

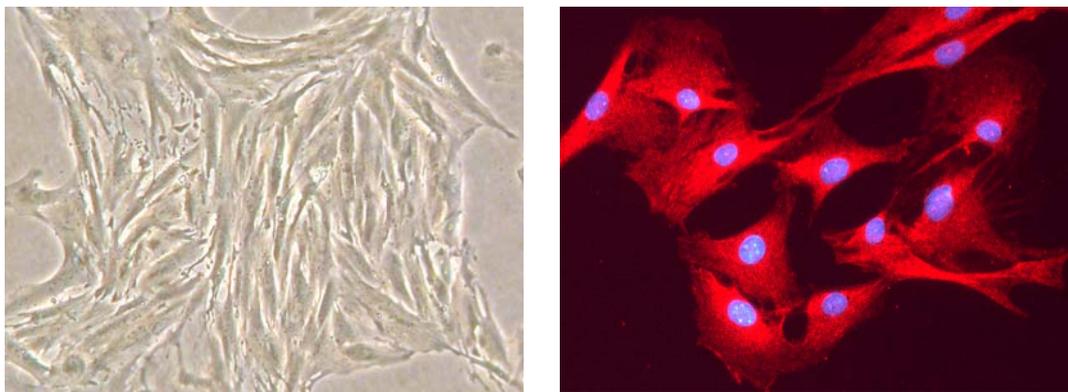
### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Etablierung der VSMC Primärzellkultur aus Rattenaorten**

Als Grundlage der in Folge beschriebenen Ergebnisse diente die Untersuchung der apoptotischen Vorgänge in VSMC. Diese Zellen nehmen eine zentrale Stellung bei der Pathogenese von vaskulären Erkrankungen ein (siehe 1.3).

Um die (patho-) physiologischen Vorgänge in VSMC besonders hinsichtlich des BN/Ka-Rattenmodells besser verstehen zu können, bestand die erste Aufgabe darin, eine Isolierungsmethode für primäre VSMC aus den Aorten von Ratten zu etablieren. Dafür wurde die Enzymverdau-Methode gewählt (siehe 2.2.3.1), welche eine anerkannte Methode zur Isolierung von VSMC darstellt. Für die Isolierung reiner VSMC-Kulturen ist es wichtig, alle anderen vorhandenen Zelltypen der Aorta, hauptsächlich Fibroblasten der Adventitia und Endothelzellen der Intima, zu entfernen. Da Endothelzellen sehr anspruchsvoll hinsichtlich ihrer Kultivierung sind, d.h. sie benötigen spezielle beschichtete Kulturflaschen und spezielles Wachstumsmedium, bestand bei der angewandten Isolierungsmethode und Kulturbedingungen keine Gefahr der Kontamination mit Endothelzellen. Die Fibroblasten allerdings ließen sich schon unter einfachen Bedingungen kultivieren, so dass der erste wichtige Schritt bei der Isolierung von VSMC die vollständige Entfernung der Adventitia und somit der Fibroblasten darstellte. Obwohl sich die Adventitia vom glatten Muskelschlauch im thorakalen Bereich sehr leicht entfernen lässt, ist sie im abdominellen Teil stärker mit der Media assoziiert und es war zunächst ein Kollagenase-Vorverdau nötig, um diese Verbindungen zu lockern und die Adventitia zu entfernen. Die so erhaltenen Muskelschlauchstücke wurden nachfolgend über Nacht in Wachstumsmedium mit hohem Serumanteil inkubiert, was die Zellausbeute erhöhte. Am nächsten Tag erfolgte dann der Enzymverdau mit Kollagenase und Elastase, um die VSMC aus ihrer Matrix freizusetzen. Dabei war die angewandte Elastase-Enzymkonzentration von entscheidender Bedeutung, da eine zu hohe Konzentration die Zellen sehr schnell schädigte, eine niedrigere Konzentration allerdings eine längere Verdauzeit bedingte, was wiederum zu einer schlechten Zellausbeute führte. Für eine höhere Überlebensrate der VSMC wurden die ersten beiden Passagen auf Wachstumsmedium mit hohem

Serumanteil (20 % FBS) gehalten, der nachfolgend gesenkt wurde. Die Identität und Reinheit der Kulturen wurde mittels der für VSMC spezifischen  $\alpha$ -smooth muscle Aktin-Färbung überprüft (Abbildung 3.1). Für die nachfolgenden Experimente wurden die Passagen 3 bis 7 verwendet.



**Abbildung 3.1: Vaskuläre glatte Gefäßmuskelzellen.**

Nachweis des VSMC-Markers  $\alpha$ -smooth muscle Aktin in der primären Zellkultur mittels Immunfluoreszenz. Darstellung links VSMC im Phasenkontrast (Vergrößerung x10) und rechts nach Immunfärbung mit einem spezifischen  $\alpha$ -smooth muscle Aktin-Antikörper (rot) und Zellkernfärbung mit Hoechst 33324 (blau) (Vergrößerung x20).

Bereits bei der Aufarbeitung der Aorten konnte ein Unterschied der Fragilität der Media zwischen den Rattenstämmen mit der Reihenfolge Wistar < BN < BN/Ka beobachtet werden, die sich in einem geringeren Widerstand gegenüber Zugkräften äußerte. In der Zellkultur war kein Unterschied zwischen den VSMC der verschiedenen Stämme erkennbar.

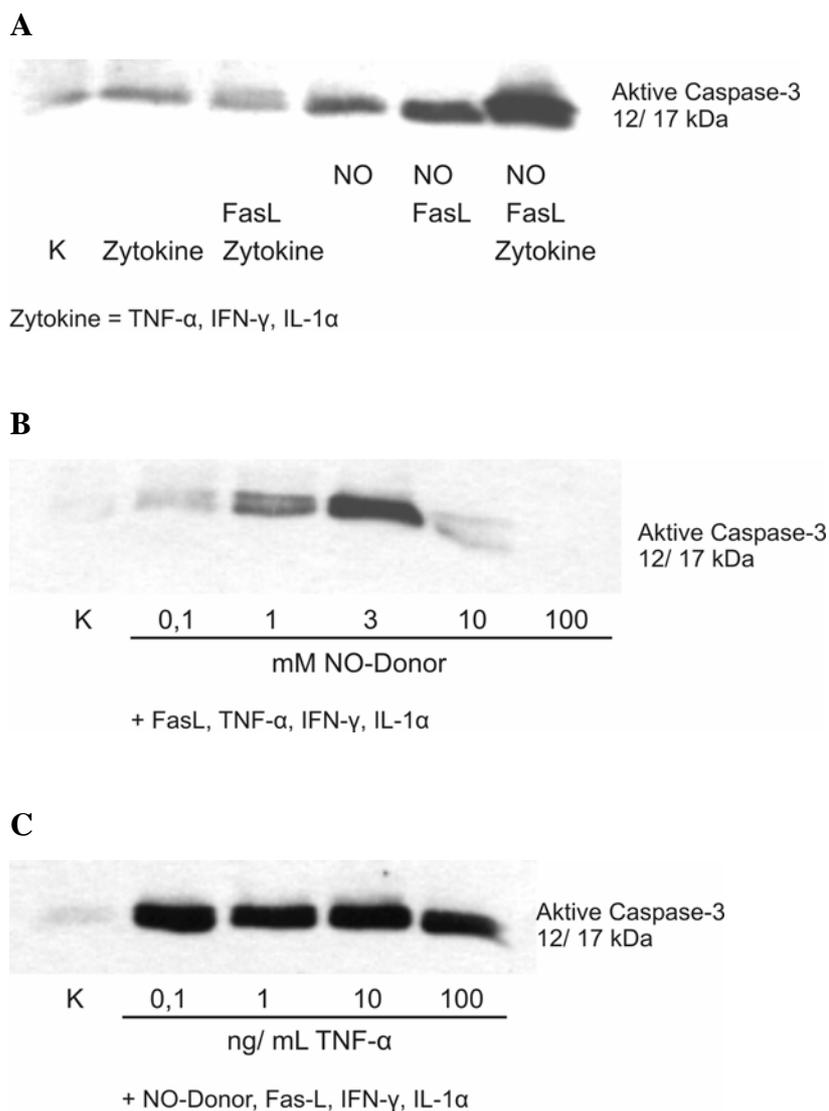
### **3.2. Etablierung eines physiologischen Stimulationsprotokoll der Apoptose in VSMC**

Die Apoptose einer Zelle führt am Ende immer zu deren Zelltod, jedoch lösen unterschiedliche Stimulantien verschiedene apoptotische Signalwege innerhalb der Zelle aus. Klassischerweise werden zur Induktion der Apoptose *in vitro* immer noch zytotoxische Substanzen, wie Cycloheximid oder Staurosporine, angewendet. Allerdings ist bei einem solchen Induktionsmodell keine Übereinstimmung mit den *in*

*in vivo* Bedingungen gewährleistet. Um die pathologischen Vorgänge des AAA möglichst genau *in vitro* nachzustellen, musste ein physiologisches Apoptoseinduktions-Mittel etabliert werden. Bisher ist der genaue Auslöser der Apoptose von VSMC im AAA noch nicht bekannt. Aufgrund der bisherigen Datenlage von aneurysmatischen Gewebeuntersuchungen unserer eigenen Studie als auch anderer Arbeitsgruppen, wurden NO, FasL und die Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 als wichtige Mediatoren herausgestellt.

Zunächst wurden VSMC aus Wistar-Ratten verwendet, um eventuelle Effekte durch pathologische Veränderungen in VSMC von BN und BN/Ka auszuschließen. Die Zellen wurden nach 24 h Hungermedium für 16 h mit den jeweiligen Substanzen stimuliert. Die isolierten Proteine wurden nach der Konzentrationsbestimmung mittels Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, um dann mit Hilfe spezifischer Antikörper im Western Blot das Vorhandensein von aktiver Caspase-3 nachzuweisen (Abbildung 3.2).

Vorangegangene Untersuchungen mit FasL ergaben keine Induktionsfähigkeit dieses Faktors alleine. Ebenfalls konnte auch entgegen anderer *in vitro*-Studien in VSMC mit den Zytokinen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-1 keine Apoptose induziert werden.<sup>58</sup> Durch die Zugabe von NO mittels Natrium-Nitroprussid (SNP) als NO-Donor, wurde die aktivierte Form von Caspase-3 detektiert, welches durch Zugabe von FasL und den Zytokinen weiter gesteigert werden konnte (Abbildung 3.2 A). Die optimale Konzentration von SNP wurde durch eine Konzentrationsreihe bestimmt (Abbildung 3.2 B). Ebenfalls wurde die Konzentration von TNF- $\alpha$  variiert, welches aber keine Unterschiede bezüglich der Aktivierung von Caspase-3 zeigte (Abbildung 3.2 C).



**Abbildung 3.2: Konzentrationsabhängiger und substanzabhängiger Effekt auf die Apoptoseinduktion in VSMC.**

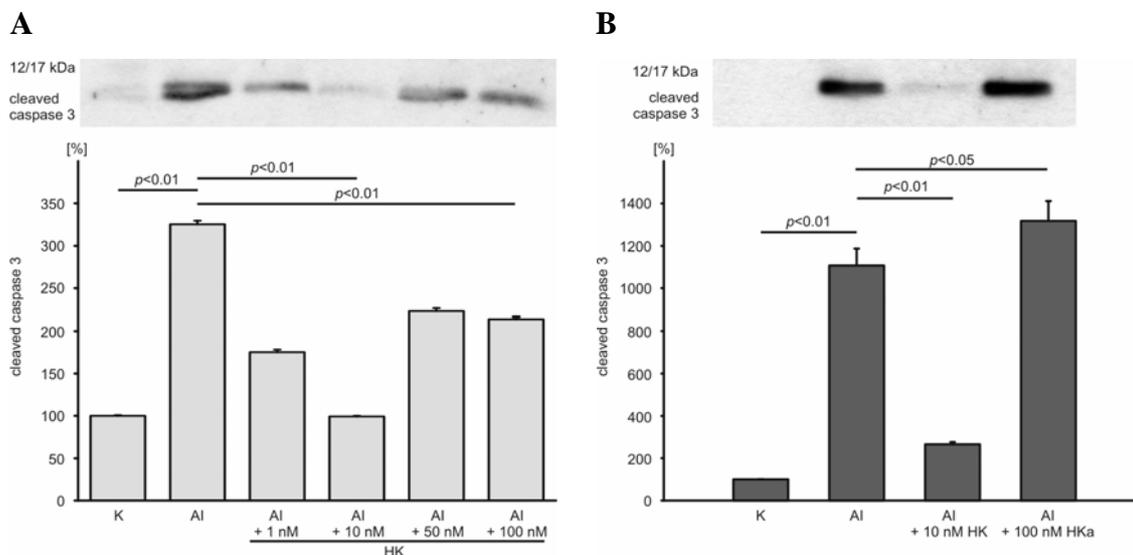
Western Blot Analyse von Cleaved Caspase-3 in VSMC von Wistar Ratten. (A) Die VSMC wurden für 16 h mit 3 mM SNP, 1 ng/mL FasL, 1 ng/mL TNF- $\alpha$ , 500 U/mL IFN- $\gamma$ , 1000 U/mL IL-1 $\alpha$  in den angegebenen Kombinationen behandelt. (B) Die VSMC wurden für 16 h mit den angegebenen Konzentrationen von SNP, 1 ng/mL FasL, 1 ng/mL TNF- $\alpha$ , 500 U/mL IFN- $\gamma$ , 1000 U/mL IL-1 $\alpha$  behandelt. (C) Die VSMC wurden für 16 h mit den angegebenen Konzentrationen TNF- $\alpha$ , 3 mM SNP, 1 ng/mL FasL, 500 U/mL IFN- $\gamma$ , 1000 U/mL IL-1 $\alpha$  behandelt. Repräsentative Blots sind gezeigt. K=Kontrolle

### 3.3. HMWK inhibiert die Aktivierung von Caspase-3

Für die nachfolgenden Experimente wurden VSMC-Kulturen aus BN und BN/Ka verwendet. Aufgrund der erhöhten Inzidenz von AAA in BN/Ka-Ratten verbunden mit einer erhöhten Apoptoserate von VSMC, sollte in den Experimenten geklärt werden, ob HMWK einen Einfluss auf die Apoptose ausübt.

Caspase-3 stellte, als zentrale apoptotische Caspase, ein geeignetes Protein für erste Untersuchungen hinsichtlich anti-apoptotischer Eigenschaften dar.

