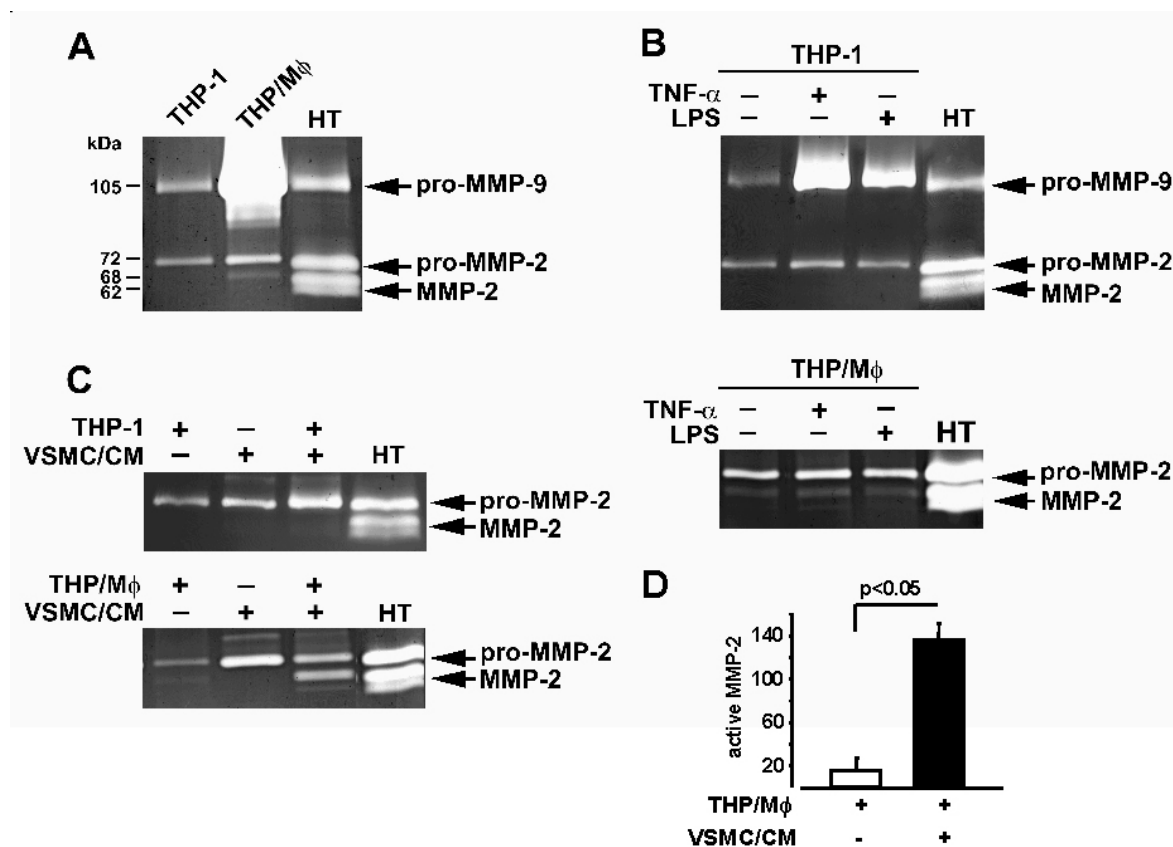


**Abbildung 25.** (A) Dec-CMK (50  $\mu\text{mol/L}$ ; 24h) inhibierte signifikant die MT1-MMP (pro = 68 kDa; aktiv = 63 kDa) Aktivierung in THP/Makrophagen (THP/M $\phi$ ). Die Densitometrie von A ist in B (prozentualer Anteil von pro- [schwarz] und aktivem MT1-MMP [weiß], equilibriert zu Actin; n = 3) dargestellt. Dec-CMK hatte keinen Effekt auf die Zellmembran-Lokalisation von MT1-MMP (C = monozytäre THP-1 Zellen; D = THP/M $\phi$ ; E = THP/M $\phi$  mit dec-CMK behandelt; geschlossene Histogramme = Kontrollantikörper; offene Histogramme = spezifischer Antikörper). Phasenkontrast-Analysen zeigen, dass dec-CMK (50  $\mu\text{mol/L}$ ) nicht die PMA-induzierte THP-1 Differenzierung zu THP/M $\phi$  hemmt (F = monozytäre THP-1 Zellen; G = THP/M $\phi$ ; H = THP/M $\phi$  mit dec-CMK behandelt).

Vergleichbar den Makrophagen aus humanen mononukleären Zellen, synthetisieren Makrophagen aus monozytären Zelllinien überwiegend pro-MMP-9 und wenig pro-MMP-2<sup>100-104</sup>. Im Gegensatz zu pro-MMP-9, welches von Plasmin und anderen Serin-Proteasen aktiviert wird<sup>89</sup>, setzt die Aktivierung von pro-MMP-2 die Bildung eines spezifischen MT1-MMP/pro-MMP-2/TIMP-2 Trimers an der Zellmembran voraus<sup>105-107</sup>. Bis auf MT4-MMP<sup>91</sup> können alle MT-MMPs pro-MMP-2 aktivieren<sup>89</sup>. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die inflammatorischen Mediatoren TNF- $\alpha$  oder Lipopolysaccharide (LPS) die pro-MMP-9 Synthese in THP-1 Monozyten stimulieren und das THP-1/Makrophagen vor allem pro-MMP-9 synthetisieren (Abbildung 26). In Monozyten fand sich MMP-2 nur in seiner latenten Form, in den MT1-MMP kompetenten Makrophagen war pro-MMP-2 Aktivierung detektierbar. Diese war jedoch nicht durch Stimulation mit inflammatorischen Mediatoren (TNF- $\alpha$  oder LPS), welche MT-MMPs in Makrophagen induzieren<sup>97,98</sup>, zu steigern<sup>99</sup>.

Deshalb untersuchten wir die Hypothese, dass die Aktivierung von pro-MMP-2, potentiell aus anderen Zellen wie z.B. Gefäßmuskelzellen stammend<sup>96</sup>, eine Aufgabe des Makrophagen MT1-MMP ist<sup>99</sup>. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Kultivierung von THP-1 Makrophagen in Medium von Serum-defizienten Gefäßmuskelzellen in einer

