

Gespaltenes hochmolekulares Kininogen, ein neuer Faktor
in der Regulation von Matrixmetalloproteinasen
in glatten Gefäßmuskelzellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Uwe Vosgerau

aus Oldenburg

Januar 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis November 2008 am Center for Cardiovascular Research/Institut für Pharmakologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Unger angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Unger

2. Gutachter: Prof. Dr. Burkhard Kleuser

Disputation am 28. Mai 2009

Danksagung

In den Jahren der Erstellung dieser Arbeit ist mir von vielen Seiten Hilfe und Unterstützung entgegengebracht worden.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Thomas Unger für die stets von einer freundlichen Atmosphäre geprägte Betreuung dieser Arbeit, für seine wertvollen Vorschläge sowie nicht zuletzt für die Bereitstellung der für diese Arbeit erforderlichen finanziellen und materiellen Mittel.

Meiner direkten Betreuerin Frau Dr. Elena Kaschina möchte ich herzlich danken für die anregenden fachlichen Diskussionen, für ihre Hilfsbereitschaft und ihre aufmunternden und optimistischen Worte, die mir über die schwierigen Phasen dieser Arbeit hinweggeholfen haben.

Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser danke ich dafür, kurzfristig die Begutachtung dieser Arbeit am Fachbereich Pharmazie der Freien Universität Berlin übernommen zu haben.

Meinen Freunden und Kollegen Jan und Christian möchte ich einen großen Dank aussprechen nicht nur für die praktische Hilfe und vielen guten Ratschläge im Laboralltag, sondern insbesondere auch für das Korrekturlesen der Dissertation.

Den Mitarbeitern der gesamten Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die unkomplizierte Zusammenarbeit, die oftmals sehr spontanen Hilfestellungen und für das gute und freundschaftliche Arbeitsklima.

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich für ihre vorbehaltlose Unterstützung danken, auf die ich mich immer verlassen konnte.

Schließlich danke ich meiner Freundin Uta für ihre unermüdliche Jagd nach Komma- und Rechtschreibfehlern sowie für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung über die gesamte Zeit der Doktorarbeit, ohne die ich sicherlich nicht so weit gekommen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Das abdominale Aortenaneurysma	1
1.2.	Matrixmetalloproteinasen	4
1.2.1.	Substratspezifität und Proteinstruktur	4
1.2.2.	Regulation der MMP-Aktivität	7
1.2.3.	Beteiligung der MMPs an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen	9
1.2.4.	Die besondere Rolle der MMP-2 und MMP-9 in der Pathogenese des abdominalen Aortenaneurysmas	11
1.3.	Glatte Gefäßmuskelzellen	12
1.4.	Kininogene	15
1.4.1.	Das Kallikrein-Kinin-System	15
1.4.2.	Hoch- und niedermolekulares Kininogen	16
1.4.3.	Gespaltenes hochmolekulares Kininogen	17
1.5.	Kininogen-defiziente Brown-Norway-Katholiek-Ratten	18
1.6.	Hypothese und Zielsetzung	19
2.	Material und Methoden	21
2.1.	Material	21
2.1.1.	Chemikalien und Substanzen	21
2.1.2.	Nährmedium, Zusätze und Substanzen für die Zellkultur	22
2.1.3.	Reagenzien für die Proteinanalytik	23
2.1.4.	Antikörper	23
2.1.5.	Reagenzien für die Nukleinsäureanalytik	24
2.1.6.	Primer	25
2.1.7.	Puffer und Lösungen	26
2.1.8.	Ausgewählte Materialien	28
2.1.9.	Geräte	29
2.2.	Methoden	31
2.2.1.	Methoden der Zellkultur	31
2.2.1.1.	Gewinnung glatter Gefäßmuskelzellen aus der Aorta der Ratte	31
2.2.1.2.	Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen	32
2.2.1.3.	Kryokonservierung	32

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.4. Behandlung mit Wirkstoffen	33
2.2.2. Methoden der Proteinanalytik	34
2.2.2.1. Immunzyto-Fluoreszenzmikroskopie	34
2.2.2.2. Proteinextraktion aus kultivierten Zellen sowie Geweben	35
2.2.2.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen	36
2.2.2.4. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen	36
2.2.2.5. Western Blotting und Immundetektion	37
2.2.2.6. Gelatine-Zymographie	38
2.2.2.7. Gelatinase/Kollagenase-Aktivitätsassay	39
2.2.3. Methoden der Nukleinsäureanalytik	40
2.2.3.1. RNA-Extraktion aus kultivierten Zellen sowie Geweben	40
2.2.3.2. RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle	41
2.2.3.3. Reverse Transkription	42
2.2.3.4. <i>Real-time</i> PCR	43
2.2.3.5. <i>Nested</i> PCR	46
2.2.3.6. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	48
2.2.4. Statistische Auswertung	48
3. Ergebnisse	49
3.1. Gewinnung und Charakterisierung glatter Gefäßmuskelzellen	49
3.2. Etablierung eines Stimulationsmodells der induzierten Expression von MMP-2 und MMP-9 in VSMCs	52
3.2.1. Stimulation von VSMCs mit Interleukin-1 α	52
3.2.2. Nachweis der durch MMPs erzeugten Gelatinolyse	56
3.2.3. Nachweis der proForm der detektierten MMPs	57
3.3. Effekt von gespaltenem HK auf die Zytokin-induzierte MMP-9-Expression	58
3.3.1. Untersuchung der MMP-9-Sekretion	58
3.3.2. Untersuchung der MMP-9-mRNA-Expression	59
3.3.3. Untersuchung der MMP-9-mRNA-Degradation	60
3.4. Effekt von gespaltenem HK auf die Zytokin-stimulierte MMP-2-Expression	62
3.4.1. Untersuchung der MMP-2-Sekretion	62
3.4.2. Untersuchung der MMP-2-mRNA-Expression	65
3.4.3. Gespaltenes HK nimmt keinen Einfluss auf die gelatinolytische Eigenschaft der MMP-2 und MMP-9	66
3.5. Die Zytokin-induzierte Zunahme der TIMP-1-Expression wird durch gespaltenes HK weiter erhöht	67

Inhaltsverzeichnis

3.6.	Gespaltenes HK verringert die MMP-Nettoaktivität	69
3.6.1.	Bestimmung des MMP-9/TIMP-1-mRNA-Quotienten	69
3.6.2.	Bestimmung des MMP-Aktivitätslevels im konditionierten Medium	70
3.7.	Untersuchungen zur basalen Expression von MMPs und TIMPs	73
3.7.1.	Die basale Expression von MMP-2 und TIMP-2 ist in VSMCs von Kininogen-defizienten Ratten erhöht	73
3.7.2.	Gespaltenes HK nimmt keinen Einfluss auf die basale MMP-2-Expression in VSMCs von Kininogen-defizienten Ratten	75
3.8.	Untersuchungen zur Expression des hochmolekularen Kininogens in VSMCs und in der Aorta der Ratte	76
3.8.1.	Nachweis des hochmolekularen Kininogens auf Protein-Ebene	76
3.8.2.	Qualitative Analyse der mRNA-Expression des hochmolekularen Kininogens	79
4.	Diskussion	82
4.1.	Die Auswahl des Untersuchungsmodells	82
4.2.	Das gespaltene HK: Ein bioaktives Protein	83
4.3.	Gespaltenes HK beeinflusst die Regulation von MMPs	84
4.4.	Die Effekte des gespaltenen HK: Potentielle Mechanismen in vaskulären Zellen	91
4.5.	Basale MMP-Expression in VSMCs von Kininogen-defizienten Ratten	92
4.6.	Präsenz der Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems in der Aorta	95
4.7.	MMPs & abdominale Aortenaneurysmen: Pharmakotherapeutische Optionen	98
5.	Zusammenfassung	103
6.	Summary	104
7.	Literaturverzeichnis	105
8.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	120
9.	Abkürzungen	122

1. Einleitung

1.1. Das abdominale Aortenaneurysma

Das Aneurysma ist definiert als lokal begrenzte, dauerhafte Ausweitung der Gefäßwand eines Blutgefäßes (Gloviczki 2008). Die Aorta zählt zu den arteriellen Blutgefäßen, in denen eine solche gravierende Strukturveränderung der Gefäßwand bevorzugt auftritt, wobei zwischen thorakalen und abdominalen Aortenaneurysmen unterschieden wird.

Abdominale Aortenaneurysmen (AAA) entstehen zum überwiegenden Teil im Bereich unterhalb des Abgangs der Nierenarterien (infrarenales AAA) und oberhalb der Bifurkation (Aufteilung der Aorta in die Beckenarterien). Seltener ist der juxta- oder suprarenale Abschnitt der Aorta betroffen. Laut Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) spricht man von einem AAA bei einer Erweiterung des infrarenalen Aortendurchmessers auf über 3 cm, während der physiologische Durchmesser in der Regel 2,0 – 2,5 cm beträgt. Die Geschwindigkeit der Ausweitung der Gefäßwand ist individuell sehr unterschiedlich und steht in Abhängigkeit zu den vorhandenen Risikofaktoren. Allerdings scheinen große AAAs mit einem Durchmesser von ≥ 5 cm allgemein schneller zu dilatieren als kleine AAAs (Gadowski 1994).

Klinisch verläuft die Entwicklung des AAA meist asymptomatisch oder äußert sich in uncharakteristischen Beschwerden, die auch im Kontext anderer Krankheitsbilder auftreten können. Indessen stellt die Ruptur eines AAA einen lebensbedrohlichen Zustand mit hoher Mortalitätsrate dar. Das Risiko einer Ruptur der Gefäßwand nimmt mit zunehmender Dilatation des Gefäßes zu und steigt ab einem Durchmesser von 5 cm stark an (Steckmeier 2001). Den Daten aus *Screening*-Untersuchungen in den USA und Australien zufolge kann von einer Prävalenz von 7-9 % in der Population der über 65-Jährigen ausgegangen werden (Newman 2001, Norman 2004). Allgemein nimmt die Inzidenz des AAA mit zunehmendem Lebensalter stark zu (Blanchard 1999). Dabei sind Männer ca. sechsmal häufiger betroffen als Frauen (Scott 2002). Neben Alter und Geschlecht zählen das Rauchen, eine arterielle Hypertonie, eine Hyperlipoproteinämie sowie genetische Prädispositionen zu den weiteren Risikofaktoren. Zudem weist die Gefäßwand des AAA häufig arteriosklerotische

Veränderungen auf, aufgrund dessen die Arteriosklerose mit der Entstehung des AAA in Verbindung gebracht wird (Reed 1992).

Die Aneurysmenformation ist gekennzeichnet durch tiefgreifende histopathologische Veränderungen der Gefäßwand, welche in einem direkten Zusammenhang mit der Entstehung und Progression des AAA stehen. Die hierbei in Erscheinung tretenden pathophysiologischen Prozesse sind umfassend untersucht worden (Abbildung 1.1.). Ein wesentliches Merkmal der Pathogenese des AAA ist der umfassende Abbau und die Umstrukturierung der extrazellulären Matrix. An diesem Prozess sind Matrixmetalloproteinasen (MMPs) entscheidend beteiligt. MMPs vermögen diverse strukturelle Proteine der extrazellulären Matrix, z.B. Kollagene und Elastin, proteolytisch zu spalten. Die Untersuchung von Busutil *et al.* im Jahre 1980 zeigte zum ersten Mal, dass die Gefäßwand des AAA eine signifikant erhöhte kollagenolytische Aktivität aufweist. Seitdem konnte in zahlreichen Studien eine erhöhte Expression und Aktivität von MMPs in der Gefäßwand von sowohl kleinen als auch bereits weit fortgeschrittenen AAAs festgestellt werden (Freestone 1995, McMillan 1997a, Kadoglou 2004).

Die Strukturproteine Kollagen und Elastin, zwei elementare Bestandteile der extrazellulären Matrix, nehmen hinsichtlich der biomechanischen Eigenschaften der Aorta eine Schlüsselfunktion ein. Die Fragmentierung von Elastinfasern stellt eine der ersten histologisch wahrnehmbaren Strukturveränderungen dar, welche bereits in der frühen Phase der Aneurysmenformation auftritt. Thompson und Cockerill (2006) formulierten die Hypothese, dass die Elastolyse einen initialen Prozess darstellt, welcher der weiteren Entwicklung des AAA zugrunde liegen könnte. Neben einem abnehmenden Gehalt an Elastin ist eine zunehmende Menge an Kollagenen in der Gefäßwand kennzeichnend für die Pathogenese des AAA (Sakalihan 1993). Diese Modulation der extrazellulären Matrix könnte als Erklärung dafür dienen, dass das aneurysmatisch veränderte Gewebe im Vergleich zur normalen Aorta seine elastische Eigenschaften verliert und insgesamt steifer und weniger dehnbar wird (He 1994, MacSweeney 1992). Die Beobachtung von Freestone *et al.* (1995), dass große Aneurysmen aufgrund einer in der *Tunica adventitia* auftretenden Fibrose dickere Gefäßwände aufweisen als kleine Aneurysmen, verdeutlicht zudem das Ausmaß der vaskulären Umstrukturierung, die mit der Progression des AAA einhergeht.

Koch *et al.* (1990) konnten zeigen, dass ein inflammatorisches Infiltrat, bestehend aus T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen, in der Gefäßwand des AAA vorhanden und

überwiegend im Bereich der *Tunica adventitia* lokalisiert ist. Darüber hinaus konnten erhöhte Mengen an Zytokinen im AAA detektiert werden (McMillan 1997b). Dabei ist die Frage, inwieweit eine inflammatorische Infiltration der Aneurysmenformation zugrunde liegt oder diese lediglich ein sekundäres Phänomen darstellt, welches die Progression des AAA begünstigt, noch nicht abschließend geklärt. Des Weiteren ist das AAA durch eine reduzierte Anzahl an glatten Gefäßmuskelzellen infolge apoptotischer Prozesse charakterisiert (Henderson 1999). Hiermit geht nicht nur ein integraler Bestandteil der zellulären Komposition der Aorta verloren, sondern es schwindet auch der Beitrag dieses Zelltyps zur Instandsetzung und Wiederherstellung der extrazellulären Matrix.

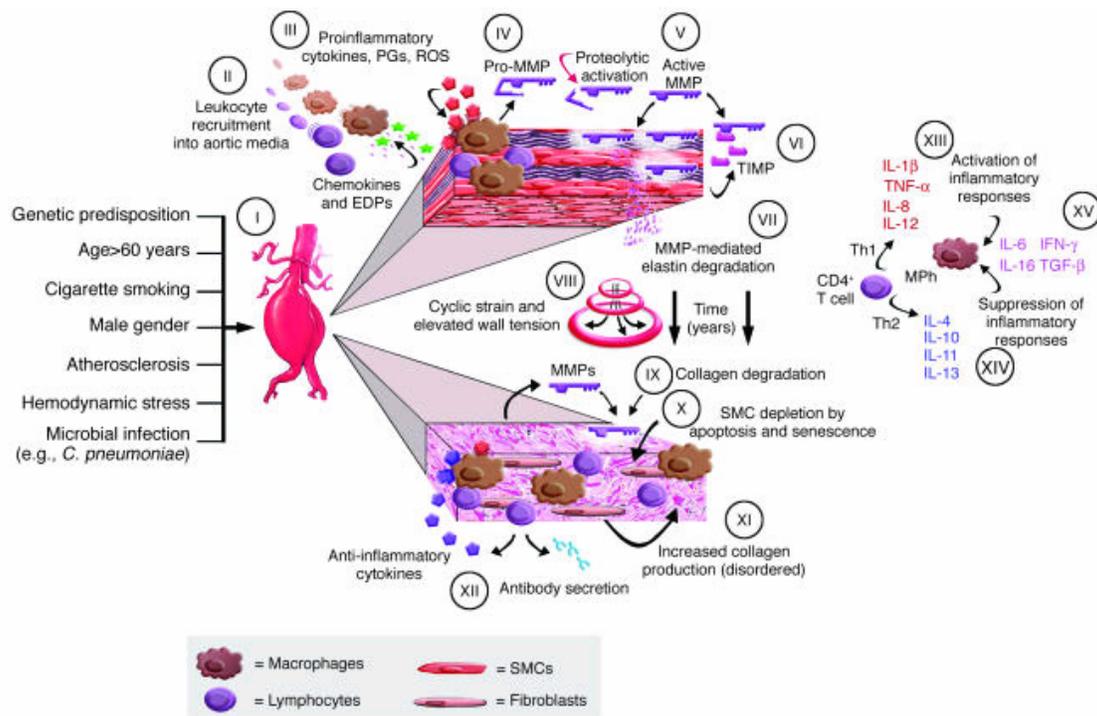


Abbildung 1.1. **Pathophysiologie des AAA.** Schematische Illustration der Prozesse, denen eine Beteiligung an der Entstehung und Progression des AAA zugesprochen wird (aus Curci 2004).

Insgesamt führen die genannten pathophysiologischen Prozesse zu einem Verlust der strukturellen Integrität und einer Schwächung der Aortenwand. Infolge der hämodynamischen Belastung kommt es dann zur Dilatation des Gewebes.

Die derzeit zur Verfügung stehenden therapeutischen Optionen sind auf die chirurgische Intervention beschränkt. Die Indikation für einen operativen Eingriff besteht grundsätzlich bei symptomatischen sowie rupturierten AAAs. Bei asymptomatischen AAAs wird ein elektiver Eingriff unter Berücksichtigung der Risikofaktoren ab einem Aortendurchmesser von 5 cm empfohlen. Pharmakologische Interventionsmöglichkeiten, die sich insbesondere hinsichtlich einer verminderten Progression des AAA als nützlich erweisen könnten, existieren bis heute nicht.

1.2. Matrixmetalloproteinasen

Die Enzymfamilie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) umfasst zahlreiche Zink-abhängige Endopeptidasen, welche einen strukturell ähnlichen Aufbau aufweisen und die Fähigkeit besitzen, Komponenten der extrazellulären Matrix zu spalten.

Die Entdeckung der MMPs geht auf eine Untersuchung von Gross und Lapiere (1962) zurück. Im Rahmen ihrer Studie zu der Frage, wie die Kaulquappe in der Metamorphose zum Frosch ihren Schwanz verliert, haben sie einen „kollagenolytischen Faktor“ beschrieben, welcher heute als MMP-1 bekannt ist. MMPs kommen in den meisten lebenden Organismen einschließlich der Bakterien vor. Die Anzahl der bekannten MMPs nimmt stetig zu. So sind bis heute 23 verschiedene humane MMPs identifiziert worden (Nagase 2006), von denen 14 im vaskulären Gewebe exprimiert werden (Chase 2003).

1.2.1. Substratspezifität und Proteinstruktur

Die verschiedenen MMPs weisen eine distinkte, zum Teil aber auch überlappende Substratspezifität auf. In ihrer Gesamtheit betrachtet besitzen die MMPs dabei das Potential, nahezu alle Protein- und Proteoglykan-Komponenten der extrazellulären Matrix zu spalten. Basierend auf der Präferenz für bestimmte Substrate sowie aufgrund struktureller Homologien lassen sich die MMPs in 6 Untergruppen unterteilen: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, membranständige MMPs (MT-MMPs; *membrane-type* MMPs) und andere MMPs.

Die hervorstechende Eigenschaft der Kollagenasen besteht in der Spaltung von fibrillärem Kollagen des Typs I, II und III an einer spezifischen Stelle, die $\frac{3}{4}$ von der Gesamtlänge der Polypeptidketten vom N-Terminus entfernt liegt (Gross 1974). Einst als exklusive Eigenschaft der Kollagenasen beschrieben, weisen auch noch zwei weitere MMPs, nämlich die MMP-2 und MMP-14 (MT1-MMP), eine kollagenolytische Aktivität auf. Diese MMPs wurden jedoch aufgrund ihrer strukturellen Merkmale anderen Gruppen zugeordnet.

Die Besonderheit des Substratspektrums der Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) liegt in deren proteolytischen Aktivität gegen Komponenten der Basalmembran, einschließlich Typ IV Kollagen und Laminin (Salo 1983, Giannelli 1997). Zudem gehören Elastin und denaturierte Kollagene (Gelatine) zu den durch Gelatinasen spaltbaren Komponenten der extrazellulären Matrix (Murphy 1989). MMP-2, jedoch nicht MMP-9, spaltet zudem fibrilläre Kollagene in gleicher Weise wie die Kollagenasen (Aimes 1995). Im Vergleich zur MMP-1 weist die MMP-2 eine wesentlich geringere kollagenolytische Aktivität auf. Infolge der Aktivierung von proMMP-2 durch die membranständige MT1-MMP trägt MMP-2 zur Kollagenolyse auf oder in unmittelbarer Nähe der Zelloberfläche bei.

Die Stromelysine und Matrilysine weisen das breiteste Substratspektrum aller MMPs auf. Es umfasst die meisten Proteine und Proteoglykane der extrazellulären Matrix ausgenommen des intakten fibrilliären Kollagens. Die membranständigen MT-MMPs, mit Ausnahme der MT4-MMP, wurden zunächst als Aktivatoren von proMMP-2 identifiziert. Zusätzlich zu dieser Eigenschaft spalten die MT-MMPs allerdings auch eine Reihe von extrazellulären Matrixmolekülen. Für die MT1-MMP konnte dabei eine kollagenolytische Aktivität bezüglich Typ I, II und III Kollagen aufgezeigt werden (Ohuchi 1997).

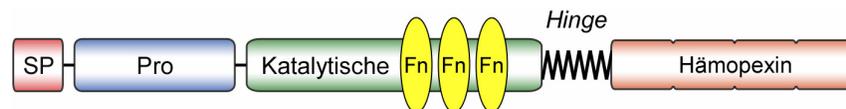


Abbildung 1.2. **Proteinstruktur der Gelatinasen (MMP-2, -9).**

SP: Signalpeptid, Pro: Propetid-Domäne, Fn: Fibronektin

Die Proteinstruktur der MMPs umfasst im Allgemeinen ein Signalpeptid, eine Propeptid-Domäne, eine katalytische Domäne, ein Verbindungspeptid (auch als „*hinge region*“ bezeichnet) und eine Hämopexin-ähnliche Domäne. Die N-terminale Propeptid-Domäne hält

das Zymogen (proMMP) in seinem latenten Zustand, indem der Cystein-Rest (Cys⁷³) einer hochkonservierten Aminosäuresequenz dieser Domäne mit dem Zn²⁺-Ion des katalytischen Zentrums interagiert (Windsor 1991).

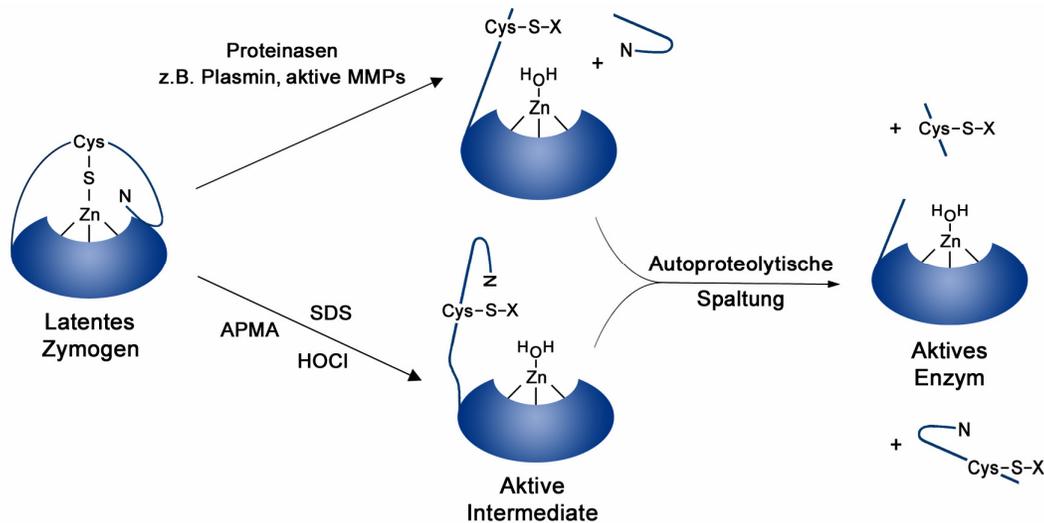


Abbildung 1.3. Aktivierung latenter proMMPs: Der *cysteine switch* Mechanismus (in Anlehnung an Chakraborti 2003).

Die Aktivierung des Zymogens geht mit der Dissoziation von Cys⁷³ vom katalytischen Zn²⁺-Ion einher und führt zur Freilegung des katalytischen Zentrums, ein Mechanismus, der als „*cysteine switch*“ bezeichnet wird (Abbildung 1.3.). Ausgelöst wird dieser Mechanismus durch eine schrittweise Spaltung der Propeptid-Domäne mittels Proteinasen wie Trypsin, Plasmin oder anderen aktiven MMPs. Zudem bewirken einige Chemikalien, zu denen Thiolgruppen-modifizierende Substanzen (4-Aminophenyl-Quecksilberacetat, hypochlorige Säure) oder Natriumdodecylsulfat zählen, dass die Cys⁷³-Zn²⁺-Interaktion aufgehoben wird. Beide Prozesse führen letztendlich zur autoproteolytischen Abspaltung der Propeptid-Domäne (Van Wart 1990, Springman 1990).

Die katalytische Domäne enthält die charakteristische Aminosäuresequenz HExxHxxGxxH (Zinkbindungsmotiv), wobei über die drei Histidine die Koordination des Zn²⁺-Ions im katalytischen Zentrum erfolgt (Visse 2003). Neben dem katalytischen Zinkion enthält die Domäne ein weiteres strukturelles Zinkion sowie zwei bis drei Calciumionen, welche für die Stabilität und Aufrechterhaltung der Aktivität des Enzyms notwendig sind (Nagase 1999). Im

Gegensatz zu anderen MMPs wird die katalytische Domäne der Gelatinasen durch drei sich wiederholende Fibronectin-Typ II-ähnliche Sequenzen unterbrochen (Abbildung 1.2.). Diese strukturelle Besonderheit der Gelatinasen steht im direkten Zusammenhang mit deren proteolytischer Aktivität gegen Elastin, Kollagen und denaturierte Kollagene (Murphy 1994, Shipley 1996). Über die prolinreiche „*hinge region*“ ist die katalytische Domäne mit der C-terminalen Hämopexin-ähnlichen Domäne verbunden, die mit Ausnahme von MMP-7 Bestandteil aller humanen MMPs ist. Dieser Domäne werden Funktionen hinsichtlich der Substraterkennung sowie der Interaktion von MMPs und TIMPs zugeschrieben (Bode 1999).

1.2.2. Regulation der MMP-Aktivität

Die Expression der meisten MMPs im Gewebe ist normalerweise gering und wird für den Fall einer erforderlichen Umstrukturierung der extrazellulären Matrix verstärkt bzw. hervorgerufen. Dabei unterliegt die Aktivität der MMPs aufgrund ihres potenten proteolytischen Potentials und breiten Substratspektrums komplexen Regulationsmechanismen, um einen überschießenden Abbau der extrazellulären Matrix zu vermeiden. Die Regulation erfolgt dabei auf mehreren Ebenen und umfasst neben der Gentranskription und Translation auch die posttranslationale Aktivierung latenter proMMPs sowie die Interaktion aktiver MMPs mit spezifischen, endogenen Inhibitoren (Abbildung 1.4.).

Die Regulation der Transkription spielt offenbar eine entscheidende Rolle, da die meisten MMP-Gene nur transkribiert werden, wenn Umstrukturierungsprozesse der extrazellulären Matrix stattfinden. Zudem konnten einige Polymorphismen in der Promotor-Region verschiedener MMP-Gene detektiert werden, welche zu einer verstärkten Transkription *in vitro* führen und mit interindividuellen Unterschieden hinsichtlich des Auftretens kardiovaskulärer Erkrankungen und Krebs in Verbindung gebracht werden (Ye 2000). In Abhängigkeit vom Zelltyp und der Beschaffenheit der Promotor-Region des jeweiligen MMP-Gens wird die Transkription durch vielfältige extrazelluläre Stimuli, z.B. verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Tumor-Promotoren, induziert. Zudem mehren sich Hinweise darauf, dass Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen bedeutende Induktoren der MMP-Genexpression darstellen (Guo 1997, Haas 1998, Sawicki 2005). Darüber hinaus kann eine Regulation posttranskriptionell über die Stabilität der mRNA erfolgen. So bewirkt

z.B. das Antibiotikum Doxycyclin eine verstärkte Degradation der Transkripte von MMP-2 in humanen VSMCs (Liu 2003).

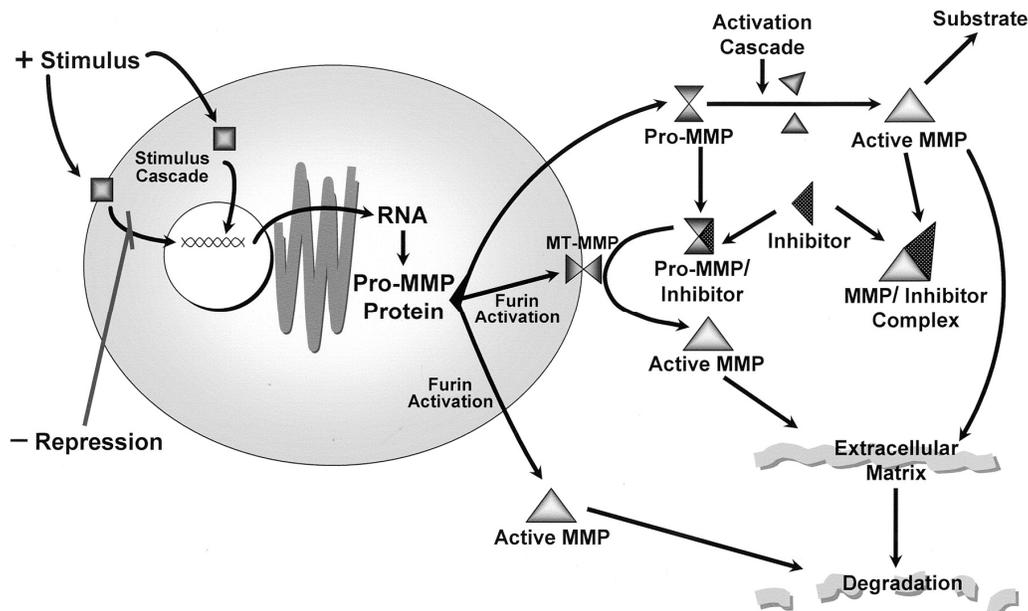


Abbildung 1.4. Regulationsmechanismen der MMP-Aktivität (aus Curry 2003).

MMPs werden von den Zellen grundsätzlich als inaktive proMMPs (Zymogene) synthetisiert. Die Aktivierung der proMMPs erfordert eine proteolytische Spaltung der Propeptid-Domäne (siehe Abschnitt 1.2.1.), womit dieser Schritt einen bedeutenden posttranslationalen Mechanismus der Regulation der MMP-Aktivität darstellt. Die meisten MMPs werden unmittelbar nach der Translation in ihrer inaktiven Form sezerniert und entweder an der Zellmembran oder im Extrazellulärraum aktiviert. Ausnahmen hiervon bilden die MMP-11 und die membranständigen MT-MMPs, welche bereits intrazellulär aktiviert werden. Verschiedene Proteinasen des Plasmas und des Gewebes sind an der extrazellulären Aktivierung beteiligt. So werden die proMMP1 und die proMMP-3 *in vitro* durch die Serin-Proteinase Plasmin prozessiert (He 1989, Ramos-DeSimone 1999). Darüber hinaus deuten Untersuchungen mit murinen *knock-out*-Modellen des Plasminogen/Plasmin-Systems darauf hin, dass Plasmin einen pathophysiologisch bedeutenden proMMP-Aktivator *in vivo* darstellt (Carmeliet 1997). Zudem fungieren MMPs auch selber als Aktivatoren. Beispiele hierfür sind die Aktivierung von proMMP-1 und proMMP-9 durch MMP-3 (Murphy 1987, Ogata 1992),

sowie die gut untersuchte Aktivierung von proMMP-2 durch die MT1-MMP unter Beteiligung von TIMP-2 auf der Zelloberfläche (Strongin 1995).

Neben der Regulation der Expression und Aktivierung der MMPs wird deren Aktivität im Extrazellularraum entscheidend durch MMP-Inhibitoren beeinflusst. Es werden zwei Klassen endogener MMP-Inhibitoren unterschieden: Die Plasma- α_2 -Makroglobuline, welche unspezifisch zahlreiche Endopeptidasen im Plasma und in Gewebsflüssigkeiten inhibieren, und die spezifischen Gewebehinhibitoren der MMPs, die als *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* (TIMPs) bezeichnet werden. Bei den TIMPs handelt es sich um Proteine mit einem Molekulargewicht von 21-29 kDa, die lokal im Gewebe gebildet werden und von denen bisher vier Formen (TIMP-1, -2, -3 und -4) in Wirbeltieren beschrieben worden sind (Visse 2003). TIMPs binden in einem molekularen Verhältnis von 1:1 kompetitiv an die katalytische Domäne aktiver MMPs und heben somit deren proteolytische Aktivität vollständig auf (Brew 2000). Das lokal gegebene quantitative Verhältnis von aktiven MMPs zu TIMPs bestimmt somit die Nettoaktivität der MMPs, welche die ausschlaggebende Determinante für die Degradation der extrazellulären Matrix darstellt (Knox 1997, Raffetto 2008).

Prinzipiell werden nahezu alle MMPs von den verschiedenen TIMPs inhibiert, gleichwohl wurde von einigen Unterschieden bezüglich der Bindungsaffinität einiger TIMPs zu bestimmten MMPs berichtet. So weist TIMP-2 eine hohe Affinität zu MMP-2 auf, indessen TIMP-1 bevorzugt an MMP-9 bindet (Olson 1997, O'Connell 1994). Zudem interagieren TIMPs mit den latenten proMMPs, dabei bindet TIMP-2 ebenso exklusiv an proMMP-2 wie TIMP-1 an proMMP-9. Diese proMMP-TIMP-Interaktionen werden mit einer Stabilisierung bzw. einer verminderten Aktivierbarkeit der proMMPs in Verbindung gebracht (Goldberg 1992, Fridman 1993).

1.2.3. Beteiligung der MMPs an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen

Die Umstrukturierung, d.h. der Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix stellt einen wesentlichen Prozess zahlreicher physiologischer Vorgänge dar. Dabei unterliegen die Synthese und der Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix, zu denen strukturelle

Proteine wie die Kollagene und das Elastin sowie verschiedene Glykoproteine und Proteoglykane zählen, einer strengen Kontrolle.

Zu den proteolytischen Enzymen, die am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind, zählen Cystein-Proteinasen und Aspartyl-Proteinasen, die vorwiegend an der intrazellulären (lysosomalen) Proteolyse beteiligt sind, sowie Serin-Proteinasen und MMPs (Skrzydłowska 2005). Dabei beteiligen sich die Proteinasen dieser Gruppen entweder direkt durch die Proteolyse von extrazellulären Matrixproteinen oder indirekt über die Aktivierung anderer Proteinasen, welche dann die extrazelluläre Matrix degradieren. Allgemein wird die Degradation der extrazellulären Matrix vor allem auf die proteolytische Aktivität von MMPs sowie Serin-Proteinasen, insbesondere Plasmin und den Plasminogen-Aktivatoren, zurückgeführt.

Bei physiologischen Prozessen wie Zellmigration, Gewebeneubildung und Wachstum, die mit einem Abbau der extrazellulären Matrix einhergehen, nehmen die MMPs eine zentrale Rolle ein. So ist die Funktion dieser Enzyme von wesentlicher Bedeutung für die Angiogenese (Burbridge 2002), Wundheilung (Pilcher 1999), Knochenentwicklung (Wucherpfennig 1994), Menstruation (Salamonsen 1996), Ovulation (Curry 1989) und embryonale Entwicklung (Werb 1998). Zugleich ist die Degradation der extrazellulären Matrix essentieller Bestandteil zahlreicher pathologischer Prozesse. So liegt diese dem Wachstum von Tumoren sowie der Metastasierung zugrunde. Zudem sind MMPs maßgeblich involviert in der mit der Invasion von Tumoren und Metastasen einhergehenden Degradation von Basalmembranen sowie in der im Rahmen der Pathogenese solider Tumore auftretenden tumorinduzierten Angiogenese (Liotta 1980, Stetler-Stevenson 1990, McCawley 2000). Weiterhin steht die proteolytische Degradation der extrazellulären Matrix durch MMPs im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen wie der Rheumatoiden Arthritis (Yoshihara 2000), Multiplen Sklerose (Maeda 1996) und Parodontitis (Reynolds 1994). Hinsichtlich vaskulärer Pathologien wird den MMPs eine bedeutende Rolle zugemessen bei der Arteriosklerose und diesbezüglich insbesondere bei der Destabilisierung arteriosklerotischer Plaques (Li 1996, Sukhova 1999), bei der Neointimaformation nach Angioplastien (Bendeck 1994) sowie bei der Entstehung von Varizen (Kowalewski 2004). Die Beteiligung der MMPs an der Aneurysmenformation wird im Folgenden erläutert.

1.2.4. Die besondere Rolle der MMP-2 und MMP-9 in der Pathogenese des abdominalen Aortenaneurysmas

In zahlreichen Studien konnte eine erhöhte Expression und Aktivität von MMPs sowohl bei in der Entstehung befindlichen als auch bei weit fortgeschrittenen humanen abdominalen Aortenaneurysmen festgestellt werden (Freestone 1995, Knox 1997, McMillan 1997a, Davis 1998, Kadoglou 2004). Zudem konnte anhand von Tiermodellen gezeigt werden, dass artifiziell induzierte Aortenaneurysmen mit einer erhöhten Expression von MMPs einhergehen (Petrinec 1996, Kaito 2003). Anhand der bisherigen Untersuchungen wurde eine Reihe von MMPs aus verschiedenen Gruppen der MMP-Enzymfamilie identifiziert, denen eine Beteiligung an der Aneurysmenformation zugesprochen wird. Zu diesen zählen die MMP-1, -2, -3, -8, -9, -10, -12 und -13. Dabei wird den beiden MMPs aus der Gruppe der Gelatinasen, MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B), eine besondere Rolle in der Pathogenese von Aneurysmen beigemessen.