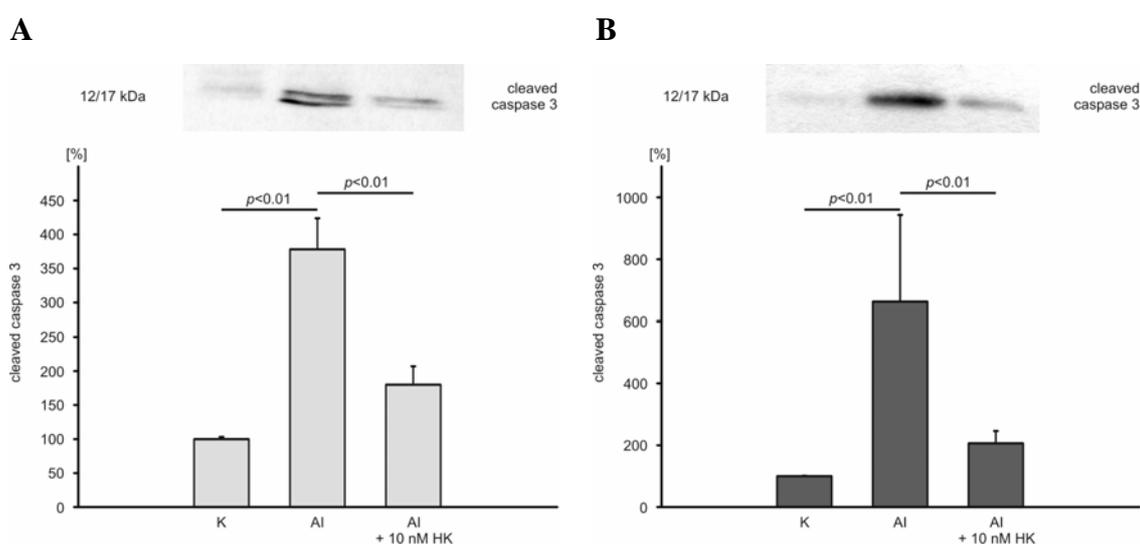
Dazu wurden konfluente VSMC Kulturen von BN und BN/Ka zunächst für 24 h mit Hungermedium inkubiert, um den Zellstoffwechsel auf ein basales Niveau zu reduzieren, und nachfolgend mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail (AI) behandelt. Nach 16 h wurden die Proteine isoliert und auf das Vorhandensein von der aktivierten Form von Caspase-3 - cleaved Caspase 3 - mittels Western Blot untersucht. Parallel erfolgte zur Konzentrationsfindung eine Ko-Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von HMWK in der Spanne von 1 nM bis 100 nM, die den verwendeten Konzentrationen aus bisherigen Studien mit HMWK entsprechen<sup>117,174-176</sup>.



**Abbildung 3.3: Konzentrationsabhängiger inhibitorischer Effekt von HMWK auf die Apoptoseinduktion in VSMC.**

Western Blot Analyse von Cleaved Caspase-3 in VSMC von BN (**A**) und BN/Ka (**B**). Die VSMC wurden für 16 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit den angegebenen Konzentrationen von HMWK behandelt. Repräsentative Blots sind gezeigt.

Aus Abbildung 3.3 ist ersichtlich, dass HMWK die Aktivierung von Caspase-3 konzentrationsabhängig zu inhibieren vermag. Dabei erfolgte die stärkste Inhibierung bei einer Konzentration von 10 nM, die bei höheren Konzentrationen wieder abnahm. Dieser Konzentrationseffekt war gleichermaßen in BN und BN/Ka zu beobachten. In weiteren Experimenten mit dem gleichen Versuchsaufbau wurde das inhibitorische Vermögen von 10 nM HMWK in VSMC von BN und BN/Ka bestätigt. Abbildung 3.4 zeigt einen repräsentativen Western Blot sowie die densitometrischen Mittelwerte der Expression aktiver Caspase-3 aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



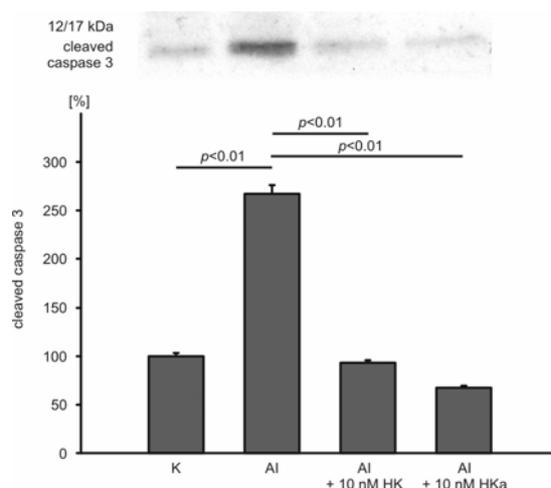
**Abbildung 3.4: Inhibierung der Cleaved Caspase-3 durch HMWK.**

Western Blot Analyse von Cleaved Caspase-3 in VSMC von BN (**A**) und BN/Ka (**B**). Die VSMC wurden für 16 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK behandelt. Repräsentative Blots sind gezeigt.

Wie in Abbildung 3.4 erkennbar, erfolgte sowohl in VSMC aus BN (Abbildung 3.4 A) und BN/Ka (Abbildung 3.4 B) eine signifikante Inhibierung der Caspase-3 Aktivierung unter Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK.

Danach wurde analysiert, ob die gefundene Inhibition durch HMWK abhängig von der verwendeten Form ist. HMWK stellt ein einkettiges Glykoprotein dar, aus dem durch Kallikrein Bradykinin freigesetzt werden kann, wodurch das zweikettige HMWK - HKa - entsteht. Es besteht also unter Verwendung des (einkettigen) HMWK die Möglichkeit,

dass die beobachteten Effekte über Bradykinin vermittelt sein könnten oder HKa eine andere physiologische Aktivität aufweist. Für die Untersuchung wurden konfluente Kulturen von BN/Ka erneut für 16 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail stimuliert und gleichzeitig mit 10 nM von sowohl HMWK als auch HKa inkubiert. Die extrahierten Proteine wurden mittels Western Blot auf die aktivierte Form der Caspase-3 untersucht.



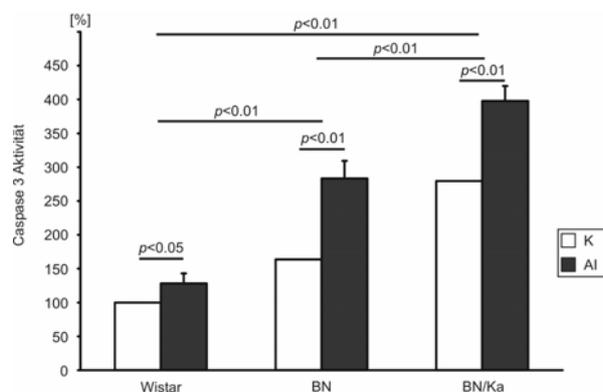
**Abbildung 3.5: Vergleich der inhibitorischen Wirkung von HMWK und HKa auf Cleaved Caspase-3.**

Western Blot Analyse von Cleaved Caspase-3 in VSMC von BN/Ka. Die VSMC wurden für 16 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK bzw. HKa behandelt. Ein repräsentativer Blot ist gezeigt.

Die statistisch signifikante inhibitorische Aktivität von HMWK auf die Caspase-3 Aktivierung ist unabhängig von der verwendeten Form, wie aus Abbildung 3.5 ersichtlich ist.

Für die Untersuchung, ob die VSMC aus BN/Ka eine andere Aktivität hinsichtlich der Caspase-3 besitzen, bedingt durch die genetische Mutation von HMWK, wurden konfluente Kulturen von VSMC aus Wistar, als der gesunde Vergleichstyp, BN und BN/Ka einmal unter basalen Bedingungen als auch nach 16-stündiger Stimulation mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail untersucht. Nach Isolierung der Proteine wurde unter Verwendung des *Caspase Colorimetric Substrate Set II Plus* spezifisch die Aktivität

von Caspase-3 bestimmt. Abbildung 3.6 zeigt die Mittelwerte der Aktivitätsbestimmung von Caspase-3 aus 3 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.6: Vergleich der Caspase-3 Aktivität in VSMC.**

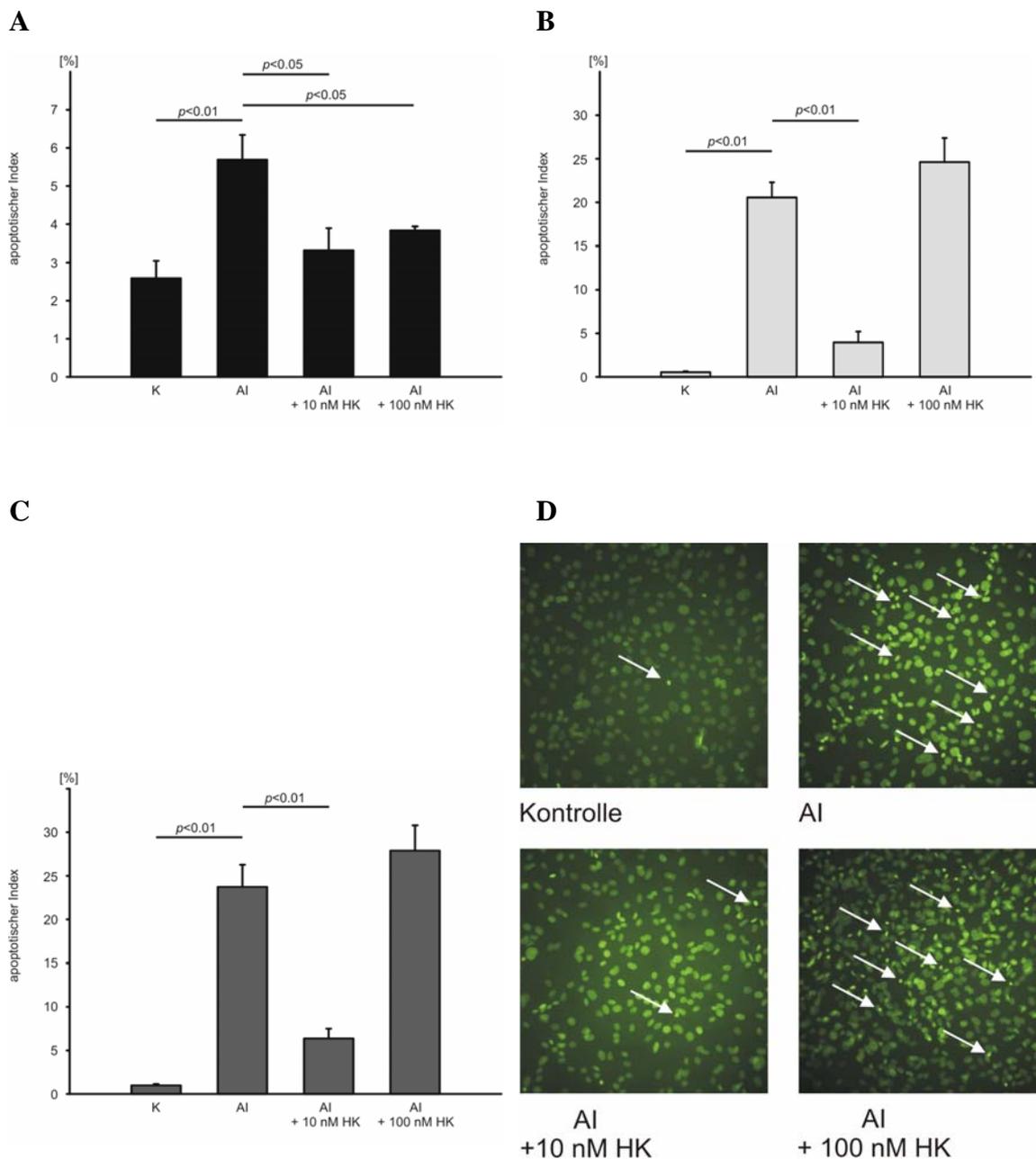
Analyse der Caspase-3-Aktivität in VSMC von Wistar, BN und BN/Ka. Die VSMC wurden für 16 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail behandelt und die Aktivität unter Anwendung eines spezifischen Aktivitätsassay photometrisch gemessen.

Für die Auswertung wurde die Kontrollgruppe der VSMC aus Wistar als Basis gesetzt und die Meßwerte darauf normalisiert berechnet. Nach apoptotischer Stimulation wurde die Aktivität der Caspase-3 in allen VSMC erhöht, wobei VSMC aus BN und BN/Ka eine größere Aktivitätssteigerung aufwiesen als VSMC von Wistar Ratten. Schon auf dem Kontroll-Niveau zeigte sich eine erhöhte Aktivität von VSMC aus BN als auch BN/Ka mit einer Zunahme der Aktivität in der Reihenfolge Wistar < BN < BN/Ka. Diese Unterschiede in der Aktivität blieben auch nach der apoptotischen Stimulation bestehen, so dass VSMC aus BN/Ka die höchste Aktivität für Caspase-3 aufwiesen, sowohl unter Kontroll- als auch unter apoptotischen Bedingungen.

### 3.4. HMWK reduziert den apoptotischen Index

Für die Bestätigung der Ergebnisse der Aktivierung und Inhibierung der Caspase-3 wurde die Gesamtapoptose-Rate durch Bestimmung des apoptotischen Indexes kalkuliert (siehe 2.2.2.6). Dafür wurden VSMC der Spezies Wistar, BN und BN/Ka für 3 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail in der Abwesenheit oder Gegenwart von 10

bzw. 100 nM HMWK stimuliert und nachfolgend der apoptotische Index bestimmt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängigen Bestimmungen.

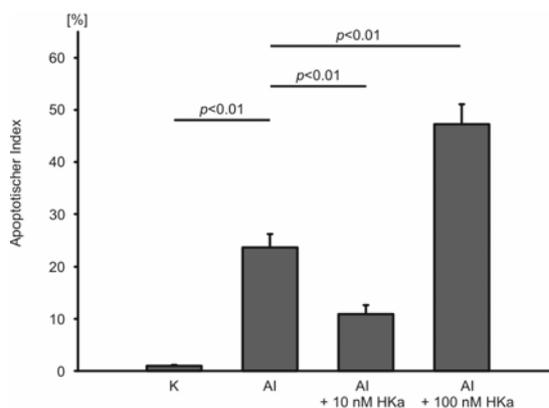


**Abbildung 3.7: Bestimmung des apoptotischen Indexes in Wistar, BN und BN/Ka.**

VSMC von Wistar (**A**), BN (**B**) und BN/Ka (**C**) wurden für 3 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM bzw. 100 nM HMWK behandelt. Die Zellen wurden mit 4 %iger Paraformaldehydlösung fixiert und die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt. **D** zeigt repräsentative Aufnahmen der apoptotischen Zellkerne (Vergrößerung x20).