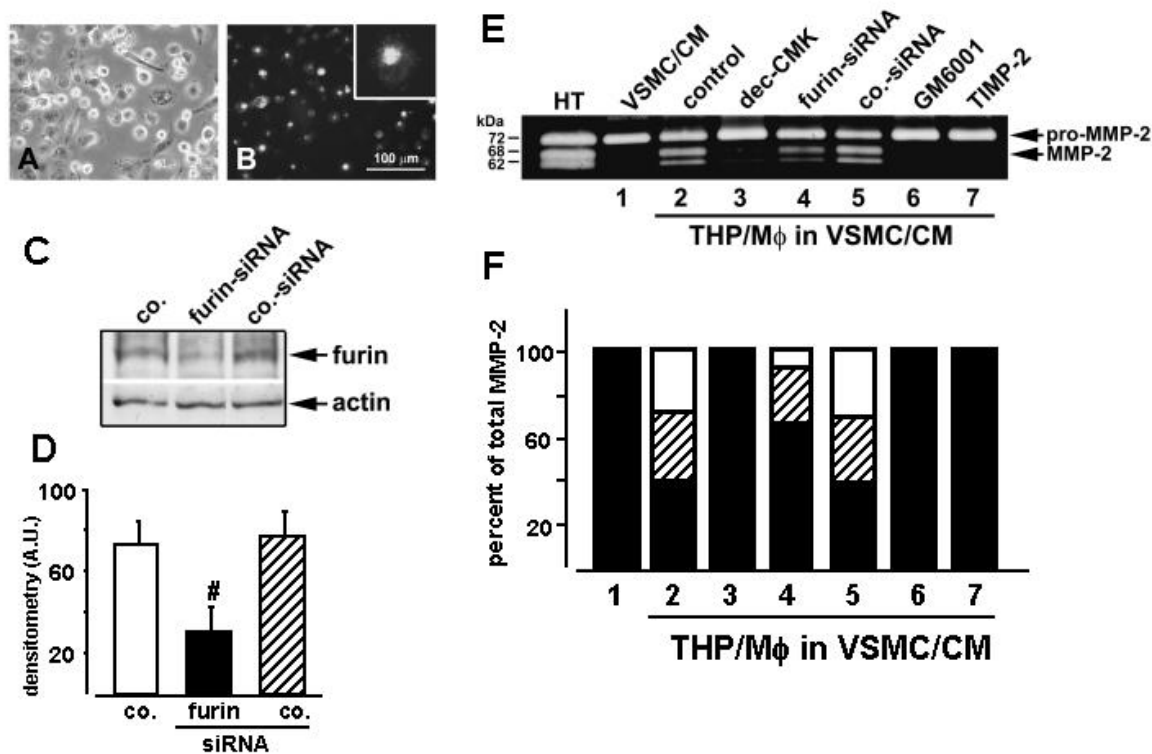
starken Induktion von pro-MMP-2 resultiert (Abbildung 26). Im Gegensatz hierzu hatte die Kultivierung von THP-1 Monozyten in Gefäßmuskelzellmedium keinen Effekt auf die pro-MMP-2 Aktivierung, was zeigt, dass Makrophagen MT1-MMP zur Aktivierung von Gefäßmuskelzellen pro-MMP-2 notwendig ist.



**Abbildung 26.** (A) In Monozyten findet sich pro-MMP-2 (72 kDa) und pro-MMP-9 (97 kDa). In Makrophagen findet sich viel pro-MMP-9 und pro-MMP-2 ist schwach zu seiner intermediären Form (68 kDa) aktiviert. (B) Monozyten und Makrophagen wurden mit TNF- $\alpha$  (10 ng/mL, 24h) oder LPS (1  $\mu$ g/mL, 24h) stimuliert. Beides steigerte die pro-MMP-9 Synthese in Monozyten, hatte aber keinen Effekt auf die pro-MMP-2 Konzentrationen/Aktivierung in diesen Zellen. In Makrophagen (untere Hälfte von B) konnte die pro-MMP-2 Aktivierung nicht weiter durch TNF- $\alpha$  oder LPS gesteigert werden. (C) Monozyten oder Makrophagen wurden in Medium von Serum-defizienten Gefäßmuskelzellen kultiviert (24 Stunden). Keine Veränderung der pro-MMP-2 Aktivierung wurde in Monozyten gefunden. In Makrophagen fand sich eine starke Aktivierung des pro-MMP-2 (72 kDa) zu seiner intermediären (68 kDa) und voll aktiven Form (62 kDa). (D) Densitometrie von aktivem (68/62 kDa) MMP-2 in Makrophagen und in Makrophagen, die in Gefäßmuskelzellmedium kultiviert wurden (n = 3).

Unsere Daten zeigen, dass die Kaskade der MT1-MMP  $\rightarrow$  pro-MMP-2 Aktivierung, die in der Amplifikation proteolytischer Aktivität resultiert und die Kooperation von Makrophagen und Gefäßmuskelzellen voraussetzt, durch Furin/PC5 kontrolliert wird<sup>99</sup>. Sowohl dec-CMK, als auch Transfektion von Makrophagen mit Furin-spezifischer siRNA inhibierten die MT1-MMP-abhängige Aktivierung von Gefäßmuskelzellen pro-MMP-2. (Abbildung 27).





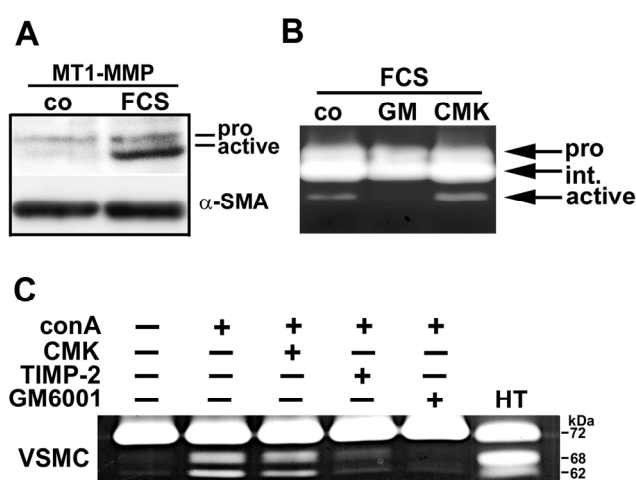
**Abbildung 27.** Die nukleäre Transfektion von THP/Makrophagen (THP/M $\phi$ ) wurde durch eine FITC-siRNA gezeigt (A = Phasenkontrast; B = Immunfluoreszenz). Die Furin-spezifische siRNA (100 nmol/L) hemmte die Furin Proteinexpression (87 kDa) in THP/M $\phi$  (C; Densitometrie in D, # $p < 0.05$  vs. Kontrollen,  $n = 3$ ). (E) Zymographien zeigten, dass die Aktivierung von pro-MMP-2 aus Gefäßmuskelzellen, einem Indikator der MT1-MMP Aktivität, durch dec-CMK (50  $\mu$ mol/L, 24h), den MMP-Inhibitor GM6001 (50  $\mu$ mol/L, 24h) oder rekombinantes TIMP-2 (200 ng/mL, 24h; alle  $p < 0.05$  vs. Kontrollen) gehemmt wurde. Ebenso hemmte die Furin siRNA die pro-MMP-2 Aktivierung ( $p < 0.05$  vs. Kontrollen), wohingegen die Kontroll-siRNA keinen Effekt hatte (beide 100 nmol/L). (F) Die Densitometrie der Inhibitionsexperimente (E) zeigt die Veränderungen der prozentualen Verteilung von pro- [72 kDa; schwarz], intermediär [68 kDa; schraffiert] und 62 kDa MMP-2 [weiß]. (1) Überstände von Serum-defizienten Gefäßmuskelzellen, (2) THP/M $\phi$  in Gefäßmuskelzellmedium kultiviert (VSMC/CM), (3) dec-CMK behandelte THP/M $\phi$ , (4 und 5) THP/M $\phi$  behandelt mit Furin-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA (6) THP/M $\phi$  behandelt mit GM6001 und (7) THP/M $\phi$  behandelt mit TIMP-2.  $n = 3$ .

Im Rahmen unserer Studien zeigten wir weiterhin, dass Furin, PC5 und MT1-MMP sich im Blut gesunder Spender auf mononukleären Zellen finden und dass sie in Makrophagen humaner atherosklerotischer Läsionen kolokalisieren<sup>99</sup>.