Longo *et al.* (2002) unterzogen Mäuse mit einem MMP-9-*knock-out* bzw. einem MMP-2-*knock-out* einer Behandlung zur Induktion abdominalen Aortenaneurysmen. Im Gegensatz zum Wild-Typ führte die Behandlung weder in den MMP-2-*knock-out*- noch in den MMP-9-*knock-out*-Mäusen zur Aneurysmenformation. Jedoch konnte diese interessanterweise nach einer zuvor durchgeführten Infusion mit kompetenten Makrophagen in den MMP-9-*knock-out*-, aber nicht in MMP-2-*knock-out*-Mäusen hervorgerufen werden. Die Ergebnisse dieser Studie führten die Autoren zu der Annahme, dass das Zusammenwirken beider MMPs für die Entstehung abdominalen Aortenaneurysmen notwendig ist.

Hinsichtlich ihrer Substratspezifität weisen die Gelatinasen gegenüber anderen MMPs die Besonderheit einer hohen proteolytischen Aktivität gegen Elastin auf. Diese Eigenschaft ist bei der MMP-2 stärker ausgeprägt als bei der MMP-9 (Senior 1991, Murphy 1991). Das Strukturprotein Elastin ist eine der biochemisch stabilsten Komponenten der extrazellulären Matrix und unterliegt daher nur einem geringen Metabolismus im adulten Gewebe (Rosenbloom 1993). Die Degradation von Elastinfasern zählt zu den ersten histologisch beobachtbaren Ereignissen in der Entstehung von Aortenaneurysmen. Neben den Auswirkungen des Elastinabbaus auf die Integrität der Aortenwand (siehe Abschnitt 1.1.) gelten zudem die dadurch freigesetzten Elastinfragmente als potente Chemotaxine (Hance 2002), die mit der Rekrutierung von mononukleären Zellen in die Aortenwand und daher mit der Inflammation des Gewebes in Verbindung gebracht werden (Satta 1998).

Thompson und Cockerill (2006) formulierten die These, dass die initiale Elastolyse durch MMP-2 vermittelt wird und somit dieser Proteinase eine Schlüsselrolle in der frühen Phase der Entstehung von Aortenaneurysmen zukommen könnte. Gestützt wird diese These durch die Studie von Freestone *et al.* (1995), in der Biopsien von kleinen (4,0 - 5,5 cm im Durchmesser) und großen (> 5,5 cm) humanen abdominalen Aortenaneurysmen vergleichend untersucht wurden. Anhand dieser Studie konnte gezeigt werden, dass MMP-2 die vorherrschende Gelatinase in kleinen Aneurysmen darstellt, wohingegen MMP-9 vorwiegend in großen Aneurysmen dominiert.

Das Ausmaß der MMP-9-mRNA-Expression in Aneurysmen ist beträchtlich und übersteigt bei weitem die relative Zunahme der mRNA anderer MMPs (Tamarina 1997). Die Rolle der MMP-9 wird zudem durch deren starke Präsenz in abdominalen Aortenaneurysmen mit einem Durchmesser von 5-7 cm verdeutlicht, aufgrund dessen die Aktivität dieser Gelatinase mit der zunehmenden Geschwindigkeit der Dilatation des Gewebes, im Zusammenspiel mit hämodynamischen Faktoren, in Verbindung gebracht wird (McMillan 1997a, Petersen 2002). Darüber hinaus konnten bei der Untersuchung eingerissener Aneurysmen besonders hohe MMP-9-Konzentrationen an der Stelle der Ruptur nachgewiesen werden (Wilson 2006).

1.3. Glatte Gefäßmuskelzellen

Die Gefäßwand der Aorta lässt sich histologisch in drei Schichten differenzieren, die als *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia* bezeichnet werden. Die wesentlichen Zelltypen der Aorta repräsentieren die Endothelzellen, die glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs; *vascular smooth muscle cells*) und Fibroblasten. Endothelzellen bilden zur Lumenseite die abschließende Zellschicht der *Tunica intima* und der Gefäße der *Vasa vasora*. Fibroblasten sind überwiegend in der *Tunica adventitia* vorzufinden. Dahingegen treten die VSMCs prinzipiell in allen drei Schichten auf, jedoch hauptsächlich in der breiten *Tunica media*. In dieser zeigen die glatten Muskelzellen eine spiralförmige Anordnung in konzentrisch um das Gefäßlumen aufeinander folgenden Schichten. Zwischen den Schichten befinden sich elastische Fasern, die größtenteils zu einer gefensterten Schicht verdichtet sind (elastische Lamelle). Die adulte Aorta des Menschen enthält ca. 70 solcher Schichten von elastischen Lamellen und glatten Muskelzellen (Junqueira 2001), die wesentlich zur

Elastizität der Gefäßwand beitragen. Während die glatten Muskelzellen in den distal gelegenen Arterien vom muskulären Typ durch Kontraktion die Lumenweite und somit den arteriellen Blutdruck bestimmen, besteht die Funktion dieser Zellen in den herznahen Arterien vom elastischen Typ (Aorta) weniger in der Veränderung der Lumenweite, als vielmehr in der Beeinflussung des passiven Dehnungswiderstandes dieser Gefäße. Die spindelförmigen VSMCs enthalten als kontraktile Elemente Myosin- und Aktinfilamente, die das Zytoplasma in Längsrichtung der Zelle durchziehen. Im Unterschied zu den Myofibrillen der quergestreiften Muskulatur sind diese jedoch nicht parallel, sondern in Form einer Scherengitterstruktur angeordnet, was u.a. die große Dehnbarkeit glatter Muskelzellen ermöglicht.

Hinsichtlich des Phänotyps der VSMCs *in vivo* wie auch in der Zellkultur lässt sich zwischen einem differenzierten „kontraktilen“ und einem weniger differenzierten „sekretorischen“ Phänotyp unterscheiden. Differenzierte VSMCs des kontraktilen Phänotyps zeichnen sich morphologisch dadurch aus, dass 75-80 % des Zytoplasmas durch kontraktile Filamente in Anspruch genommen wird (Manderson 1989). Darüber hinaus weisen diese Zellen eine äußerst niedrige Proliferationsrate auf und synthetisieren nur geringe Mengen an Matrixproteinen (Owens 1995, Ang 1990). Die Hauptfunktion der differenzierten VSMCs besteht in der Kontraktion.

Außergewöhnlich ist die Fähigkeit selbst adulter VSMCs, diesen differenzierten Phänotyp in Reaktion auf Veränderungen der äußeren Einflüsse zugunsten des sekretorischen Phänotyps zu ändern. Eine solche Modulation vom kontraktilen zum sekretorischen Phänotyp ist für primäre VSMCs in der Zellkultur beschrieben, die mit einer starken Zunahme der Anzahl synthetisierender Organellen sowie einer erhöhten Expression von Matrixproteinen einhergeht (Chamley-Campbell 1979, Ang 1990). Zudem nimmt die Expression struktureller Proteine wie α -Aktin und *smooth muscle myosin heavy chain* ab, insgesamt kommt es zum Verlust kontraktiler Filamente (Worth 2001). Dabei scheint die Veränderung des Phänotyps bei kultivierten VSMCs von der Zelldichte und den Wachstumsbedingungen beeinflusst zu werden und eine gewisse Re-Differenzierung der Zellen mit dem Entzug von Wachstumsfaktoren und zunehmender Konfluenz aufzutreten (Campbell 1989, Owens 1986). Der sekretorische Phänotyp liegt der Migration und Proliferation der Zellen zugrunde. Er tritt vermehrt bei vaskulären Pathologien wie mechanischen oder arteriosklerotisch bedingten Läsionen der Gefäßwand auf (Glukhova 1988). Zudem existieren Hinweise auf eine Zunahme

von VSMCs des sekretorischen Phänotyps im Rahmen der Aneurysmenformation, wobei die phänotypische Modulation der Zellen zudem mit einer verstärkten Expression von MMPs in den untersuchten Geweben in Verbindung gebracht wurde (Kamijima 1999, Lesauskaite 2001).

Der Stellenwert der VSMCs für die strukturelle Integrität der Aortenwand lässt sich anhand folgender physiologischer bzw. pathophysiologischer Gesichtspunkte verdeutlichen.

(1) Zusammen mit den Fibroblasten bilden die glatten Muskelzellen den zellulären Hauptbestandteil der Aorta und repräsentieren den vorherrschenden Zelltyp in der *Tunica media* (Rodin 1980).

(2) Der Großteil der extrazellulären Matrix wird von VSMCs gebildet, dabei synthetisieren diese Zellen wichtige Matrixproteine wie Kollagene, Elastin und Proteoglykane (Snider 1981, Faris 1976). Darüber hinaus sezernieren diese Zellen sowohl MMPs wie auch TIMPs und nehmen somit an der Regulation der lokalen Aktivität von MMPs teil. Anhand von histologischen Untersuchungen des Aortengewebes konnte die Expression von MMP-2, MT1-MMP sowie von TIMP-1 und TIMP-2 durch VSMCs *in situ* demonstriert werden (McMillan 1995a, Crowther 2000a). Zudem ist die Expression von MMP-1, MMP-3 und MMP-9 in diesen Zellen durch Zytokine *in vitro* induzierbar (Galis 1994). Somit nehmen VSMCs insgesamt einen entscheidenden Einfluss auf die lokale Homöostase der extrazellulären Matrix.

(3) Mittels *in situ*-Hybridisationsstudien konnte gezeigt werden, dass die Expression von MMP-2 durch VSMCs im abdominalen Aortenaneurysma signifikant erhöht ist (McMillan 1995a). Zudem weisen aus der aneurysmatisch veränderten Aorta isolierte VSMCs *in vitro* einen hohen basalen MMP-2-Expressionslevel auf (Crowther 2000b). Wie bereits erwähnt, wird die elastolytische Aktivität der MMP-2 mit der Degradation der elastischen Lamellen in der frühen Phase der Entstehung abdominaler Aortenaneurysmen in Verbindung gebracht (siehe Abschnitt 1.2.4.). Da sich die VSMCs in der Aortenwand in direkter Nähe zu den elastischen Lamellen befinden könnten diese Zellen an der Degradation der elastischen Lamellen entscheidend beteiligt sein, ein Prozess, der mit einem erheblichen Verlust der strukturellen Integrität der Aortenwand verbunden ist.

1.4. Kininogene

1.4.1. Das Kallikrein-Kinin-System

Das Kallikrein-Kinin-System (KKS) umfasst die Kininogene, die enzymatisch aktiven Kallikreine sowie die Kinine und deren Rezeptoren. Historisch gesehen geht die Entdeckung des KKS auf die von Abelous und Bardier (1909) gemachte Beobachtung zurück, dass die intravenöse Applikation einer alkoholunlöslichen Fraktion des Urins einen vorübergehenden Blutdruckabfall bewirkt. Zunächst wurde diese Wirkung auf eine aus dem Urin isolierte Substanz zurückgeführt, die zudem in hohen Konzentrationen im Pankreas vorkommt und daher in Anlehnung an die griechische Bezeichnung für das Pankreas als „Kallikrein“ bezeichnet wurde. Heute ist bekannt, dass es sich bei den Kallikreinen um Enzyme aus der Gruppe der Serin-Proteinasen handelt. Diese spalten spezifisch Kininogene, infolgedessen die vasodilatatorisch wirkenden Kinine freigesetzt werden, welche für den beobachteten hypotensiven Effekt verantwortlich sind. Das im Blutplasma vorhandene Kallikrein wird von der Leber synthetisiert und als Prekallikrein in die Zirkulation sezerniert. Daneben wird Kallikrein auch lokal von verschiedenen Geweben, z.B. Blutgefäßen, gebildet (Blais 2000). Dieses wird als Gewebe- bzw. glanduläres Kallikrein bezeichnet. Analog hierzu wird zwischen einem Plasma-KKS und verschiedenen lokalen KKS differenziert.

Bezüglich des Menschen und der meisten Säuger bezieht sich der Terminus „Kinine“ auf das Nonapeptid Bradykinin, das Dekapeptid Kallidin (Lys-Bradykinin) sowie deren des-Arg-Metaboliten. In der Ratte liegt von diesen Kininen das Bradykinin und darüber hinaus das T-Kinin (Ile-Ser-Bradykinin) vor, welches proteolytisch, jedoch nicht durch Kallikrein, aus den einzig in der Ratte vorkommenden T-Kininogenen freigesetzt wird (Kato 1985, Okamoto 1986). Kinine fungieren als Liganden an den Bradykininrezeptoren (B1 und B2) und sind an diversen (patho-) physiologischen Prozessen beteiligt. In der Gefäßwand bewirkt Bradykinin über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Endothelium eine Relaxation der VSMCs. Zudem übt Bradykinin direkte Effekte auf isolierte VSMCs aus, die teilweise den durch NO vermittelten Wirkungen entgegenstehen. So löst die Bindung von Bradykinin an den B2-Rezeptor eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung aus (Dixon 1990). Darüber hinaus stimuliert Bradykinin über eine vom B2-Rezeptor ausgehende Signaltransduktion die Proliferation von VSMCs (Yang 2005).

1.4.2. Hoch- und niedermolekulares Kininogen

Als Kininogene werden endogene Proteine bezeichnet, aus denen durch Proteinasen die Kinine freigesetzt werden. Zwei Formen von Kininogenen sind beschrieben, das hochmolekulare Kininogen und das niedermolekulare Kininogen.

Hochmolekulares Kininogen (HK), ein α -Globulin, zirkuliert im humanen Plasma als 120 kDa Glykoprotein in einer Konzentration von $\sim 90 \mu\text{g/ml}$ (750 nM) (Proud 1980). Das aus sechs Domänen bestehende Protein lässt sich in eine schwere Kette mit den Domänen 1 bis 3 und eine leichte Kette mit den Domänen 5 und 6 aufgliedern. Die schwere Kette und die leichte Kette sind über die Domäne 4 miteinander verbunden, welche die Bradykininsequenz enthält (Abbildung 1.5.).

Niedermolekulares Kininogen (NK) ist ein β -Globulin mit einem Molekulargewicht von 68 kDa und einer Plasmakonzentration von $\sim 170 \mu\text{g/ml}$ (Adam 1985). Beide Kininogene werden von demselben Gen kodiert, durch alternatives Spleißen gehen aus einem gemeinsamen Primärtranskript zwei distinkte mRNAs hervor. Die Aminosäuresequenz beider Kininogene ist N-terminal mit der schweren Kette, der Bradykininsequenz sowie den darauf folgenden 12 Aminosäuren identisch. C-terminal bestehen Unterschiede in der leichten Kette, die beim HK die Domänen 5 und 6 umfasst und ein Molekulargewicht von 56 kDa aufweist, im Vergleich zu der wesentlich kürzeren leichten Kette des NK mit 4 kDa.

Beide, HK und NK, stellen Substrate für die proteolytische Freisetzung von Bradykinin und Lys-Bradykinin durch Plasma- bzw. Gewebe-Kallikrein dar. Die Kininogene werden hauptsächlich von der Leber gebildet und in die Blutzirkulation abgegeben. Daneben erfolgt deren Synthese auch lokal in extrahepatischen Geweben, z.B. Lunge und Niere, wobei in der relativen Expression des HK zu der des NK gewebespezifische Unterschiede bestehen (Takano 2000). Zudem existieren in der Literatur Hinweise darauf, dass HK in der Gefäßwand lokal gebildet wird (Nolly 1998, Schmaier 1988). Bezüglich der Fragestellung, inwieweit in der Aorta eine lokale Synthese des HK vorliegt bzw. diese in VSMCs erfolgt, lassen die bisher publizierten Studien jedoch keine eindeutige Aussage zu. So weisen Untersuchungen zur Expression des HK in VSMCs, die aus der Aorta der Ratte isoliert wurden, widersprüchliche Ergebnisse auf (Okamoto 1998, Oza 1990).

1.4.3. Gespaltenes hochmolekulares Kininogen

Der nach der Spaltung des hochmolekularen Kininogens und Freisetzung von Bradykinin verbleibende Teil des Moleküls wird als gespaltenes hochmolekulares Kininogen (gespaltenes HK) bezeichnet. Wie in Abbildung 1.5. dargestellt, besteht gespaltenes HK aus zwei Ketten, einer schweren Kette (62 kDa) mit den Domänen 1-3 und einer leichten Kette (56 kDa) mit den Domänen 5 und 6. Beide Ketten sind über eine einzige Disulfidbrücke miteinander verbunden (Mori 1981). Das gespaltenes HK wird daher auch als zweikettiges HK oder Kinin-freies HK bezeichnet.

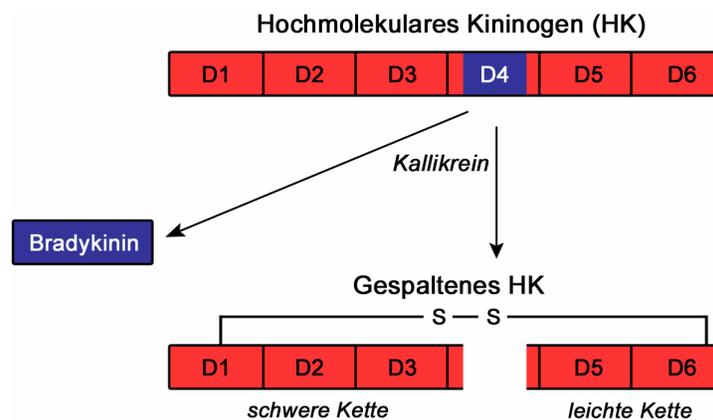


Abbildung 1.5. Spaltung des hochmolekularen Kininogens.

Während Bradykinin und dessen Effekte umfassend erforscht worden sind, ist das gespaltenes HK erst seit kurzem in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt. In der Studie von Zhang *et al.* (2000) konnte gezeigt werden, dass gespaltenes HK die Proliferation von Endothelzellen inhibiert und dabei selektiv in proliferierenden Zellen Apoptose induziert. Sowohl in dieser Studie als auch in den Untersuchungen von Colman *et al.* (2000) erwies sich gespaltenes HK zudem als potenter Inhibitor der Angiogenese in jeweils verschiedenen *in vivo*-Modellen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Umwandlung vom HK zum gespaltenen HK mit einer drastischen Veränderung der Konformation und Neuordnung der Domänen einhergeht (Weisel 1994). Zudem erlangt das gespaltenes HK infolge der Umwandlung neue Eigenschaften. So konnten in den oben genannten Studien die

anti-proliferativen und anti-angiogenen Effekte zwar durch gespaltenes HK, jedoch nicht durch HK hervorgerufen werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass diese Effekte weitestgehend über die Domäne 5 vermittelt werden, die infolge der Neuausrichtung der Domänen im gespaltenen HK stärker exponiert ist. Während HK im normalen humanen Plasma überwiegend in seiner ungespaltenen Form vorliegt, nimmt der Anteil des gespaltenen HK unter pathologischen Umständen, z.B. bei der Rheumatoiden Arthritis (Sharma 1980), dem chirurgischen Trauma (Karlsrud 1996) und dem hereditärem Angioödem (Berrettini 1986) deutlich zu.

1.5. Kininogen-defiziente Brown-Norway-Katholiek-Ratten

Im Jahre 1979 wurden Mutanten des Rattenstammes Brown Norway (BN) mit einem erblich bedingten Mangel an hoch- und niedermolekularem Kininogen im Plasma entdeckt (Damas 1979). Diese Mutanten wurden anscheinend zufällig aus einer Population von BN-Ratten in der Zuchteinrichtung der katholischen Universität Leuven, Belgien selektiert. Dem hieraus hervorgegangen Rattenstamm wurde daher der Name Brown Norway Katholiek (BN/Ka) verliehen. Das Plasma der Kininogen-defizienten BN/Ka-Ratten enthält in etwa nur 3% HK und 3-6% NK der normalen Menge des jeweiligen Kininogens im Plasma von BN-Ratten (Oh-ishi 1992, Liu 2000).

Hayashi *et al.* (1989) haben festgestellt, dass dem Mangel an Kininogenen im Plasma von BN/Ka-Ratten ein Sekretionsdefizit der Leber zugrunde liegt, obgleich funktional aktives HK in der Leber nachgewiesen werden konnte. Anhand kultivierter primärer Hepatozyten der Stämme BN und BN/Ka wurde dieses Phänomen genauer untersucht. Mittels Inkorporation von [³⁵S]-Methionin konnte in den Zellen beider Gruppen eine *de novo*-Synthese des hoch- und niedermolekularen Kininogens demonstriert werden. Während die [³⁵S]-markierten Kininogene bereits nach kurzer Zeit im Kulturmedium der BN-Hepatozyten detektiert werden konnten, erfolgte durch die BN/Ka-Hepatozyten nur eine äußerst geringe Sekretion. Zudem konnte gezeigt werden, dass die in den BN/Ka-Hepatozyten detektierten Kininogene intrazellulär in lysosomalen Kompartimenten akkumulieren (Hayashi 1993a). Die Sequenzanalyse klonierter cDNA des HK zeigte eine Punktmutation im Nukleotid 487

(Adenin anstelle von Guanin) in der BN/Ka-cDNA auf, welche zum Austausch der Aminosäure an Position 163 von Alanin zu Threonin in der schweren Kette des hoch- und niedermolekularen Kininogens führt. In Transfektionsexperimenten mit entsprechenden cDNA-Fragmenten konnte gezeigt werden, dass diese Punktmutation die Ursache der mangelhaften Sekretion der Kininogene darstellt (Hayashi 1993b).

BN/Ka-Ratten stellen ein ideales und in seiner Form einzigartiges Modell zur Erforschung der pathophysiologischen Bedeutung der Kininogene bzw. des Kallikrein-Kinin-Systems dar. So wurde unter Verwendung dieses Modells u.a. gezeigt, dass die Kininogen-Defizienz verbunden ist mit einem erhöhten Thromboserisiko (Colman 1999), einer ausgeprägten hypertensiven Reaktion auf niedrigdosiertes Angiotensin II (Majima 1994), einer verminderten Angiogenese (Hayashi 2002) sowie einer abgeschwächten Reaktion auf inflammatorische Stimuli (Sainz 2005).

In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe (Kaschina 2004) konnte eine hohe Anfälligkeit der BN/Ka-Ratten für die Entstehung abdominaler Aortenaneurysmen aufgezeigt werden. Für diese Untersuchung wurden Ratten der Stämme BN/Ka, BN und Wistar (Alter 10 Wochen) auf eine atherogene Diät (hoher Fett- und Cholesterolanteil) gesetzt. Nach 12 Wochen traten in der BN/Ka-Gruppe abdominale Aortenaneurysmen mit einer Inzidenz von 100% (20/20) auf. Demgegenüber lag die Inzidenz in der BN-Gruppe bei 55% (11/20) und in der Wistar-Gruppe bei 0% (0/20). Bei der anschließenden Untersuchung der Aneurysmen konnten charakteristische Merkmale der Pathogenese abdominaler Aortenaneurysmen wie degradierte elastische Lamellen, ein erhöhtes Kollagen/Elastin-Verhältnis, Apoptose medialer und adventitialer Zellen sowie eine signifikant erhöhte Expression von MMPs aufgezeigt werden.

1.6. Hypothese und Zielsetzung

Wie eingangs beschrieben, stellt der Abbau der extrazellulären Matrix einen wesentlichen Prozess in der Pathogenese von Aneurysmen dar. Zudem wird der Degradation elastischer Lamellen eine große Bedeutung hinsichtlich der Entstehung abdominaler Aortenaneurysmen beigemessen. An diesen Prozessen sind MMPs entscheidend beteiligt, deren erhöhte

Expression und Aktivität in der Aneurysmenformation durch zahlreiche Studien belegt ist. Aufgrund der Prädisposition von Kininogen-defizienten BN/Ka-Ratten für die Entwicklung abdominaler Aortenaneurysmen, die mit der Degradation elastischer Lamellen und einer erhöhten Expression von MMPs einhergeht, konnte erstmals eine Verbindung zwischen den Kininogenen und MMPs aufgezeigt werden. Hieraus leitet sich die Hypothese ab, dass der Kininogen-Mangel zu einer erhöhten Expression und Aktivität von MMPs in der Aortenwand führt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit gespaltenes HK auf die Regulation von MMPs in primären, aus der Aorta von Ratten gewonnenen VSMCs Einfluss nimmt. Hierfür sollten Effekte von gespaltenem HK auf die Expression von MMPs auf der mRNA-Ebene sowie auf der Ebene der Freisetzung durch die Zellen untersucht werden. Als weiterer Faktor der MMP-Regulation sollte zudem die Expression von TIMPs analysiert und die damit im Zusammenhang stehende Nettoaktivität der MMPs bestimmt werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, mittels qualitativer Gen- und Proteinexpressionsstudien die Frage zu klären, inwieweit das hochmolekulare Kininogen *in vitro* von kultivierten VSMCs gebildet wird bzw. dieses *in situ* im Aortengewebe vorhanden ist.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller (Ort, Land)
Acryl-/Bisacrylamid-Lösung	Serva (Heidelberg, D)
Agarose	Serva (Heidelberg, D)
4-Aminophenyl-Quecksilberacetat (APMA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Borsäure	Merck (Darmstadt, D)
Brij [®] -35	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck (Darmstadt, D)
Chloroform	Merck (Darmstadt, D)
Complete Mini (Proteinaseinhibitor-Cocktail)	Roche (Mannheim, D)
Coomassie Brilliant Blau G-250	Ferak (Berlin, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Essigsäure	Merck (Darmstadt, D)
Ethanol	Merck (Darmstadt, D)
Ethidiumbromid (1% m/v)	Roth (Karlsruhe, D)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Fluoreszenz-Eindeckmittel	Dako (Glostrup, DK)
Gelatine, Typ A, Schweinehaut	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Glycerol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Glycin	Serva (Heidelberg, D)
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, D)

β-Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg, D)
Methanol	Merck (Darmstadt, D)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg, D)
Nonidet P40	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Ponceau-S-Lösung	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Salzsäure (37%ig) (HCl)	Merck (Darmstadt, D)
TEMED	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Tris-Base	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Tris-HCl	Serva (Heidelberg, D)
Triton-X-100	Ferak (Berlin, D)
Trockenmilchpulver	Roth (Karlsruhe, D)
Tween 20	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)

2.1.2. Nährmedium, Zusätze und Substanzen für die Zellkultur

Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM, mit 4,5 g/l Glucose; 0,58 g/l L-Glutamin; 3,7 g/l NaHCO ₃)	PAN (Aidenbach, D)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Fötales bovines Serum (FBS)	HyClone (Logan, USA)
Gentamycinsulfat-Lösung	PAN (Aidenbach, D)
Hank's Salzlösung (HBSS)	PAA (Cölbe, D)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAN (Aidenbach, D)
Trypsin/ EDTA-Lösung	PAN (Aidenbach, D)
Actinomycin D	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Interleukin-1α (IL-1α)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
Gespaltenes hochmolekulares Kininogen	Enzyme Research Laboratories (Swansea, UK)
Tumor-Nekrose-Faktor-α	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)

2.1.3. Reagenzien für die Proteinanalytik

BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce (Rockford, USA)
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham (Little Chalfont, UK)
EnzChek® Gelatinase/Collagenase Assay Kit	Molecular Probes (Leiden, NL)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas (St.Leon-Rot, D)

2.1.4. Antikörper

Bezeichnung	Typ	Wirt	Produktnummer	Hersteller
anti- α -Aktin	monoklonal	Maus	MAB1522	Chemicon (Temecula, USA)
anti-GAPDH	monoklonal	Maus	MAB374	Chemicon (Temecula, USA)
anti-Kininogen HC	polyklonal	Kaninchen	sc-25799	Santa Cruz (Heidelberg, D)
anti-MMP-2	monoklonal	Maus	MAB3308	Chemicon (Temecula, USA)
anti-Kaninchen Ig, HRP-konjugiert	polyklonal	Schwein	P0217	Dako (Glostrup, DK)
anti-Maus Ig, HRP-konjugiert	polyklonal	Kaninchen	P0260	Dako (Glostrup, DK)
anti-Maus IgG, Cyanin-3-konjugiert	polyklonal	Esel	715-165-150	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)

2.1.5. Reagenzien für die Nukleinsäureanalytik

Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Promega (Mannheim, D)
DNA Probenpuffer (6x)	Fermentas (St.Leon-Rot, D)
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas (St.Leon-Rot, D)
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas (St.Leon-Rot, D)
M-MLV Puffer (5x)	Promega (Mannheim, D)
M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H minus	Promega (Mannheim, D)
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel (Düren, D)
Random Primer	Promega (Mannheim, D)
RNasin® Ribonuklease Inhibitor	Promega (Mannheim, D)
ROX	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
RQ1 DNase 10x Puffer	Promega (Mannheim, D)
RQ1 DNase Stopplösung	Promega (Mannheim, D)
RQ1 RNase-freie DNase	Promega (Mannheim, D)
SYBR Green I	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D)
SYBR Green Mastermix (2x)	eigene Herstellung
Taq-Polymerase	PAN (Aidenbach, D)
TRIzol®	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Wasser, ultra-pure (u.p. H ₂ O), RNase-/ DNase-frei	Invitrogen (Karlsruhe, D)

Tabelle 2.1. Zusammensetzung des SYBR Green Mastermixes (2x).

Komponente	Endkonzentration	
KCl	100	mM
Mg ²⁺	13	mM
dNTP Mix	0,4	mM
SYBR Green I	0,02%	(v/v)
DMSO	4%	(v/v)
NP 40	0,01%	(v/v)
Tween 20	0,031%	(v/v)
ROX	2%	(v/v)

2.1.6. Primer

Die im Rahmen der *real-time* und *nested* PCR verwendeten Primer wurden mit dem Programm Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, USA) entworfen. Hierfür wurde die jeweilige Zielsequenz aus den Datenbanken NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) oder Ensembl (<http://www.ensembl.org>) bezogen und in das Programm eingefügt. Die Auswahl der Primer erfolgte anhand von Parametern betreffend Schmelztemperatur, G+C-Anteil, Wahrscheinlichkeit von Sekundärstrukturen, Primerlänge sowie Länge des Amplifikates. Bevorzugt wurden solche Primerpaare ausgewählt, welche Exon-Exon-Grenzen überspannen. Zur Überprüfung der Spezifität wurden die Primersequenzen gegen das gesamte Rattengenom geblastet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) und die Primer hinsichtlich der Entstehung unerwünschter Amplifikate im Rahmen der PCR getestet. Die Primer wurden von der Firma Operon (Köln, D) synthetisiert.

Tabelle 2.2. Sequenzen der für die *real-time* und *nested* PCR verwendeten Primer
(For: *Forward*, Rev: *Reverse*).

	Zielsequenz	Primersequenzen (5'-3')	Amplifikat Länge [Bp]
MMP-2	NM_031054.1	For: GACGCTGGGAGCATGGAG Rev: TTACGCGGACCACTTGTCC	113
MMP-9	NM_031055	For: CTTCTCTGGGCGCAAATG Rev: CCGGTGACCAGGGTTACCT	102
TIMP-1	NM_053819.1	For: GTGCACAGTGTTTCCCTGTT Rev: CTGGTAGCCCTTCTCAGAGC	103
TIMP-2	NM_021989.2	For: CGAATTTATCTACACGGCCCC Rev: CCGCCTTCCCTGCAATTAG	92
HK (außen)	NM_012741	For: CTTGAACCCTCCCCTAGCTC Rev: CCAGGACACTTGTGGGAAGT	204

HK (innen)	NM_012741	For: TATGACACGGAGACCCATGA Rev: TGGGAAGTTGCTTCTGGAAA	101
18S rRNA	X01117.1	For: CCGCAGCTAGGAATAATGGAATA Rev: TCTAGCGGCGCAATACGAAT	108

2.1.7. Puffer und Lösungen

Die nachfolgend aufgeführten Puffer und Lösungen wurden für die SDS- und Agarose-Gelelektrophorese, Zymographie und das Western Blotting verwendet. Für ihre Herstellung kam ausschließlich destilliertes Wasser zur Anwendung.

Tabelle 2.3. Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue G-250 0,5% (m/v) Methanol 30% (v/v) • Essigsäure 10% (v/v)
Entfärbelösung	Methanol 30% (v/v) • Essigsäure 10% (v/v)
Enzypuffer	Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) • NaCl 20 mM • CaCl ₂ 5 mM Brij [®] -35 0,02% (m/v)
Milchpulverlösung	Trockenmilchpulver 5% (m/v) • TBST-Puffer
Probenpuffer (4x), reduzierend	Tris-HCl 0,5 mM (pH 6,8) • β -Mercaptoethanol 8% (v/v) SDS 8% (m/v) • Glycerol 40% (v/v) Bromphenolblau 0,1% (m/v)
Probenpuffer (5x), nicht-reduzierend	Tris-HCl 400 mM (pH 6,8) • SDS 5% (m/v) Glycerol 20% (v/v) • Bromphenolblau 0,1% (m/v)

Protein-Lyse-Puffer	Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) • NaCl 150 mM • EDTA 1 mM Nonidet P40 1% (v/v) • Glycerol 15% (v/v) • 1 Tablette Complete Mini (Proteinaseinhibitor-Cocktail) auf 10 ml
Sammelgelpuffer (4x)	Tris-Base 0,5 M • HCl (pH 6,8)
SDS- Elektrophoresepuffer	Tris-Base 25 mM (pH 8,3) • Glycin 192 mM SDS 0,1% (m/v)
Stripping-Puffer	Glycin 100 mM • HCl (pH 2,8 ± 0,2)
TAE-Puffer	Tris-Acetat 40 mM (pH 8,0) • EDTA 1 mM
TBE-Puffer	Tris-Borat 45 mM (pH 8,0) • EDTA 1 mM
TBST-Puffer	Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) • NaCl 140 mM Tween 20 0,1% (v/v)
Towbin-Puffer	Tris-Base 25 mM (pH 8,3) • Glycin 192 mM Methanol 20% (v/v) • SDS 0,05% (m/v)
Trenngelpuffer (4x)	Tris-Base 1,5 M • HCl (pH 8,8)

2.1.8. Ausgewählte Materialien

Materialien für die Zellkultur

CryoTube™ Kryoröhrchen	Nunc (Roskilde, DK)
Einmal-Pipetten	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Lab-Tek ChamberSlides	Nunc (Roskilde, DK)
Primaria® 60 mm Kulturschalen	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Spritzen-Filter FP 30/0,2	Whatman (Dassel, D)
Zellkulturflaschen (25,75,175 cm ²)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Zellkulturplatten (6,12,24 Vertiefungen)	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, D)

Materialien für die Proteinanalytik

Hyperfilm ECL®	GE Healthcare (Freiburg, D)
Optiwell™ Mikrotiterplatten	PerkinElmer (Monza, IT)
Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen	Millipore (Schwalbach, D)

Materialien für die Nukleinsäureanalytik

Biosphere® Filterspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Biosphere® MicroTubes	Sarstedt (Nümbrecht, D)
96-well Multiply® PCR-Platten	Sarstedt (Nümbrecht, D)

Verwendete Tiere

Wistar-Ratten	Harlan Winkelmann (Borchen, D)
Brown-Norway-Ratten	Harlan Winkelmann (Borchen, D)
Brown-Norway-Katholiek-Ratten	eigene Zucht

2.1.9. Geräte**Geräte, allgemein:**

Mikrowaage SE2	Sartorius (Göttingen, D)
pH-Meter pH 340	WTW (Weilheim, D)
Präzisionswaage BL 150 S	Sartorius (Göttingen, D)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge Micro 20	Hettich (Tuttlingen, D)

Geräte für die Zellkultur:

Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRE2	Leica (Wetzlar, D)
Inkubator Heracell 150	Kendro (Langenselbold, D)
Lichtmikroskop Leica DM IL	Leica (Wetzlar, D)
Sicherheitswerkbank Safe2010	Heto-Holten (Allerød, DK)
Stereomikroskop Leica MZ6	Leica (Wetzlar, D)
Wasserbad WB14	Memmert (Schwabach, D)
Zentrifuge Universal 32R	Hettich (Tuttlingen, D)

Geräte für die Proteinanalytik:

Film-Entwicklungsautomat Curix 60	Agfa (Köln, D)
Fluoreszenz-Platten-Lesegerät Victor 3™ V 1420	PerkinElmer (Monza, IT)
Hybridisierungssofen OV 5	Biometra (Göttingen, D)
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad (München, D)
Mini-Protean 3 Elektrophorese System	Bio-Rad (München, D)
Rollenmischgerät RM5	Karl Hecht (Sondheim, D)
Spektrophotometer: SmartSpec	Bio-Rad (München, D)
Ultraschall-Homogenisator Sonoplus HD2070	Bandelin (Berlin, D)

Geräte für die Nukleinsäureanalytik:

Elektrophoresekammer horizontal	Armin Baack (Schwerin, D)
Gel-Dokumentationssystem ChemiDoc	Bio-Rad (Hercules, USA)
Mx3000P® qPCR System	Stratagene (La Jolla, USA)
PCR-Cycler iCycler®	Bio-Rad (Hercules, USA)
Spektrophotometer DU 530	Beckman (Fullerton, USA)
Ultra Turrax®	IKA® Werke (Staufen, D)

2.2. Methoden

2.2.1. Methoden der Zellkultur

2.2.1.1. Gewinnung glatter Gefäßmuskelzellen aus der Aorta der Ratte

Glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs) wurden aus der Aorta von männlichen, 8-20 Wochen alten Ratten der Stämme Wistar, Brown Norway und Brown Norway Katholiek gewonnen. Die Ratten wurden mittels einer intraperitoneal applizierten Überdosis Choralhydrat getötet und die Aorta unter aseptischen Bedingungen komplett entnommen. Unter einem Stereomikroskop wurde anschließend anhängendes Fett- und Bindegewebe entfernt sowie abgehende Arterien mit einer Schere abgeschnitten. Diese Arbeiten wurden in einer mit HBSS befüllten Petrischale auf Eis durchgeführt.