Die schon bei der Bestimmung der aktiven Form von Caspase-3 gezeigte konzentrationsabhängige Inhibition durch HMWK, konnte mit diesem Experiment bestätigt werden (Abbildung 3.7). In den VSMC aus allen drei Rattenstämmen konnte der apoptotische Index statistisch signifikant unter Ko-Behandlung mit 10 nM HMWK gesenkt werden. Dabei zeigte sich als Unterschied der VSMC aus den verschiedenen Rattenstämmen, dass in Wistar VSMC der apoptotische Index deutlich niedriger lag sowie unter 100 nM HMWK eine signifikante Reduktion gegenüber der Apoptose zu erkennen war (Abbildung 3.7 A). In VSMC von BN und BN/Ka zeigte sich unter 100 nM HMWK keine inhibitorische Aktivität sondern die Tendenz zur weiteren Steigerung des apoptotischen Indexes (Abbildung 3.7 B, C). Weiterhin nahm der apoptotische Index unter apoptotischen Bedingungen ohne Einfluss von HMWK in der Reihenfolge Wistar < BN < BN/Ka zu.

Für die Überprüfung der Substanzunabhängigkeit, d.h. Verwendung von HMWK oder HKa, wurden exemplarisch VSMC aus BN/Ka dem gleichen Versuchsaufbau nur unter Verwendung von 10 und 100 nM HKa unterzogen. Abbildung 3.8 zeigt die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Bestimmungen.



**Abbildung 3.8: Bestimmung des apoptotischen Indexes unter Ko-Stimulation mit HKa.**

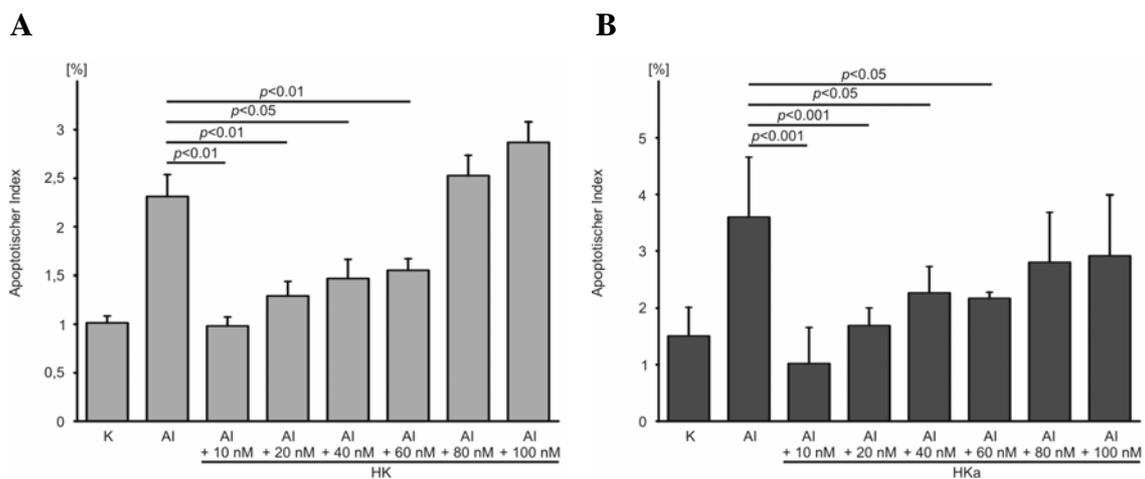
VSMC von BN/Ka wurden für 3 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM bzw. 100 nM HKa behandelt. Die Zellen wurden mit 4 %iger Paraformaldehydlösung fixiert und die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, wurde der apoptotische Index ebenfalls durch die zusätzliche Stimulation mit 10 nM HKa statistisch signifikant gesenkt. Gleichmaßen

fehlte unter 100 nM HKa die inhibitorische Potenz. Sowohl HMWK als auch HKa verhielten sich äquivalent hinsichtlich ihrer anti-apoptotischen Wirkung bei 10 nM, wodurch in nachfolgenden Experimenten HMWK eingesetzt wurde. Unter Ko-Stimulation mit 100 nM HKa erfolgte eine signifikante Steigerung gegenüber alleiniger Apoptoseinduktion.

Gleichermaßen wurde die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf humane VSMC untersucht.

Dafür wurden primäre humane VSMC für 1 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail in der Abwesenheit oder Gegenwart von 10 bis 100 nM HMWK bzw. HKa stimuliert. Die nachfolgende Abbildung 3.9 stellt die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar.



**Abbildung 3.9: Bestimmung des apoptotischen Indexes in humanen VSMC.**

VSMC aus humaner Aorta wurden für 1 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM bis 100 nM HMWK (A) bzw. HKa (B) wie angegeben behandelt. Die Zellen wurden mit 4 %iger Paraformaldehydlösung fixiert und die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt.

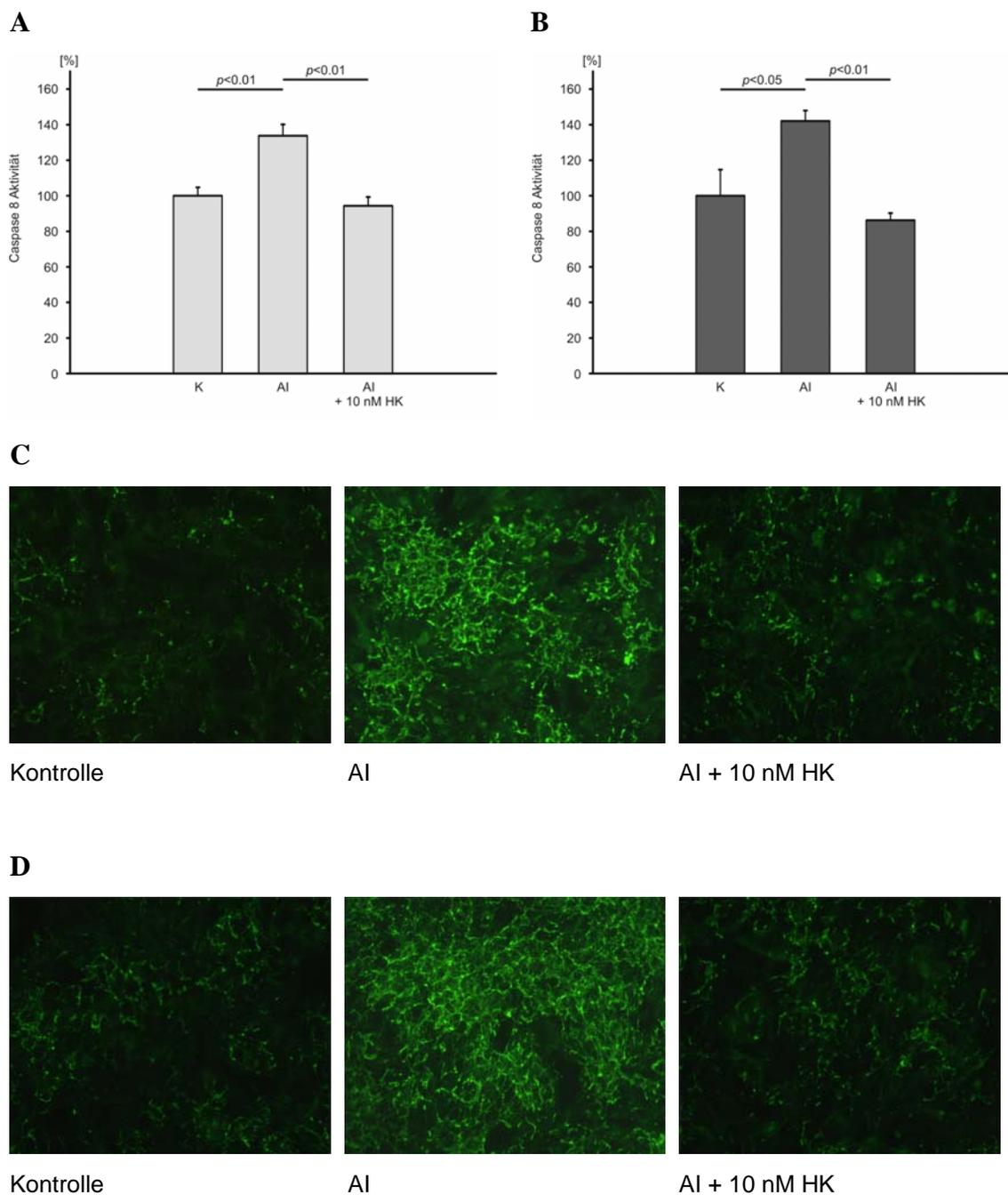
Die Experimente lieferten das Ergebnis, dass der unter apoptotischer Stimulation zu verzeichnende Anstieg des apoptotischen Indexes durch gleichzeitige Stimulierung mit HMWK/ HKa in den Konzentrationen 10, 20, 40 und 60 nM statistisch signifikant gesenkt werden konnte. Dabei übte die Konzentration 10 nM den größten inhibitorischen Effekt aus. Die Konzentrationen 80 und 100 nM konnten den

apoptotischen Index nicht senken, es lag sogar die Tendenz zu einer weiteren Steigerung der Apoptose vor. Ebenfalls konnte die Unabhängigkeit von der verwendeten Kininogen-Form und damit von Bradykinin gezeigt werden.

Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass das Apoptose-Modell gleichermaßen in VSMC aus Ratten oder humaner Aorta angewendet werden kann und vergleichbare Ergebnisse der Inhibition durch HMWK liefert.

### **3.5. HMWK reduziert die Aktivität von Caspase-8**

Durch die Stimulation der Zellen mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail wird laut Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen in VSMC der Fas/FasL-induzierte Signalweg der Apoptose beschrieben.<sup>43,45,46</sup> In dem nachfolgenden Experiment sollte daher geklärt werden, ob es tatsächlich zu einer Aktivierung der Initiator-Caspase des extrinsischen Apoptose-Signalweges - Caspase-8 - kommt und ob HMWK ebenfalls eine inhibitorische Auswirkung auf die Aktivität dieser Caspase hat. Dazu wurden VSMC aus BN und BN/Ka für 3 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail sowie 10 nM HMWK stimuliert. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da nach 3 h in den Experimenten des apoptotischen Indexes schon deutliche Apoptose-bedingte morphologische Unterschiede in den Zellen zu erkennen waren und die Aktivierung der Caspase-8 ein frühes apoptotisches Ereignis darstellt. Nach Anwendung eines spezifischen Aktivitäts-Assays auf Fluoreszenzbasis wurden die Zellen mittels eines Fluoreszenzmikroskopes untersucht und die Fluoreszenzaktivität vermessen. Die Abbildung 3.10 zeigt repräsentative Fluoreszenzaufnahmen sowie die Mittelwerte aus der Fluoreszenzaktivitätsbestimmung von Caspase-8 aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.10: Inhibierung der Caspase-8-Aktivität durch HMWK.**

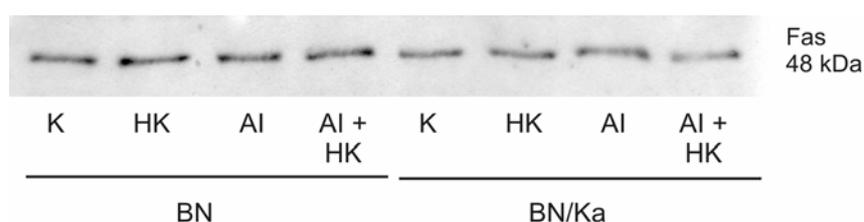
Analyse der Caspase-8-Aktivität in VSMC von BN (**A, C**) und BN/Ka (**B, D**). Die VSMC wurden für 3 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK behandelt und die Aktivität unter Anwendung eines spezifischen Aktivitätsassay fluorometrisch gemessen. Repräsentative Fluoreszenzbilder sind gezeigt (Vergrößerung x20).

In Abbildung 3.10 ist ersichtlich, dass es unter dem angewandten Stimulationsprotokoll zu einer Aktivierung der Initiator-Caspase-8 und dementsprechend zu einer Aktivierung des Fas/FasL-induzierten Signalweges kommt. Die Behandlung mit 10 nM HMWK führte zu einer signifikanten Reduktion der Caspase-8-Aktivität, und konnte die inhibitorische Aktivität von HMWK auch für diese Caspase bestätigen. Interessanterweise bestand kein Unterschied in der Aktivität der Caspase-8 zwischen den VSMC aus BN oder BN/Ka.

### 3.6. Keine regulatorischer Effekt auf den Fas-Rezeptor durch Apoptose und HMWK

Eine vermehrte Verfügbarkeit des Fas-Rezeptors könnte die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Stimulation mit dem Liganden erhöhen und damit die apoptotische Aktivierung begünstigen. Mit dem nachfolgenden Experiment sollte analysiert werden, ob es Unterschiede in der Proteinexpression des Fas-Rezeptors in VSMC gibt.

VSMC aus BN und BN/Ka wurden für 16 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail stimuliert und mit 10 nM HMWK ko-behandelt. Nach der Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung erfolgte die Analyse mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen Fas-Antikörpers. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western Blot aus 2 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.11: Keine Regulation von Fas in VSMC.**

Western Blot Analyse von Fas in VSMC von BN und BN/Ka. Die VSMC wurden für 16 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK behandelt. Ein repräsentativer Blot ist gezeigt.

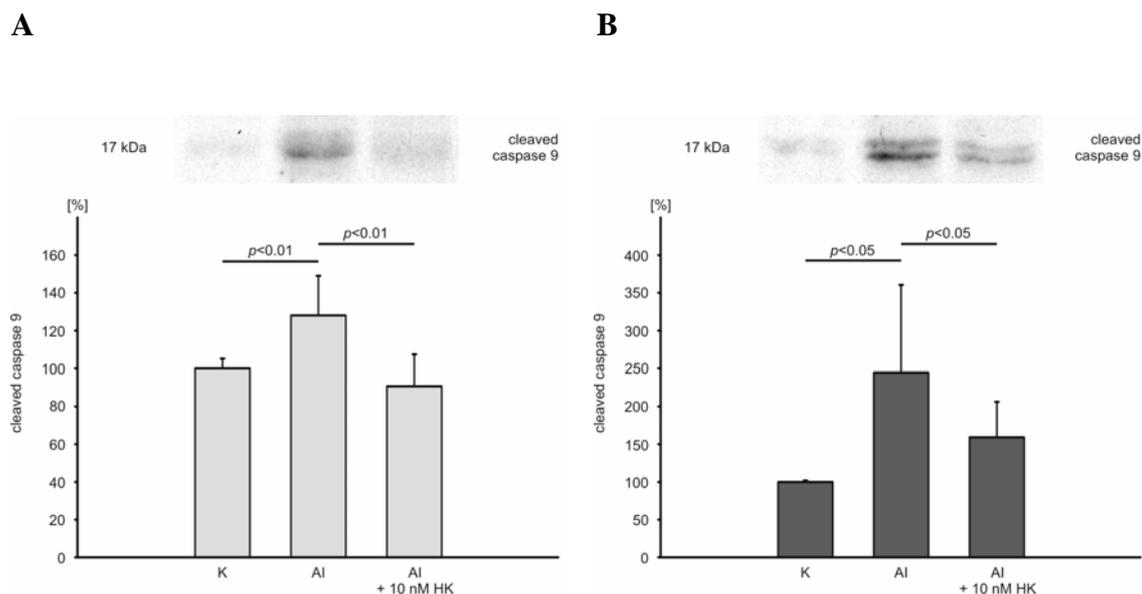
Wie in Abbildung 3.11 ersichtlich, zeigten sich keine Unterschiede in dem Proteingehalt von Fas in den VSMC von BN und BN/Ka. Auch nach apoptotischer Stimulation bzw. Ko-Stimulation mit HMWK wurde keine Regulation gefunden.