### 2.3.2 Die endoproteolytische Aktivierung des insulin-like growth factor 1-receptors (IGF-1R) durch Furin/PC5 reguliert die insulin-like growth factor-1 (IGF-1) abhängige Induktion von MT1-MMP/MMP-2 in Gefäßmuskelzellen

In weiteren Experimenten untersuchten wir die Regulation von MT1-MMP durch Furin/PC5 in Gefäßmuskelzellen<sup>108</sup>. Proliferierende, FCS-stimulierte Gefäßmuskelzellen besitzen aktives MT1-MMP (63 kDa), welches sich in Serum-defizienten Gefäßmuskelzellen fast ausschließlich als inaktives pro-MT1-MMP (68 kDa) findet (Abbildung 28). Die Expression von aktivem MT1-MMP korrelierte hierbei mit der pro-MMP-2 Aktivierung in den Zellkulturüberständen. In Gefäßmuskelzellen konnten wir

die pro-MMP-2 Aktivierung durch den MMP-Inhibitor GM6001 hemmen, jedoch hatte die Inhibition von Furin/PC5 mit dec-CMK keinen Effekt <sup>75</sup>. In weiteren Versuchen stimulierten wir die Gefäßmuskelzellen mit dem Lectin Concanavalin A (ConA), welches die mRNA und Proteinkonzentrationen von MMPs induziert <sup>109</sup>. Wir fanden, dass GM6001 oder ein Überschuss an exogenem, rekombinatem TIMP-2 die ConA-induzierte pro-MMP-2 Aktivierung in Gefäßmuskelzellen hemmen, jedoch der furin-like PC-Inhibitor dec-CMK <sup>33</sup> keinen Effekt hat (Abbildung 28). Zusammenfassend lassen diese Experimente vermuten, dass die MT1-MMP → pro-MMP-2 Kaskade in Gefäßmuskelzellen PC-unabhängig ist. In der Tat wurde eine Zelltyp-spezifische Notwendigkeit von Furin-Convertasen für die MT1-MMP Aktivierung <sup>110</sup>, wie auch die Möglichkeit der autokatalytischen Aktivierung von MT1-MMP beschrieben <sup>111</sup>. Auch andere Arbeitsgruppen fanden keinen Effekt von dec-CMK auf die pro-MMP-2 Aktivierung in Gefäßmuskelzellen <sup>112,113</sup>.

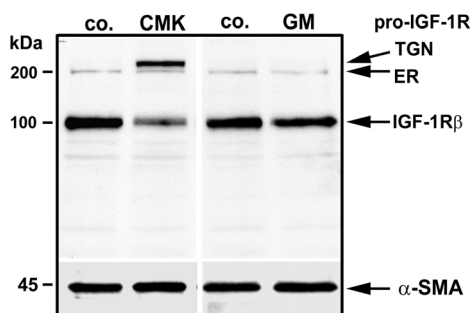


**Abbildung 28.** (A) MT1-MMP ist in proliferierenden Gefäßmuskelzellen induziert. Der in diesem Experiment verwendete polyklonale Antikörper erkennt die pro- und aktive MT1-MMP Form. (B) Der MMP-Inhibitor GM6001 (GM; 50  $\mu\text{mol/L}$ ; 24 Stunden) hemmte die pro-MMP-2 Aktivierung. Dec-CMK (CMK; 50  $\mu\text{mol/L}$ ; 24h) hatte keinen Effekt auf die pro-MMP-2 Aktivierung in Gefäßmuskelzellen. co = Kontrollen. (C) Dec-CMK hemmte nicht die ConA (10  $\mu\text{g/mL}$ ; 24 Stunden) induzierte pro-MMP-2 Aktivierung in Gefäßmuskelzellen. Die ConA-induzierte pro-MMP-2 Aktivierung wurde durch TIMP-2 (200 ng/mL; 24h) und den MMP-Inhibitor GM6001 (50  $\mu\text{mol/L}$ ; 24h) gehemmt. n = 3.

MMP Aktivität unterliegt auch der Regulation durch Wachstumsfaktoren <sup>89,90</sup>. Deshalb untersuchten wir die Hypothese, dass Furin/PC5 MMP-Aktivität durch die Aktivierung von Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptoren in Gefäßmuskelzellen regulieren <sup>108</sup>. In Tumorzellen ist IGF-1 ein potenter Induktor von MT1-MMP/MMP-2 und steigert hierdurch die Invasion <sup>114</sup>. Hierbei erfolgt die IGF-1-abhängige MMP-Regulation über die Induktion des PI3-Kinase/Akt/mTOR Signaltransduktionsweges <sup>114</sup>. In Gefäßmuskelzellen war der Effekt von IGF-1 auf die MMP-Aktivität bisher unbekannt. IGF-1 wird von Gefäßmuskelzellen synthetisiert <sup>115</sup> und steigert durch Stimulation von PI3-Kinase die Migration <sup>116</sup>. Die Wirkung von IGF-1 wird durch Bindung an seinen spezifischen Rezeptor (IGF-1R) vermittelt. Dieser Rezeptor ist ein Heterotetramer aus Disulphid-gebundenen  $\alpha 2/\beta 2$  Ketten, in welchem die  $\beta$ -Kette intrinsische Tyrosin-Kinase Aktivität besitzt <sup>117</sup>. Aus dem pro-IGF-1R entsteht durch endoproteolytische Spaltung an  $\text{RKRR}^{740}\downarrow$  eine  $\alpha$ -Kette und die Membran-gebundene  $\beta$ -Kette <sup>117,118</sup>. In Furin-defizienten Zellen ist der IGF-1R ausschließlich in seiner inaktiven Pro-Form vorhanden <sup>118</sup>. Khatib et al. <sup>119</sup> zeigten in Tumorzellen, dass Furin und PC5 die wichtigsten IGF-1R Convertasen sind, und fanden PACE4 und PC7 ineffektiv.

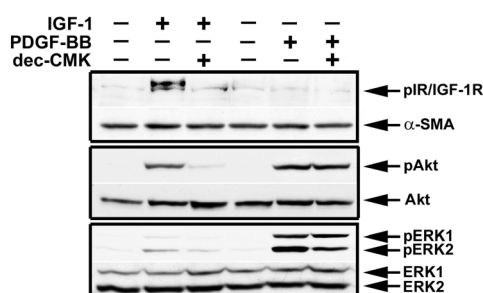


Unsere Versuche mit Gefäßmuskelzellen zeigen, dass Furin/PC5 den IGF-1R in Gefäßmuskelzellen aktivieren, erkennbar an der deutlichen Zunahme des pro-IGF-1R nach Inkubation von Gefäßmuskelzellen mit dem PC-Inhibitor dec-CMK (Abbildung 29)<sup>108</sup>. Interessanterweise nimmt nach Hemmung von Furin/PC5 ausschließlich die pro-IGF-1R TGN-Form<sup>37</sup>, nicht jedoch die endoplasmatische Retikulum (ER) Form zu. Der MMP-Inhibitor GM6001 hatte keinen Effekt auf die IGF-1R Aktivierung.



**Abbildung 29.** In unbehandelten Kontrollen detektierte der Anti-IGF-1R Antikörper (gerichtet gegen das C-terminale Ende) nur die aktivierte IGF-1R $\beta$  Untereinheit (100 kDa), wohingegen die Inhibition von Furin/PC5 mit dec-CMK (CMK; 50  $\mu$ mol/L) die IGF-1R Aktivierung im TGN hemmte, erkennbar an der Steigerung des 210 kDa pro-IGF-1R, ohne die ER Form (200 kDa) zu beeinflussen. Der MMP-Inhibitor GM6001 (GM; 50  $\mu$ mol/L) hatte keine Wirkung auf die IGF-1R Aktivierung in Gefäßmuskelzellen. n = 3.

