

3. Zusammenfassung

Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren oder auch Adhäsionsmoleküle werden in der Regel als Proproteine synthetisiert und müssen durch endoproteolytische Spaltung an bestimmten Aminosäuresequenzen aktiviert werden. Dies setzt die Anwesenheit von entsprechenden Subtilisin/Kexin-ähnlichen Proprotein Convertasen (PCs) voraus, die mit den Proproteinen eine funktionelle Einheit zur Synthese biologisch aktiver Substanzen bilden¹¹⁻¹³.

Das Ziel der hier dargestellten Untersuchungen war es, die Regulation und Funktion der PC-Isoenzyme Furin und PC5 in kardio-vaskulären Zellen, insbesondere Gefäßmuskelzellen und Makrophagen, zu untersuchen. Mononukleäre Zellen (Monozyten/Makrophagen) sind an der Initiierung, Progression und den Komplikationen der Atherosklerose beteiligt; die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen trägt in der fibro-proliferativen Phase zur Neointimabildung bei^{1,2}. Der Eintritt von Monozyten in die Gefäßwand führt zu deren Differenzierung zu Makrophagen, was sie befähigt an der chronisch-inflammatorischen Reaktion der Atherosklerose teilzunehmen⁴. Aber auch Gefäßmuskelzellen werden phänotypisch moduliert. So zeichnen sich neointimale Gefäßmuskelzellen durch einen metabolisch aktiven, sekretorischen Phänotyp aus, welcher ein anderes Wachstumsverhalten als „ruhende“, kontraktile Gefäßmuskelzellen aus der Media besitzt^{45,130}. Grundlegende Funktionen dieser Zellen, wie Proliferation, Adhäsion und Migration, werden durch Wachstumsfaktoren^{2,55}, Integrine^{62,131} und Matrix Metalloproteinasen (MMPs)^{89,90} reguliert, die durch PCs aktiviert werden müssen^{11,12,35,36}.

Für unsere Untersuchungen haben wir *in vitro* und *in vivo* Modelle benutzt. Mit Hilfe eines Rattenaorten-Organkulturmodells zeigten wir, dass die phänotypische Differenzierung von Gefäßmuskelzellen von der Induktion von Furin, PC5 und PC7 und einer Wachstumsfaktoren de novo Synthese begleitet ist⁴⁶. Vergleichbar den Markergenen de-differenzierter Gefäßmuskelzellen, wie matrix Gla protein (MPG) und Osteopontin (OPN)⁴⁷, fanden sich Furin, PC5 und PC7 vor allem in proliferierenden Gefäßmuskelzellen⁴⁶. Die neuroendokrinen PC1 und PC2^{23,24} waren nicht detektierbar⁴⁶.

In vivo untersuchten wir die Regulation von PCs in dem Rattenaorta Ballon-Verletzungsmodell, bei welchem die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen eine zentrale Rolle spielt⁶⁰. Auch hier fanden wir die selektive Induktion von PC5 mRNA und Protein in proliferierenden Gefäßmuskelzellen⁵⁰. Die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen wird u.a. reguliert durch mitogene Wachstumsfaktoren, von denen PDGF einer der stärksten ist^{2,55}. An Kulturen von primären Gefäßmuskelzellen haben wir deshalb die Regulation von PCs durch Wachstumsfaktoren untersucht⁵⁰. Unsere Ergebnisse zeigen, dass PDGF-BB PC5 in Gefäßmuskelzellen induziert, Furin und PC7 durch PDGF aber unbeeinflusst bleiben⁵⁰. Angiotensin II, ein Wachstumsfaktor, der vor allem zu einer hypertrophen Antwort in Gefäßmuskelzellen führt⁵⁶, hatte keinen Effekt auf die PC-Expression⁵⁰. Im Rahmen unserer Arbeiten zeigten wir auch, dass die PDGF-abhängige PC5 Induktion in Gefäßmuskelzellen über einen PI3-Kinase/Akt/mTOR-abhängigen Signaltransduktionsweg erfolgt⁵⁰. Dies ist ein zentraler Regulationsweg der Proteinbiosynthese, Zellproliferation und Zellzyklusprogression^{54,58}. Analysen der subzellulären Lokalisation von PCs ergaben, dass Furin und PC5 überwiegend im TGN lokalisiert sind⁵⁰, der zentralen Stelle der Sortierung/post-translatorischen endoproteolytischen Aktivierung von Proproteinen im konstitutiven Weg der Proteinsekretion^{11,12}. Unsere Ergebnisse und die Daten anderer¹³² zeigen, dass PC7,

das eine andere Substratspezifität als Furin besitzt⁹⁵, auch in anderen post-Golgi Kompartimenten lokalisiert ist.

