

Aus der Klinik für Innere Medizin / Kardiologie des Deutschen Herzzentrums Berlin
Stiftung des bürgerlichen Rechts

DISSERTATION

Regulation und Funktion der Proprotein Convertase PC5 in glatten
Gefäßmuskelzellen der Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Adam Kilimnik
aus Wroclaw

Gutachter: 1. Prof. Dr. W.-H. Zimmermann
2. Priv.-Doz. Dr. Ralf Dechend
3. Priv.-Doz. Dr. Philipp Stawowy

Datum der Promotion: 20.11.2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5-18
1.1. Entstehung und Komplikationen der Atherosklerose unter besonderer Berücksichtigung der glatten Gefäßmuskelzellen.....	5-8
1.2. Funktion der Integrine bei der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen.....	9-10
1.3. Proprotein Convertasen.....	10-17
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	18
2. Materialien	19-21
2.1. Antikörper.....	19
2.2. Chemikalien.....	19-20
2.3. Geräte und Zubehör.....	20-21
3. Methoden	22-32
3.1. Zellkultur.....	22
3.2. Pharmakologische Inhibitionsexperimente.....	22
3.3. Adhäsions-Assay.....	22-23
3.4. Migrations-Assay.....	23
3.5. Immunfluoreszenz.....	23-24
3.6. Reverse Transkriptase-PCR.....	24-27
3.7. BrdU-Proliferationsassay.....	27
3.8. Western Blot.....	27-30
3.9. Transfektion der vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen mit Antisense- Oligonukleotiden.....	30-32
3.10. Überprüfung der Zellvitalität beim Einsatz der Oligonukleotide.....	32
3.11. Statistische Auswertung.....	32
4. Ergebnisse	33-52
4.1. Identifikation von PC5-, Furin- und PC7-mRNA und subzelluläre Lokalisation der Proprotein Convertasen in glatten Gefäßmuskelzellen.....	33-35
4.2. Regulation von PC5, Furin und PC7 in glatten Gefäßmuskelzellen durch Wachstumsfaktoren.....	36-37

4.2.1.	Zeitabhängigkeit der PC5-Induktion durch platelet derived growth factor-BB.....	38
4.2.2.	Untersuchung der Signaltransduktionswege bei der PC5-Induktion durch platelet derived growth factor-BB in glatten Gefäßmuskelzellen.....	39-40
4.3.	Hemmung von PC5 durch Antisense-Oligonukleotide.....	41
4.3.1.	Untersuchung der Transfektionseffizienz der Antisense-Oligonukleotide und deren Transfektionskinetik in glatten Gefäßmuskelzellen in vitro.....	41-42
4.3.2.	Effektivitätsvergleich der ausgewählten PC5-Antisense-Oligonukleotide bei der Hemmung des Serum-induzierten PC5-Proteinanstiegs.....	42-44
4.3.3.	Überprüfung der Zellvitalität bei der Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden.....	45
4.3.4.	Einfluss der PC5-Antisense-Oligonukleotide auf die FKS-induzierte DNA-Synthese in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen.....	46
4.3.5.	Reduktion der endoproteolytischen Aktivierung der α_v -Integrinuntereinheit durch PC5-Antisense-Oligonukleotide.....	46-48
4.3.6.	Effekt der PC5-Hemmung durch Antisense-Oligonukleotide auf die Adhäsion glatter Gefäßmuskelzellen auf Vitronektin und Kollagen.....	49-50
4.3.7.	Einfluss der PC5 Hemmung durch Antisense-Oligonukleotide auf die Migration glatter Gefäßmuskelzellen auf Vitronektin und Gelatine.....	51-52
5.	Diskussion.....	53-63
6.	Zusammenfassung.....	64
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	65-67
8.	Literaturverzeichnis.....	68-74
9.	Danksagung.....	75
10.	Lebenslauf.....	76
11.	Publikationsliste.....	77-78
12.	Erklärung.....	79

1. Einleitung

1.1. Entstehung und Komplikationen der Atherosklerose unter besonderer Berücksichtigung der glatten Gefäßmuskelzellen

Die Atherosklerose ist eine chronisch fibroproliferative Erkrankung, die durch Akkumulation von Lipiden, extrazellulären Matrixproteinen, glatten Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells; VSMCs) und mononukleären Zellen in der Arterienwand charakterisiert ist.¹ Die Folgen atherosklerotischer Gefäßveränderungen, die in Abhängigkeit von dem betroffenen Gefäßabschnitt zu Herzinfarkt, apoplektischem Insult oder Verschlüssen von Extremitätenarterien führen, stellen in den Industrieländern die häufigste Todesursache dar.² Unter dem Einfluss von atherosklerotischen Risikofaktoren (arterielle Hypertonie, Nikotinkonsum, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus und auch genetische Faktoren) kommt es initial zur Schädigung und Dysfunktion des Endothels.¹ Die darauf folgende vermehrte Expression adhäsiver Glykoproteine auf der Oberfläche der Endothelzellen führt unter Einwirkung chemotaktischer Zytokine zur Steigerung der Adhäsion und Diapedese von Monozyten und Lymphozyten durch die Endothelzell-Barriere.¹ Während der Transmigration differenzieren Monozyten zu Makrophagen. Diese Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der chronischen Entzündungsreaktion, die mit der Entwicklung der Atherosklerose einhergeht. Neben der Antigen-präsentierenden Eigenschaft, sind Makrophagen in der Lage zahlreiche Zytokine zu produzieren. Weiterhin phagozitieren Makrophagen über spezielle Scavenger-Rezeptoren oxidiertes low density lipoprotein (oxLDL). Da das Zytoplasma der Makrophagen durch fortschreitende intravakuoläre Lipideinlagerung mikroskopisch einen schaumigen Aspekt erhält, werden diese Zellen als Schaumzellen bezeichnet. Frühe atherosklerotische Läsionen, die bereits im Kindesalter nachweisbar sind³, zeichnen sich durch Akkumulation von Schaumzellen und T-Lymphozyten aus. Sie werden als Lipidflecken („fatty streaks“) bezeichnet und sind als einziges Entwicklungsstadium der Atherosklerose vollständig reversibel.¹ Im Gegensatz zu Monozyten/Makrophagen, die insbesondere den chronischen Entzündungsprozess in den betroffenen Gefäßen triggern, trägt die Proliferation und Migration von vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen sowie deren gesteigerte Synthese der extrazellulären Matrixproteine (EZM-Proteine) zum Wachstum des Plaques bei.¹ Die so genannte fibroproliferative Phase ist ebenfalls für die Entstehung von Restenosen nach therapeutischen Eingriffen (PTCA) bedeutsam.⁴ Proliferation und Migration ist gekennzeichnet durch phänotypische Modulation der VSMCs. Daunter versteht man einen reversiblen Prozess der Umwandlung vom kontraktiven (k-Phänotyp) zum metabolisch/sekretorischen (m-Phänotyp) Typ der VSMCs.⁵ Die VSMCs liegen in der normalen Gefäßwand im k-Phänotyp vor. Als Bestandteil der Media

adulter Gefäße wachsen sie nur in einem sehr geringen Umfang und produzieren nur geringe Mengen EZM-Proteine.⁵ Unter dem Einfluss von Chemokinen und Wachstumsfaktoren wandeln sich die VSMCs in den m-Phänotyp um. Nach dieser Modulation sind sie äußerst empfänglich für mitogene Reize und können eine große Menge an faserhaltiger Grundsubstanz bilden.⁵ Der m-Phänotyp der glatten Gefäßmuskelzellen zeichnet sich durch die Größenzunahme der Zellorganellen, die für die Proteinbiosynthese, Modifikation und Exkretion notwendig sind, aus.¹ Induziert wird die Proliferation und Migration der VSMCs durch Wachstumsfaktoren und Chemokine, von denen platelet derived growth factor (PDGF) eines der stärksten ist. PDGF wird von den Thrombozyten, Makrophagen, Endothelzellen und auch von den VSMCs selbst sezerniert. Dieser Wachstumsfaktor besteht aus den zwei Polypeptidketten A und B mit einem Molekulargewicht von 16 kDa bzw. 14 kDa.⁶ Beide Ketten werden über Disulfidbrücken verbunden und entsprechend der Zusammensetzung zu den drei Isoformen PDGF-AA, PDGF-BB und PDGF-AB zusammengefügt. PDGF interagiert mit dem gleichnamigen Rezeptor. Ähnlich den Insulin-, insulin-like growth factor- (IGF) und epidermal growth factor- (EGF) Rezeptoren ist der PDGF-Rezeptor eine membrangebundene Tyrosinkinase.⁷ Die Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne führt zur Dimerisation des Rezeptors und Änderung der Konformation der zytoplasmatischen Domäne mit konsekutiver Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität. Dadurch werden auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors spezifische Tyrosylreste autophosphoryliert. Die PDGF-Rezeptoren setzen sich aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten α und β zusammen, die zu drei Rezeptortypen dimerisieren können ($\alpha\alpha$ -, $\beta\beta$ - und $\alpha\beta$ -Dimere). Diese Rezeptortypen unterscheiden sich hinsichtlich der Signaltransduktionskaskaden und auch in ihren biologischen Auswirkungen.⁸ Die mitogene Aktivität von PDGF ist abhängig von der Isoform und Anzahl beider Rezeptoruntereinheiten auf der Zelloberfläche.⁸ PDGF-Rezeptoren kommen in unterschiedlicher Menge und unterschiedlichen Anteilen der α - und β -Untereinheiten auf mesenchymalen Zellen (z.B. VSMCs, Fibroblasten, Osteoblasten, Gliazellen) vor. Dagegen sind auf Epithelzellen, Endothelzellen und Lymphozyten keine Rezeptoren zu finden.⁸ Eine erhöhte PDGF-Expression wird in allen Stadien der atherosklerotischen Erkrankung beschrieben.⁹ Rubin und Mitarbeiter¹⁰ untersuchten immunhistochemisch die Expression von PDGF-Rezeptoren bei Blutgefäßen mit normaler und pathologisch gesteigerter Zellproliferation. Sie fanden eine geringe Rezeptorexpression bei Gefäßen mit normaler Zellproliferation, aber eine gesteigerte Dichte bei proliferativen Prozessen in den atherosklerotischen Plaques.

Auch das Angiotensin II (Ang II) kann neben seiner wichtigen Rolle bei der Regulation des

Blutdruckes (durch Beeinflussung des vaskulären Tonus und Wasserhaushaltes) die Proteinbiosynthese der glatten Gefäßmuskelzellen induzieren.¹¹ Trotz der nachgewiesenen hypertrophen Wirkung ist Ang II im Gegensatz zu PDGF ein schwaches Mitogen.¹¹ Die zelluläre Wirkung des Ang II wird durch die Anbindung an membranständige Rezeptoren initiiert. Bisher wurden vier Rezeptorsubtypen beschrieben.¹² Der AT₁-Rezeptor gehört zur Familie der Rezeptoren mit 7-Transmembrandomänen, die an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind. Klassischer Weise wird in der nachfolgenden Signaltransduktionskaskade die Phospholipase C β aktiviert.¹¹

Beide Peptide PDGF und Ang II sind in der Lage zahlreiche Signaltransduktionswege zu induzieren. Eine zentrale Rolle bei der Initiierung der Proteinbiosynthese durch hypertrophe und mitogene Faktoren nehmen die extracellular signal-regulated kinases 1/2 mitogen-activated protein kinase (ERK1/2 MAP-Kinase) und die ribosomale S6-Kinase (p70S6-Kinase) ein. Angiotensin II ist ein wirkungsstarker Induktor der ERK1/2 MAP-Kinase in vivo und in vitro.¹³ Auch das PDGF kann dem MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg stimulieren.¹⁴ Die phosphorylierte ERK1/2 MAP-Kinase transloziert in den Nukleus und führt hier zur vermehrten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Zellzyklus-regulierenden Genen (z.B. c-fos, c-myc, c-jun) steigern.¹² Neben der Steigerung der DNA-Synthese spielt der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Migration glatter Gefäßmuskelzellen.¹⁵ Die Inkubation von VSMCs mit dem mitogen-activated or extracellular signal-regulated protein kinase-Inhibitor (MEK-Inhibitor) PD 98059 führt zur Verminderung der Ang II- und PDGF-induzierten Migration dieser Zellen.¹⁵ Ribosomale p70s6-Kinase, die über den PI3-Kinase-Akt Signaltransduktionsweg stimuliert wird, reguliert die Translation der mRNA ribosomaler Proteine und kontrolliert so die Proteinbiosynthese und Zellzyklusprogression.¹⁶

Die fibroproliferativen Vorgänge, die für die Entwicklung der Atherosklerose und Restenose nach therapeutischen Eingriffen wichtig sind, können im Tiermodell durch die so genannte Ballon-Verletzung initiiert werden.¹⁷ Dabei wird in einem Gefäßabschnitt das Endothel entfernt und das Gefäß durch einen Ballon überdehnt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Arteria carotis der Ratte nach einer Ballon-Verletzung zeigten die Größenzunahme des endoplasmatischen Retikulums (ER) und Golgiapparates in den glatten Gefäßmuskelzellen. Diese Beobachtung weist auf eine Veränderung der VSMCs in Richtung des mitogenen Phänotyps hin. Nachdem die Neointima durch eine Endothelzellschicht überzogen wurde, konnten erneut vermehrt kontraktile Proteine in den neointimalen VSMCs nachgewiesen werden.¹⁷ Antikörper gegen PDGF bewirken nach Ballon-Verletzung (Neointimamodell) im Rattenversuch eine signifikante Verminderung der Akkumulation von VSMCs in der Neointima. Hierbei

scheinen die Antikörper die Zellmigration in die Neointima zu verhindern.¹⁸ Eine Reihe von Proteinen, die Bestandteil des kontraktiven Apparates sind, wurden als Marker für den Differenzierungsgrad der glatten Gefäßmuskelzellen etabliert. Typisch für den kontraktiven Phänotyp der VSMCs ist eine starke Expression der schweren Ketten des Myosins (SM-MHC).¹⁹ SM-MHC kommt in den zwei Splicevarianten SM-1 (204 kDa) und SM-2 (200 kDa) vor, ist auf VSMCs begrenzt und in den proliferierenden Zellen reduziert. Ähnlich den embryonalen VSMCs zeichnen sich die sekretorischen glatten Gefäßmuskelzellen in atherosklerotischen Läsionen durch die Expression veränderter Myosinfilamente (SM-emb) aus.¹⁹

Reusch und Mitarbeiter untersuchten die Auswirkungen einer Druckerhöhung auf kultivierte VSMCs und fanden heraus, dass diese zu einer erhöhten Expression von SM-1 und SM-2 führt.²⁰ Die Erhöhung der schweren Myosinketten war auf Laminin kultivierten Zellen größer als bei Zellen, die auf Kollagen Typ I ausgesetzt wurden. Des Weiteren wurde experimentell auch eine Phänotyp-modifizierende Wirkung von Wachstumsfaktoren beobachtet. So zeigten die Autoren ferner, dass es unter dem Einfluss von PDGF zu einem Expressionsrückgang von SM-1 kommt.²⁰ Die Zellen wandeln sich somit zum sekretorischen Phänotyp um.

Unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren sezernieren die sekretorischen VSMCs große Mengen extrazellulärer Matrixproteine.¹ Die VSMCs sind in adulten Gefäßen umgeben von Kollagen Typ I, III, IV, V, VI und Laminin.²¹ In pathologisch veränderten Gefäßen lassen sich weitere Glykoproteine nachweisen. Zu diesen zählen Osteopontin, Vitronektin, Thrombospondin, Tenascin C und secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC).²¹ Diese Veränderungen tragen neben der Zellproliferation und Lipidablagerung zum Plaquewachstum bei.

Integrine sind für die Migration der VSMCs notwendig.²² Sie sind das Link zwischen dem Zytoskelett und EZM. Darüber hinaus sind sie an der Mechanotransduktion und der bidirektionalen Signalübertragung beteiligt.²² Unter Mechanotransduktion versteht man die zelluläre Antwort auf transmuralen Druck oder Dehnung. Bei der bidirektionalen Signalübertragung werden in den Zellen durch Integrine sowohl Signale von außen nach innen (outside-in signaling) als auch Signale von innen nach außen (inside-out signaling) weitergeleitet. Da in dieser Arbeit schwerpunktmäßig die Funktion von Integrinen in VSMCs untersucht wurde, wird im nächsten Abschnitt näher auf diese eingegangen.

1.2. Funktion der Integrine bei der Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

Integrine gehören neben den Cadherinen, Selektinen, Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie zu den Zelladhäsionsmolekülen, die zum einen die Interaktion zwischen den Zellen untereinander vermitteln,²³ zum anderen bilden sie die Verbindung zur EZM. Sie sind transmembranäre Glykoproteine, die aus zwei nichtkovalent verbundenen Untereinheiten α und β bestehen.²³ Der Name Integrine wurde 1986 von Hynes eingeführt und sollte die integrierende Rolle dieser Molekülgruppe zwischen dem Extrazellular- und Intrazellularraum verdeutlichen.²³ Die extrazelluläre Domäne beider Integrinuntereinheiten bildet die Bindungsstelle für Moleküle der EZM oder für andere Adhäsionsmoleküle. Über einen kurzen membranären Anteil erfolgt die Verankerung in der Plasmamembran. Die zytoplasmatische Domäne stellt die Verbindung zum Zytoskelett her. α -Untereinheiten beinhalten als eine Besonderheit in ihrem extrazellulären Anteil mehrere Bindungsstellen für Ca^{2+} -Ionen. Einige der α -Untereinheiten ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, αIIb , αv) werden posttranslatorisch durch Endoproteolyse in zwei Anteile gespalten.²⁴ Die dadurch entstandene leichte und schwere Kette wird durch eine Disulfidkette verbunden. Die β -Untereinheit besitzt in dem extrazellulären Anteil eine cysteinreiche Region. Ein beispielhafter Aufbau eines dimeren Integrinrezeptors wird in der Abbildung 1 dargestellt.

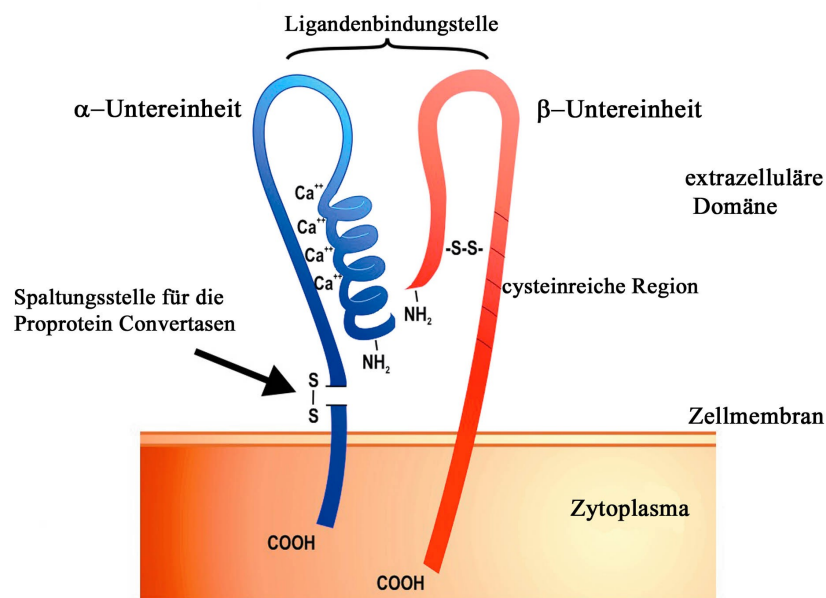


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrinrezeptors. Durch die Endoproteolyse des pro- αv (150 kDa) entsteht eine schwere (125 kDa) und leichte (25 kDa) Kette. Beide Anteile werden durch eine Disulfidbrücke verbunden. Die αv -Untereinheit dimerisiert mit der $\beta 3$ -Untereinheit zu einem Integrinrezeptor.²⁴

Auf Säugetierzellen wurden bisher achtzehn verschiedene α -Untereinheiten und acht β -Untereinheiten beschrieben.²³ Sie können zu mehr als zwanzig verschiedenen Rezeptoren dimerisieren. Die meisten Integrine können mehr als nur einen Liganden binden.²³ Neben der Funktion als Adhäsionsmoleküle führt die Bindung an EZM-Bestandteile zur Aktivierung zahlreicher Signaltransduktionskaskaden.²³ Obwohl die zytoplasmatischen Anteile der Integrine keine Tyrosinkinaseaktivität besitzen, führt die Anbindung der Liganden zur Aktivierung weiterer Proteine (c-Jun-Kinase, MAP-Kinasen, PI3-Kinase).²⁵ Eine wichtige Rolle hierbei spielt die Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (focal adhesion kinase; FAK).²³ Die nachgeschalteten Signaltransduktionswege können verschiedene Zellfunktionen beeinflussen. Experimentelle Daten zeigen, dass die $\alpha 5 \beta 1$ vermittelte Adhäsion an Fibronectin bei VSMCs zur Stimulation von Migration und Zellwachstum führt.²⁶ Darüber hinaus können Integrine druckbedingte Veränderungen der EZM-Bestandteile detektieren und somit als Mechanosensoren fungieren (Mechanotransduktion).²⁷ Experimente der Arbeitsgruppe von Morla zeigten²⁸, dass glatte Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien von Schweinen, die auf Laminin kultiviert wurden, eine deutlich höhere Expressionsrate an Myosin schweren Ketten aufwiesen, als auf Fibronectin kultivierte Vergleichszellen. Dies verdeutlicht, dass die Integrin-EZM Interaktion den Phänotyp der VSMCs modulieren kann. Die Änderung der Zusammensetzung der EZM bei der Atheroskleroseentwicklung wird begleitet durch eine Änderung des Expressionsmusters der Integrine auf der Oberfläche der VSMCs.²⁸ Immunohistochemische und Northern Blot-Untersuchungen von Rattenaorta nach Ballon-Verletzung zeigten eine Hochregulation von $\alpha v \beta 3$ und $\alpha v \beta 5$ in der Neointima.²⁹ Die Blockade dieser Integrine vermindert signifikant die Bildung der Neointima.³⁰ Zehn der bisher bekannten achtzehn α -Untereinheiten haben in der Aminosäuresequenz des Vorläuferproteins mögliche di-basische Spaltungsstellen, an denen Proprotein Convertasen (PCs) ihre Wirkung entfalten können. Bisher wurde gezeigt, dass die Integrinuntereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv Substrate von Furin und PC5 sind.³¹ Beide Enzyme gehören zu den PCs, die im nächsten Abschnitt detaillierter beschrieben werden.

1.3. Proprotein Convertasen

Viele im Körper vorkommende Proteine, zu denen auch Wachstumsfaktoren, Integrine und Peptidhormone gehören, werden als inaktive Proproteine synthetisiert und müssen eine limitierte Endoproteolyse durchlaufen um ihre biologische Aktivität entfalten zu können. Die von Steiner et al. 1967 publizierten Untersuchungen zeigten, dass das Insulinmolekül aus einem inaktiven größeren Vorläufermolekül entsteht.³² Zur gleichen Zeit veröffentlichten Chrétien und Li

Ergebnisse der Sequenzierung der Proteine β -Lipotropin (β -LPH), γ -Lipotropin (γ -LPH) und β -Melanotropin (β -MSH).³³ Sie fanden heraus, dass die Proteinsequenz des β -MSH in den Sequenzen von β -LPH und γ -LPH enthalten ist. Die Autoren folgerten daraus, dass das β -MSH ein endoproteolytisches Produkt beider Lipotropine ist. Die endoproteolytische Spaltung erfolgt hierbei an di-basischen Proteinsequenzen. Jedoch erst 1984 wurde das erste Enzym identifiziert, das an di-basischen Sequenzen proteolytisch aktiv ist.³⁴ Es handelte sich um das Produkt des aus Hefen stammenden *KEX2*-Gens, das für eine membranständige Kalzium abhängige Subtilisin-ähnliche Serin-Protease KEXIN kodiert. Subtilisin ist eine Protease, die in Bakterien nachgewiesen wurde. In Vitro ist dieses Enzym imstande auch in Säugetierzellen das Pro-Opiomelanokortin Molekül (POMC) proteolytisch zu aktivieren.³⁵ Das große Vorläufermolekül POMC wird an di-basischen Aminosäuresequenzen in die aktiven Proteine ACTH, β - und γ -Lipotropin, β -Endorphin und α -Melanotropin (α -MSH) gespalten.³⁵ Durch die Anwendung von PCR-Primern, die auf der Basis der Hefe-Gensequenz hergestellt wurden, entdeckte man homologe Säugetierenzyme.³⁶ Bisher wurden sieben verschiedene Vertreter der Familie der Subtilisin/Kexin-ähnlichen PCs identifiziert. Der Aufbau der bakteriellen Protease Subtilisin bildet die Grundlage für diese Proteasenfamilie. Zu den bisher bekannten PCs, die die Vorläufermoleküle sequenzspezifisch an einem gemeinsamen Motiv (Lys/Arg)-(X_n)-(Lys/Arg)↓ (wobei n = 0, 2, 4 oder 6 ist und X eine beliebige Aminosäure, jedoch normalerweise nicht Cystein sein kann) spalten, gehören PC1 (auch PC3 genannt), PC2, PC4, PACE4, Furin, PC5A und PC5B (auch als PC6 bekannt) und PC7 (auch LPC genannt).³⁶ Einige Vorläufermoleküle erfordern eine Spaltung an nicht-basischen Aminosäuren, so dass es weitere spezifische Proteasen geben muss. Die erste in Säugetierzellen nachgewiesene Protease, die Proproteine an nicht-basischen Sequenzen spaltet, ist die Pyrolysin-ähnliche Subtilase SKI-1/S1P (subtilisin-kexin isoenzyme-1/ Site-1 Protease).³⁷ Das Konsensus-Motiv dieses Enzyms lautet (Arg/Lys)-X-(hydrophob)-Z↓ (Z ist variabel). Eine weitere Proprotein Convertase, die Proproteine an nicht-basischen Spaltstellen aktiviert ist PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin kexin 9). Sowohl SKI-I als auch PCSK9 spielen eine wichtige Rolle im Lipidstoffwechsel.³⁸

Der Aufbau der PCs kann in vier Abschnitte unterteilt werden. An dem N-terminalen Ende der Peptidkette befindet sich das Propeptid, das autokatalytisch abgespalten werden muss, damit das Enzym biologische Aktivität entfalten kann.³⁶ Weiterhin spielt das Propeptid eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung. Dem Propeptid folgt die katalytische Domäne des Enzyms, die innerhalb der PCs eine hohe Homologie aufweist (bis zu 55 %). Nachfolgend an der Peptidkette befindet sich eine Domäne, die P- oder Homo B-Domäne genannt wird. Dieser Proteinbereich beeinflusst

die pH-Optima sowie die Kalziumabhängigkeit der Enzyme.³⁹ Der letzte Proteinabschnitt ist die variable C-terminale Region, die für die subzelluläre Verteilung der PCs bedeutsam ist.³⁹ Über eine transmembranäre Domäne, die sich in der variablen C-terminalen Region befindet, erfolgt bei Furin, PC5B und PC7, ähnlich dem homologen Hefeenzym Kexin, die Verankerung in den Membranen des *trans*-Golgi network (TGN), der Vesikelmembran und in der Zellmembran.³⁹

Ein wichtiger Aspekt in der Wirkung aller Proteasen ist deren genau regulierte räumliche und zeitliche Aktivierung. Der Mechanismus der Autoaktivierung, der für Furin gezeigt wurde³⁹, dient als Modell auch für die anderen bekannten PCs - außer für PC2. Die autoproteolytische Abspaltung der Pro-Domäne erlaubt dem Furin das rauhe endoplasmatische Retikulum (RER) zu verlassen. Dabei bleibt die Pro-Domäne an dem Enzym nicht kovalent gebunden und wirkt hierbei als ein Inhibitor bis ein Bereich im TGN erreicht wird, der sich durch einen niedrigeren pH-Wert (pH = 6,5) und höhere Kalziumkonzentrationen auszeichnet. Diese veränderten Umgebungsbedingungen erlauben die Abdissoziation der zuvor zum zweiten Mal proteolytisch gespaltenen Pro-Domäne und führen zur vollständigen Aktivierung des Enzyms.³⁹ Die erneute Proteolyse des Pro-Segmentes verhindert seinen möglichen inhibitorischen Einfluss nach der Abdissoziation.