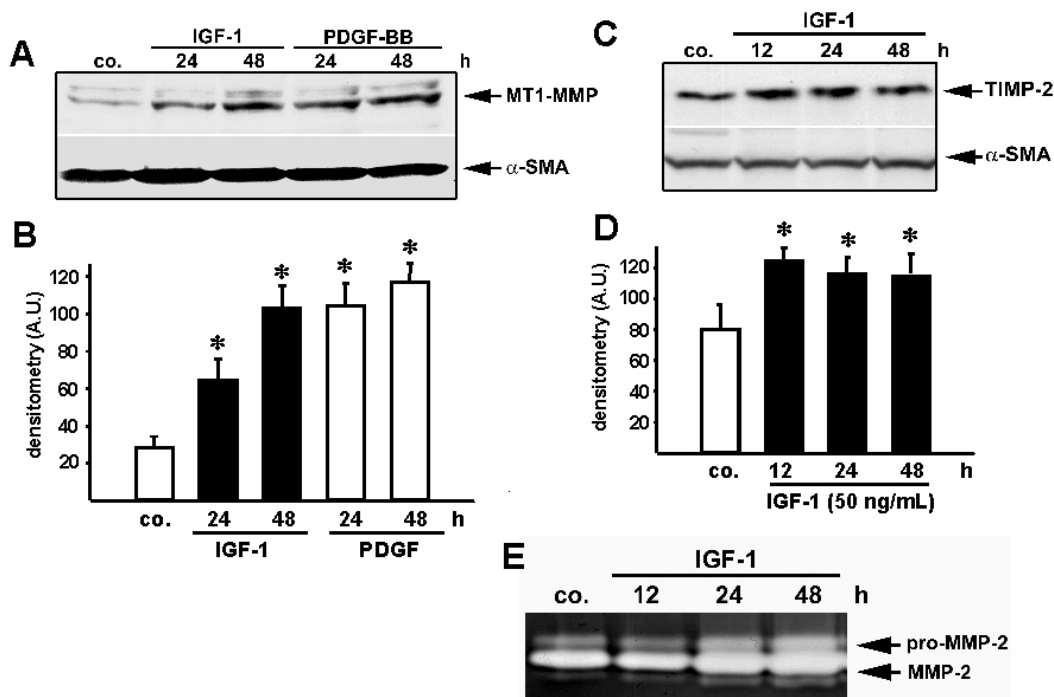
Mit Hilfe von Phospho-spezifischen Antikörpern untersuchten wir die Konsequenzen der Hemmung der IGF-1R Aktivierung für die IGF-1R-abhängige Signaltransduktion<sup>108</sup>. Die Bindung von IGF-1 an seinen spezifischen Rezeptor führt zur IGF-1R Autophosphorylierung und nachfolgenden Shc und insulin-receptor substrate (IRS)-1 Aktivierung<sup>117</sup>. Diese induzieren dann weiter distal gelegene Signaltransduktionswege, von denen die wichtigsten PI3-Kinase und ERK1/2-Kinase sind<sup>117</sup>. Unsere Daten zeigen, dass die Inhibition der IGF-1R Aktivierung die IGF-1-induzierte IGF-1R Autophosphorylierung und nachfolgende Akt und ERK1/2 Aktivierung in Gefäßmuskelzellen hemmt (Abbildung 30). Somit ist die Aktivierung des pro-IGF-1R durch Furin/PC5 notwendig für die IGF-1  $\rightarrow$  IGF-1R vermittelte Signaltransduktion. Verglichen wurden diese Ergebnisse mit der Wirkung der Inhibition von Furin/PC5 auf die PDGF-stimulierte Signaltransduktion. Der PDGF-R muss nicht endoproteolytisch aktiviert werden, so dass sich hier nach Furin/PC5-Inhibition mit dec-CMK kein Effekt zeigte. Dec-CMK hemmte auch die IGF-1-vermittelte DNA-Synthese von Gefäßmuskelzellen, hatte jedoch keinen Effekt auf das PDGF-abhängige Zellwachstum<sup>108</sup>.



**Abbildung 30.** IGF-1 (50 ng/mL, 10 min.) induzierte die (insulin receptor) IR/IGF-1R Phosphorylierung (IR und IGF-1R haben eine hohe Homologie; beide Rezeptoren werden in ihrer phosphorylierten Form von diesem Antikörper

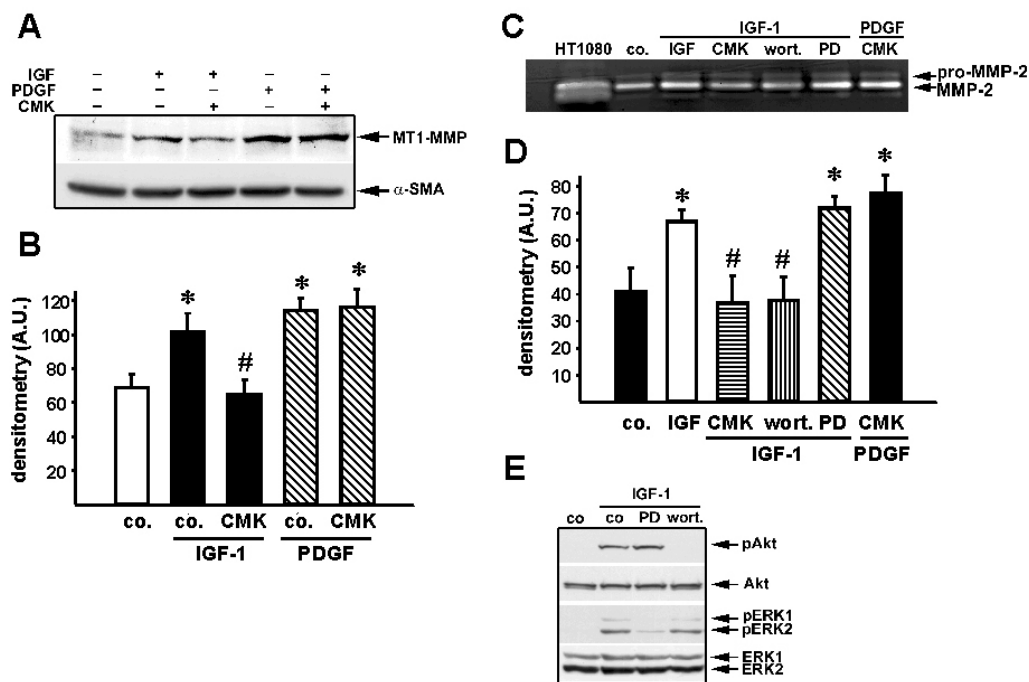
detektiert), wie auch die Phosphorylierung von Akt und ERK1/2. Die IGF-vermittelte Induktion der Signaltransduktionswege wurde durch Inhibition der pro-IGF-1R Aktivierung durch dec-CMK (50  $\mu\text{mol/L}$ ) gehemmt. PDGF-BB (20 ng/mL; 10 min.) induzierte Akt und ERK1/2 Phosphorylierung, hatte aber keinen Effekt auf die Phosphorylierung von IR/IGF-1R. Dec-CMK hatte keine Wirkung auf die PDGF-abhängige Signaltransduktion. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -smooth muscle ( $\alpha$ -SMA), totales Akt oder totales ERK1/2 re-geblottet. n = 3.

In weiteren Experimenten untersuchten wir die Regulation von MT1-MMP/MMP-2 durch IGF-1 und die Bedeutung der pro-IGF-1R Aktivierung durch Furin/PC5 in diesem Prozess<sup>108</sup>. PDGF und IGF-1 induzierten MT1-MMP in Gefäßmuskelzellen und dieses resultierte in der MMP-2 Aktivierung (Abbildung 31).



**Abbildung 31.** (A) IGF-1 (50 ng/mL) und PDGF-BB (20 ng/mL) induzierten MT1-MMP (60 kDa) in Gefäßmuskelzellen. Der in diesem Experiment benutzte monoklonale Antikörper (clone 113-5B7) detektiert nur eine MT1-MMP Bande. Die Densitometrie von A ist in B gezeigt (n = 3; \*p<0.05 vs. Kontrollen). IGF-1 steigerte auch die Proteinkonzentrationen des physiologischen MMP-Inhibitor TIMP-2 (21 kDa) (C). Die Densitometrie von C ist in D dargestellt (\*p<0.05 vs. Kontrollen; n = 3). In den Zellkultur-Überständen fand sich nach IGF-1 Stimulation die Hochregulation von latentem (72 kDa) und intermediärem/aktivem (68/62 kDa) MMP-2. (E; n = 3). co = Kontrollen.