### **3.7. HMWK inhibiert die Aktivierung von Caspase-9 und die Freisetzung von Cytochrom C**

Die aktive Caspase-8 vermag den Gruppenvertreter Bid aus der Bcl-2-Familie proteolytisch zu spalten und zu aktivieren. Nachfolgend kann tBid die Freisetzung von Cytochrom C veranlassen und somit den intrinsischen Apoptose-Weg aktivieren (siehe 1.1.6).

Es sollte experimentell geklärt werden, ob in VSMC der intrinsische Signalweg aktiviert wird. Dafür wurden die Zellen zunächst hinsichtlich ihrer Expression von aktiver Caspase 9 untersucht.

In einem vorangegangenen Zeitversuch wurde nach 2 h Apoptose-Induktion die aktive Form der Caspase 9 - cleaved Caspase 9 - detektiert und diese Zeitdauer für nachfolgende Experimente benutzt. Nachfolgend wurden VSMC aus BN und BN/Ka für 2 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail behandelt und mit 10 nM HMWK ko-stimuliert. Die Abbildung 3.12 zeigt die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung der aktiven Caspase-9 Proteinexpression aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

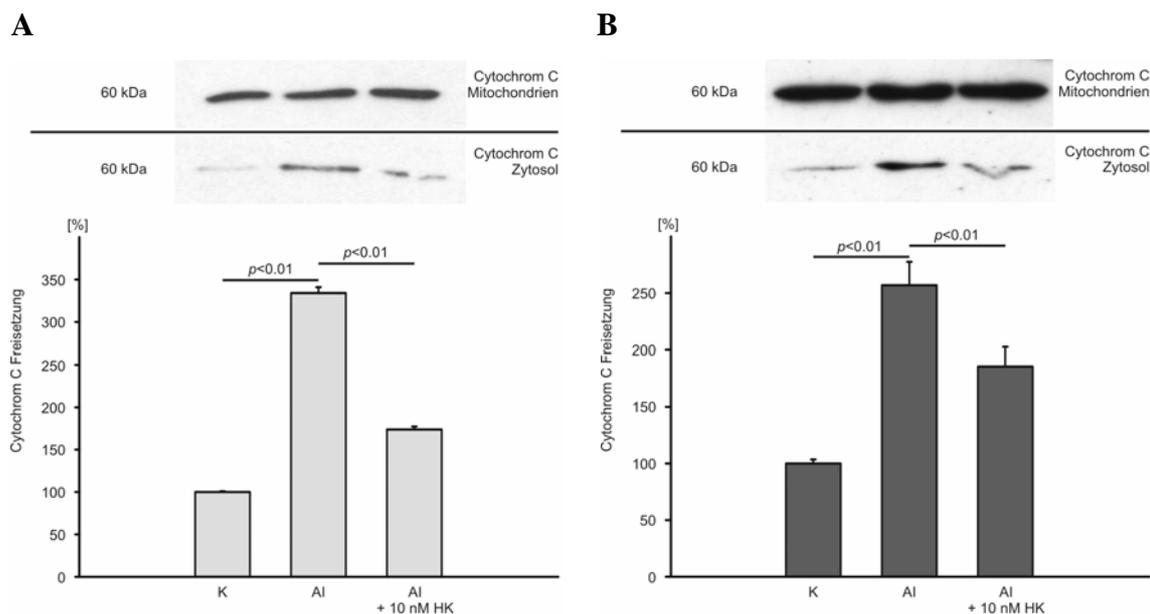


**Abbildung 3.12: Inhibierung der Cleaved Caspase-9 durch HMWK.**

Western Blot Analyse von Cleaved Caspase-9 in VSMC von BN (A) und BN/Ka (B). Die VSMC wurden für 2 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK behandelt.

Die Western-Blot-Analyse ergab eine Aktivierung der Caspase-9, nach der Behandlung der VSMC mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail. Durch Zugabe von 10 nM HMWK konnte diese Aktivierung statistisch signifikant gesenkt werden.

Zur Bestätigung der gerade beschriebenen Resultate wurde nachfolgend untersucht, ob eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien - der Initialschritt der intrinsischen Kaskade - erfolgt. Die VSMC aus BN und BN/Ka wurden gleichermaßen kultiviert und vorbehandelt und die Apoptose für 6 h induziert. Dieser spätere Zeitpunkt wurde als Mittelmaß zwischen den frühen Zeitpunkten (2 bzw. 3 h) und dem späten Zeitpunkt (16 h) gewählt, um eine ausreichende Freisetzung und damit Detektion des Proteins zu gewährleisten. Die Abbildung 3.13 zeigt repräsentative Western Blots sowohl der Zytosol- als auch der Mitochondria-Fraktion sowie die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



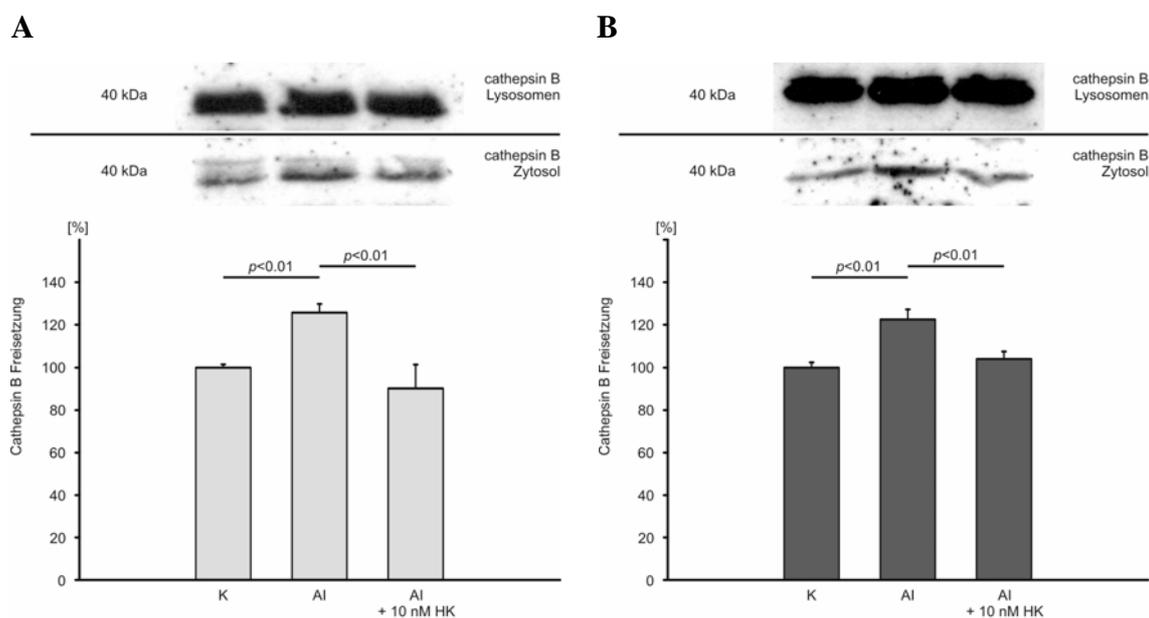
**Abbildung 3.13: Inhibierung der Cytochrom C Freisetzung durch HMWK.**

Western Blot Analyse von Cytochrom C in VSMC von BN (A) und BN/Ka (B) in den fraktionierten Proteinisolationen von Zytosol und Mitochondrien. Die VSMC wurden für 6 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK behandelt. Repräsentative Blots sind gezeigt.

Die Western-Blot-Analyse der fraktionierten Proteinisolation ergab eine Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol, erkennbar durch die Detektion des Proteins in der Zytosol-Fraktion. Unter gleichzeitiger Stimulation mit 10 nM HMWK konnte diese Freisetzung in den VMSC aus BN und BN/Ka gleichermaßen statistisch signifikant, wenn auch nicht vollständig, gesenkt werden. Die Untersuchung der mitochondriellen Fraktion zeigte eine deutlich höhere und konstante Expression ohne Regulation nach erfolgter Stimulierung.

### 3.8. HMWK inhibiert die Freisetzung von Cathepsin B

Verschiedene Arbeitsgruppen haben ebenfalls eine apoptotische Beteiligung der lysosomalen Cysteine-Protease Cathepsin B postuliert (siehe 1.1.6.).<sup>177-180</sup> Um herauszufinden, ob Cathepsin B in dem verwendeten Induktionsmodell eine zytosolische Beteiligung zukommt, wurde in VSMC die Apoptose für 6 h induziert. Daraufhin erfolgte eine fraktionierte Proteinisolation mit anschließender Analyse der Proteinexpression von Cathepsin B mittels Western Blot. Die Abbildung 3.14 zeigt repräsentative Western Blots sowohl der Zytosol- als auch der Lysosomen-Fraktion sowie die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



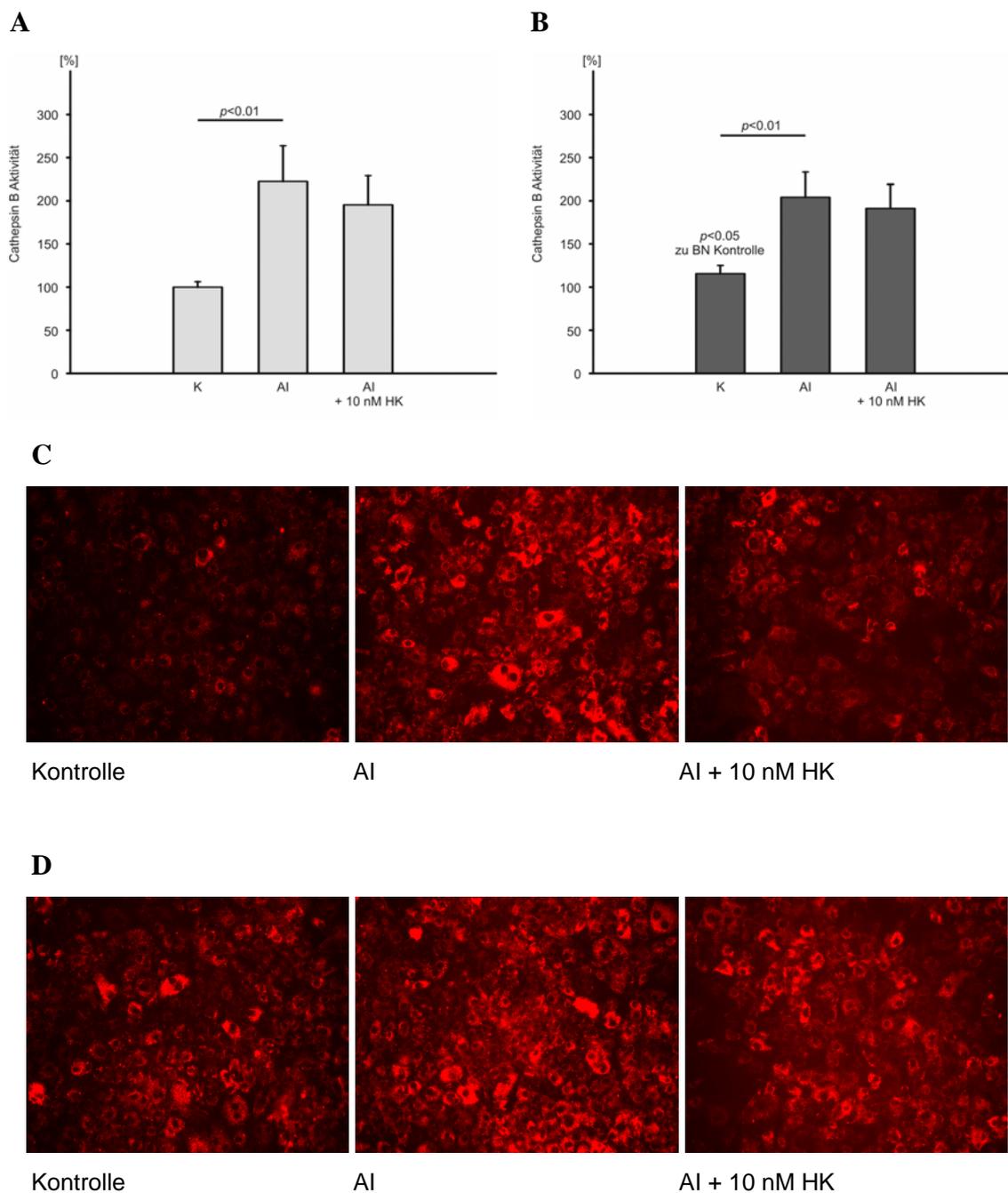
**Abbildung 3.14: Inhibierung der Cathepsin B Freisetzung durch HMWK.**

Western Blot Analyse von Cathepsin B in VSMC von BN (**A**) und BN/Ka (**B**) in den fraktionierten Proteinisolationen von Zytosol und Lysosomen. Die VSMC wurden für 6 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK behandelt. Repräsentative Blots sind gezeigt.

In den VSMC konnte nach alleiniger apoptotischer Stimulation eine Erhöhung der zytosolischen Expression von Cathepsin B festgestellt werden. Dabei war wiederum kein Unterschied zwischen den Kulturen aus BN und BN/Ka festzustellen. Nach der

Zugabe von 10 nM HMWK wurde die Expression von zytosolischem Cathepsin B statistisch signifikant gesenkt. Die wesentlich stärkere Expression in der lysosomalen Fraktion wurde durch das Stimulationsprotokoll nicht beeinflusst. Die Ergebnisse aus vorangegangenen Experimenten in denen das gesamte Proteinlysate untersucht wurde, zeigten keine Regulation bezüglich der Cathepsin B Expression. Nach den vorangegangenen beschriebenen Experimenten kann davon ausgegangen werden, dass die konstante hohe Expression in den Lysosomen die Änderungen im Zytosol überlagert hat.

Um beurteilen zu können, ob allein eine Beeinflussung der Freisetzung von Cathepsin B aus den Lysosomen ins Zytosol oder auch eine Inhibierung der Aktivität durch HMWK erfolgt, wurde im anschließenden Experiment eine spezifische Aktivitätsbestimmung mittels eines Fluoreszenz-Assays durchgeführt.



**Abbildung 3.15: Regulation der Cathepsin B-Aktivität in VSMC.**

Analyse der Cathepsin B-Aktivität in VSMC von BN (**A, C**) und BN/Ka (**B, D**). Die VSMC wurden für 3 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK behandelt und die Aktivität unter Anwendung eines spezifischen Aktivitätsassay fluorometrisch gemessen. Repräsentative Fluoreszenzbilder sind gezeigt (Vergrößerung x20).