Für den zellulären Transport und Autoaktivierung von PC2 ist die Bindung an das Molekül 7B2 notwendig.⁴⁰ Die Interaktion des Enzyms mit 7B2 erfolgt im RER. Während des Transports des Pro-PC2/7B2-Komplexes durch das TGN kommt es zur proteolytischen Spaltung des 7B2-Moleküls durch Furin und verwandte TGN-Proteasen.⁴⁰ Diese Spaltung resultiert in einem inhibitorischen C-terminalen Fragment und einem aktivierenden und stabilisierenden N-terminalen Anteil. Bei Abwesenheit von 7B2 erfolgt trotz proteolytischer Spaltung des Pro-PC2 keine Ausbildung eines aktiven PC2.⁴⁰

Einige sekretorische Proteine werden von bestimmten Zellen zunächst in Vesikeln gespeichert und erst nach einem spezifischen Reiz unter dem Einfluss nervaler oder hormoneller Stimuli durch Exozytose an die Umgebung freigegeben.⁴¹ Dieser Sekretionsmechanismus wird als regulierte Sekretion bezeichnet. Vorzugsweise findet man ihn bei der Freisetzung von Hormonen wie Insulin und ACTH. Plasmamembran-Glykoproteine und einige weitere Proteine werden dagegen kontinuierlich und ohne jeglichen Stimulus zur Zelloberfläche transportiert (konstitutive Sekretion).⁴¹ Die im Körper weit verbreiteten PCs Furin, PC5B, PACE4 und PC7 wirken in ihrer aktiven Form an der konstitutiven Sekretion der Proteine.³⁹ Furin und PC5 zeichnen sich durch ubiquitäres Vorkommen in den Geweben aus. Beide Enzyme zeigen ähnliche Spaltungssensitivität und vergleichbare subzelluläre Verteilung (deshalb auch die gemeinsame Bezeichnung „Furin-ähnliche“ PCs). Sie zirkulieren zwischen dem TGN und der Zellmembran.

Der Isoform PC5A fehlt im Gegensatz zur Isoform PC5B die transmembranäre Domäne.⁴¹ Das lösliche PC5A befindet sich in der sekretorischen Granula des regulierten Proteinsekretionsweges. PC5A scheint auch an der Prozessierung von Proteinen im konstitutiven Proteinsekretionsweg mitzuwirken.³⁶ Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen der α -Zellen des Pankreas konnte das PC5A in sekretorischen Vesikeln der Inselzellen detektiert werden.⁴¹

Im Vergleich zu den weit im Körper verteilten furin-ähnlichen PCs zeichnen sich insbesondere PC1, PC2 und PC4 durch ein Vorkommen in wenigen Geweben aus.³⁶

PC1 und PC2 sind die Hauptvertreter der PCs im Gehirn und in neuroendokrinen Zellen.³⁶ Hier werden beide Enzyme in der sekretorischen Granula detektiert und sind für die Prozessierung zahlreicher Prohormone und Proneuropeptide verantwortlich. Sie wirken im regulierten Sekretionsweg. Insgesamt zeigen Untersuchungen, dass PC1-mRNA weniger weit verbreitet im Gehirn vorkommt als die PC2-mRNA.³⁶ So findet man in fast allen Kernen des Thalamus PC2-mRNA. Hingegen ist die PC1-mRNA nur in den anterioren Anteilen detektierbar. Die unterschiedliche Verteilung beider Enzyme in der Hypophyse bewirkt, dass aus dem gleichen Vorläufermolekül, dem POMC im Vorderlappen das ACTH und im intermediären Bereich das α -MSH entsteht.⁴² Die unterschiedliche Gewebe- und intrazelluläre Verteilung der PCs führt trotz ähnlicher Spaltungssequenzen zur Spezifität der Enzym-Substrat-Interaktionen.

Im Gegensatz zu Furin und PC5 wurde PC4 bisher ausschließlich in Keimzellen nachgewiesen.³⁶ PC7 ist vor allem in lymphatischen Geweben vertreten.³⁶

Ein wichtiges Mittel bei der Untersuchung der physiologischen Funktionen der PCs ist die Betrachtung der Knock-out Tiere und Evaluierung natürlich vorkommender Mutationen.

Eine Mutation im PC1-Gen wurde beim Menschen beschrieben.^{43,44} Die Punktmutation Gly \rightarrow Arg⁴⁸³ im ersten Allel des PC1-Gens führt zur Retention des pro-PC1 im ER. Das zweite Allel ist ebenfalls von einer Mutation betroffen. Diese resultiert in einem Verlust von 26 Aminosäuren bei dem Spleißvorgang und hierdurch bedingter Inaktivität des Genprodukts. Die von der Genveränderung betroffenen Menschen zeichnen sich bereits im Kindesalter durch massive Fettleibigkeit, gestörte Glukosetoleranz, Hypokortisolismus und hypogonadotropen Hypogonadismus aus. Weiterhin konnten erhöhte Plasmaspiegel von Proinsulin- und POMC detektiert werden. Das klinische Bild verdeutlicht, dass PC1 eine wichtige Rolle bei der gonadalen Entwicklung, Regulation von Körpergewicht, Glukosehomeostase und Hormonhaushalt spielt. Anhand eines Knock-out Mausmodells konnte gezeigt werden, dass eine Mutation im PC4-Gen zur Störung der Fertilität führt.⁴⁵ Die Spermatozyten weisen eine verminderte Befruchtungsfähigkeit auf. Die befruchteten Eizellen entwickeln sich nicht weiter.

Furin-Transkripte werden während der Embryonalentwicklung sehr früh detektiert.⁴⁶ Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass sich die Furin-Null-Maus durch frühe embryonale Missbildungen auszeichnet.⁴⁷ Die letalen Fehlentwicklungen betreffen insbesondere das Herz-Kreislauf-System. Weiterhin wird deutlich, dass keine andere Convertase das Fehlen von Furin in dieser frühen Entwicklungsphase kompensieren kann.

Der Phänotyp der PACE-4 Knock-out Maus zeichnet sich insbesondere durch kraniofaziale Malformationen und ähnlich der Furin Knock-out Maus durch Störungen der Organogenese aus.⁴⁵

Auch PC5-Knock-out Versuche erbrachten wie bei Furin das Ergebnis einer frühen embryonalen Letalität.⁴⁵ Die PC7 Knock-out Maus zeigt keine phänotypischen Auffälligkeiten. Dies kann ein Hinweis auf eine komplette Redundanz sein.⁴⁵ Im Gegensatz zum Furin Knock-out stehen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Roebroek et al., die einen induzierbaren Furin Knock-out in den Leberzellen von adulten Mäusen untersuchten.⁴⁸ Histologische Untersuchungen der Leber bei den Versuchstieren ergaben keine morphologisch feststellbaren Abweichungen. Die Ausprägungen der Einschränkungen in der Prozessierung von ausgewählten Vorläufermolekülen, die in zahlreichen Vorarbeiten in Koexpressionsexperimenten als Furinsubstrate ausgewiesen wurden, waren unterschiedlich ausgeprägt. Die Prozessierung des Insulinrezeptors und des low density Lipoprotein (LDL) wurde nicht beeinträchtigt. Die in den Leberzellen detektierte Menge an Proalbumin stieg an. Der größere Anteil dieses Vorläufermoleküls wurde trotz des fehlenden Furins in Albumin umgewandelt. Ähnliche Ergebnisse ergaben die Untersuchungen des Pro-Vitronektins. Hingegen blieb eine größere Menge der $\alpha 5$ -Integrinuntereinheiten ungespalten. Ebenfalls wurde ein starker Rückgang des endoproteolytisch aktivierten $\alpha 1$ -Mikroalbumins beobachtet. Dieses Molekül konnte aber weiterhin in geringeren Mengen detektiert werden. Zusammenfassend zeigten die beschriebenen Experimente, dass die fehlende Aktivität von Furin durch redundante PCs in unterschiedlichem Maße kompensiert wurde. Bei keinem der postulierten Furinsubstrate kam es zu einer kompletten Unterbrechung der Prozessierung des Vorläufermoleküls.⁴⁸

Erhöhte Expressionsraten der verschiedenen PCs wurden in zahlreichen Tumorzellarten gefunden. Furin ist am weitesten verbreitet in Tumorzellen unterschiedlicher Herkunft.⁴⁹ Die Hochregulation dieses Enzyms scheint mit beschleunigter Progression der Erkrankung und erhöhter Invasivität der Zellen einherzugehen.⁴⁹ Andere Studien zeigten das vermehrte Vorkommen von PC1 und PC2 in neuroendokrinen Tumoren.⁵⁰ PC5- und PC7-Expression wurde nur in wenigen Tumoren bzw. Tumorzelllinien nachgewiesen.⁵¹ Das PC5 wird vermehrt in Tumorzelllinien des Kolonkarzinoms gefunden.⁵¹ PC7 kann in Brusttumoren nachgewiesen werden.⁵¹ Vermutlich sind PCs an verschiedenen Vorgängen des Tumorwachstums und der

Metastasierung beteiligt. Durch die Prozessierung von Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren können sie die Proliferation der Tumorzellen beeinflussen. So ist z.B. die proteolytische Spaltung des insulin-like growth factor-1 Rezeptor (IGF-1R) notwendig für die Übermittlung von Signalen, die zum Wachstum und Überleben zahlreicher Tumorzellarten beitragen.⁵¹ Zu den Substraten der PCs zählen auch das epidermal growth factor (EGF) und transforming growth factor β (TGF- β).³⁶ Die PCs sind weiterhin an der Aktivierung zahlreicher EZM-abbauender Enzyme beteiligt. Das Stromelysin-3 – ein Mitglied der Matrix-degradierenden Metalloproteinasen (MMP) – wird von Furin aktiviert.⁵² Das vermehrte Vorkommen dieses Enzyms bei Tumorerkrankungen ist mit erhöhter lokaler Invasivität und insgesamt schlechter Prognose verbunden.⁵³ Die membrane type-MMP-1 (MT-MMP-1) wird durch Furin-ähnlichen Convertasen aktiviert.⁵⁴ Dieses Enzym ist verantwortlich für die Prozessierung des pro-MMP-2, das für den Abbau des Hauptbestandteils der Basalmembranen – Kollagen Typ IV – verantwortlich ist. An dem Vorgang der Metastasierung sind auch Integrine beteiligt. Wie bereits zuvor beschrieben gehören einige der Integrine zu den Substraten der PCs.

Experimentell wurde auch der Einfluss der PC-Inhibitoren auf Tumorzellen untersucht. Wachstumstendenz und Invasivität der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 und Hypophysentumor Zelllinie AtT20 konnte durch den Einsatz von α 1-Antitrypsin-Portland (α ₁-PDX) entscheidend gesenkt werden.⁵⁵

Die Entwicklung von atherosklerotischen Plaques, Restenose nach interventionellen Eingriffen und Umbauvorgänge des Myokards nach einem Herzinfarkt oder bei arterieller Hypertonie sind mit Neusynthese zahlreicher Proteine verbunden.¹ Die Beteiligung der PCs an der Aktivierung von Wachstumsfaktoren, Integrinen, EZM-Bestandteilen, EZM-abbauenden Enzymen und Peptidhormonen macht diese Enzymgruppe ebenfalls interessant für die kardiovaskuläre Forschung.

Im Rattenversuch wurde nach einem Herzinfarkt eine Hochregulation von Furin beobachtet.⁵⁶ Northern Blot-Analysen zeigten, dass im Gegensatz zu Furin-mRNA, PACE4-mRNA nach Herzinfarkt nicht höher exprimiert war. Die Hochregulation von Furin wurde begleitet von der Expressionserhöhung des Vorläuferproteins brain natriuretic peptide (BNP), dem gamma-BNP. In vitro Experimente zeigten, dass dieses Molekül ein mögliches Substrat von Furin ist.⁵⁶ Durch den Einsatz von α -PDX konnte die Prozessierung von gamma-BNP in neonatalen Kardiomyocyten supprimiert werden.⁵⁷ Zu gleichen Ergebnissen kam man durch den Einsatz des pharmakologischen PC-Inhibitors von Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketone (Dec-RVKR-CMK). Die spannungsinduzierte Hypertrophie dieser Zellen, die durch Hochregulation

des gamma-BNP begleitet wird, konnte mit den beiden o.g. Inhibitoren negativ beeinflusst werden.⁵⁷ Negishi et al. zeigten in vivo und in vitro, dass shear-stress zu einer Expressionssteigerung von Furin und seines Substrats TGF- β in Endothelzellen führt.⁵⁸ Mögliche Involvierung der PCs in die Vorgänge der Blutdruckregulation wird in zwei Arbeiten dargestellt. Das Proprotein des vasoaktiven Peptids Endothelin-1 wird durch Furin aktiviert.⁵⁹ Durch den Einsatz von α -PDX als auch von Dec-RVKR-CMK konnte die Aktivierung unterbrochen werden.⁵⁹ Die Koexpression von dem humanen PC5 mit dem Prorenin in kultivierten GH4C1-Zellen führte zur Sekretion des aktiven Renins.⁶⁰ Auch die immunhistochemischen Analysen der Zona glomerulosa der Nebenniere zeigten, dass das Enzym mit dem vermuteten Substrat kolokalisiert.

Die immunhistochemischen Färbungen von Rattengefäßen nach einer Ballon-Verletzung verdeutlichten eine Hochregulation von Furin, PC5 und PC7 nach dem Eingriff.⁶¹ In den intakten Gefäßen wurden diese Enzyme nur in geringen Mengen detektiert. PC1 und PC2 konnten in den Gefäßen nicht nachgewiesen werden.⁶¹ Auch in der Organkultur der Rattenaorta wurde eine Expressionssteigerung von Furin, PC5 und PC7 nachgewiesen. Northern Blot-Analysen von PC5 zeigten, dass nur die mRNA der Isoform PC5A und nicht PC5B vermehrt gebildet wurde.⁶¹ In dem Kulturmedium wurde darüber hinaus gesteigerte Sekretion des PC-Substrates nerve growth factor (NGF) festgestellt. Dieser Wachstumsfaktor wird durch die VSMCs gebildet und hat auf die Zellen eine starke mitogene Wirkung.⁶¹

Die Involvierung der PCs in viele physiologische und insbesondere in pathologische Vorgänge lenkt eine steigende Aufmerksamkeit auf die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren. Der Hauptweg, der bisher besprochen wurde, beinhaltet die Entwicklung von Inhibitoren, die sich gegen das aktive Zentrum der Enzyme richten. Hieraus ergibt sich bereits das Problem der Spezifität der Inhibitoren, da die katalytische Domäne ein Bereich der höchsten Homologie in der Familie der PCs ist.⁶²

Zu den natürlich vorkommenden Inhibitoren der PCs gehören ihre N-terminalen Prosegmente. Auch bei den Prosegmenten gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass sie die PCs nicht selektiv hemmen. Das Prosegment von PC1 inhibiert auch PACE4.³⁶ Das Furin-Prosegment entwickelt seine Wirkung auch in Gegenwart von PC1, etwas schwächer wird das PC2 inhibiert. PC2-Prosegment hat dagegen keinen inhibierenden Einfluss auf Furin. Die Prosegmente von PC1 und PC2 sind nicht untereinander austauschbar.³⁶ Basak et al. zeigten, dass synthetische Peptide, die auf der Sequenz der Prosegmente von PC1 und Furin basieren, potente Inhibitoren beider Proteinasen sind.⁶³ Zu den natürlich vorkommenden proteinbasierten PC-Inhibitoren gehört auch der proteinase inhibitor-8.⁶² Dieses Molekül besitzt ein Erkennungssignal, das insbesondere der

Spaltungsspezifität des Furins entspricht. Der proteinase inhibitor-8 ist mit einem K_i von 53,8 pmol/L der stärkste bisher bekannte Furininhibitor. Auch für das aus der *Drosophila* stammende Protein Serin protease inhibitor4 (Spn4) konnte eine inhibierende Wirkung auf das Furin gezeigt werden.⁶² Der PC-Inhibitor α -PDX findet seinen Ursprung im physiologischen Inhibitor der neutrophilen Elastase α 1-Antitrypsin. In einer natürlich vorkommenden Mutation dieses Enzyms (α 1-AT-Pittsburgh) wurde von der Arbeitsgruppe Anderson³⁶ eine weitere Aminosäure im aktiven Zentrum ausgetauscht. Die so entstandene Sequenz Arg-Ile-Pro-Arg des α -PDX (auch genannt α 1-Antitrypsin-Portland) entspricht insbesondere der Spaltungsspezifität des Furins, dessen Substrate oft an Positionen P1 und P4 (P1 wird die erste, P4 die vierte Aminosäure vor der Spaltungsstelle des Proproteins bezeichnet) ein Arginin besitzen. Decroly et al. zeigte, dass α -PDX am stärksten Furin und PC5 inhibiert, dreifach schwächer ist die Wirkung auf PC7.⁶⁴

Potente Inhibitoren der PCs wurden durch Kopplung von kurzen Peptiden an Chlormethan hergestellt.⁶² Der Peptidanteil wurde analog zu den Spaltsequenzen der PCs – mit basischen Aminosäuren an P₁, P₂ und meist zusätzlich an P₄ – synthetisiert. Die Einführung des lipophilen Decanoyl führte zu einer Verbesserung der Membrangängigkeit dieser Moleküle. Fuller et al. und Mizuno et al. zeigten, dass das Hefeenzym Kexin durch Ala-Lys-Arg-CH₂Cl und J125-Tyr-Ala-Lys-Arg-CH₂Cl gehemmt werden kann.⁶² Auch diese synthetischen Moleküle besitzen keine Selektivität bezüglich ihrer Hemmwirkung auf die PCs. Das Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chlormethylketon (Dec-RVKR-CMK) hemmt am stärksten Furin ($K_i = 0,1$ nmol/L) sowie PC5 und PC7 ($K_i = 0,12$ nmol/L). Es wirkt auch inhibierend auf PC2 ($K_i = 0,36$ nmol/L), PC3 ($K_i = 2,0$ nmol/L) und PACE4 ($K_i = 3,6$ nmol/L).⁶⁵

In den letzten Jahren wurden einige weitere Inhibitoren der PCs entdeckt und entwickelt. Die abschließende Beurteilung ihrer Selektivität ist noch nicht gänzlich untersucht. Zu den Peptidbasierten PC-Inhibitoren gehören die Poly-Arginin Verbindungen. Cameron und Mitarbeiter zeigten, dass das nona-Arginin am stärksten Furin ($K_i = 40$ nmol/L) hemmt.⁶⁶ Schwächer war die Wirkung auf PC1 ($K_i = 2,5$ μ mol/L), PC2 konnte nicht inhibiert werden.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation der mRNA Transkripte von PCs und deren subzelluläre Lokalisation in VSMCs der Rattenaorta. Weiterhin sollte die Regulation der PCs durch Wachstumsfaktoren untersucht werden. Hierzu sollte der Effekt von PDGF als starkes Mitogen und Ang II als ein Wachstumsfaktor, der eine starke hypertrophe Wirkung besitzt, miteinander verglichen werden. Des Weiteren sollte mit Hilfe von pharmakologischen Inhibitionsexperimenten als auch mittels Gen-silencing durch spezifische PC5-asODNs die Bedeutung von PC5 für die Aktivierung von αv -Integrin untersucht werden. Hierbei sollten auch die Konsequenzen der Hemmung der Aktivierung des αv -Integrins auf die Adhäsion und Migration der VSMCs analysiert werden.

2. Materialien

2.1. Antikörper

Folgende Antikörper wurden verwendet:

1. anti α -smooth muscle actin (α -SMA) - DAKO
2. anti proliferating cell nuclear antigen (PCNA) - Novocastra Laboratories
3. anti *trans*-Golgi network 38 (TGN38) - ABR Affinity Bioreagents
4. phospho-ERK1/2 MAP-Kinase (erkennt Phosphorylierung an Threonin 202 und Tyrosin 204) - Promega
5. Phospho-Akt (erkennt Phosphorylierung an Serin 473) - Cell Signaling
6. Phospho-p70^{s6} (erkennt die Phosphorylierung an Threonin 421 und Serin 424) - Cell Signaling
7. anti-Human Integrin α v β 5 (Clone P1F6) - Gibco BRL
8. anti-Actin - Sigma
9. unspezifische IgG-Kontrollantikörper Myeloma mouse IgG - Sigma
10. Texas Red anti-rabbit IgG (H+L) und Fluorescein anti-mouse IgG (H+L) – VECTOR Laboratories
11. anti- α v Integrin (gerichtet gegen C-Terminale Sequenz des Moleküls - AB 1930) - Chemicon
12. Rabbit-anti PC5 NT antibody, rabbit-anti PC7 und rabbit-anti Furin wurden von Nabil G. Seidah, Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute, Montréal, Quebec, Canada zur Verfügung gestellt
13. Sekundärantikörper für Western Blot-Experimente: Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) und Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) - Jackson ImmunoResearch, Donkey Anti-Mouse und Donkey Anti-Rabbit 1:40000 - Promega

2.2. Chemikalien

Bei den Versuchen verwendete Chemikalien:

1. Angiotensin II und PDGF-BB - Bachem
2. Wortmannin, PD98059 und Rapamycin - Biomol
3. 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid - DAPI; Merck
4. Vitronektin aus Rattenplasma und Gelatine (Gelatine 2 % Solution Type B from Bovine skin) - Sigma
5. Kollagen Typ I - Collagen Biomaterials Vitrogen 100

6. Trypan Blue - PAA
7. Ponceau-Rot, Hämatoxylin - Sigma
8. Phosphorothioat-konjugierte Oligodesoxynukleotide (asODNs) - TIB-MOLBIOL
9. Transfektionsmedium OligofectAMINE™ Reagent - LIFE TECHNOLOGIES
10. OPTI-MEM® Medium - Invitrogen Corporation
11. Zellkulturmedium: Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (DMEM) - PAA
12. fetales Kälberserum (FKS), Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin - PAA
13. Bovines Serumalbumin (BSA) - Sigma
14. Ziegenserum - VECTOR Laboratories
15. 0,5 % Toluidinblau - Sigma
16. RNA-Extraktionslösung RNazol™B - Tel-Test, INC.
17. retrovirale Reverse Transkriptase (SuperScript™) - Life Technologies
18. Ribonukleaseninhibitor RNasin® - Promega
19. Taq-Polymerase - Gibco BRL
20. Ethidiumbromid - BIOMOL
21. Agarose-Gel - Sigma
22. Bromphenolblau - Sigma
23. Igepal CA-630 - Sigma, Nonidet P-40 - Amresco
24. Phosphatase Inhibitor Cocktail – Sigma
25. BCA Protein Assay - Pierce
26. Detektionsreagenz-Mischung für Western Blot-Membranen femto LUCENT™
Chemiluminescence Detection System - CHEMICON
27. AB-diluent - DAKO

2.3. Geräte und Zubehör

Bei der Laborarbeit wurden nachstehende Geräte und folgendes Zubehör benutzt:

1. Zellcounter: CASY 1 DT – Schärfe System GmbH
2. Thermocycler: PTC 200 – MJ Research
3. Heizblock: Test Tube Thermostat TCR 100 – Roth
4. Zentrifugen: Biofuge Fresco und Biofuge primo – Heraeus Instruments
5. Schüttler – Heraeus Instruments
6. Zellkulturschrank – Heraeus Instruments
7. pH-Meter: Mettler Delta 320
8. Zellkulturbank (laminar flow): Laminin Air HBB 2448

9. Trafo: Power Pack 300 – Biorad
10. Autoklavanlage –Webeco
11. Elisa Reader – anthos ht II
12. Gewebekulturschalen: Durchmesser von 10 cm – Falcon, 6 cm Durchmesser – TPP,
Polystyrol-beschichtete Kulturschalen von 10 cm Durchmesser – Falcon
13. Multititerplatten: 96-well-Platten – Falcon
14. Zwei-Kammer-System für Migrationsexperimente – Falcon
15. 8-Kammer Objektträgern – Lab-Tek® Chamber Slide™ System
16. Fluoreszenzmikroskop – Firma Zeiss Ikon – Axioplan

3. Methoden

3.1. Zellkultur

VSMCs aus der Rattenaorta wurden mit der so genannten Auswachsmethode („explant technique“) von Ross und Kariya⁶⁷ isoliert. Die explantierten Rattenaorten wurden hierbei zunächst von dem umgebenden Bindegewebe befreit und längst aufgeschnitten. Dann erfolgte die Aufteilung in Quadrate von ca. 4x4 mm Größe. Nach kurzer Adhärenzzeit wurden die Gewebestücke mit dem Zellkulturmedium überschichtet und bei 37 °C und 5 % CO₂ auf Gewebekulturschalen (Durchmesser 10 cm) kultiviert. Dulbeccos modifiziertes Eagle Zellkulturmedium enthielt zusätzlich 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin und 200 mmol/L L-Glutamin sowie fetales Kälberserum. Die Identifikation als glatte Gefäßmuskelzellen erfolgte durch regelmäßige immunhistochemische Färbungen mit einem spezifischen Anti α -smooth-muscle-actin Antikörper. Weiterhin konnten kultivierte VSMCs an der typischen „Hügel- und Tal-Wachstumsstruktur“ in den Kulturschalen identifiziert werden. Die Zellen wurden durchschnittlich einmal pro Woche beim Erreichen von ca. 75 %iger Konfluenz in einem Verhältnis von 1:4 umgesetzt. Hierzu wurden sie durch Trypsinierung von den Petrischalen abgelöst und in 10 % FKS-Nährmedium aufgenommen. Nach der Zentrifugation bei 1200 Umdrehungen pro Min. über 4 Min. wurde das Zentrifugat (Pellet) resuspendiert und auf neue Petrischalen verteilt. Das Nährmedium wurde regelmäßig zweimal pro Woche gewechselt. Experimente wurden in der 3. bis 7. Zellpassage mit präkonfluenten (60-80%) Zellen durchgeführt. Vor der Durchführung der jeweiligen Experimente wurden die VSMCs zunächst für 48 h in 0 % FKS-Medium im Zellzyklus synchronisiert.