Inhibition von Furin/PC5 mit dec-CMK hemmte die IGF-1 vermittelte MT1-MMP/MMP-2 Induktion, hatte jedoch keinen Effekt auf die PDGF-abhängige MT1-MMP/MMP-2 Regulation (Abbildung 32). Dies zeigt, dass der Effekt der Furin/PC5 Inhibition auf die IGF-vermittelte MT1-MMP/MMP-2 Expression durch die Hemmung der IGF-1R Aktivierung vermittelt ist<sup>108</sup>. Mit Hilfe selektiver pharmakologischer Inhibitoren konnten wir darüber hinaus zeigen, dass IGF-1 in Gefäßmuskelzellen MMP-Aktivität über den PI3-Kinase Weg induziert<sup>108</sup>, also einen Signaltransduktionsweg, der die IGF-1 vermittelte Migration von Gefäßmuskelzellen reguliert<sup>116</sup>. Furin/PC5 stellen somit potentielle Ziele dar, um IGF-1 abhängige Effekte, wie z.B. die Induktion von MMPs, in Gefäßmuskelzellen zu hemmen.



**Abbildung 32.** Der Furin/PC5-Inhibitor dec-CMK (CMK; 50  $\mu\text{mol/L}$ ) hemmt spezifisch die IGF (50 ng/mL; 24h)-abhängige MT1-MMP Induktion, hatte aber keinen Effekt auf die PDGF (20 ng/mL; 24h)-vermittelte MT1-MMP Induktion in Gefäßmuskelzellen (A). Die Densitometrie ist in B dargestellt (\* $p < 0.05$  vs. Kontrollen; # $p < 0.05$  vs. IGF-1 alleine;  $n = 3$ ). In den Zellkultur-Überständen hemmten dec-CMK und der PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin (wort.; 100 nM) die IGF-1 vermittelte MMP-2 Aktivität (C, Densitometrie abgebildet in D; \* $p < 0.05$  vs. Kontrollen; # $p < 0.05$  vs. IGF-1 alleine;  $n = 3$ ; HT1080 = Überstände von HT1080 Zellen). Der ERK-MAPK-Inhibitor PD98059 (PD; 30  $\mu\text{mol/L}$ ) hatte keinen Effekt und dec-CMK hemmte auch nicht die PDGF-vermittelte MMP-2 Induktion. (E) demonstriert die Spezifität der benutzten pharmakologischen Inhibitoren.

## 2.4 Regulation und Funktion von Furin-Convertase in kardialen Fibroblasten

### 2.4.1 Furin spielt eine zentrale Rolle für die TGF- $\beta$ 1 und MT1-MMP Aktivierung in kardialen Fibroblasten

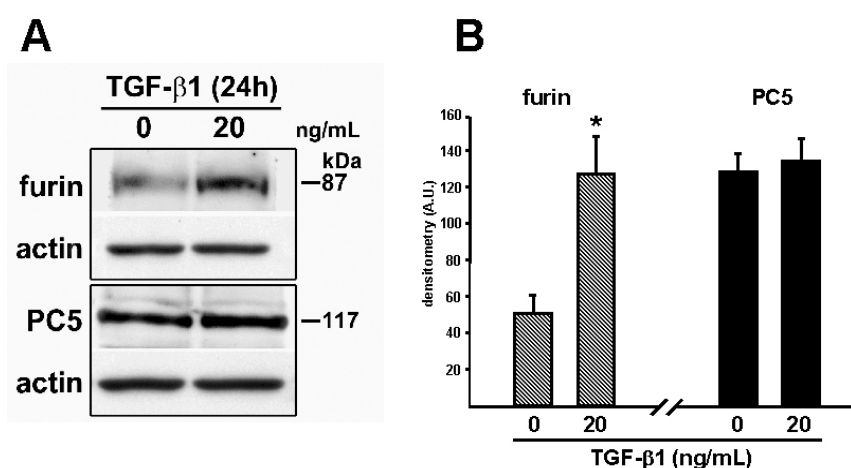
Die zuvor dargestellten eigenen Ergebnisse<sup>75,108</sup>, wie auch die Daten anderer Arbeitsgruppen<sup>112,113</sup> lassen schlussfolgern, dass Furin/PC5 keine Rolle für die direkte endoproteolytische Aktivierung von MT1-MMP in Gefäßmuskelzellen spielen. Ob diese Aktivierung autokatalytisch<sup>111</sup> oder durch eine bisher unbekannte Protease erfolgt, bedarf weiterer Untersuchungen. Da jedoch auch eine Zelltyp-spezifische Notwendigkeit von Furin für die MT1-MMP Aktivierung beschrieben wurde<sup>110</sup>, besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass PCs in unterschiedlichen Zellen/Geweben Substrate differentiell aktivieren. Wir untersuchten deshalb die direkte Aktivierung von MT1-MMP durch Furin in kardialen Fibroblasten.

Untersuchungen an MMP oder TIMP knockout Tieren haben gezeigt, dass MMPs potentielle therapeutische Ziele im kardialen Remodeling sind<sup>120</sup>. So verhindert z.B. die Deletion von MMP-2 in Mäusen nicht nur frühe Komplikation (LV-Ruptur), sondern hemmt auch das späte ECM-Remodeling nach Myokardinfarkt<sup>121</sup>, welches gekennzeichnet ist durch die Imbalance von ECM Synthese und Abbau<sup>122</sup>. Pro-fibrotische Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF- $\beta$ 1, wie auch die Matrix-abbauenden MMPs sind hierbei von zentraler Bedeutung<sup>6,122</sup>. Sowohl kardiale Fibroblasten als auch kardiale Myozyten nehmen am Remodeling teil<sup>122</sup>. Dabei sind kardiale

Fibroblasten/Myofibroblasten nicht nur hauptverantwortlich für die Kollagenbiosynthese, sondern synthetisieren auch die Matrix-abbauenden MMPs<sup>6</sup>. In Fibroblasten inhibiert TGF- $\beta$  MMP-1<sup>123</sup>, induziert aber MMP-2<sup>124</sup>, was die differentielle Regulation des MMP-Repertoire durch dieses Zytokin zeigt.

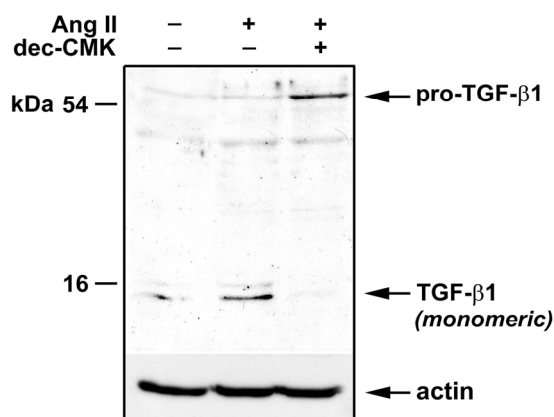
Furin, die Prototyp Convertase<sup>12</sup>, wird durch TGF- $\beta$  positiv reguliert und ist gleichzeitig die prinzipielle TGF- $\beta$  Convertase<sup>32</sup>. In Furin knockout Mäusen wird das Unvermögen der kardialen Tuben sich zu drehen und zu fusionieren auf die Bedeutung von Furin für die TGF-Biosynthese und TGF-abhängige Signaltransduktion zurückgeführt<sup>27</sup>. Furin steigert die Migration/Invasion von Karzinomzellen, was auf seine Notwendigkeit für die pro-TGF- $\beta$ 1 und/oder pro-MT1-MMP Aktivierung zurückgeführt wird<sup>38,39</sup>. Somit legen diese Daten einen engen funktionellen Zusammenhang zwischen TGF- $\beta$  - Furin - MT1-MMP nahe.