Die Isolierung der VSMCs wurde anhand der von Campbell *et al.* (1993a) beschriebenen Explantat-Methode mit einigen Modifikationen durchgeführt. Unter der Sterilbank (Laminar-Air-Flow) wurde die Aorta longitudinal aufgeschnitten und das Endothelium mit einem Wattestäbchen, durch sanftes Abstreichen entlang der luminalen Seite, entfernt. Das verbleibende Gewebe wurde anschließend in ein mit HBSS befülltes Zentrifugenrohr (15 ml) gegeben und durch mehrmaliges Invertieren des Zentrifugenrohres gewaschen. Daraufhin wurde das Gewebe in einer Kulturschale mit einem Skalpell in ca. 2-4 mm² große Explantate geschnitten. Diese wurden mit einer Pinzette aufgenommen und mit der luminalen Seite nach unten auf eine Kulturschale (60 mm, Primaria[®]) transferiert. Zuvor wurde in die Kulturschale Zellkulturmedium (DMEM, 100 µg/ml Gentamycin, 20% FBS) gegeben und dieses soweit wieder abgesaugt, bis die Kulturfläche grade noch bedeckt war. Anschließend wurden die Explantate bei 37°C und 5% CO₂ in einer befeuchteten Atmosphäre inkubiert. Nach 18-20 h wurde Zellkulturmedium in zunächst geringer Menge zugegeben, damit sich die Explantate nicht vorzeitig ablösen. Nach 48 h waren die Explantate in der Regel soweit adhäriert, dass vorsichtig Zellkulturmedium zugegeben werden konnte, bis die Explantate vollständig bedeckt waren. In der Folge wurde das Zellkulturmedium alle 2 Tage gewechselt. Der Auswuchs der ersten Zellen aus den Explantaten trat üblicherweise nach 9-15 Tagen auf. Nach ca. 3 Wochen wurden die Explantate mit einer Pinzette vorsichtig entfernt und der FBS-Anteil im Zellkulturmedium von 20% auf 10% gesenkt.

2.2.1.2. Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen

Die Zellen wurden in Zellkulturmedium bestehend aus DMEM, Gentamycin (100 µg/ml) und FBS (10%) bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. War durch Proliferation der Zellen eine Konfluenz von ca. 90% erreicht, wurden diese passagiert. Dafür wurden die Zellen mit warmen PBS gewaschen und für 2-3 min mit 0,25%iger Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde durch sanftes Schlagen gegen die Flasche die vollständige Ablösung der Zellen von der Kulturfläche erreicht. Diese wurden dann mit Zellkulturmedium aufgenommen, in eine Zentrifugenröhre transferiert und bei 1000 g für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette in 4 ml Zellkulturmedium suspendiert. Die anschließende Aussaat der Zellen in neue Zellkulturgefäße wurde in einem Verhältnis von 1:2,5 (Fläche Zellkulturgefäß alt:neu) durchgeführt. Für Experimente kamen VSMCs in den Passagen 4-11 zur Anwendung.

2.2.1.3. Kryokonservierung

Befanden sich mehr Zellen in Kultur als für die anstehenden Experimente benötigt, wurden diese zwischenzeitlich in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden die Zellen, sobald eine Konfluenz von ca. 90% erreicht war, durch Behandlung mit Trypsin/EDTA von der Kulturfläche abgelöst und zentrifugiert (Abschnitt 2.2.1.2). Das Zellpellet wurde dann in Einfriermedium bestehend aus DMEM mit 20% FBS und 10% DMSO suspendiert. Die Zellsuspension wurde in 2 ml Kryoröhrchen transferiert, wobei der Inhalt eines Kryoröhrchens der Zellmenge einer 75 cm² Zellkulturflasche entsprach. Zunächst wurden die Kryoröhrchen in einem Tiefkühlschrank für 1 h bei -80°C tiefgefroren und anschließend in einen mit flüssigem Stickstoff befüllten Kryotank überführt.

Zur Re-Kultivierung der Zellen wurde ein Kryoröhrchen dem flüssigen Stickstoff entnommen, und die Zellsuspension unter kontinuierlichem Schütteln des Kryoröhrchens im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Sofort nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension dem Kryoröhrchen entnommen und tropfenweise in 9 ml warmes Zellkulturmedium (20% FBS) pipettiert. Im Anschluss an eine Zentrifugation bei 1000 g für 8 min wurden die Zellen in 4 ml Zellkulturmedium (20% FBS) suspendiert und in eine 25 cm² Zellkulturflasche gegeben.

Nach erfolgter Adhäsion der Zellen wurde nach 48 h das Zellkulturmedium gewechselt und der FBS-Anteil von 20% auf 10% gesenkt.

2.2.1.4. Behandlung mit Wirkstoffen

Experimenteller Ablauf: Für alle Experimente, die eine Stimulation mit Zytokinen umfassten, wurden VSMCs von Wistar-Ratten verwendet. In Vorbereitung auf die Experimente wurden die Zellen homogen ausgesät. Hierfür wurden die Zellen nach der Trypsinierung gründlich in Zellkulturmedium suspendiert und identische Volumina der Zellsuspension in die für die Experimente verwendeten Zellkulturgefäße gegeben. Die Zellen wurden so lange kultiviert, bis diese konfluent gewachsen waren. Standardmäßig wurde vor Beginn der Experimente ein Serumentzug durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann mit Zellkulturmedium mit einem geringen FBS-Anteil (0,2%) für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch neues ersetzt, welches die jeweiligen Wirkstoffkomponenten enthält.

Behandlung mit IL-1 α , TNF α , gespaltenem HK und Actinomycin D: Die Behandlung der Zellen mit Wirkstoffen erfolgte generell unter Verwendung von Zellkulturmedium mit einem geringen FBS-Anteil (0,2% v/v). Bei Verwendung von IL-1 α wurde das Zellkulturmedium zudem mit BSA versetzt, welches als Transportprotein für IL-1 α fungiert. Hierfür wurde zunächst eine 2%ige (m/v) BSA-Stammlösung hergestellt, indem BSA mittels einer Feinwaage eingewogen und in einer entsprechenden Menge Zellkulturmedium gelöst wurde. Anschließend wurde die Stammlösung sterilfiltriert und zur Präparation von Zellkulturmedium mit einem BSA-Gehalt von 0,1% (m/v) verwendet.

IL-1 α und TNF α wurden aus den jeweiligen Stammlösungen (100 $\mu\text{g/ml}$) dem Zellkulturmedium in einer der gewünschten Endkonzentration entsprechenden Menge zugesetzt und die Lösung anschließend gründlich homogenisiert. Bei Verwendung verschiedener Endkonzentrationen wurden die Ansätze ausgehend von der höchsten Konzentration sukzessiv verdünnt. Zur Behandlung der Zellen mit IL-1 α und gespaltenem HK wurde dem IL-1 α -haltigen Zellkulturmedium gespaltenes HK aus einer Stammlösung (1,54 mg/ml) in einer Menge zugegeben, dass eine Endkonzentration von 1 μM gespaltenes HK erreicht wurde. Durch 1:10 Verdünnungen wurden sukzessiv Ansätze mit 100 und 10 nM

gespaltenem HK hergestellt. Für die Experimente mit Actinomycin D (Endkonzentration 5 µg/ml) wurde das IL-1 α -haltige Zellkulturmedium mit einer entsprechenden Menge Actinomycin-D-Stammlösung (1 mg/ml) versetzt und gründlich homogenisiert.

Die Zellen der Kontrollgruppe wurden parallel mit Zellkulturmedium inkubiert (0,2% FBS; bei IL-1 α zudem 0,1% BSA), das zuvor mit äquivalenten Mengen der jeweiligen Trägerlösungen der Wirkstoffe (IL-1 α / TNF α : PBS, gespaltenes HK: H₂O, Actinomycin D: DMSO) versetzt wurde.

2.2.2. Methoden der Proteinanalytik

2.2.2.1. Immunzyto-Fluoreszenzmikroskopie

Zur Charakterisierung der mittels der Explantat-Methode gewonnenen Zellen (Abschnitt 2.2.1.1.) wurden diese mit einem anti- α -Aktin-Antikörper markiert, der spezifisch an die α -Aktin-Isoform glatter Muskelzellen bindet, jedoch nicht an das α -Aktin anderer Zelltypen wie Fibroblasten und Endothelzellen.

Hierfür wurden die Zellen auf Deckgläser, welche zuvor in die Vertiefungen einer Zellkulturplatte gelegt wurden, ausgesät und unter Verwendung von Zellkulturmedium (10% FBS) kultiviert. Im Anschluss an einen 24-stündigen Serumentzug (Zellkulturmedium mit 0,2% FBS) wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen mit Methanol behandelt (10 min, -20°C). Anschließend folgte eine Inkubation in 10% FBS (in PBS) für 30 min bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der monoklonale anti- α -Aktin-Antikörper wurde 1:500 in PBS (mit 5% FBS, 0,02% Triton-X-100) verdünnt und für 2 h bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Cyanin-3-konjugierten anti-Maus-Sekundärantikörper, 1:1000 verdünnt in PBS (mit 5% FBS, 0,02% Triton-X-100), für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Markierung der Zellkerne wurde anschließend eine Behandlung mit Hoechst 33342, 70 ng/ml in PBS für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Abschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen. Zellen, die parallel nur mit

Sekundärantikörper und Hoechst 33342 behandelt wurden, dienten als Negativkontrollen, um eventuell auftretende unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers zu erfassen. Die Deckgläser mit den fixierten und markierten Zellen wurden unter Verwendung von Fluoreszenz-Eindeckmittel auf Objektträger fixiert und unter Lichtausschluss aufbewahrt. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte unter Anregung bei 550 und 346 nm zur Visualisierung von Cyanin 3 bzw. Hoechst 33342.

2.2.2.2. Proteinextraktion aus kultivierten Zellen sowie Geweben

Proteinextraktion aus glatten Gefäßmuskelnzellen: Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mittels Trypsinierung oder mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 1500 g wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurde das Zellpellet in eiskaltem Lyse-Puffer (mit Proteinaseinhibitoren) durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette lysiert. Zur Entfernung von Zellresten wurde das Lysat bei 12000 g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend entnommen, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Proteinextraktion aus Geweben: Nach der Entnahme der jeweiligen Organe wurden diese in eiskaltem PBS-Puffer gesäubert und von anhängendem Fett- und Bindegewebe befreit. Mit einem Skalpell wurden die Organe in kleinere Stücke geschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zur Proteinextraktion wurden die Gewebestücke im gefrorenen Zustand mechanisch zerkleinert und in einem Glas-Potter-Gefäß nach Zugabe von eiskaltem Lyse-Puffer (mit Proteinaseinhibitoren) homogenisiert. Zusätzlich wurde das Homogenat in einem Reaktionsgefäß auf Eis mit Ultraschall (10 Impulse à 5 s) behandelt. Zur Entfernung von Geweberesten wurde anschließend zentrifugiert (12000 g, 10 min, 4°C), der Überstand aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.2.3. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts wurde das *BCA Protein Assay Reagent Kit* verwendet, welches auf dem Prinzip der Biuret-Reaktion mit nachfolgender Komplexbildung von Bicinchoninsäure mit Cu^+ -Ionen basiert. Die Proteinlysate wurden der Anweisung des Herstellers entsprechend mit den Reagenzien behandelt und anschließend photometrisch vermessen. Durch den Abgleich mit einer Rinderserumalbumin-Standardkurve konnte dann der Proteingehalt berechnet werden.

2.2.2.4. Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli (1970). Hierfür wurden zunächst Polyacrylamidgele bestehend aus einem 8 oder 10%igen Trenngel und einem 5%igen Sammelgel (Tabelle 2.4.) hergestellt. Das Trenngel-Gemisch wurde zwischen zwei Glasplatten pipettiert und anschließend mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Abschlusskante zu erzielen. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel-Gemisch auf das Trenngel gegeben und 10er oder 15er Kämmen zur Formung der Taschen in das noch flüssige Sammelgel-Gemisch eingesetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Taschen mit Elektrophoresepuffer ausgespült. Die Proben wurden je nach der weiteren Analytik (Western Blotting oder Gelatine-Zymographie) entsprechend aufbereitet und in die Taschen der Gele pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung von SDS-Elektrophoresepuffer in vertikalen Gelelektrophoresekammern (Mini-Protean 3) bei 180 V für 70-90 min. Parallel zu den Proben wurden 8 μl eines Molekulargewichtsmarkers (*PageRuler Prestained Protein Ladder*) in eine der Taschen des Gels pipettiert und elektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 2.4. Rezeptur für 2 Polyacrylamidgele (Dicke: 1,5 mm).

	Sammelgel 5%	Trenngel 8%
Acryl-/Bisacrylamid-Lösung (30%/ 0,8%)	1,1 ml	5,0 ml
Sammelgelpuffer (4x)	1,7 ml	–
Trenngelpuffer (4x)	–	4,7 ml
Aqua demin.	3,8 ml	9,3 ml (Zymographie: 7,4 ml)
Zymographie: Gelatinelösung (10%)	–	1,9 ml
Ammoniumpersulfat (10%ige Lösung)	49,5 µl	96 µl
TEMED	8,3 µl	9,6 µl

2.2.2.5. Western Blotting und Immundetektion

Proteinlysate wurden mit einer für alle Proben gleichen Menge an Gesamtprotein mit 4x reduzierendem Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 3 min erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels der SDS-PAGE (Abschnitt 2.2.2.4) unter Verwendung von 8 oder 10%igen Polyacrylamidgelen. Der Transfer auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen wurde nach der von Towbin *et al.* (1979) beschriebenen Methode in einer Nassblotkammer bei 100 V für 1 h bei permanenter Kühlung durchgeführt. Der erfolgreiche Transfer der Proteine wurde anschließend mit einer reversiblen Ponceau-S-Färbung überprüft. Zur Absättigung restlicher Protein-Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit 5%iger Milchpulverlösung behandelt. Daraufhin wurde die Membran mit einer Verdünnung des primären Antikörpers (Tabelle 2.5.) in 2,5%iger Milchpulverlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST-Puffer folgte eine zweite Inkubation mit dem entsprechenden Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper, verdünnt in TBST-Puffer, für 30 min bei Raumtemperatur. Nach mehrmaligem Waschen in TBST-Puffer wurde die Membran mit ECL-Reagenz benetzt und eine auftretende Chemilumineszenz durch Auflegen eines Fotofilms detektiert.

Um auf derselben Membran ein weiteres Protein zu detektieren, wurden die gebundenen Antikörper wieder abgelöst. Dazu wurde die Membran zuerst mit Stripping-Puffer für 8 min bei Raumtemperatur behandelt und danach mehrmals mit TBST-Puffer gewaschen.

Tabelle 2.5. Verdünnungen der zur Immundetektion eingesetzten Antikörper.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
anti-Kininogen	1:500	anti-Kaninchen	1:3000
anti-MMP-2	1:2000	anti-Maus	1:3000
anti-GAPDH	1:50000	anti-Maus	1:2000

2.2.2.6. Gelatine-Zymographie

Prinzip und Probenvorbereitung: Bei der Zymographie wird die substratspezifische Aktivität von Enzymen genutzt, um diese zu detektieren bzw. zu quantifizieren. Die Methode basiert auf der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wobei ein in das Gel inkorporiertes Substrat nach elektrophoretischer Auftrennung der Enzyme durch diese abgebaut wird. Zur Detektion der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 wird hierfür Gelatine eingesetzt. Mit der Gelatine-Zymographie lassen sich auch die inaktiven Vorstufen (proMMPs) detektieren, welche in Folge des Prozesses der Denaturierung mittels SDS und anschließender Renaturierung aktiviert werden (Birkedal-Hansen 1982, Kleiner 1994).

Konditionierte Medien: Mit Beendigung der Experimente wurden die Überstände der Zellen (Zellkulturmedien) entnommen und bei 12000 g (4°C) für 10 min zentrifugiert, um Zellen oder Zellreste zu entfernen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die somit erhaltenen Proben, welche im folgenden Text als konditionierte Medien bezeichnet werden, bei -20°C eingefroren.

Probenvorbereitung: Zur Ermittlung der gelatinolytischen Aktivität in den konditionierten Medien wurden äquivalente Mengen (0,5 – 15 µl pro Probe) mit 5x nicht-reduzierenden Probenpuffer versetzt und für die Zymographie verwendet. Die Proben wurden nicht erhitzt, damit die enzymatische Aktivität der MMPs erhalten bleibt.

Zymographie: Die Proben wurden auf 8%ige Polyacrylamidgele, die zusätzlich Gelatine (1 mg/ml) enthielten, aufgetragen und mittels der SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Entfernung des SDS wurde das Gel anschließend für 1 h mit Renaturierungspuffer (2,5% Triton-X-100 in Aqua demin.) behandelt. Das Gel wurde dann dreimal für 1 min in Aqua demin. gewaschen, um das Triton-X-100 wieder zu entfernen und anschließend in Enzympuffer bei 37°C über Nacht inkubiert. Daraufhin wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung für 3 h bei Raumtemperatur unter Agitation gefärbt und anschließend für 1½ - 2 h mit Entfärbelösung behandelt. Dabei wurden die Bereiche mit gelatinolytischer Aktivität als helle, transparente Banden in einem ansonsten dunkelblau gefärbten Gel deutlich erkennbar. Die somit erhaltenen Zymogramme wurden mit einem Durchlichtscanner gescannt und mit der Software Quantity One (Biorad) densitometrisch ausgewertet. Zum Nachweis der durch die Aktivität von MMPs verursachten Gelatinolyse erfolgte bei einer parallel durchgeführten Zymographie die Inkubation des Gels in Enzympuffer mit EDTA (20 mM).

2.2.2.7. Gelatinase/Kollagenase-Aktivitätsassay

Behandlung der Proben mit APMA: Hierfür wurde zunächst eine entsprechende Menge 4-Aminophenyl-Quecksilberacetat (APMA) zur Herstellung einer 25 mM Stammlösung mittels einer Mikrowaage eingewogen und in DMSO gelöst. Unmittelbar vor der Durchführung des Aktivitätsassays wurden die konditionierten Medien in Reaktionsgefäßen mit der APMA-Stammlösung in einem Verhältnis von 1:25 versetzt, so dass in den Ansätzen eine Endkonzentration von 1 mM APMA vorlag. Die Ansätze wurden anschließend durch Vortexen gründlich durchmischt und für 2 h bei 37°C inkubiert.

Messung der enzymatischen Aktivität: Zur Messung der enzymatischen Aktivität der MMPs in den konditionierten Medien wurde das EnzChek[®] *Gelatinase/Collagenase Assay Kit*

verwendet und entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers durchgeführt. Das Assay basiert auf der Spaltung von Fluorescein-konjugierter Gelatine durch Proteinasen mit gelatinolytischer Aktivität. Die Zunahme der daraus resultierenden Fluoreszenz ist proportional zur proteolytischen Aktivität. In den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden 40 µl des APMA-behandelten konditionierten Mediums mit 140 µl Assay Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,2 mM NaN₃, pH 7,6) und 20 µl Substratlösung (DQTM Gelatine; 0,7 mg/ml) vermischt. Das Assay wurde bei 37°C für 17 h durchgeführt und die entstehende Fluoreszenz mittels eines Fluoreszenz-Lesegerätes (Anregung: 490/20 nm, Emission: 510/10 nm) detektiert. Die gemessene Fluoreszenzintensität der Proben wurde hinsichtlich des Fluoreszenzhintergrundes korrigiert, indem der Werte einer Minus-Enzym-Kontrolle (Reagenzien ohne konditioniertes Medium) abgezogen wurde.

2.2.3. Methoden der Nukleinsäureanalytik

2.2.3.1. RNA-Extraktion aus kultivierten Zellen sowie Geweben

Extraktion der Gesamt-RNA aus vaskulären glatten Muskelzellen: Zunächst wurden die Zellen nach Entfernung des Zellkulturmediums zweimal mit PBS gewaschen, mittels Trypsinierung oder mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1500 g für 5 min wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Zur Extraktion der RNA wurde das NucleoSpin[®] RNA II Kit verwendet. Nach erfolgter Zelllyse mit Lyse-Puffer in der Gegenwart von Guanidinisothiocyanat und β-Mercaptoethanol wurde das Lysat zunächst auf eine Filtersäule gegeben und mittels Zentrifugation aufgereinigt. Anschließend wurde das Filtrat mit Ethanol (70%) versetzt, auf eine Säule mit einer Silica-Matrix gegeben und zentrifugiert. Die folgende Prozedur basierte auf der Adsorption von RNA an die Silica-Matrix und umfasste einen DNase-Verdau (15 min bei Raumtemperatur) gefolgt von mehreren Waschstufen. Anschließend wurde die RNA mit 40 µl Reinstwasser (u.p. H₂O; RNase-/DNase-frei) eluiert.

Extraktion der Gesamt-RNA aus Geweben: Die RNA aus Geweben wurde anhand einer modifizierten Prozedur der von Chomczynski und Sacchi (1987) beschriebenen Einzelschrittmethode unter Verwendung von TRIzol[®]-Reagenz extrahiert. Tiefgefrorene Gewebestücke wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 1 ml TRIzol[®]-Reagenz versetzt und unter Verwendung eines Dispergiergerätes (Ultra Turrax[®]) mechanisch homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 200 µl Chloroform durchmischt, für 3 min stehengelassen und dann zentrifugiert (10000 g, 15 min, 8°C). Anschließend wurde die obere, wässrige Phase abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und durch Zugabe von 500 µl Isopropanol die RNA gefällt. Das durch Zentrifugation (10000 g, 10 min, 8°C) erhaltene RNA-Pellet wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (7000 g, 5 min, 8°C), für 5-10 min luftgetrocknet und anschließend in 50 µl u.p. H₂O gelöst. Zur Entfernung potentiell vorhandener genomischer DNA wurde die so gewonnene RNA mit DNase behandelt:

Komponente	Menge
Gesamt-RNA	2 µg
10x DNase Puffer	1 µl
DNase (1 u/µl)	2 µl
u.p. H ₂ O	ad 10 µl

Der Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 1 µl DNase-Stopplösung versetzt und 10 min bei 65°C inkubiert, um die DNase zu inaktivieren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Proben bei -80°C tiefgefroren.

2.2.3.2. RNA-Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit wurden 4 µl RNA-Lösung mit 96 µl u.p. H₂O verdünnt, in Quarz-Ultramikroküvetten transferiert und in einem Spektrophotometer die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Anhand der OD₂₆₀-Messung gegen einen Leerwert konnte die Nukleinsäurekonzentration berechnet

werden. Die Reinheit der Präparation wurde anhand des Verhältnisses OD_{260}/OD_{280} überprüft. Dieses wird durch Protein-Verunreinigungen beeinflusst und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen. Zudem wurden 0,5 μg RNA auf ein 1,5%iges TBE-Agarosegel aufgetragen und bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Durch das in das Gel inkorporierte Ethidiumbromid ließen sich unter UV-Licht die 28S und 18S rRNA-Banden einer intakten Gesamt-RNA deutlich visualisieren (Abbildung 2.1.). Dieses Verfahren diente zur Überprüfung der Proben hinsichtlich einer eventuell auftretenden RNA-Degradation.

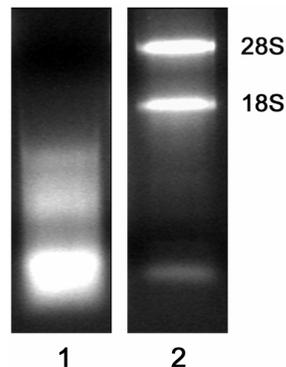


Abbildung 2.1. **RNA-Qualitätskontrolle.** Elektrophoretisch aufgetrennte Probe mit degradierter RNA (1) und intakter RNA (2).

2.2.3.3. Reverse Transkription

Für die Synthese von cDNA mittels reverser Transkription wurde 1 μg Gesamt-RNA eingesetzt. Zusammen mit Random Primern wurde der Ansatz zunächst auf 70°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA zu lösen. Für die Hybridisierung der Random Primer wurde der Ansatz anschließend auf 0°C abgekühlt. Unter Verwendung der Reversen Transkriptase des *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV) wurde die cDNA-Synthese bei 37°C durchgeführt. Die reverse Transkription umfasste folgende Reaktionsansätze:

RNA	1 µg	5 min, 70°C
Random Primer	1 µl	
u.p. H ₂ O	ad 10 µl	

1 min auf Eis ↓

M-MLV Reverse Transkriptase	0,5 µl	60 min, 37°C
M-MLV Puffer (5x)	5,0 µl	
dNTPs 10 nM	1,25 µl	
RNase Inhibitor (10 u/µl)	0,75 µl	
u.p. H ₂ O	7,5 µl	
Gesamtvolumen	25 µl	

Parallel wurde die reverse Transkription ohne die M-MLV Reverse Transkriptase durchgeführt. Die hieraus hervorgegangenen Produkte, welche im folgenden Text als (RT-)Kontrollen bezeichnet werden, wurden im Rahmen der PCR als Negativkontrollen verwendet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.4. *Real-time* PCR

Zur Messung der relativen Genexpression wurde die PCR-Technik angewendet. Die PCR wurde unter Verwendung von Taq-Polymerase, spezifischen Primern (siehe Tabelle 2.2.) und dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I durchgeführt. SYBR Green interkaliert in doppelsträngige DNA und wird dadurch zur Fluoreszenz befähigt (Morrison 1998). Somit nimmt die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Menge an Amplifikaten im Verlauf der PCR zu. Die *real-time* PCR-Technik bietet dabei den Vorteil, dass die Fluoreszenzintensität bei jedem Zyklus gemessen wird und somit die Amplifikation in "*real-time*" nachvollzogen werden kann. Folgender Reaktionsansatz wurde in die Vertiefungen einer 96er Platte pipettiert:

Komponente	Volumina pro Ansatz [μ l]
cDNA	0,5
u.p. H ₂ O	ad 10
DMSO	0,9
Forward Primer [10 μ M]	0,6
Reverse Primer [10 μ M]	0,6
Taq-Polymerase [5 u/ μ l]	0,075
SYBR Green Mastermix	15
Total	30

Standardmäßig wurden zudem Reaktionsansätze pipettiert, bei denen die cDNA-Komponente durch die entsprechende (RT-)Kontrolle oder u.p. H₂O ersetzt wurde. Diese dienten der Überprüfung hinsichtlich der Amplifikation von genomischer DNA bzw. Fremd-DNA aus kontaminierten Reagenzien. Neben SYBR Green I enthielt der Mastermix den Fluoreszenzfarbstoff ROX, der nicht zur Interkalation in doppelsträngige DNA befähigt ist. Dieser diente dazu, Unterschiede in der Fluoreszenzintensität, die nicht mit dem Amplifikationsprozess in Verbindung stehen (z.B. Abweichungen bei den Volumina des Mastermixes), zu detektieren bzw. auszugleichen. Die *real-time* PCRs wurden mit dem Mx3000P[®] qPCR System unter Verwendung des folgenden Temperaturprofils durchgeführt:

	2 min	94°C	Denaturierung
40 Zyklen	15 s	94°C	Denaturierung
	15 s	58-61°C ¹⁾	Annealing
	30 s	72°C	Elongation

¹⁾ Primer-spezifisch

Datenanalyse: Die aus der *real-time* PCR hervorgegangenen Daten wurden mit der GED (*Gene Expression's CT Difference*) Methode analysiert (Scheffe 2006). Diese Methode bietet den Vorteil, dass die relative Quantifizierung der Genexpression unmittelbar anhand der Daten der vermessenen Proben erfolgt, so dass auf eine Standardkurve verzichtet werden kann. Zudem werden PCR-Effizienzen in die Kalkulation miteinbezogen, womit die GED-Methode eine präzise Analytik von *real-time* PCR-Daten erlaubt.

Zunächst wurde anhand der Amplifikationsgrafik (Abbildung 2.2.) ein Schwellenwert (*threshold*) in dem Bereich der Kurve festgelegt, in dem die Amplifikation exponentiell verläuft (log-Phase der PCR). Der CT-Wert markiert den Zyklus der PCR, bei dem die Amplifikationskurve den Schwellenwert kreuzt (*threshold cycle*). Anhand der CT-Werte erfolgte die Berechnung des Δ CT-Wertes, welcher die Differenz zwischen dem CT-Wert einer Probe und dem einer Referenzprobe (z.B. die cDNA von Zellen der Kontrollgruppe) darstellt. PCR-Effizienzen wurden mit dem Programm LinRegPCR (Ramakers 2003) für jede Amplifikation berechnet und ein Gen-spezifischer Mittelwert gebildet.

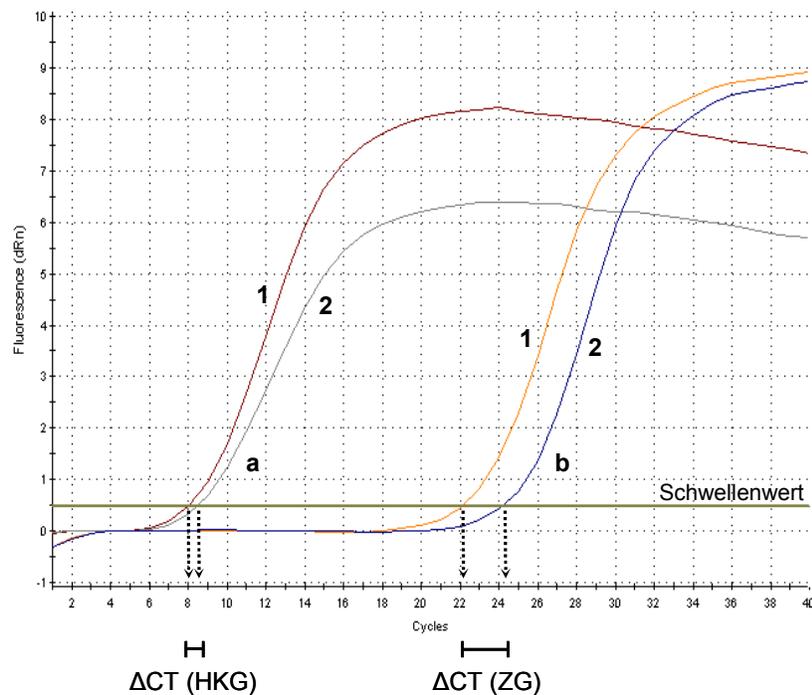


Abbildung 2.2. **Real-time PCR-Datenanalyse.** Beispiel für die Festlegung des Schwellenwertes und Bestimmung der Δ CT-Werte anhand der Amplifikationskurven von 18S rRNA (a) und MMP-9 (b) einer Probe (2) und einer Referenzprobe (1).

Die somit erhaltenen Werte wurden in die folgende GED-Formel eingesetzt:

$$\text{rEV} = \frac{(1+E(\text{ZG}))^{-\Delta\text{CT}(\text{ZG})}}{(1+E(\text{HKG}))^{-\Delta\text{CT}(\text{HKG})}}$$

mit $\Delta\text{CT}(\text{Gen}) = \text{CT}(\text{Gen}; \text{Probe}) - \text{CT}(\text{Gen}; \text{Referenzprobe})$

rEV = relatives Expressionsverhältnis

E = Effizienz

ZG = Zielgen

HKG = Housekeeping-Gen

Als Housekeeping-Gen wurde die 18S-Untereinheit ribosomaler RNA (18S rRNA) ausgewählt, welche unter verschiedenen experimentellen Bedingungen stabil exprimiert wird und zur Verwendung als endogener Standard in der Quantifizierung der Genexpression geeignet ist (Goidin 2001, Thellin 1999). Jede cDNA-Probe wurde 4fach vermessen (je Ziel- und Housekeeping-Gen) und die Mittelwerte zur Berechnung des relatives Expressionsverhältnisses eingesetzt.

2.2.3.5. *Nested* PCR

Die *nested* PCR (*nested* (engl.) = verschachtelt) umfasst zwei aufeinander folgende Amplifikationen, wobei das Produkt der ersten Amplifikation als Matrize in der zweiten Amplifikation eingesetzt wird. Das zweite Primerpaar liegt dabei zwischen dem ersten Primerpaar (Abbildung 2.3.). Mit dieser Methode lassen sich selbst sehr geringe Mengen cDNA noch nachweisen. Zudem zeichnet sie sich, aufgrund der Verwendung von zwei unterschiedlichen Primerpaaren, durch eine hohe Spezifität aus. Die *nested* PCR wurde daher im Rahmen dieser Arbeit zur qualitativen Analytik der Genexpression eingesetzt.

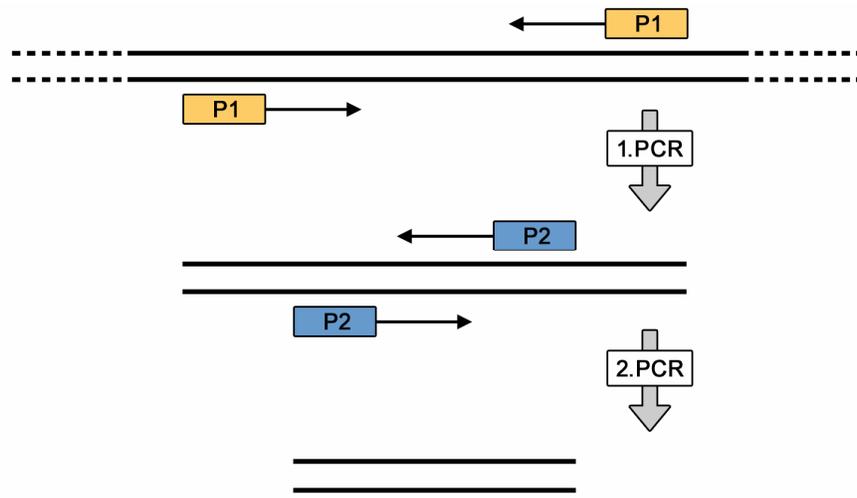


Abbildung 2.3. **Prinzip der nested PCR.** Primerpaar außen (P1), Primerpaar innen (P2).

Zur Durchführung der *nested* PCRs wurde die *real-time* PCR-Technik, mit dem unter Abschnitt 2.2.3.4. beschriebenen Reaktionsansatz und Temperaturprofil (40 Zyklen) angewendet. Für die erste PCR wurde dem Reaktionsansatz 1 μ l cDNA zugegeben und unter Verwendung der äußeren Primer die PCR in einem Endvolumen von 30 μ l durchgeführt. Es wurden dann 4 μ l des Amplifikationsproduktes in ein Reaktionsgefäß transferiert und mit u.p. H₂O 1:100 verdünnt. Für die zweite PCR wurden dem Reaktionsansatz 10 μ l dieser Verdünnung zugegeben und die PCR unter Verwendung der inneren Primer durchgeführt. Die *nested* PCR wurde parallel zu jeder cDNA-Probe mit der entsprechenden (RT-)Kontrolle durchgeführt, um die Amplifikation von genomischer oder eingeschleppter Fremd-DNA auszuschließen. Die Amplifikationsprodukte wurden zur Überprüfung auf die Entstehung der gewünschten Amplifikate und zur besseren Visualisierung elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.3.6. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die aus der *nested* PCR gewonnenen Amplifikationsprodukte sowie RNA-Proben (RNA-Qualitätskontrolle) wurden unter Verwendung von Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Hierfür wurde zunächst ein Gel bestehend aus 1,5% oder 2% Agarose (w/v), welche durch Aufkochen in TAE-Puffer (DNA-Proben) oder TBE-Puffer (RNA-Proben) gelöst und anschließend mit 0,2 µg Ethidiumbromid pro ml versetzt wurde, gegossen. Nach dem Erkalten des Gels wurden die mit 6x Probenpuffer versetzten Proben, sowie 3 µl eines Molekulargewichtsmarkers (*GeneRulerTM DNA Ladder*) in die Taschen des Gels pipettiert. Anschließend erfolgte die Elektrophorese in horizontalen Gelelektrophoresekammern unter Verwendung von TAE-Puffer (DNA-Proben) oder TBE-Puffer (RNA-Proben) bei 100-150 V für 30-45 min. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und mit einer CCD-Kamera fotografiert.

2.2.4. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Zellkulturexperimente sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM; *standard error of the mean*). Die Berechnung der Mittelwerte erfolgte anhand der Messwerte von mindestens drei separat durchgeführten Experimenten mit jeweils drei Ansätzen pro Behandlungsgruppe. Unter Annahme einer Normalverteilung der Mittelwerte wurde für die statistische Auswertung der gepaarte, zweiseitige Student-t-Test verwendet. Dabei wurde zur Überprüfung der Varianzhomogenität standardmäßig zunächst ein F-Test durchgeführt. Die Differenz zweier Mittelwerte wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ als signifikant bewertet.

Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten kamen die Programme Excel 2002 (Microsoft, Redmond, USA) und SigmaPlot 8.0 (Systat, San Jose, USA) zur Anwendung.

3. Ergebnisse

3.1. Gewinnung und Charakterisierung glatter Gefäßmuskelzellen

Für die Gewinnung von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) aus der Aorta sind im Wesentlichen zwei Methoden beschrieben, der Enzymverdau und die Explantatmethode. Während bei dem Enzymverdau die Zellen durch Behandlung des Gewebes mit einer Enzymlösung aus dem Zellverbund gelöst werden, beruht die Explantatmethode auf dem Auswuchs der Zellen aus präparierten Gewebestücken. Der letztgenannten Methode werden die Vorteile zugesprochen, dass der Phänotyp der Zellen auch weiterhin durch Interaktionen mit benachbarten Zellen sowie mit der umgebenden extrazellulären Matrix beeinflusst werden kann (McMurray 1991). Daher wurde für die vorliegende Arbeit zur Gewinnung von VSMCs die Explantatmethode (Abschnitt 2.2.1.1.) etabliert und verwendet.

Hinsichtlich der in der Aorta konstitutiv vorkommenden Zelltypen, den Endothelzellen, VSMCs und Fibroblasten, ermöglicht diese Methode eine selektive Isolierung von VSMCs. Im Rahmen der Präparation der Aorta wurde diese zunächst unter aseptischen Bedingungen gesäubert, anhängendes Fett- und Bindegewebe entfernt und abgehende Arterien abgetrennt. Anschließend wurde das Gefäß unter der Sterilbank longitudinal geöffnet und das Endothelium entfernt. Somit war die Möglichkeit eines Wachstums von Endothelzellen nicht mehr gegeben. Zudem müssten für die Gewinnung dieses Zelltyps spezielle Bedingungen in Bezug auf Wachstumsfaktoren sowie Beschaffenheit der Kulturfläche erfüllt sein. Nach der Entfernung des Endotheliums erfolgte die Präparation der Explantate, die mit der luminalen Seite auf die Kulturfläche gebracht wurden. Dadurch erhielten die Explantate über die *Tunica media* Kontakt zur Kulturfläche, womit einerseits der Auswuchs von VSMCs aus der *Tunica media* ermöglicht und andererseits der von Fibroblasten aus der *Tunica adventitia* vermieden werden kann.

Im Rahmen der Etablierung der Explantatmethode hat es sich als vorteilhaft erwiesen, mit möglichst kleinen Explantaten (~2-3 mm²) zu arbeiten und in den ersten 48 h wenig Kulturmedium zu verwenden, um die Adhäsion der Explantate auf der Kulturfläche zu ermöglichen bzw. zu optimieren. Somit konnte eine Adhäsion von ca. 70% der präparierten Explantate erzielt werden, von denen ca. jedes dritte einen zellulären Auswuchs aufwies.

