

**Hochmolekulares Kininogen – ein neuartiger
Faktor in der Regulation der Apoptose von
glatten Gefäßmuskelzellen**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades des Doktors
der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Eingereicht am Fachbereich Chemie, Biologie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von

Nicole Dörfel

aus Berlin

Juli 2007

1. Gutacher: Prof. Dr. Thomas Unger

2. Gutachter: Prof. Dr. Burkhard Kleuser

Disputation am 30. Juli 2007

Danksagung

Für die Planung und Durchführung von molekularbiologischen und zellexperimentellen Versuchen ist neben einer hervorragenden Laborausstattung ein hohes Maß an Expertise und Erfahrung erforderlich.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Unger für sein entgegengebrachtes Vertrauen bei der Überlassung und Durchführung dieses Projektes und seine exzellente Betreuung bedanken.

Desweiteren gilt mein tiefempfundener Dank meiner direkten Betreuerin Frau Dr. Elena Kaschina für ihre Hilfsbereitschaft, ihr stets freundschaftliches Verhältnis und die Bereitschaft, ihre Erfahrungen mit mir zu teilen.

Bei Herrn Prof. Kleuser möchte ich mich herzlichst für seine Bereitschaft bedanken, auch sehr kurzfristig meine Betreuung der Arbeit am Fachbereich Pharmazie der Freien Universität Berlin übernommen zu haben. Gleichmaßen gilt mein Dank Herrn Prof. Borchert, dem ich hiermit die besten Genesungswünsche übermitteln möchte.

Die Mitglieder der Arbeitsgruppe Unger waren mir während meiner Zeit am CCR eine große Unterstützung und kreierte ein angenehmes, stets positives Arbeitsklima. Ich möchte besonderen Dank an Manuela und Melanie, für ihre anfängliche experimentelle Unterstützung, an Kristin, Jan, Jens und Heiko, für ihre ständige Hilfsbereitschaft bei schwierigen Fragestellungen, und an Uwe, für den regen Gedankenaustausch über unser kleines Projekt, aussprechen.

Ebenso gilt mein herzlichster Dank meinen Eltern, meiner Schwester und Steffen, die mich über den gesamten Zeitraum unterstützt und zusammen mit meinen Freunden einen erholsamen Gegenpol zu meiner wissenschaftlichen Arbeit geschaffen haben. Ein extra Dankeschön möchte ich gegenüber Kristin, Cindy und Gunnar aussprechen.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei Lucas bedanken, der mir während meiner gesamten akademischen Laufbahn sowohl im privaten als auch wissenschaftlichen Alltag unterstützend und mit regem Ideenaustausch zur Seite stand.

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1.	APOPTOSE	1
1.1.1.	CASPASEN – AUFBAU, WIRKUNG UND AKTIVIERUNG	1
1.1.2.	DIE EXTRINSISCHE APOPTISCHE KASKADE	4
1.1.3.	FAS UND FASLIGAND – SCHLÜSSEL UND SCHLOß ZUR EXTRINSISCHEN APOPTOTISCHEN KASKADE.....	6
1.1.4.	STICKSTOFFOXID - INVOLVIERUNG IN APOPTOTISCHEN MECHANISMEN	7
1.1.5.	DIE INTRINSISCHE APOPTOTISCHE KASKADE.....	8
1.1.6.	DIE BCL-2 FAMILIE – MIT- UND GEGENSPIELER DER INTRINSISCHEN APOPTOTISCHEN KASKADE.....	9
1.1.7.	DIE PHYSIOLOGISCHEN CYSTEIN-PROTEASEN-INHIBITOREN	12
1.2.	KININOGEN	14
1.3.	VASKULÄRE GLATTE GEFÄßMUSKELZELLEN.....	17
1.3.1.	DAS ABDOMINELLE AORTENANEURYSMA	19
1.4.	DAS BN-BN/KA-RATTENMODELL	22
1.5.	HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG.....	22
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1.	MATERIAL.....	24
2.1.1.	CHEMIKALIEN UND SUBSTANZEN.....	24
2.1.2.	KITS	25
2.1.3.	NUKLEINSÄUREN UND NUKLEOTIDE	25
2.1.4.	MOLEKULARGEWICHTSMARKER	27
2.1.5.	RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN UND MODIFIZIERENDE ENZYME	28
2.1.6.	ANTIKÖRPER	28
2.1.7.	MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE KULTUR EUKARYOTISCHER ZELLEN.....	29
2.1.8.	VERSUCHSTIERE, BAKTERIEN UND ZELLINIEN	29
2.1.9.	AUSGEWÄHLTE GERÄTE UND ZUSATZMATERIALIEN.....	30
2.1.10.	MEDIEN FÜR DIE PRODUKTION KOMPETENTER <i>E.COLI</i> -STÄMME UND TRANSFORMATION	31
2.1.11.	PUFFER UND LÖSUNGEN.....	32