Essentielle zelluläre Funktionen, wie die Adhäsion und Migration von Gefäßmuskelzellen und mononukleären Zellen, werden durch Integrine und Matrix Metalloproteinasen (MMPs) reguliert^{62,89,131}. Integrine stellen hierbei die Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix (ECM) und Zytoskelett dar und vermitteln Mechanotransduktion und bi-direktionale Signalverarbeitung⁶²⁻⁶⁴. MMPs sind als Gruppe in der Lage alle Moleküle der ECM abzubauen⁸⁹, können aber darüber hinaus Zellfunktionen auch durch Proteolyse von sogenannten Nicht-Matrix-Substraten, wie Adhäsionsmoleküle oder Wachstumsfaktoren, regulieren^{76,91-93}. MMPs und Integrine interagieren und kooperieren bei der Regulation von Zellfunktionen miteinander^{133,134}. Auch dient die MMP-abhängige ECM-Proteolyse nicht ausschließlich der Beseitigung einer physiologischen Barriere bei der Zellmigration, sondern kann Integrin - ECM Interaktionen erst ermöglichen, indem Bindungsstellen demaskiert werden¹³⁵.

Die α -Untereinheiten von RGD-erkennenden Integrinen ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 11b$ und αv) bestehen aus 2 Disulphid-gebundenen Ketten^{62,72}, welche durch endoproteolytische Spaltung entstehen^{36,74,77}. Der Schwerpunkt unserer Arbeiten lag in der Untersuchung der Aktivierung von αv Integrin durch Furin/PC5 in Gefäßmuskelzellen⁷⁵. Integrin αv findet sich in humanen atherosklerotischen Läsionen^{68,69} und im Tiermodell hemmt die Blockade von α -Integrinen die Neointimabildung^{66,67}, wie auch die Infiltration der Gefäßwand mit Makrophagen^{84,85}, was ihre Bedeutung unterstreicht.

Im Rahmen unserer Studien zeigten wir durch Inhibition von Furin/PC5 mit dem pharmakologischen furin-like PC-Inhibitor dec-CMK³³ und durch Transfektion von Gefäßmuskelzellen mit PC5-spezifischen antisense Oligonucleotiden, dass PC5 die endoproteolytische Aktivierung der αv -Untereinheit in Gefäßmuskelzellen reguliert und dass diese Aktivierung die Integrin-abhängige Adhäsion und Migration, wie auch Signaltransduktion kontrolliert⁷⁵. Wir zeigten, dass die Aktivierung der αv -Untereinheit im TGN erfolgt⁵⁹. Unsere Daten zeigen, dass die Hemmung von PC5 und damit auch konsequenterweise Hemmung der endoproteolytischen Aktivierung von αv , die Adhäsion und Migration von Gefäßmuskelzellen auf dem $\alpha v\beta 3/\beta 5$ Liganden Vitronectin hemmt, aber keinen Effekt auf die Adhäsion der Zellen auf einer Typ I Kollagen Matrix hat⁷⁵. Dies erklärt sich dadurch, dass die Adhäsion an Typ I Kollagen $\alpha 2$ -abhängig vermittelt wird und dieses Integrin nicht endoproteolytisch aktiviert wird⁶².

Integrine, welche selbst keine Tyrosin-Kinase-Aktivität besitzen⁶², vermitteln Signale durch die Aktivierung von Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, wie FAK⁶⁵. Autophosphoryliertes FAK aktiviert Akt, was Zellmotilität steigert^{58,79,80}. Im Gegensatz zum PI3-Kinase \rightarrow Akt Weg können ERK1/2 MAP-Kinasen durch Integrine FAK-unabhängig induziert werden⁸¹. Wir zeigten, dass die Inhibition der αv Aktivierung via Inhibition von Furin/PC5 Integrin-abhängige Signaltransduktion differentiell regulieren kann, indem FAK und Akt Phosphorylierung gehemmt werden, die Integrin-abhängige Aktivierung der ERK1/2 MAP-Kinasen jedoch unbeeinflusst bleibt⁷⁵. Somit können auch nicht-gespaltene α -Integrine Signalkompetenz besitzen⁷⁴⁻⁷⁷. Dies ist bemerkenswert, da Proproteine bisher in aller Regel als Vorläuferproteine ohne physiologische Funktion angesehen wurden.

Auch in Makrophagen ist die αv Aktivierung Furin/PC5 abhängig, sie ist jedoch nicht erforderlich für die Sortierung/Leitung von αv zur Zellmembran, bzw. dessen Heterodimerisierung mit der $\beta 3$ -Kette⁸⁶.