3.2. Pharmakologische Inhibitionsexperimente

Die Untersuchung der Signaltransduktionswege bei der PC5-Induktion durch PDGF erfolgte durch den Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren. Hierbei wurde der ERK-MAP-Kinase Inhibitor PD98059⁶⁸, der PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin⁶⁹ und Rapamycin als Inhibitor von mTOR/p70^{S6}-Kinase⁶⁹ benutzt. Nach 48 h Inkubation in 0 % FKS-Medium wurden die Zellen 1 h vor der PDGF-Stimulation mit den pharmakologischen Inhibitoren behandelt. Anschließend erfolgte in Anwesenheit der Inhibitoren die Stimulation mit PDGF-BB (20 ng/mL) für eine weitere Stunde.

3.3. Adhäsions-Assay

Die Durchführung der Adhäsionsexperimente erfolgte auf 96-Well-Platten. Die Kammern wurden über Nacht bei 4 °C mit 100 µL der Matrixproteine (20 µg/mL Kollagen Typ I bzw.

10 µg/mL Vitronektin) beschichtet. Nach dem Entfernen der Proteinsuspension wurden für 1 h bei 37 °C die unspezifischen Bindungsstellen mit einer 10 mg/mL BSA in PBS –Lösung blockiert. Die Zellen wurden durch Trypsinierung abgelöst, in 10 % FKS-Medium aufgenommen und für 4 Min. bei 1200 Umdrehungen pro Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0 % FKS-Medium wieder resuspendiert. Anschließend folgte die Auszählung der Zellen mittels Zellcounter. Nach einer entsprechenden Verdünnung mit 0 % FKS-Medium wurden 100 µL Zellsuspension (12000 Zellen) pro Kammer gegeben und zur Adhäsion im Kulturschrank bei 37 °C inkubiert. Bei einigen Experimenten wurde der blockierende $\alpha_v\beta_5$ -Antikörper P1F6 bzw. unspezifische Kontroll-IgG-Antikörper für 30 Min. (vor der Verteilung der Zellen auf einzelne Kammern) bei Raumtemperatur (RT) und permanenter Bewegung auf dem Schüttler zur Zellsuspension hinzugegeben. Die Adhäsionszeit betrug für Kollagen Typ I 30 Min. und für Vitronektin 50 Min. Die nicht adhärenen Zellen wurden aus den Kammern durch Spülen mit PBS herausgewaschen. Hiernach erfolgte für 5 Minuten die Fixierung der verbleibenden Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in PBS. Danach wurden die Zellen durch 0,5 % Toluidinblau in 4 % Paraformaldehyd (pH 7,4) angefärbt und dreimal mit Wasser gespült. Nach dem Auflösen der Zellen in 100 µL 1 % Natrium-Dodecylsulfat (SDS) in Milliporewasser erfolgte die quantifizierende Absorptionsbestimmung in einem ELISA-Reader bei 590 nm.

3.4. Migrations-Assay

Die Migrationsexperimente wurden nach Law et al.⁷⁰ mit der modifizierten Boyden-Kammer-Methode mittels eines Zwei-Kammer-Systems mit einem 8 µm große Poren besitzenden Polycarbonatfilter durchgeführt. Die Beschichtung der Filter mit 0,2 % Gelatine bzw. Vitronektin (10 µg/mL) geschah über Nacht bei 4 °C. Die innere Kammer wurde mit jeweils 30000 Zellen gefüllt (je in 200 µL Volumen 0,4 % FKS-Zellkulturmedium gelöst) und zur Adhäsion 1 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Hiernach wurde die Migration durch Zugabe von 10 % FKS-Kulturmedium in die äußere Kammer induziert. Nach 4 h wurden die Zellen mit Methanol für 10 Min. bei –20° C fixiert und mit Hämatoxylin gefärbt. Die zur Unterseite der Membran migrierten Zellen wurden mikroskopisch bei einer 320fachen Vergrößerung in jeweils vier zufälligen Gesichtsfeldern ausgezählt.

3.5. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenzversuche wurden die Zellen auf 8-Kammer Objektträgern (“chamber slides“) ausgesetzt. Die Beschichtung der Objektträger erfolgte zuvor über Nacht bei 4 °C durch die Zugabe von 0,2 % Gelatine in 1 x PBS. Danach wurde jede Kammer mit 200 µL der

Zellsuspension (8000 Zellen pro Kammer) gefüllt. In den weiteren 48 h adhärten die Zellen in 10 % FKS-Medium zunächst und proliferierten dabei bis zu 60 %iger Konfluenz. Nach einmaligem Waschvorgang mit PBS wurden die Zellen mit kaltem Methanol über 5 Min. bei -20 °C oder mit 4 % Paraformaldehyd in PBS pH 7,4 bei RT über 5 Min. fixiert. Bei Versuchen mit FITC-markierten Oligonukleotiden erfolgte die Fixierung in diesen Versuchsansätzen mit 4 % Paraformaldehyd. Die Fixierungslösung wurde abgesaugt, die Kammern dreimal mit 1 x PBS gespült. Dann folgte die Zugabe des Primärantikörpers, der in ca. 200 µL des sog. AB-Diluents gelöst wurde. Das AB-Diluent setzt sich aus dem 10 %igen normalen Ziegen Serum und 0,3 % Triton-X 100 in PBS zusammen. Nach der Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde der Primärantikörper abgesaugt und die Kammern mehrmals mit 0,01 % Triton-X 100 in PBS gespült. Die sekundären FITC oder Texas Red-konjugierten Antikörper wurden in der 0,01 % Triton-X 100 in PBS-Lösung verdünnt (20 µg/mL) und für mindestens 1 h bei 37 °C in den Kammern inkubiert. Nach fünfmaligen Waschvorgang mit 0,01 % Triton-X 100 wurde der Objektträger von den Kammern getrennt und bei RT getrocknet. Bei dem Anbringen der Deckgläser auf die Objektträger, die das Austrocknen der Präparate verhindern, wurde das VECTASHIELD® Mounting Medium benutzt. Bei den Kollokalisationsstudien folgte nach der Inkubationszeit mit dem ersten primären und sekundären Antikörper ein zweiter Durchgang nach dem oben geschilderten Schema, wobei darauf geachtet wurde, dass zunächst der monoklonale Primärantikörper zum Einsatz kam. Als Kontrollen dienten Ansätze, bei denen nur der sekundäre Antikörper benutzt wurde. Die Auswertung des Versuches erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop.

3.6. Reverse Transkriptase-PCR

Nach dem Absaugen des Nährmediums von den präkonfluenten Zellen und einmaligem Spülen mit kaltem PBS erfolgte die Zugabe von 3 mL RNA-Extraktionslösung pro Petrischale. In dieser Lösung wurde das Zellmaterial mit einem sterilen Schaber vom Boden der Petrischale abgelöst und in sterilen 2 mL-Eppendorf-Tubes gesammelt. Um die Kontamination mit RNAsen zu verhindern, wurden die Gefäße mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandelt. Alle Schritte der RNA-Gewinnung wurden auf Eis durchgeführt. Nach der Zugabe von Chloroform in einem Verhältnis von 1:10 wurde die Lösung bei 4 °C und 13000 Umdrehungen 15 Min. zentrifugiert. Zur RNA-Gewinnung wurde die obere (wässrige) der beiden nach der Zentrifugation entstandenen Phasen benutzt. Nach der Zugabe von Isopropanol im Verhältnis von 1:1 und 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben erneut 15 minutenlang bei 13000 Umdrehungen pro Min. und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig vollständig abgossen, das RNA-Pellet

mit 1500 μL 75 % Ethanol überschichtet und 10 Min. bei 13000 Umdrehungen und 4 $^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Alkohol abpipettiert, die RNA-Proben im Vakuum getrocknet und in DEPC- H_2O erneut gelöst. Die Menge und Reinheit der so gewonnenen RNA wurde photometrisch gegen DEPC- H_2O als Nullwert bestimmt. Der Quotient der Messung bei 260 nm/ 280 nm war stets größer als 1,9. Größere Abweichungen von diesem Wert sind ein Hinweis auf starke Verunreinigung mit Proteinen.

Als nächster Schritt wurde die RNA mit Hilfe der retroviralen Reversen Transkriptase SuperScript™ in cDNA umgeschrieben. Durch den Einsatz von Hexameren („Random-Primer“) und Oligonukleotiden wird die reverse Transkription am Poly-(A)-Schwanz (3'-Ende) und verteilt über die gesamte RNA initiiert. Dieses gewährleistet die vollständige Umschreibung des RNA-Stranges in die cDNA. Das eingesetzte RNasin® ist ein nicht kompetitiver Ribonukleasen-Inhibitor. Pro Ansatz wurde 1,2 μg RNA in 12 μL DEPC-Wasser gelöst und in einem Mastermix zusammengemischt. Dieser enthielt:

5 μL 5 x RT-Puffer
 2,5 μL DTT (0,1 mol/L)
 1 μL RNasin® (2 U/ μL)
 1,2 μL dNTPs (10 mmol/L)
 2,5 μL Randomhexamere (50 ng/ μL)

Nach 10 Min. bei 70 $^{\circ}\text{C}$ und anschließenden 10 Min. auf Eis wurden jedem Ansatz 5 μL entnommen. Dieser Anteil diente in der Polymersekettreaktion (PCR) als weitere Kontrolle. Es sollte hierbei überprüft werden, ob die RNA bereits vor der Umschreibung durch DNA verunreinigt war. Anschließend wurden dem Mastermix 1 μL SuperScript und 0,3 μL RNasin® hinzugegeben und gut gemischt. Die Umschreibung der RNA erfolgte zunächst 10 Min. bei RT und dann über 50 Min. bei 42 $^{\circ}\text{C}$. Nach 5-minütiger Temperaturerhöhung auf 95 $^{\circ}\text{C}$ war die Umschreibung abgeschlossen und die gewonnene cDNA konnte vor der weiteren Verwendung eingefroren werden.

Mit der PCR kann die cDNA aus der Reverse-Transkriptase-Reaktion vervielfältigt werden. Hierbei wird ein durch zwei Oligonukleotide („Primer“) begrenzter Nukleinsäurebereich amplifiziert. Ein Reaktionszyklus, bestehend aus Denaturierung der DNA in Einzelstränge bei 90 $^{\circ}\text{C}$, Anheften der Oligonukleotide bei der sog. „Annealing-Temperatur“, Extension der Einzelstränge zu neuen Doppelsträngen, wird mehrmals wiederholt. Dabei benutzt man die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnene hitzestabile Taq-Polymerase. Zu 2 μL cDNA aus der Reversen Transkription wurden hinzugegeben:

2,5 µL	10 x PCR-Puffer
4 µL	dNTPs (0,8 mmol/L)
0,2 µL	Taq-Polymerase
1 µL	Primer forward (10 pmol/L)
1 µL	Primer reverse (10 pmol/L)
14,3 µL	H ₂ O

Die PCR-Reaktion erfolgte standardisiert nach dem unten aufgeführten Thermoprofil im Thermozykler:

I.	Initialer Denaturierungsschritt	5 Min.	94 °C
II.	je nach Primerpaar	25-30 Zyklen	
	Denaturierung	20 Sek.	94 °C
	Primer Annealing	20 Sek.	Siehe Tabelle 1
	Extension	20 Sek.	72 °C
III.	Finaler Verlängerungsschritt	5 Min.	72 °C

Die PCR-Primer wurden mit Hilfe des Primersuchprogramms (Primer3: www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi) auf der Basis von publizierten Sequenzen ausgewählt (Accession Number in Tabelle 1 angegeben). Die optimale Annealing-Temperatur und Zyklusanzahl wurde für jedes Primerpaar einzeln ermittelt.

Primer	Sequenz	Nukleotid-Position	Accession-Nummer	Länge Bp.	Annealing; Zyklen
PC7	GAGGAGAACGGTAACCACCA CTTCCAAGCTGATGAGGAC	913-922 1145-1164	NM019246	251	62,2 °C; 28 Zyklen
PC5	CTCAGGCTGCTCGGATAATC CGTGCCATAGAGGACTAAGG	1487-1506 1789-1808	L14933	321	60,0 °C; 29 Zyklen
PC5A	AGAGTCCTGGGCAGAAGGAG CAGGAACAGGGATGTAAGGT	2648-2667 2762-2782	L14933	134	56,0 °C; 28 Zyklen
PC5B	CGACACTGTGTTCCATGAGC CTGGTCCTCGTCGAGATAGC	250-270 429-449	U47014	199	58,0 °C; 29 Zyklen
Furin	CCTATGGCTACGGGCTGTTG CTCGCTGGTATTTTCAATCTC	1711-1730 2090-2111	NM019331	400	57,8 °C 28 Zyklen

Tabelle 1: Dargestellt ist die Basensequenz der verwendeten PCR-Primer mit der dazugehörigen Position innerhalb der Gensequenz (angegeben mit der Accession-Nummer unter der die Gensequenz veröffentlicht wurde). Weiterhin wird die Länge des PCR-Produktes, die Annealing-Temperatur und die Anzahl der Wiederholungszyklen der PCR-Reaktion aufgeführt.

Je 5 μL des PCR-Amplifikats wurden zusammen mit 1 μL Agaroseladepuffer (5 x TBE + 20 % Ficoll 400 + 0,1 %iges Bromphenolblau) versetzt und auf ein 2 % Agarose-Gel (60 mL 1x TBE + 1,2 g Agarose mit 3 μL Ethidiumbromid (10 mg/mL)) aufgetragen. Die Trennung erfolgte in einem Spannungsfeld von 80 V über 50 Minuten. Als Laufpuffer diente 1 x TBE (0,1 mol/L Tris Base + 0,1 mol/L Borsäure + 0,002 mol/L Tritriplex III). Die mit Ethidiumbromid gefärbten Amplifikate wurden im UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert und für spätere Versuchsauswertung gespeichert.

3.7. BrdU-Proliferationsassay

Eine Möglichkeit der Quantifizierung der Proliferation von Zellen ist der Einsatz von Brom-Desoxy-dimethyl-Uridin (BrdU), das ein Analogon der Pyrimidinbase Thymin ist. BrdU wird in die DNA an Stelle der verwandten Base eingebaut und kann unter der Zuhilfenahme eines BrdU-spezifischen monoklonalen Antikörpers und darauf folgenden chemischen Farbreaktion nachgewiesen werden. Die Messung der Inkorporation erfolgte in einem ELISA-Messgerät bei 450 nm. Die Versuche wurden auf Multititerplatten mit 96 Kammern durchgeführt. Pro Versuchsansatz wurden mindestens 6 Kammern verwendet mit jeweils 8000 Zellen. Nach dem Aussetzen wurden die Zellen zunächst 48 h in 10 % FKS-Medium (100 μL Gesamtvolumen pro Kammer) kultiviert. Durch die Reduktion der FKS-Konzentration des Nährmediums auf 0,4 % für weitere 48 h wurden die Zellen vor der Zugabe von Antisense-Oligonukleotiden und anschließender Stimulation mit FKS in ihrem Zellzyklus synchronisiert. Die Zugabe des BrdU erfolgte während der Stimulationszeit für ca. 16 Stunden.

3.8. Western Blot

Zunächst wurde das Nährmedium von den Zellkulturschalen entfernt und eine Spülung mit 4 °C kaltem PBS vorgenommen. Nach der Zugabe von RIPA-Puffer und 10 Min. Wartezeit, bei der die Zellkulturschalen bei 4 °C auf dem mechanischen Schüttler bewegt wurden, erfolgte das Abschaben der Zellschicht. Das Zelllysat wurde gesammelt und dann bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen bei 4 °C wurden die Proben mit dünnen Pipettenspitzen mehrmals resuspendiert und nach Zugabe von PMSF 10 μL (10 mg/mL) pro mL Proteinsuspension über 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben über weitere 10 Min. bei 11000 Umdrehungen und 4 °C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration mittels BCA-Test bestimmt.

Zusammensetzung des RIPA-Puffers (in 1fach PBS wurden gelöst):

1 % Igepal CA-630 oder Nonidet P-40 + 0,5 % sodium deoxycholate + 0,1 % SDS

Vor dem Gebrauch versetzt mit:

10 mg/mL PMSF (10 μ L/mL RIPA-Puffer) + PIC1 2,5 μ L pro mL RIPA-Puffer + PIC2 2,5 μ L pro mL RIPA-Puffer

Um einen quantitativen Vergleich zwischen den Proben durchführen zu können musste die Konzentration der extrahierten Proteine vor dem Einsatz in der Gelelektrophorese gemessen werden. Die Messung der verdünnten Proteinproben erfolgte unter Zuhilfenahme des BCA Protein-Assays. Diese Methode beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der es zwischen den Peptidbindungen und zugefügten Cu^{+2} -Ionen im alkalischen Milieu zur Ausbildung rotvioletter Komplexe kommt. Diese können bei 550 nm gemessen werden. Die gemessene Extinktion ist proportional zur Anzahl der Peptidbindungen (entspricht der Größe der Peptide). Als Vergleich diente eine Verdünnungsreihe aus BSA mit Konzentrationen zwischen 1000 μ g/mL und 62,5 μ g/mL sowie die Nullprobe, die mit H_2O gefüllt war. Die photometrische Bestimmung erfolgte mit dem ELISA-Reader bei 550 nm.

Die Proteinmengen der verschiedenen Proben wurden mit H_2O auf 50 μ g angeglichen und mit 4fach Proteinladepuffer versetzt (maximales Volumen). Die Proteinproben wurden dann 3 Min. bei 95 °C erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert. Die Gelelektrophorese wurde unter reduzierenden (hierbei war im Proteinladepuffer 20 % Mercaptoethanol enthalten) Bedingungen durchgeführt. In dem Proteinladepuffer und auch in dem Gel enthaltenes Natriumdodecylsulfat (SDS, sodium dodecyl sulfate) ist ein negativ geladenes Sulfatester des Dodekanols. Dieses Detergens bindet mit seinem Fettsäureanteil an hydrophobe Bezirke des Proteins, so dass das Molekül sich entfaltet und die Wechselwirkungen mit anderen Proteinen und Lipiden aufgehoben werden. Nach dem Einbringen der Proben in die Geltaschen erfolgte die elektrophoretische Trennung der Proteine in einem Spannungsfeld von 80 V für maximal 2 h. Bei der Wanderung zur Anode wurden die Proteine in dem hochvernetzten Polyacrylamidgel nach dem Molekulargewicht getrennt.

Danach wurde das Gelsystem auseinander gebaut, das Ladegel von dem proteinhaltigen Trenngell entfernt und im kalten Transferpuffer über mindestens 15 Min. äquilibriert. Auch die anderen Bestandteile des Transfersystems wurden in diesem Puffer eingetaucht. Die Zellulosemembran wurde im Gegensatz zu anderen Bestandteilen nur über wenige Sekunden vor dem Zusammenbau des Transfersystems in dem Transferpuffer eingetaucht.

Zusammensetzung des Proteinladepuffers (4fach Puffer):

3,03 g Tris Base (0,25 mol/L, pH 6,8) + 8 g SDS (8 %) + 40 mL Glycerol (40 %) + 20 mL 2-Mercaptoethanol (20 %) + 2 mL bromphenol-blue (1 %) ad 100 mL Milliporewasser

Elektrodenpuffer für die Gelelektrophorese (10fach Puffer):

6,06 g Tris Base (0,25 M, pH 8,3) + 28,8 g Glycin (1,92 M) + 20 mL 10 % SDS (1 % SDS) ad 200 mL Milliporewasser

Ladegel 5 % (Angaben für 4 Gele):

5,5 mL Milliporewasser + 1,3 mL 30 % Acrylamid + 1 mL Tris Base (1 mol/L, pH 6,8) + 80 µL 10 % SDS + 80 µL 10 % APS + 8 µL TEMED

Trenngel 6 % (Angaben für 2 Gele):

5,3 mL Milliporewasser + 2 mL 30 % Acrylamid + 2,5 mL Tris Base (1,5 mol/L, pH 8,8) + 100 µL 10 % SDS + 100 µL 10 % APS + 8 µL TEMED

Der Tankblot wurde so durchgeführt, dass die Übertragung der negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode - von dem Trenngel auf das Nitrocellulosepapier erfolgen konnte. Der Transfer wurde bei 100 V unter Eiskühlung über ca. 60 Min. auf einem Magnetrührer durchgeführt.

Zusammensetzung des Transferpuffers (5fach Puffer):

72 g Glycin + 15,15 g Tris Base ad 1000 mL Milliporewasser

Vor dem Gebrauch:

200 mL 5fach Puffer + 200 mL Milliporewasser + 200 mL Methanol

Nach dem Trocknen wurde die Membran auf Gleichmäßigkeit der Proteinladung sowie andere Qualitätsmerkmale (z.B. Luftblasen mit aufgehobener Proteinübertragung) überprüft. Dieses geschah bereits vor der Antikörperzugabe durch die Färbung mit Ponceau-Rot. Anschließend wurde eine mehrmalige Entfärbung mit Milliporewasser durchgeführt. Die unspezifische Bindung der Antikörper wurde durch die Inkubation der Membran in 5 % Magermilchpulver in TBST-Puffer über ca. 60 Min. blockiert. Hiernach erfolgte nach zweimaligem Waschen mit TBST-Puffer die Zugabe des Primärantikörpers, der ebenfalls in 5 % Magermilchlösung in TBST-Puffer gelöst wurde. Die Inkubation verlief über Nacht bei 4 °C auf einem horizontalen Schüttler. Nach dem mindestens einstündigen Waschvorgang mit mehrmaligen Wechsel der TBST-Lösung wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben und über ca. 2 h bei RT inkubiert. Dieser Antikörper ist gegen Anteile der schweren Kette des Primärantikörpers ausgerichtet und besitzt zusätzlich eine konjugierte Peroxidaseaktivität, die nach der Zugabe der Detektionsreagenz das Sichtbarwerden der durch den Primärantikörper markierten Proteinfraction durch die Schwärzung des Röntgenfilmes erlaubt. Die Vermessung der eingescannten Blots erfolgte mit dem Programm: ImageJ (www: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Zusammensetzung des TBST-Puffers:

5fach TBST-Puffer:

24 g Tris Base + 80 g NaCl ad 2L Milliporewasser

pH-Einstellung auf 7,6 mit HCl

1fach TBST-Puffer:

5fach TBST-Puffer mit Milliporewasser 1:5 verdünnen + 4 ml 1:2 verdünnten TWEEN 20,

pH 7,6

3.9. Transfektion vaskulärer, glatter Gefäßmuskelzellen mit Antisense-Oligonukleotiden

Um PC5 in den VSMCs selektiv und spezifisch zu hemmen wurden Phosphorothioat Oligodesoxynukleotide benutzt. Diese Moleküle wurden anhand der bekannten RNA-Sequenz als komplementärer RNA-Strang synthetisiert.⁷¹ Antisense-Oligonukleotide mit unveränderter Phosphodiesterbindung werden schnell durch zytoplasmatische Nucleasen (Phosphodiesterasen) und durch jene, die im Serum enthalten sind, abgebaut.⁷¹ Um die Stabilität gegenüber den Phosphodiesterasen zu erhöhen, wurden verschiedene Modifikationen in den Antisense-Molekülen eingeführt. Durch das Austauschen eines nicht an der Bindung beteiligten Sauerstoffatoms jeder Phosphodiesterbindung durch z.B. Schwefelatome erhält man Phosphorothioat Oligodesoxynukleotide.

Nach der Aufnahme einzelsträngiger Antisense-Oligonukleotide (meist kleiner als 30 Basenpaare) in die Zelle kommt es zur Bildung von Antisense-Oligonukleotid-mRNA-Doppelhelix und dadurch zur Bindungsstörung der Doppelhelix-mRNA an die Ribosomen.⁷¹ Als ein weiterer Hauptwirkmechanismus wird die Aktivierung der RNase H gesehen. Dieses ubiquitär vorkommende Enzym wirkt sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern⁷², erkennt und baut DNA-RNA-Doppelhelixstrukturen ab. Dieser Mechanismus kann durch die Zugabe von einem Überschuss an DNA-RNA-Hybriden blockiert werden.⁷³ Die genannten Mechanismen führen schließlich zur Minderung der translatierten Proteinmenge des gewünschten Zielgens. Die Aufnahme der Oligonukleotide in die Zellen erfolgt über die Endozytose.⁷¹ Die Aufnahme der Oligonukleotide kann durch den Einsatz von kationischen Lipiden erhöht werden, die zusätzlich die Stabilität der Oligonukleotide im Kulturmedium und Serum steigern können.⁷⁴

Ausgehend von der publizierten Sequenz der Proprotein Convertase PC5 (Accession Number: L14933) wurden drei verschiedene Antisense-Oligonukleotide ausgewählt. Als Kontrollen dienten jeweils die komplementären Sense-Sequenzen. Außerdem wurden Scramble-Sequenzen verwendet, die die gleiche Basenzusammensetzung wie die Antisense-Oligonukleotide haben, jedoch eine zufällige Basenreihenfolge aufweisen.