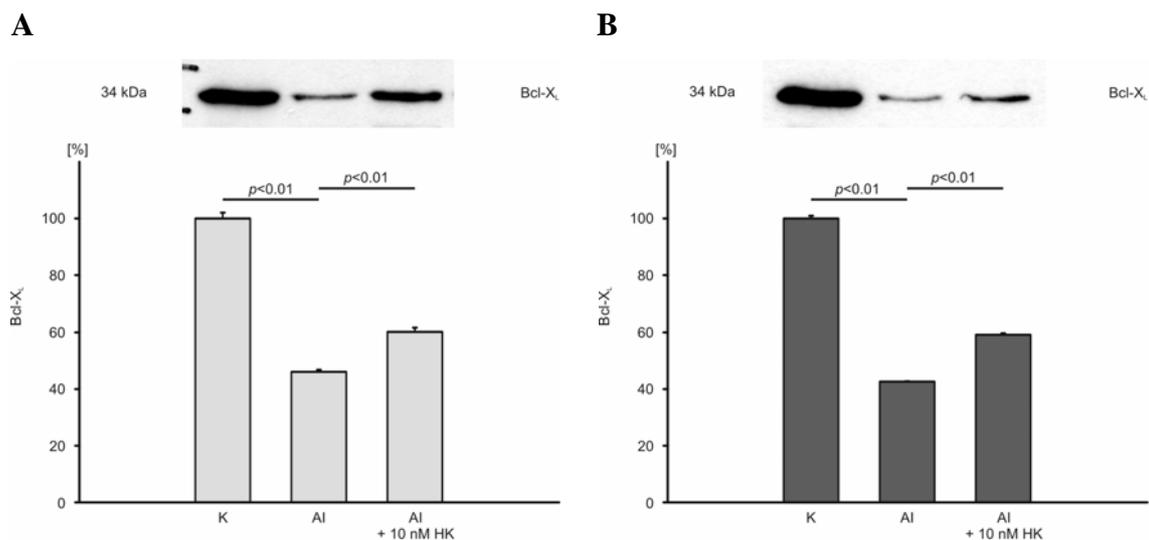
Es zeigte sich ein hoher Fluoreszenzanstieg nach apoptotischer Stimulation in den VSMC aus beiden Rattenstämmen, was auf eine hohe Aktivitätszunahme des Cathepsin

B hindeutet (Abbildung 3.15). Der Vergleich der Cathepsin B-Aktivitäten von BN und BN/Ka unter Kontrollbedingungen zeigten eine signifikante Erhöhung der basalen Cathepsin B Aktivität in VSMC aus BN/Ka (Abbildung 3.15 B). Die Ko-Stimulation mit HMWK bewirkte allerdings keine signifikante Aktivitätsverminderung, obwohl die Tendenz in den beiden Versuchsreihen zu sehen war.

### **3.9. HMWK stimuliert Bcl-X<sub>L</sub> aber nicht Bcl-2**

Die Proteine der Bcl-2-Familie sind die Mediatoren des Mitochondrien-abhängigen Signaltransduktionsweges.<sup>69</sup> Die Inhibierung der Freisetzung von Cytochrom C durch das anti-apoptotische Familien-Mitglied Bcl-X<sub>L</sub> ist ein wichtiges, modulierendes Ereignis im Ablauf der Apoptose. Es sollte nun die Frage geklärt werden, ob HMWK zusätzlich zu den Cystein-Proteasen auch einen Effekt auf Bcl-X<sub>L</sub> ausübt.

Dafür wurde in VSMC aus BN und BN/Ka die Apoptose für 16 h induziert. Nach der Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung erfolgte die Analyse der Proteinexpression von Bcl-X<sub>L</sub> mittels Western Blot. Die Abbildung 3.16 zeigt repräsentative Western Blots sowie die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

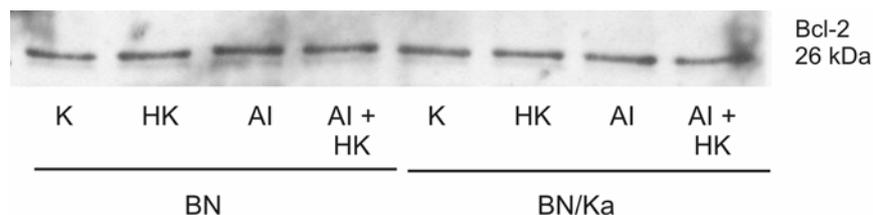


**Abbildung 3.16: Regulation von Bcl-X<sub>L</sub> durch HMWK.**

Western Blot Analyse von Bcl-X<sub>L</sub> in VSMC von BN (**A**) und BN/Ka (**B**). Die VSMC wurden für 16 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK behandelt. Repräsentative Blots sind gezeigt.

Sowohl in den VSMC von BN als auch BN/Ka war eine deutliche Reduktion des Proteingehaltes von Bcl-X<sub>L</sub> nach apoptotischer Stimulierung festzustellen. Diese konnte zwar nicht vollständig, aber zum Teil durch die Ko-Stimulation mit HMWK wieder aufgehoben werden.

Ebenfalls wurde der Proteingehalt des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 untersucht. Dafür wurden VSMC von BN und BN/Ka dem gleichen Versuchsaufbau unterzogen und für 16 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail als auch mit 10 nM HMWK stimuliert bzw. ko-stimuliert. Die Abbildung 3.17 zeigt einen repräsentativen Western Blot aus 2 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.17: Keine Regulation von Bcl-2 in VSMC.**

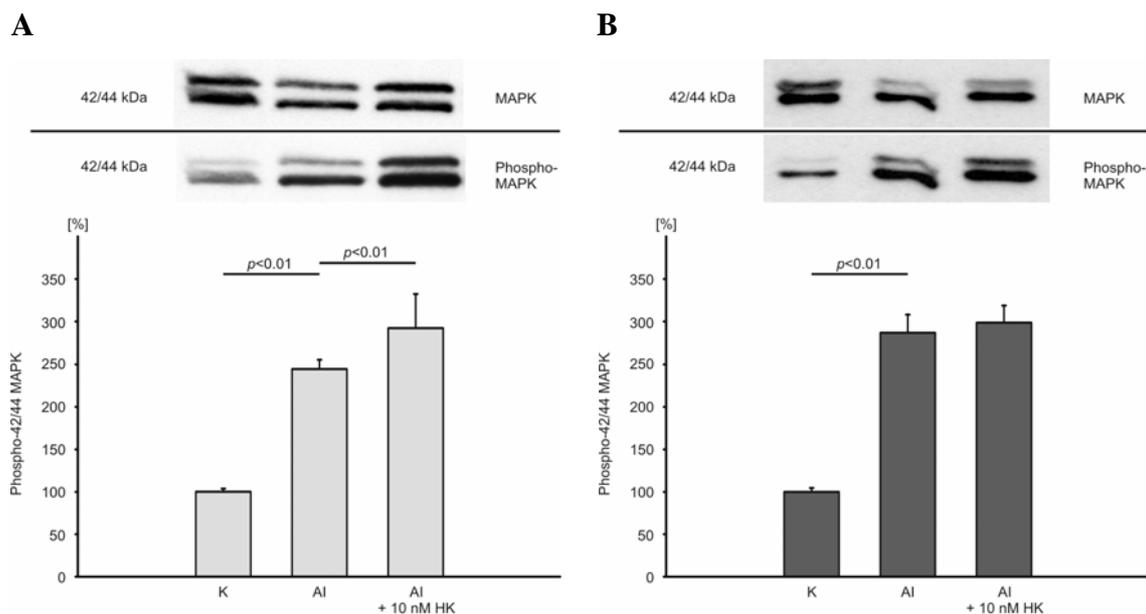
Western Blot Analyse von Bcl-2 in VSMC von BN und BN/Ka. Die VSMC wurden für 16 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK behandelt. Ein repräsentativer Blot ist gezeigt.

Im Gegensatz zu dem verwandten Bcl-X<sub>L</sub> zeigte sich weder in VSMC von BN und BN/Ka eine Regulation unter apoptotischen Bedingungen noch unter Stimulation/ Ko-Stimulation mit HMWK.

### 3.10. HMWK aktiviert 42/44-MAPK

Mit dem nachfolgenden Experiment sollte untersucht werden, ob eine Regulation der phosphorylierten, und damit aktivierten, Form der 42/44 MAPK vorliegt.

Dafür wurde in VSMC die Apoptose für 16 h induziert und es erfolgte zunächst die Analyse der Proteinexpression der phosphorylierten Form der 42/44 MAPK mittels Western Blot. Nach dem Strippen der Membran zur Entfernung der gebundenen Antikörper wurde diese mit dem Antikörper für die Gesamtform der 42/44 MAPK reinkubiert. Die Abbildung zeigt repräsentative Western Blots sowie die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 3.18: Regulation von Phospho-42/44-MAPK durch HMWK.**

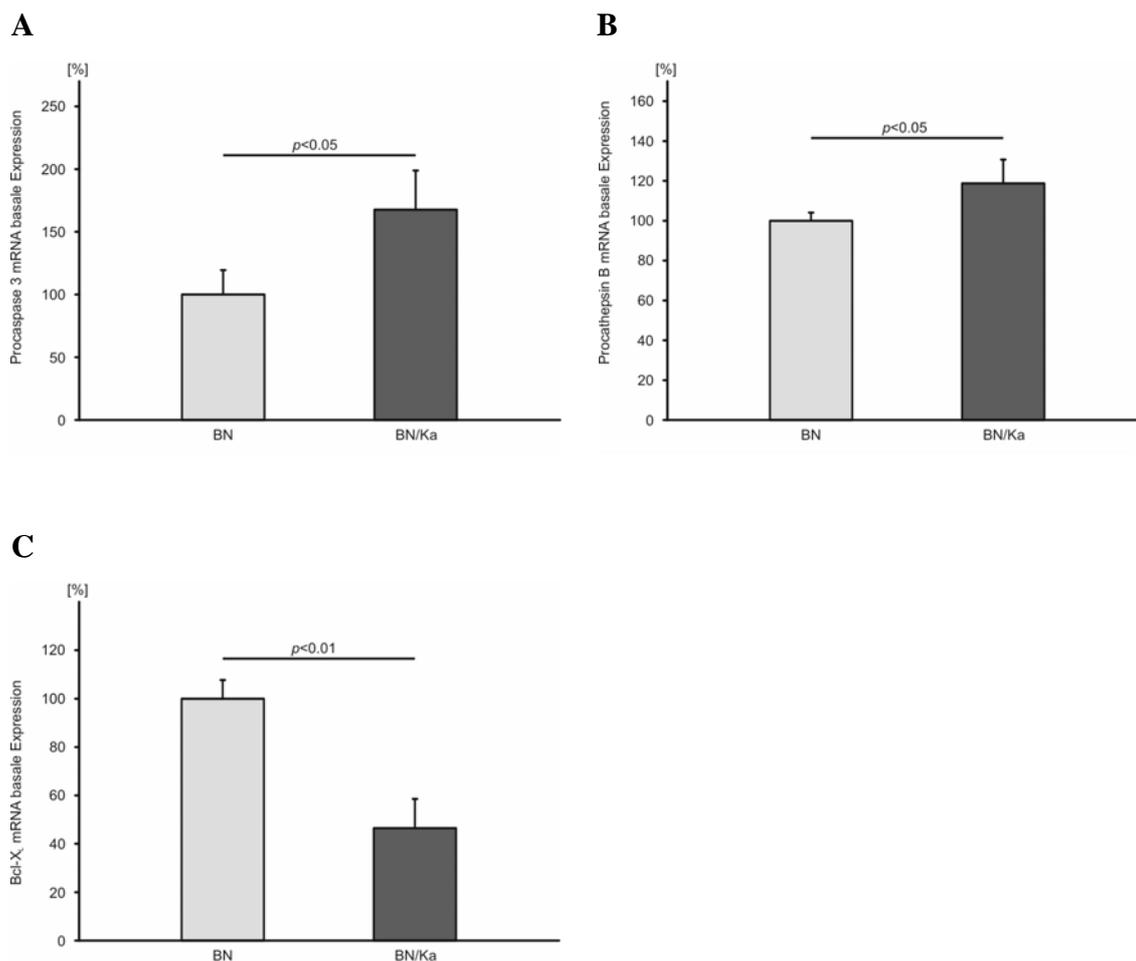
Western Blot Analyse von Phospho-42/44-MAPK und Gesamt-42/44-MAPK in VSMC von BN (A) und BN/Ka (B). Die VSMC wurden für 16 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK behandelt. Repräsentative Blots sind gezeigt.

Durch die apoptotische Stimulation wurde in den VSMC von BN und BN/Ka gleichermaßen die Bildung der phosphorylierten Form von 42/44 MAPK induziert (Abbildung 3.18). Die Ko-stimulation mit HMWK bewirkte in den VSMC von BN einen weiteren signifikanten Anstieg der phosphorylierten Form. Dieser Anstieg war als Tendenz auch in den VSMC von BN/Ka zu erkennen, jedoch bestand kein signifikanter Unterschied.

### 3.11. Basale und stimulierbare Unterschiede in der mRNA von Caspase-3, Cathepsin B und Bcl-X<sub>L</sub>

Um bereits basale Unterschiede zwischen den VSMC von BN und BN/Ka bedingt durch die HMWK-Defizienz aufzudecken, wurden die Expressionsraten verschiedener Schlüsselbausteine der apoptotischen Kaskade in VSMC aus diesen Rattenstämmen untersucht. Dafür wurden die VSMC für 24 h mit Hungermedium inkubiert, die RNA ohne jede weitere Beeinflussung der Zellen isoliert und mittels real-time PCR

analysiert. Die Expression wurde auf die ribosomale Untereinheit 18s bezogen. Die Zellen wurden auf die Expression von Caspase-3, als wichtiger Vertreter der Caspasen, von Cathepsin B, als Vertreter einer weiteren apoptotischen Cystein-Protease neben den Caspasen, und von Bcl-X<sub>L</sub>, als Vertreter eines anti-apoptischen Proteins, hin untersucht.