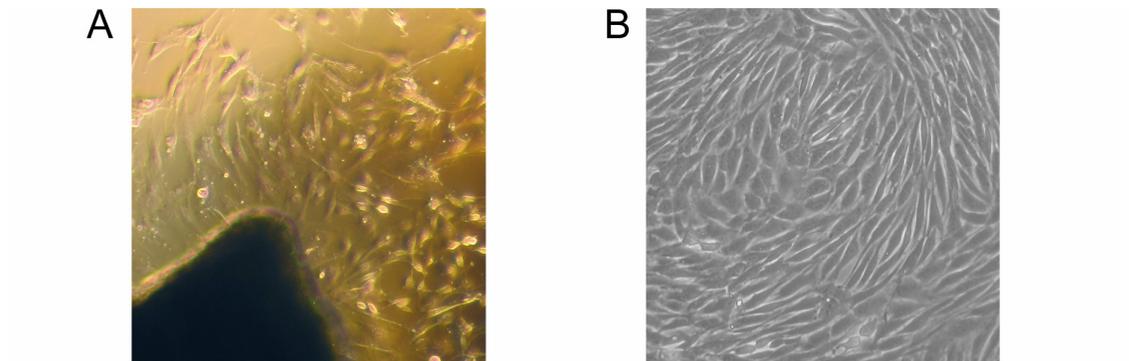


Abbildung 3.1. **Gewinnung und Kultivierung von VSMCs.**

Lichtmikroskopische Aufnahme eines Explantats mit herauswachsenden Zellen (Bild A; Originalvergrößerung 40x) und von konfluente VSMCs mit charakteristischer "Hügel und Tal"-Morphologie (Bild B; Originalvergrößerung 100x)

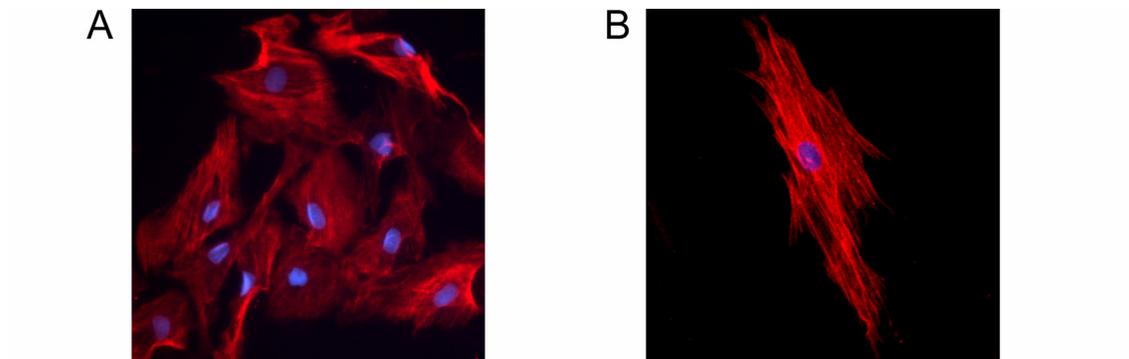


Abbildung 3.2. **Detektion von α -Aktin in primären VSMCs mittels Immunfluoreszenz.**

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Markierung der α -Aktin-Isoform glatter Muskelzellen (Cyanin 3 = rot) und die Färbung der Zellkerne (Hoechst 33342 = blau). Bild A: Originalvergrößerung 400x, Bild B: Originalvergrößerung 630x, bei der die α -Aktin enthaltenden Aktinfilamente erkennbar sind.

Der erste Auswuchs von Zellen aus den Explantaten trat üblicherweise nach 9-15 Tagen Inkubation mit Zellkulturmedium mit einem hohen FBS-Anteil (20 %) auf. Die Zellen wiesen infolge der Proliferation und der damit verbundenen zunehmenden Konfluenz bei lichtmikroskopischer Betrachtung die für VSMCs charakteristische "Hügel und Tal"-Morphologie sowie eine Organisationsstruktur in Form mehrschichtiger Zellschichten auf (Abbildung 3.1.).

Zur weiteren Charakterisierung der gewonnenen Zellen wurden diese einer Immundetektion auf α -Aktin unterzogen. Abbildung 3.2. zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Behandlung der Zellen mit einem anti- α -Aktin-Antikörper, welcher spezifisch an die α -Aktin-Isoform glatter Muskelzellen bindet. Durch die Antikörpermarkierung konnte die α -Aktin-Isoform in den gewonnenen Zellen qualitativ nachgewiesen und zudem eine typische Anordnung der Aktinfilamente in Form einer Scherengitterstruktur beobachtet werden. Zusammen mit der Zellkernfärbung, welche der Detektion potentiell nicht markierter Zellen diente, konnte somit nachgewiesen werden, dass es sich bei den gewonnenen Zellen ausschließlich um VSMCs handelt.

Für die vorliegende Arbeit wurden aus den Aorten von Ratten der Stämme Wistar, Brown Norway und Brown Norway Katholiek mehrere VSMC-Kulturen pro Stamm gewonnen. Dabei konnten im Rahmen der Gewinnung und Kultivierung der Zellen hinsichtlich ihrer Herkunft keine offensichtlichen Unterschiede in Bezug auf deren Zellmorphologie, Viabilität und Proliferationsrate festgestellt werden.

3.2. Etablierung eines Stimulationsmodells der induzierten Expression von MMP-2 und MMP-9 in VSMCs

In der Literatur sind verschiedenartige Agenzien beschrieben, welche die Expression von MMPs in vaskulären Zellen *in vitro* erhöhen bzw. induzieren. So bewirkt oxidiertes *low-density lipoprotein* (LDL) eine Zunahme der Expression von MMP-1 in vaskulären Endothelzellen (Huang 1999). Das Mitogen Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) induziert die Expression von MMP-3 und MMP-9 in VSMCs (Kenagy 1994) und der Wachstumsfaktor *basic fibroblast growth factor* (bFGF) bewirkt eine Zunahme der Expression von MMP-2 in VSMCs (Wen 2002). Des Weiteren sind diverse Zytokine bekannt dafür, die Expression von MMPs in verschiedenen Zelltypen anzuregen. So führt die Behandlung kardialer Endothelzellen mit Interleukin-1 β (IL-1 β) zu einer Zunahme der MMP-2-Expression (Mountain 2007). Galis *et al.* (1994) konnten zeigen, dass durch Stimulation von VSMCs mit Interleukin-1 α (IL-1 α) sowie mit Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) die basale Sekretion von MMP-2 zunimmt. Zudem induziert IL-1 α die Freisetzung von MMP-9 in VSMCs (Fabunmi 1996, Galis 1994). In Gewebeextrakten von abdominalen Aortenaneurysmen konnten verschiedene Zytokine in erhöhten Mengen nachgewiesen werden, darunter IL-1 β (Pearce 1992), IL-1 α und TNF α (Lindeman 2008). Für die Etablierung eines *in vitro*-Modells, welches im Kontext mit den pathophysiologischen Prozessen *in vivo* steht, bot sich daher die Verwendung eines Zytokins zur Stimulation der Expression von MMPs an. Da IL-1 α über das Potential verfügt in VSMCs sowohl die Freisetzung von MMP-9 zu induzieren, als auch die basale Freisetzung von MMP-2 zu erhöhen, wurde dieses Zytokin im Rahmen der Etablierung eines Stimulationsmodells getestet.

3.2.1. Stimulation von VSMCs mit Interleukin-1 α

Zur Ermittlung einer geeigneten Konzentration erfolgte zunächst eine Behandlung von VSMCs mit IL-1 α in den Konzentrationen 1, 5, 10, 20 und 40 ng/ml über einen Zeitraum von 48 h. Zuvor wurden die Zellen bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert, um Einflüsse von Zell-Zell-Interaktionen auf die Expression von MMPs zu berücksichtigen. Zudem wurde vor Beginn der Behandlung ein Serumentzug durchgeführt (Abschnitt 2.2.1.4.), um den Zellstoffwechsel auf ein basales Niveau zu reduzieren. Im Anschluss an die Stimulation mit

IL-1 α wurde das Zellkulturmedium, welches über die Dauer des Experimentes durch die Zellen konditioniert wurde (= konditioniertes Medium), mittels der Gelatine-Zymographie hinsichtlich der Sekretion von MMP-2 und -9 analysiert.

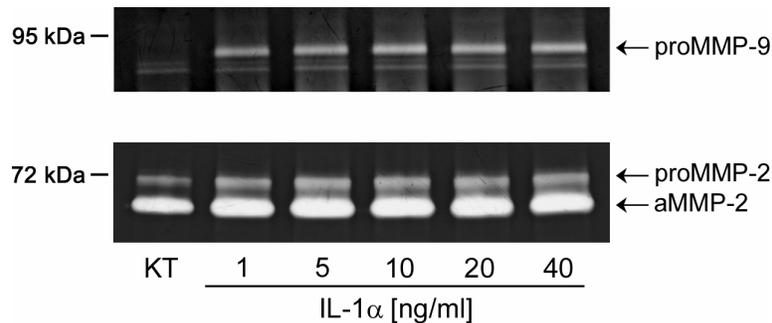


Abbildung 3.3. **Behandlung von VSMCs mit IL-1 α in verschiedenen Konzentrationen.**

Die Zellen wurden für 48 h mit IL-1 α in den angezeigten Konzentrationen oder unter basalen Bedingungen (Kontrolle; KT) kultiviert. Dargestellt ist das Ergebnis der zymographischen Analyse des konditionierten Mediums.

Abbildung 3.3. zeigt das Ergebnis der zymographischen Analyse der nach 48 h gewonnenen konditionierten Medien. Das Zymogramm weist Banden bei 72 und 62 kDa auf, entsprechend der proForm und aktiven Form der MMP-2. Es ist zu erkennen, dass im Vergleich zur basalen Expression unbehandelter Zellen (Kontrolle) die Behandlung mit IL-1 α zu einer deutlichen Zunahme der Sekretion von MMP-2 führt. In den konditionierten Medien von IL-1 α -behandelten VSMCs konnte zudem ein Protein mit gelatinolytischer Aktivität bei 92 kDa detektiert werden, entsprechend proMMP-9. Aus dem Zymogramm ist ersichtlich, dass IL-1 α in geringen Konzentrationen eine annähernd gleich starke Induktion der MMP-9-Sekretion bzw. Stimulation der Sekretion der MMP-2 bewirkt wie in hohen Konzentrationen. Dies entspricht der Erkenntnis, dass bereits wenige Ligand-IL-1 α -Rezeptorbindungen ausreichen, um eine starke intrazelluläre Signaltransduktion auszulösen (Auron 1998).

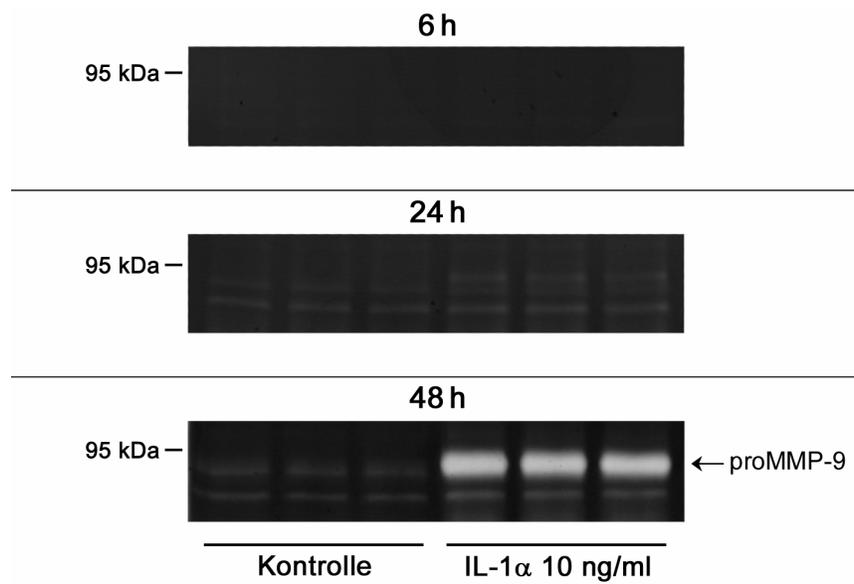


Abbildung 3.4. **Zeitverlauf der IL-1 α -induzierten MMP-9-Sekretion.**

8 μ l konditioniertes Medium wurden pro Ansatz für die zymographische Analyse eingesetzt.

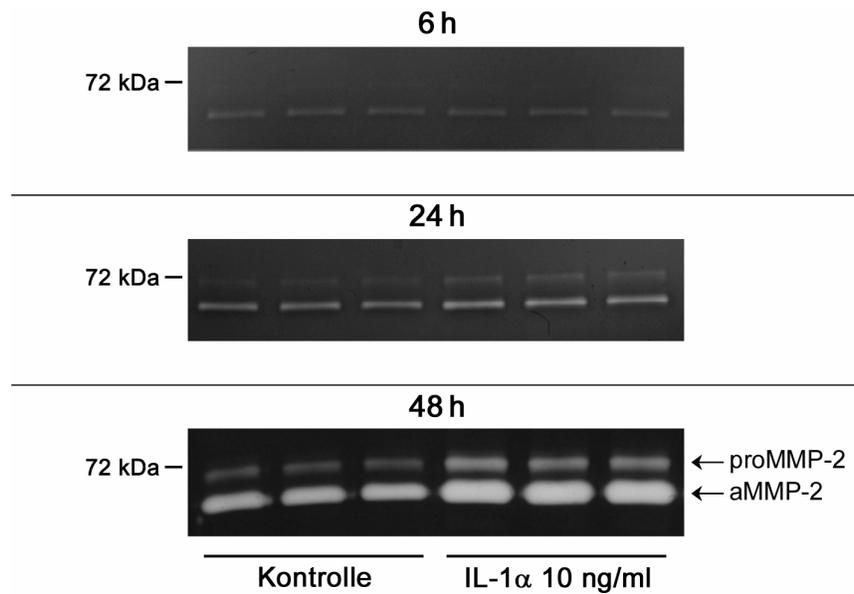


Abbildung 3.5. **Zeitverlauf der IL-1 α -induzierten Zunahme der MMP-2-Sekretion.**

1 μ l konditioniertes Medium wurde pro Ansatz für die zymographische Analyse eingesetzt.

Zur Ermittlung einer geeigneten Behandlungsdauer wurde das Ausmaß der MMP-9- und MMP-2-Sekretion zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Wie in Abbildung 3.4. zu erkennen ist, war nach 6 h Stimulation der Zellen mit 10 ng/ml IL-1 α kein MMP-9 im konditionierten Medium detektierbar. Nach 24 h Stimulation war im Vergleich zum konditionierten Medium unbehandelter Zellen eine allenfalls geringfügige Freisetzung von MMP-9 feststellbar. Dahingegen resultierte eine Stimulation über einen Zeitraum von 48 h in einer deutlichen Induktion der MMP-9-Sekretion. Die zymographische Analyse der konditionierten Medien hinsichtlich der Sekretion von MMP-2 (Abbildung 3.5.) zeigte eine unveränderte basale Sekretion nach 6 h Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 α auf. Nach 24 h konnte eine geringfügige und nach 48 h eine deutliche Zunahme des Levels von proMMP-2 wie auch von aktivem MMP-2 in den konditionierten Medien stimulierter Zellen im Vergleich zur basalen MMP-2-Sekretion unbehandelter Zellen festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle Experimente in dieser Arbeit, in denen eine Stimulation mit IL-1 α erfolgte, über einen Zeitraum von 48 h mit 10 ng/ml IL-1 α durchgeführt.

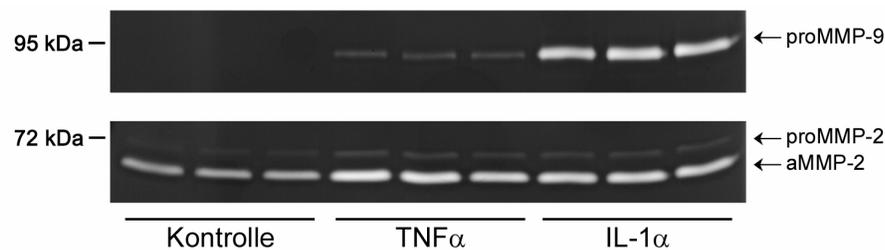


Abbildung 3.6. **IL-1 α und TNF α im Vergleich.**

VSMCs wurden für 48 h mit IL-1 α (10 ng/ml) oder TNF α (10 ng/ml) behandelt oder unter basalen Bedingungen (Kontrolle) kultiviert. Dargestellt ist das Ergebnis der zymographischen Analyse der durch die Zellen konditionierten Medien.

Neben IL-1 α wurde das Zytokin TNF α im Rahmen der Etablierung eines Stimulationsmodells getestet. Hinsichtlich ihres Potentials, die Sekretion der MMP-2 und -9 durch VSMCs zu induzieren, konnte im direkten Vergleich beider Zytokine festgestellt werden, dass IL-1 α und TNF α eine annähernd gleich starke Zunahme der MMP-2-Sekretion hervorrufen. Zudem bewirkte TNF α auch eine Induktion der MMP-9-Sekretion, welche allerdings im Vergleich zur IL-1 α -hervorgerufenen MMP-9-Sekretion sehr viel schwächer ausfiel (Abbildung 3.6.).

3.2.2. Nachweis der durch MMPs erzeugten Gelatinolyse

Die Gelatine-Zymographie dient der Detektion und quantitativen Analyse von MMPs, welche eine substratspezifische Aktivität gegen Gelatine aufweisen. Dieses Analyseverfahren zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Präzision aus (Snoek-van Beurden 2005). Durch die Analyse konditionierter Medien können mittels der Gelatine-Zymographie Aussagen über das Ausmaß der Freisetzung bzw. Sekretion der MMPs durch VSMCs über einen definierten Zeitraum, d.h. vom Zeitpunkt der Zugabe von neuem Zellkulturmedium bis zur Entnahme, getroffen werden. Da neben den MMPs auch weitere Proteinasen, z.B. Serinproteinasen, eine Substratspezifität für Gelatine aufweisen, wurde die Abhängigkeit der im Rahmen der Zymographie detektierten Gelatinolyse von Metallionen überprüft. Durch Bildung von Chelatkomplexen entzieht EDTA dem katalytischen Zentrum Metallionen und hemmt auf diese Weise die Aktivität von MMPs. Wie aus Abbildung 3.7. ersichtlich, wird die auftretende Gelatinolyse vollständig durch EDTA inhibiert.

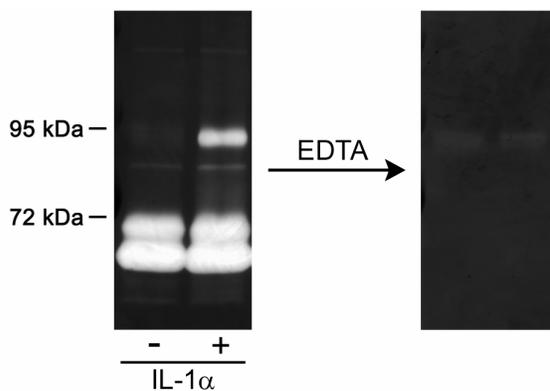


Abbildung 3.7. **Inhibition der Gelatinolyse durch EDTA.**

6 μ l konditioniertes Medium von unbehandelten oder mit IL-1 α (10 ng/ml) stimulierten VSMCs wurden für die Gelatine-Zymographie verwendet. Die Entwicklung der Zymogramme erfolgte im normalen Enzypuffer (linkes Bild) oder im Enzypuffer, der mit EDTA [20 mM] versetzt worden war (rechtes Bild).

3.2.3. Nachweis der proForm der detektierten MMPs

Aus dem Vergleich mit den Positionen von vorgefärbten Molekulargewichtsmarkern in den Zymogrammen geht hervor, dass MMP-9 im konditionierten Medium von IL-1 α -stimulierten VSMCs fast ausschließlich als 92 kDa proMMP-9 vorzuliegen scheint. Zur Verifizierung dieser Annahme wurde das konditionierte Medium mit 4-Aminophenyl-Quecksilberacetat (APMA) behandelt. APMA bewirkt eine artifizielle Auslösung des "cysteine switch" (Abschnitt 1.2.1.) und ruft eine Konversion von proMMP-9 hervor, bei der unter Verringerung des Molekulargewichts gelatinolytisch aktive MMP-9-Formen entstehen (Okada 1992).

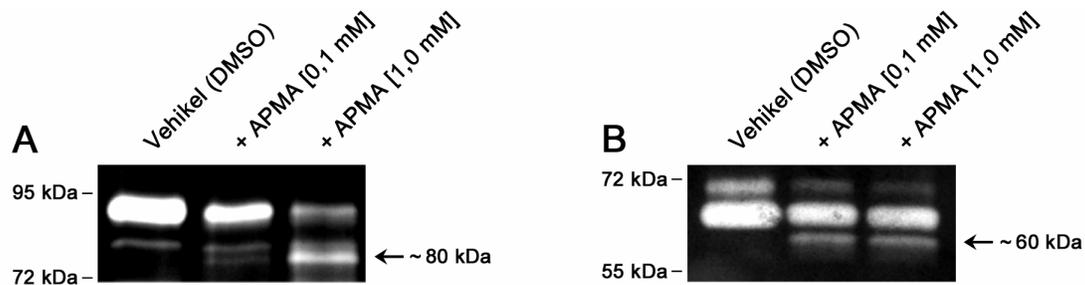


Abbildung 3.8. **Konversion der proMMPs mittels APMA.**

Das konditionierte Medium von IL-1 α -stimulierten VSMCs (10 ng/ml IL-1 α) wurde mit APMA in den angegebenen Konzentrationen versetzt und für 3 h bei 37°C inkubiert. Die anschließende zymographische Analyse erfolgte mit 5 μ l pro Probe zur Detektion der MMP-9-Formen (A) und 2 μ l pro Probe zur Detektion der MMP-2-Formen (B).

Wie in Abbildung 3.8. zu erkennen ist, führte die Behandlung mit APMA konzentrationsabhängig zu einer deutlichen Abschwächung der gelatinolytischen Bande bei 92 kDa. Zudem weist das Zymogramm eine neue gelatinolytische Bande bei ~80 kDa auf. Diese durch APMA hervorgerufene Konversion belegt, dass es sich bei der 92 kDa Bande um proMMP-9 handelt. Darüber hinaus wurde die gelatinolytische Bande bei 72 kDa durch die Behandlung mit APMA abgeschwächt, was darauf schließen lässt, dass es sich bei dieser Bande um die proForm der MMP-2 handelt. Zudem weist das Zymogramm eine neue gelatinolytische Bande bei ~60 kDa, wobei es sich aller Voraussicht nach um eine prozessierte Form der aktiven MMP-2 handelt (Brown 1990). Zusätzlich zu dieser

Untersuchung konnte sowohl die proForm als auch die aktive Form der MMP-2 durch eine Immundetektion mit einem spezifischen anti-MMP-2-Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.4.1.).

3.3. Effekt von gespaltenem HK auf die Zytokin-induzierte MMP-9-Expression

3.3.1. Untersuchung der MMP-9-Sekretion

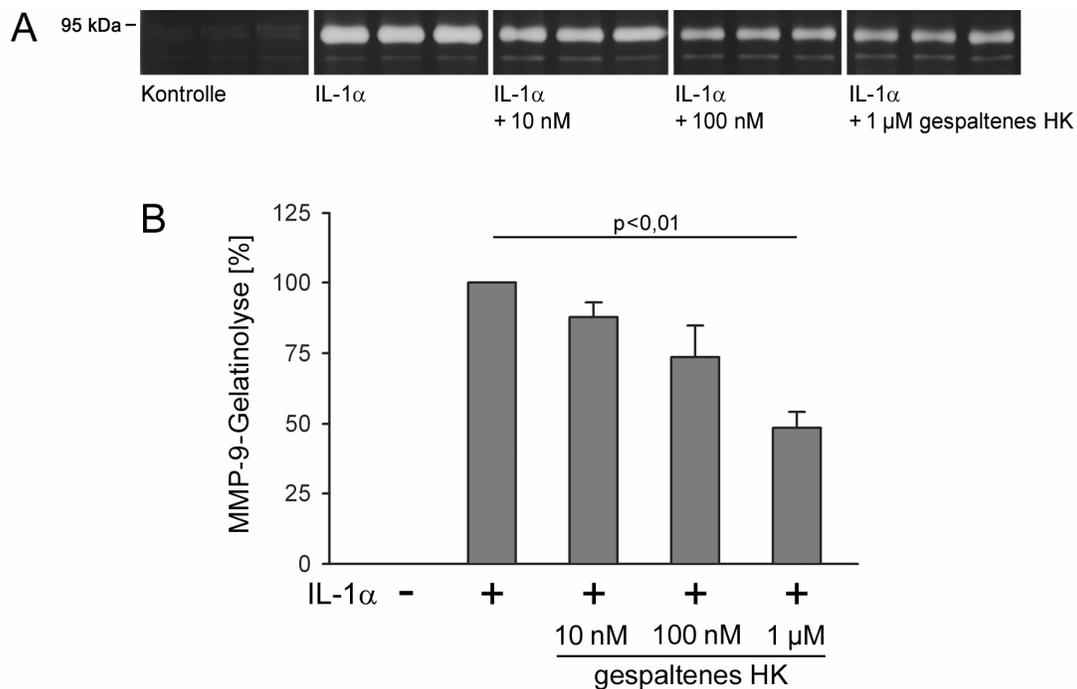


Abbildung 3.9. Effekt von gespaltenem HK auf die Zytokin-induzierte MMP-9-Sekretion.

VSMCs wurden unter basalen Bedingungen kultiviert (-) oder mit 10 ng/ml IL-1 α (+) und gespaltenem HK in den angegebenen Konzentrationen behandelt. (A) Zymographische Analyse der konditionierten Medien. (B) Densitometrische Auswertung der Zymogramme. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Experimenten. In jedem Experiment wurden die densitometrischen Werte auf die entsprechenden Werte der allein mit IL-1 α behandelten Zellen normalisiert.

Um mögliche Effekte von gespaltenem HK auf die Expression von MMP-9 zu untersuchen, wurden VSMCs mit 10 ng/ml IL-1 α stimuliert und simultan mit gespaltenem HK in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM und 1 μ M behandelt. Nach 48 h wurde das konditionierte Medium hinsichtlich der Freisetzung von MMP-9 mittels Gelatine-Zymographie analysiert. Abbildung 3.9. zeigt die Zytokin-vermittelte Induktion der MMP-9-Sekretion in das Kulturmedium, erkennbar an der gelatinolytischen Bande bei 92 kDa im Zymogramm, welche durch proMMP-9 hervorgerufen wird (siehe Abschnitt 3.2.3.). Durch die simultane Behandlung der Zellen mit gespaltenem HK wird die Zytokin-induzierte Sekretion von MMP-9 reduziert. Die densitometrische Auswertung der Zymogramme ergab, dass gespaltenes HK in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise die MMP-9-Sekretion vermindert, mit einer maximalen Reduzierung auf $49 \pm 6 \%$ ($p < 0,01$) durch 1 μ M gespaltenes HK.

3.3.2. Untersuchung der MMP-9-mRNA-Expression

Um herauszufinden, inwieweit gespaltenes HK die MMP-9-Expression auf der Ebene der mRNA beeinflusst, wurde die MMP-9 mRNA-Expression in den jeweiligen Behandlungsgruppen mittels *real-time* PCR bestimmt. VSMCs, die unter basalen Bedingungen kultiviert wurden (Kontrolle), wiesen keine MMP-9-mRNA auf. Dahingegen bewirkt die Stimulation der Zellen mit 10 ng/ml IL-1 α eine starke Induktion der mRNA-Expression von MMP-9. Die in Abbildung 3.10. dargestellten Resultate aus vier unabhängigen Experimenten zeigen auf, dass gespaltenes HK konzentrationsabhängig die Zytokin-induzierte MMP-9-mRNA-Expression vermindert. In den Konzentrationen 100 nM und 1 μ M bewirkte gespaltenes HK eine Reduktion auf $59 \pm 11 \%$ ($p < 0,05$) bzw. $48 \pm 5 \%$ ($p < 0,01$).

Somit wird sowohl die Sekretion (vgl. Abbildung 3.9.) als auch die mRNA-Expression von MMP-9 in einem nahezu gleichen Ausmaß durch gespaltenes HK negativ reguliert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Effekt von gespaltenem HK auf die Zytokin-induzierte Sekretion von MMP-9 in erster Linie auf eine negative Regulation der entsprechenden mRNA zurückzuführen ist.

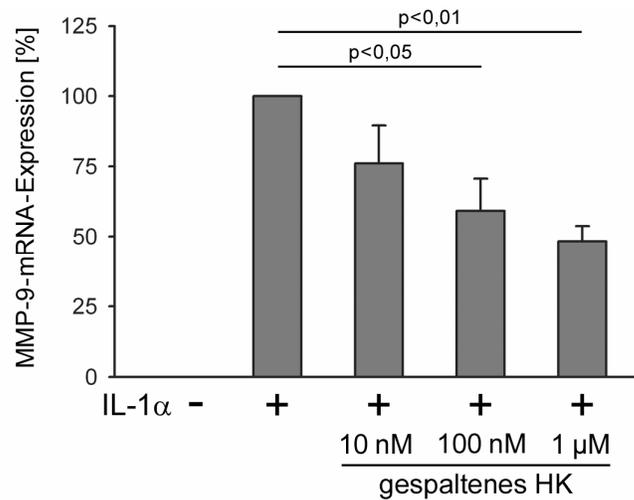


Abbildung 3.10. **Effekt von gespaltenem HK auf die Zytokin-induzierte MMP-9-mRNA-Expression.** Das Diagramm zeigt die auf 18S rRNA normalisierte, relative mRNA-Expression (Mittelwerte \pm SEM).

3.3.3. Untersuchung der MMP-9-mRNA-Degradation

Hinsichtlich der durch gespaltenes HK hervorgerufenen Reduktion der MMP-9-mRNA-Expression in Zytokin-stimulierten VSMCs sollte die Frage geklärt werden, inwieweit diesem Effekt möglicherweise eine erhöhte MMP-9-mRNA-Degradation zugrunde liegen könnte. Zur Untersuchung der MMP-9-mRNA-Degradation wurde Actinomycin D verwendet. Diese Substanz aus der Gruppe der zytotoxischen Antibiotika bindet an doppelsträngige DNA und blockiert dadurch die RNA-Synthese.

Vor der Behandlung mit Actinomycin D wurden die Zellen zunächst für 48 h einer Stimulation mit IL-1 α (10 ng/ml) unterzogen, um die MMP-9-mRNA-Expression zu induzieren. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt und durch neues ersetzt, welches für die eine Behandlungsgruppe Actinomycin D (5 μ g/ml) und IL-1 α (10 ng/ml) und für die andere Behandlungsgruppe Actinomycin D (5 μ g/ml), IL-1 α (10 ng/ml) und gespaltenes HK (1 μ M) enthielt. Zur Bestimmung des Ausmaßes der MMP-9-mRNA-Degradation wurde die Menge der verbleibenden MMP-9-mRNA unter Transkriptionsblockade durch Actinomycin D nach 12 bzw. 24 h semiquantitativ bestimmt. Hierfür erfolgte im Rahmen der *real-time* PCR-Analytik eine Normalisierung auf die ribosomale 18S RNA, die durch

Ausbildung von Sekundärstrukturen eine hohe Stabilität aufweist und relativ zur MMP-9-mRNA einer sehr viel langsameren Degradation unterliegt (Akool 2003, Eberhardt 2002).

Wie aus Abbildung 3.11. ersichtlich, trat nach 12 h nahezu keine Degradation der MMP-9-mRNA in beiden Behandlungsgruppen auf. Dahingegen konnte nach 24 h in der Behandlungsgruppe mit Actinomycin D und IL-1 α eine Abnahme der verbleibenden MMP-9-mRNA auf 76 ± 16 % bzw. in der Behandlungsgruppe mit Actinomycin D, IL-1 α und gespaltenem HK eine Abnahme auf 70 ± 10 % ermittelt werden. Dabei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen festgestellt werden. Dieses Ergebnis zeigt auf, dass die Reduktion der Zytokin-induzierten MMP-9-mRNA-Expression durch gespaltenes HK nicht aus einer erhöhten Degradation der MMP-9-mRNA resultiert.

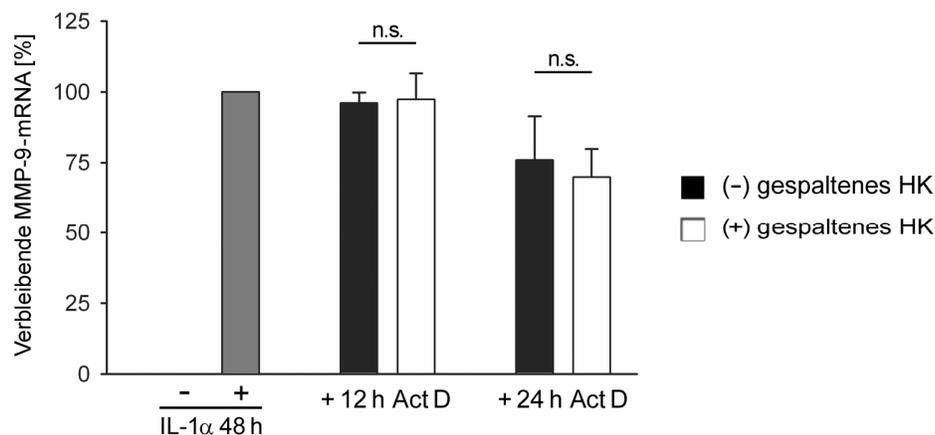


Abbildung 3.11. **MMP-9-mRNA-Degradation.**

VSMCs wurden zunächst für 48 h mit 10 ng/ml IL-1 α stimuliert und anschließend mit Actinomycin D (Act D; 5 μ g/ml) und IL-1 α (10 ng/ml) +/- gespaltenes HK (1 μ M) für weitere 12 oder 24 h behandelt. Das Diagramm zeigt die verbleibende MMP-9-mRNA in Prozenten (Mittelwerte \pm SEM), relativ zur MMP-9-mRNA-Expression vor der Behandlung mit Actinomycin D.

3.4. Effekt von gespaltenem HK auf die Zytokin-stimulierte MMP-2-Expression

3.4.1. Untersuchung der MMP-2-Sekretion

Um festzustellen, inwieweit gespaltenes HK auch auf die Expression von MMP-2 Einfluss nimmt, wurde zunächst die MMP-2-Sekretion durch VSMCs untersucht. Hierfür wurden die konditionierten Medien von VSMCs, die für 48 h mit 10 ng/ml IL-1 α stimuliert und simultan mit gespaltenem HK in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM und 1 μ M behandelt worden waren, mittels der Gelatine-Zymographie analysiert.

Wie in Abbildung 3.12. dargestellt, nahm die basale proMMP-2-Sekretion (Bande bei 72 kDa) durch VSMCs infolge die Stimulation mit IL-1 α deutlich zu (119 ± 36 %). Zudem war in den konditionierten Medien der Level von aktivem MMP-2 (Bande bei 62 kDa) infolge der Zytokin-Stimulation signifikant erhöht (80 ± 21 %). Die Auswertung von vier unabhängigen Experimenten ergab, dass die simultane Behandlung Zytokin-stimulierter Zellen mit gespaltenem HK in den Konzentrationen 10 und 100 nM im Vergleich zu den entsprechenden Werten der einzig mit IL-1 α behandelten VSMCs keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der proMMP-2 Sekretion sowie des Levels von aktivem MMP-2 in den konditionierten Medien hervorgerufen hatte. Dahingegen war durchgängig in allen Experimenten festzustellen, dass gespaltenes HK in einer Konzentration von 1 μ M sowohl eine signifikante Reduktion der proMMP-2-Sekretion (31 ± 12 %) als auch eine Abnahme von aktivem MMP-2 (26 ± 6 %) bewirkte.

Die zymographische Analyse ließ zudem erkennen, dass die Behandlung mit gespaltenem HK zu einer gleichmäßigen Abnahme des Levels von sowohl aktivem MMP-2 als auch von proMMP-2 in den konditionierten Medien führte und auf das relative Verhältnis der aktiven Form zur proForm keinen Einfluss nahm (Tabelle 3.1.).

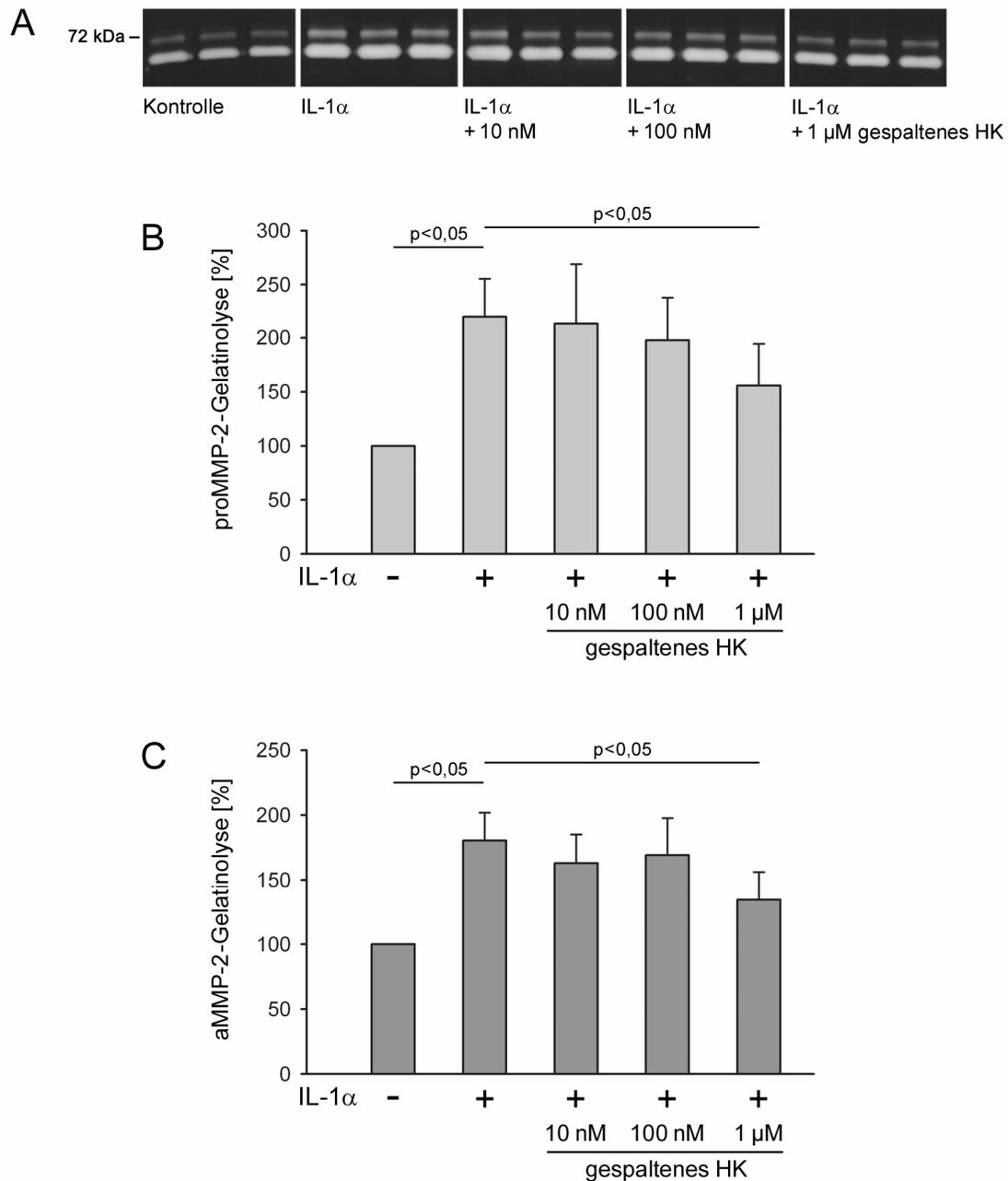


Abbildung 3.12. **Effekt von gespaltenem HK auf die Zytokin-induzierte MMP-2-Sekretion.**

VSMCs wurden unter basalen Bedingungen kultiviert (-) oder mit 10 ng/ml IL-1 α (+) und gespaltenem HK in den angegebenen Konzentrationen behandelt. (A) Zymographische Analyse der konditionierten Medien. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte \pm SEM der densitometrischen Auswertung für (B) proMMP-2 und (C) aktives MMP-2 von vier unabhängigen Experimenten. In jedem Experiment wurden die densitometrischen Werte auf die entsprechenden Werte unbehandelter Zellen normalisiert.