Das Ziel unserer Experimente war es, die Rolle von Furin für die TGF- $\beta$ 1 und/oder MT1-MMP Aktivierung in kardialen Fibroblasten zu untersuchen<sup>125</sup>. Zunächst haben wir die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf die Furin Expression in kardialen Fibroblasten untersucht (Abbildung 33). Unsere Versuche zeigen, dass TGF- $\beta$ 1 selektiv die Expression von Furin in kardialen Fibroblasten steigert und dabei keinen Effekt auf das nah verwandte Isoenzym PC5 hat. Die Hochregulation von Furin durch TGF- $\beta$ 1 war zeit- und konzentrationsabhängig<sup>125</sup>.



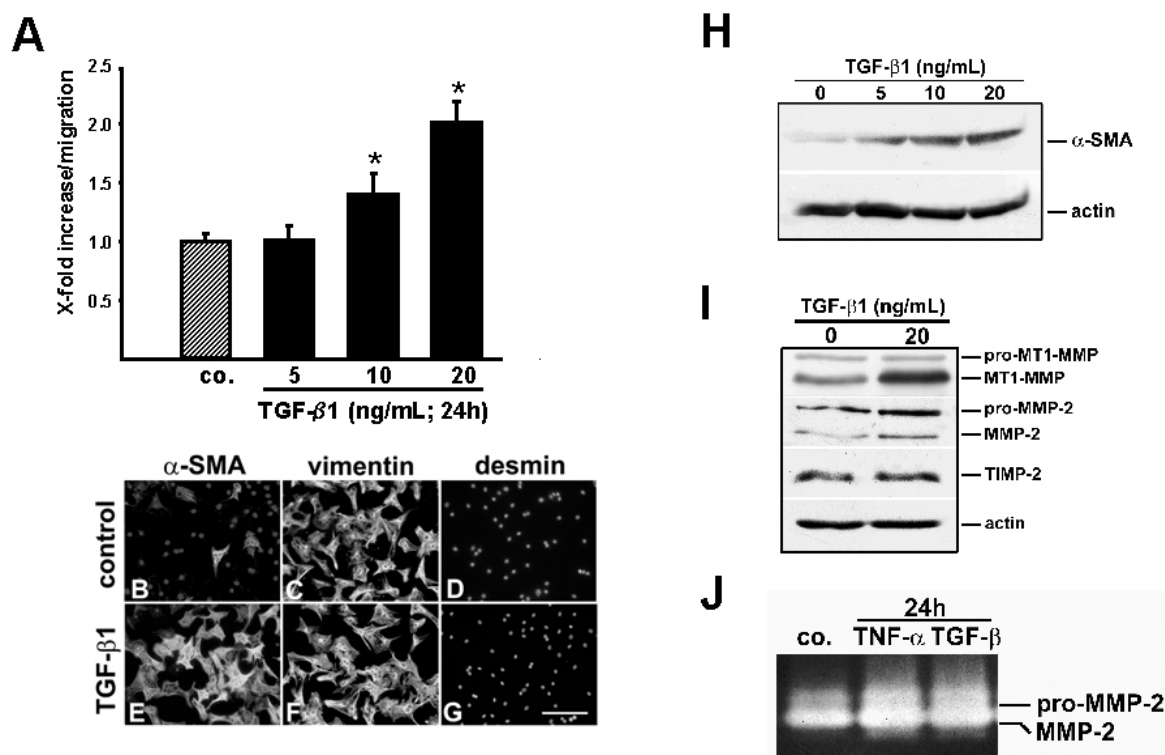
**Abbildung 33.** (A) Die Stimulation kardialer Fibroblasten mit TGF- $\beta$ 1 (20 ng/mL; 24h) resultierte in der Induktion von Furin (87 kDa), hatte jedoch keinen Effekt auf PC5 (117 kDa). (B) Die Densitometrie von Furin und PC5 nach TGF- $\beta$ 1 Stimulation ist abgebildet (\* $p < 0.05$  vs. Kontrollen).  $n = 3$ .

Nachfolgend untersuchten wir die Bedeutung von Furin für die TGF- $\beta$ 1 Aktivierung in kardialen Fibroblasten<sup>125</sup>. TGF- $\beta$ 1 wird als 55 kDa Proprotein synthetisiert, welches zu seinem Propeptid (44 kDa) und aktivem TGF- $\beta$ 1 (12.5 kDa) im TGN konvertiert<sup>126</sup>. Extrazellulär ist TGF- $\beta$ 1 an sein Propeptid (LAP; latency-associated peptide) gebunden, von welchem biologisch aktives TGF- $\beta$ 1 durch Proteolyse aus dem Multiprotein-Komplex entlassen wird<sup>127</sup>. Wir zeigten, dass die Inkubation von kardialen Fibroblasten mit dem furin-like PC-Inhibitor dec-CMK<sup>33</sup> die Angiotensin II induzierte TGF- $\beta$ 1 Aktivierung<sup>128</sup> hemmt, erkennbar an der Zunahme des pro-TGF- $\beta$ 1 (Abbildung 34). Somit reguliert TGF- $\beta$ 1, welches seine eigene Synthese in kardialen Fibroblasten steigert<sup>129</sup>, auch seine aktivierende Convertase Furin in einem positiven Feed-back.



**Abbildung 34.** Kardiale Fibroblasten wurden mit dec-CMK (100  $\mu\text{mol/L}$ ) behandelt und dann mit Angiotensin II (1  $\mu\text{mol/L}$ ; 24h) stimuliert. Der PC-Inhibitor hemmte die Angiotensin II-induzierte TGF- $\beta$ 1 Aktivierung, erkennbar an der Zunahme des pro-TGF- $\beta$ 1 (55 kDa). n = 3.