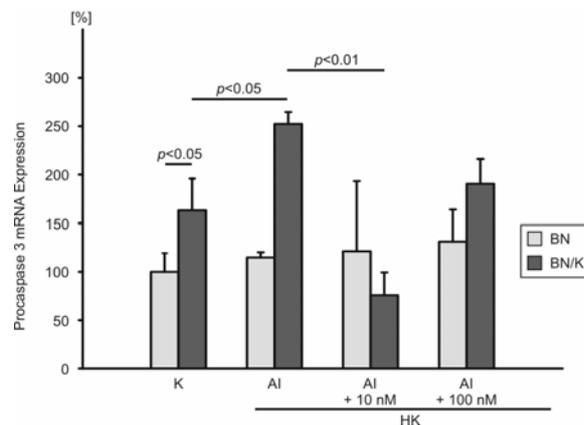
**Abbildung 3.19: Vergleich der basale mRNA Expression in VSMC von BN und BN/Ka.**

Real-Time PCR Analyse der mRNA Expression von Procaspase-3 (**A**), Procathepsin B (**B**) und Bcl-XL (**C**) in VSMC von BN und BN/Ka. Die VSMC wurden unter normalen Bedingungen kultiviert und die RNA nach 24 h Hungermedium (1 % FBS) isoliert.

Wie aus Abbildung 3.19 ersichtlich, war die mRNA Expression der Procaspase-3 in VSMC von BN/Ka deutlich erhöht (Abbildung 3.19 A). Ebenfalls wurde eine Erhöhung der Expressions-Werte der mRNA von Procathepsin-B gefunden (Abbildung 3.19 B).

Die Expression von Bcl-X<sub>L</sub> dagegen war in VSMC von BN/Ka deutlich erniedrigt (Abbildung 3.19 C).

Daraufhin sollte geklärt werden, ob eine Beeinflussung der mRNA Expression durch apoptotische Stimulation in Abwesenheit oder Gegenwart von HMWK erfolgt. Die VSMC von BN und BN/Ka wurden für 30 Minuten mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail behandelt. In Vorversuchen wurde dieser frühe Zeitpunkt als geeignet ermittelt, weil nach längerer Induktion der Apoptose eine allgemein verringerte mRNA-Expression festgestellt wurde, wahrscheinlich als Energiesparmaßnahme der Zelle. Nachfolgend wurde die Expression der zentralen Effektor-Caspase, Caspase-3, bestimmt und auf die stabil exprimierte ribosomale Untereinheit 18s bezogen.



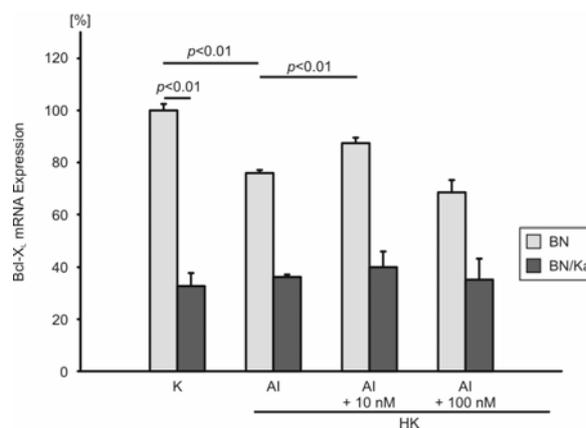
**Abbildung 3.20: Einfluß von HMWK auf die Procaspase-3 mRNA Expression.**

Real-Time PCR Analyse der mRNA Expression von Procaspase-3 in VSMC von BN und BN/Ka. Die VSMC wurden für 0.5 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM bzw. 100 nM HMWK behandelt.

Es erfolgte eine unterschiedliche Induktion der Caspase-3 mRNA Expression in VSMC von BN und BN/Ka (Abbildung 3.20). Die bereits schon erhöhte basale Expression in VSMC von BN/Ka konnte durch den apoptotischen Stimulus weiter erhöht werden. Die Ko-Stimulation mit HMWK vermochte anschließend, die Expressionswerte auf ein Niveau zu senken, welches dem von BN vergleichbar war. Dabei war, wie auch schon auf Protein-Ebene, eine konzentrationsabhängige Senkung durch HMWK festzustellen,

die bei 10 nM signifikant war. Die mRNA Expression der Caspase-3 war in VSMC von BN hingegen unreguliert.

In den gleichen Proben wurde anschließend ebenfalls mittels real-time PCR die mRNA Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-X<sub>L</sub> bestimmt und auf die stabil exprimierte ribosomale Untereinheit 18s bezogen.



**Abbildung 3.21: Einfluß von HMWK auf die Bcl-X<sub>L</sub> mRNA Expression.**

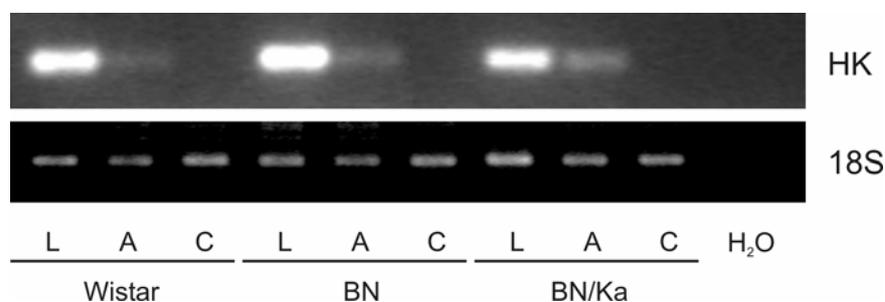
Real-Time PCR Analyse der mRNA Expression von Bcl-X<sub>L</sub> in VSMC von BN und BN/Ka. Die VSMC wurden für 0.5 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail unter Ko-Stimulation mit 10 nM bzw. 100 nM HMWK behandelt.

Es zeigt sich ein genau umgedrehtes Bild, wie bei Expression der pro-apoptischen Caspase-3 (Abbildung 3.21). Die Bcl-X<sub>L</sub> mRNA Expression in VSMC von BN/Ka war nicht nur basal erniedrigt, auch unter apoptotischer Stimulation blieb sie unreguliert. In VSMC von BN dagegen wurde eine ähnliche Regulation wie auf Protein-Ebene gefunden. Durch den apoptotischen Stimulus wurde die Bcl-X<sub>L</sub> mRNA Expression erniedrigt, und konnte teilweise durch die Ko-Stimulation mit 10 nM HMWK wieder erhöht werden.

### 3.12. Keine endogene HMWK mRNA Expression in VSMC

Die Frage eines lokalen Kininogen-Systems in der Vaskulatur wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. Im Speziellen gab es bislang keine Untersuchungen hinsichtlich der mRNA Expression von HMWK in VSMC. Aus diesem Grunde sollte in den nachfolgend beschriebenen Experimenten die Frage geklärt werden, ob VSMC unter den gegebenen Umständen HMWK exprimieren.

Um zu überprüfen, ob es unterschiedliche Expressionsmuster zwischen den Rattenstämmen gibt, wurde die mRNA aus Proben von Leber, Aorta und unstimulierten VSMC aus Wistar, BN und BN/Ka mittels semiquantitativer PCR untersucht.

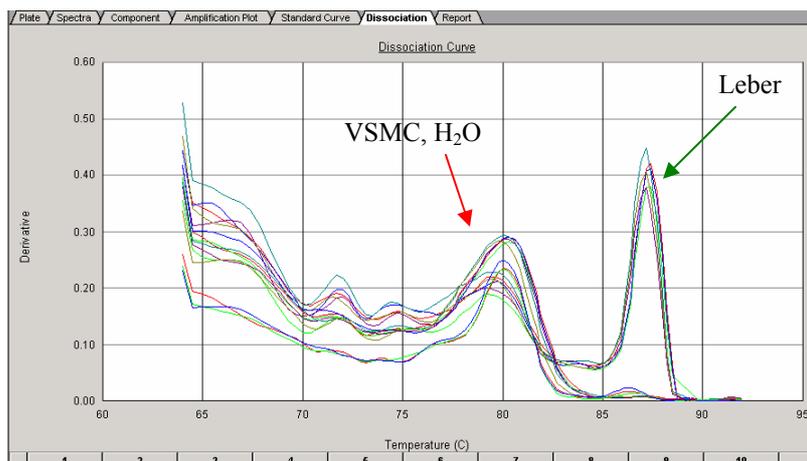


**Abbildung 3.22: HMWK mRNA Expression in Leber, Aorta und VSMC.**

RT-PCR Analyse der mRNA Expression von HMWK in Gewebeproben aus Leber (L), Aorta (A) und VSMC (C) von Wistar, BN und BN/Ka.

In Abbildung 3.22 zeigt sich eine sehr starke Expression von HMWK in den Leberproben, wobei kein Unterschied zwischen den Rattenstämmen zu erkennen ist. Ebenfalls wurde eine sehr schwache Bande in den Extrakten aus den Aorten detektiert, ebenfalls ohne Intensitätsunterschiede für die verschiedenen Stämme. Interessanterweise zeigte sich keine Expression in den VSMC.

Da die real-time PCR eine wesentlich empfindlichere Methode zur Detektion von mRNA ist, und da man über die Schmelzkurvenanalyse eine eindeutige Aussage zur Spezifität erhält, wurde aus diesem Grund nachfolgend eine real-time PCR durchgeführt. Es wurden als Kontrolle erneut Leber-mRNA verwendet und verschiedene Proben unstimulierter VSMC untersucht.

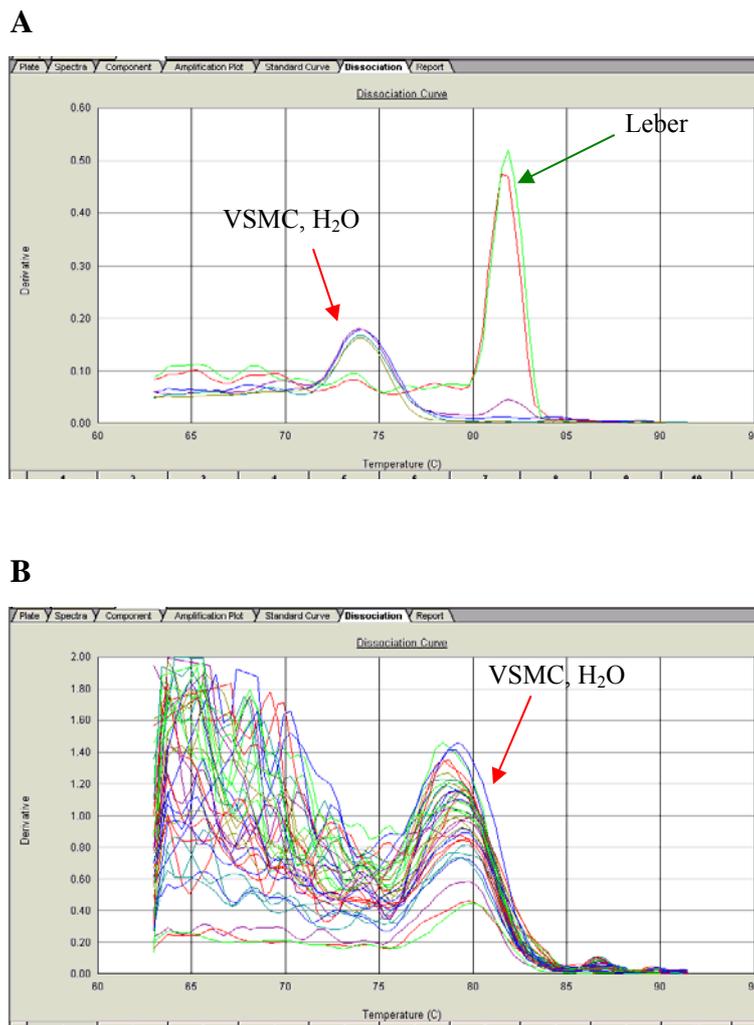


**Abbildung 3.23: HMWK mRNA Expression in Leber und VSMC.**

Real-Time PCR Analyse der mRNA Expression von HMWK in Gewebeproben aus Leber und VSMC von BN und BN/Ka.

Es wurde ein spezifisches Amplikon für die Leberproben detektiert, jedoch konnte auch mit dieser Methode keine Amplifizierung für die VSMC festgestellt werden, lediglich unspezifische Amplifizierungsprodukte, die ebenfalls in der Wasserprobe detektiert wurden, konnten nachgewiesen werden (Abbildung 3.23).

Für die Überprüfung, ob die Expression von HMWK durch äußere Stimuli abhängig ist und HMWK in VSMC nicht konstitutiv exprimiert wird, wurden VSMC Proben aus BN und BN/Ka für verschiedene Zeiträume (30 Minuten, 2 h, 6 h, 24 h) sowohl mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail stimuliert als auch mit unterschiedlichen Konzentrationen von HMWK ko-stimuliert.

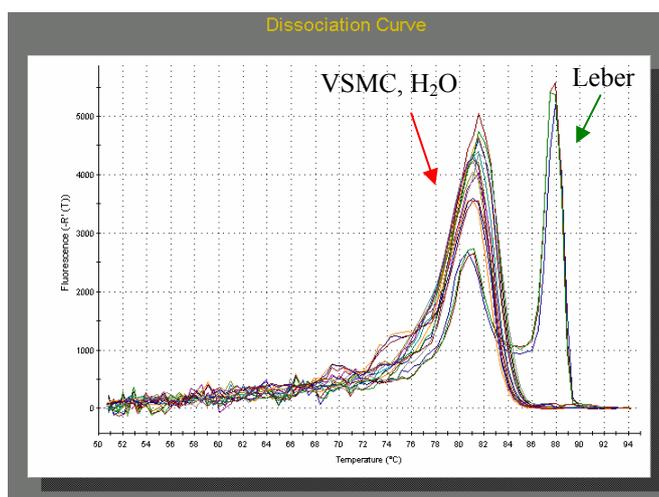


**Abbildung 3.24: HMWK mRNA Expression in Leber und stimulierten VSMC.**

Real-Time PCR Analyse der mRNA Expression von HMWK in Gewebeproben aus Leber und stimulierten Proben (Apoptose 0.5 bis 24 h unter Ko-Stimulation mit 1 nM bis 100 nM HMWK) VSMC von BN und BN/Ka. **(A)** Detektion der Positivkontrolle Leber im Vergleich zu dem unspezifischen Peak von einer VSMC-Probe und H<sub>2</sub>O. **(B)** Stimulierte Proben von VSMC und H<sub>2</sub>O.

Die real-time PCR Analyse unter Verwendung eines hochsensitiven SYBR GreenI<sup>®</sup> Firmenmixes ergab wie auch schon in den vorangegangenen Experimenten lediglich ein spezifisches Amplikon für die Leberprobe (Abbildung 3.24 A). Für VSMC wurde kein spezifisches Amplikon, sondern erneut nur ein unspezifisches Signal detektiert, welches im gleichen Temperaturbereich wie das der *no template control*-Probe (NTC) gemessen wurde (Abbildung 3.24 B).

Anschließend wurde noch die systemische Antwort auf eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) getestet. Dafür wurde zunächst Ratten des Stammes BN mit 10 bzw. 25 mg/kg Körpergewicht LPS gespritzt. Nach 24 h wurden die Aorten entnommen. Die Aorten wurden in zwei äquivalente Teile zerteilt und ein Teil wurde bis zum Erhalt des glatten Muskelschlauches präpariert. Nach Isolation der RNA wurde zunächst wieder auf die Expression von HMWK unter Gebrauch von Leber-RNA als Positivkontrolle getestet.