Behandlungsgruppe	OD aMMP-2/ OD proMMP-2	p-Wert
Kontrolle	4,97 (\pm 0,89)	0,082
IL-1 α [10 ng/ml]	3,87 (\pm 0,72)	–
+ gespaltenes HK [10 nM]	3,85 (\pm 0,60)	0,978
+ gespaltenes HK [100 nM]	4,10 (\pm 0,74)	0,248
+ gespaltenes HK [1 μ M]	4,09 (\pm 0,75)	0,142

Tabelle 3.1. **Verhältnis aktives MMP-2 zu proMMP-2 in den konditionierten Medien.**

Anhand der Werte für die optische Dichte (OD) wurde für jedes Zymogramm das Verhältnis aMMP-2/proMMP-2 kalkuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) und die p-Werte (vs. IL-1 α -Gruppe).

Zur Verifizierung der Resultate wurde zudem eine Detektion auf MMP-2 in den gewonnenen konditionierten Medien mittels Western Blotting durchgeführt. Hierfür wurden äquivalente Mengen der konditionierten Medien aus den verschiedenen Behandlungsgruppen für die SDS-PAGE verwendet. Die in den konditionierten Medien enthaltenen Proteine wurden wie unter Abschnitt 2.2.2.4. und 2.2.2.5. beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Für die anschließende Immundetektion wurde ein spezifischer anti-MMP-2-Antikörper verwendet, der sowohl an die pro- als auch die aktive Form der MMP-2 bindet. Wie anhand des in Abbildung 3.13. dargestellten Ausschnitts eines repräsentativen Western Blots zu erkennen ist, konnten die aus der Gelatine-Zymographie hervorgegangenen Ergebnisse im Western Blot bestätigt werden.

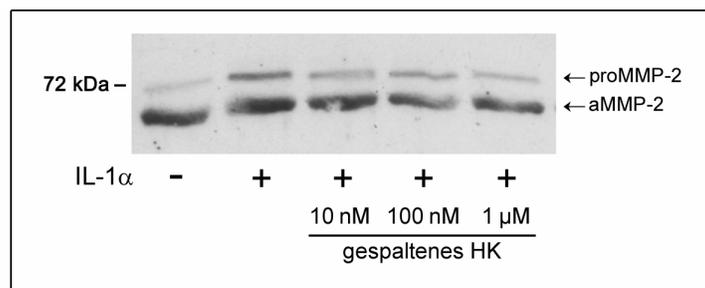


Abbildung 3.13. **Detektion von MMP-2 in den konditionierten Medien mittels Western Blotting.**

3.4.2. Untersuchung der MMP-2-mRNA-Expression

Für diese Untersuchung wurde die MMP-2-mRNA-Expression in VSMCs der verschiedenen Behandlungsgruppen mittels der *real-time* PCR-Analytik bestimmt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Expression der MMP-2-mRNA bereits unter basalen Bedingungen (Kontrollgruppe) stark ausgeprägt war. Interessanterweise wurde die basale MMP-2-mRNA-Expression weder durch die Stimulation mit IL-1 α noch durch die gleichzeitige Behandlung mit gespaltenem HK in verschiedenen Konzentrationen signifikant verändert (Abbildung 3.14.). Somit konnten die auf der Proteinebene festgestellten Effekte von IL-1 α und gespaltenem HK hinsichtlich der Sekretion der MMP-2 durch VSMCs auf der Ebene der mRNA nicht ausgemacht werden.

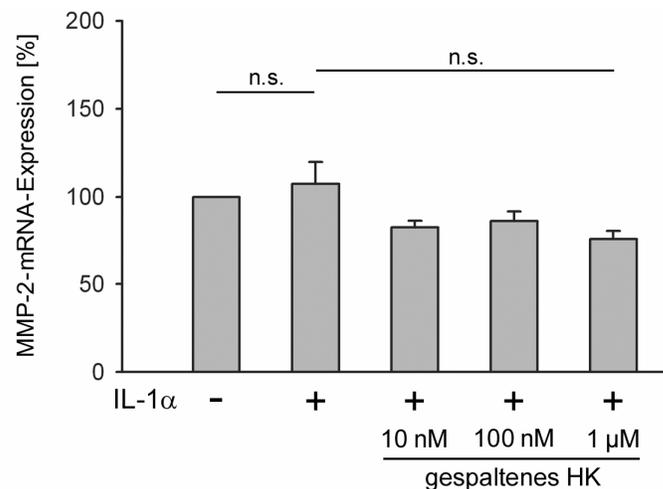


Abbildung 3.14. **Analyse der MMP-2-mRNA-Expression.**

Das Diagramm zeigt die Resultate der *real-time* PCR-Analyse der MMP-2-mRNA-Expression, normalisiert auf 18S rRNA. Die Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten sind angegeben in Prozenten relativ zur MMP-2-mRNA-Expression un behandelter VSMCs.

3.4.3. Gespaltenes HK nimmt keinen Einfluss auf die gelatinolytische Eigenschaft der MMP-2 und MMP-9

Um festzustellen, ob das im Zellkulturmedium enthaltene gesplattene HK über direkte Interaktionen mit den MMPs einen Einfluss auf die gelatinolytische Eigenschaft der MMP-2 und MMP-9 in den konditionierten Medien nimmt, wurden zellfreie Inkubationsexperimente durchgeführt. Diese Inkubationsexperimente erfolgten mit konditionierten Medien von VSMCs, die für 48 h mit IL-1 α (10 ng/ml) stimuliert worden waren. Aliquote der konditionierten Medien wurden mit gespaltenem HK versetzt (Endkonzentration 1 μ M) und analog zu dem Behandlungsschema der Zellkulturexperimente für 48 h bei 37°C inkubiert.

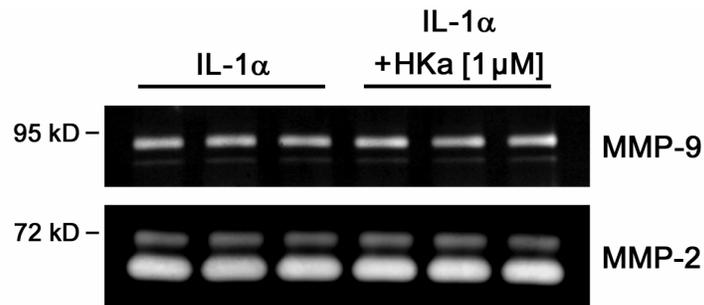


Abbildung 3.15. **Zellfreie Inkubation mit gespaltenem HK.**

Aliquote konditionierter Medien von IL-1 α -stimulierten VSMCs wurden mit oder ohne gespaltenem HK [1 μ M] für 48 h bei 37°C inkubiert. Für die zymographische Analyse von MMP-9 wurden 8 μ l, für die von MMP-2 1 μ l Volumen pro Probe eingesetzt. Das Zymogramm zeigt die Ergebnisse von jeweils 3 identisch behandelten Proben.

Wie in Abbildung 3.15. zu erkennen ist, weist das im Anschluss an die Inkubation entwickelte Zymogramm nahezu identische gelatinolytische Banden für alle Proben auf. Somit hat die zellfreie Inkubation mit gespaltenem HK keinen Einfluss auf die von proMMP-9 sowie von pro- und aktives MMP-2 hervorgerufene Gelatinolyse genommen. Dieses Ergebnis bestärkt die Annahme, dass die zuvor im Rahmen der zymographischen Analyse festgestellte Verminderung der Gelatinolyse (Abschnitt 3.3.1. und 3.4.1.) auf eine durch gespaltenes HK vermittelte Reduzierung der zellulären Expression bzw. Sekretion der entsprechenden MMPs zurückzuführen ist.

3.5. Die Zytokin-induzierte Zunahme der TIMP-1-Expression wird durch gespaltenes HK weiter erhöht

Die spezifischen endogenen Inhibitoren der MMPs, die TIMPs, sind wesentlich an der Regulation der Aktivität von MMPs beteiligt. Um festzustellen, inwieweit gespaltenes HK auf die Expression von TIMPs in VSMCs Einfluss nimmt, wurde die mRNA-Expression von TIMP-1 und TIMP-2 untersucht. Analog der Untersuchungen zur Expression von MMPs wurden hierfür cDNA-Proben von VSMCs verwendet, die für 48 h mit 10 ng/ml IL-1 α stimuliert und simultan mit gespaltenem HK in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM und 1 μ M behandelt worden waren.

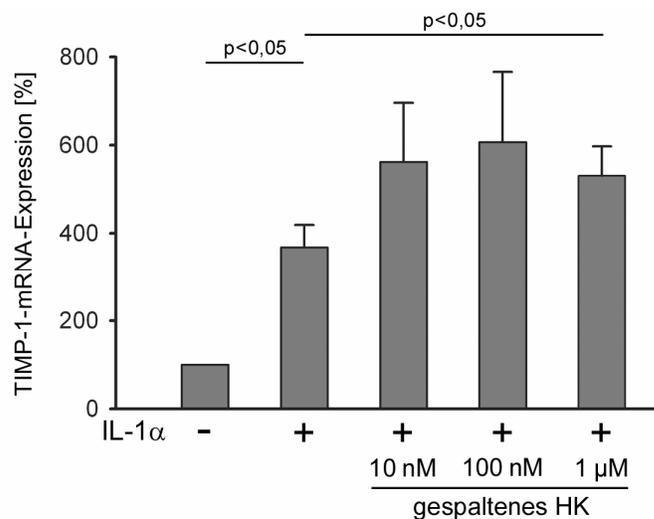


Abbildung 3.16. Effekt von gespaltenem HK auf die TIMP-1-mRNA-Expression in Zytokin-stimulierten VSMCs. Die Zellen wurden unter basalen Bedingungen kultiviert (-) oder mit 10 ng/ml IL-1 α (+) und gespaltenem HK in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Dargestellt ist die auf 18S rRNA normalisierte mRNA-Expression (Mittelwert \pm SEM) in Prozenten, relativ zur TIMP-1-mRNA-Expression unbehandelter VSMCs.

Die Ergebnisse der semiquantitativen TIMP-1-mRNA-Analyse mittels *real-time* PCR (Abbildung 3.16.) zeigen, dass die Stimulation der Zellen mit IL-1 α eine deutliche Zunahme der TIMP-1-mRNA-Expression ($368 \pm 51\%$) im Vergleich zur basalen Expression unbehandelter Zellen hervorgerufen hat. Relativ zu der Zytokin-induzierten Zunahme der

TIMP-1-mRNA-Expression, wurde diese durch gespaltenes HK um 49 ± 16 % (10 nM), 60 ± 20 % (100 nM) und 45 ± 6 % (1 μ M) weiter verstärkt. Die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten ergab, dass dieser Effekt bei einer Konzentration von 1 μ M gespaltenem HK statistische Signifikanz erreicht.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in einem zusätzlichen Experiment ermittelt, ob gespaltenes HK auch ohne Stimulation der Zellen mit IL-1 α eine erhöhte TIMP-1-Expression hervorruft. VSMCs, die für 48 h einzig mit 1 μ M gespaltenem HK behandelt wurden, wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit unbehandelten Zellen keine Unterschiede hinsichtlich der TIMP-1-mRNA-Expression auf (Abbildung 3.17.). Dies lässt darauf schließen, dass der beobachtete Effekt von gespaltenem HK auf die TIMP-1-Expression in Abhängigkeit zur Wirkung von IL-1 α steht.

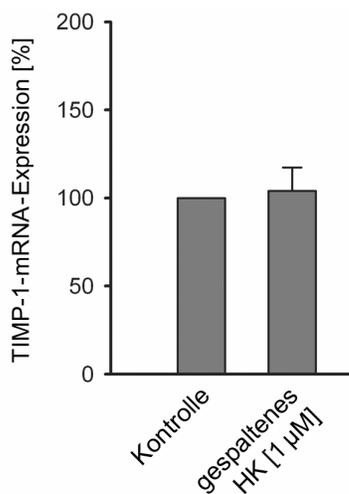


Abbildung 3.17. **Effekt von gespaltenem HK auf die basale TIMP-1-mRNA-Expression.** VSMCs wurden für 48 h unter basalen Bedingungen kultiviert (Kontrolle) oder mit gespaltenem HK [1 μ M] behandelt. Dargestellt ist die auf 18S rRNA normalisierte mRNA-Expression (Mittelwert \pm SEM) in Prozenten, relativ zur Kontrollgruppe.

Die Expression der TIMP-2-mRNA, welche in unbehandelten VSMCs (Kontrollgruppe) im Vergleich zur TIMP-1-mRNA-Expression ohnehin stark ausgeprägt war, wurde weder durch IL-1 α noch durch die simultane Behandlung mit gespaltenem HK wesentlich verändert (Abbildung 3.18.).

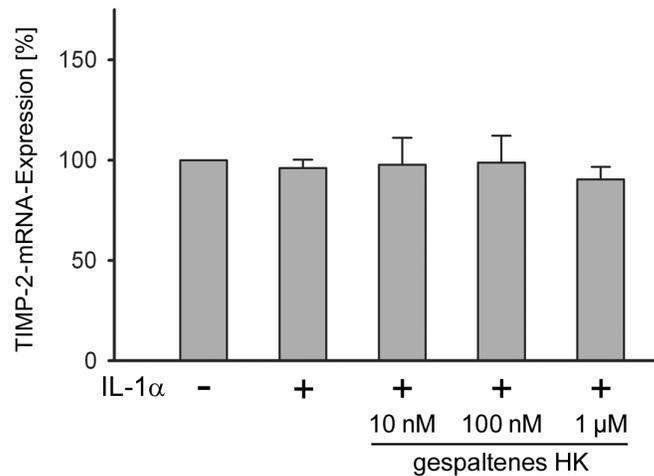


Abbildung 3.18. **Analyse der TIMP-2-mRNA-Expression.**

Das Diagramm zeigt die Resultate der *real-time* PCR-Analyse normalisiert auf 18S rRNA. Die Mittelwerte \pm SEM sind angegeben in Prozenten relativ zur TIMP-2-mRNA-Expression un behandelter VSMCs.

3.6. Gespaltenes HK verringert die MMP-Nettoaktivität

Das lokale quantitative Verhältnis von MMPs zu TIMPs bestimmt im Wesentlichen die Nettoaktivität der MMPs und ist somit eine bedeutende Determinante für den (patho-) physiologischen Abbau der extrazellulären Matrix. Aufgrund der festgestellten Effekte von gespaltenem HK auf die Expression von MMP-9 und MMP-2 (Abschnitt 3.3. und 3.4.) sowie von TIMP-1 (Abschnitt 3.5.) in Zytokin-stimulierten VSMCs bestand das Ziel dieser Untersuchung darin, zu ermitteln, inwieweit sich diese Effekte insgesamt auf das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs und somit auf die MMP-Nettoaktivität auswirken.

3.6.1. Bestimmung des MMP-9/TIMP-1-mRNA-Quotienten

Anhand der zuvor mittels *real-time* PCR bestimmten mRNA-Expressionswerte für MMP-9 und TIMP-1 wurden separat für jedes Experiment die entsprechenden MMP-9/TIMP-1-Quotienten der jeweiligen Behandlungsgruppen kalkuliert. Wie aus Abbildung 3.19.

ersichtlich, nahm der MMP-9/TIMP-1-Quotient in Folge der Stimulation der VSMCs mit IL-1 α deutlich zu. Die Behandlung der Zytokin-stimulierten Zellen mit gespaltenem HK führte in konzentrationsabhängiger Art und Weise zu signifikant kleineren MMP-9/TIMP-1-mRNA-Quotienten.

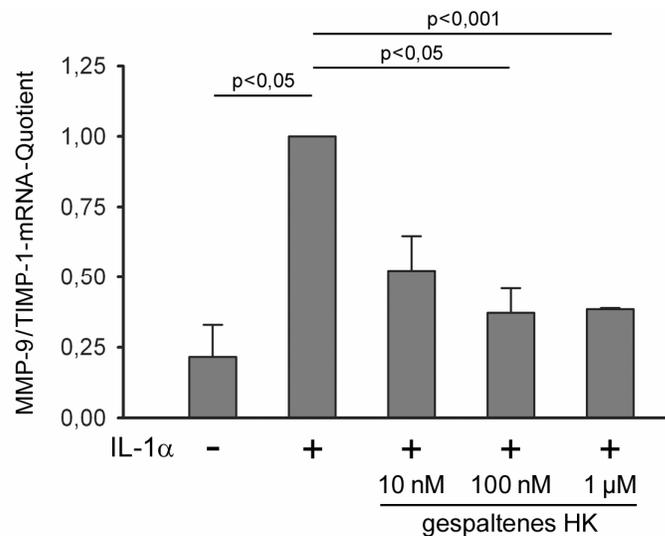


Abbildung 3.19. **Bestimmung des MMP-9/TIMP-1-mRNA-Quotienten.**

Anhand der entsprechenden, auf 18S rRNA normalisierten mRNA-Expressionswerte wurden für jedes Experiment die MMP-9/TIMP-1-mRNA-Quotienten kalkuliert. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte \pm SEM in Bezug zur IL-1 α Behandlungsgruppe.

3.6.2. Bestimmung des MMP-Aktivitätslevels im konditionierten Medium

Im nächsten Schritt wurde untersucht, inwieweit sich die Beeinflussung des MMP/TIMP-Gleichgewichtes durch gespaltenes HK auf die enzymatische Aktivität der von den VSMCs sezernierten MMPs auswirkt.

Für die Analyse der enzymatischen Aktivität wurde ein für Kollagenasen und Gelatinasen spezifisches Aktivitätsassay verwendet (Abschnitt 2.2.2.7.), welches auf der Spaltung Fluorescein-konjugierter Gelatine mit anschließender fluorimetrischer Detektion der entstehenden Spaltprodukte basiert. Mit Hilfe dieses Assays wurde der Aktivitätslevel von MMPs, welche eine Substratspezifität für Gelatine aufweisen, in den durch VSMCs konditionierten Zellkulturmedien untersucht. Die hierfür verwendeten konditionierten Medien

entstammten den zuvor beschriebenen Experimenten, bei denen VSMCs für 48 h mit IL-1 α (10 ng/ml) stimuliert und simultan mit gespaltenem HK in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM und 1 μ M behandelt worden waren. Wie in Abbildung 3.20. gezeigt, war der MMP-Aktivitätslevel in den konditionierten Medien als Resultat der Stimulation der Zellen mit IL-1 α stark erhöht. Im Vergleich hierzu konnten in den konditionierten Medien von Zytokin-stimulierten VSMCs, die simultan mit 100 nM und 1 μ M gespaltenem Kininogen behandelt wurden, signifikant geringere MMP-Aktivitätslevels von 67 ± 6 % bzw. 59 ± 9 % festgestellt werden.

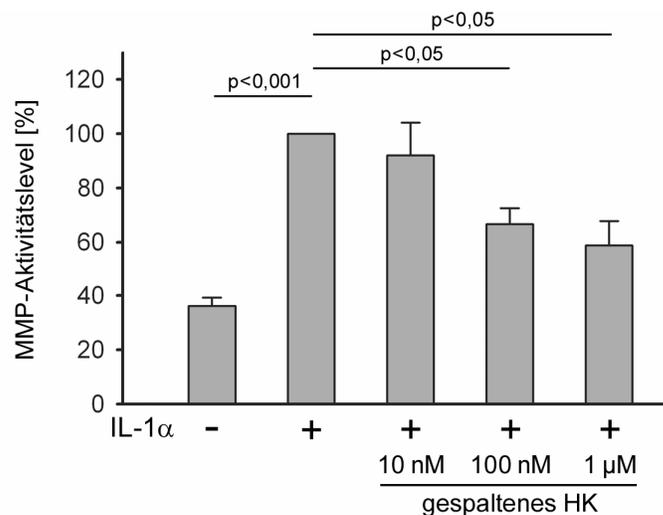


Abbildung 3.20. **Bestimmung des MMP-Aktivitätslevels in den konditionierten Medien.**

Die Proben wurden für 2 h mit APMA inkubiert und anschließend unter Verwendung eines Gelatine-Substratassays analysiert. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte \pm SEM in Bezug zur IL-1 α -Behandlungsgruppe.

Vor Durchführung des Assays erfolgte eine „Aktivierung“ der konditionierten Medien, indem die Proben für 2 h bei 37°C mit APMA behandelt wurden, wodurch die proMMPs in gelatinolytisch aktive Formen überführt werden (siehe Abschnitt 3.2.3.). Die Fluoreszenzintensität von unbehandelten Proben lag bemerkenswerter Weise nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze, wohingegen APMA-behandelte Proben eine starke Fluoreszenzintensität aufwiesen (Abbildung 3.21.). Dies lässt darauf schließen, dass die mit diesem Assay detektierten MMPs im konditionierten Medium überwiegend in der inaktiven proForm

vorlagen. Zudem wurde überprüft, inwieweit die Spaltung der Fluorescein-konjugierten Gelatine im Rahmen des Assays auf die Aktivität von MMPs zurückzuführen ist. Hierfür wurde das Assay in Gegenwart des MMP-spezifischen Inhibitors 1,10-Phenanthrolin durchgeführt, was zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität führte.

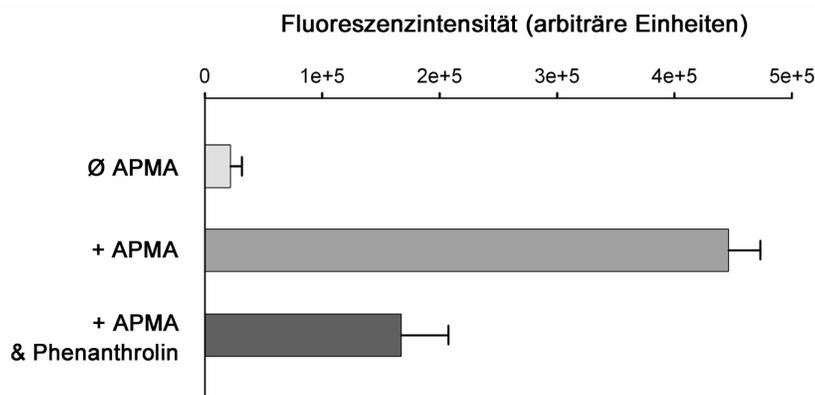


Abbildung 3.21. **Aktivierung der Proben mit APMA.**

Aliquote konditionierter Medien von IL-1 α stimulierten VSMCs wurden mit oder ohne APMA [1 mM] für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend im Gelatinase/Kollagenase-Aktivitätsassay eingesetzt und die Fluoreszenzintensität nach 1 h bestimmt. APMA-behandelte Proben wurden zusätzlich in Gegenwart von 1, 10-Phenanthrolin [1 mM] vermessen.

3.7. Untersuchungen zur basalen Expression von MMPs und TIMPs

3.7.1. Die basale Expression von MMP-2 und TIMP-2 ist in VSMCs von Kininogen-defizienten Ratten erhöht

Aufgrund der festgestellten Effekte von gespaltenem HK auf die Expression von MMPs und TIMPs in Zytokin-stimulierten VSMCs bestand das Ziel dieser experimentellen Untersuchung darin, die basale mRNA-Expressionsrate von MMP-2 und -9 sowie von TIMP-1 und -2 in VSMCs von Kininogen-defizienten Brown-Norway-Katholiek-Ratten zu analysieren. Hierfür wurden VSMCs von Brown-Norway-Katholiek-Ratten (BN/Ka) mit VSMCs von Brown-Norway-Ratten (BN) hinsichtlich der basalen mRNA-Expression der genannten MMPs und TIMPs verglichen. BN-Ratten weisen im Unterschied zu BN/Ka-Ratten normale Kininogen-Plasmakonzentrationen auf und wurden aufgrund des gemeinsamen genetischen Hintergrundes dieser beiden Stämme für diesen Vergleich herangezogen.

Die für diese Untersuchung verwendeten VSMCs wurden aus den Aorten von Ratten dieser beiden Stämme isoliert, bis zur Konfluenz kultiviert und zunächst einem 24-stündigen Serumentzug unterzogen. Anschließend wurden die Zellen für weitere 48 h in Zellkulturmedium mit einem geringen FBS-Anteil (0,2%) inkubiert, bevor die Extraktion der GesamtrNA erfolgte. Die Ergebnisse der *real-time* PCR-Analyse (Abbildung 3.22.) zeigen im Vergleich mit der basalen Expression in VSMCs von BN-Ratten eine deutlich erhöhte basale mRNA-Expression sowohl von MMP-2 ($229 \pm 18 \%$) als auch von TIMP-2 ($169 \pm 25 \%$) in den VSMCs von BN/Ka-Ratten. Dahingegen konnte eine nahezu gleich starke basale TIMP-1-mRNA-Expression in den untersuchten VSMC-Kulturen festgestellt werden. Die mRNA der MMP-9 konnte weder in den VSMCs von BN/Ka- noch in denen von BN-Ratten unter basalen Bedingungen detektiert werden: Die CT-Werte der cDNA-Proben und die entsprechender RT(-)- bzw. Wasserkontrollen in der *real-time* PCR-Analyse wiesen diesbezüglich eine Differenz von ≤ 3 auf, was als negative Detektion der MMP-9-mRNA zu werten ist.

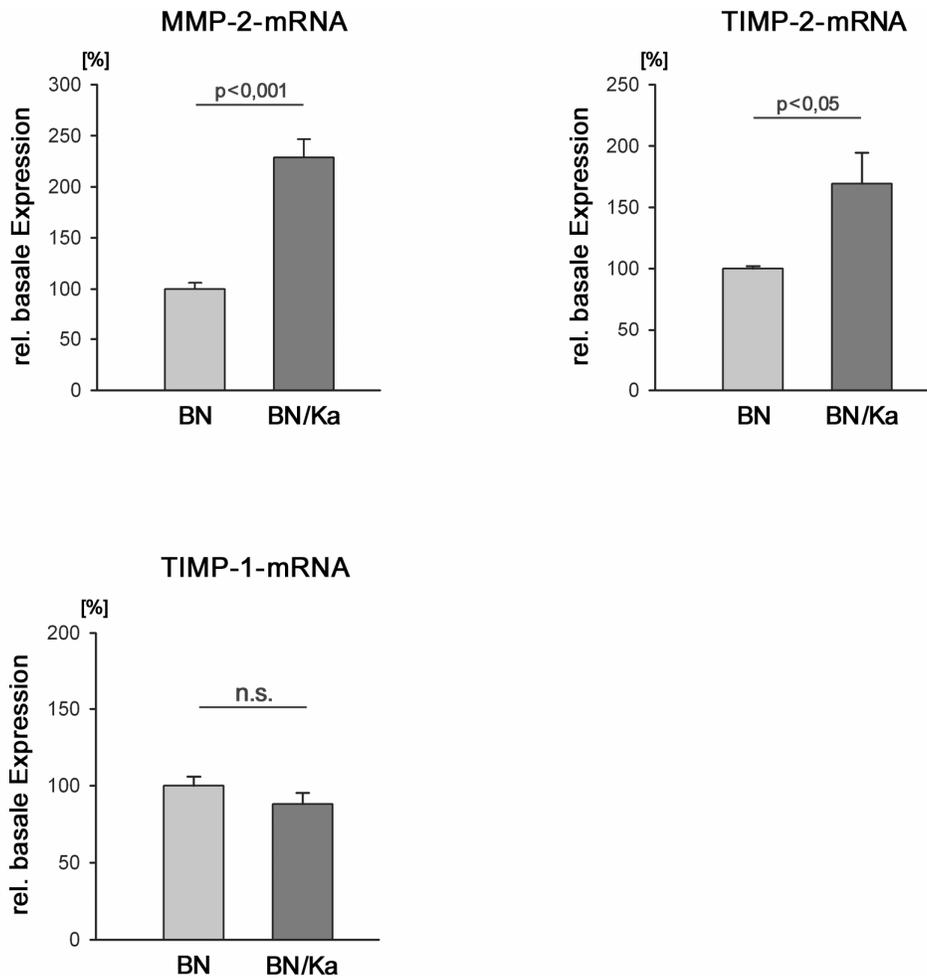


Abbildung 3.22. **Basale mRNA-Expression.**

VSMCs von Ratten der Stämme Brown Norway (BN) und Brown Norway Katholiek (BN/Ka) wurden unter basalen Bedingungen kultiviert und die angegebene mRNA mittels *real-time* PCR semiquantitativ analysiert. Dargestellt ist die basale mRNA-Expression, normalisiert auf 18S rRNA, in Prozenten (Mittelwerte \pm SD) relativ zur basalen mRNA-Expression in VSMCs von BN-Ratten.

3.7.2. Gespaltenes HK nimmt keinen Einfluss auf die basale MMP-2-Expression in VSMCs von Kininogen-defizienten Ratten

Hinsichtlich der erhöhten basalen MMP-2-mRNA-Expression in VSMCs von Kininogen-defizienten BN/Ka-Ratten sollte mit diesem Experiment untersucht werden, inwieweit diese durch exogen zugeführtes gespaltenes HK beeinflusst werden kann. Hierfür wurden die aus der BN/Ka-Ratte gewonnenen VSMCs bis zur Konfluenz kultiviert und zunächst einem Serumentzug für 24 h unterzogen. Anschließend erfolgte eine Behandlung der Zellen mit gespaltenem HK in den Konzentrationen 10 nM, 100 nM und 1 μ M für weitere 24 h. Die Ergebnisse der *real-time* PCR (Abbildung 3.23.) zeigen, dass die Behandlung der Zellen mit gespaltenem HK in den verschiedenen Konzentrationen keine signifikante Veränderung der MMP-2-mRNA-Expression im Vergleich zu den entsprechenden Expressionswerten un behandelter VSMCs hervorgerufen hat.

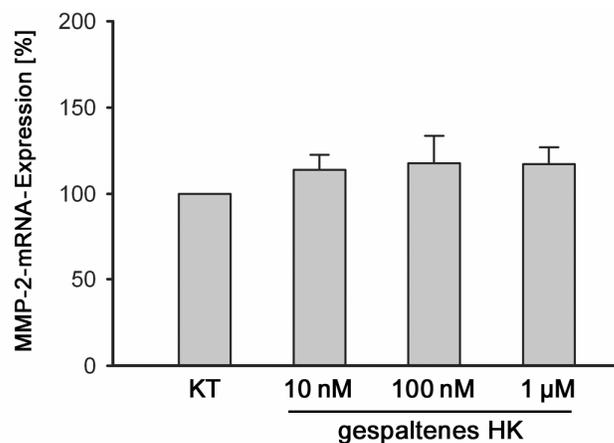


Abbildung 3.23. Einfluss von gespaltenem HK auf die basale MMP-2-mRNA-Expression in VSMCs von BN/Ka-Ratten. Die Mittelwerte \pm SEM der auf 18S rRNA normalisierten Expressionswerte sind angegeben in Prozenten relativ zur MMP-2-mRNA-Expression in den Zellen der Kontrollgruppe (KT).

3.8. Untersuchungen zur Expression des hochmolekularen Kininogens in VSMCs und in der Aorta der Ratte

3.8.1. Nachweis des hochmolekularen Kininogens auf Protein-Ebene

Mit den nachfolgend dargestellten Untersuchungen sollte die Frage geklärt werden, inwieweit eine Expression des hochmolekularen Kininogens (HK) in den aus der Aorta der Ratte isolierten VSMCs vorliegt. Diesen Untersuchungen lag die Arbeitshypothese zugrunde, dass eine Sekretion des HK durch VSMCs von Kininogen-defizienten BN/Ka-Ratten analog zur HK-Sekretion durch BN/Ka-Hepatozyten (siehe Abschnitt 1.5.) aufgrund der Mutation des Kininogen-Gens gestört sein könnte. Darüber hinaus sollte ermittelt werden, inwieweit das HK-Protein in der Aorta vorhanden ist.

Qualitative Analyse des durch VSMCs konditionierten Mediums

Zunächst wurde überprüft, ob eine Sekretion des HK durch VSMCs in das Zellkulturmedium vorliegt. Für diese Untersuchung wurden VSMCs von BN-Ratten verwendet, deren Hepatozyten eine normale Sekretion des HK aufweisen. Die BN-VSMCs wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen bis zur Konfluenz kultiviert, daraufhin zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 10 ml serumfreien Zellkulturmedium für 24 h inkubiert. Das durch die Zellen konditionierte Medium wurde daraufhin unter Verwendung einer Ultrafiltrationseinheit (Ausschlussgrenze: 10 kDa) zentrifugiert. Somit wurde eine Aufkonzentrierung der Probe in einem Verhältnis von 100:1 µl erzielt, die anschließend auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt wurde.

Abbildung 3.24. zeigt das mit Coomassie gefärbte Gel. Anhand der Position der Molekulargewichtsmarker wurden Banden ausgewählt, die im Bereich der Molekulargewichte des HK (120 kDa / Ausschnitt A) sowie der Kininogen *heavy-chain* (62 kDa / Ausschnitt B) liegen. Diese Banden wurden ausgeschnitten und von der Firma ProteomeFactory (Berlin, D) massenspektrometrisch analysiert. Durch den Abgleich der massenspektrometrischen Daten mit der Datenbank NCBI (Taxonomie *Rattus*) konnten 4 Proteine im Ausschnitt A sowie 5 Proteine im Ausschnitt B identifiziert werden. Unter den insgesamt 9 identifizierten Proteinen befand sich kein HK.

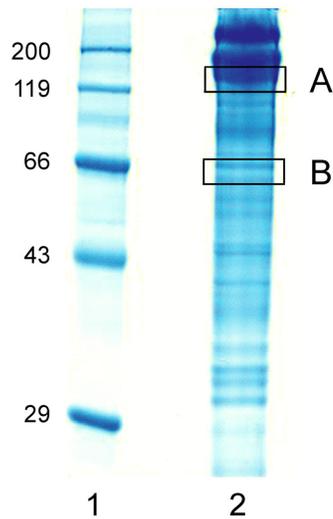


Abbildung 3.24. **Auswahl der Banden für die massenspektrometrische Analyse.**

1: Molekulargewichtsmarker

2: Konditioniertes Medium (100:1 aufkonzentriert)

Qualitative Analyse von Proteinextrakten der Leber, Aorta und VSMCs

Für diese Untersuchung wurden aus den Aorten von Ratten der Stämme Wistar, BN sowie BN/Ka isolierte VSMCs bis zur Konfluenz kultiviert und für 24 h in serumfreiem Zellkulturmedium inkubiert, bevor die Proteinextraktion erfolgte. Zudem wurden Proteinextrakte aus Gewebeproben der Leber und Aorta von Ratten der genannten Stämme gewonnen und im Rahmen dieser Untersuchung analysiert.

Äquivalente Mengen der Proteinextrakte (25 µg pro Probe) wurden auf ein 10%iges Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss an das Western Blotting erfolgte die Immundetektion auf HK mit einem polyklonalen anti-Kininogen-Antikörper, welcher im Abschnitt der Kininogen *heavy-chain* bindet.

Wie in Abbildung 3.25. gezeigt, resultierte die Analyse der Proteinextrakte der Leber, welche als Positivkontrollen verwendet wurden, in Banden bei ~62 kDa, was dem Molekulargewicht der Kininogen *heavy-chain* entspricht. Im Molekulargewichtsbereich des „vollständigen“ HK bei 120 kDa erfolgte keine Detektion, was darauf zurückzuführen ist, dass unter denaturierenden Bedingungen (95 °C, β-Mercaptoethanol) eine Fragmentierung des Proteins erfolgt, aus der die HK *heavy-chain* hervorgeht. Die Kininogen *heavy-chain* konnte zudem in den Proteinextrakten der Aorta von sowohl Wistar-, BN- als auch BN/Ka-Ratten

nachgewiesen werden, wobei die entsprechenden Banden bemerkenswert ausgeprägt waren. In den Proteinextrakten der untersuchten VSMCs konnte dagegen kein HK detektiert werden. Die Immundetektion des ubiquitär vorkommenden Enzyms Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) auf den jeweiligen Western Blots diente dabei als Ladungskontrolle und resultierte in entsprechenden Banden bei ~36 kDa.