Sequenzbereich	Bezeichnung	Sequenz
1-17	PC5-asODNs-1	CCAGTCCATGGTCCCGA
	PC5-seODNs-1	TCGGGACCATGGACTGG
	PC5-scrODNs-1	CAGCTTCCACAGCGTCG
571-587	PC5-asODNs-2	GCAACTTGCCAGAGCAT
	PC5-seODNs-2	ATGCTCTGGCAAGTTGC
	PC5-scrODN-2	CATGACTACGCTCAGAG
955-970	PC5-asODN-3	TCCTTACTCCGTCCAC
	PC5-seODN-3	GTGGACGGAGTAAGGA
	PC5-scrODN-3	ATCCCTCCTCTCATC

Tabelle 2: Phosphorothioat Oligodesoxynukleotide

Eine weitere Kontrolle bei den Experimenten bestand aus α 1-Kollagen-Antisense-Oligonukleotiden.⁷⁵ Um die Transfektionseffizienz zu steigern wurde das Transfektionsmedium OligofectAMINE™ verwendet. Dieses Produkt wurde speziell für den Einsatz von Oligonukleotiden in eukaryotischen Zellen entwickelt und basiert auf dem Prinzip der kationischen Lipide, die den Anionencharakter der Phosphorothioat Oligodesoxynukleotide maskieren und durch ihren Lipidcharakter die Aufnahme in die Zellen erleichtern.

Die subkonfluenten VSMCs (60 %) wurden bereits vier Tage vor dem Versuch in 10 % FKS-Medium ausgesetzt. Nach den ersten 48 h wurde das 10 % FKS-Medium durch 0,4 % FKS-Medium ersetzt um eine Synchronisierung des Zellzyklus zu erreichen. Zwei Stunden vor dem Beginn der Transfektion wurden die Zellen nach einmaligen Spülen mit 0 % FKS-Medium ohne Antibiotikazusatz überschichtet. In zwei verschiedenen Eppendorfgläsern pro Ansatz wurden mit dem vom Hersteller empfohlenen OPTI-MEM® Medium das OligofectAMINE und die Oligonukleotide verdünnt (Endkonzentrationen der Oligonukleotide in den Versuchen lagen zwischen 0,5 μ mol/L und 5 μ mol/L). Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurde der Inhalt beider Gefäße zusammengefügt, vorsichtig gemischt, weitere 15 Min. stehen gelassen und dann dem Zellkulturmedium hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen unter normalen Zellkulturbedingungen über 4 h transfiziert. Danach erfolgte die Zugabe der Antibiotika (Penicillin, Streptomycin) sowie FKS (Endkonzentration FKS 0,2 %) für weitere 20 h.

Um die Transfektionseffizienz und die Kinetik der Oligonukleotid-Aufnahme zu untersuchen wurden FITC-markierte Oligonukleotide eingesetzt. Hierzu wurden die Zellen auf 8-Kammer Objektträgern, die vorher über Nacht bei 4 °C mit 0,2 % Gelatine in PBS beschichtet wurden,

ausgesetzt. Die Transfektion erfolgte wie zuvor beschrieben. Außerdem wurden als Vergleich auch Ansätze ohne OligofectAMINE verwendet. Nach einer entsprechenden Transfektionszeit wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in PBS über 15 Min. fixiert. Für die Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden die Zellen mit 0,1 µg/mL DAPI für 5 Min. gefärbt. Durch die hohe Affinität des Fluoreszenzfarbstoffs zur DNA wurden durch die Färbung Zellkerne dargestellt.

3.10. Überprüfung der Zellvitalität beim Einsatz der Oligonukleotide

Um die mögliche Beeinträchtigung der Zellvitalität durch den Einsatz der Oligonukleotide zu überprüfen wurde die Färbung der Zellen mit Trypan Blue durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen durch Trypsinierung gelöst, abzentrifugiert und in einer kleinen Menge 10 % FKS-Medium wieder resuspendiert. Nach der Zugabe vom gleichen Volumen an 0,05 % Trypan Blue und 3-minütiger Inkubationszeit bei 37 °C erfolgte die Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer. Das Trypan Blue hat die Eigenschaft nur avitale Zellen zu färben, die eine defekte Zellmembran aufweisen. Außerdem wurde die Zellvitalität durch die Bestimmung der Zellgröße im Zellcounter (0,0 µm bis 0,8 µm: Zelltrümmer, von 0,8 µm bis 12,5 µm: tote Zellen, über 12,5 µm: lebendige Zellen) überprüft. Die hier angegebenen Grenzen der Zelldurchmesser wurden in Vorversuchen ermittelt. Hierbei wurde der Durchmesser von vitalen und mit Ethanol abgetöteten Zellen bestimmt.

3.11. Statistische Auswertung

Zur Bestimmung der Signifikanz der dargestellten Versuche wurde ein ANOVA-Test und nachfolgend ein Bonferroni/Dunn Vergleichstest verwendet. Als signifikant wurden Werte von $p < 0,05$ berücksichtigt.

Die Experimente wurden in vier- bis achtfachen Ansätzen durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt. Durchschnittswerte +/- Standardabweichung von repräsentativen Experimenten sind abgebildet. Die semiquantitative Densitometrie bei den Western Blot-Experimenten erfolgte mit dem Program Image 1.62 und wird als arbitrary units (AU) dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Identifikation von PC5-, Furin- und PC7-mRNA und subzelluläre Lokalisation der Proprotein Convertasen in glatten Gefäßmuskelzellen

Das Ziel der ersten Experimente war der Nachweis von PC-mRNA-Transkripten und Protein in VSMCs als auch die Identifikation der subzellulären Lokalisation der PCs. Die Northern Blot-Experimente zeigten, dass Furin-, PC5- und PC7-mRNA in Rattenaorten zu finden sind.⁶¹ Da die mRNA-Gewinnung aus der gesamten Rattenaorta erfolgte, die auch andere Zellarten wie z.B. Fibroblasten enthält, fehlte bisher der direkte Nachweis der Furin-, PC5- und PC7-mRNA in den VSMCs. Reverse Transkriptase-PCR zeigte die Präsenz von Furin-, PC5- und PC7-mRNA in Kulturen von VSMCs der Ratte (Abbildung 2). Mittels RT-PCR konnten mRNA-Transkripte beider Isoformen PC5A und PC5B detektiert werden. PC5B zeichnet sich gegenüber PC5A durch eine Elongation der C-terminalen Region aus. Dieser Proteinbereich enthält Sequenzen, die eine Verankerung des Proteins in Membranen ermöglichen. Dem PC5A fehlt dieser Anteil.

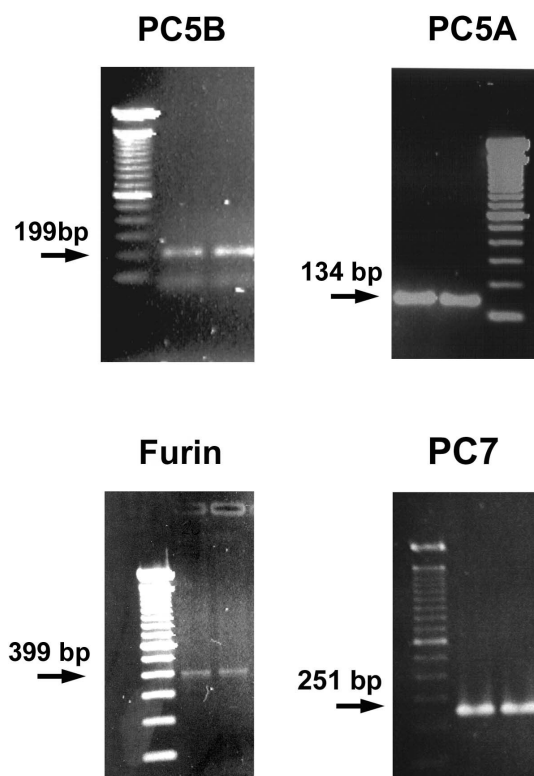


Abbildung 2: RT-PCR Experimente zeigen den Nachweis der mRNA von PC5A (134 bp), PC5B (199 bp), Furin (399 bp) und PC7 (251 bp) in Kulturen von glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte.

In weiteren Experimenten wurde die Immunfluoreszenz benutzt, um die subzelluläre Lokalisation der PCs in den VSMCs zu identifizieren. Zunächst zeigten die Kolokalisationsexperimente (Abbildung 3), dass das PC5 mit α -smooth-muscle-actin (α -SMA) in VSMCs kolokalisiert (Abbildungen A und B). Die PC5-Färbung zeigte im Vergleich zu der Darstellung der α -SMA Filamente eine geringere intrazelluläre Verteilung mit Konzentration im perinuklären Bereich. Zur weitergehenden Untersuchung der subzellulären Lokalisation von PC5, Furin und PC7 wurden die VSMCs mit Brefeldin A (BFA) behandelt. Zu den in 10 % FKS-Medium kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen wurde 30 Min. vor der Fixation BFA (10 μ g/mL) hinzugefügt. BFA stört den Proteintransport durch den Golgiapparat durch Verschmelzung von dessen cis-, medial- und trans-Anteilen mit dem ER wobei das *trans*-Golgi network (TGN) bestehen bleibt.⁷⁶ Immunfluoreszenz-Kolokalisationsstudien nach BFA Behandlung zeigten die Kolokalisation der PCs Furin und PC5 mit dem spezifischen TGN-Markerantikörper TGN38. Aus der Abbildung E und F wird deutlich, dass die subzelluläre Lokalisation von Furin gut mit dem TGN38-Fluoreszenzsignal übereinstimmte. Das PC7-Signal zeigte hingegen eine über den Bereich des TGN hinausgehende Verteilung auf (Abbildung G und H). PC5 kolokalisierte nach BFA-Behandlung ähnlich dem Furin gut mit TGN38. Auffällig war, dass das Fluoreszenzsignal von PC5 nach BFA-Behandlung (Abbildung D), verglichen mit den BFA-unbehandelten Zellen (Abbildung A), eine geringere Ausdehnung aufwies. Xiang und Mitarbeiter kamen in ihrer Arbeit zu dem Ergebnis, dass die Behandlung der Zellen mit BFA zum Kollaps des Anteils des Golgiapparates führt, in dem sich hauptsächlich die Isoform PC5B befindet.⁷⁷ Die unterschiedliche Ausbreitung des Fluoreszenzsignals von PC5 mit und ohne BFA-Behandlung lässt sich deshalb durch unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der PC5-Isoenzyme PC5A und PC5B erklären. Im Gegensatz zu PC5B ist PC5A in konstitutiven Zelltypen im nicht-kollabierbaren TGN lokalisiert (Abbildung D) und kolokalisiert hier mit dem TGN-spezifischen Membranprotein-TGN38 (Abbildung C). Der hier verwendete Antikörper (PC5 NT) erkennt beide Isoformen von PC5.⁴¹

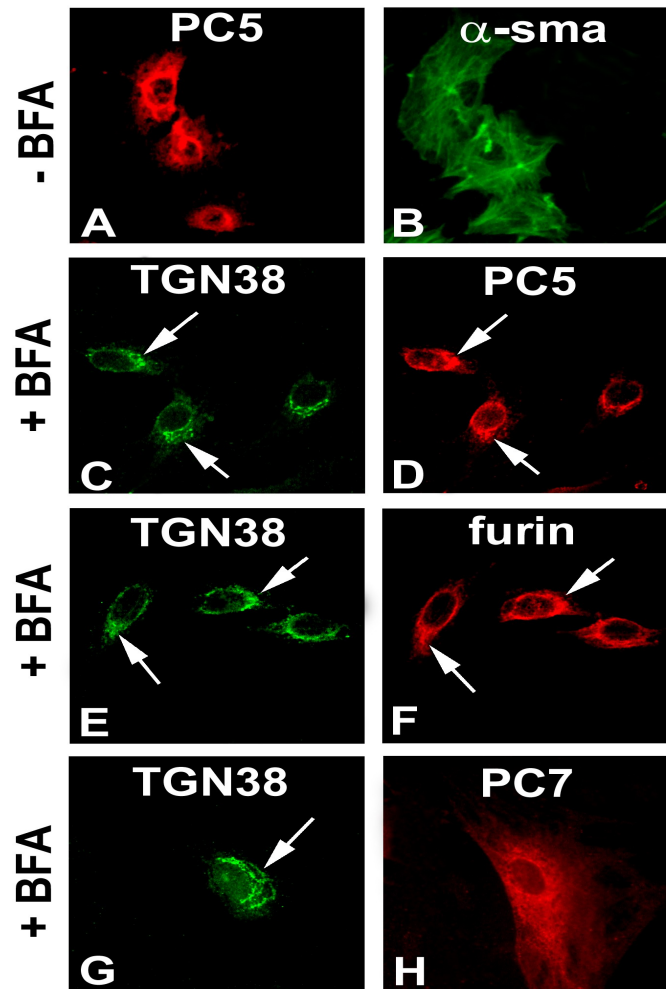


Abbildung 3: Doppel-Immunfärbungen mit PC5 und dem α -sma-Antikörper zeigten die Präsenz von PC5 in VSMCs (A und B). Nach der Behandlung mit BFA kolokalisierte PC5 mit dem TGN-Markerprotein TGN38 (C und D). Auch das Fluoreszenzsignal von Furin zeigte nach BFA-Behandlung weitgehende Übereinstimmung mit TGN38 (E und F). Hingegen wies PC7 im Vergleich zu PC5 und Furin ein über den Bereich des TGN gehendes Fluoreszenzsignal auf (G und H).

4.2 Regulation von PC5, Furin und PC7 in glatten Gefäßmuskelzellen durch Wachstumsfaktoren

In weiteren Experimenten wurde die Regulation der PCs PC5, Furin und PC7 in VSMCs in vitro durch Wachstumsfaktoren untersucht. Hierbei wurde PDGF als starkes Mitogen und Angiotensin II als ein Wachstumsfaktor, der stark die Proteinbiosynthese induziert, gewählt.^{6,11} Beide Wachstumsfaktoren bewirken die Aktivierung einer Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden, wobei die MAPK der wichtigste Weg für die Steigerung der Migration der VSMCs und die ribosomale p70s6-Kinase der wichtigste Weg für die wachstumsfaktorvermittelte Steigerung der Proteinbiosynthese ist.⁷⁸ Beide Wachstumsfaktoren können sowohl die MAPK- als auch den p70s6-Signaltransduktionsweg induzieren.⁷⁹ PDGF induziert die Wege über die Aktivierung eines membranständigen Tyrosinkinaserzeptors, Ang II im Gegensatz hierzu über die Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors. In den Experimenten wurden die VSMCs zunächst über 48 h in 0 % FKS-Medium im Zellzyklus synchronisiert. Danach erfolgte die Stimulation mit 10 % FKS-Medium, PDGF-BB (20 ng/mL) oder Ang II (1 µmol/L) für weitere 48 h. Verglichen wurde die Induktion der PC-Proteine mit PCNA, einem Marker für die Proliferation der Zellen.⁸⁰ In Abbildung 4 ist ein exemplarisches Western Blot-Experiment dargestellt. Beide Wachstumsfaktoren Ang II und PDGF induzierten PCNA deutlich verglichen mit den unbehandelten Kontrollen, wenn auch Ang II viel schwächer als PDGF war. Parallel zur Induktion von PCNA durch FKS und PDGF fand sich eine starke Induktion von PC5. Angiotensin II, welches auch PCNA induziert, hatte im Gegensatz dazu keinen Effekt auf die PC5-Proteinkonzentration. Im Unterschied zu PC5 waren Furin und PC7 weder durch Ang II noch durch PDGF oder FKS reguliert. Um ungleichmäßige Proteinbeladung der Blots auszuschließen, wurden die Western Blot Membranen hier und auch in folgenden Versuchen mit einem gegen α -SMA gerichteten Antikörper erneut geblottet. In der Abbildung 4, Teil B, wird die Auswertung der semiquantitativen Densitometrie der PC5-Blots dargestellt. Abbildungsteil C veranschaulicht zusätzlich den Effekt von FKS-, Ang II- und PDGF-Stimulation auf PCNA.

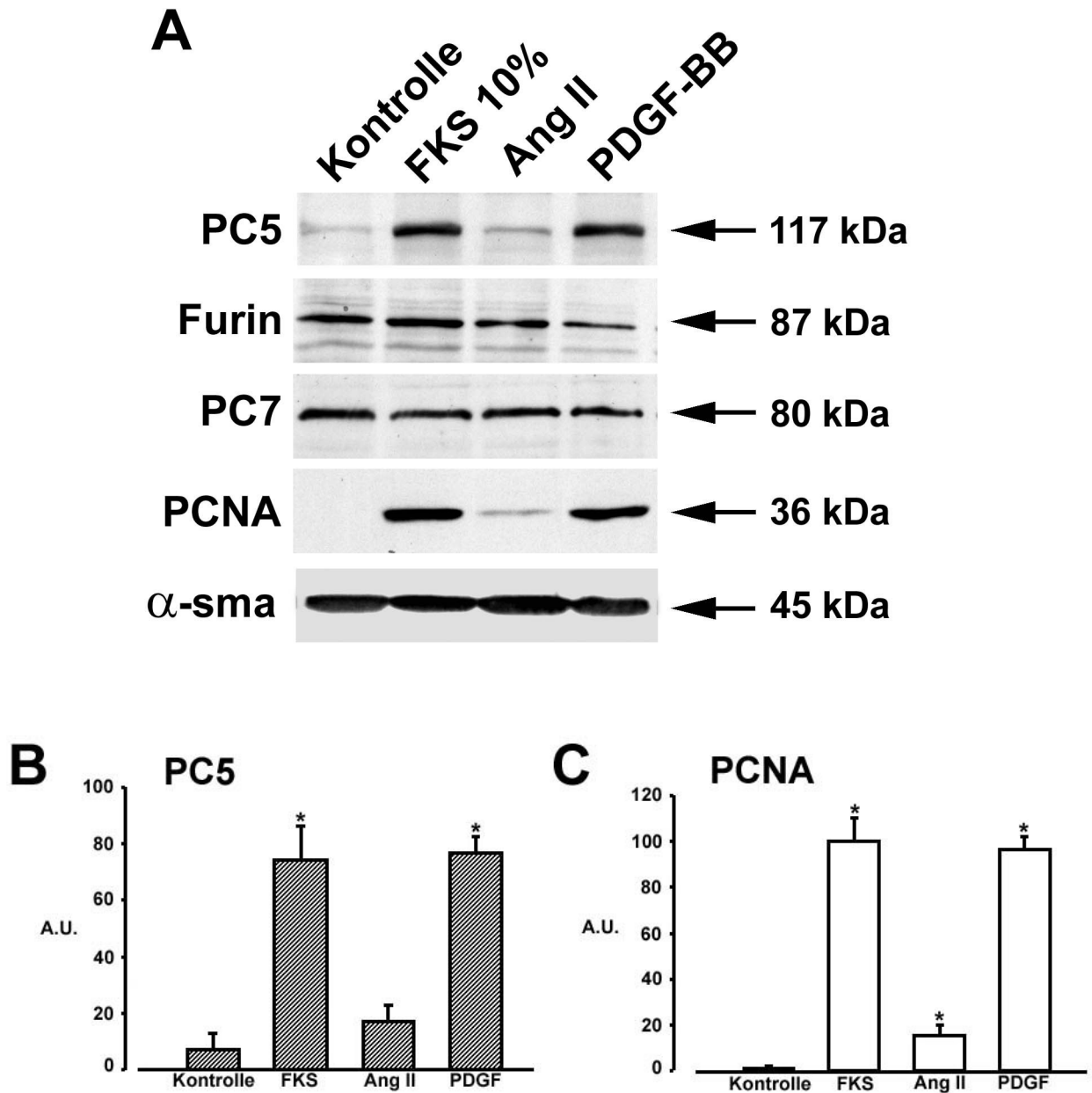


Abbildung 4: Repräsentatives Western Blot-Experiment zur Regulation von PC5, Furin, PC7 und PCNA nach 48 h Stimulation der VSMCs mit 10 % FKS, PDGF-BB (20 ng/mL) oder Ang II (1 μ mol/L) (A). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass PC5 durch FKS und PDGF induziert wurde. Furin und PC7 wurden nicht beeinflusst. „Re-blotting“ mit dem α -smooth-muscle-Antikörper zeigte die Gleichmäßigkeit der Proteinladung der Membranen. Die Abbildungen B und C stellen die semiquantitative Densitometrie (A.U. – arbitrary units) der PC5- und PCNA-Blots dar (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 3$).

4.2.1. Zeitabhängigkeit der PC5-Induktion durch platelet derived growth factor

Um die Zeitabhängigkeit der PC5-Induktion (Abbildung 5) durch PDGF-BB zu untersuchen, wurden die VSMCs nach einer 48-stündigen Inkubation in 0 % FKS-Medium über 5, 10, 30 Min. bzw. über 48 h mit PDGF-BB (20 ng/mL) stimuliert. Bereits nach 30 Min. ergab sich eine 3fache Erhöhung der PC5-Proteinmenge im Vergleich zu der nicht stimulierten Kontrolle (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

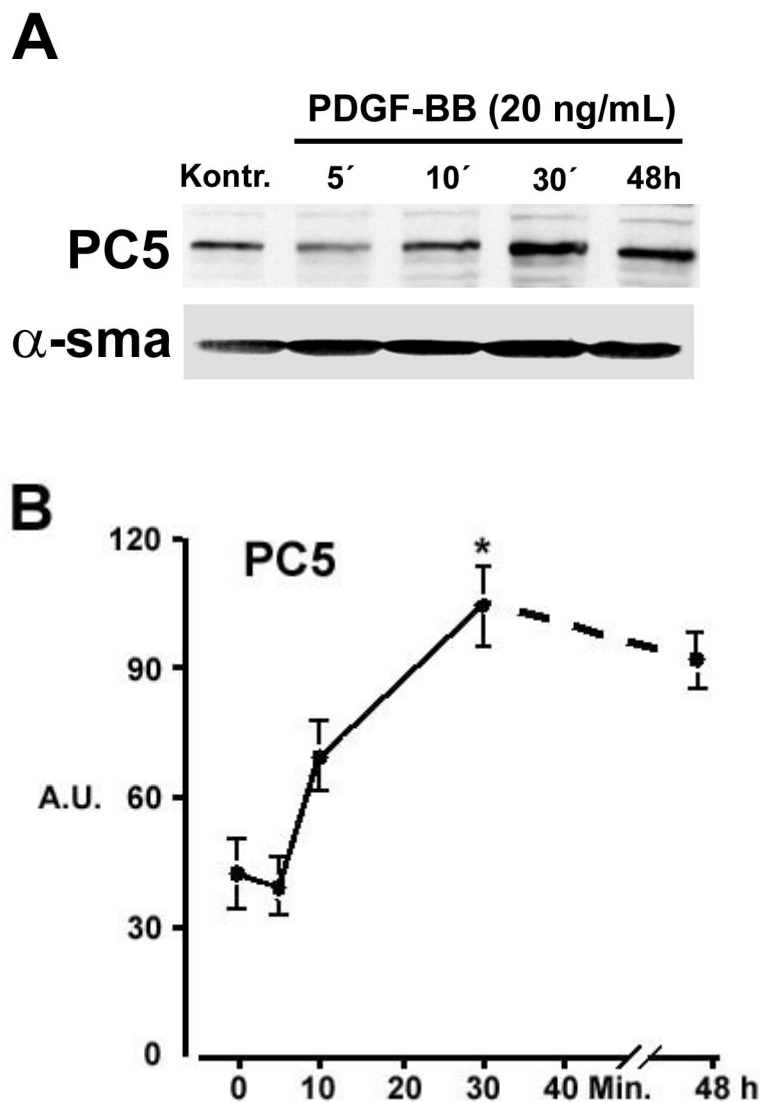


Abbildung 5: Western Blot-Experiment zur Zeitabhängigkeit der PC5-Induktion von VSMCs, die nach 48 Stunden Inkubation in 0 % FKS-Medium mit 20 ng/mL PDGF-BB über verschiedene Zeitintervalle stimuliert wurden (A). Die densitometrische Auswertung (A.U. – arbitrary units) der Western Blot-Versuche wird in der Abbildung B dargestellt. Ein statistisch signifikanter Anstieg des PC5-Proteins (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n = 3$) war nach 30 Min. Stimulation nachweisbar.

4.2.2. Untersuchung der Signaltransduktionswege bei der PC5-Induktion durch platelet derived growth factor-BB in glatten Gefäßmuskelzellen

Nachdem die Experimente eine Induktion von PC5 durch PDGF-BB gezeigt hatten, wurden pharmakologische Inhibitionsexperimente zur Identifikation der beteiligten Signaltransduktionswege durchgeführt. Hierbei wurde der ERK-MAP-Kinase Inhibitor PD98059⁶⁸, der PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin⁶⁹ und Rapamycin als Inhibitor von mTOR/p70^{S6}-Kinase⁶⁹ benutzt. Nach 48 h Inkubation in 0 % FKS-Medium wurden die Zellen 1 h vor der PDGF-Stimulation mit den pharmakologischen Inhibitoren behandelt. Anschließend erfolgte in Anwesenheit der Inhibitoren die Stimulation mit PDGF-BB (20 ng/mL) für eine weitere Stunde. Wie bereits in vorherigen Experimenten gezeigt wurde, induzierte PDGF-BB einen Anstieg der PC5-Proteinmenge. PDGF-BB führte zur Phosphorylierung der MAP-Kinase, Akt und der p70^{S6}-Kinase (Abbildung 5). Die Anwendung von PD98059 (30 µmol/L) bewirkte eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung der MAP-Kinase, hatte aber keinen Effekt auf die PC5-Induktion. Die PDGF-BB induzierte Phosphorylierung von Akt und der p70^{S6}-Kinase wurde durch den Einsatz von PD98059 nicht beeinflusst. Wortmannin (200 nmol/L) verhinderte die Phosphorylierung des in der Signalkaskade folgenden Akt, hatte aber gleichzeitig keinen Einfluss auf die MAP-Kinase. Im Gegensatz zum PD98059 hemmte Wortmannin die PC5-Induktion signifikant (*p < 0,05 vs. PDGF-BB-Stimulation). Als wirksamster Inhibitor des PDGF-BB-induzierten PC5-Anstiegs erwies sich Rapamycin (10 ng/mL). Zugleich inhibierte Rapamycin die Phosphorylierung der p70^{S6}-Kinase und hat keinen Einfluss auf Akt und MAP-Kinase.