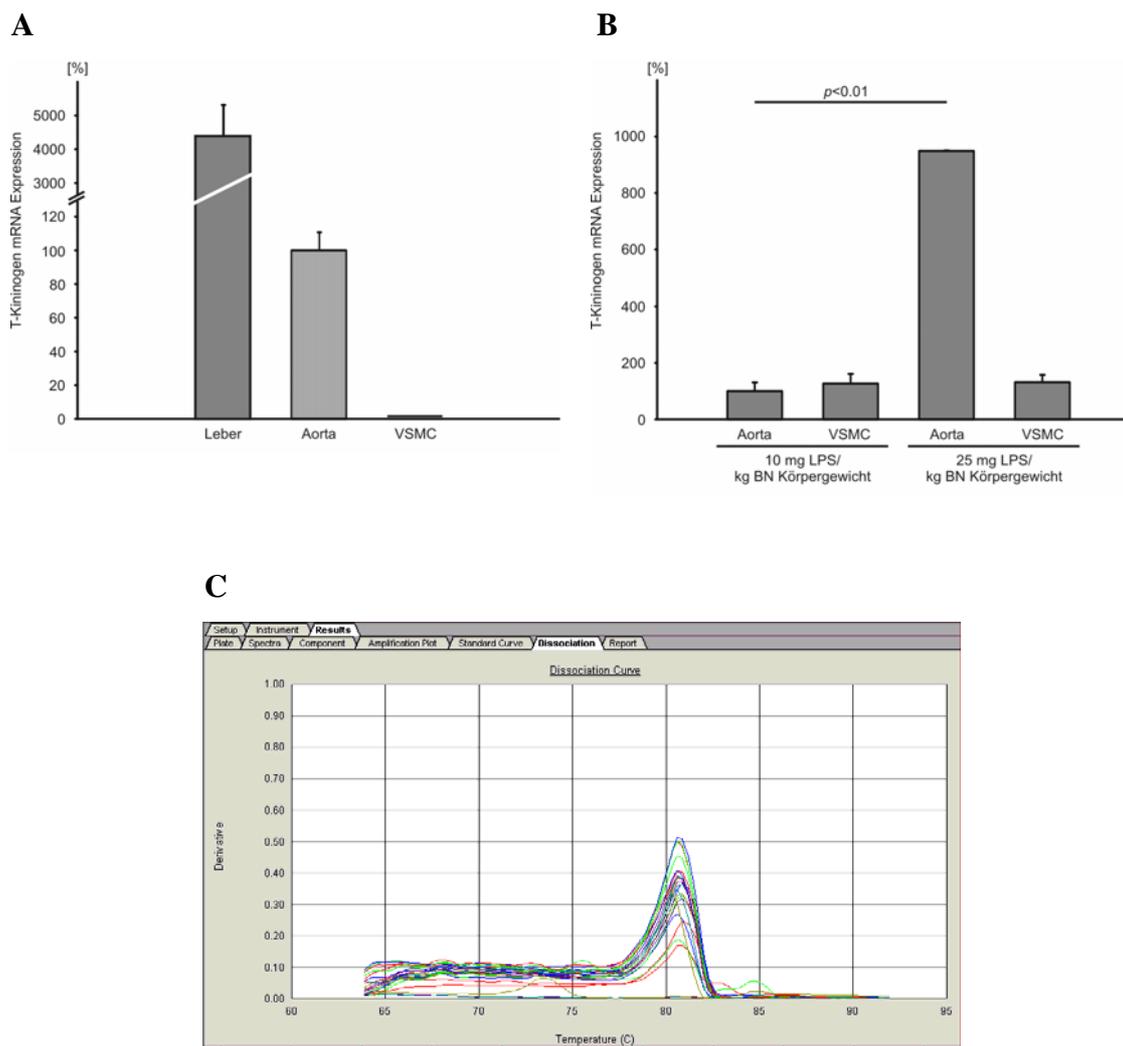


**Abbildung 3.25: HMWK mRNA Expression in Leber und VSMC nach Stimulation mit LPS.**

Real-Time PCR Analyse der mRNA Expression von HMWK in Gewebeproben aus Leber, Aorta und VSMC von BN. BN Ratten wurden für 24 h mit 10 bzw. 25 mg Lippolysacchariden pro kg Körpergewicht behandelt und die Aorta entnommen.

Wie in Abbildung 3.25 zu erkennen, konnte nur ein spezifischer Peak für die Kontrollprobe (Leber) detektiert werden.

Da LPS *in vivo* Entzündungsreaktionen auslöst und in Ratten T-Kininogen als Akut-Phase-Protein zirkuliert, wurde ebenfalls mittels Real-Time PCR die Expression von T-Kininogen bestimmt und auf die stabil exprimierte ribosomale RNA 18s bezogen.



**Abbildung 3.26: T-Kininogen mRNA Expression in Leber, Aorta und VSMC.**

Real-Time PCR Analyse der mRNA Expression von T-Kininogen in Gewebeproben aus Leber, Aorta und VSMC von BN. **(A)** Basale Expression in Leber, Aorta und VSMC. BN Ratten wurden für 24 h mit 10 bzw. 25 mg Lippolysacchariden pro kg Körpergewicht behandelt und die Aorta entnommen. **(B)** Auswertung der Regulation der T-Kininogen mRNA Expression. **(C)** Aufnahme der Dissoziationskurve.

Wie in Abbildung 3.26 A ersichtlich, wurde unter basalen Bedingungen eine sehr starke Expression in der Leberprobe und eine schwache Expression in der Aorta gefunden. Ebenfalls wurde eine extrem schwache Expression in den VSMC detektiert. In den Proben aus den Ratten, die mit 10 mg/kg Körpergewicht LPS stimuliert wurden, konnte in den Proben aus VSMC die gleiche geringe Expression von T-Kininogen wie in der Gesamtaorta gefunden werden (Abbildung 3.26 B). Durch eine Erhöhung der LPS-Dosis auf 25 mg/kg Körpergewicht konnte die T-Kininogen-Expression in den Proben

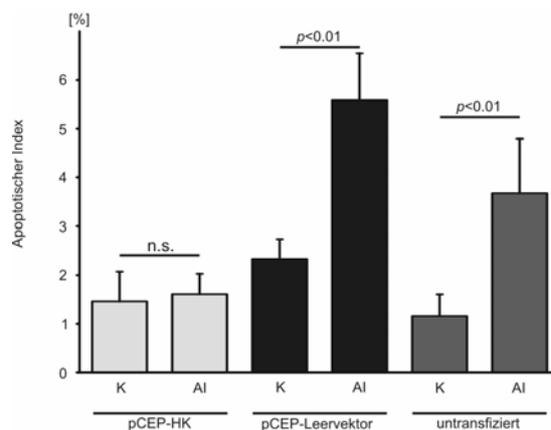
der Gesamtaorta weiter signifikant induziert werden, wohingegen in den VSMC keine weitere Erhöhung detektiert wurde (Abbildung 3.26 B).

### **3.13. Inhibierung der Apoptose durch die Transfektion von VSMC zur endogenen HMWK-Produktion**

Aufgrund der vorangegangenen Experimente stellte sich nun die Frage, ob in VSMC durch eine endogene Produktion von HMWK der Verlauf der Apoptose beeinflusst werden kann.

In Vorexperimenten wurde die Transfektions-Effizienz der verschiedenen primären VSMC getestet. Dabei zeigte sich, dass die VSMC aus den Ratten sehr schlecht bzw. nicht transfizierbar waren (Transfektionsrate < 5%). Die humanen VSMC hingegen zeigten eine sehr gute Transfizierbarkeit (Transfektionsrate > 50%). In den Experimenten zur Bestimmung des apoptotischen Index konnte das gleiche Verhalten der humanen VSMC gegenüber dem apoptotischen Stimulus und der Ko-Stimulation mit HMWK gezeigt werden (siehe 3.4, Abbildung 3.9), woraufhin diese Zellen für das Transfektionsexperiment gewählt wurden.

Für die endogene Produktion von HMWK wurde ein Klon des pCEP Expressionsvektors generiert, der die komplette Sequenz für die Produktion von humanem HMWK enthält (siehe 2.2.3.6.). Nach der Transfektion wurden hAoSMC für 24 h mit Hungermedium kultiviert und anschließend für 1 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail behandelt. Als Kontrollen diente die Transfektion mit dem leeren pCEP-Expressionsvektor, als auch untransfizierte Zellen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Bestimmungen.

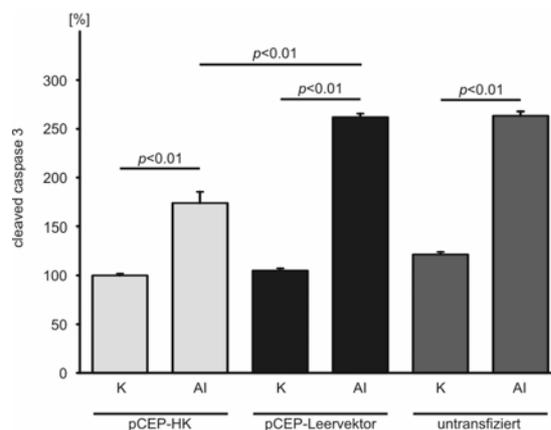


**Abbildung 3.27: Inhibitorischer Effekt von HMWK auf den apoptotischen Index in VSMC.**

Bestimmung des apoptotischen Indexes in hAoSMC. Die hAoSMC wurden mit dem HMWK-Expressionsvektor (pCEP-HK) bzw. mit dem Leervektor (pCEP-Leervektor) transfiziert oder blieben unbehandelt. Nachfolgend wurden die Zellen der verschiedenen Gruppen für 1 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail behandelt. Die Zellen wurden mit 4 %iger Paraformaldehydlösung fixiert und die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt.

Wie in Abbildung 3.27 erkennbar, wurde in der kurzen Apoptoseinduktionszeit für die Bestimmung des apoptotischen Indexes die Apoptoserate in den HMWK-transfizierten Zellen nicht signifikant erhöht. Dagegen war eine deutliche Zunahme des apoptotischen Indexes in den mit dem Leervektor transfizierten als auch in den untransfizierten Zellen zu verzeichnen.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde ebenfalls die Aktivierung der zentralen Effektor-Caspase - Caspase-3 - untersucht. Dafür wurden transfizierte hAoSMC für 6 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail stimuliert. Als Kontrollen dienten erneut transfizierte hAoSMC mit dem leeren pCEP-Expressionsvektors, als auch untransfizierte Zellen. Die Abbildung 3.28 zeigt die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

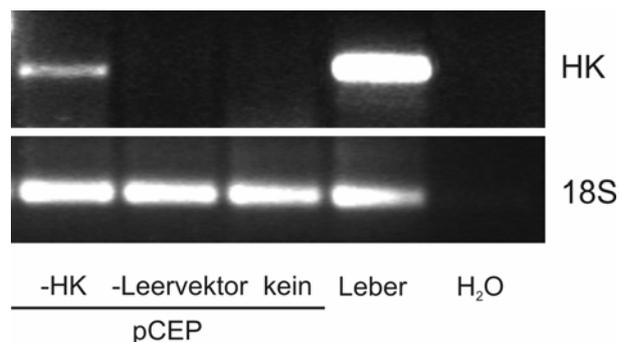


**Abbildung 3.28: Inhibitorischer Effekt von HMWK-Vektor auf die Apoptoseinduktion in VSMC.**

Western Blot Analyse von Cleaved Caspase-3 in hAoSMC. Die hAoSMC wurden mit dem HMWK-Expressionsvektor (pCEP-HK) bzw. mit dem Leervektor (pCEP-Leervektor) transfiziert oder blieben unbehandelt. Nachfolgend wurden die Zellen der verschiedenen Gruppen für 6 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail behandelt.

In allen drei Behandlungsgruppen wurde Caspase-3 durch die Behandlung mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail aktiviert. In den HWMK-transfizierten VSMC fiel diese Aktivierung jedoch signifikant geringer aus, als in den Kontroll-Gruppen.

Zur Überprüfung des Transfektionserfolges wurde aus VSMC die mit dem HMWK- oder dem leeren Expressionsvektor transfiziert bzw. die untransfiziert waren, nach der 24 stündigen Behandlung mit Hungermedium (nach der Transfektion) die RNA isoliert und mittels semi-quantitativer RT-PCR auf die Expression von HMWK hin untersucht. Als Positivkontrolle diente aus humaner Leber isolierter mRNA-Extrakt mit nachweisbarer HMWK-Expression.



**Abbildung 3.29: HMWK mRNA Expression in hAoSMC mit HMWK-Expressionsvektor.**

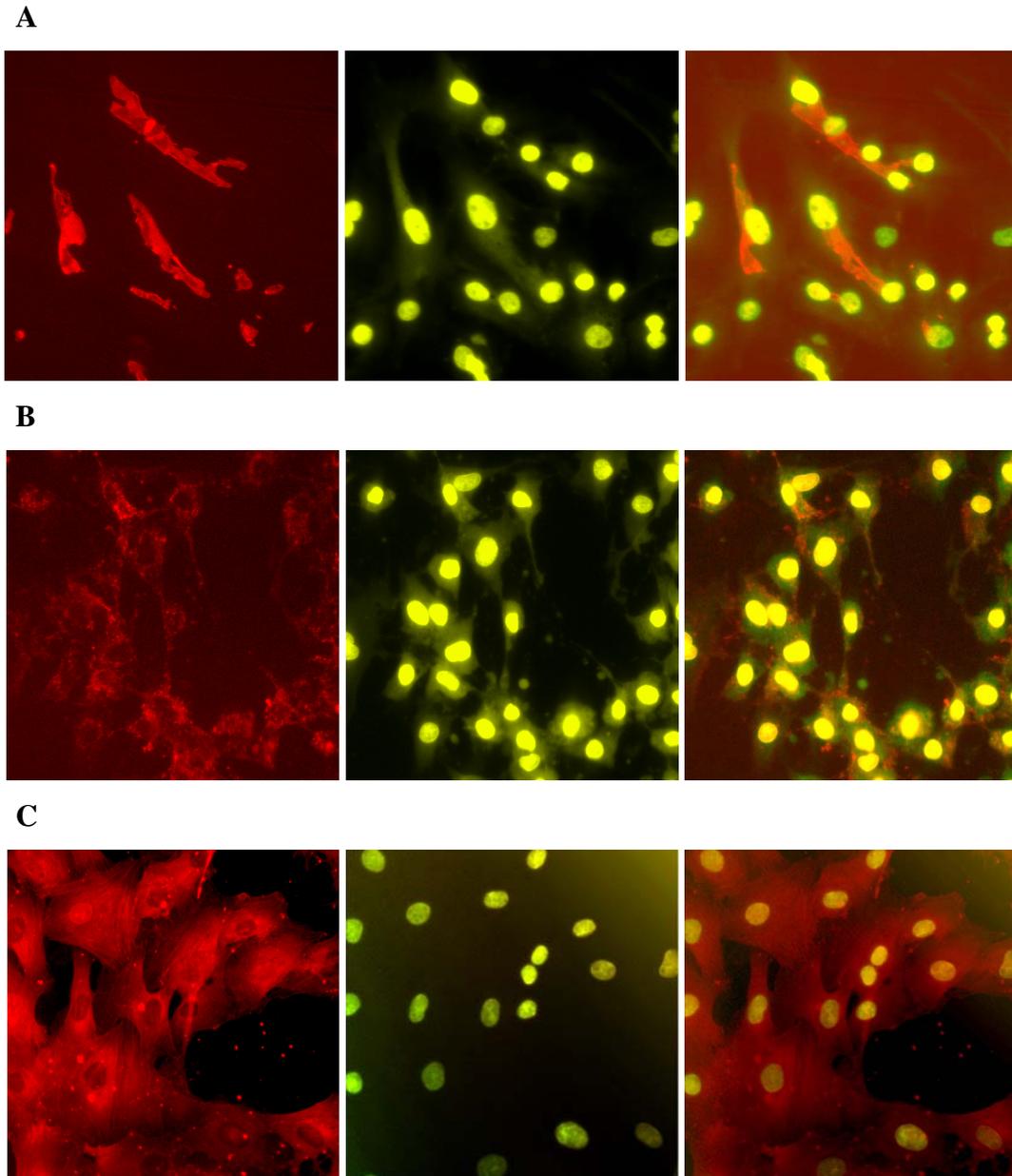
RT-PCR Analyse der mRNA Expression von HMWK in hAoSMC nach Transfektion mit dem HMWK-Expressionsvektor (pCEP-HK) bzw. dem Leervektor (pCEP-Leervektor) als auch untransfizierten Zellen. Als Positivkontrolle diente die RNA-Isolation aus humaner Leber.