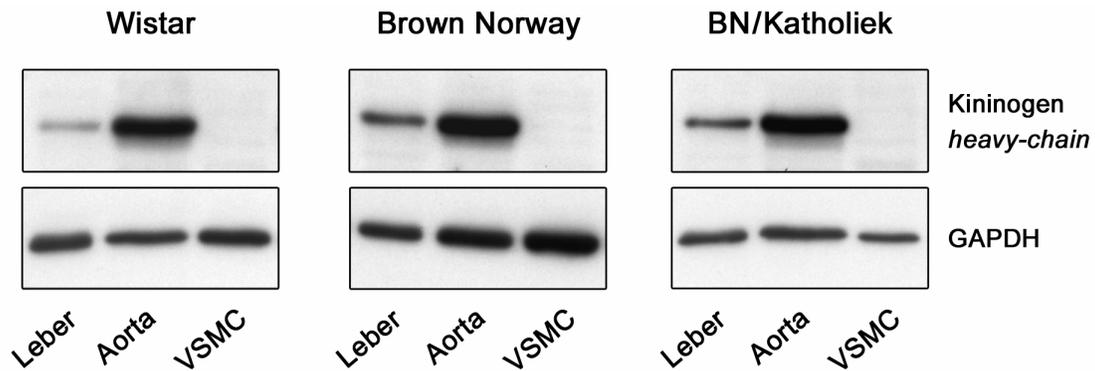


Abbildung 3.25. Detektion auf hochmolekulares Kininogen im Western Blot von Proteinextrakten der Leber, Aorta und VSMCs.

3.8.2. Qualitative Analyse der mRNA-Expression des hochmolekularen Kininogens

Hinsichtlich der zu untersuchenden mRNA-Expression des HK in VSMCs wurde in Erwägung gezogen, dass die HK-mRNA in nur geringer Menge vorhanden und daher nicht mit PCR-Standardprotokollen zu detektieren sei. Deshalb wurde für diese Untersuchung die *nested* PCR verwendet, die zwei aufeinander folgende PCRs mit einem außen liegenden bzw. einem innen liegenden Primerpaar umfasst (Abschnitt 2.2.3.5.).

```

1   AGAGGGAACCTTTAATCATGAAGCTAATTACTATCCTGCTCCTCTGCTCCAGGCTCCTGCCAAGTTTAGCGCAGGAAG
79  AAGATGCCCAAGAAATGGACTGCAATGATGAGAGTCTTTTTCAGGCTGTGGATACTGCTCTGAAGAAATATAATGCTG
157 GGTTAAAAAGTGGCAACCAGTTTGTGTTGTACCAAGTGACTGAGGGCACTAAGAAGGATGGCTCTAAAACATTTTATT
  ⋮
1015 ACGCAGAACTGACAGCAGATTTGTGAGACCAAACGCCTCGGTCAAAGCCTCAACTGCAATGCTAACGTGTACATGAGAC
1093 CTTGGGAGAACAAGTCGTCCCGACTGTCAAATGCAAAGTACTAGACATGACATCAGTGATAAGAAGGCCTCCAGGAT
1171 TTTCACCTTTCCGGGCACCTCGAGTGAAAAGCCTAAAGAAAGTACAACGTGTAAGTCCATCCTACATTGCCAGGGTGC
1249 AAGAAGAGAGGGATCCAGGAAATGAACAAGGACCCATCCATGGGCATGGGTGGTGCATGCAAAGCAAATAAAGAATA
1327 AGAATCACCAAGGTCATAAGCATGGGCATGGTATTGGCCATGGACACCAGAAACCACATGGCCTTGGTCATGGACATC
1405 AACTTAAACTTGATGATCTTAAACAGCAAAGGGAAGACGGCTATGACCATAGACATCCAGTGGGACATGGTCATGGTC
1483 AGAGGCATGGTCATGGTCATGGTCATGGTCACGGTCGTGATAAACACACAATAAAGACAAAAACAATGTCAAGCACA
1561 CTGACCAGAGAAGAGCACCTTTGACAAGCTCTTCTGAAGACAATACTACATCTACACAGATACAGGGGAGGACAGAGG
1639 GCTTACCTTGAACCCCTCCCCTAGCTCAGCCAGCTGTTATCTCTCGTGGTTTTTCAGGACTCAGGTTTCACTGAAGGTG
1717 TGATAGCTACCACATCACCATATGACACGGAGACCCATGATGATTTGATCCCTGATATCCATGTACAACCAGATAGCC
1795 TTTCATTTAAGCTGATATCTGACTTTCCAGAAGCAACTTCCCACAAAGTGTCTCTGGCGCCCATGGAAGCCAGTTAGTA
1873 GGAAGGATCCAACCATAGAAACAACAGAATTTTCTGATTTTGATCTCCTCGATGCTCTTTCTTAACCTTATACAGCGTA
1951 GGAATCTTTACAAATGCTTTCCAGCCTCTTTTTCTACTGCCAAACACAATATTTGTGACATAAGTCATCAAGCCAT
2029 GAGGCTCAGAACAGCCTGTCTAGTAGGACTTTATAAATCCCTGTGGACTGATAATAAAAACCTGCCATCCTTCTG

```

Abbildung 3.26. cDNA-Sequenz des hochmolekularen Kininogens.

Rot: Sequenzbereich identisch mit der cDNA des niedermolekularen Kininogens sowie hoch homolog zur cDNA der T-Kininogene I und II, Schwarz: Spezifischer Sequenzbereich für die HK-cDNA, Grau: Ausgewählter Bereich für die Amplifikation.

Die Sequenz der HK-mRNA ist in weiten Teilen identisch mit der mRNA-Sequenz des niedermolekularen Kininogens (NK), da beide Transkripte durch alternatives Spleißen aus einem gemeinsamen Primärtranskript hervorgehen. Zudem besteht in diesem Bereich in Bezug zur mRNA-Sequenz von T-Kininogen I und T-Kininogen II eine Homologie von 90 % bzw. 91 % (Furuto-Kato 1985). Dies ist insofern von Bedeutung, als dass in VSMCs die Expression der einzig in der Ratte vorkommenden T-Kininogene durch Stimulation mit verschiedenen Substanzen hervorgerufen werden kann (Okamoto 1998). Um eine spezifische Detektion der HK-mRNA bzw. HK-cDNA im Rahmen der *nested* PCR-Analytik zu gewährleisten, wurden daher Primer entworfen und für die Amplifikation verwendet, die

genau in dem Sequenzbereich hybridisieren, der die HK-cDNA von der NK-cDNA unterscheidet (Abbildung 3.26.).

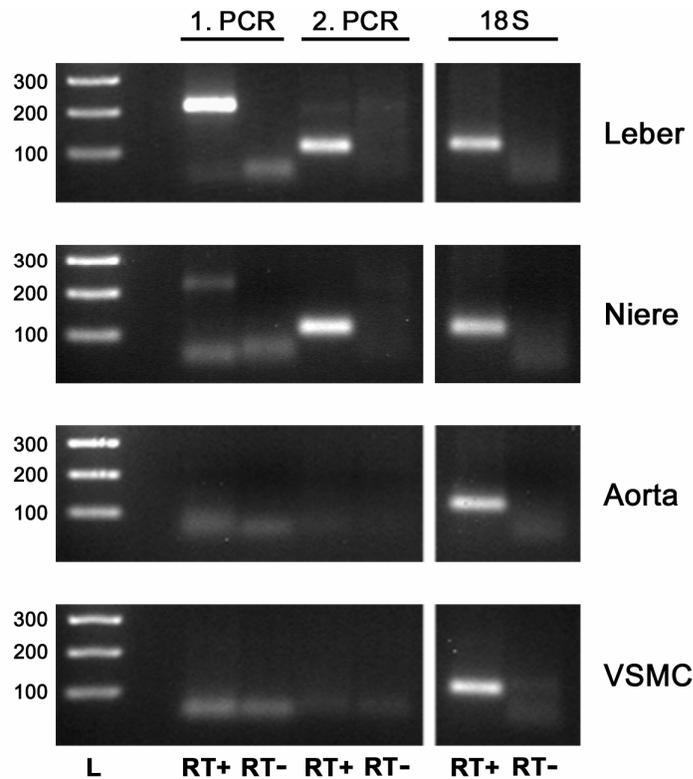


Abbildung 3.27. **Detektion der HK-mRNA mittels *nested* PCR.**

Dargestellt sind die elektrophoretisch aufgetrennten Produkte der Amplifikation mit außen (1. PCR) und innen liegenden Primern (2. PCR). L: 100 Bp DNA-Leiter, RT+: Produkt der reversen Transkription (cDNA), RT-: ohne Zugabe der Reversen Transkriptase (Negativkontrolle). Die simultane Amplifikation der 18S rRNA diente als interne Kontrolle.

Die HK-mRNA-Expression wurde in der Leber, Niere, Aorta und in VSMCs von Ratten der Stämme Wistar, BN und BN/Ka mittels der *nested* PCR qualitativ analysiert. Hierfür wurde die Gesamt-RNA aus den jeweiligen Gewebeproben und Zellen extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Zur Herbeiführung einer zellulären mRNA-Expression auf basalem Niveau wurden die aus der Aorta isolierten VSMCs zuvor bis zur Konfluenz kultiviert und dann für 48 h in Zellkulturmedium mit einem geringen FBS-Anteil (0.2%) inkubiert. Abbildung 3.27. zeigt repräsentative Ergebnisse der *nested* PCR-Analyse. Die cDNA der Leber sowie die der

Niere dienten im Rahmen dieser Untersuchung als Positivkontrollen, deren Verwendung in den erwarteten Amplifikaten von 204 und 101 Basenpaaren resultierte. Eine Amplifikation eventuell vorhandener genomischer DNA konnte ausgeschlossen werden, da die Verwendung entsprechender RT(-)-Kontrollen, die parallel zu den cDNA-Proben der analytischen Prozedur unterzogen wurden, keine Amplifikate hervorbrachte. Bei der Amplifikation der cDNA der Niere, in der im Vergleich zu anderen Organen eine geringe Expression der HK-mRNA vorliegt (Takano 2000), zeigte sich die mit der *nested* PCR bezweckte deutliche Verstärkung der Signalintensität durch die aufeinander folgenden Amplifikationen. Im Aortengewebe sowie in den kultivierten VSMCs von Ratten der verschiedenen Stämme konnte keine HK-mRNA detektiert werden. Eine Übersicht der für diese Untersuchung verwendeten Proben mit den entsprechenden Resultaten zeigt Tabelle 3.2.

	Leber	Niere	Aorta	VSMC 1/2*
Wistar	+	+	-	-/-
BN	+	+	-	-/-
BN/Ka	+	+	-	-/-

Tabelle 3.2. **HK-mRNA-Expression in Leber, Niere, Aorta und VSMCs.**

Resultate der Detektion auf HK-mRNA mittels *nested* PCR (+: positiv, -: negativ).

*1/2: stellvertretend für zwei separate VSMC-Kulturen (gewonnen aus verschiedenen Ratten des angegebenen Stammes)

4. Diskussion

4.1. Die Auswahl des Untersuchungsmodells

Durch die vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Formation abdominalen Aortenaneurysmen in Kininogen-defizienten Ratten ergaben sich erstmals Hinweise auf eine Beteiligung des hochmolekularen Kininogens an der Regulation von MMPs in der Aortenwand. Für die in der vorliegenden Arbeit diesbezüglich vorgenommenen Untersuchungen wurden primäre, aus der Aorta von Ratten gewonnene VSMCs im Rahmen eines *in vitro*-Zellkulturmodells verwendet.

VSMCs repräsentieren einen wesentlichen Bestandteil der zellulären Komposition der Aorta und den vorherrschenden Zelltyp in der *Tunica media*. Darüber hinaus exprimieren diese Zellen sowohl MMPs als auch TIMPs und sind somit wesentlich an der Regulation der lokalen MMP-Aktivität in der Gefäßwand beteiligt (siehe Abschnitt 1.3.). Daher stellen kultivierte VSMCs ein geeignetes Zellmodell dar, um Einflüsse auf die MMP-Regulation zu untersuchen, die übertragen auf die Situation *in vivo* von potentieller Relevanz für die MMP-Aktivität in der Aorta sein könnten. Generell sind die gut kontrollier- und standardisierbaren Bedingungen der Zellkultur vorteilhaft für die Untersuchung molekularer Mechanismen auf zellulärer Ebene. Dieses *in vitro*-Modell erlaubt zudem die Untersuchung eines Ausschnitts komplexer Regulationsmechanismen, ohne dass dabei die zusätzlich im Organismus auftretenden regulativen Einflüsse das Untersuchungsergebnis beeinträchtigen.

Der Entscheidung, gespaltenes HK anstelle des hochmolekularen Kininogens für die Untersuchungen zur MMP-Regulation zu verwenden, lagen hinsichtlich des verwendeten Zellmodells folgende Überlegungen zugrunde: Zum einen exprimieren kultivierte VSMCs das Enzym Kallikrein und sezernieren dieses in das Zellkulturmedium (Oza 1990). Somit müsste bei einer Behandlung der Zellen mit hochmolekularem Kininogen die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass im Verlauf des Experimentes ein nicht unerheblicher Teil des eingesetzten hochmolekularen Kininogens enzymatisch zu gespaltenem HK und Bradykinin umgesetzt wird. Zum anderen liegt in VSMCs eine Expression der Bradykinin-Rezeptoren vor (Kintsurashvili 2001). Durch die Verwendung von gespaltenem HK, dem die Bradykinin-Sequenz fehlt, konnten somit von vornherein Effekte ausgeschlossen werden, die

möglicherweise auf die Wirkung von Bradykinin zurückzuführen wären. In den Zellkultur-experimenten wurde gespaltenes HK in Konzentrationen von 10 nM – 1 µM eingesetzt. Dieser Konzentrationsbereich wurde in Orientierung an die physiologische Plasmakonzentration des hochmolekularen Kininogens im Menschen gewählt, für die ein Wert von 750 nM ermittelt wurde (Proud 1980).

4.2. Das gespaltene HK: Ein bioaktives Protein

Das hochmolekulare Kininogen wurde ursprünglich als Vorläuferprotein des Bradykinins identifiziert. Bradykinin, das zusammen mit dem gespaltenen HK aus der proteolytischen Spaltung des hochmolekularen Kininogens hervorgeht, ist an diversen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Während insbesondere im kardiovaskulären Kontext die Wirkungen des Bradykinins intensiv erforscht worden sind, ist über die physiologischen Auswirkungen, die mit der Entstehung des gespaltenen HK einhergehen, noch relativ wenig bekannt.

Die Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems in der Angiogenese betrachtend haben Guo *et al.* (2005) aufgezeigt, das die Spaltprodukte des hochmolekularen Kininogens direkt entgegengesetzte Wirkungen aufweisen, wobei Bradykinin als pro-angiogener Faktor agiert, und gespaltenes HK anti-angiogene Effekte hervorruft. Dabei stimmen die anti-angiogenen Effekte des gespaltenen HK mit der These überein, dass proteolytische Fragmente von bestimmten Plasmaproteinen oder Proteinen der extrazellulären Matrix eine Wirkung entfalten, die im Gegensatz zu der pro-angiogenen Signalkaskade steht, die die Spaltung dieser Proteine hervorruft (Wahl 2005). Weitere Beispiele hierfür sind das Angiostatin, ein 38 kDa Spaltprodukt des Plasminogens, und Endostatin, ein 20 kDa Carboxy-terminales Fragment von Kollagen XVIII. Beide Fragmente entstehen im Rahmen der tumorassoziierten Angiogenese und stellen für sich Inhibitoren der Angiogenese dar (O'Reilly 1994, O'Reilly 1997).

Das gespaltene HK und dessen physiologische Bedeutung sind erst seit kurzem in den Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt. In den bisher zu diesem Thema publizierten Studien konnte u.a. gezeigt werden, dass das gespaltene HK einen potenten

Inhibitor der Angiogenese darstellt (Zhang 2000, Zhang 2002, Liu 2008). Zudem hemmt es die Proliferation und Migration von Endothelzellen, ein Effekt, der weitestgehend über die Domäne 5 vermittelt wird, die infolge der Konversion vom hochmolekularen Kininogen zum gespaltenen HK stärker exponiert ist (Colman 2000). Insgesamt lässt sich aus den Resultaten dieser Studien schließen, dass das gespaltene HK weit mehr als „nur“ ein Nebenprodukt der Bradykinin-Genese ist und ein für sich bioaktives Protein darstellt, das zelluläre Effekte ausübt. Diese Annahme konnte durch die in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen zur Regulation von MMPs in VSMCs weiter bestärkt werden, deren Ergebnisse im Folgenden diskutiert werden.

4.3. Gespaltenes HK beeinflusst die Regulation von MMPs

Die Pathogenese des abdominalen Aortenaneurysmas ist gekennzeichnet durch einen drastischen Abbau der extrazellulären Matrix, eine erhöhte Aktivität von MMPs und der Präsenz eines chronisch inflammatorischen Infiltrates. Im Rahmen des normalen physiologischen Abbaus der extrazellulären Matrix unterliegt die Aktivität der involvierten MMPs einer engmaschigen Regulation, um einen überschießenden Abbau der extrazellulären Matrix zu vermeiden. Dabei verläuft die Regulation der Aktivität der MMPs im Wesentlichen auf drei Ebenen: 1) Regulation der Genexpression; 2) posttranslationale Aktivierung der proMMPs; 3) Inhibition der enzymatischen Aktivität durch endogene Inhibitoren, die TIMPs. Verschiedene endogene wie exogene Agenzien, darunter Wachstumsfaktoren, Hormone, Tumor-Promotoren sowie inflammatorische Zytokine, nehmen Einfluss auf die Regulation der Genexpression und führen zu einer verstärkten Expression und Sekretion von MMPs. Aufgrund der vielfach festgestellten erhöhten Mengen an verschiedenen Zytokinen in der aneurysmatisch veränderten Aorta wird in der Literatur die Hypothese diskutiert, dass die Überexpression von MMPs im Rahmen der Aneurysmenformation durch Zytokine hervorgerufen wird (McMillan 1997b).

Für die Untersuchung potentieller Effekte von gespaltenem HK auf die Expression von MMPs wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Stimulationsmodell der induzierten Expression von MMP-9 und MMP-2 in VSMCs etabliert. Zur Induktion der MMP-Expression

bot sich die Verwendung eines Zytokins an, um ein *in vitro*-Modell zur Verfügung zu haben, welches im Kontext mit den pathophysiologischen Prozessen *in vivo* steht. Dabei fiel die Wahl auf Interleukin-1 α (IL-1 α), da dieses Zytokin das Potential besitzt, in humanen venösen VSMCs sowohl die Freisetzung von MMP-9 zu induzieren, als auch die basale Sekretion von MMP-2 zu erhöhen (Galis 1994). In eigenen Experimenten konnten diese Effekte auch für primäre VSMCs, welche aus der Aorta der Ratte gewonnen wurden, demonstriert werden (Abschnitt 3.2.1.).

Unter Verwendung dieses *in vitro*-Modells Zytokin-stimulierter VSMCs konnte gezeigt werden, dass gespaltenes HK die induzierte MMP-9-Expression in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise reduziert (Abschnitt 3.3.). Dieser Effekt zeigte sich einerseits bei der Analyse des durch die Zellen konditionierten Mediums mittels Gelatine-Zymographie, wobei eine Abnahme der MMP-9-Sekretion in das Zellkulturmedium festgestellt werden konnte. Andererseits konnte mittels der *real-time* PCR-Analyse aufgezeigt werden, dass auch die entsprechende MMP-9-mRNA-Expression in einem nahezu gleichen Ausmaß durch gespaltenes HK verringert wird. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass der Effekt von gespaltenem HK auf die Zytokin-induzierte MMP-9-Expression in erster Linie auf eine negative Regulation auf der Ebene der MMP-9-mRNA zurückzuführen ist.

Hinsichtlich der ermittelten MMP-9-mRNA-Expressionslevels gilt es zu berücksichtigen, dass die quantitative mRNA-Analytik Aussagen über die *steady-state* Menge einer bestimmten mRNA zu einem bestimmten Zeitpunkt gewährt. Dabei wird die *steady-state* Menge sowohl von der Syntheserate (Transkription) wie auch dem Ausmaß der Degradation der mRNA im Zytoplasma der Zelle bestimmt. Eine Modifizierung der mRNA-Degradationsrate stellt dabei einen Regulationsmechanismus dar, über den die *steady-state* Menge der mRNA und somit auch das Ausmaß der Translation in Abhängigkeit von verschiedenen physiologischen Anforderungen an die Zelle beeinflusst werden kann. In diesem Zusammenhang konnten Eberhardt *et al.* (2002) zeigen, dass Agonisten des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors- α (PPAR α) die Zytokin-induzierte MMP-9-Expression über eine Verringerung des MMP-9 *steady-state* mRNA-Levels reduzieren und dass dieser Effekt auf eine Stickstoffmonoxid (NO)-vermittelte Erhöhung der Degradationsrate des MMP-9-Transkriptes zurückzuführen ist. Bei näherer Untersuchung dieses Effektes konnten Akool *et al.* (2003) feststellen, dass NO die Expression des mRNA-

Stabilisierungsfaktors HuR vermindert und infolgedessen die MMP-9-mRNA einer verstärkten Degradation unterliegt.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit der durch gespaltenes HK hervorgerufenen negativen Regulation der Zytokin-induzierten MMP-9-mRNA eine verstärkte Degradation der MMP-9-mRNA zugrunde liegen könnte. Die experimentelle Untersuchung mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D ergab, dass gespaltenes HK keinen Einfluss auf die Degradationsrate der MMP-9-mRNA nimmt (Abschnitt 3.3.3.). Somit ist die Reduktion des MMP-9-mRNA-Levels durch gespaltenes HK wahrscheinlich das Resultat einer verminderten Transkription.

Die Analyse der konditionierten Medien mittels Gelatine-Zymographie ließ zudem erkennen, dass neben der Sekretion der MMP-9 auch die MMP-2-Sekretion durch gespaltenes HK vermindert wurde. Dabei konnten infolge der simultanen Behandlung Zytokin-stimulierter VSMCs mit gespaltenem HK in der Konzentration 1 μM signifikant geringere MMP-2-Levels in den konditionierten Medien festgestellt werden (Abschnitt 3.4.1.). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Ergebnisse der zymographischen Analyse das Resultat einer direkten Interaktion des in den konditionierten Medien enthaltenen gespaltenen HK mit den MMPs und damit unabhängig von zellulären Prozessen sind, wurden Inkubationsexperimente in der Abwesenheit von Zellen durchgeführt (Abschnitt 3.4.3.). Hiermit konnte gezeigt werden, dass gespaltenes HK die gelatinolytische Eigenschaft sowohl von MMP-2 als auch von MMP-9 nicht beeinträchtigt. Zudem wurden die konditionierten Medien unter Verwendung eines spezifischen anti-MMP-2-Antikörpers im Western Blot analysiert, wodurch das Ergebnis der zymographischen Analyse verifiziert werden konnte. Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die festgestellten Effekte von gespaltenem HK auf die MMP-2-Sekretion aus einer negativen Regulation der zellulären Expression resultieren.

Für die Regulation der meisten MMPs wird die Beeinflussung der Transkription als der zentrale Prozess erachtet. Ausgenommen hiervon wird gemeinhin MMP-2, dessen Expression auf der Ebene der Transkription als nicht oder nur geringfügig regulierbar beschrieben wird (Chakraborti 2003, Jones 2003). Dies mag damit im Zusammenhang stehen, dass viele verschiedene Gewebe bzw. Zelltypen ohnehin eine stark ausgeprägte, konstitutive Transkription des MMP-2-Gens aufweisen, wobei dem MMP-2-Promoter einige Charakteristika eines *housekeeping*-Gens zugesprochen werden (Huhtala 1990). Durch die unter Abschnitt 3.4.2. dargestellte Untersuchung der MMP-2-mRNA-Expression wird diese

Beobachtung bestätigt. Dabei konnte mittels der *real-time* PCR-Analyse eine stark ausgeprägte, konstitutive Expression der MMP-2-mRNA in VSMCs festgestellt werden, die unter basalen Bedingungen kultiviert worden waren. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Effekten auf den MMP-2-Proteinlevel erfolgte weder durch die Stimulation der Zellen mit IL-1 α noch durch die simultane Behandlung mit gespaltenem HK eine Regulation der MMP-2 auf der Ebene der mRNA. Dies weist auf eine post-translationale Regulation der MMP-2 hin. Diese Annahme wird durch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zur MMP-2-Expression in VSMCs gestützt, in denen ebenfalls Effekte auf der Protein-Ebene festgestellt wurden, die jedoch nicht mit einer entsprechend veränderten mRNA-Expression korrelierten (Galis 1994, Luan 2003).

Die meisten MMPs werden als inaktive Proenzyme freigesetzt, welche erst im Rahmen eines proteolytischen Prozesses in ihre aktive Form überführt werden (Abschnitt 1.2.2.). Die Aktivierung von proMMPs stellt somit einen wesentlichen post-translationalen Regulationsmechanismus der MMP-Aktivität dar. Das Ergebnis der zymographischen Analyse wie auch das der Analyse konditionierter Medien im Western Blot ließ erkennen, dass gespaltenes HK eine gleichmäßige Abnahme sowohl der proForm, als auch der aktiven Form der MMP-2 hervorgerufen hatte und das Verhältnis aktives MMP-2/proMMP-2 in den konditionierten Medien weitestgehend unverändert blieb (Abschnitt 3.4.1.). Dies weist darauf hin, dass gespaltenes HK auf die Prozesse, die zur Aktivierung von proMMP-2 führen, keinen Einfluss nimmt. Weiterhin könnte hinsichtlich des Effekts von gespaltenem HK auf den MMP-2-Proteinlevel über eine verstärkte Degradation oder einer zunehmenden Entfernung von MMP-2 aus dem Extrazellularraum diskutiert werden. Diesbezüglich berichteten Emonard *et al.* (2004) über eine Rezeptor-vermittelte (*low density lipoprotein receptor-related protein*/LRP), endozytische Entfernung von MMP-2 aus dem konditionierten Medium von HT1080-Fibrosarkom-Zellen mit anschließender lysosomaler Degradation. Insgesamt ist allerdings über den Prozess des Abbaus von MMPs und insbesondere über dessen Stellenwert in der Regulation der MMP-Aktivität nur wenig bekannt.

Hinsichtlich des Potentials von MMPs diverse Komponenten der extrazellulären Matrix proteolytisch zu spalten, muss deren Interaktion mit spezifischen, endogen exprimierten MMP-Inhibitoren, den TIMPs, berücksichtigt werden. TIMPs binden an die katalytische Domäne aktiver MMPs und inhibieren somit deren enzymatische Aktivität (Brew 2000).

Folglich werden die Nettoaktivität der MMPs und der dadurch hervorgerufene Abbau der extrazellulären Matrix durch die lokale Balance zwischen MMPs und TIMPs bestimmt.

Die Bedeutung der TIMPs in der Regulation der MMP-Aktivität wird anhand von Studien deutlich, in denen unter Verwendung entsprechender *knock-out*-Modelle der Verlauf experimentell induzierter Aneurysmen untersucht wurde. So konnte im Vergleich zum Wild-Typ festgestellt werden, dass in TIMP-1- und in TIMP-2-*knock-out*-Mäusen induzierte zerebrale Aneurysmen (Aoki 2007) sowie in TIMP-1-*knock-out*-Mäusen induzierte Aortenaneurysmen (Ikonomidis 2004, Eskandari 2005) einen akzelerierten Verlauf aufweisen. Darüber hinaus erwies sich eine lokale TIMP-1-Überexpression in der Studie von Allaire *et al.* (1998) als ein protektiver Faktor, durch den die Degeneration und Ruptur der Aortenwand bei den im Rahmen dieser Studie experimentell induzierten Aortenaneurysmen in der Ratte verhindert werden konnten. Dabei wurden infolge der TIMP-1-Überexpression u.a. eine durch die Inhibition verursachte verminderte Aktivität der MMP-9 sowie der Erhalt von Elastinfasern festgestellt.

Interessanterweise konnte in zahlreichen Studien zur Expression von MMPs und TIMPs in humanen sowie in experimentell bei der Ratte induzierten Aortenaneurysmen neben der erhöhten Expression von MMPs auch eine starke Zunahme der Expression von TIMPs, vornehmlich TIMP-1, auf der mRNA- und Proteinebene festgestellt werden (Thompson 1995, Tamarina 1997, Annabi 2002, Kaito 2003, Nishimura 2003). Diese Beobachtung steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu der erhöhten proteolytischen Aktivität von MMPs, die im aneurysmatisch veränderten Gewebe vorhanden ist (Knox 1997). Dafür, dass es trotz der Hochregulation von TIMPs zu einer erhöhten Aktivität der MMPs kommt, gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze:

Kadoglou *et al.* (2004) schlagen vor, dass die Zunahme an TIMPs von einer umso stärkeren Expression der MMPs übertroffen und somit das MMP/TIMP-Gleichgewicht insgesamt zugunsten einer erhöhten proteolytischen Aktivität verschoben wird. Unterstützt wird diese Hypothese durch Bestimmungen von MMP/TIMP-mRNA-Quotienten, welche in Aneurysmen im Vergleich zum gesunden Gewebe erhöht sind (Tamarina 1997, Aoki 2007).

Tamarina *et al.* (1997) ziehen zudem die Möglichkeit in Betracht, dass das lokale Verhältnis von MMPs zu TIMPs ausschlaggebend sein könnte für die in einem bestimmten Areal auftretende Degradation der extrazellulären Matrix. Dabei wird von den Autoren berücksichtigt, dass aufgrund der unterschiedlichen zellulären Quellen der MMP- bzw. TIMP-

Expression in der Aortenwand das lokale Verhältnis von MMPs zu TIMPs verschiedenartig ausfällt. Diesbezüglich konnte anhand von Gewebeschnitten mittels *in situ*-Hybridisationsstudien eine unterschiedliche Lokalisation von TIMP-1 und MMP-9 in abdominalen Aortenaneurysmen demonstriert werden, wobei die Lokalisation von MMP-9 eine auf bestimmte Areale begrenzte Expression aufzeigte, wohingegen die TIMP-1-Expression eine eher diffuse Verteilung aufwies (McMillan 1995b).

Von den endogen im Säugerorganismus vorkommenden vier verschiedenen TIMPs (TIMP-1, -2, -3 und -4) werden von VSMCs der TIMP-1, TIMP-2 sowie der TIMP-3 exprimiert. Die als konstitutiv beschriebene TIMP-2-Expression in VSMCs (Fabunmi 1996, Galis 1994) konnte durch die in dieser Arbeit vorgenommene Untersuchung zur TIMP-2-mRNA-Expression in IL-1 α -stimulierten VSMCs bestätigt werden. Die Expression von TIMP-1 in VSMCs wird teils als konstitutiv (Fabunmi 1996, Galis 1994), teils als induzierbar (Fabunmi 1998) beschrieben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine deutliche Zunahme der TIMP-1-mRNA infolge der Stimulation mit IL-1 α und weisen somit auf eine induzierbare TIMP-1-Expression in VSMCs hin (Abschnitt 3.5.). Interessanterweise bewirkte die simultane Behandlung mit gespaltenem HK eine weitere Zunahme der Zytokin-induzierten TIMP-1-mRNA-Expression. Dies lässt darauf schließen, dass gespaltenes HK neben der Beeinflussung der Expression von MMP-9 und -2 auch auf der Ebene der Inhibition durch TIMPs Einfluss auf die Regulation von MMPs nimmt.

Analog zu der bereits beschriebenen Situation in Aneurysmen konnte auch *in vitro* in VSMCs infolge der Stimulation mit IL-1 α eine erhebliche Zunahme des MMP-9/TIMP-1-mRNA-Quotienten festgestellt werden (Abschnitt 3.6.1.). Die durch gespaltenes HK hervorgerufene signifikante Abnahme des Quotienten in Zytokin-stimulierten VSMCs deutet darauf hin, dass gespaltenes HK das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs beidseitig beeinflusst. Da sich Veränderungen der mRNA-Expression nicht zwangsläufig auch auf der Proteinebene widerspiegeln und diese zudem keine Rückschlüsse auf die Interaktion von MMPs und TIMPs erlauben, wurde die MMP-Nettoaktivität in den konditionierten Medien bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen abnehmende MMP-Aktivitätslevels in den konditionierten Medien von Zytokin-stimulierten VSMCs, die mit gespaltenem HK behandelt wurden (Abschnitt 3.6.2.).

Somit konnte gezeigt werden, dass gespaltenes HK in diesem *in vitro*-Modell insgesamt eine Abnahme der enzymatischen Aktivität der MMPs bewirkt, welche hinsichtlich des Abbaus

der extrazellulären Matrix durch MMPs die ausschlaggebende Determinante darstellt. Zusammengefasst lassen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse die Annahme zu, dass die negative Regulation der Expression und Aktivität von MMPs durch gespaltenes HK dazu beitragen könnte, *in vivo* die extrazelluläre Matrix vor einem überschießenden Abbau im Kontext physiologischer und pathophysiologischer vaskulärer Prozesse zu bewahren. Im Umkehrschluss wird somit die Hypothese gestützt, dass ein Kininogen-Mangel und eine damit verbundene fehlende negative Regulation durch gespaltenes HK zu einer erhöhten Aktivität von MMPs in der Aortenwand führt.

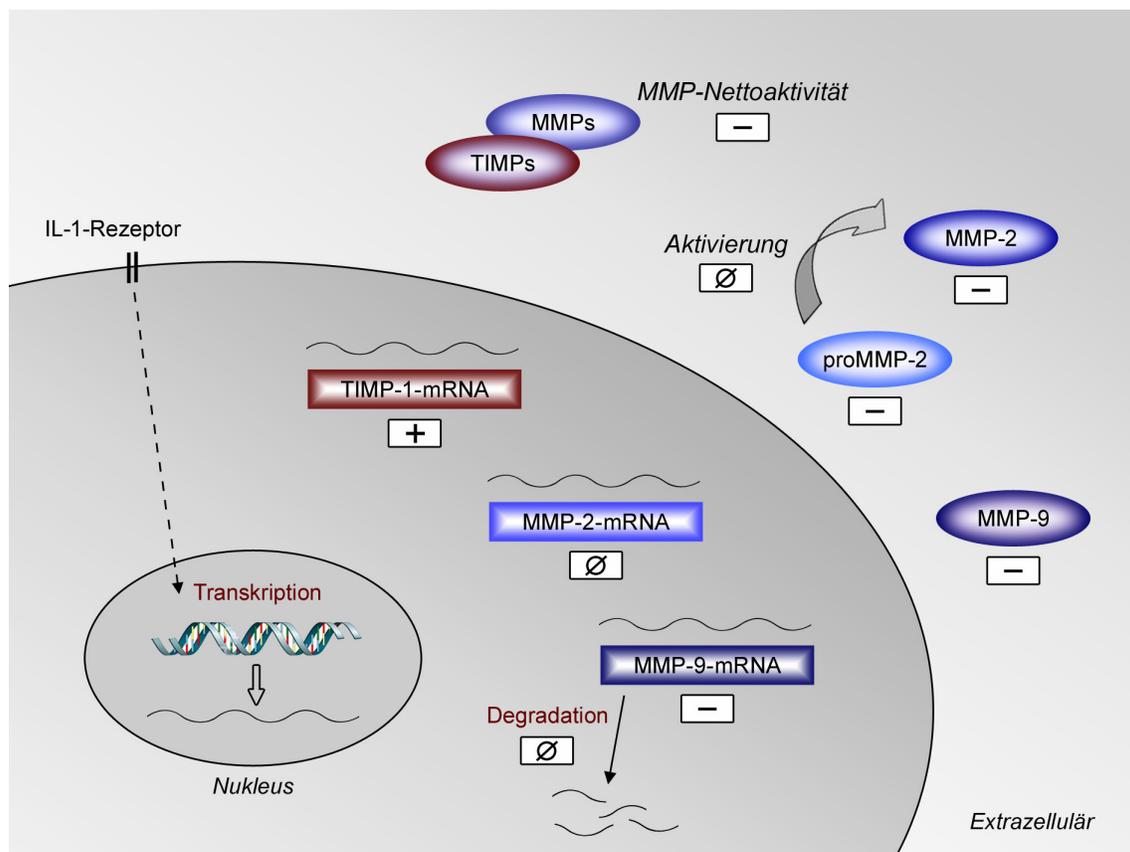


Abbildung 4.1. Schematische Darstellung der Effekte des gespaltenen HK auf die MMP-Regulation in Zytokin-stimulierten VSMCs (+: positive Regulation, -: negative Regulation, Ø: kein Effekt).

4.4. Die Effekte des gespaltenen HK: Potentielle Mechanismen in vaskulären Zellen

Hinsichtlich der Effekte von gespaltenem HK auf die Regulation von MMPs in VSMCs stellt sich die Frage nach dem Mechanismus, über den diese vermittelt werden. Eine inhibitorische Wirkung des gespaltenen HK auf die durch die Ligandenbindung von IL-1 α an den IL-1-Rezeptor ausgelöste Signaltransduktion erscheint angesichts der Effekte auf die Zytokin-induzierte Expression von MMP-9 und MMP-2 plausibel. Andererseits lässt sich damit die durch gespaltenes HK hervorgerufene Zunahme der Zytokin-induzierten TIMP-1-Expression nicht erklären. Wie unter Abschnitt 3.5. beschrieben bewirkt gespaltenes HK alleine keine Zunahme der basalen TIMP-1-Expression, was auf einen zumindest in Abhängigkeit zur IL-1 α -Stimulation stehenden Effekt schließen lässt.

Allgemein ist eine Diskussion über einen potentiellen Mechanismus nach dem derzeitigen Forschungsstand nur begrenzt möglich, da über die Wirkung von gespaltenem HK auf zelluläre Prozesse in VSMCs nur sehr wenig bekannt ist und zudem eine spezifische Bindungsstelle für gespaltenes HK in VSMCs noch nicht identifiziert wurde. Dahingegen sind mehrere Proteine der Zellmembran von Endothelzellen identifiziert worden, an die HK und/oder gespaltenes HK bindet, darunter der Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPAR) (Colman 1997), Tropomyosin (Zhang 2002), der globuläre C1q-Rezeptor (Herwald 1996) und Zytokeratin-1 (Hasan 1998). Neben der Bindung von gespaltenem HK an Tropomyosin konnte in der Studie von Zhang *et al.* (2002) zudem gezeigt werden, dass über diese Interaktion der inhibitorische Effekt von gespaltenem HK auf die Angiogenese von Endothelzellen vermittelt wird. Hinsichtlich der Interaktion von gespaltenem HK mit dem uPAR ergaben weitere Untersuchungen, dass sich diese Interaktion störend auf die Bildung eines Signalkomplexes auswirkt, der aus dem uPAR, dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ und Caveolin besteht (Cao 2004). Infolgedessen wird die durch diesen Signalkomplex vermittelte Signaltransduktion beeinträchtigt, was anhand der Regulation mehrerer Effektorproteine im Zusammenhang mit der Wirkung von gespaltenem HK auf Migration und Proliferation in Endothelzellen aufgezeigt werden konnte (Wu 2007, Liu 2008).