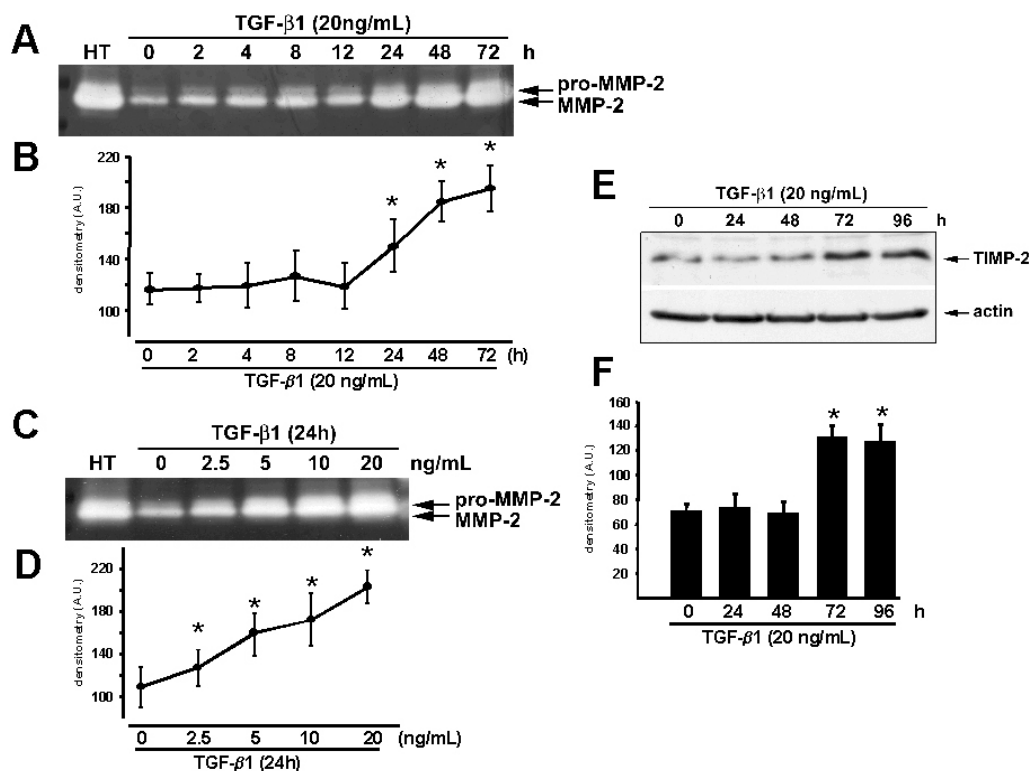
In weiteren Experimenten haben wir den Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die Motilität von kardialen Fibroblasten untersucht<sup>125</sup>. Initiale checker-box Experimente zeigten, dass TGF- $\beta$ 1 selbst nicht signifikant chemotaktisch auf kardiale Fibroblasten wirkt<sup>125</sup>. Jedoch führte die Vorstimulation von kardialen Fibroblasten mit TGF- $\beta$ 1 zu einer ca. 2-fach gesteigerten Migration/Invasion durch eine Gelatine-beschichtete Membran (Abbildung 35). Die TGF- $\beta$ 1 gesteigerte Migration/Invasion war begleitet von einer MT1-MMP und MMP-2 Aktivierung, wie auch der Myofibroblasten-Transformation kardialer Fibroblasten, erkennbar an ihrer Expression von  $\alpha$ -smooth muscle.



**Abbildung 35.** (A) Vorbehandlung von kardialen Fibroblasten mit TGF- $\beta$ 1 (20 ng/mL; 24h) steigerte die Migration/Invasion einer Gelatine-beschichteten Membran in Konzentrations-abhängiger Weise (\* $p < 0.05$  vs. Kontrollen). n = 4. Immunfluoreszenz zeigte, dass nicht mit TGF- $\beta$ 1 stimulierte kardiale Fibroblasten (control) zu 90% aus Fibroblasten und ca. 10% Myofibroblasten bestanden, wohingegen nach TGF- $\beta$ 1 Stimulation (20 ng/mL; 24h) 100% Myofibroblasten waren, erkennbar an der Expression von  $\alpha$ -smooth muscle ( $\alpha$ -SMA) (B und E). Kardiale

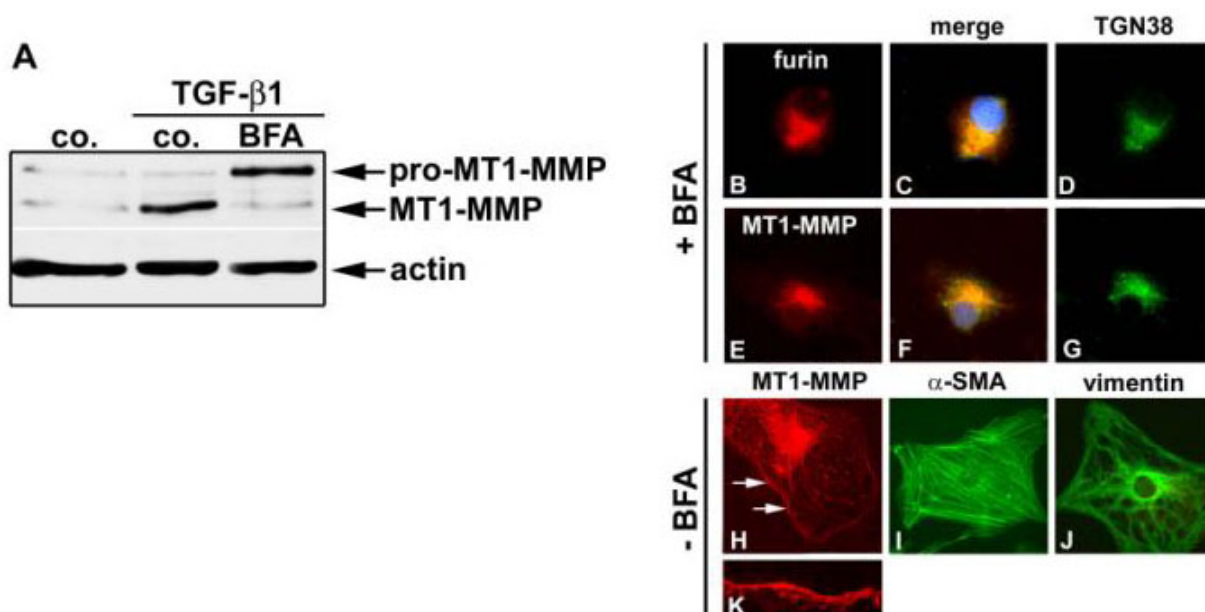
Fibroblasten sind Vimentin positiv (**C** und **F**) und Desmin negativ (**D** und **G**, Bar in **G** = 200  $\mu$ m). (**H**) TGF- $\beta$ 1 induzierte  $\alpha$ -smooth muscle in Konzentrations-abhängiger Weise. (**I**) Die TGF- $\beta$ -gesteigerte Motilität war begleitet von der MT1-MMP (63 kDa; pro-MT1-MMP = 68 kDa) und MMP-2 (68 kDa; pro-MMP-2 = 72 kDa) Aktivierung, hatte aber auf TIMP-2 (21 kDa) nach 24 Stunden Stimulation keinen Effekt. (**J**) Latentes (72 kDa) und intermediäres/aktives (68/62 kDa) MMP-2 war nach TGF- $\beta$ 1 (20 ng/mL; 24h) Stimulation signifikant gesteigert, vergleichbar der Wirkung von TNF- $\alpha$  (100 ng/mL; 24h; co. = Kontrollen).

Der Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die MT1-MMP -abhängige MMP-2 Aktivierung war zeit- und konzentrationsabhängig. Im Gegensatz zu der relativ rasch gesteigerten MMP-2 Aktivität wurde eine signifikante Induktion des physiologischen MMP-Inhibitors TIMP-2 erst nach 72 Stunden Stimulation detektiert (Abbildung 36).



**Abbildung 36.** MMP-2 Aktivität wurde durch TGF- $\beta$ 1 zeit- (**A**; **B**) und konzentrationsabhängig (**C**; **D**) gesteigert (\* $p$ <0.05 vs. Kontrollen). HT = HT1080 Zellen.  $n$  = 3. (**E**) TIMP-2 zeigte eine verzögerte Regulation durch TGF- $\beta$ 1 (20 ng/mL) nach 72 Stunden Stimulation (Densitometrie in **F**; \* $p$ <0.05 vs. Kontrollen).  $n$  = 3.