Im Rahmen unserer Arbeiten untersuchten wir die Koregulation/Koexpression von PCs und αv in vivo. Unsere Arbeiten zeigen, dass PC5 und αv nach Ballon-Verletzung von Rattenaorta koreguliert sind und in Gefäßmuskelzellen der Neointima kolokalisieren⁵⁹. Wie PC5⁵⁰ ist auch αv vor allem in proliferierenden, metabolisch aktiven Gefäßmuskelzellen induziert⁵⁹. Darüber hinaus untersuchten wir die Expression von Furin und PC5 in humanen atherosklerotischen Läsionen. Furin und PC5 finden sich in fortgeschrittenen Läsionen in Gefäßmuskelzellen und vor allem auch in Makrophagen^{75,86,99}. In Gefäßmuskelzellen und Makrophagen kolokalisieren Furin und PC5 mit αv Integrin^{75,86}. In Arterektomiepräparaten der A. carotis demonstrierten wir darüber hinaus die Kolokalisation von Furin und PC5 mit einem weiteren Substrat, dem Membran-gebundenen MT1-MMP, in Makrophagen⁹⁹.

MT-MMPs werden durch endoproteolytische Spaltung von Furin, bzw. Furin-ähnlichen Convertasen (PC5) intrazellulär aktiviert³⁵ und finden sich in humanen atherosklerotischen Läsionen vor allem in Gefäßmuskelzellen und Makrophagen^{97,98}. MMPs sind potentielle Regulatoren der Plaquestabilität⁹⁰, denn vulnerabele atherosklerotische Läsionen sind durch die Akkumulation von Makrophagen und deren *in situ* MMP-Aktivität gekennzeichnet¹³⁶. In Makrophagen werden MT-MMPs durch inflammatorische Mediatoren wie TNF- α oder oxLDL reguliert^{97,98}. Die Aktivierung von MT1-MMP führt zur Amplifikation einer proteolytischen Kaskade, welche in der MMP-2 Aktivierung mündet^{89,105}. Im Gegensatz zu MMP-2, welches durch Bildung eines MT1-MMP/pro-MMP-2/TIMP-2 Trimers an der Zellmembran aktiviert wird¹⁰⁵⁻¹⁰⁷, wird MMP-9 durch Plasmin oder andere Serin-Proteasen aktiviert⁸⁹.

Vergleichbar den Makrophagen aus humanen Monozyten, synthetisieren Makrophagen aus monozytären Zelllinien vorwiegend pro-MMP-9 und wenig pro-MMP-2¹⁰⁰⁻¹⁰⁴. Im Rahmen unserer Arbeiten zeigten wir, dass die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen durch die Induktion von Furin, PC5 und MT1-MMP gekennzeichnet ist⁹⁹. Die Stimulation von Monozyten mit den inflammatorischen Mediatoren TNF- α oder LPS stimulierte pro-MMP-9 Synthese, hatte aber keinen Effekt auf die Expression/Aktivierung von pro-MMP-2 in Monozyten. Makrophagen exprimierten stark pro-MMP-9 und in diesen MT1-MMP kompetenten Zellen war auch eine basale pro-MMP-2 Aktivierung detektierbar. Diese ließ sich jedoch nicht durch TNF- α oder LPS steigern. Wir untersuchten deshalb die Hypothese, dass eine Funktion des Makrophagen MT1-MMP die Aktivierung von pro-MMP-2 aus anderen Zellen ist. Die Kultivierung von Makrophagen in konditioniertem Medium von Serum-defizienten Gefäßmuskelzellen, die konstitutiv pro-MMP-2 synthetisieren⁹⁶, resultierte in einer starken pro-MMP-2 Aktivierung. Die Kultivierung von Monozyten im Gefäßmuskelzellmedium hatte keinen Effekt auf die pro-MMP-2 Aktivierung, was zeigt, dass die Aktivierung von pro-MMP-2 abhängig ist vom MT1-MMP der Makrophagen. Durch Transfektion von Makrophagen mit einer Furin-spezifischen siRNA oder pharmakologische Inhibition von Furin/PC5 zeigten wir, dass diese PCs die Aktivität von MT1-MMP in Makrophagen kontrollieren und dass die Inhibition von Furin/PC5 in der Inhibition der MT1-MMP –abhängigen Aktivierung des Gefäßmuskelzellen pro-MMP-2 resultiert. Somit kontrollieren Furin/PC5 die Amplifikation der MT1-MMP \rightarrow pro-MMP-2 proteolytischen Kaskade, welche die Kooperation von Makrophagen und Gefäßmuskelzellen voraussetzt und potentiell zur Plaqueinstabilität beiträgt⁹⁹.

Im Gegensatz zur Furin/PC5 –abhängigen Regulation von MT1-MMP/MMP-2 in Makrophagen fanden wir^{75,108} und andere Arbeitsgruppen^{112,113} jedoch keine Inhibition der MT1-MMP -abhängigen pro-MMP-2 Aktivierung durch Inhibition von PCs in

Gefäßmuskelzellen. In der Tat kann MT1-MMP auch autokatalytisch aktiviert werden¹¹¹.