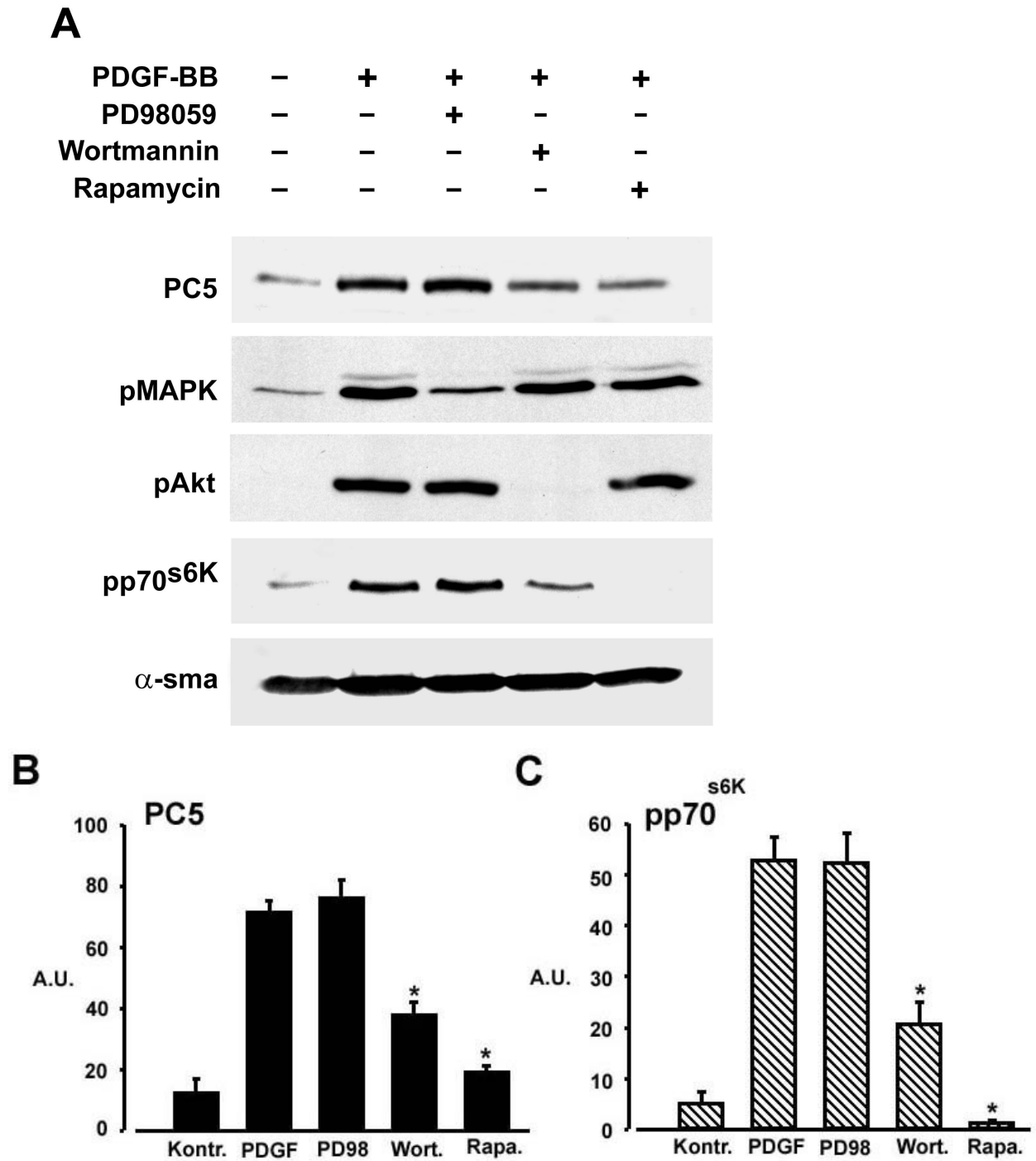


Abbildung 6: Western Blot-Experiment zur Untersuchung der Signaltransduktion der Induktion von PC5 durch PDGF (A). Die PDGF-stimulierte PC5-Induktion wurde signifikant durch den PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin (200 nmol/L) und den Inhibitor von mTOR Rapamycin (10 ng/ml) gehemmt. Der ERK-MAPK-Inhibitor PD98059 (30 μ mol/L) hatte keinen Effekt. Darüberhinaus ist die semiquantitative Densitometrie (A.U. – arbitrary units) von PC5 (B) und p70^{S6}-Kinase (C) abgebildet (*p < 0,05 vs. Kontrollen, n = 3).

4.3. Hemmung von PC5 durch Antisense-Oligonukleotide

In den bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der VSMCs mit PDGF selektiv das PC5 hochreguliert. An dieser Hochregulation ist die PI3-Kinase und die p70S6-Kinase beteiligt. Um die Funktion von PC5 in VSMCs detaillierter zu untersuchen, wurden Experimente mit spezifischen gegen PC5 gerichteten Antisense-Oligonukleotiden (asODNs) *in vitro* durchgeführt. Zunächst wurde die Transfektion der VSMCs durch FITC-markierte asODNs untersucht. Bei diesen Experimenten konnte u.a. die Zeitkinetik der intrazellulären Aufnahme der asODNs evaluiert werden. Anschließend wurden verschiedene Sequenzen hinsichtlich ihrer Potenz PC5 zu hemmen verglichen. Um auszuschließen, dass die beobachtete Reduktion des PC5-Proteins durch toxische Effekte verursacht ist, wurde die Wirkung der asODNs auf FKS-vermittelte DNA-Synthese sowie auf die Zellvitalität überprüft. Die Vitalitätsüberprüfung erfolgte mittels Trypan Blue-Färbung und Bestimmung des Zelldurchmessers im Zellcounter.

4.3.1. Untersuchung der Transfektionseffizienz der Antisense-Oligonukleotide und deren Transfektionskinetik in glatten Gefäßmuskelzellen *in vitro*

Transfektionskinetik und Transfektionseffizienz wurden in den folgenden Experimenten mit Hilfe von FITC-markierten PC5-Antisense-Oligonukleotiden (1 $\mu\text{mol/L}$) untersucht. Die Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme **A** (Abbildung 7) zeigt 7 h nach Beginn der Transfektion ein kaum wahrnehmbares Fluoreszenzsignal. Die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt. Starkes FITC-Signal erscheint im Kernbereich der dargestellten Zellen nach 48 h Transfektion (**B**). Im Gegensatz hierzu zeigen zum gleichen Zeitpunkt nach der Transfektion Zellen, die mit asODNs aber ohne Transfektionsmedium OligofectAMINE behandelt wurden, nur ein körniges zytoplasmatisches Signal (**D**). Aufnahme **C** verdeutlicht nach 72 h, dass die Verteilung des Fluoreszenzsignals bei der Transfektion mit OligofectAMINE einer Zeitkinetik unterlag. Deutlich zu erkennen ist der signalfreie Zellkern mit nun paranukleärer Fluoreszenz.

Die Anzahl der nicht transfizierten Zellen wurde durch die Färbung der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI untersucht. In den Versuchen wiesen nach 72 h Transfektion unter Zuhilfenahme von OligofectAMINE durchschnittlich 60 % der Zellen ein durch FITC-markierte Oligonukleotide verursachtes Zellkernsignal auf.

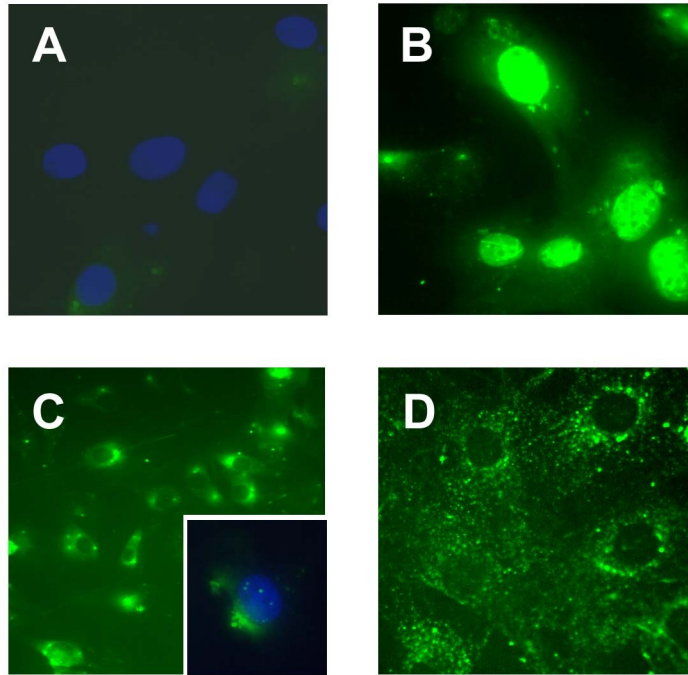


Abbildung 7: Aufnahmen A bis C zeigen VSMCs nach Transfektion mit FITC-markierten PC5-asODNs (1 $\mu\text{mol/L}$) unter Zuhilfenahme des Transfektionsmediums OligofectAMINE (A nach 7 h, B nach 48 h, C nach 72 h). Das stärkste Zellkernsignal wurde nach 48 h erzielt. Hingegen zeigen VSMCs, die ohne OligofectAMINE transfiziert wurden nach 48 h keine Zellkernfärbung (D). Die zusätzliche Nukleusfärbung in Abbildung A und C (in C wird eine der dargestellten Zellen in stärkerer Vergrößerung rechts unten dargestellt) erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI.

4.3.2. Effektivitätsvergleich der ausgewählten PC5-Antisense-Oligonukleotide bei der Hemmung des Serum-induzierten PC5-Proteinanstiegs

Im weiteren Verlauf sollte ein Wirksamkeitsvergleich zwischen den ausgewählten Oligonukleotidsequenzen (Tabelle 2) durchgeführt werden. Oligonukleotide PC5-asODNs-1, PC5-asODNs-2 und PC5-asODNs-3 wurden in Konzentrationen 0,5 und 1,0 sowie 5 $\mu\text{mol/L}$ angewendet. Ein exemplarisches Western Blot-Experiment wird in der Abbildung 8 A dargestellt. Als Kontrollen dienten Zellen, die mit 0,2 % FKS-Medium (*Kontr.*) oder 2,5 % FKS-Medium (*FKS*) behandelt wurden. Um unspezifische Effekte des Transfektionsmediums auszuschließen, wurde eine der Kontrollen nur mit OligofectAMINE behandelt (*Olig.*). Auch Antisense-Oligonukleotide, die gegen das α_1 -Kollagen ($\alpha_1\text{-coll.asODNs}$) gerichtet sind, wurden bei diesen Experimenten verwendet, um die Spezifität der PC5-Antisensemoleküle zu

evaluieren. Antisense-Oligonukleotide PC5-asODNs-2 erwiesen sich als der potenteste Inhibitor der FKS-induzierten PC5-Synthese. Die Auswirkungen der PC5-asODNs-1 Oligonukleotide waren schwächer, PC5-asODNs-3 Oligonukleotide waren unwirksam. Weiterhin zeigte sich eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von PC5-asODNs-2 und PC5-asODNs-1 mit stärkstem Einfluss auf die PC5-Proteinmenge in der Antisensekonzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$. Für die folgenden Versuche wurden daher PC5-asODNs-2 Oligonukleotide ausgewählt. Antisense-Oligonukleotide, die gegen das α_1 -Kollagen gerichtet sind, hatten keinen Einfluss auf die PC5-Proteinmenge, ebenso das Transfektionsmedium nicht (Abbildung 8 A).

Um die Spezifität der Antisensewirkung weiter zu untersuchen, wurden Versuche mit Hilfe von Sense- (*se.*) und Scramble- (*scr.*) Oligonukleotiden durchgeführt. Die Sense-Kontrolle besteht aus RNA-Sequenz, die zu der Antisense komplementär ist. Die Scrambel-Sequenz zeichnet sich im Vergleich zur Antisense durch quantitativ gleiche Basenzusammensetzung bei jedoch zufälliger Basenreihenfolge aus. Abbildung 8 B zeigt ein exemplarisches Western Blot-Experiment. Alle Oligonukleotide wurden in Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ angewendet. PC5-Antisense-Oligonukleotide (PC5-asODNs-2) führten im Vergleich zur FKS-Kontrolle zu ca. 60 %iger Reduktion des FKS-induzierten PC5-Proteinanstiegs, die gut mit der zuvor bestimmten Transfektionseffizienz übereinstimmt. Sense- bzw. Scramble-Kontrollen inhibieren den PC5-Anstieg nicht. Außerdem weist keine der verwendeten Kontrollen, insbesondere auch nicht die PC5-Antisense-Oligonukleotide einen Einfluss auf die Proteinmenge von Furin auf, was die Spezifität der verwendeten PC5-asODNs-1 unterstreicht.

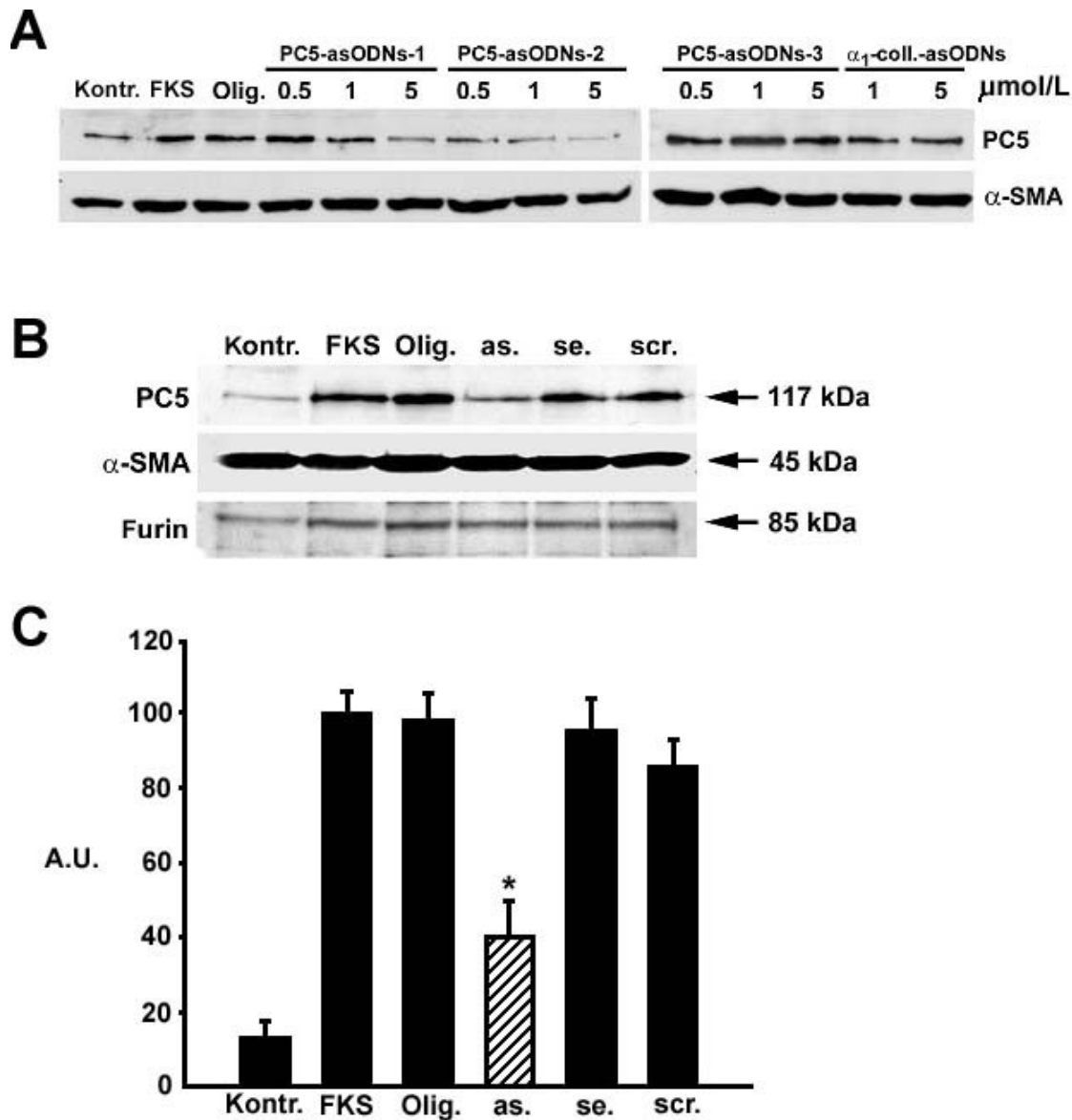


Abbildung 8: In einem exemplarischen Western Blot-Experiment, zeigt sich, dass innerhalb der ausgewählten Gensequenzen PC5-asODNs-2 Oligonukleotide am stärksten den FKS-induzierten PC5-Proteinanstieg (*FKS*) hemmen konnten (A). Die Wirkung der Nukleotide war von deren Konzentration abhängig mit stärkster Hemmung bei 5 $\mu\text{mol/L}$. Die Auswirkungen der PC5-asODNs-1 Oligonukleotide waren schwächer. PC5-asODNs-3 als auch die Kontroll-Oligonukleotide waren unwirksam. Die verwendeten Kontrollen (*Olig.*, *se.*, *scr.*, α_1 -coll.-asODNs) zeigten keinen Einfluss auf den FKS-induzierten PC5-Proteinanstieg. Furin wurde weder durch PC5-Antisense noch durch die Kontrollen signifikant beeinflusst. Als weiterer Kontrollansatz dienten unstimulierte VSMCs (*Kontr.*) Die semiquantitative Densitometrie (A.U. – arbitrary units) der PC5-Hemmung ist in der Abbildung C abgebildet (* $p < 0,05$ vs. Kontrollen, $n = 3$).

4.3.3. Überprüfung der Zellvitalität bei Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden

Um auszuschließen, dass die PC5-asODNs ihre Wirkung durch toxische Effekte entfalten, wurden die mit PC5-asODNs-2 behandelten Zellen mit Trypan Blue gefärbt. In weiteren Versuchen wurde zur Vitalitätsüberprüfung der Zelldurchmesser der mit Oligonukleotiden behandelten Zellen ermittelt. Zellmembranen toter Zellen sind im Gegensatz zu denen vitaler Zellen für den Farbstoff Trypan Blue durchgängig⁸¹ und können folglich mit diesem Farbstoff gefärbt werden. Die Anzahl toter Zellen wurde mikroskopisch bei 320facher Vergrößerung ermittelt. Pro Ansatz wurden drei Gesichtsfelder ausgezählt. Durch die Aufhebung der Barrierefunktion der Zellmembran toter Zellen verändert sich auch der im Zellcounter messbare Zelldurchmesser. Dieser nimmt durch den Einstrom von Ionen und Wasser zu. In Vorversuchen, bei denen die Zellen mit Ethanol abgetötet wurden, erfolgte die Evaluierung der Durchmesser avitaler VSMCs. Die Tabellen 3 und 4 veranschaulichen Ergebnisse exemplarischer Versuche. Die Anzahl vitaler Zellen wurde in jedem Ansatz als 100 % gesetzt. Aufgeführt ist jeweils der prozentuale Anteil toter Zellen mit der dazugehörigen Standardabweichung (n = 5). Insgesamt konnte weder bei der Trypan Blue Färbung noch bei der Überprüfung des Zelldurchmessers im Zellcounter ein Anstieg der Anzahl toter Zellen durch Verwendung von PC5-asODNs-2 (1 µmol/L) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Auch die verwendeten Kontroll-Oligonukleotide und das Transfektionsmedium OligofectAMINE (*Olig.*) alleine führten zu keinem signifikanten Anstieg der Anzahl avitaler Zellen.

2,5 % FKS	Olig.	PC5-asODNs-2	PC5-seODNs-2	PC5-scrODNs-2
9,6 ± 2,8	8,9 ± 1,8	8,9 ± 1,7 (*)	9,7 ± 2,5	10,7 ± 0,8

Tabelle 3: Auswertung von fünf Versuchen (Mittelwert ± Standardabweichung, *p nicht signifikant vs. 2,5% FKS, n=5), bei denen die transfizierten Zellen mit Trypan Blue gefärbt wurden. Der Anteil vitaler Zellen wurde in jedem Ansatz als 100 % gesetzt. Weder PC5-Antisense-Oligonukleotide noch die verwendeten Kontrollen führten zu einem signifikanten Anstieg toter Zellen im Vergleich zur FKS-Kontrolle.

2,5 % FKS	Olig.	PC5-asODNs-2	PC5-seODNs-2	PC5-scrODNs-2
8,5 ± 3,1	9,2 ± 3,7	8,1 ± 3,9 (*)	7,9 ± 3,4	9,8 ± 1,9

Tabelle 4: Ergebnisse der Untersuchung von Zelldurchmesser nach Transfektion mit PC5-asODNs-2 (Mittelwert ± Standardabweichung, *p nicht signifikant vs. 2,5% FKS, n=5). Anzahl vitaler Zellen wurde als 100 % gesetzt. Auch hier zeigte sich keine signifikante Zunahme toter Zellen nach der Transfektion mit Oligonukleotiden.

4.3.4. Einfluss der PC5-Antisense-Oligonukleotide auf die FKS-induzierte DNA-Synthese in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen

Zuletzt wurde die Wirkung der PC5-asODNs-2 auf die FKS-vermittelte DNA-Synthese mit Hilfe eines BrdU-ELISA untersucht. VSMCs wurden in ihrem Zellzyklus zunächst über 48 h in 0 % FKS-Medium synchronisiert. Nach der Transfektion mit Oligonukleotiden erfolgte die Stimulation der Proliferation über 24 h mit 5 % FKS-Medium. In den darauf folgenden 8 h wurde dem Zellkulturmedium BrdU hinzugegeben. Ergebnisse dieser Versuche (n = 3) zeigen zunächst, dass die FKS-Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Synthese in den VSMCs im Vergleich zur unstimulierten 0 % FKS-Kontrolle führte (Tabelle 5, p < 0,05 vs. 0 % FKS-Kontrolle). Weder PC5-asODNs-2 noch die verwendeten Kontroll-Oligonukleotide und das Transfektionsmedium bewirkten eine signifikante Hemmung der FKS-induzierten DNA-Synthese.

0 % FKS	5 % FKS	Olig.	PC5-asODNs-2	PC5-seODNs-2	PC5-scrODNs-2
0,07 ± 0,001	0,31 ± 0,04 (#)	0,3 ± 0,03	0,29 ± 0,04 (*)	0,32 ± 0,05	0,31 ± 0,01

Tabelle 5: Ergebnisse von BrdU-ELISA Versuchen, bei denen DNA-Synthese der VSMCs unter Verwendung von PC5-asODNs-2 mit 5 % FKS stimuliert wurde (Mittelwert ± Standardabweichung, (n=5). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der DNA-Synthese nach der Stimulation mit 5 % FKS im Vergleich zur 0 % FKS-Kontrolle (#p < 0,05 vs. 0 % FKS Kontrolle). PC5-asODNs-2 Oligonukleotide (*p nicht signifikant vs. 5 % FKS) hatten keinen signifikanten Einfluss auf die FKS-induzierte DNA-Synthese. Bei den verwendeten Kontroll-Oligonukleotiden (PC5-seODNs-2, PC5-scrODNs-2) und OligofectAMINE (Olig.) konnte ebenfalls keine Verminderung oder Erhöhung der DNA-Synthese beobachtet werden.

4.3.5. Reduktion der endoproteolytischen Aktivierung der α_v -Integrinuntereinheit durch PC5 Antisense-Oligonukleotide

Die α_v -Untereinheit ist ein Bestandteil der $\alpha_v\beta_3/\beta_5$ -Integrine. Diese Integrine sind die wichtigsten Vitronektinrezeptoren auf den VSMCs.²⁹ Ähnlich einer Reihe weiterer α -Untereinheiten besteht α_v aus einer leichten (25 kDa) und schweren (125 kDa) Kette, die im extrazellulären Abschnitt des Integrins durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Bereits publizierte Untersuchungen verdeutlichen, dass beide Anteile durch Proteolyse des pro- α_v -Integrins entstehen.⁸² Eine Reduktion der Adhäsion auf Vitronektin konnte auch in Adenokarzinomzellen, die mit dem PC-Inhibitor α -PDX transfiziert wurden, gezeigt werden.⁸³ Die Rolle von PC5 bei der Proteolyse der α_v -Integrinuntereinheit in VSMCs in vitro wurde mit

Hilfe der Antisense-Oligonukleotide in den folgenden Experimenten untersucht. Exemplarische Ergebnisse eines Western Blot-Versuches mit der dazugehörigen densitometrischen Auswertung sind in der Abbildung 9 dargestellt. Der verwendete α_v -Integrinantikörper ist gegen eine C-terminale Proteinsequenz gerichtet. Als Resultat der durchgeführten Versuche ist festzuhalten, dass PC5-asODNs-2 (1 $\mu\text{mol/L}$) (*as.*) die proteolytische Spaltung der α_v -Integrinuntereinheit signifikant verminderte (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle- *Kontr.*, $n = 3$). Dieses wird an der Abnahme der detektierbaren Menge der α_v -leichten Kette (25 kDa) im Western Blot unter reduzierenden Bedingungen deutlich. Die verwendeten Oligonukleotid-Kontrollen (*se.*, *scr.*) hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Endoproteolyse der α_v -Untereinheit. Auch Antisense-Oligonukleotide, die gegen α_1 -Kollagen (α_1 -*as*) gerichtet sind und das Transfektionsmedium ohne Nukleotide (*Olig.*) zeigten keine signifikante Reduktion der endoproteolytischen α_v -Aktivierung. „Re-blotting“ mit dem α -smooth-muscle-Antikörper verdeutlicht die Gleichmäßigkeit der Proteinladung der Membranen.