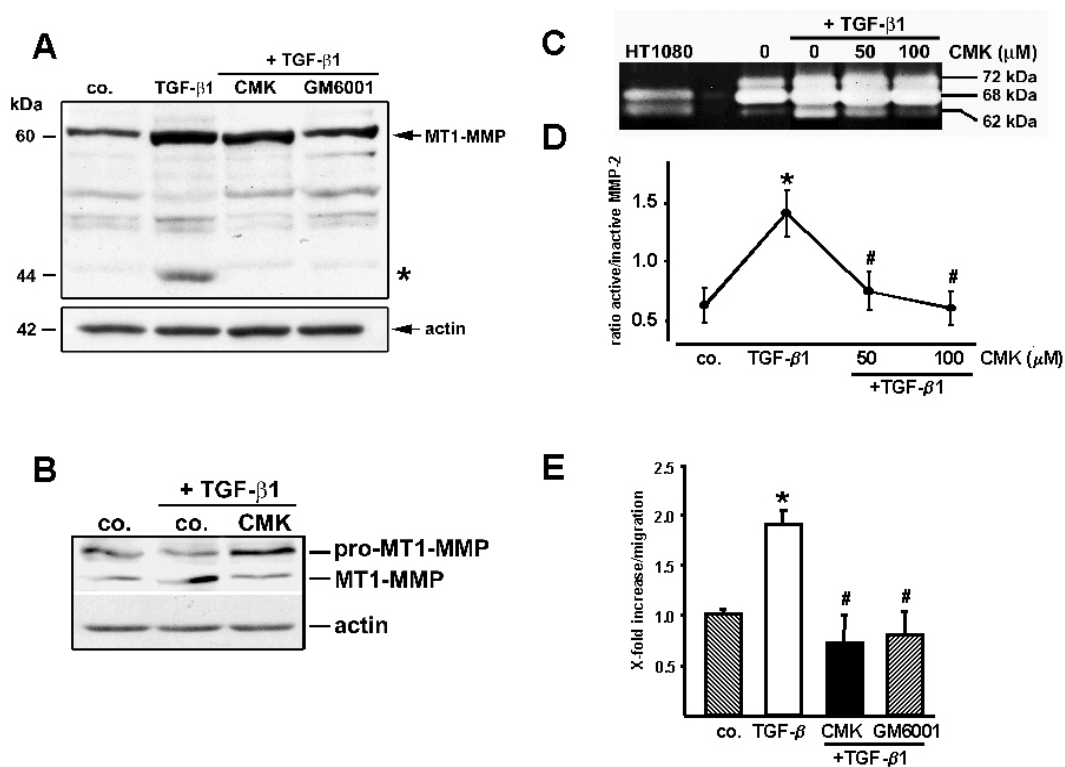
Um die subzelluläre Lokalisation der MT1-MMP Aktivierung in kardialen Fibroblasten zu untersuchen, benutzten wir den Golgi-Transport Inhibitor BFA<sup>51,52</sup>. Immunfluoreszenz-Kolokalisationsstudien zeigten, dass sowohl Furin, wie auch MT1-MMP im TGN in kardialen Fibroblasten lokalisiert sind. Mit Immunoblot-Analysen konnten wir zeigen, dass BFA die Aktivierung von MT1-MMP hemmt. Somit wird MT1-MMP in kardialen Fibroblasten im TGN aktiviert, wo MT1-MMP und Furin kolokalisieren (Abbildung 37)



**Abbildung 37. (A)** Nach BFA Behandlung war die TGF-β1-induzierte (20 ng/mL; 24h) Aktivierung von pro-MT1-MMP (68 kDa) zu aktivem MT1-MMP (63 kDa) gehemmt. Die Immunfluoreszenz zeigte, dass Furin mit TGN38 kolokalisierte (**B** = Furin, **C** = übereinander gelagert, **D** = TGN38). Gleiches fand sich für MT1-MMP (**E** = MT1-MMP, **F** = übereinander gelagert, **G** = TGN38). Ohne BFA fand sich MT1-MMP an der Zellmembran (Pfeile in **H** und höhere Vergrößerung in **K**). Zellen waren TGF-β1 (20 ng/mL) behandelt. Expression von α-smooth muscle (**I**) und Vimentin (**J**).

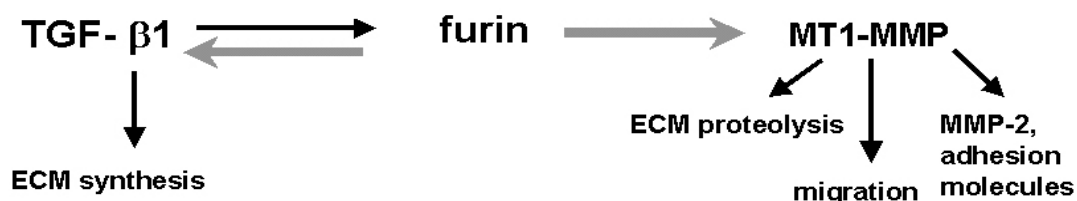
Um direkt die Bedeutung von Furin für die pro-MT1-MMP Aktivierung in kardialen Fibroblasten zu untersuchen, hemmten wir Furin mit dec-CMK. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Furin-Aktivität in kardialen Fibroblasten für die direkte pro-MT1-MMP Aktivierung notwendig ist<sup>125</sup>. Die Inhibition durch dec-CMK war der Inhibition der MT1-MMP Aktivität durch GM6001 (MMP-Inhibitor) vergleichbar. Beide pharmakologischen Inhibitoren hemmten auch die TGF-β1 gesteigerte Motilität kardialer Fibroblasten, was die Hypothese unterstützt, dass MMPs wichtige Mediatoren der TGF-induzierten Motilität kardialer Fibroblasten sind (Abbildung 38).





**Abbildung 38.** (A) Dec-CMK (100 μmol/L) und GM6001 (50 μmol/L) hemmten die MT1-MMP Autoproteolyse zu einem inaktivem 43 kDa MT1-MMP (monoklonaler MT1-MMP Antikörper; clone 113-5B7). (B) Dec-CMK hemmt die MT1-MMP Aktivierung, erkennbar an der Zunahme des pro-MT1-MMP nach TGF-β1 Stimulation (polyklonaler MT1-MMP Antikörper, gerichtet gegen die Hinge-Region). (C) Dec-CMK hemmt auch die MMP-2 Aktivierung in den Überständen TGF-behandelter kardialer Fibroblasten (50 und 100 μmol/L). HT = HT180 Zellen. (D) Die Ratio von aktivem (68 kDa intermediäres MMP-2 und 62 kDa voll-aktives MMP-2) zu inaktivem (72 kDa pro-MMP-2) ist als Index der MMP-2 Aktivierung dargestellt (\* $p < 0.05$  vs. Kontrollen; # $p < 0.05$  vs. TGF-β1). co. = Kontrollen;  $n = 3$ . (E) Dec-CMK (100 μmol/L) hemmte die TGF-β1 (20 ng/mL; 24h)-gesteigerte Migration von kardialen Fibroblasten, vergleichbar dem Effekt von GM6001 (50 μmol/L; \* $p < 0.05$  vs. Kontrollen; # $p < 0.05$  vs. TGF-β1). co. = Kontrollen.  $n = 5$ .

Zusammenfassend zeigen diese Versuche, dass Furin, welches nach Myokardinfarkt im Tiermodell im Myokard induziert ist<sup>43</sup>, eine zentrale Rolle im kardialen Remodeling spielen könnte. Wir zeigten *in vitro*, dass Furin essentiell für die TGF-β1 Aktivierung in kardialen Fibroblasten ist und durch TGF-β1 positiv reguliert wird. Dies ist von potentieller Bedeutung für die Synthese der ECM. Furin wird aber auch benötigt für die MT1-MMP/MMP-2 Aktivierung, was von Bedeutung ist, damit kardiale Fibroblasten an den Ort des Geschehens gelangen. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass TGF-β1 die Motilität kardialer Fibroblasten durch die Aktivierung von MT1-MMP/MMP-2 steigert und dass in diesem Prozess Furin eine zentrale regulatorische Rolle spielt (Abbildung 39).



**Abbildung 39.** Schematische Darstellung der Bedeutung von Furin für die TGF-β1 und MT1-MMP Aktivierung in kardialen Fibroblasten. TGF-β1 induziert Furin, welches TGF-β1 in einem positiven Feed-back aktiviert. Furin aktiviert auch MT1-MMP. Die grauen Pfeile zeigen die Aktivierung durch Furin.