MMP-Aktivität wird aber auch durch Wachstumsfaktoren reguliert⁸⁹, so dass die Möglichkeit bestand, dass Furin/PC5 die Aktivität von MMPs durch Aktivierung von Wachstumsfaktoren und/oder deren Rezeptoren in Gefäßmuskelzellen regulieren können. Die insulin-like growth factor Achse, bestehend aus insulin-like growth factor-1 (IGF-1), seinem Rezeptor (IGF-1R) und den Bindungsproteinen (IGFBPs), reguliert die Proliferation und Migration von Gefäßmuskelzellen. IGF-1, welches MT1-MMP in Tumorzellen induziert¹¹⁴, vermittelt seine Signaltransduktion durch Bindung an seinen IGF-1R¹¹⁷. Der IGF-1R ist eine Heterotetramer aus Disulphid-gebundenen $\alpha 2/\beta 2$ Ketten, welche aus dem pro-IGF-1R durch limitierte endoproteolytische Aktivierung an RKRR⁷⁴⁰ hervorgehen^{117,118}.

Unsere Arbeiten¹⁰⁸ zeigen, dass Furin/PC5 die Aktivierung von MT1-MMP/MMP-2 durch IGF-1 via selektiver endoproteolytischer Aktivierung des IGF-1R kontrollieren und dass die Induktion von MMP-2 durch IGF-1 in Gefäßmuskelzellen PI3-Kinase abhängig ist, dem Signaltransduktionsweg, über welchen IGF-1 Zellmigration in Gefäßmuskelzellen steuert¹¹⁶. Inhibition von Furin-Convertasen bietet somit die Möglichkeit IGF-abhängige Funktionen, wie z.B. die Regulation von MMP-Aktivität, in Gefäßmuskelzellen zu hemmen¹⁰⁸.

Sato et al.¹¹⁰ hatten eine Zelltyp-spezifische Notwendigkeit von Furin für die MT1-MMP Aktivierung in Fibroblasten beschrieben. Wir untersuchten deshalb, ob Furin in kardialen Fibroblasten MT1-MMP direkt aktivieren kann. Unsere Arbeiten zeigen, dass Furin MT1-MMP in kardialen Fibroblasten direkt durch endoproteolytische Spaltung im TGN aktiviert¹²⁵. Im Rahmen dieser Arbeiten zeigten wir, dass TGF- $\beta 1$ die Motilität kardialer Fibroblasten durch Induktion von MT1-MMP/MMP2 steigert. Weiterhin, dass Furin in diesem Regelkreis eine zentrale Rolle spielt, denn Furin aktiviert TGF- $\beta 1$, was wiederum Furin in einer positiven Regulationsschleife in kardialen Fibroblasten induziert. Auf das eng verwandte PC5 hatte TGF- $\beta 1$ in kardialen Fibroblasten keinen Effekt¹²⁵. Diese Ergebnisse können von klinischer Relevanz sein. Klinische Studien zeigen, dass sich pro-fibrotische Faktoren und Matrix-abbauende Enzyme nicht per se ausschließen: in terminal insuffizienten Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, also einem Zustand, in dem die TGF- β Spiegel erhöht sind¹³⁷ und der ECM-Umsatz gesteigert ist¹³⁸, sind auch MT1-MMP und MMP-2 gesteigert¹³⁹. Furin spielt somit potentiell eine zentrale Rolle im kardialen Remodeling und der Herzinsuffizienz.

Die in diesen Arbeiten dargestellten differentiellen Regulationen und Zelltyp-spezifischen Notwendigkeiten von Furin und PC5 für die Aktivierung von αv Integrin, MT1-MMP, Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta 1$) und Wachstumsfaktor-Rezeptoren (IGF-1R) in Gefäßmuskelzellen, Makrophagen und kardialen Fibroblasten zeigen die potentielle Bedeutung von Furin und PC5 für die Pathogenese kardio-vasculärer Erkrankungen. Die Herausforderung besteht in der temporären, Isoenzym-spezifischen Inhibition, da PCs auch essentielle physiologische Funktionen erfüllen^{11,12}. Der häufig benutzte PC-Inhibitor $\alpha 1$ -PDX³⁴, der intrazellulär vor allem Furin/PC5 im konstitutiven Weg hemmt⁷⁸, ist ebenso wie der pharmakologische PC-Inhibitor dec-CMK³³ in vivo toxisch. Mit einem neuen Hexa-D-Arginin Furin-Inhibitor¹⁴⁰ wurde jedoch kürzlich an einem Tiermodell gezeigt, dass die temporäre in vivo Inhibition von Furin, bzw. Furin-ähnlichen PCs prinzipiell möglich ist¹⁴¹.