Der Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor wird von VSMCs exprimiert (Dumler 1998) und ist zudem im Rahmen des Plasminogen-Aktivator-Systems an dem Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt (Behrendt 2004). Weitere Untersuchungen sind erforderlich,

um zu ermitteln, inwieweit der uPAR an einer Vermittlung der Effekte von gespaltenem HK auf die Regulation von MMPs in VSMCs beteiligt sein könnte, oder aber hierfür andere, noch nicht identifizierte Interaktionspartner in Frage kommen.

4.5. Basale MMP-Expression in VSMCs von Kininogen-defizienten Ratten

Hinsichtlich der in Ratten des Stammes Brown Norway Katholiek (BN/Ka) auftretenden Kininogen-Defizienz im Blutplasma weisen die vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Kininogen-Defizienz und der Prädisposition für die Entstehung abdominaler Aortenaneurysmen (AAA) hin (siehe Abschnitt 1.5.). Dabei sind die hierfür zugrunde liegenden Mechanismen noch weitgehend unbekannt.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene Bestimmung der basalen Expression von MMPs und TIMPs in VSMCs, die aus der Aorta von Kininogen-defizienten BN/Ka-Ratten kultiviert wurden, zeigt interessanterweise eine deutlich erhöhte basale mRNA-Expression von MMP-2 sowie TIMP-2 auf (Abschnitt 3.7.1.). Dabei erfolgte die Bestimmung der basalen Expressionswerte relativ zu denen in VSMCs von Brown-Norway-Ratten (BN), welche normale Kininogen-Plasmakonzentrationen aufweisen und aufgrund des gemeinsamen genetischen Hintergrundes der beiden Stämme für diesen Vergleich herangezogen wurden.

Die erhöhte basale MMP-2-Expression ist insofern von Bedeutung, als dass dieser Matrixmetalloproteinase eine möglicherweise entscheidende Rolle in der Ätiologie des AAA zugesprochen wird (Thompson 2006). In der Studie von Davis *et al.* (1998) konnte festgestellt werden, dass die MMP-2-Expression im pathologisch veränderten Aortengewebe in der Reihenfolge gesundes Gewebe < Arteriosklerose < Aneurysma zunimmt. Zudem konnten bei einem Vergleich arteriosklerotisch und aneurysmatisch veränderter Aorten verschiedenartige Muster bezüglich der Lokalisation von MMP-2 in den Geweben aufgezeigt werden (McMillan 1995a). Dies weist auf eine zentrale Rolle dieses Enzyms hinsichtlich der für die Aneurysmenformation charakteristischen strukturellen Veränderungen hin. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in der frühen Phase der Formation des AAA eine verstärkte Expression und Aktivität von MMP-2 vorliegt (Freestone 1995, Nishimura 2003). Kaito *et al.*

(2003) ziehen es daher in Betracht, dass der Prozess der Entstehung des AAA mit einer lokal erhöhten MMP-2-Aktivität beginnt, die den Abbau von Elastin zur Folge hat. Dieser These folgend könnte über freigesetzte Elastin-Fragmente ein inflammatorisches, zelluläres Infiltrat angezogen werden, welches dann zum weiteren Abbau der extrazellulären Matrix und zum Verlust der Gefäßwandstabilität führt.

Die Funktion von TIMP-2 hinsichtlich der post-translationalen Regulation der MMP-2-Aktivität scheint komplex. Einerseits fungiert TIMP-2 als physiologischer Inhibitor von MMPs und bindet mit hoher Affinität an MMP-2 (Olson 1997). Andererseits spielt TIMP-2 eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von proMMP-2 auf der Zelloberfläche (Butler 1998, Strongin 1995). Dabei bindet proMMP-2 an einen Komplex bestehend aus TIMP-2 und der membranständigen MMP-14 (MT1-MMP), infolgedessen proMMP-2 zu aktivem MMP-2 gespalten wird (Kinoshita 1998, Worley 2003). Alle drei Komponenten dieses Systems sind in der *Tunica media* der Aorta vorhanden (Crowther 2000a). Somit scheint TIMP-2 eine Schlüsselfunktion in der Regulation der MMP-2-Aktivität im Aortengewebe einzunehmen. Die hieraus resultierenden pathophysiologischen Implikationen werden anhand der Studie von Xiong *et al.* (2006) deutlich, in der bei TIMP-2-*knock-out*-Mäusen im Vergleich zum Wild-Typ eine verminderte Aneurysmenformation verbunden mit einer geringeren MMP-2-Aktivität beobachtet wurde.

Hinsichtlich der Ursachen für die erhöhte Genexpression von MMP-2 und TIMP-2 in den untersuchten VSMCs liegt die Vermutung nahe, dass diese durch das Kininogen-Defizit in der Blutzirkulation von BN/Ka-Ratten hervorgerufen wird. Dabei gilt es allerdings zu berücksichtigen, dass die Untersuchung der basalen Expression anhand von kultivierten Zellen erfolgte und somit ein direkter bzw. zeitnaher Einfluss der Kininogen-Defizienz *in vivo* nicht mehr gegeben war. Wie eingangs bereits erwähnt, liegt dem Kininogen-Defizit im Blutplasma von BN/Ka-Ratten eine stark verringerte Sekretion von Kininogenen durch Hepatozyten in die Zirkulation zugrunde. Dabei ist in den Hepatozyten von BN/Ka-Ratten generell eine Synthese der Kininogene vorhanden, bedingt durch die Mutation im Kininogen-Gen werden diese jedoch kaum sezerniert (Abschnitt 1.5.). Daher wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass analog zu den Hepatozyten ein Sekretionsdefizit des hochmolekularen Kininogens in den VSMCs von BN/Ka-Ratten vorliegt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die aus der Aorta von Ratten kultivierten VSMCs das Enzym Gewebe-Kallikrein exprimieren (Oza 1990), könnte dieses Sekretionsdefizit im Rahmen der Zellkultur mit einer

verminderten Bildung des gespaltenen HK einhergehen und sich insgesamt, im Sinne einer gestörten autokrinen Regulation, auf die basale MMP-Regulation der Zellen auswirken. Dieser Arbeitshypothese folgend wurde zunächst ermittelt, inwieweit eine Expression des hochmolekularen Kininogens in VSMCs vorliegt. Die diesbezüglich vorgenommenen Untersuchungen zeigten jedoch eindeutig, dass die kultivierten VSMCs verschiedener Rattenstämme weder hochmolekulares Kininogen in das Zellkulturmedium sezernieren noch dass eine Expression dessen auf Protein- und mRNA-Ebene in den Zellen vorliegt (Abschnitt 3.8.), so dass diese Arbeitshypothese widerlegt werden konnte.

Insofern liegt die Vermutung nahe, dass die permanente Kininogen-Defizienz *in vivo* zu einer Modifikation der MMP-2-Regulation in VSMCs führt, z.B. über epigenetische Mechanismen, und diese auch im Rahmen der Kultur dieser Zellen *ex vivo* bestehen bleibt. Hierfür spricht auch, dass gespaltenes HK bei einer kurzzeitigen Behandlung von 24 h keine Auswirkungen auf die erhöhte basale MMP-2-mRNA-Expression in VSMCs von BN/Ka-Ratten genommen hat (Abschnitt 3.7.2.). Die These von einer *in vivo* erfolgten Modifikation der MMP-Regulation in VSMCs der Aorta, welche auch *ex vivo* weiterhin Bestand hat, wird durch die Untersuchungen von Crowther *et al.* (2000b) sowie Patel *et al.* (1996) gestützt, in denen VSMCs aus humanen AAA gewonnen wurden und diese unter basalen Zellkulturbedingungen eine erhöhte MMP-2-Expression aufwiesen.

Die erhöhte basale MMP-2- und TIMP-2-Expression in VSMCs von BN/Ka-Ratten deutet insgesamt darauf hin, dass eine latent erhöhte MMP-2-Aktivität in der Aorta bestehen und diese der Prädisposition für die Entstehung des AAA zugrunde liegen könnte. Weitere Untersuchungen zur MMP-Aktivität vor Beginn sowie in den verschiedenen Stadien der Aneurysmenformation in BN/Ka-Ratten könnten hierüber Aufschluss gewähren.

Allgemein stellen die BN/Ka-Ratten ein interessantes Modell für die Untersuchung der Beteiligung von MMPs an der Entstehung und Progression des AAA dar. Die zu diesem Thema aus der Literatur hervorgehenden Erkenntnisse basieren zum größten Teil auf Studien, in denen humane AAA untersucht wurden. Die hierfür verwendeten Gewebeproben entstammen weitestgehend chirurgischen Eingriffen, bei denen eine Resektion des Aortengewebes vorgenommen wurde oder aus Biopsien des AAA, die im Rahmen elektiver Eingriffe zur Stabilisierung des Gefäßes durchgeführt worden sind. Somit repräsentieren diese Gewebeproben ein weit fortgeschrittenes bzw. das Endstadium der pathologischen Prozesse, die zur Aneurysmenformation führen. Die molekularbiologischen Untersuchungen humaner

Gewebeproben haben zwar maßgeblich zur Aufklärung der Pathogenese des AAA und der Beteiligung von MMPs beigetragen. Allerdings lässt sich hinsichtlich der dabei identifizierten Determinanten der Pathogenese des AAA nur schwer zwischen primären und sekundären Prozessen differenzieren, so dass Aussagen über die ätiologischen Faktoren, die der Entstehung des AAA zugrunde liegen, nur begrenzt möglich sind.

Ein weiterer Forschungsansatz stellt das induzierte AAA im Tiermodell dar. Hierbei wird die Aorta mit bestimmten Chemikalien behandelt, wodurch degenerative Prozesse in der Gefäßwand initiiert werden, in deren Folge das Gefäß dilatiert. Häufig wird ein Verfahren verwendet, bei dem zunächst eine Ligatur des infrarenalen Abschnitts der Aorta vorgenommen und dann das Gefäß für wenige Minuten intraluminal mit Elastase perfundiert wird (Anidjar 1990). Die somit innerhalb weniger Tage entstehenden Aneurysmen weisen zwar einige charakteristische Merkmale der Pathogenese des AAA auf, stellen jedoch artifizielle Modelle mit einem geringen Bezug zur normalen Pathophysiologie der Entstehung des AAA dar. Aufgrund der gut standardisierbaren Bedingungen findet das Tiermodell des induzierten AAA unter anderem breite Anwendung in Studien, in denen Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Effekte auf die Entstehung und Progression des AAA untersucht werden (siehe Abschnitt 4.7.). Im Hinblick auf die Erforschung der pathologischen Mechanismen, die der Entstehung des AAA zugrunde liegen, sowie zur Klärung der Frage, inwieweit die Dysregulation von MMPs einen ätiologischen Faktor darstellt, könnten Studien mit BN/Ka-Ratten als Untersuchungsmodell des AAA neue Erkenntnisse liefern.

4.6. Präsenz der Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems in der Aorta

Die in der Literatur vorhandenen Angaben zur Expression des hochmolekularen Kininogens in VSMCs weisen sich widersprechende Untersuchungsergebnisse auf. In der Studie von Okamoto *et al.* (1998) konnte die mRNA des hochmolekularen Kininogens in VSMCs, die aus der Aorta von Sprague-Dawley-Ratten kultiviert wurden, nicht nachgewiesen werden. Zudem konnte weder die mRNA des hochmolekularen Kininogens noch die des niedermolekularen Kininogens im Gewebe des glatten Muskels der Aorta detektiert werden. Dem stehen die Ergebnisse der Untersuchungen von Oza *et al.* (1990) zur Expression von

Kininogen in VSMCs auf Protein-Ebene gegenüber. Diese zeigen eine Detektion von Kininogen sowohl in den Zelllysaten von primären, aus der Aorta von Sprague-Dawley-Ratten kultivierten VSMCs wie auch in dem von den Zellen konditionierten Medium. Die Detektion erfolgte dabei über die Quantifizierung des freigesetzten Bradykinins unter Verwendung eines ^{125}I -Bradykinin-Radioimmunoassays, nachdem die Proben einer Behandlung mit Trypsin im Überschuss unterzogen wurden. Diese Methode stellt allerdings einen nur indirekten Nachweis dar und lässt auch nicht zwischen hoch- und niedermolekularem Kininogen differenzieren, was erklärt, warum die Autoren der Studie diesbezüglich auch keine Differenzierung vorgenommen haben.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen eindeutig, dass hochmolekulares Kininogen von den untersuchten VSMCs nicht exprimiert wird. Dabei wurde hinsichtlich der Studie von Okamoto *et al.* (1998) in Erwägung gezogen, dass die mRNA gegebenenfalls in nur geringer Menge exprimiert wird und daher nicht leicht mit PCR-Standardprotokollen zu detektieren sei. Daher wurde für diese Untersuchung die Methode der *nested* PCR verwendet, welche einen äußerst sensitiven und spezifischen Nachweis auch von nur in geringen Mengen vorhandener Transkripte erlaubt. Bei der Analyse mehrerer VSMC-Kulturen, die aus der Aorta verschiedener Ratten gewonnen wurden, konnte keine mRNA des hochmolekularen Kininogens im Vergleich zur Positivkontrolle Leber detektiert werden (Abschnitt 3.8.2.). Das gleiche Ergebnis ging aus der Analyse des Aortengewebes hervor, womit gezeigt werden konnte, dass auch *in vivo* keine mRNA-Expression des hochmolekularen Kininogens in VSMCs vorliegt. Davon ableitend kann zudem ein potentiell möglicher Verlust der Expression in den Zellen *in vitro* aufgrund der artifiziellen Bedingungen der Zellkultur ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu der Studie von Oza *et al.* (1990) konnte auch auf der Proteinebene weder das hochmolekulare Kininogen in VSMCs nachgewiesen noch dessen Sekretion in das Zellkulturmedium festgestellt werden. Dies geht aus den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse des durch die Zellen konditionierten Mediums sowie aus der Analyse der Zelllysate im Western Blot hervor (Abschnitt 3.8.1.).

Hinsichtlich der in dieser Arbeit dargelegten Effekte von gespaltenem HK auf die MMP-Regulation in den aus der Aorta isolierten und kultivierten VSMCs stellt sich somit die Frage, inwiefern das hochmolekulare Kininogen bzw. das gespaltene HK für VSMCs *in vivo* in der *Tunica media* der Aorta verfügbar ist. Die im Blutplasma gegenwärtigen Kininogene sowie

das Plasma-Prekallikrein werden von der Leber gebildet und in die Blutzirkulation sezerniert (siehe Abschnitt 1.4.1. und 1.4.2.). Infolge der Kontaktaktivierung des Plasma-Kallikrein-Kinin-Systems auf zellulären Oberflächen wird Prekallikrein zu Kallikrein aktiviert und spaltet sukzessiv das hochmolekulare Kininogen zu Bradykinin und gespaltenem HK. Dabei stellt die Oberfläche von Gefäßendothelzellen einen bedeutenden Ort der Entstehung von Bradykinin und gespaltenem HK dar (Motta 1998, Nishikawa 1992). Neben dem Plasma-Kallikrein-Kinin-System existiert eine Reihe von lokalen Kallikrein-Kinin-Systemen in verschiedenen Geweben. So konnte die Expression von Gewebe-Kallikrein sowie Kininogenen in der Niere (Chen 1995, Hermann 1996), Nebenniere (Wang 1996), Schweißdrüse (Poblete 1991) und in der Lunge (Planque 2005, Takano 2000) nachgewiesen werden. Allgemein gilt das Kallikrein-Kinin-System des Gewebes als Hauptentstehungsort von Kininen. Diese Annahme geht unter anderem aus der Bestimmung von Bradykinin-Konzentrationen in verschiedenen Geweben der Ratte hervor, welche im Vergleich zur Bradykinin-Konzentration im Blutplasma um ein Vielfaches höher sind (Campbell 1993b). Interessanterweise konnte dabei eine besonders hohe Bradykinin-Konzentration in der Aorta festgestellt werden.

Hinsichtlich eines lokalen Kallikrein-Kinin-Systems in der Aorta konnten Wolf *et al.* (1999) eine Expression des Gewebe-Kallikreins durch humanes vaskuläres Gewebe nachweisen und anhand von histologischen Untersuchungen der Aorta das Gewebe-Kallikrein sowohl in Endothelzellen wie auch in VSMCs lokalisieren. Mit der Expression des Gewebe-Kallikreins könnten VSMCs somit lokal auf die Bildung von Bradykinin und gespaltenem HK regulierend Einfluss nehmen, was dafür spricht, dass hochmolekulares Kininogen und gespaltenes HK für VSMCs in der *Tunica media* verfügbar sind. Diese These wird ferner durch die Feststellung von Fernando *et al.* (2005) gestützt, dass hochmolekulares Kininogen auf der Oberfläche von kultivierten VSMCs zu binden vermag und in Gegenwart von Prekallikrein die Bildung von Bradykinin erfolgt.

Schmaier *et al.* (1988) konnten eine Expression des hochmolekularen Kininogens in humanen Endothelzellen aus der Nabelschnur *in vitro* nachweisen. Dies weist auf die Möglichkeit hin, dass hochmolekulares Kininogen von Endothelzellen der Aorta gebildet und im Sinne eines parakrinen Mechanismus in der *Tunica media* zur Wirkung kommt. Die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen qualitativen Analyse der mRNA-Expression des hochmolekularen Kininogens (Abschnitt 3.8.2.) zeigen jedoch eindeutig auf, dass das

hochmolekulare Kininogen im Aortengewebe nicht exprimiert wird und somit seine lokale Synthese durch die Endothelzellen der Aorta ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Analyse der mRNA-Expression konnte das hochmolekulare Kininogen jedoch interessanterweise auf Protein-Ebene im Aortengewebe nachgewiesen werden (Abschnitt 3.8.1.) Somit liegt die Vermutung nahe, dass das im Aortengewebe detektierte hochmolekulare Kininogen der Blutzirkulation entstammt.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um Kenntnisse darüber zu gewinnen, inwieweit das gespaltene HK für VSMCs in der *Tunica media* unter physiologischen Bedingungen verfügbar ist. Des Weiteren könnten Aktivitätsbestimmungen des Gewebe-Kallikreins sowie Konzentrationsbestimmungen von lokal gebildetem gespaltenen HK dazu beitragen, Erkenntnisse über die Rolle des lokalen Kallikrein-Kinin-Systems der Aorta im Kontext pathophysiologischer Prozesse zu gewinnen.

4.7. MMPs & abdominale Aortenaneurysmen: Pharmakotherapeutische Optionen

Die erhöhte Aktivität von MMPs steht in enger Verbindung mit den strukturellen Veränderungen in der Aortenwand, die der Entstehung und Progression des abdominalen Aortenaneurysmas (AAA) zugrunde liegen (siehe Abschnitt 1.1.). Dabei geht die erhöhte MMP-Aktivität zum einen auf eine Dysregulation solcher MMPs zurück, die auch an der physiologischen Proteolyse der EZM beteiligt sind. Zum anderen wird die Expression bestimmter MMPs erst im Rahmen der Pathogenese des AAA induziert, wodurch insgesamt die Anzahl verschiedenartiger MMPs zunimmt. Hieraus ergeben sich rationale Ansätze für eine pharmakologische Intervention, die auf die Regulation der beteiligten MMPs abzielt.

Die direkte Inhibition proteolytisch aktiver MMPs stellt dabei einen naheliegenden Ansatz dar. Eine mittels gentherapeutischer Verfahren erzielte lokale Überexpression von TIMPs, den endogenen Inhibitoren der MMPs, erwies sich im Tiermodell als effektive Strategie zur Behandlung von verschiedenen kardiovaskulären und Tumorerkrankungen (Baker 2002). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine lokale TIMP-1-Überexpression im Aortengewebe die Entstehung von Aneurysmen verhindert (Allaire 1998). Für die

konventionelle Pharmakotherapie sind TIMPs allerdings wenig geeignet, da es sich um Proteine mit einer geringen Halbwertszeit *in vivo* handelt (Wojtowicz-Praga 1997). In den 1990er Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, synthetische MMP-Inhibitoren (MMPI) zu entwickeln und diese als kurative oder adjuvante Medikation in der Therapie von Tumorerkrankungen einzuführen. Aus der Entwicklung synthetischer MMPI sind zahlreiche Substanzen mit unterschiedlichen strukturellen Elementen hervorgegangen. Dabei wurde u.a. ein Substrat-basierter Ansatz verfolgt, bei dem die Proteinstruktur des Kollagens zugrunde gelegt und der Abschnitt imitiert wurde, der die Spaltstelle für MMPs aufweist. Zu den prominentesten Vertretern dieser Substanzklasse mit einer Peptid-imitierenden Struktur zählen Batimastat und Marimastat. Die Grundstruktur beider Substanzen weist eine Hydroxamat-Gruppe als funktionelle Gruppe auf, über die das Zinkion im aktiven Zentrum der MMPs unter Bildung eines Chelatkomplexes gebunden wird. Batimastat und Marimastat sind starke Inhibitoren der Enzymaktivität verschiedener MMPs. *In vitro* inhibieren sie die MMP-1, -2, -3, -7 und -9 mit IC₅₀-Werten im Bereich von 1-20 nM für Batimastat bzw. 3-230 nM für Marimastat (Wojtowicz-Praga 1997). Aufgrund ihrer geringen Spezifität innerhalb der MMP-Enzymfamilie werden sie auch als Breitband-MMPI bezeichnet. Batimastat war der erste synthetische MMPI, der Einzug in die klinische Prüfung am Menschen fand. Aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit konnte Batimastat jedoch nicht peroral appliziert werden (Wojtowicz-Praga 1996). Dieser Nachteil konnte mit der Entwicklung von Marimastat überwunden werden, welches nach peroraler Applikation rasch absorbiert wird (Millar 1998).

Während die präklinischen Untersuchungen dieser und anderer synthetischer MMPI erfolgversprechende Resultate aufwiesen und damit hohe Erwartungen an diese Substanzklasse geweckt wurden, verlief die klinische Prüfung von verschiedenen synthetischen MMPI am Menschen insgesamt enttäuschend. In der Phase III zahlreicher klinischer Prüfungen zeigten die synthetischen MMPI weitestgehend keine oder eine ungenügende therapeutische Wirksamkeit bei Patienten mit verschiedenen fortgeschrittenen malignen Tumorerkrankungen (Pavlaki 2003). Zudem traten schwerwiegende Nebenwirkungen auf, zu denen häufig Gelenkschmerzen und Kontrakturen von Gelenken zählten. Insgesamt führten diese Erkenntnisse dazu, dass die weitere Entwicklung von synthetischen MMPI fast vollständig eingestellt wurde. Generelle Bedenken hinsichtlich der Verwendung von unselektiven MMPI sowie eine naheliegende Erklärung für die dabei

auftretenden Nebenwirkungen ergeben sich aus den komplexen Funktionen, die die verschiedenen MMPs in sowohl physiologischen als auch in den jeweiligen pathophysiologischen Prozessen erfüllen. Ein Wirkstoff, der selektiv die Aktivität von solchen MMPs hemmt, die maßgeblich und spezifisch an der Pathogenese der zu behandelnden Krankheit beteiligt sind, könnte hinsichtlich seines klinischen Nutzens Vorteile aufweisen.

Bezüglich der Pathogenese des AAA konnte gezeigt werden, dass die Verwendung synthetischer MMPI in entsprechenden Tiermodellen sowohl die Dilatation des Gewebes verringert als auch zum Erhalt der Elastinfasern beiträgt (Aziz 2007). Somit scheint die MMP-Inhibition eine geeignete pharmakologische Option für die Behandlung des AAA darzustellen. Angesichts der bereits erwähnten schwerwiegenden Nebenwirkungen der synthetischen MMPI liegen entsprechende Daten für den Menschen jedoch nicht vor. Dem Nebenwirkungsprofil potentieller Wirkstoffe für die Behandlung des AAA kommt eine besondere Bedeutung zu: Zum einen müsste ein Wirkstoff, dessen Verwendung auf eine Verlangsamung der Progression des AAA abzielt, über mehrere Jahre eingenommen werden. Zum anderen sind die Patienten in Bezug auf das Aneurysma meist beschwerdefrei, was bei auftretenden Nebenwirkungen erfahrungsgemäß zu einer abnehmenden Compliance führt.

Idealerweise würde ein potentieller Wirkstoff nach einer kurzen Behandlungsphase zu einer Rückbildung des AAA führen. Große Aufmerksamkeit rief diesbezüglich die Studie von Yoshimura *et al.* (2005) hervor, in der aufgezeigt wurde, dass sich die Rückbildung eines existenten AAA zumindest im Tiermodell pharmakologisch erreichen lässt. Die derzeit wahrscheinlichere Option liegt aber wohl eher in einer langfristigen pharmakologischen Behandlung, die darauf abzielt, die fortschreitende Progression des kleinen, asymptomatischen AAA zu stoppen bzw. zu verlangsamen. Somit könnte das Risiko einer Ruptur der Gefäßwand gesenkt bzw. ein chirurgischer Eingriff zur Stabilisierung des Gefäßes vermieden werden. Angesichts der Tatsache, dass das AAA vornehmlich eine Erkrankung älterer Menschen ist, würde dies bereits einen bedeutenden therapeutischen Vorteil darstellen.

Ein für die Behandlung des AAA spezifisch entwickelter Wirkstoff steht bis heute nicht zur Verfügung. Allerdings ist von einigen in der Behandlung anderer Erkrankungen etablierten Arzneistoffen bekannt, dass sie die Entstehung des AAA im Tiermodell verhindern sowie die Progression des AAA im Menschen verlangsamen können. Zu diesen zählen die Tetracycline sowie die 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym A-Reduktaseinhibitoren (Statine). Die

Tetracyclin-Antibiotika und insbesondere der prominenteste Vertreter dieser Substanzklasse, das Doxycyclin, wurden in diesem Zusammenhang untersucht, aufgrund ihrer gut dokumentierten Eigenschaft, MMPs zu inhibieren (Golub 1985, Paemen 1996). In der Tat ist das Doxycyclin bisher der einzige Arzneistoff, dem basierend auf dessen MMP-inhibitorischer Wirkung eine Zulassung durch die Arzneimittelbehörde erteilt wurde. So ist niedrig-dosiertes Doxycyclin (Periostat[®]) in den USA zur Behandlung der Parodontitis zugelassen. In verschiedenen Tiermodellen des experimentell induzierten AAA konnte durch die Behandlung mit Doxycyclin die Inzidenz des AAA effektiv vermindert werden, was mit einer reduzierten MMP-Aktivität in der Aortenwand sowie einer verringerten Degradation von Elastinfasern einherging (Petrinec 1996, Kaito 2003). Zudem weisen die Ergebnisse einer von Mosorin *et al.* (2001) durchgeführten kleinen prospektiven Studie darauf hin, dass Doxycyclin auch im Menschen die Progression des AAA günstig beeinflusst. Allerdings ist eine langfristige Medikation mit Doxycyclin aufgrund der Resistenzproblematik kritisch zu bewerten. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass chemisch modifizierte Tetracycline, die über keine antibiotischen Eigenschaften verfügen, ebenso effektiv wie Doxycyclin die Entstehung des AAA im Tiermodell unterdrücken (Curci 1998). Neben der MMP-Inhibition scheint Doxycyclin auch noch über andere Mechanismen Einfluss auf die Aktivität der MMPs zu nehmen. So existieren zahlreiche Hinweise darauf, dass es die zelluläre Expression verschiedener MMPs verringert (Thompson 1999). Es konnte z.B. festgestellt werden, dass Doxycyclin eine schnellere Degradation der MMP-2-mRNA in humanen VSMCs hervorruft (Liu 2003).

Ebenso wie Doxycyclin zeigten auch Arzneistoffe aus der Gruppe der Statine in prospektiven Studien einen günstigen Einfluss auf die Progression des AAA im Menschen (Baxter 2008). Zudem geht aus tierexperimentellen Untersuchungen hervor, dass die Wirkung der Statine weniger auf dem lipidsenkenden Effekt dieser Substanzklasse beruht, sondern vielmehr auf einer modifizierten Regulation von MMPs basieren könnte (Steinmetz 2005). Gestützt wird diese Annahme durch die Feststellung, dass Cerivastatin, Simvastatin und Lovastatin eine negative post-translationale Regulation verschiedener MMPs in VSMCs und Makrophagen hervorrufen (Luan 2003). Insgesamt wird den pleiotropen Effekten, z.B. der anti-inflammatorischen Wirkung, eine bedeutende Rolle hinsichtlich der protektiven Wirkungen der Statine auf das kardiovaskuläre System beigemessen (Tsiara 2003).

Im Tiermodell zeigten zudem nicht-steroidale Antiphlogistika wie Indometacin eine reduzierende Wirkung auf das Ausmaß der Expansion des Elastase-induzierten AAA (Holmes 1996); ein Effekt, der mit einer verminderten Prostaglandin-E₂-Synthese in der Aortenwand und einer dadurch bedingten negativen Regulation von MMPs in Verbindung gebracht wird (Thompson 1999). Ebenso zeigte Telmisartan, ein Wirkstoff aus der Substanzklasse der Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten, eine inhibierende Wirkung auf die Entstehung des Elastase-induzierten AAA im Tiermodell, die unabhängig von dem blutdrucksenkenden Effekt dieses Wirkstoffs und zusammen mit anti-inflammatorischen Prozessen sowie einer reduzierten MMP-Aktivität auftrat (Kaschina 2008).

Hinsichtlich des gespaltenen HK sind weitere Untersuchungen erforderlich, um zu ermitteln, inwieweit dieses die MMP-Aktivität in der Aortenwand *in vivo* beeinflusst und sich auf die Entstehung und Progression des AAA auswirkt. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die den in dieser Arbeit dargelegten Effekten des gespaltenen HK auf die MMP-Regulation zugrunde liegen, könnte zudem dazu beitragen, neue Zielstrukturen für eine Pharmakotherapie des AAA zu identifizieren.

5. Zusammenfassung

Die erhöhte Aktivität von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und die dadurch bedingte Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix stellt einen wesentlichen Prozess in der Pathogenese abdominalen Aortenaneurysmen dar. Dabei wird insbesondere den MMPs aus der Gruppe der Gelatinasen, MMP-2 (Gelatinase A) und MMP-9 (Gelatinase B), eine bedeutende Rolle beigemessen. In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte eine ausgeprägte Prädisposition von Kininogen-defizienten Ratten für abdominale Aortenaneurysmen aufgezeigt werden, deren Entstehung durch eine Degradation von Elastinfasern sowie eine erhöhte Expression von MMPs gekennzeichnet war. Hieraus ergaben sich erstmals Hinweise auf eine Beteiligung von Kininogenen an der MMP-Regulation.

In der vorliegenden Arbeit sollte ermittelt werden, inwieweit das gespaltene hochmolekulare Kininogen (gespaltenes HK) auf die Regulation von MMPs in primären, aus der Aorta von Ratten gewonnenen glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) Einfluss nimmt. Es konnte gezeigt werden, dass gespaltenes HK die Zytokin-induzierte Sekretion von sowohl MMP-2 als auch MMP-9 durch VSMCs konzentrationsabhängig reduzierte. Zudem wurde die Zytokin-induzierte MMP-9-mRNA-Expression in einem nahezu gleichen Ausmaß durch gespaltenes HK negativ reguliert. Weitere Untersuchungen zeigten auf, dass dieser Effekt nicht aus einer erhöhten Degradationsrate der MMP-9-mRNA resultierte. Die Bestimmung der Expressionslevels der endogenen Inhibitoren der MMPs, den TIMPs, ergab, dass die infolge der Zytokin-Stimulation bereits verstärkte TIMP-1-mRNA-Expression in VSMCs durch gespaltenes HK weiter erhöht wurde. Zudem konnte eine signifikante Abnahme des MMP-Aktivitätslevels in den durch die Zellen konditionierten Medien festgestellt werden. Insgesamt lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass das Gleichgewicht von MMPs zu TIMPs durch gespaltenes HK zugunsten einer geringeren MMP-Nettoaktivität verschoben wurde.

Der Vergleich basaler mRNA-Expressionswerte zeigte eine erhöhte basale MMP-2- und TIMP-2-Expression in VSMCs von Kininogen-defizienten Ratten auf. Das hochmolekulare Kininogen war weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene in den kultivierten VSMCs nachweisbar. Darüber hinaus ergab die qualitative mRNA-Analyse von Aortengewebe, dass eine lokale Expression des hochmolekularen Kininogens in der Aorta nicht vorliegt. Dahingegen konnte das hochmolekulare Kininogen auf Protein-Ebene im Aortengewebe nachgewiesen werden, welches vermutlich der Blutzirkulation entstammte.

6. Summary

Cleaved high molecular weight kininogen, a novel factor in the regulation of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells

Increased activity of matrix metalloproteinases (MMPs) in the aortic wall, leading to degradation of extracellular matrix components, is considered to play a crucial role in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. Thereby, a pivotal role has been attributed to MMPs belonging to the subgroup of gelatinases, including MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B). We previously reported that kininogen-deficient rats are predisposed to develop abdominal aortic aneurysms. Thereby, aneurysm formation was associated with enhanced elastolysis and increased expression of MMPs, thus indicating a role for kininogens in the regulation of MMPs.

In the present study we investigated whether cleaved high molecular weight kininogen (cleaved HK) affects the regulation of MMPs in primary vascular smooth muscle cells (VSMCs), cultured from the rat aorta. We found that cleaved HK reduced in a concentration-dependent manner cytokine-induced release of both MMP-9 and MMP-2 by VSMCs. Furthermore, cytokine-induced MMP-9 mRNA expression was negatively regulated by cleaved HK to almost the same extent. Further investigations showed that this effect did not result from an increased rate of MMP-9 mRNA degradation. Determination of expression levels of the endogenous inhibitors of MMPs, the TIMPs, revealed that TIMP-1 mRNA expression, already increased as a result of cytokine-stimulation, was further enhanced by cleaved HK. Moreover, a significant reduction of the MMP activity level was detected in cell-conditioned media. Altogether, these findings indicate that the balance between MMPs and TIMPs was shifted towards less net MMP activity by cleaved HK.

The comparison of basal mRNA expression values showed an elevated MMP-2 and TIMP-2 expression in VSMCs from kininogen-deficient rats. High molecular weight kininogen was not detectable in cultured VSMCs, neither at the mRNA nor at the protein level. In addition, qualitative mRNA analysis of aortic tissues revealed that a local expression of high molecular weight kininogen is not present in the aorta. However, high molecular weight kininogen was demonstrated at the protein level in aortic tissue, which presumably originated from the blood circulation.