2.2.	METHODEN	33
2.2.1.	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	33
2.2.1.1.	Isolation von mRNA	33
2.2.1.2.	Kontrolle der mRNA-Qualität	33
2.2.1.3.	RT-Reaktion zur cDNA-Synthese	34
2.2.1.4.	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
2.2.1.5.	Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.1.6.	Real-Time PCR (quantitative PCR)	37
2.2.1.7.	Restriktion von DNA	41
2.2.1.8.	Ligation von DNA	43
2.2.1.9.	Herstellung kompetenter <i>E.coli</i>	43
2.2.1.10.	Transformation kompetenter <i>E.coli</i>	44
2.2.1.11.	Präparation von Plasmid-DNA	44
2.2.1.12.	DNA-Sequenzierung	44
2.2.2.	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	44
2.2.2.1.	Proteinisolation aus kultivierten Zellen	44
2.2.2.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	45
2.2.2.3.	Western Blotting	45
2.2.2.4.	Aktivitätsbestimmung von Proteinen	47
2.2.2.5.	Immunzytofluoreszenz	47
2.2.2.6.	Apoptotischer Index	48
2.2.2.7.	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	49
2.2.3.	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	50
2.2.3.1.	Isolierung von primären VSMC aus Aorten von Ratten	50
2.2.3.2.	Zellkultivierung von primären VSMC aus Rattenaorten	51
2.2.3.3.	Kultivierung von primären humanen glatten Gefäßmuskelzellen	52
2.2.3.4.	Apoptoseinduktion in VSMC	52
2.2.3.5.	Stimulation von VSMC mit Kininogen	53
2.2.3.6.	Transiente Transfektion von adhärenen Zellkulturen	53
2.2.3.7.	Kryokonservierung von Zellen	54
2.2.4.	STATISTISCHE BERECHNUNGEN	55
3.	ERGEBNISSE	56

3.1.	ETABLIERUNG DER VSMC PRIMÄRZELLKULTUR AUS RATTENAORTEN ...	56
3.2.	ETABLIERUNG EINES PHYSIOLOGISCHEN STIMULATIONS-PROTOKOLL DER APOPTOSE IN VSMC	57
3.3.	HMWK INHIBIERT DIE AKTIVIERUNG VON CASPASE-3	60
3.4.	HMWK REDUZIERT DEN APOPTOTISCHEN INDEX	63
3.5.	HMWK REDUZIERT DIE AKTIVITÄT VON CASPASE-8	67
3.6.	KEINE REGULATORISCHER EFFEKT AUF DEN FAS-REZEPTOR DURCH APOPTOSE UND HMWK.....	69
3.7.	HMWK INHIBIERT DIE AKTIVIERUNG VON CASPASE-9 UND DIE FREISETZUNG VON CYTOCHROM C	70
3.8.	HMWK INHIBIERT DIE FREISETZUNG VON CATHEPSIN B	73
3.9.	HMWK STIMULIERT BCL-X_L ABER NICHT BCL-2	76
3.10.	HMWK AKTIVIERT 42/44-MAPK	78
3.11.	BASALE UND STIMULIERBARE UNTERSCHIEDE IN DER MRNA VON CASPASE-3, CATHEPSIN B UND BCL-X_L.....	79
3.12.	KEINE ENDOGENE HMWK MRNA EXPRESSION IN VSMC	83
3.13.	INHIBIERUNG DER APOPTOSE DURCH DIE TRANSFEKTION VON VSMC ZUR ENDOGENEN HMWK-PRODUKTION	88
3.14.	ZELLULÄRE AUFNAHME VON HMWK IN VSMC	91
3.14.1.	ZEITABHÄNGIGE ZELLULÄRE AUFNAHME VON HMWK.....	91
3.14.2.	IRREVERSIBILITÄT DER ZELLULÄREN AUFNAHME VON HMWK	99
3.14.3.	KEINE BLOCKIERUNG DER AUFNAHME VON HMWK DURCH ENDOZYTÖSE-INHIBITOR	100
3.14.4.	KOLOKALISATION VON HMWK MIT AKTIVEN APOPTOTISCHEN PROTEASEN	102
4.	DISKUSSION.....	105
4.1.	DIE AUSWAHL DER ZELLMODELLE	106
4.2.	DAS APOPTOSEINDUKTIONS-MODELL.....	107
4.3.	KONZENTRATIONSABHÄNGIGER INHIBITORISCHER EFFEKT VON HMWK AUF DIE APOPTOSE	109
4.4.	EINFLUSS VON HMWK AUF DIE EXTRINSISCHE UND INTRINSISCHE APOPTOTISCHE KASKADE.....	110

4.5.	INVOLVIERUNG VON HMWK IN ANTI-APOPTOTISCHEN SIGNALWEGEN .	112
4.6.	MRNA EXPRESSION VON APOPTOTISCHEN SCHLÜSSELPROTEINEN UND BASALE UNTERSCHIEDE IN VSMC VON BN UND BN/KA.....	115
4.7.	ENDOGENE HMWK EXPRESSION IN VSMC	117
4.8.	ZELLULÄRE AUFNAHME VON HMWK UND MÖGLICHER INTERAKTIONSMCHANISMUS	118
4.9.	AUSBLICK UND MÖGLICHE THERAPEUTISCHE ANSÄTZE	119
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	124
6.	ABSTRACT.....	126
7.	LITERATURVERZEICHNIS	127
8.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	141
9.	CURRICULUM VITAE	145

Abkürzungsverzeichnis

AAA	abdominelles Aortenaneurysma
AI	Apoptoseinduktion
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor-1</i>
BN	Brown Norway
BN/Ka	Brown Norway/ Katholiek
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
DD	<i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DISC	<i>death-inducing signalling complex</i>
EC	Endothelzellen
ECM	extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
eNOS	endotheliale Stickstoffoxid-Synthase
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FasL	Fas Ligand
FBS	fetales bovines Serum
HMWK	hochmolekulares Kininogen (<i>high molecular weight kininogen</i>)
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-1	Interleukin-1
iNOS	induzierbare Stickstoffoxid-Synthase
LMWK	niedermolekulares Kininogen (<i>low molecular weight kininogen</i>)
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	Monozyten-chemotaktisches Protein-1 (<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
nNOS	neuronale Stickstoffoxid-Synthase
P/S	Penicillin/ Streptomycin
RAS	Renin-Angiotensin-System
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

SNP	Sodium-Nitroprussid
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
VSMC	glatte Gefäßmuskelzellen (<i>vascular smooth muscle cells</i>)