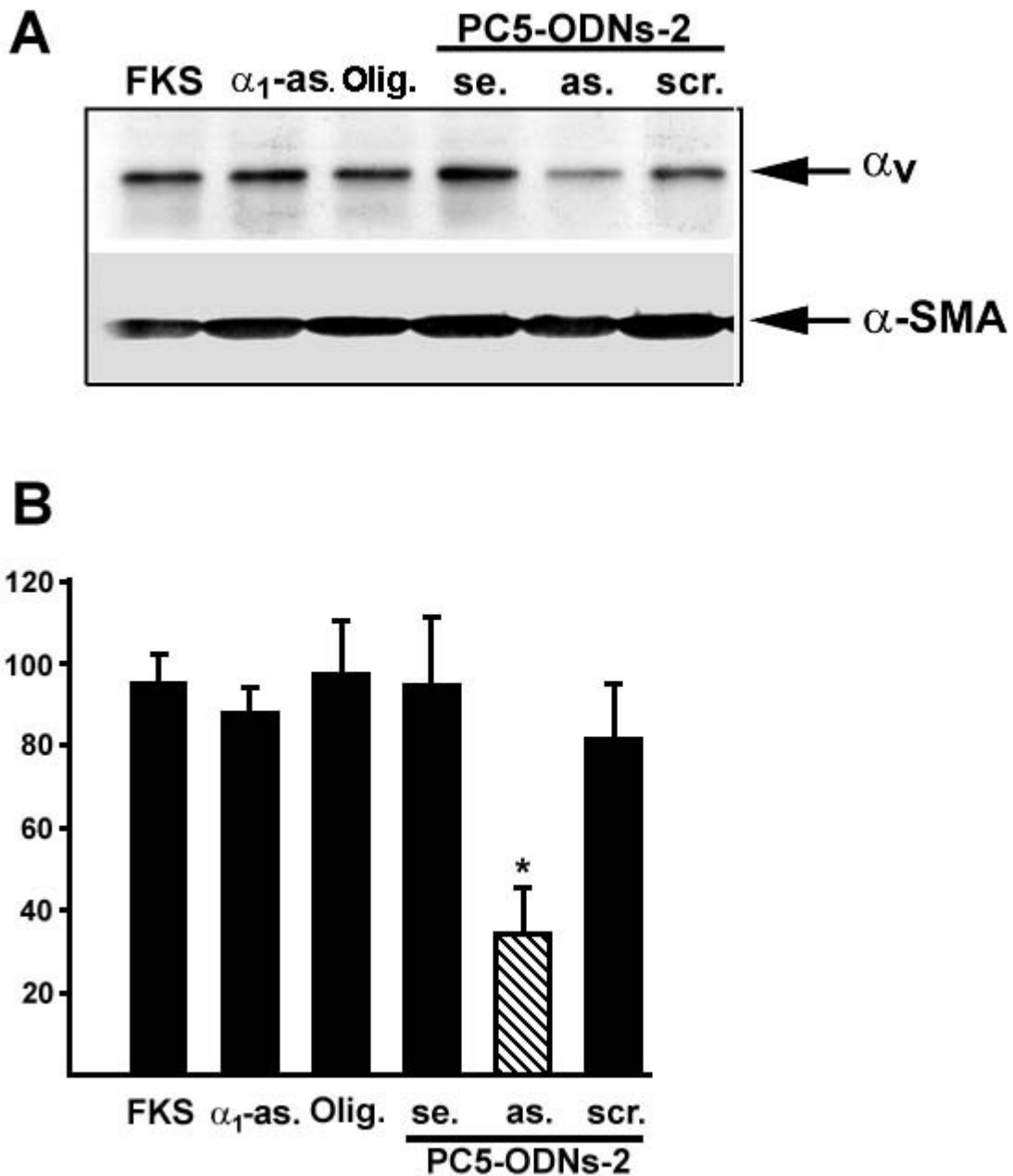


Abbildung 9: Repräsentatives Western Blot-Experiment zeigt die Reduktion der endoproteolytischen Spaltung der α_v -Integrinuntereinheit durch die Anwendung von PC5-asODNs-2 (1 μ mol/L) (*as.*), erkennbar an der signifikanten Abnahme der α_v (25 kDa) leichten Kette in kultivierten VSMCs (A). Sense (*se.*) und scramble (*scr.*) hatten keinen Effekt. Ebenso zeigte die Transfektion der VSMCs mit einer gegen α_1 -Kollagen gerichteten asODNs (α_1 -*as.*) und das Transfektionsmedium (*Olig.*) keine Wirkung. Die Densitometrie der Versuche (A.U. – arbitrary units) ist in B dargestellt (* $p < 0,05$ vs. FKS-Kontrolle- *FKS*, $n = 3$).

4.3.6. Effekt der PC5-Hemmung durch Antisense-Oligonukleotide auf die Adhäsion glatter Gefäßmuskelzellen auf Vitronektin und Kollagen

Nachdem eine spezifische Hemmung von PC5 und die Verminderung der Aktivierung der α_v -Integrinuntereinheit durch Antisense-Oligonukleotide gezeigt wurde, erfolgte die Durchführung funktioneller Assays. Hierbei sollte die Bedeutung von PC5 für die Adhäsion und Migration der VSMCs evaluiert werden.

Die Migration von VSMCs ist ein komplexer Vorgang, der das Lösen und erneutes Binden (Adhäsion) extrazellulärer Kontakte und Zytoskelettveränderungen beinhaltet. Eine besondere Rolle spielen hierbei die Integrine.²³ In den folgenden Experimenten sollte die Bedeutung von PC5 bei der Adhäsion und Migration der VSMCs auf Vitronektin, Kollagen Typ I und Gelatine untersucht werden.

Nach 24-stündiger Transfektion mit Oligonukleotiden (1 $\mu\text{mol/L}$) wurden die VSMCs zur Adhäsion auf Kollagen Typ I (20 $\mu\text{g/mL}$) und Vitronektin (10 $\mu\text{g/mL}$) ausgesetzt. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der Adhäsionsversuche. Das Ergebnis der Absorptionsmessung bei der Adhäsion der mit Oligonukleotiden unbehandelten VSMCs (*Kontr.*) wurde als 100 % gesetzt. Die dargestellten Versuchsauswertungen verdeutlichen (**Abbildung 10 A**), dass die PC5-Proteinreduktion durch PC5-asODNs-2 zu einer signifikanten Verminderung der Adhäsion von VSMCs auf Vitronektin führte (* $p < 0,005$ vs. *Kontr.*). Weder das Transfektionsmedium (*Olig.*) noch die verwendeten Kontroll-Oligonukleotide (*se. und scr.*) führten zu einem vergleichbaren Effekt. Eine weitere Kontrolle waren Oligonukleotide, die gegen das α_1 -Kollagen gerichtet sind (*α_1 -ODNs*). Auch diese Kontroll-Oligonukleotide verminderten nicht die Adhäsion der VSMCs auf Vitronektin. In den durchgeführten Versuchen wurde die Adhäsion der VSMCs auf Vitronektin ebenfalls signifikant durch den $\alpha_v\beta_5$ -blockierenden IgG-Antikörper P1F6 (25 $\mu\text{g/mL}$) reduziert (* $p < 0,05$ vs. *Kontr.*). Als Kontrolle zu P1F6 dienten unspezifische IgG-Antikörper (50 $\mu\text{g/mL}$). Diese hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion der VSMCs.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Adhäsionsverminderung von VSMCs auf Vitronektin, konnte keine signifikante Reduktion der Adhäsion von kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen auf Kollagen Typ I (20 $\mu\text{g/mL}$) durch PC5-asODNs-2 (1 $\mu\text{g/mL}$) erreicht werden (**Abbildung 10 B**). Auch die verwendeten Oligonukleotid-Kontrollen (*se. und scr.*) hatten keinen reduzierenden Einfluss auf die Adhäsion auf Kollagen Typ I.

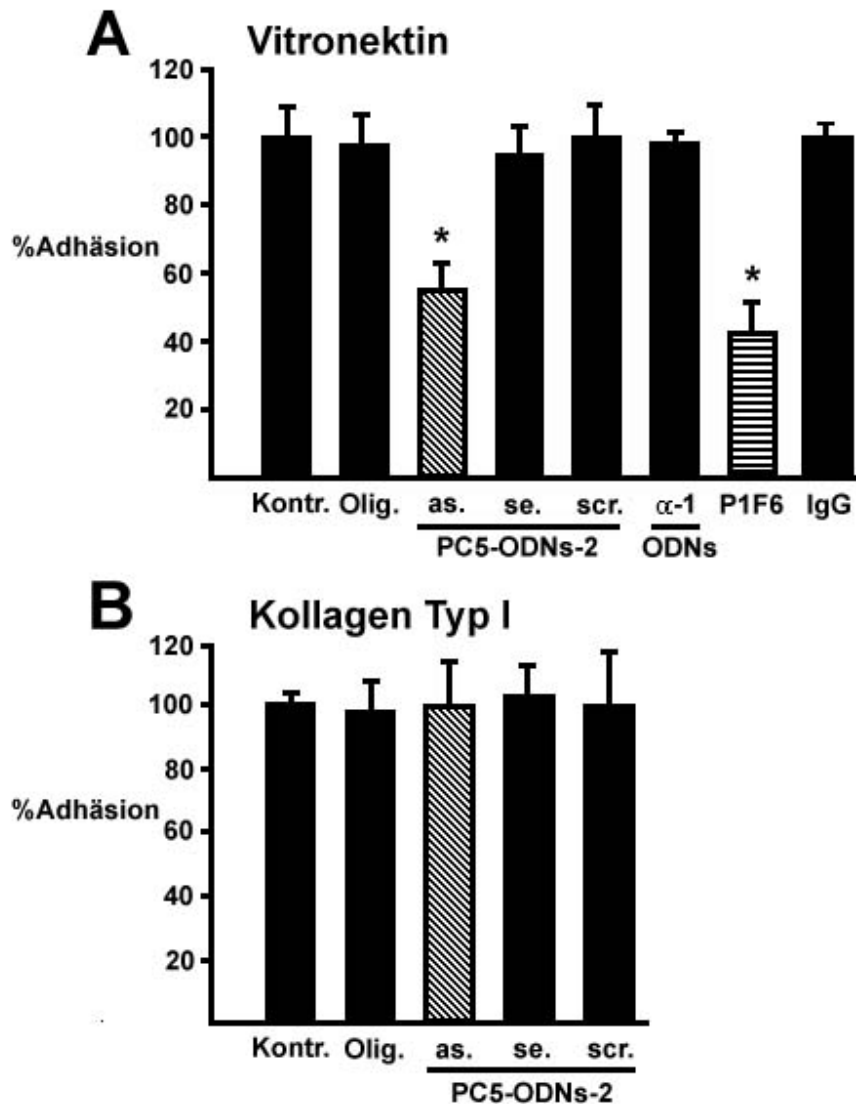


Abbildung 10: Einfluss der Antisense-Oligonukleotide auf die Adhäsion von VSMCs auf Vitronektin und Kollagen Typ I (A). PC5-asODNs-2 (*as.*) (1 $\mu\text{mol/L}$) und der $\alpha_v\beta_3$ -blockierende Antikörper P1F6 (25 $\mu\text{g/mL}$) hemmten signifikant die Adhäsion der VSMCs auf Vitronektin (10 $\mu\text{g/mL}$) (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle – *Kontr.*, $n = 6$). Hingegen hatten die verwendeten Kontroll-Oligonukleotide sense (*se.*), scramble (*scr.*), α_1 -Kollagen-Antisense-Oligonukleotide (α_1 -ODNs), das Transfektionsmedium (*Olig.*) und der unspezifische IgG-Antikörper (*IgG*) keinen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion der VSMCs auf Vitronektin. Im Gegensatz zu den Vitronektin-Ergebnissen führte die Anwendung der PC5-asODNs-2 (1 $\mu\text{mol/mL}$) zu keiner signifikanten Reduktion der Adhäsion der VSMCs auf Kollagen Typ I (20 $\mu\text{g/mL}$). Auch die verwendeten Kontroll-Oligonukleotide und das Transfektionsmedium waren unwirksam (B).

4.3.7. Einfluss der PC5-Hemmung durch Antisense-Oligonukleotide auf die Migration glatter Gefäßmuskelzellen auf Vitronektin und Gelatine

Nachdem die Reduktion der Adhäsion der VSMCs auf Vitronektin durch die Anwendung von PC5-asODNs-2 gezeigt wurde, erfolgte die Durchführung von Migrationsexperimenten. Nach 24-stündiger Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden (1 $\mu\text{mol/L}$) wurden die VSMCs für die Migrationsexperimente auf den zuvor mit Vitronektin (10 $\mu\text{g/mL}$) bzw. Gelatine (0,2 %) beschichteten Migrationsfiltern ausgesetzt. Die Migration wurde nach 1 h Adhäsion durch 10 % FKS-Medium induziert (für weitere 4 h). Ergebnisse exemplarischer Migrationsversuche werden in der Abbildung 11 präsentiert. Die Reduktion des PC5-Proteins durch die Anwendung der PC5-asODNs-2 führte sowohl auf Vitronektin als auch auf Gelatine zu einer signifikanten Reduktion der Migration der VSMCs. Ergebnisse der Migration auf Gelatine verdeutlichen zusätzlich, dass dieser Effekt abhängig von der Konzentration der PC5-asODNs-2 war. Bereits in der Konzentration von 500 nmol/L konnte die Migration der VSMCs auf Gelatine signifikant vermindert werden (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle *Kontr.*, $n = 4$). Darüber hinaus konnte auch eine Reduktion der Migration der VSMCs auf Vitronektin durch die Anwendung des $\alpha_v\beta_5$ -blockierenden Antikörpers P1F6 (25 $\mu\text{g/mL}$) (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle; *Kontr.*) erreicht werden. Ein vergleichbarer Effekt war bei der Anwendung der unspezifischen Kontroll-IgG (*IgG*) (50 $\mu\text{g/mL}$) nicht feststellbar. Die Migration der VSMCs auf Vitronektin und Gelatine wurde durch die verwendeten Kontroll-Oligonukleotide (*se.* und *scr.*) und durch das Transfektionsmedium (*Olig.*) nicht beeinflusst. Die Migration der mit Oligonukleotiden unbehandelten VSMCs (*Kontr.*) wurde als 100 % gesetzt.

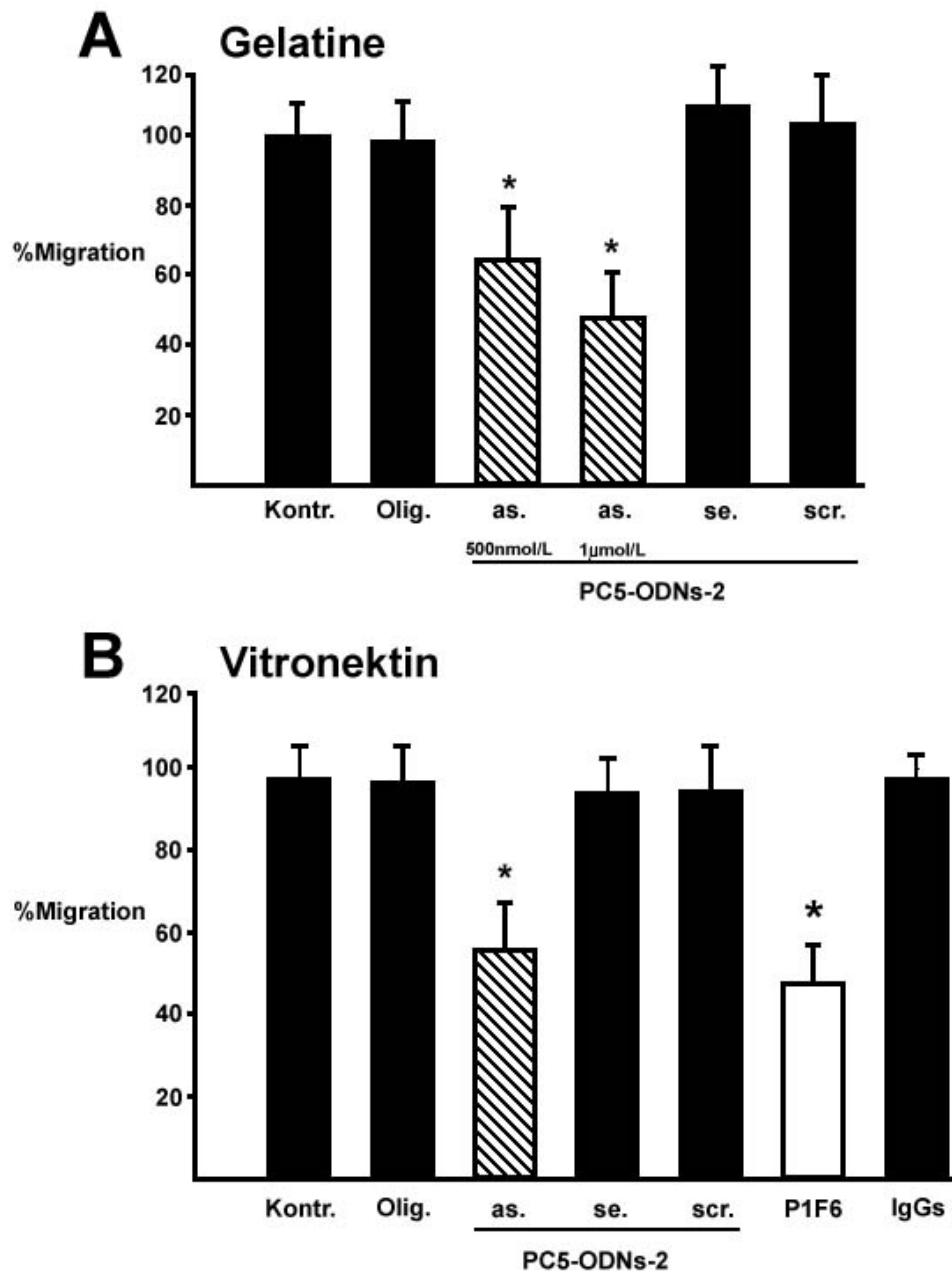


Abbildung 11: Auswirkungen der Transfektion von VSMCs mit Antisense-Oligonukleotiden auf die Migration auf Vitronektin und Gelatine (A). PC5-asODNs-2 (*as.*) (500 nmol/L und 1 µmol/L) reduzierte konzentrationsabhängig die Migration der VSMCs auf Gelatine (B). Eine signifikante Reduktion der Migration zeigte sich auch durch die Anwendung von PC5as-ODNs-2 (1 µmol/L) auf Vitronektin (10 µg/mL) (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle; *Kontr.*). Der $\alpha_v\beta_5$ -blockierende Antikörper P1F6 verminderte im Gegensatz zu den als Kontrolle verwendeten unspezifischen IgG-Antikörpern (*IgGs*) (50 µg/mL) ebenfalls die VSMC-Migration auf Vitronektin. Kontroll-Oligonukleotide sense (*se.*), scramble (*scr.*) und das Transfektionsmedium (*Olig.*) hatten weder auf Gelatine noch auf Vitronektin eine signifikante Wirkung auf die Migration.

5. Diskussion

Glatte Gefäßmuskelzellen sind durch ihre Kontraktionsfähigkeit wesentlich an der Regulation des Blutdruckes und der Zirkulation beteiligt. Durch verschiedene Stimuli können VSMCs ihren Phänotyp hin zum sekretorischen Typ verändern und folglich große Mengen EZM-Proteine produzieren. Die phänotypische Modulation ist eine Voraussetzung für die Entwicklung von Atherosklerose und Restenose nach therapeutischen Eingriffen.¹ Zahlreiche hierbei gebildete Proteine werden zunächst als inaktive Proproteine synthetisiert und müssen eine limitierte Proteolyse durchlaufen um biologisch aktiv zu werden. Für die Aktivierung der Proproteine an di-basischen Proteinsequenzen sind die Proprotein Convertasen verantwortlich. Zu den Substraten dieser Enzymfamilie gehören Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Hormone und EZM-Bestandteile. Hervorzuheben sind auch einige Integrinrezeptoren, die neben ihrer wichtigen Rolle als Adhäsionsmoleküle ebenfalls bedeutsam für die bidirektionale Übertragung von Signalen (inside-out, outside-in signaling) sind. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass in den kultivierten VSMCs der Ratte mRNA der Proprotein Convertasen PC5 (Isoform A und B), Furin und PC7 nachweisbar ist. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen verdeutlichen, dass sich die intrazelluläre Lokalisation von PC5 und Furin auf das TGN konzentriert. Hingegen geht die intrazelluläre Verbreitung von PC7 über das TGN hinaus. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass das PC5 selektiv durch PDGF-BB stimuliert wird. Wie fortführende Inhibitionsversuche verdeutlichen, scheint der PI3-Kinaseweg und die mTOR-Kinasen für die Hochregulation von PC5 durch PDGF-BB bedeutsam zu sein. Selektive Inhibition von PC5 durch Oligonukleotide führte bei den VSMCs zur signifikanten Verminderung der Proteolyse der α v-Integrinuntereinheit. Begleitend hierzu konnte eine verminderte Adhäsion und Migration der VSMCs auf dem α v β 3/ β 5-Rezeptor Vitronektin beobachtet werden.

Die Einwirkung von Wachstumsfaktoren auf Zellen führt zur Steigerung der Proteinbiosynthese. Hierbei kann man ebenfalls die Hypothese aufstellen, dass die Proteasen, die für die Herstellung biologisch aktiver Proteine notwendig sind, ebenfalls einer Regulation durch die Wachstumsfaktoren unterliegen. In den Experimenten wurde die Regulation von Furin, PC5 und PC7 durch die Wachstumsfaktoren PDGF-BB und Ang II untersucht. PDGF ist der wichtigste mitogene Faktor für Zellen mesenchymalen Ursprungs.⁶ Ang II wirkt neben der Funktion bei der Blutdruckregulation auch als Wachstumsfaktor, der Proteinbiosynthese initiiert und zur Zellhypertrophie führt.¹¹ VSMCs der Ratte, die über 24 h mit Ang II (100 nmol/L) inkubiert wurden, zeigten einen 80 %igen Anstieg der Proteinbiosynthese. Die Gesamtzellzahl wurde von der Stimulation nicht beeinflusst.¹¹ An der Hochregulation des proliferating cell nuclear antigens (PCNA) lässt sich in den zuvor dargestellten Experimenten nachweisen, dass beide Wachstums-

faktoren die DNA-Synthese in VSMCs induzieren. PDGF als starker mitogener Faktor zeigt hierbei eine stärkere Wirkung als das Ang II. PCNA ist als Kofaktor der DNA-Polymerase delta an der DNA-Synthese beteiligt.⁸⁴ Im Tiermodell führt die Ballon-Verletzung der Arteria carotis der Ratte zu einer Induktion von PCNA.⁷⁹ Dagegen lässt sich immunhistochemisch nur wenig PCNA in intakten Gefäßen finden. In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass das PDGF-BB die Proprotein Convertase PC5 selektiv hochreguliert. Zeitkinetik-Analysen der PDGF-induzierten PC5-Hochregulation verdeutlichen einen signifikanten Effekt des Wachstumsfaktors bereits nach 30 Min. Obwohl das Ang II ebenfalls die Proteinsynthese initiiert und auch wie das PDGF-BB die PI3-Kinase und den MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg aktiviert⁸⁵, konnte kein Einfluss auf das PC5 in den kultivierten VSMCs festgestellt werden. Die Proteinkonzentration von PC7 und Furin wurde weder von PDGF-BB noch von Ang II verändert. Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einklang mit anderen Untersuchungen der proliferierenden VSMCs. In intakten Gefäßen konnte PC5 immunhistochemisch nur in wenigen Zellen der Media nachgewiesen werden.⁸⁶ In vivo führte eine Ballon-Verletzung in Nagern zu einer Hochregulation von PC5 – zunächst in der Media, dann in der sich bildenden Neointima.⁷⁹ Expressionssteigerung von PC5 war auch im Organkulturmodell der Rattenaorta zu beobachten.⁶¹ In der Organkultur wurde PC5 im Gegensatz zu der PDGF-BB Stimulation der kultivierten VSMCs nicht als einzige Proprotein Convertase hochreguliert. Immunhistochemische Analysen und Northern Blot-Untersuchungen erbrachten als Ergebnis, dass in dem Organkulturmodell neben PC5 auch Furin und PC7 induziert werden.⁶¹ Es liegt die Vermutung nahe, dass andere an der Proliferation der VSMCs beteiligten Zytokine für diese Induktion verantwortlich sind.

Ein weiteres Beispiel für eine selektive Beeinflussung der Expression einer Proprotein Convertase ist die Stimulation verschiedener Zellarten mit TGF- β 1.⁵⁴ Diese führt bei den Synovialiszellen und kardialen Fibroblasten der Ratte zur Hochregulation von Furin. Andere PCs bleiben hierbei unbeeinflusst. Interessanterweise wurde Furin auch als Hauptconvertase des pro-TGF- β 1 identifiziert.⁸⁷ Die Stimulation der Zellen mit diesem Wachstumsfaktor hat die Autoinduktion des TGF- β 1-Gens und Hochregulation der prozessierenden Protease Furin zur Folge.⁸⁸ Die Anbindung von Zytokinen an ihre Rezeptoren führt zur Induktion zahlreicher Signaltransduktionswege, deren Zielmoleküle im Zytosol und Nukleus zelluläre Funktionen wie Proteinbiosynthese, Proliferation, Migration beeinflussen. Zentrale Bedeutung bei der Signaltransduktion von PDGF und Ang II haben die MAP-Kinase- und der PI3-Kinase-Signaltransduktionsweg. Beide Wege sind an der Progression des Zellzyklus beteiligt.⁸⁹

Experimentelle Daten zeigen, dass mRNA des Cyclin D₁, das essentielle Bedeutung für den Übergang der Zellen aus der G₁- in die S-Phase hat, durch beide Signaltransduktionswege induziert wird.⁸⁹ Die Migration der Zellen benötigt eine Signalübertragung über den PI3-Kinaseweg.⁹⁰ PDGF-BB hat keine Migrations-stimulierende Wirkung in chinese hamster ovary (CHO) Zellen, deren mutierter PDGF-Rezeptor nicht in der Lage ist, die PI3-Kinase zu aktivieren.⁹¹ Der MAP-Kinase-Transduktionsweg scheint ebenfalls eine essentielle Rolle bei der Migration zu spielen. Die Inkubation der VSMCs mit MAP-Kinase Inhibitor PD98059 als auch die Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden, die gegen ERK-1 und ERK-2 gerichtet sind, führten zu einer signifikanten Verminderung der durch PDGF-BB induzierten Migration der VSMCs.⁹²

Eine weitere Gemeinsamkeit mitogener und hypertropher Faktoren ist die Initiierung der Proteinbiosynthese. Steigerung der Proteinbiosynthese geht einher mit der Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6 durch die p70s6-Kinase.¹⁶ Die Aktivierung der p70s6-Kinase führt zur Steigerung der Translation von mRNA-Molekülen, die an ihrem 5'-Ende eine Polypyrimidinkette besitzen. Diese Modifikation ist vor allem für ribosomale mRNA typisch. Die vermehrte Translation ribosomaler RNA trägt zum Ausbau der Proteinbiosynthesekapazität der Zelle bei.¹⁶ An der Aktivierung der p70s6-Kinase ist der PI3-Kinase-Signaltransduktionsweg und die mTOR-Proteine (mammalian target of rapamycin) beteiligt. Zu den mTOR-Proteinen zählt eine Reihe von Serin/Threonin-Proteinkinasen, die an der Regulation der Proteinbiosynthese in Abhängigkeit von den verfügbaren Nährstoffen beteiligt sind.¹⁶ Die Steuerung der Proteinbiosynthese kann z.B. auf der Ebene der Translation stattfinden. Eukaryote Ribosomen sind nur dann in der Lage das 5'-Ende der mRNA zu binden, wenn dieses durch angebundene Initiationsfaktoren eIF4E, eIF4GI und eIF4GII markiert wird. Über die PI3-Kinase, mTOR-Proteine und S6-Kinasen wird die Initiation der Translation über die Phosphorylierung der inhibierenden 4E-BP's (eIF4E-binding proteins) reguliert.¹⁶ Die 4E-BP's konkurrieren mit eIF4GI und eIFGII um die Anbindung an das eIF4E und sind dabei im phosphorylierten Zustand weniger effektiv.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Signaltransduktionswege an der PDGF-induzierten PC5-Proteinerhöhung in den VSMCs beteiligt sind. In den Experimenten konnte gezeigt werden, dass der PC5-Proteinanstieg durch den PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin gehemmt werden kann. Bei den untersuchten Pharmaka wies der mTOR-Inhibitor Rapamycin die stärkste inhibierende Eigenschaften auf. Hingegen bewirkte der MAP-Kinase Inhibitor PD98059 keine signifikante Veränderung des PDGF-induzierten PC5-Anstiegs.