7. Literaturverzeichnis

- Abelous JE, Bardier E** (1909) Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *CR Soc Biol.* 66:511-512
- Adam A, Albert A, Calay G, Closset J, Damas J, Franchimont P** (1985) Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values. *Clin Chem.* 31:423-426
- Aimes RT, Quigley JP** (1995) Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem.* 270:5872-5876
- Akool el S, Kleinert H, Hamada FM, Abdelwahab MH, Forstermann U, Pfeilschifter J, Eberhardt W** (2003) Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol.* 23:4901-4916
- Allaire E, Forough R, Clowes M, Starcher B, Clowes AW** (1998) Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J Clin Invest.* 102:1413-1420
- Ang AH, Tachas G, Campbell JH, Bateman JF, Campbell GR** (1990) Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *Biochem J.* 265:461-469
- Anidjar S, Salzmann JL, Gentric D, Lagneau P, Camilleri JP, Michel JB** (1990) Elastase-induced experimental aneurysms in rats. *Circulation.* 82:973-981
- Annabi B, Shedid D, Ghosn P, Kenigsberg RL, Desrosiers RR, Bojanowski MW, Beaulieu E, Nassif E, Mouldjian R, Beliveau R** (2002) Differential regulation of matrix metalloproteinase activities in abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 35:539-546
- Aoki T, Kataoka H, Moriwaki T, Nozaki K, Hashimoto N** (2007) Role of TIMP-1 and TIMP-2 in the progression of cerebral aneurysms. *Stroke.* 38:2337-2345
- Auron PE** (1998) The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9:221-237
- Aziz F, Kuivaniemi H** (2007) Role of matrix metalloproteinase inhibitors in preventing abdominal aortic aneurysm. *Ann Vasc Surg.* 21:392-401
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G** (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 115:3719-3727
- Baxter BT, Terrin MC, Dalman RL** (2008) Medical management of small abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 117:1883-1889
- Behrendt N** (2004) The urokinase receptor (uPAR) and the uPAR-associated protein (uPARAP/Endo180): membrane proteins engaged in matrix turnover during tissue remodeling. *Biol Chem.* 385:103-136

- Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA** (1994) Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res.* 75:539-545
- Berrettini M, Lammle B, White T, Heeb MJ, Schwarz HP, Zuraw B, Curd J, Griffin JH** (1986) Detection of in vitro and in vivo cleavage of high molecular weight kininogen in human plasma by immunoblotting with monoclonal antibodies. *Blood.* 68:455-462
- Birkedal-Hansen H, Taylor RE** (1982) Detergent-activation of latent collagenase and resolution of its component molecules. *Biochem Biophys Res Commun.* 107:1173-1178
- Blais C, Jr., Marceau F, Rouleau JL, Adam A** (2000) The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides.* 21:1903-1940
- Blanchard JF** (1999) Epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Epidemiol Rev.* 21:207-221
- Bode W, Fernandez-Catalan C, Tschesche H, Grams F, Nagase H, Maskos K** (1999) Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol Life Sci.* 55:639-652
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H** (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 1477:267-283
- Brown PD, Levy AT, Margulies IM, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG** (1990) Independent expression and cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumorigenic cell lines. *Cancer Res.* 50:6184-6191
- Burbridge MF, Coge F, Galizzi JP, Boutin JA, West DC, Tucker GC** (2002) The role of the matrix metalloproteinases during in vitro vessel formation. *Angiogenesis.* 5:215-226
- Busuttil RW, Abou-Zamzam AM, Machleder HI** (1980) Collagenase activity of the human aorta. A comparison of patients with and without abdominal aortic aneurysms. *Arch Surg.* 115:1373-1378
- Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, Will H, Tamura T, Schade van Westrum S, Crabbe T, Clements J, d'Ortho MP, Murphy G** (1998) The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem.* 273:871-880
- Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM** (1993b) Bradykinin peptides in kidney, blood, and other tissues of the rat. *Hypertension.* 21:155-165
- Campbell JH, Campbell GR** (1993a) Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle. *Clin Sci (Lond).* 85:501-513
- Campbell JH, Kocher O, Skalli O, Gabbiani G, Campbell GR** (1989) Cytodifferentiation and expression of alpha-smooth muscle actin mRNA and protein during primary culture of aortic smooth muscle cells. Correlation with cell density and proliferative state. *Arteriosclerosis.* 9:633-643
- Cao DJ, Guo YL, Colman RW** (2004) Urokinase-type plasminogen activator receptor is involved in mediating the apoptotic effect of cleaved high molecular weight kininogen in human endothelial cells. *Circ Res.* 94:1227-1234
- Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaître V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro S, Lupu F, Collen D** (1997) Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet.* 17:439-444
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T** (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem.* 253:269-285

- Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R** (1979) The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev.* 59:1-61
- Chase AJ, Newby AC** (2003) Regulation of matrix metalloproteinase (matrixin) genes in blood vessels: a multi-step recruitment model for pathological remodelling. *J Vasc Res.* 40:329-343
- Chen LM, Song Q, Chao L, Chao J** (1995) Cellular localization of tissue kallikrein and kallistatin mRNAs in human kidney. *Kidney Int.* 48:690-697
- Chomczynski P, Sacchi N** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159
- Colman RW, Jameson BA, Lin Y, Johnson D, Mousa SA** (2000) Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostatin) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. *Blood.* 95:543-550
- Colman RW, Pixley RA, Najamunnisa S, Yan W, Wang J, Mazar A, McCrae KR** (1997) Binding of high molecular weight kininogen to human endothelial cells is mediated via a site within domains 2 and 3 of the urokinase receptor. *J Clin Invest.* 100:1481-1487
- Colman RW, White JV, Scovell S, Stadnicki A, Sartor RB** (1999) Kininogens are antithrombotic proteins In vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:2245-2250
- Crowther M, Goodall S, Jones JL, Bell PR, Thompson MM** (2000a) Localization of matrix metalloproteinase 2 within the aneurysmal and normal aortic wall. *Br J Surg.* 87:1391-1400
- Crowther M, Goodall S, Jones JL, Bell PR, Thompson MM** (2000b) Increased matrix metalloproteinase 2 expression in vascular smooth muscle cells cultured from abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 32:575-583
- Curci JA, Petrincec D, Liao S, Golub LM, Thompson RW** (1998) Pharmacologic suppression of experimental abdominal aortic aneurysms: a comparison of doxycycline and four chemically modified tetracyclines. *J Vasc Surg.* 28:1082-1093
- Curci JA, Thompson RW** (2004) Adaptive cellular immunity in aortic aneurysms: cause, consequence, or context? *J Clin Invest.* 114:168-171
- Curry TE, Jr., Dean DD, Sanders SL, Pedigo NG, Jones PB** (1989) The role of ovarian proteases and their inhibitors in ovulation. *Steroids.* 54:501-521
- Curry TE, Jr., Osteen KG** (2003) The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev.* 24:428-465
- Damas J, Adam A** (1979) The kallikrein-kininogens-kinins system in the Brown-Norway rat. *Biomedicine.* 31:249
- Davis V, Persidskaia R, Baca-Regen L, Itoh Y, Nagase H, Persidsky Y, Ghorpade A, Baxter BT** (1998) Matrix metalloproteinase-2 production and its binding to the matrix are increased in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:1625-1633
- Dixon BS, Breckon R, Fortune J, Vavrek RJ, Stewart JM, Marzec-Calvert R, Linas SL** (1990) Effects of kinins on cultured arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 258:C299-308
- Dumler I, Weis A, Mayboroda OA, Maasch C, Jerke U, Haller H, Gulba DC** (1998) The Jak/Stat pathway and urokinase receptor signaling in human aortic vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 273:315-321

- Eberhardt W, Akool el S, Rebhan J, Frank S, Beck KF, Franzen R, Hamada FM, Pfeilschifter J** (2002) Inhibition of cytokine-induced matrix metalloproteinase 9 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists is indirect and due to a NO-mediated reduction of mRNA stability. *J Biol Chem.* 277:33518-33528
- Emonard H, Bellon G, Troeberg L, Berton A, Robinet A, Henriet P, Marbaix E, Kirkegaard K, Patthy L, Eeckhout Y, Nagase H, Hornebeck W, Courtoy PJ** (2004) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates endocytic clearance of pro-MMP-2.TIMP-2 complex through a thrombospondin-independent mechanism. *J Biol Chem.* 279:54944-54951
- Eskandari MK, Vijungco JD, Flores A, Borensztajn J, Shively V, Pearce WH** (2005) Enhanced abdominal aortic aneurysm in TIMP-1-deficient mice. *J Surg Res.* 123:289-293
- Fabunmi RP, Baker AH, Murray EJ, Booth RF, Newby AC** (1996) Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors or metalloproteinases-1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J.* 315 (Pt 1):335-342
- Fabunmi RP, Sukhova GK, Sugiyama S, Libby P** (1998) Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in human atheroma and regulation in lesion-associated cells: a potential protective mechanism in plaque stability. *Circ Res.* 83:270-278
- Faris B, Salcedo LL, Cook V, Johnson L, Foster JA, Franzblau C** (1976) The synthesis of connective tissue protein in smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta.* 418:93-103
- Fernando AN, Fernando LP, Fukuda Y, Kaplan AP** (2005) Assembly, activation, and signaling by kinin-forming proteins on human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289:H251-257
- Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT** (1995) Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15:1145-1151
- Fridman R, Bird RE, Hoyhtya M, Oelkuct M, Komarek D, Liang CM, Berman ML, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Fuerst TR** (1993) Expression of human recombinant 72 kDa gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2): characterization of complex and free enzyme. *Biochem J.* 289 (Pt 2):411-416
- Furuto-Kato S, Matsumoto A, Kitamura N, Nakanishi S** (1985) Primary structures of the mRNAs encoding the rat precursors for bradykinin and T-kinin. Structural relationship of kininogens with major acute phase protein and alpha 1-cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem.* 260:12054-12059
- Gadowski GR, Pilcher DB, Ricci MA** (1994) Abdominal aortic aneurysm expansion rate: effect of size and beta-adrenergic blockade. *J Vasc Surg.* 19:727-731
- Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P** (1994) Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res.* 75:181-189
- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V** (1997) Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science.* 277:225-228

- Gloviczki P, Ricotta JJ II** (2008) Aneurysmal Vascular Disease. In: Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL (eds). *Sabiston Textbook of Surgery-18th Edition*. Philadelphia: Elsevier:1907-1938
- Glukhova MA, Kabakov AE, Frid MG, Ornatsky OI, Belkin AM, Mukhin DN, Orekhov AN, Koteliansky VE, Smirnov VN** (1988) Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: a study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:9542-9546
- Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O** (2001) Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. *Anal Biochem*. 295:17-21
- Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL** (1992) Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. *J Biol Chem*. 267:4583-4591
- Golub LM, Wolff M, Lee HM, McNamara TF, Ramamurthy NS, Zambon J, Ciancio S** (1985) Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian sources. *J Periodontal Res*. 20:12-23
- Gross J, Harper E, Harris ED, McCroskery PA, Highberger JH, Corbett C, Kang AH** (1974) Animal collagenases: specificity of action, and structures of the substrate cleavage site. *Biochem Biophys Res Commun*. 61:605-612
- Gross J, Lapiere CM** (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 48:1014-1022
- Guo H, Zucker S, Gordon MK, Toole BP, Biswas C** (1997) Stimulation of matrix metalloproteinase production by recombinant extracellular matrix metalloproteinase inducer from transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*. 272:24-27
- Guo YL, Colman RW** (2005) Two faces of high-molecular-weight kininogen (HK) in angiogenesis: bradykinin turns it on and cleaved HK (HKa) turns it off. *J Thromb Haemost*. 3:670-676
- Haas TL, Davis SJ, Madri JA** (1998) Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 273:3604-3610
- Hance KA, Tataria M, Ziporin SJ, Lee JK, Thompson RW** (2002) Monocyte chemotactic activity in human abdominal aortic aneurysms: role of elastin degradation peptides and the 67-kD cell surface elastin receptor. *J Vasc Surg*. 35:254-261
- Hasan AA, Zisman T, Schmaier AH** (1998) Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:3615-3620
- Hayashi I, Amano H, Yoshida S, Kamata K, Kamata M, Inukai M, Fujita T, Kumagai Y, Furudate S, Majima M** (2002) Suppressed angiogenesis in kininogen-deficiencies. *Lab Invest*. 82:871-880
- Hayashi I, Hoshiko S, Makabe O, Oh-ishi S** (1993b) A point mutation of alanine 163 to threonine is responsible for the defective secretion of high molecular weight kininogen by the liver of brown Norway Katholiek rats. *J Biol Chem*. 268:17219-17224

- Hayashi I, Maruhashi J, Oh-ishi S** (1989) Functionally active high molecular weight-kininogen was found in the liver, but not in the plasma of brown Norway Katholiek rat. *Thromb Res.* 56:179-189
- Hayashi I, Oh-ishi S** (1993a) Plasma kininogen deficiency: associated defective secretion of kininogens by primary cultures of hepatocytes from brown Norway Katholiek rats. *J Biochem.* 113:531-537
- He CM, Roach MR** (1994) The composition and mechanical properties of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 20:6-13
- He CS, Wilhelm SM, Pentland AP, Marmer BL, Grant GA, Eisen AZ, Goldberg GI** (1989) Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:2632-2636
- Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whittemore AD, Knox J, Libby P** (1999) Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 99:96-104
- Hermann A, Braun A, Figueroa CD, Muller-Esterl W, Fritz H, Rehbock J** (1996) Expression and cellular localization of kininogens in the human kidney. *Kidney Int.* 50:79-84
- Herwald H, Dedio J, Kellner R, Loos M, Muller-Esterl W** (1996) Isolation and characterization of the kininogen-binding protein p33 from endothelial cells. Identity with the gC1q receptor. *J Biol Chem.* 271:13040-13047
- Holmes DR, Petrincec D, Wester W, Thompson RW, Reilly JM** (1996) Indomethacin prevents elastase-induced abdominal aortic aneurysms in the rat. *J Surg Res.* 63:305-309
- Huang Y, Mironova M, Lopes-Virella MF** (1999) Oxidized LDL stimulates matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:2640-2647
- Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K** (1990) Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem.* 265:11077-11082
- Ikonomidis JS, Gibson WC, Butler JE, McClister DM, Sweterlitsch SE, Thompson RP, Mukherjee R, Spinale FG** (2004) Effects of deletion of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 gene on the progression of murine thoracic aortic aneurysms. *Circulation.* 110:II268-273
- Jones CB, Sane DC, Herrington DM** (2003) Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res.* 59:812-823
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO** (2001) Histologie. *Springer Verlag Berlin.* 5. Auflage
- Kadoglou NP, Liapis CD** (2004) Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis, surveillance and treatment of abdominal aortic aneurysms. *Curr Med Res Opin.* 20:419-432
- Kaito K, Urayama H, Watanabe G** (2003) Doxycycline treatment in a model of early abdominal aortic aneurysm. *Surg Today.* 33:426-433
- Kamijima T, Isobe M, Suzuki J, Fukui D, Arai M, Urayama H, Nishimaki K, Sekiguchi M, Kawasaki S** (1999) Enhanced embryonic nonmuscle myosin heavy chain isoform and matrix metalloproteinase expression in aortic abdominal aneurysm with rapid progression. *Cardiovasc Pathol.* 8:291-295

- Karlsrud TS, Buo L, Aasen AO, Johansen HT** (1996) Cleavage of plasma high molecular weight kininogen in surgical ICU patients. *Intensive Care Med.* 22:760-765
- Kaschina E, Schrader F, Sommerfeld M, Kemnitz UR, Grzesiak A, Krikov M, Unger T** (2008) Telmisartan prevents aneurysm progression in the rat by inhibiting proteolysis, apoptosis and inflammation. *J Hypertens.* 26:2361-2373
- Kaschina E, Stoll M, Sommerfeld M, Steckelings UM, Kreutz R, Unger T** (2004) Genetic kininogen deficiency contributes to aortic aneurysm formation but not to atherosclerosis. *Physiol Genomics.* 19:41-49
- Kato H, Enjyoji K, Miyata T, Hayashi I, Oh-ishi S, Iwanaga S** (1985) Demonstration of arginyl-bradykinin moiety in rat HMW kininogen: direct evidence for liberation of bradykinin by rat glandular kallikreins. *Biochem Biophys Res Commun.* 127:289-295
- Kenagy RD, Nikkari ST, Welgus HG, Clowes AW** (1994) Heparin inhibits the induction of three matrix metalloproteinases (stromelysin, 92-kD gelatinase, and collagenase) in primate arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 93:1987-1993
- Kinoshita T, Sato H, Okada A, Ohuchi E, Imai K, Okada Y, Seiki M** (1998) TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads. *J Biol Chem.* 273:16098-16103
- Kintsurashvili E, Duka I, Gavras I, Johns C, Farmakiotis D, Gavras H** (2001) Effects of ANG II on bradykinin receptor gene expression in cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281:H1778-1783
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG** (1994) Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem.* 218:325-329
- Knox JB, Sukhova GK, Whittemore AD, Libby P** (1997) Evidence for altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in human aortic diseases. *Circulation.* 95:205-212
- Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, Radosevich JA, Pope RM, Robinson PG, Pearce WH** (1990) Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol.* 137:1199-1213
- Kowalewski R, Sobolewski K, Wolanska M, Gacko M** (2004) Matrix metalloproteinases in the vein wall. *Int Angiol.* 23:164-169
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685
- Lesauskaite V, Tanganelli P, Sassi C, Neri E, Diciolla F, Ivanoviene L, Epistolato MC, Lalinga AV, Alessandrini C, Spina D** (2001) Smooth muscle cells of the media in the dilatative pathology of ascending thoracic aorta: morphology, immunoreactivity for osteopontin, matrix metalloproteinases, and their inhibitors. *Hum Pathol.* 32:1003-1011
- Li Z, Li L, Zielke HR, Cheng L, Xiao R, Crow MT, Stetler-Stevenson WG, Froehlich J, Lakatta EG** (1996) Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 148:121-128
- Lindeman JH, Abdul-Hussien H, Schaapherder AF, Van Bockel JH, Von der Thusen JH, Roelen DL, Kleemann R** (2008) Enhanced expression and activation of pro-inflammatory transcription factors distinguish aneurysmal from atherosclerotic aorta: IL-6- and IL-8-dominated inflammatory responses prevail in the human aneurysm. *Clin Sci (Lond).* 114:687-697

- Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S** (1980) Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*. 284:67-68
- Liu J, Xiong W, Baca-Regen L, Nagase H, Baxter BT** (2003) Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg*. 38:1376-1383
- Liu Y, Cao DJ, Sainz IM, Guo YL, Colman RW** (2008) The Inhibitory Effect of HKA in Endothelial Cell Tube Formation Is Mediated by Disrupting the uPA-uPAR Complex and Inhibiting its Signaling and Internalization. *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Liu YH, Yang XP, Mehta D, Bulagannawar M, Scicli GM, Carretero OA** (2000) Role of kinins in chronic heart failure and in the therapeutic effect of ACE inhibitors in kininogen-deficient rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 278:H507-514
- Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT** (2002) Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 110:625-632
- Luan Z, Chase AJ, Newby AC** (2003) Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23:769-775
- MacSweeney ST, Young G, Greenhalgh RM, Powell JT** (1992) Mechanical properties of the aneurysmal aorta. *Br J Surg*. 79:1281-1284
- Maeda A, Sobel RA** (1996) Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*. 55:300-309
- Majima M, Mizogami S, Kuribayashi Y, Katori M, Oh-ishi S** (1994) Hypertension induced by a nonpressor dose of angiotensin II in kininogen-deficient rats. *Hypertension*. 24:111-119
- Manderson JA, Mosse PR, Safstrom JA, Young SB, Campbell GR** (1989) Balloon catheter injury to rabbit carotid artery. I. Changes in smooth muscle phenotype. *Arteriosclerosis*. 9:289-298
- McCawley LJ, Matrisian LM** (2000) Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression. *Mol Med Today*. 6:149-156
- McMillan WD, Patterson BK, Keen RR, Pearce WH** (1995a) In situ localization and quantification of seventy-two-kilodalton type IV collagenase in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *J Vasc Surg*. 22:295-305
- McMillan WD, Patterson BK, Keen RR, Shively VP, Cipollone M, Pearce WH** (1995b) In situ localization and quantification of mRNA for 92-kD type IV collagenase and its inhibitor in aneurysmal, occlusive, and normal aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 15:1139-1144
- McMillan WD, Pearce WH** (1997b) Inflammation and cytokine signaling in aneurysms. *Ann Vasc Surg*. 11:540-545
- McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M, Johnson DA, Parker MA, Pearce WH** (1997a) Size matters: the relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation*. 96:2228-2232

- McMurray HF, Parrott DP, Bowyer DE** (1991) A standardised method of culturing aortic explants, suitable for the study of factors affecting the phenotypic modulation, migration and proliferation of aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 86:227-237
- Millar AW, Brown PD, Moore J, Galloway WA, Cornish AG, Lenehan TJ, Lynch KP** (1998) Results of single and repeat dose studies of the oral matrix metalloproteinase inhibitor marimastat in healthy male volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 45:21-26
- Mori K, Nagasawa S** (1981) Studies on human high molecular weight (HMW) kininogen. II. Structural change of HMW kininogen by the action of human plasma kallikrein. *J Biochem*. 89:1465-1473
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT** (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*. 24:954-958, 960, 962
- Mosorin M, Juvonen J, Biancari F, Satta J, Surcel HM, Leinonen M, Saikku P, Juvonen T** (2001) Use of doxycycline to decrease the growth rate of abdominal aortic aneurysms: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *J Vasc Surg*. 34:606-610
- Motta G, Rojkaer R, Hasan AA, Cines DB, Schmaier AH** (1998) High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation. *Blood*. 91:516-528
- Mountain DJ, Singh M, Menon B, Singh K** (2007) Interleukin-1beta increases expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in cardiac microvascular endothelial cells: role of PKCalpha/beta1 and MAPKs. *Am J Physiol Cell Physiol*. 292:C867-875
- Murphy G, Cockett MI, Stephens PE, Smith BJ, Docherty AJ** (1987) Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. *Biochem J*. 248:265-268
- Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJ** (1991) Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem J*. 277 (Pt 1):277-279
- Murphy G, Nguyen Q, Cockett MI, Atkinson SJ, Allan JA, Knight CG, Willenbrock F, Docherty AJ** (1994) Assessment of the role of the fibronectin-like domain of gelatinase A by analysis of a deletion mutant. *J Biol Chem*. 269:6632-6636
- Murphy G, Ward R, Hembry RM, Reynolds JJ, Kuhn K, Tryggvason K** (1989) Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. A metalloproteinase resembling tumour type IV collagenase. *Biochem J*. 258:463-472
- Nagase H, Visse R, Murphy G** (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*. 69:562-573
- Nagase H, Woessner JF, Jr.** (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 274:21491-21494
- Newman AB, Arnold AM, Burke GL, O'Leary DH, Manolio TA** (2001) Cardiovascular disease and mortality in older adults with small abdominal aortic aneurysms detected by ultrasonography: the cardiovascular health study. *Ann Intern Med*. 134:182-190
- Nishikawa K, Shibayama Y, Kuna P, Calcaterra E, Kaplan AP, Reddigari SR** (1992) Generation of vasoactive peptide bradykinin from human umbilical vein endothelium-bound high molecular weight kininogen by plasma kallikrein. *Blood*. 80:1980-1988

- Nishimura K, Ikebuchi M, Kanaoka Y, Ohgi S, Ueta E, Nanba E, Ito H** (2003) Relationships between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Int Angiol.* 22:229-238
- Nolly H, Nolly A** (1998) Release of endothelial-derived kallikrein, kininogen and kinins. *Biol Res.* 31:169-174
- Norman PE, Jamrozik K, Lawrence-Brown MM, Le MT, Spencer CA, Tuohy RJ, Parsons RW, Dickinson JA** (2004) Population based randomised controlled trial on impact of screening on mortality from abdominal aortic aneurysm. *Bmj.* 329:1259
- O'Connell JP, Willenbrock F, Docherty AJ, Eaton D, Murphy G** (1994) Analysis of the role of the COOH-terminal domain in the activation, proteolytic activity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interactions of gelatinase B. *J Biol Chem.* 269:14967-14973
- Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H** (1992) Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem.* 267:3581-3584
- Oh-ishi S, Hayashi I, Yamaki K, Utsunomiya I** (1992) Kininogen deficiency in the rat. *Agents Actions Suppl.* 38 (Pt 1):277-291
- Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y** (1997) Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem.* 272:2446-2451
- Okada Y, Gonoji Y, Naka K, Tomita K, Nakanishi I, Iwata K, Yamashita K, Hayakawa T** (1992) Matrix metalloproteinase 9 (92-kDa gelatinase/type IV collagenase) from HT 1080 human fibrosarcoma cells. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *J Biol Chem.* 267:21712-21719
- Okamoto H, Greenbaum LM** (1986) Isolation and properties of two rat plasma T-kininogens. *Adv Exp Med Biol.* 198 Pt A:69-75
- Okamoto H, Yayama K, Shibata H, Nagaoka M, Takano M** (1998) Kininogen expression by rat vascular smooth muscle cells: stimulation by lipopolysaccharide and angiotensin II. *Biochim Biophys Acta.* 1404:329-337
- Olson MW, Gervasi DC, Mobashery S, Fridman R** (1997) Kinetic analysis of the binding of human matrix metalloproteinase-2 and -9 to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2. *J Biol Chem.* 272:29975-29983
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J** (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 88:277-285
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J** (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell.* 79:315-328
- Owens GK** (1995) Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 75:487-517
- Owens GK, Loeb A, Gordon D, Thompson MM** (1986) Expression of smooth muscle-specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation. *J Cell Biol.* 102:343-352
- Oza NB, Schwartz JH, Goud HD, Levinsky NG** (1990) Rat aortic smooth muscle cells in culture express kallikrein, kininogen, and bradykininase activity. *J Clin Invest.* 85:597-600

- Paemen L, Martens E, Norga K, Masure S, Roets E, Hoogmartens J, Opdenakker G** (1996) The gelatinase inhibitory activity of tetracyclines and chemically modified tetracycline analogues as measured by a novel microtiter assay for inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 52:105-111
- Patel MI, Melrose J, Ghosh P, Appleberg M** (1996) Increased synthesis of matrix metalloproteinases by aortic smooth muscle cells is implicated in the etiopathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 24:82-92
- Pavlaki M, Zucker S** (2003) Matrix metalloproteinase inhibitors (MMPi): the beginning of phase I or the termination of phase III clinical trials. *Cancer Metastasis Rev.* 22:177-203
- Pearce WH, Sweis I, Yao JS, McCarthy WJ, Koch AE** (1992) Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release in normal and diseased human infrarenal aortas. *J Vasc Surg.* 16:784-789
- Petersen E, Wagberg F, Angquist KA** (2002) Proteolysis of the abdominal aortic aneurysm wall and the association with rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 23:153-157
- Petrinec D, Liao S, Holmes DR, Reilly JM, Parks WC, Thompson RW** (1996) Doxycycline inhibition of aneurysmal degeneration in an elastase-induced rat model of abdominal aortic aneurysm: preservation of aortic elastin associated with suppressed production of 92 kD gelatinase. *J Vasc Surg.* 23:336-346
- Pilcher BK, Wang M, Qin XJ, Parks WC, Senior RM, Welgus HG** (1999) Role of matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity. *Ann N Y Acad Sci.* 878:12-24
- Planque C, de Monte M, Guyetant S, Rollin J, Desmazes C, Panel V, Lemarie E, Courty Y** (2005) KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 329:1260-1266
- Poblete MT, Reynolds NJ, Figueroa CD, Burton JL, Muller-Esterl W, Bhoola KD** (1991) Tissue kallikrein and kininogen in human sweat glands and psoriatic skin. *Br J Dermatol.* 124:236-241
- Proud D, Pierce JV, Pisano JJ** (1980) Radioimmunoassay of human high molecular weight kininogen in normal and deficient plasmas. *J Lab Clin Med.* 95:563-574
- Raffetto JD, Khalil RA** (2008) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 75:346-359
- Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF** (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett.* 339:62-66
- Ramos-DeSimone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP** (1999) Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem.* 274:13066-13076
- Reed D, Reed C, Stemmermann G, Hayashi T** (1992) Are aortic aneurysms caused by atherosclerosis? *Circulation.* 85:205-211
- Reynolds JJ, Hembry RM, Meikle MC** (1994) Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv Dent Res.* 8:312-319
- Rodin JA** (1980) Architecture of the vessel wall. In: Bohr DF, Somlyo AP, Sparks HV (eds). *Handbook of Physiology Section 2: The Cardiovascular System.* Vol. 2:1-31

- Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R** (1993) Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *Faseb J.* 7:1208-1218
- Sainz IM, Isordia-Salas I, Castaneda JL, Agelan A, Liu B, DeLa Cadena RA, Pixley RA, Adam A, Sartor RB, Colman RW** (2005) Modulation of inflammation by kininogen deficiency in a rat model of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 52:2549-2552
- Sakalihasan N, Heyeres A, Nussgens BV, Limet R, Lapiere CM** (1993) Modifications of the extracellular matrix of aneurysmal abdominal aortas as a function of their size. *Eur J Vasc Surg.* 7:633-637
- Salamonsen LA, Woolley DE** (1996) Matrix metalloproteinases in normal menstruation. *Hum Reprod.* 11 Suppl 2:124-133
- Salo T, Liotta LA, Tryggvason K** (1983) Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J Biol Chem.* 258:3058-3063
- Satta J, Laurila A, Paakko P, Haukipuro K, Sormunen R, Parkkila S, Juvonen T** (1998) Chronic inflammation and elastin degradation in abdominal aortic aneurysm disease: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 15:313-319
- Sawicki G, Marcoux Y, Sarkhosh K, Tredget EE, Ghahary A** (2005) Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. *Mol Cell Biochem.* 269:209-216
- Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H** (2006) Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med.* 84:901-910
- Schmaier AH, Kuo A, Lundberg D, Murray S, Cines DB** (1988) The expression of high molecular weight kininogen on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem.* 263:16327-16333
- Scott RA, Bridgewater SG, Ashton HA** (2002) Randomized clinical trial of screening for abdominal aortic aneurysm in women. *Br J Surg.* 89:283-285
- Senior RM, Griffin GL, Fliszar CJ, Shapiro SD, Goldberg GI, Welgus HG** (1991) Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J Biol Chem.* 266:7870-7875
- Sharma JN, Zeitlin IJ, Brooks PM, Buchanan WW, Dick WC** (1980) The action of aspirin on plasma kininogen and other plasma proteins in rheumatoid patients: relationship to disease activity. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 7:347-354
- Shiple JM, Doyle GA, Fliszar CJ, Ye QZ, Johnson LL, Shapiro SD, Welgus HG, Senior RM** (1996) The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats. *J Biol Chem.* 271:4335-4341
- Skrzydowska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S** (2005) Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 11:1251-1266
- Snider R, Faris B, Verbitzki V, Moscaritolo R, Salcedo LL, Franzblau C** (1981) Elastin biosynthesis and cross-link formation in rabbit aortic smooth muscle cell cultures. *Biochemistry.* 20:2614-2618
- Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW** (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 38:73-83

- Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE** (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:364-368
- Steckmeier B** (2001) Epidemiologie der Aortenerkrankung: Aneurysma, Dissektion, Verschluss. *Radiologe.* 41:624-632
- Steinmetz EF, Buckley C, Shames ML, Ennis TL, Vanvickle-Chavez SJ, Mao D, Goeddel LA, Hawkins CJ, Thompson RW** (2005) Treatment with simvastatin suppresses the development of experimental abdominal aortic aneurysms in normal and hypercholesterolemic mice. *Ann Surg.* 241:92-101
- Stetler-Stevenson WG** (1990) Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 9:289-303
- Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI** (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem.* 270:5331-5338
- Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, Libby P** (1999) Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation.* 99:2503-2509
- Takano M, Sakanaka F, Yayama K, Okamoto H** (2000) Tissue-Specific expression of rat kininogen mRNAs. *Biol Pharm Bull.* 23:1239-1242
- Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH** (1997) Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery.* 122:264-271; discussion 271-262
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E** (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol.* 75:291-295
- Thompson M, Cockerill G** (2006) Matrix metalloproteinase-2: the forgotten enzyme in aneurysm pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1085:170-174
- Thompson RW, Baxter BT** (1999) MMP inhibition in abdominal aortic aneurysms. Rationale for a prospective randomized clinical trial. *Ann N Y Acad Sci.* 878:159-178
- Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, Liao S, Botney MD, Mecham RP, Welgus HG, Parks WC** (1995) Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest.* 96:318-326
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:4350-4354
- Tsiara S, Elisaf M, Mikhailidis DP** (2003) Early vascular benefits of statin therapy. *Curr Med Res Opin.* 19:540-556
- Van Wart HE, Birkedal-Hansen H** (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:5578-5582
- Visse R, Nagase H** (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 92:827-839

- Wahl ML, Kenan DJ, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV** (2005) Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated. *J Cell Biochem.* 96:242-261
- Wang DZ, Song Q, Chen LM, Chao L, Chao J** (1996) Expression and cellular localization of tissue kallikrein-kinin system in human adrenal gland. *Am J Physiol.* 271:F709-716
- Weisel JW, Nagaswami C, Woodhead JL, DeLa Cadena RA, Page JD, Colman RW** (1994) The shape of high molecular weight kininogen. Organization into structural domains, changes with activation, and interactions with prekallikrein, as determined by electron microscopy. *J Biol Chem.* 269:10100-10106
- Wen JK, Han M, Zheng B, Yang SL** (2002) Comparison of gene expression patterns and migration capability at quiescent and proliferating vascular smooth muscle cells stimulated by cytokines. *Life Sci.* 70:799-807
- Werb Z, Chin JR** (1998) Extracellular matrix remodeling during morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 857:110-118
- Wilson WR, Anderton M, Schwalbe EC, Jones JL, Furness PN, Bell PR, Thompson MM** (2006) Matrix metalloproteinase-8 and -9 are increased at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. *Circulation.* 113:438-445
- Windsor LJ, Birkedal-Hansen H, Birkedal-Hansen B, Engler JA** (1991) An internal cysteine plays a role in the maintenance of the latency of human fibroblast collagenase. *Biochemistry.* 30:641-647
- Wojtowicz-Praga S, Low J, Marshall J, Ness E, Dickson R, Barter J, Sale M, McCann P, Moore J, Cole A, Hawkins MJ** (1996) Phase I trial of a novel matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in patients with advanced cancer. *Invest New Drugs.* 14:193-202
- Wojtowicz-Praga SM, Dickson RB, Hawkins MJ** (1997) Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs.* 15:61-75
- Wolf WC, Harley RA, Sluce D, Chao L, Chao J** (1999) Localization and expression of tissue kallikrein and kallistatin in human blood vessels. *J Histochem Cytochem.* 47:221-228
- Worley JR, Thompkins PB, Lee MH, Hutton M, Soloway P, Edwards DR, Murphy G, Knauper V** (2003) Sequence motifs of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2) determining progelatinase A (proMMP-2) binding and activation by membrane-type metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *Biochem J.* 372:799-809
- Worth NF, Rolfe BE, Song J, Campbell GR** (2001) Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil Cytoskeleton.* 49:130-145
- Wu Y, Rizzo V, Liu Y, Sainz IM, Schmuckler NG, Colman RW** (2007) Kininostatin associates with membrane rafts and inhibits alpha(v)beta3 integrin activation in human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:1968-1975
- Wucherpfennig AL, Li YP, Stetler-Stevenson WG, Rosenberg AE, Stashenko P** (1994) Expression of 92 kD type IV collagenase/gelatinase B in human osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 9:549-556
- Xiong W, Knispel R, Mactaggart J, Baxter BT** (2006) Effects of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 deficiency on aneurysm formation. *J Vasc Surg.* 44:1061-1066

- Yamashita A, Noma T, Nakazawa A, Saito S, Fujioka K, Zempo N, Esato K** (2001) Enhanced expression of matrix metalloproteinase-9 in abdominal aortic aneurysms. *World J Surg.* 25:259-265
- Yang CM, Lin MI, Hsieh HL, Sun CC, Ma YH, Hsiao LD** (2005) Bradykinin-induced p42/p44 MAPK phosphorylation and cell proliferation via Src, EGF receptors, and PI3-K/Akt in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 203:538-546
- Ye S** (2000) Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 19:623-629
- Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y** (2000) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 59:455-461
- Yoshimura K, Aoki H, Ikeda Y, Fujii K, Akiyama N, Furutani A, Hoshii Y, Tanaka N, Ricci R, Ishihara T, Esato K, Hamano K, Matsuzaki M** (2005) Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med.* 11:1330-1338
- Zhang JC, Claffey K, Sakthivel R, Darzynkiewicz Z, Shaw DE, Leal J, Wang YC, Lu FM, McCrae KR** (2000) Two-chain high molecular weight kininogen induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: partial activity within domain 5. *Faseb J.* 14:2589-2600
- Zhang JC, Donate F, Qi X, Ziats NP, Juarez JC, Mazar AP, Pang YP, McCrae KR** (2002) The antiangiogenic activity of cleaved high molecular weight kininogen is mediated through binding to endothelial cell tropomyosin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:12224-12229

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abbildung 1.1. Pathophysiologie des AAA	3
Abbildung 1.2. Proteinstruktur der Gelatinasen (MMP-2, -9)	5
Abbildung 1.3. Aktivierung latenter proMMPs: Der <i>cysteine switch</i> Mechanismus	6
Abbildung 1.4. Regulationsmechanismen der MMP-Aktivität	8
Abbildung 1.5. Spaltung des hochmolekularen Kininogens	17
Abbildung 2.1. RNA-Qualitätskontrolle	42
Abbildung 2.2. <i>Real-time</i> PCR-Datenanalyse	45
Abbildung 2.3. Prinzip der <i>nested</i> PCR	47
Abbildung 3.1. Gewinnung und Kultivierung von VSMCs	50
Abbildung 3.2. Detektion von α -Aktin in primären VSMCs mittels Immunfluoreszenz	50
Abbildung 3.3. Behandlung von VSMCs mit IL-1 α in verschiedenen Konzentrationen	53
Abbildung 3.4. Zeitverlauf der IL-1 α -induzierten MMP-9-Sekretion	54
Abbildung 3.5. Zeitverlauf der IL-1 α -induzierten Zunahme der MMP-2-Sekretion	54
Abbildung 3.6. IL-1 α und TNF α im Vergleich	55
Abbildung 3.7. Inhibition der Gelatinolyse durch EDTA	56
Abbildung 3.8. Konversion der proMMPs mittels APMA	57
Abbildung 3.9. Effekt von gespaltenem HK auf die Zytokin-induzierte MMP-9-Sekretion	58
Abbildung 3.10. Effekt von gespaltenem HK auf die Zytokin-induzierte MMP-9-mRNA- Expression	60
Abbildung 3.11. MMP-9-mRNA-Degradation	61
Abbildung 3.12. Effekt von gespaltenem HK auf die Zytokin-induzierte MMP-2-Sekretion	63
Abbildung 3.13. Detektion von MMP-2 in den konditionierten Medien mittels Western Blotting	64
Abbildung 3.14. Analyse der MMP-2-mRNA-Expression	65
Abbildung 3.15. Zellfreie Inkubation mit gespaltenem HK	66
Abbildung 3.16. Effekt von gespaltenem HK auf die TIMP-1-mRNA-Expression in Zytokin- stimulierten VSMCs	67
Abbildung 3.17. Effekt von gespaltenem HK auf die basale TIMP-1-mRNA-Expression	68
Abbildung 3.18. Analyse der TIMP-2-mRNA-Expression	69
Abbildung 3.19. Bestimmung des MMP-9/TIMP-1-mRNA-Quotienten	70
Abbildung 3.20. Bestimmung des MMP-Aktivitätslevels in den konditionierten Medien	71
Abbildung 3.21. Aktivierung der Proben mit APMA	72
Abbildung 3.22. Basale mRNA-Expression	74

Abbildung 3.23. Einfluss von gespaltenem HK auf die basale MMP-2-mRNA-Expression in VSMCs von BN/Ka-Ratten	75
Abbildung 3.24. Auswahl der Banden für die massenspektrometrische Analyse	77
Abbildung 3.25. Detektion auf hochmolekulares Kininogen im Western Blot von Proteinextrakten der Leber, Aorta und VSMCs	78
Abbildung 3.26. cDNA-Sequenz des hochmolekularen Kininogens	79
Abbildung 3.27. Detektion der HK-mRNA mittels <i>nested</i> PCR	80
Abbildung 4.1. Schematische Darstellung der Effekte des gespaltenen HK auf die MMP-Regulation in Zytokin-stimulierten VSMCs	90

Tabellen

Tabelle 2.1. Zusammensetzung des SYBR Green Mastermixes (2x)	24
Tabelle 2.2. Sequenzen der für die <i>real-time</i> und <i>nested</i> PCR verwendeten Primer	25
Tabelle 2.3. Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.	26
Tabelle 2.4. Rezeptur für 2 Polyacrylamidgele	37
Tabelle 2.5. Verdünnungen der zur Immundetektion eingesetzten Antikörper	38
Tabelle 3.1. Verhältnis aktives MMP-2 zu proMMP-2 in den konditionierten Medien	64
Tabelle 3.2. HK-mRNA-Expression in Leber, Niere, Aorta und VSMCs	81

9. Abkürzungen

Act D	Actinomycin D
APMA	4-Aminophenyl-Quecksilberacetat
Aqua dest.	Aqua destillata
Arg	Arginin
BN	Brown Norway
BN/Ka	Brown Norway Katholiek
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Cys	Cystein
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	Fetales Bovines Serum
g	Erdschwerebeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HK	Hochmolekulares Kininogen
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration</i> : Konzentration, bei der 50% Hemmung erzielt wird
IL-1 α	Interleukin-1 α
kDa	Kilo Dalton
KKS	Kallikrein-Kinin-System

l	Liter
Lys	Lysin
m	Masse
M	Molar (mol/l)
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
MMPI	Matrixmetalloproteinase-Inhibitor
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MT-MMP	membranständige MMP (<i>membrane-type MMP</i>)
n.s.	nicht signifikant
NK	Niedermolekulares Kininogen
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
S	Svedberg-Einheit
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
TIMP	Gewebeinhibitor der MMPs (<i>tissue inhibitor of MMPs</i>)
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
u	Enzymeinheit (<i>unit</i>)
u.p. H ₂ O	Reinstwasser (<i>ultra-pure</i>)
uPAR	Urokinase-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor
v	Volumen
VSMC	glatte Gefäßmuskelzelle (<i>vascular smooth muscle cell</i>)