Die dargestellten Experimente verdeutlichen weiterhin, dass Rapamycin ein starker Inhibitor der

Phosphorylierung der p70s6-Kinase ist. Auch mit Wortmannin konnte die Aktivierung dieses Enzyms signifikant vermindert werden. Im Einklang mit den bisher veröffentlichten Daten steht auch, dass der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg keine Rolle bei der Aktivierung der p70s6-Kinase spielt.¹⁶

Verstärkte Proteinbiosynthese der Zellen bedingt auch steigende Aktivität der prozessierenden Enzyme. So führt im bereits beschriebenen Beispiel eine Stimulation der kardialen Fibroblasten der Ratte mit TGF- β 1, welches durch PCs aktiviert wird, zur Expressionssteigerung von Furin.⁵⁴ Verstärkte Freisetzung des NGF in der Rattenaorta-Organokultur wird begleitet durch den detektierbaren Anstieg von PC5-, PC7- und Furin-mRNA.⁶¹ Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führt die Stimulation der VSMCs durch PDGF zur Aktivierung der PI3- und p70S6-Kinase. Dieses führt wie oben beschrieben zur Induktion der mTOR Proteine und folglich zur Steigerung der Proteinbiosynthese. Bei der Aktivierung der hierdurch entstehenden Proteine scheint das PC5 eine besondere Rolle zu spielen, da es im Gegensatz zu den anderen in VSMCs nachgewiesenen PCs- PC7 und Furin selektiv durch die PDGF-Stimulation hochreguliert wird. Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass durch den Einsatz des mTOR-Inhibitors Rapamycin, dessen inhibierende Wirkung den Zellen Nährstoffmangel suggeriert¹⁶, neben der Proteinbiosynthese auch das prozessierende Enzym PC5 herunterreguliert wird. In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass die Behandlung der VSMCs mit Rapamycin ebenfalls zur phänotypischen Modulation der Zellen hin zum kontraktile Phänotyp führt.⁹³ Dieses ist an der steigenden Expression von SM-MHC, smooth muscle α -Aktinin sowie einem weiteren Markerprotein – Calponin erkennbar. Gleichzeitig konnte eine reduzierte Kollagen- und Gesamtprotein-synthese beobachtet werden.⁹³ Die Proliferation der VSMCs und gesteigerte Freisetzung der EZM-Bestandteile kann nach therapeutischen Eingriffen (PTCA/Stent) zu erneuter Einengung im behandelten Gefäßgebiet führen. Antiproliferative Effekte des Rapamycins führten zum therapeutischen Einsatz der Substanz als Beschichtung in den sogenannten drug-eluting Stents.⁹⁴ Die weitgehende Homologie im Bereich des aktiven Zentrums der Proprotein Convertasen und die Verteilung von Furin, PC5, PC7 in zahlreichen Geweben führt zu der Frage, in wieweit diese Enzyme redundant sind. Man kann vermuten, dass die in dieser Arbeit und in publizierten Daten gezeigte selektive Regulation von PCs durch Wachstumsfaktoren einen Hinweis für die hauptverantwortliche Convertase bei physiologischen und pathologischen Vorgängen in bestimmten Geweben darstellt. Die unterschiedliche Verteilung von PC1 und PC2 in verschiedenen Anteilen des Thalamus stellt eine weitere Möglichkeit der gewebespezifischen Regulation von PCs dar.³⁶ Zu den Faktoren, die die Spezifität der Enzym-Substratinteraktion beeinflussen, zählt auch die subzelluläre Lokalisation der PCs. Um diese in den VSMCs zu untersuchen, wurden

Immunofluoreszenz-Doppelfärbungen mit und ohne Zugabe von BFA vorgenommen. BFA verursacht ein Auseinanderfallen des TGN, wobei ein Teil dieser Organelle bestehen bleibt.⁹⁵ Der Transport und posttranslationale Modifikationen von Proteinen werden dadurch gestört. Kolo-kalisation mit dem TGN-Markerprotein TGN38 zeigte, dass PC5 und Furin im TGN zu finden sind. Die posttranslationale Prozessierung der Proproteine durch die PCs findet im konstitutiven Proteinsekretionsweg in der Regel im TGN statt. Im regulierten Proteinsekretionsweg können die Proteine zusätzlich auch in der sekretorischen Granula und an der Zellmembran prozessiert werden.³⁶ Die Änderung der Ausdehnung des Fluoreszenzsignals von PC5 nach der Behandlung mit BFA verdeutlicht, dass beide Isoformen dieses Enzyms ihre Wirkung in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten entfalten. Xiang et al. wiesen mit Hilfe von Epitop-markierten PC5B-Konstrukten nach, dass sich die Isoform PC5B in BFA-sensitiven Kompartiment befindet.⁷⁷ Diese frühen Lamellen des TGN kollabieren unter dem Einfluss von BFA.⁷⁷ Weiterhin konnten die Autoren nachweisen, dass sich die Lokalisation des membranständigen PC5B von der Lokalisation des Furins unterscheidet. Daraus folgend kann in den dargestellten Versuchen das nach Einwirkung von BFA verbleibende Fluoreszenzsignal der PC5A-Isoform zugeschrieben werden, da der verwendete polyklonale Antikörper beide Isoformen in den VSMCs erkennt.⁴¹ Beide PC5-Isoenzyme unterscheiden sich in der variablen C-terminalen Region. Andere Bereiche der Aminosäuresequenz, zu denen auch das aktive Zentrum gehört, sind baugleich.³⁶ Die Aminosäurekette des PC5B ist länger (-1877 Aminosäuren (PC5A misst 918 Aminosäuren) und beinhaltet eine dem PC5A fehlende transmembranäre Domäne. Die C-terminalen Abschnitte beider Isoenzyme enthalten Sequenzen, die für die subzelluläre Adressierung wichtig sind.³⁹ In der stabil transfizierten kortikotrophen Mäusezelllinie AtT20, kann das überexprimierte lösliche PC5A in Zellextrakten und im Zellkulturmedium detektiert werden.⁴¹ Das membranständige 210 kDa große PC5B-Molekül kann nur intrazellulär nachgewiesen werden. Eine Deletion im C-terminalen Abschnitt des PC5A resultiert in einer ausbleibenden Sortierung in die sekretorischen Granula. Dieses ist an der veränderten Freisetzungskinetik, die der basalen Sekretion von Proteinen des konstitutiven Sekretionsweges gleicht, zu erkennen.⁴¹ Das PC7 zeigte in den VSMCs ein Fluoreszenzsignal, das über den durch TGN38 markierten Bereich hinausging. Diese Ergebnisse entsprechen den Untersuchungen der C-terminalen Region dieses Enzyms, das ähnlich dem Furin und PC5B über eine transmembranäre Domäne verfügt. Different Sortierungssignale in diesem Molekülbereich führen zur veränderten subzellulären Lokalisation im Vergleich zu Furin.⁹⁶ Die experimentellen Daten lassen vermuten, dass obwohl Furin und PC7 Substrate mit Arginin an Positionen P1 und P6 bevorzugen⁸⁷, ihre unterschiedliche subzelluläre Lokalisation zu einer veränderten Substrat-

spezifität beiträgt.

Neben der gesteigerten Proteinbiosynthese und vermehrten Freisetzung von Bestandteilen der EZM, spielt auch die Proliferation und Migration der VSMCs eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Atherosklerose und Restenose.

Um die Bedeutung der Proprotein Convertase PC5 für die Proliferation, Adhäsion und Migration der VSMCs zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit PC5-Antisense-Oligonukleotide verwendet. Für die Durchführung der Experimente lassen sich zusammenfassend einige Leitlinien darstellen, die helfen sollen, die Wirkung der Oligonukleotide zu steigern und zu spezifizieren. Um die wirksamste Sequenz herauszufinden wird empfohlen mehrere Bereiche der Gensequenz als Ziel der Antisense-Oligonukleotide auszuwählen und auszutesten.⁷¹ Die Reduktion des Zielproteins sollte nachgewiesen werden. Das Verhältnis von Antisense zur mRNA (Antisensekonzentration) und zu den empfohlenen kationischen Lipiden muss experimentell z.B. durch Western Blot-Analysen ermittelt werden.⁷¹ Kontrollsequenzen sollen die Spezifität der Aussage über die Wirkung der Antisense-Sequenz erhöhen. Hierzu können Sequenzen verwendet werden, die mit der Antisense-Sequenz „verwandt“ sind: Sense-Kontrolle, Scramble-Kontrolle. Um die sequenzspezifischen Wirkungen der biologisch wirksamen Oligonukleotide aufzuzeigen, können als Vergleich Antisense-Sequenzen anderer Gene verwendet werden.⁷¹

In den dargestellten Vorversuchen zeigten Oligonukleotide, die komplementär zu dem Sequenzbereich 571-587 (Accession Number: L14933) aufgebaut sind, die größte Wirksamkeit bei der Reduktion des FKS-induzierten PC5-Proteinanstiegs. Die Spezifität der Antisensewirkung wurde mit Kontrollsequenzen Sense, Scramble und Antisense gegen das α 1-Kollagen⁷⁵ evaluiert. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass weder PC5-Antisense noch die Kontrollsequenzen einen Einfluss auf Furin hatten. Somit wurde im Gegensatz zu den bisher bekannten pharmakologischen Inhibitoren nur das PC5 inhibiert. Trypan Blue Färbungen und Zellcounter Untersuchungen der mit Antisense-Oligonukleotiden behandelten Zellen machen deutlich, dass der Einsatz der Oligonukleotide in der hier verwendeten Konzentration nicht mit erhöhter Zelltoxizität verbunden war. Mit Hilfe von FITC-markierten Oligonukleotiden wurde die Transfektionseffizienz ermittelt. Diese lag bei ca. 60 % aller Zellen. Antisense-Oligonukleotide wurden auch von anderen Arbeitsgruppen verwendet, um einzelne PCs spezifisch zu hemmen. Rothenberg et al. untersuchte mit Hilfe von vektorgebundenen Antisense-Molekülen die unterschiedlichen Angriffsorte von PC1 und PC2 bei der Prozessierung von Proglukagon in der Pankreasinseldzelllinie α TC1.⁹⁷ In einer anderen Studie wirkte sich die Anwendung von Furin-Antisense wachstumshemmend auf die Magenzelllinie GSM06 aus.⁹⁸

Die in dieser Arbeit dargestellten BrdU-ELISA-Versuche lassen den Schluss zu, dass die mittels PC5-Antisense erzielte Verminderung des PC5-Proteins keinen Einfluss auf die FKS-induzierte DNA-Synthese der VSMCs hat. Dies liegt nahe, dass die für das Zellwachstum notwendigen Proteine keine Substrate von PC5 sind oder dass an deren Prozessierung mehrere redundante PCs beteiligt sind. Weiterhin muss bei der Auswertung der Proliferationsexperimente beachtet werden, dass weder die Transfektionsrate der VSMCs noch die erreichte Reduktion des PC5-Proteins 100 % betrug. Hingegen führt der Einsatz von Dec-RVKR-CMK, das am stärksten Furin und PC5 inhibiert, in kultivierten VSMCs zur Verminderung der IGF-1 induzierten DNA-Synthese.⁹⁹ IGF-1, das auch von den VSMCs sezerniert wird¹⁰⁰, wirkt durch die Anbindung an den IGF-1 Rezeptor (IGF-1R) und ist an der Proliferation und Migration der Zellen beteiligt.⁹⁰ Stawowy et al. konnte nachweisen, dass die Hemmung von Furin und PC5 durch das Dec-RVKR-CMK in den VSMCs eine fehlende Prozessierung des proIGF-1R zur Folge hat.⁹⁹ Als Resultat können die nachgeschalteten Signaltransduktionswege durch die Anbindung des IGF-1 nicht mehr induziert werden. Interessanterweise wurde in der gleichen Arbeit gezeigt, dass Dec-RVKR-CMK keinen Einfluss auf die PDGF-induzierte DNA-Synthese hat. Die PDGF-BB Stimulation der mit dem Inhibitor behandelten Zellen verdeutlicht, dass die der Rezeptorebene nachgeschalteten Signaltransduktionswege, zu denen auch der PI3-Kinase- und der MAP-Kinaseweg gehören, bei der Hemmung von Furin und PC5 prinzipiell intakt sind. Da der PDGF-Rezeptor kein Substrat der Furin-ähnlichen PCs ist, wird die PDGF-vermittelte VSMC Proliferation nicht durch Dec-RVKR-CMK gehemmt. Die zusammenfassende Betrachtung der bisher veröffentlichten Daten lässt darauf schließen, dass PCs durchaus eine Rolle bei der Proliferation der VSMCs spielen können. Dieses wird insbesondere dann deutlich, wenn die proteolytische Aktivierung eines Wachstumsfaktorrezeptors durch die PC-Hemmung nicht stattfindet und die Aktivierung der nachfolgenden Signaltransduktionswege nach Anbindung des zugehörigen Zytokins beeinträchtigt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Antisense-Oligonukleotiden weiterhin auch die Bedeutung der Proprotein Convertase PC5 bei der Adhäsion und Migration glatter Gefäßmuskelzellen untersucht. PC5-Antisense inhibierte die Adhäsion der VSMCs auf Vitronektin. Dieser Effekt war vergleichbar mit der Adhäsionsminderung, die durch den $\alpha_v\beta_5$ -blockierenden Antikörper P1F6 hervorgerufen wurde. Auch die Migration auf Vitronektin wurde durch PC5-Antisense und durch den P1F6-Antikörper vermindert. Zusätzlich migrierten die mit Antisense behandelten VSMCs auch auf Gelatine, welches ebenso RGD-abhängig von den α_v -Integrinen erkannt wird, in verminderter Anzahl.

Adhäsion ist ein essentieller Bestandteil der Migration und erfordert dynamische Wechselwirkungen der Zellen mit der EZM, die durch Integrine vermittelt werden. Neben der nichtkovalenten Anbindung an EZM-Bestandteile sind diese Rezeptoren an bi-direktionaler Signaltransduktion und Mechanotransduktion beteiligt.¹⁰¹ Einige der bekannten α -Integrinuntereinheiten ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, αv , αE , αIIb) haben in ihren Proproteinsequenzen di-basische Spaltungsstellen, die einen potentiellen Angriffsort der PCs darstellen.³⁶ Der Proteinbereich, in dem sich die di-basische Proteinsequenz der pro- α -Untereinheiten befindet, liegt mit Ausnahme von $\alpha 4$ im extrazellulären Anteil des Moleküls nahe der Zellmembran. In Folge der endoproteolytischen Spaltung entsteht eine leichte, membrangebundene C-terminale Kette und eine schwere N-terminale Kette. Beide Molekülanteile sind durch eine Disulfidbrückenbindung verbunden.³¹ Lissitzky et al. untersuchten die Endoproteolyse von pro $\alpha 5$ -, $\alpha 6$ - und αv -Untereinheiten durch Überexpression von PC1, PC2, PACE4, PC5A, Furin und PC7 in Furin defizienten LoVo Zellen.³¹ Die Ergebnisse machen deutlich, dass neben Furin auch das PC5A und im geringeren Maße PACE4 zur Proteolyse der α -Untereinheiten in der untersuchten Zelllinie fähig sind. Interessant ist auch die Tatsache, dass die detektierte Proteolyse durch das PC5A effektiver war als durch Furin.

Im Einklang mit den bisherigen Untersuchungen der pro- α -Endoproteolyse durch die PCs stehen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. In den Western Blot-Experimenten konnte in den VSMCs gezeigt werden, dass die Inkubation der VSMCs mit PC5 Antisense-Oligonukleotiden zu einem signifikanten Rückgang der proteolytischen Aktivierung der αv -Integrinuntereinheit führt. Erkennbar ist dieses an der verminderten Prozessierung der αv -Integrinuntereinheit in die schwere 125 kDa und leichte 25 kDa Proteinkette. Die αv -Untereinheit ist ein Bestandteil von fünf heterodimeren Integrinrezeptoren ($\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, $\alpha v\beta 8$), die zahlreiche EZM-Bestandteile (u.a. Fibronectin, Osteopontin, Tenascin, Vitronectin) über die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Aspartat) binden können.²³ Die $\alpha v\beta 3$ - und $\alpha v\beta 5$ -Integrine sind die Hauptrezeptoren für das Vitronectin in den VSMCs.²⁹ Vor diesem Hintergrund lässt sich zusammenfassend die Schlussfolgerung formulieren, dass die verwendeten PC5-Antisense-Oligonukleotide die αv -Prozessierung in den VSMCs inhibieren und somit die Adhäsion und Migration der Zellen über die Vitronectinrezeptoren $\alpha v\beta 3$ und $\alpha v\beta 5$ vermindert wird. Im Gegensatz zu der verminderten Adhäsion auf Vitronectin hatten die PC5-Antisense-Oligonukleotide keinen Einfluss auf die Adhäsion der VSMCs auf Kollagen Typ I. Dieses lässt sich dadurch erklären, dass das Kollagen Typ I überwiegend durch $\alpha 2$ -Integrine gebunden wird und diese keiner endoproteolytischen Aktivierung bedürfen.²³ Berthet et al. konnte anhand von

Adenokarzinomzellen, die mit dem Furin/PC5-Inhibitor α 1-PDX transfiziert wurden, ebenfalls eine verminderte Adhäsion der Zellen auf Vitronektin beobachten.⁸³ Die transfizierten Adenokarzinomzellen konnten weiterhin ohne Einschränkungen auf Kollagen Typ I adhären. Die Autoren wiesen ferner eine Beeinträchtigung der proteolytischen Aktivierung der Integrinuntereinheiten α v, α 3 und α 6 in den α 1-PDX-behandelten Zellen nach.

Die Anbindung der Integrine an die EZM führt bei fehlender eigener Tyrosinkinaseaktivität zur Aktivierung von sogenannten „nonreceptor“ Tyrosinkinasen.¹⁰¹ Eine zentrale Rolle in der Regulation Integrin-abhängiger Signaltransduktion spielt die Autophosphorylierung der focal adhesion kinase (FAK). Durch Mutationen im Bereich des FAK-Proteinsequenz konnte Schaller et al.¹⁰² zeigen, dass die Autophosphorylierung an Tyr³⁹⁷ eine besondere Rolle bei der Aktivierung der nachgeschalteten Signaltransduktionswege spielt. Autophosphoryliertes FAK kann durch direkte Anbindung die PI3-Kinase induzieren und somit deren migratorischen Signale verstärken.¹⁰³ Die Integrin-vermittelte Adhäsion kann ebenfalls zur Induktion des MAP-Kinase Signaltransduktionsweges führen. In Fibroblasten (Mäusezelllinie NIH 3T3) konnte gezeigt werden, dass diese Aktivierung unabhängig von der Autophosphorylierung des FAK ist.¹⁰⁴ Eine Mutation des β 1-Integrins im Bereich der FAK-Bindungsstelle verhinderte in Fibroblasten die Autophosphorylierung des FAK. Die Aktivierung der MAP-Kinase wurde durch die Mutation nicht beeinträchtigt.

Weitergehende in der Arbeitsgruppe am Deutschen Herzzentrum Berlin durchgeführte Untersuchungen der α v-Prozessierung und deren funktionellen Bedeutung für die VSMCs verdeutlichen, dass die Hemmung von PC5/Furin neben der Beeinträchtigung der Zelladhäsion und Migration auf Vitronektin auch Folgen für die Signalübertragung durch die Integrine hat.⁸⁶ Bei den mit dem PC-Inhibitor Dec-RVKR-CMK vorbehandelten VSMCs führte die Adhäsion auf Vitronektin nicht zur Phosphorylierung des FAK an Tyr³⁹⁷. Diese Phosphorylierung war bei unbehandelten Kontrollzellen zu beobachten. Auch die nachfolgende Akt-Aktivierung wurde gehemmt. Auch Berthet und Mitarbeiter wiesen nach, dass die FAK-Phosphorylierung der mit α 1-PDX stabil transfizierten Adenokarzinomzellen nach dem Aussetzen auf Vitronektin signifikant vermindert ist.⁸³ Funktionelle Auswirkungen konnten auch bei der fehlenden Proteolyse der α 6-Integrinuntereinheit beobachtet werden.¹⁰⁵ Die Einführung einer Mutation im Bereich der di-basischen Proteinspaltsequenz im pro- α 6 Integrin verhinderte die Proteolyse dieses Moleküls durch PCs in Adenokarzinom Zelllinie K562. Die fehlende proteolytische Spaltung beeinträchtigte nicht die Assoziation der ungespaltenen α -Untereinheit mit der β -Untereinheit auf der Zelloberfläche. Die ausbleibende Stimulation der Adhäsion der

untersuchten Zelllinie durch das Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) macht deutlich, dass in diesem Fall das inside out signaling beeinträchtigt ist.¹⁰⁵ Durch Mutationen der α IIb- und α 4-Integrinuntereinheiten im Bereich der Spaltungssequenzen der PCs konnte jedoch gezeigt werden, dass ungespaltene Integrine α IIb β 3 und α 4 β 1 weiterhin in der Lage sind ihre Liganden zu binden.¹⁰⁶

Ein alternativer Weg für die Aktivierung der α v-Integrinuntereinheit wurde kürzlich in Karzinomzellen gezeigt.¹⁰⁷ Die Koexpression des α v β 3-Integrins mit dem MT1-MMP führte zur proteolytischen Spaltung des α v in eine C-terminal verkürzte 115 kDa schwere Kette und eine 25 kDa leichte Kette. Die Prozessierung der α v-Untereinheit hatte verstärkte Adhäsion und Migration der Zellen auf Vitronektin zu Folge. In den kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte scheint dieser alternative Weg keine Rolle zu spielen, obwohl proliferierende VSMCs MT1-MMP exprimieren. Die Proteolyse der α v-Untereinheit konnte durch den Einsatz des MMP-Inhibitors GM6001 (Ilomastat) in VSMCs nicht vermindert werden.⁸⁶

Die Bedeutung der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse für die kardiovaskuläre Forschung wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die beiden Adhäsionspartner Vitronektin und die bindenden Integrine in humanen atherosklerotischen Läsionen hochreguliert gefunden werden.^{108, 109} Auch das PC5 wurde in atherosklerotischen Läsionen gefunden.¹¹⁰ In Operationspräparaten der Arteria carotis mit einem fortgeschrittenen Plaquestadium (Stary IV/V) wurde PC5 vor allem in der Media unterhalb der fibrösen und fettreichen Läsionen histologisch nachgewiesen. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass im betroffenen Bereich das PC5 mit der α v-Integrinuntereinheit in glatten Gefäßmuskelzellen kolokalisierte.¹¹⁰ Die Betrachtung von Präparaten aus der humanen Arteria femoralis ergab, dass in einfachen atherosklerotischen Läsionen (Stary Typ 1), die durch Vermehrung von VSMCs in der Intima ohne Lipid- oder Makrophagenakkumulation gekennzeichnet sind, PC5 und Furin in den glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert werden. Mit dem Fortschreiten der Läsionen konnte PC5/Furin vermehrt auch in Makrophagen/Schaumzellen nachgewiesen werden.¹¹⁰ Im Tiermodell wurde mittels Immunhistologie und in situ Hybridisierung nach Gefäßverletzung in der Ratte bereits in der frühen Phase der Neointimaformation eine Expressionssteigerung von Vitronektin und seinen Bindungspartnern α v β 3- und α v β 5-Integrinen nachgewiesen.¹¹¹ Blockierende Antikörper, sowohl anti-Vitronektin als auch anti- α v β 3 und α v β 5, bewirkten eine signifikante Reduktion der Neointimadicke und der darin enthaltenen Zelldichte. In vitro Ergebnisse zeigen, dass die Migration der VSMCs durch die oben genannten blockierenden Antikörper inhibiert werden kann.¹¹¹ Auch in hyperlipämischen Kaninchen führte die Antikörperblockade der

Vitronektinrezeptoren zu einer Verminderung der Neointimaformation nach Gefäßverletzung.¹¹² Der hierbei benutzte monoklonale $\alpha v\beta 3$ -Antikörper Vitaxin reduzierte bei systemischer Gabe die gemessene Neointimadicke in den Versuchstieren. Gleichzeitig konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass die Apoptoserate der Gefäßwandzellen in den Vitaxin-behandelten Tieren höher war als in den unbehandelten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die $\alpha v\beta 3$ -Integrine vermittelten Signale auch antiapoptotische Wirkung haben können. Die Blockade der $\alpha v\beta 3$ -Integrine beeinflusst auch andere Zellen, die an der Entwicklung der Atherosklerose und Restenose beteiligt sind. XT199, ein selektiver (non-peptide) $\alpha v\beta 3$ -Inhibitor, verminderte die Infiltration der atherosklerotischen Läsionen durch Makrophagen und deren Neovaskularisation.¹¹³ Verstärkte Neovaskularisation und Infiltration der Läsionen mit Makrophagen sind Kennzeichen von instabilen Plaques.¹¹⁴

Blockade der αv -vermittelten Funktionen in VSMCs scheint die Progression der atherosklerotischen Läsionen und Neointimabildung nach therapeutischen Eingriffen günstig zu beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurde die wichtige Rolle von PC5 bei der proteolytischen Aktivierung der αv -Untereinheit in den glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte in vitro deutlich. Dieses Ergebnis macht die Proprotein Convertase PC5 zu einem interessanten Ziel für die Entwicklung selektiver pharmakologischer Inhibitoren, deren Einsatz bei der Behandlung der atherosklerotischen Erkrankung und zur Verhinderung von Restenose nach therapeutischen Eingriffen weiter erforscht werden sollte.

6. Zusammenfassung

PCs sind für die endoproteolytische Spaltung von zahlreichen Proproteinen, zu denen auch Integrine, EZM-Bestandteile und Peptidhormone gehören, während ihres Reifungsprozesses verantwortlich. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Regulation und Funktion der Proprotein Convertase PC5 in der primären Zellkultur von glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte.

Zunächst konnten mittels RT-PCR mRNA-Transkripte von Furin, PC7 und beiden Isoformen PC5A und PC5B in den kultivierten VSMCs nachgewiesen werden. Fluoreszenzmikroskopische Kolokalisationsstudien zeigten, dass das PC5 und Furin im TGN lokalisiert sind. Das TGN ist der Ort an dem die Proproteine im konstitutiven Proteinsekretionsweg durch die PCs endoproteolytisch gespalten und aktiviert werden. Die phänotypisch veränderten glatten Gefäßmuskelzellen sind die Hauptlieferanten der Bestandteile der EZM in atherosklerotisch veränderten Gefäßen. Steigerung der Proteinbiosynthese, die mit gesteigerter Aktivität der prozessierenden Enzyme verbunden sein muss, erfolgt unter Einwirkung von Hypertrophie- und Wachstumsfaktoren. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Proprotein Convertase PC5 in VSMCs selektiv durch das PDGF-BB und nicht durch Ang II hochreguliert wird. Furin und PC7 blieben von der Stimulation beider Zytokine unbeeinflusst. Untersuchungen der Zeitkinetik der PC5-Stimulation durch PDGF erbrachten einen signifikanten Anstieg des PC5 bereits nach 30 Min. Der PDGF-BB induzierte PC5-Anstieg konnte durch den PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin und noch stärker durch den mTOR/p70S6-Kinase Inhibitor Rapamycin reduziert werden. Der MAP-Kinase Inhibitor PD98059 konnte den PDGF bedingten PC5-Anstieg nicht vermindern.

Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen tragen zu der Entwicklung und Progression der Atherosklerose und Restenose nach therapeutischen Eingriffen bei. Die selektive Hemmung der Proprotein Convertase PC5 durch Antisense-Oligonukleotide verminderte die Adhäsion und Migration der VSMCs auf Vitronektin. Die FKS-induzierte Proliferation der VSMCs wurde durch die Anwendung der PC5-Antisense nicht beeinträchtigt. Bei der Adhäsion und Migration der Zellen spielen Integrine eine entscheidende Rolle. PC5-Antisense-Oligonukleotide verminderten die Prozessierung der α v-Integrinuntereinheit, die als Bestandteil der dimeren Integrinrezeptoren α v β 3 und α v β 5 als Hauptbindungspartner des Vitronektins in den VSMCs fungiert. Ausgehend von den dargestellten in vitro Ergebnissen in der primären Zellkultur der VSMCs, kann eine herausragende Rolle von PC5 bei der Aktivierung der α v-Integrinuntereinheit in vivo postuliert werden.

7. Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	alpha smooth muscle actin
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
Ang II	Angiotensin II
Arg	Arginin
asODNs	Antisense Oligonukleotide
AT ₁ -R, AT ₂ -R	Angiotensin II Rezeptor Subtyp 1 bzw. Subtyp 2
A.U.	arbitrary units
FKS	fetales Kälberserum
BFA	Brefeldin A
BNP	brain natriuretic peptid
bp	Basenpaare
BrdU	Brom-Deoxy-Uridin
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	copyDNA
CHO-cells	chinese hamster ovary Zellen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
Dec-RVKR-CMK	decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketone
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	desoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EBP	eIF binding protein
EGF	epidermal growth factor
EGF-R	epidermal growth factor receptor
eIF	eukaryonter Initiationsfaktor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	focal adhesion kinase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FKS / FCS	fetales Kälberserum / fetal calf serum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gp	Glykoprotein
HCL	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
IGF	insulin-like growth factor
Ile	Isoleucin
kDa	Kilodalton
K _i	Inhibitionskonstante
LDL	low density lipoprotein
β-LPH	β-Lipotropin
γ-LPH	γ-Lipotropin
LRP	Lipoprotein
Lys	Lysin
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (Erk1/2)
MEK	mitogen-activated or extracellular signal-regulated protein Kinase
MMP(s)	Matrix Metalloproteinase(n)
mRNA	messenger RNA
β-MSH	β-Melanotropin
MT-MMP-1	membrane type-MMP-1
NaCl	Natriumchlorid
NARC-1	neural apoptosis-regulated convertase 1
NGF	nerve growth factor
oxLDL	oxidiertes LDL
PACE4	paired basic amino acid converting enzyme 4
PBS	phosphate buffered saline
PC	Proprotein Convertase
PCR	polymerase chain reaction
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platelet derived growth factor
α1-PDX	α1-Antitrypsin-Portland
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIC, PIC2	Phosphatase Inhibitor Cocktail, Phosphatase Inhibitor Cocktail 2

PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POMC	Pro-Opiomelanokortin
Pro	Prolin
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
RER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RNA	ribonucleic acid
RNasin®	rekombinanter Säugetierinhibitor der RNase A und B
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction
scr.	scramble
SDS	Natriumdodecylsulfat
se.	Sense
SM-emb	embryonic isoform of smooth muscle myosin heavy chain
SM-MHC	smooth muscle isoform of myosin heavy chain
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine
Taq	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TGF- β	transforming growth factor β
TGN	<i>trans</i> -Golgi network
U/mL	Units pro Mililiter
Val	Valin
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMC(s)	vascular smooth muscle cell(s)

8. Literaturverzeichnis

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340(2):115-26.
2. Goff DC, Jr., Brass L, Braun LT, et al. Essential features of a surveillance system to support the prevention and management of heart disease and stroke: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Stroke, and Cardiovascular Nursing and the Interdisciplinary Working Groups on Quality of Care and Outcomes Research and Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease. *Circulation* 2007;115(1):127-55.
3. Stary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 1989;9(1 Suppl):I19-32.
4. Bhoday J, de Silva S, Xu Q. The molecular mechanisms of vascular restenosis: Which genes are crucial? *Curr Vasc Pharmacol* 2006;4(3):269-75.
5. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995;75(3):487-517.
6. Heldin CH. Simultaneous induction of stimulatory and inhibitory signals by PDGF. *FEBS Lett* 1997;410(1):17-21.
7. Hunter T. A thousand and one protein kinases. *Cell* 1987;50(6):823-9.
8. Rosenkranz S, Kazlauskas A. Evidence for distinct signaling properties and biological responses induced by the PDGF receptor alpha and beta subtypes. *Growth Factors* 1999;16(3):201-16.
9. Wilcox JN, Smith KM, Williams LT, Schwartz SM, Gordon D. Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *J Clin Invest* 1988;82(3):1134-43.
10. Rubin K, Tingstrom A, Hansson GK, et al. Induction of B-type receptors for platelet-derived growth factor in vascular inflammation: possible implications for development of vascular proliferative lesions. *Lancet* 1988;1(8599):1353-6.
11. Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1989;13(4):305-14.
12. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000;52(4):639-72.
13. Duff JL, Berk BC, Corson MA. Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;188(1):257-64.
14. Pelech SL, Sanghera JS. MAP kinases: charting the regulatory pathways. *Science* 1992;257(5075):1355-6.
15. Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(1):73-82.
16. Raught B, Gingras AC, Sonenberg N. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(13):7037-44.
17. Thyberg J, Blomgren K, Hedin U, Dryjski M. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res* 1995;281(3):421-33.
18. Libby P, Warner SJ, Salomon RN, Birinyi LK. Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth-muscle cells from human atheroma. *N Engl J Med* 1988;318(23):1493-8.

19. Aikawa M, Sivam PN, Kuro-o M, et al. Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis. *Circ Res* 1993;73(6):1000-12.
20. Reusch P, Wagdy H, Reusch R, Wilson E, Ives HE. Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1996;79(5):1046-53.
21. Raines EW. The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. *Int J Exp Pathol* 2000;81(3):173-82.
22. Abedi H, Zachary I. Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc Res* 1995;30(4):544-56.
23. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110(6):673-87.
24. Stawowy P, Fleck E. Proprotein convertases furin and PC5: targeting atherosclerosis and restenosis at multiple levels. *J Mol Med* 2005;83(11):865-75.
25. Juliano RL. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:283-323.
26. Mercurius KO, Morla AO. Inhibition of vascular smooth muscle cell growth by inhibition of fibronectin matrix assembly. *Circ Res* 1998;82(5):548-56.
27. Mogford JE, Davis GE, Platts SH, Meininger GA. Vascular smooth muscle alpha v beta 3 integrin mediates arteriolar vasodilation in response to RGD peptides. *Circ Res* 1996;79(4):821-6.
28. Morla AO, Mogford JE. Control of smooth muscle cell proliferation and phenotype by integrin signaling through focal adhesion kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272(1):298-302.
29. Stawowy P, Graf K, Goetze S, et al. Coordinated regulation and colocalization of alphav integrin and its activating enzyme proprotein convertase PC5 in vivo. *Histochem Cell Biol*, 2003; v. 119.
30. Matsuno H, Stassen JM, Vermeylen J, Deckmyn H. Inhibition of integrin function by a cyclic RGD-containing peptide prevents neointima formation. *Circulation* 1994;90(5):2203-6.
31. Lissitzky JC, Luis J, Munzer JS, et al. Endoproteolytic processing of integrin pro-alpha subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem J* 2000;346 Pt 1:133-8.
32. Steiner DF, Cunningham D, Spigelman L, Aten B. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* 1967;157(789):697-700.
33. Chretien M, Li CH. Isolation, purification, and characterization of gamma-lipotropic hormone from sheep pituitary glands. *Can J Biochem* 1967;45(7):1163-74.
34. Julius D, Brake A, Blair L, Kunisawa R, Thorner J. Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* 1984;37(3):1075-89.
35. Thomas G, Thorne BA, Thomas L, et al. Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science* 1988;241(4862):226-30.
36. Seidah NG, Chretien M. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* 1999;848(1-2):45-62.
37. Elagoz A, Benjannet S, Mammarbassi A, Wickham L, Seidah NG. Biosynthesis and cellular trafficking of the convertase SKI-1/S1P: ectodomain shedding requires SKI-1 activity. *J Biol Chem* 2002;277(13):11265-75.
38. Seidah NG, Prat A. The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med* 2007;85(7):685-96.

39. Zhou A, Webb G, Zhu X, Steiner DF. Proteolytic processing in the secretory pathway. *J Biol Chem* 1999;274(30):20745-8.
40. Lamango NS, Zhu X, Lindberg I. Purification and enzymatic characterization of recombinant prohormone convertase 2: stabilization of activity by 21 kDa 7B2. *Arch Biochem Biophys* 1996;330(2):238-50.
41. De Bie I, Marcinkiewicz M, Malide D, et al. The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. *J Cell Biol* 1996;135(5):1261-75.
42. Marcinkiewicz M, Day R, Seidah NG, Chretien M. Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(11):4922-6.
43. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 1997;16(3):303-6.
44. Jackson RS, Creemers JW, Farooqi IS, et al. Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest* 2003;112(10):1550-60.
45. Scamuffa N, Calvo F, Chretien M, Seidah NG, Khatib AM. Proprotein convertases: lessons from knockouts. *Faseb J* 2006;20(12):1954-63.
46. Zheng M, Streck RD, Scott RE, Seidah NG, Pintar JE. The developmental expression in rat of proteases furin, PC1, PC2, and carboxypeptidase E: implications for early maturation of proteolytic processing capacity. *J Neurosci* 1994;14(8):4656-73.
47. Roebroek AJ, Umans L, Pauli IG, et al. Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* 1998;125(24):4863-76.
48. Roebroek AJ, Taylor NA, Louagie E, et al. Limited redundancy of the proprotein convertase furin in mouse liver. *J Biol Chem* 2004;279(51):53442-50.
49. Bassi DE, Mahloogi H, Klein-Szanto AJ. The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression. *Mol Carcinog* 2000;28(2):63-9.
50. Takumi I, Steiner DF, Sanno N, Teramoto A, Osamura RY. Localization of prohormone convertases 1/3 and 2 in the human pituitary gland and pituitary adenomas: analysis by immunohistochemistry, immunoelectron microscopy, and laser scanning microscopy. *Mod Pathol* 1998;11(3):232-8.
51. Khatib AM, Siegfried G, Chretien M, Metrakos P, Seidah NG. Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am J Pathol* 2002;160(6):1921-35.
52. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 1995;375(6528):244-7.
53. Tetu B, Brisson J, Lapointe H, Bernard P. Prognostic significance of stromelysin 3, gelatinase A, and urokinase expression in breast cancer. *Hum Pathol* 1998;29(9):979-85.
54. Stawowy P, Margeta C, Kallisch H, et al. Regulation of matrix metalloproteinase MT1-MMP/MMP-2 in cardiac fibroblasts by TGF-beta1 involves furin-convertase. *Cardiovasc Res* 2004;63(1):87-97.
55. Khatib AM, Siegfried G, Prat A, et al. Inhibition of proprotein convertases is associated with loss of growth and tumorigenicity of HT-29 human colon carcinoma cells: importance of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor processing in IGF-1-mediated functions. *J Biol Chem* 2001;276(33):30686-93.
56. Sawada Y, Inoue M, Kanda T, et al. Co-elevation of brain natriuretic peptide and proprotein-processing endoprotease furin after myocardial infarction in rats. *FEBS Lett* 1997;400(2):177-82.

57. Sawada Y, Suda M, Yokoyama H, et al. Stretch-induced hypertrophic growth of cardiocytes and processing of brain-type natriuretic peptide are controlled by proprotein-processing endoprotease furin. *J Biol Chem* 1997;272(33):20545-54.
58. Negishi M, Lu D, Zhang YQ, et al. Upregulatory expression of furin and transforming growth factor-beta by fluid shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(5):785-90.
59. Denault JB, D'Orleans-Juste P, Masaki T, Leduc R. Inhibition of convertase-related processing of proendothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;26 Suppl 3:S47-50.
60. Mercure C, Jutras I, Day R, Seidah NG, Reudelhuber TL. Prohormone convertase PC5 is a candidate processing enzyme for prorenin in the human adrenal cortex. *Hypertension* 1996;28(5):840-6.
61. Stawowy P, Marcinkiewicz J, Graf K, et al. Selective expression of the proprotein convertases furin, pc5, and pc7 in proliferating vascular smooth muscle cells of the rat aorta in vitro. *J Histochem Cytochem* 2001;49(3):323-32.
62. Fugere M, Day R. Cutting back on pro-protein convertases: the latest approaches to pharmacological inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26(6):294-301.
63. Basak A, Lazure C. Synthetic peptides derived from the prosegments of proprotein convertase 1/3 and furin are potent inhibitors of both enzymes. *Biochem J* 2003;373(Pt 1):231-9.
64. Decroly E, Wouters S, Di Bello C, Lazure C, Ruyschaert JM, Seidah NG. Identification of the paired basic convertases implicated in HIV gp160 processing based on in vitro assays and expression in CD4(+) cell lines. *J Biol Chem* 1996;271(48):30442-50.
65. Jean F, Stella K, Thomas L, et al. alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(13):7293-8.
66. Cameron A, Appel J, Houghten RA, Lindberg I. Polyarginines are potent furin inhibitors. *J Biol Chem* 2000;275(47):36741-9.
67. Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 1979;59(1):1-61.
68. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1995;270(46):27489-94.
69. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 2000;351(Pt 1):95-105.
70. Law RE, Meehan WP, Xi XP, et al. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest* 1996;98(8):1897-905.
71. Lebedeva I, Stein CA. Antisense oligonucleotides: promise and reality. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:403-19.
72. Crum C, Johnson JD, Nelson A, Roth D. Complementary oligodeoxynucleotide mediated inhibition of tobacco mosaic virus RNA translation in vitro. *Nucleic Acids Res* 1988;16(10):4569-81.
73. Walder RY, Walder JA. Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(14):5011-5.
74. Bennett CF, Chiang MY, Chan H, Shoemaker JE, Mirabelli CK. Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol* 1992;41(6):1023-33.
75. Pickering JG, Isner JM, Ford CM, et al. Processing of chimeric antisense oligonucleotides by human vascular smooth muscle cells and human atherosclerotic plaque. Implications for antisense therapy of restenosis after angioplasty. *Circulation* 1996;93(4):772-80.

76. Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Bonifacino JS, Klausner RD. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 1989;56(5):801-13.
77. Xiang Y, Molloy SS, Thomas L, Thomas G. The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments. *Mol Biol Cell* 2000;11(4):1257-73.
78. Kingsley K, Huff JL, Rust WL, et al. ERK1/2 mediates PDGF-BB stimulated vascular smooth muscle cell proliferation and migration on laminin-5. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293(3):1000-6.
79. Stawowy P, Blaschke F, Kilimnik A, et al. Proprotein convertase PC5 regulation by PDGF-BB involves PI3-kinase/p70(s6)-kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 2002;39(2 Pt 2):399-404.
80. Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987;326(6112):515-7.
81. Tanner FC, Meier P, Greutert H, Champion C, Nabel EG, Luscher TF. Nitric oxide modulates expression of cell cycle regulatory proteins: a cytostatic strategy for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 2000;101(16):1982-9.
82. Suzuki S, Argraves WS, Pytela R, et al. cDNA and amino acid sequences of the cell adhesion protein receptor recognizing vitronectin reveal a transmembrane domain and homologies with other adhesion protein receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(22):8614-8618.
83. Berthet V, Rigot V, Champion S, et al. Role of endoproteolytic processing in the adhesive and signaling functions of alphavbeta5 integrin. *J Biol Chem* 2000;275(43):33308-13.
84. Takasaki Y, Deng JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. *J Exp Med* 1981;154(6):1899-909.
85. Berk BC, Corson MA. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res* 1997;80(5):607-16.
86. Stawowy P, Kallisch H, Veinot JP, et al. Endoproteolytic activation of alpha(v) integrin by proprotein convertase PC5 is required for vascular smooth muscle cell adhesion to vitronectin and integrin-dependent signaling. *Circulation* 2004;109(6):770-6.
87. Dubois CM, Blanchette F, Laprise MH, Leduc R, Grondin F, Seidah NG. Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol* 2001;158(1):305-16.
88. Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, et al. Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 1990;10(4):1492-7.
89. Frederick TJ, Min J, Altieri SC, Mitchell NE, Wood TL. Synergistic induction of cyclin D1 in oligodendrocyte progenitor cells by IGF-I and FGF-2 requires differential stimulation of multiple signaling pathways. *Glia* 2007;55(10):1011-22.
90. Duan C, Bauchat JR, Hsieh T. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* 2000;86(1):15-23.
91. Kundra V, Escobedo JA, Kazlauskas A, et al. Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor-beta. *Nature* 1994;367(6462):474-6.
92. Graf K, Xi XP, Yang D, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1997;29(1 Pt 2):334-9.
93. Martin KA, Rzucidlo EM, Merenick BL, et al. The mTOR/p70 S6K1 pathway regulates vascular smooth muscle cell differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286(3):C507-17.
94. Serruys PW, Regar E, Carter AJ. Rapamycin eluting stent: the onset of a new era in interventional cardiology. *Heart* 2002;87(4):305-7.

95. Wood SA, Park JE, Brown WJ. Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes. *Cell* 1991;67(3):591-600.
96. Wouters S, Leruth M, Decroly E, et al. Furin and proprotein convertase 7 (PC7)/lymphoma PC endogenously expressed in rat liver can be resolved into distinct post-Golgi compartments. *Biochem J* 1998;336 (Pt 2):311-6.
97. Rothenberg ME, Eilertson CD, Klein K, Mackin RB, Noe BD. Evidence for redundancy in propeptide/prohormone convertase activities in processing proglucagon: an antisense study. *Mol Endocrinol* 1996;10(4):331-41.
98. Konda Y, Yokota H, Kayo T, et al. Proprotein-processing endoprotease furin controls the growth and differentiation of gastric surface mucous cells. *J Clin Invest* 1997;99(8):1842-51.
99. Stawowy P, Kallisch H, Kilimnik A, et al. Proprotein convertases regulate insulin-like growth factor 1-induced membrane-type 1 matrix metalloproteinase in VSMCs via endoproteolytic activation of the insulin-like growth factor-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321(3):531-8.
100. Delafontaine P, Lou H, Alexander RW. Regulation of insulin-like growth factor I messenger RNA levels in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1991;18(6):742-7.
101. Juliano RL, Reddig P, Alahari S, Edin M, Howe A, Aplin A. Integrin regulation of cell signalling and motility. *Biochem Soc Trans* 2004;32(Pt3):443-6.
102. Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol* 1994;14(3):1680-8.
103. Chen HC, Guan JL. Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(21):10148-52.
104. Lin TH, Aplin AE, Shen Y, et al. Integrin-mediated activation of MAP kinase is independent of FAK: evidence for dual integrin signaling pathways in fibroblasts. *J Cell Biol* 1997;136(6):1385-95.
105. Delwel GO, Hogervorst F, Sonnenberg A. Cleavage of the alpha6A subunit is essential for activation of the alpha6Abeta1 integrin by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem* 1996;271(13):7293-6.
106. Kolodziej MA, Vilaire G, Gonder D, Poncz M, Bennett JS. Study of the endoproteolytic cleavage of platelet glycoprotein IIb using oligonucleotide-mediated mutagenesis. *J Biol Chem* 1991;266(34):23499-504.
107. Deryugina EI, Ratnikov BI, Postnova TI, Rozanov DV, Strongin AY. Processing of integrin alpha(v) subunit by membrane type 1 matrix metalloproteinase stimulates migration of breast carcinoma cells on vitronectin and enhances tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2002;277(12):9749-56.
108. Hoshiga M, Alpers CE, Smith LL, Giachelli CM, Schwartz SM. Alpha-v beta-3 integrin expression in normal and atherosclerotic artery. *Circ Res* 1995;77(6):1129-35.
109. Dufourcq P, Louis H, Moreau C, et al. Vitronectin expression and interaction with receptors in smooth muscle cells from human atheromatous plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18(2):168-76.
110. Stawowy P, Kallisch H, Borges Pereira Stawowy N, et al. Immunohistochemical localization of subtilisin/kexin-like proprotein convertases in human atherosclerosis. *Virchows Arch* 2005;446(4):351-9.
111. Dufourcq P, Couffignal T, Alzieu P, et al. Vitronectin is up-regulated after vascular injury and vitronectin blockade prevents neointima formation. *Cardiovasc Res* 2002;53(4):952-62.
112. Coleman KR, Braden GA, Willingham MC, Sane DC. Vitaxin, a humanized monoclonal antibody to the vitronectin receptor (alphavbeta3), reduces neointimal hyperplasia and total vessel area after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits. *Circ Res* 1999;84(11):1268-76.

113. Bishop GG, McPherson JA, Sanders JM, et al. Selective alpha(v)beta(3)-receptor blockade reduces macrophage infiltration and restenosis after balloon angioplasty in the atherosclerotic rabbit. *Circulation* 2001;103(14):1906-11.
114. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362(6423):801-9.

9. Danksagung

Herrn PD Dr. med. P. Stawowy danke ich für die Überlassung des Dissertationsthema, seine ständige Diskussionsbereitschaft, unermüdliche Motivationskraft und wichtige Ratschläge während der Laborarbeit und später bei der Erstellung der Arbeit. Bei Herrn Prof. Dr. med. E. Fleck möchte ich mich für die Schaffung der geeigneten Rahmenbedingungen für die Durchführung der wissenschaftlichen Untersuchungen bedanken.

Den Mitarbeiterinnen des Forschungslabors im Deutschen Herzzentrum Berlin, insbesondere Frau Dipl. Ing. Heike Mayborg, danke ich für wertvolle Hilfestellungen in labortechnischen Fragen. Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Frau für ihre moralische Unterstützung während der langen Versuchsphase und bei der Erstellung der Arbeit bedanken. Meiner Tochter und meinem Sohn danke ich für die schönen Spielpausen in der Schreibphase.

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. Publikationsliste

Die in der vorliegenden Dissertation aufgeführten Ergebnisse sind zuvor teilweise auf Kongressen vorgetragen sowie in wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert worden.

Ein Hinweis entsprechend der Dissertationsordnung erfolgte beim Promotionsbüro.

Publikationen:

1. Stawowy P, Blaschke F, Kilimnik A, Goetze S, Kallisch H, Chrétien M, Marcinkiewicz M, Fleck E, Graf K. Proprotein convertase PC5 regulation by PDGF-BB involves PI3-kinase/p70^{s6}-kinase activation in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 2002; 39:399-404.
2. Stawowy P, Kallisch H, Veinot JP, Kilimnik A, Prichett W, Goetze S, Seidah NG, Chrétien M, Fleck E, Graf K. Endoproteolytic activation of αv integrin by proprotein convertase PC5 is required for vascular smooth muscle cell adhesion to vitronectin and integrin-dependent signaling. *Circulation*. 2004;109:770-776.
3. Stawowy P, Kallisch H, Kilimnik A, Margeta C, Seidah NG, Chrétien M, Fleck E, Graf K. Proprotein convertases regulate insulin-like growth factor 1-induced membrane-type 1 matrix metalloproteinase in VSMCs via endoproteolytic activation of the insulin-like growth factor-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;321:531-538.

Abstracts:

1. Stawowy P, Blaschke F, Kilimnik A, Bruemmer D, Graf K, Seidah NG, Chrétien M, Marcinkiewicz M, Fleck E. Regulation von Proprotein Convertase PC5 und Integrin αv nach Ballon-Verletzung in vivo. *Z Kardiol*. 2001;90(Supp.2):155.
2. Stawowy P, Blaschke F, Kilimnik A, Goetze S, Wollert-Wulf B, Seidah NG, Chrétien M, Fleck E, Marcinkiewicz M, Graf K. Differential regulation of the proprotein convertase PC5 in VSMCs by PDGF-BB and angiotensin II and its expression during arterial remodeling. *Hypertension*. 2001;38(Suppl.1):504.
3. Stawowy P, Blaschke F, Kilimnik A, Goetze S, Wollert-Wulf B, Chrétien M, Seidah NG, Marcinkiewicz M, Fleck E, Graf K. Growth factors regulate the proprotein convertase PC5, which is required for VSMC proliferation. *Circulation*. 2001;104(Suppl. II):225.
4. Stawowy P, Kilimnik A, Blaschke F, Goetze S, Kallisch H, Schmidt G, Chrétien M, Fleck E, Graf K. Rapamycin hemmt die PDGF-induzierte PC5 Expression in VSMCs. *Z Kardiol*. 2002;91(Supp.1):186.

5. Stawowy P, Kilimnik A, Goetze S, Kallisch H, Margeta C, Roser M, Chrétien M, Fleck E, Graf K. Aktivierung von α_v Integrin durch Proprotein Convertase PC5 ist notwendig für die VSMC Adhäsion und Integrin-abhängige Signaltransduktion. *Z Kardiol.* 2003;92 (Supp.1):249.

Vortrag:

1. Adam Kilimnik: „Growth Factors regulate the Proprotein Convertase PC5, which is required for VSMC proliferation” auf dem 12th European Students Conference for Medical Students, Scientists and Doctors, Charité, Berlin 2001, Abstract book 12th European Students’ Conference, Berlin 2001, p.56

12. Erklärung

„Ich, Adam Kilimnik, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Regulation und Funktion der Proprotein Convertase PC5 in glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 04.10.2009

Unterschrift