Wie in Abbildung 3.29 ersichtlich ist, konnte in dem Leberextrakt eine sehr starke Expression von HMWK nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde eine schwächere Expression in den mit dem HMWK-Expressionvektor transfizierten VSMC gefunden. In den untransfizierten Zellen bzw. in den Zellen transfiziert mit dem leeren Expressionsvektor konnte keine Expression von HMWK nachgewiesen werden, was mit den Ergebnissen in VSMC aus Ratten übereinstimmend war.

### 3.14. Zelluläre Aufnahme von HMWK in VSMC

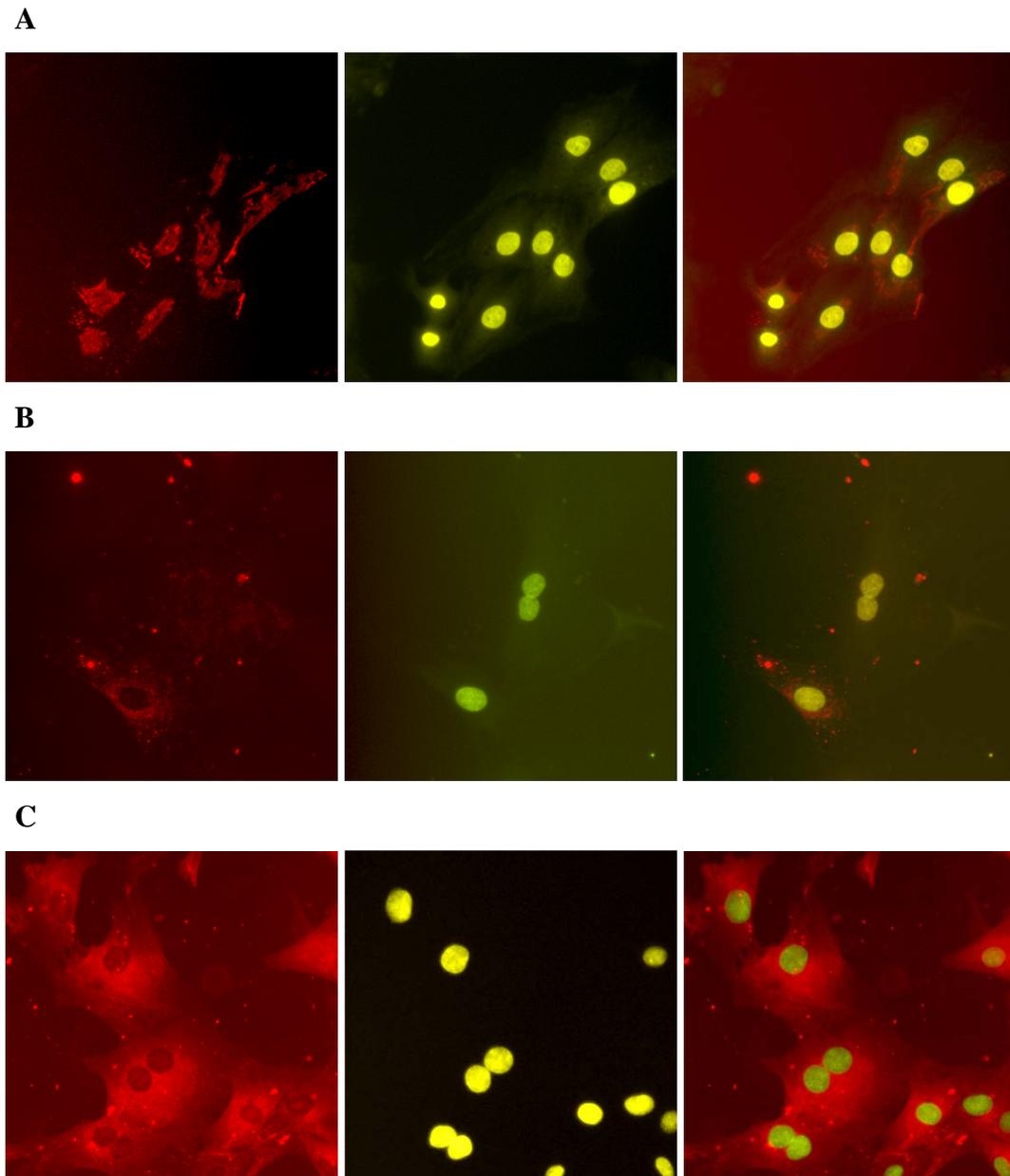
#### 3.14.1. Zeitabhängige zelluläre Aufnahme von HMWK

In den nachfolgenden Experimenten sollte geklärt werden, in welche Wechselwirkung HMWK mit den VSMC geht und wo es sich nach erfolgter Stimulation lokalisiert. Dafür wurde zunächst das zur Ko-Stimulation benutzte HMWK mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und VSMC für 2 Minuten bis 24 h mit 100 nM HMWK<sup>markiert</sup> inkubiert. Die Erhöhung der Konzentration wurde wegen der visuellen Erfassungsgrenze des Fluoreszenzmikroskopes notwendig. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen repräsentative Fotos aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.



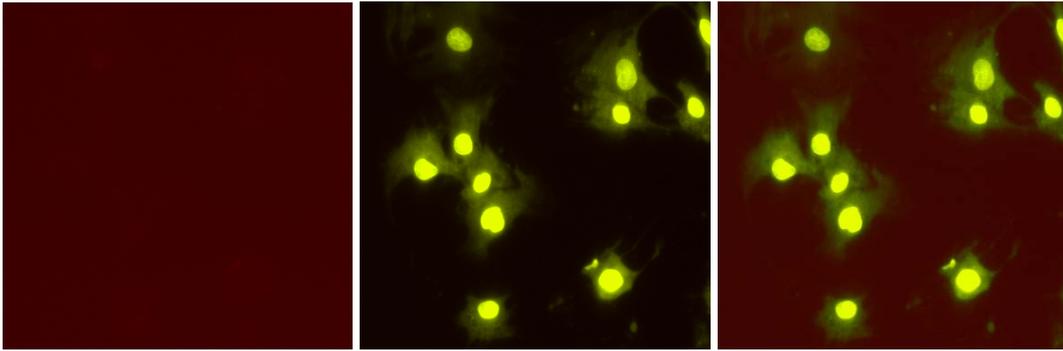
**Abbildung 3.30: Zeitabhängige Aufnahme von HMWK in VSMC von BN/Ka.**

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Aufnahme von HMWK nach Fluoreszenzmarkierung des Proteins (Vergrößerung x20). VSMC von BN/Ka wurden für die Zeiträume 2 min (**A**), 12 h (**B**) und 24 h (**C**) mit HMWK<sup>markiert</sup> inkubiert und die Reaktion durch Fixierung der Zellen für 10 min mit 2 %iger Paraformaldehydlösung, die ebenfalls Hoechst 33342 enthielt, gestoppt. Repräsentative Bilder von der HMWK-Fluoreszenz (rot, links), Kernfärbung mit Hoechst 33342 (grün, mitte) und überlagerten Bildern (merge, rechts) sind gezeigt. Als Negativkontrolle diente jeweils die Inkubation mit unmarkiertem HMWK bzw. reinem Inkubationsmedium (DMEM mit 1 % FBS).



**Abbildung 3.31: Zeitabhängige Aufnahme von HMWK in VSMC von BN.**

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Aufnahme von HMWK nach Fluoreszenzmarkierung des Proteins (Vergrößerung x20). VSMC von BN wurden für die Zeiträume 2 min (**A**), 12 h (**B**) und 24 h (**C**) mit HMWK<sup>markiert</sup> inkubiert und die Reaktion durch Fixierung der Zellen für 10 min mit 2 %iger Paraformaldehydlösung, die ebenfalls Hoechst 33342 enthielt, gestoppt. Repräsentative Bilder von der HMWK-Fluoreszenz (rot, links), Kernfärbung mit Hoechst 33342 (grün, mitte) und überlagerten Bildern (merge, rechts) sind gezeigt. Als Negativkontrolle diente jeweils die Inkubation mit unmarkiertem HMWK bzw. reinem Inkubationsmedium (DMEM mit 1 % FBS).

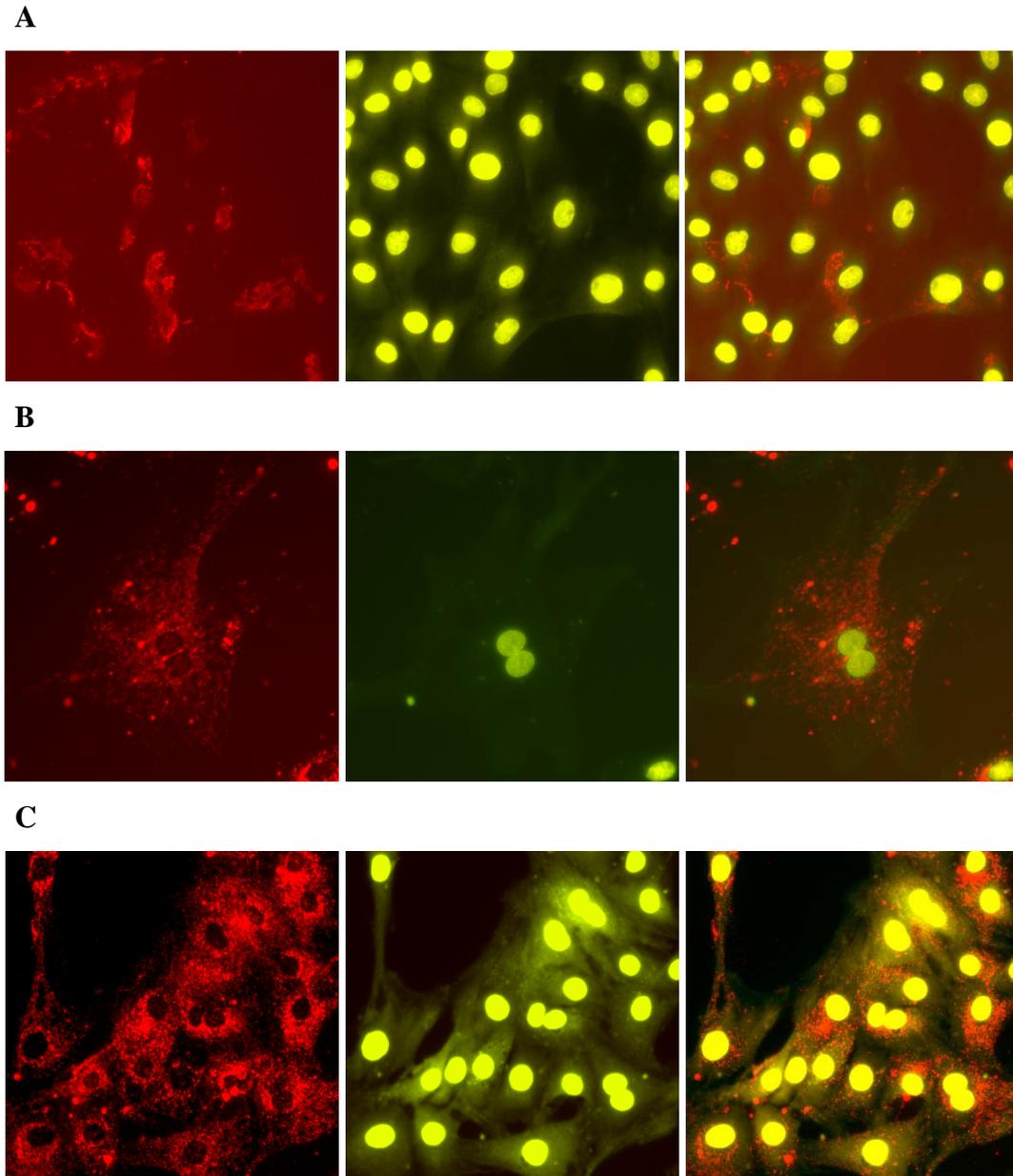


**Abbildung 3.32: Repräsentatives Beispiel der Negativkontrolle für die Aufnahme von HMWK in VSMC.**

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Aufnahme von HMWK nach Fluoreszenzmarkierung des Proteins (Vergrößerung x20). VSMC von BN und BN/Ka wurden für die Zeiträume 2 min, 12 h und 24 h mit HMWK<sup>markiert</sup> inkubiert und die Reaktion durch Fixierung der Zellen für 10 min mit 2 %iger Paraformaldehydlösung, die ebenfalls Hoechst 33342 enthielt, gestoppt. Als Negativkontrolle diente jeweils die Inkubation mit unmarkiertem HMWK bzw. reinem Inkubationsmedium (DMEM mit 1 % FBS). Repräsentative Bilder für die Negativkontrollen sind gezeigt; jeweils Bild mit Fluoreszenzfilter im Wellenbereich von HMWK<sup>markiert</sup> (links), Kernfärbung mit Hoechst 33342 (grün, mitte) und überlagertes Bild (merge, rechts).

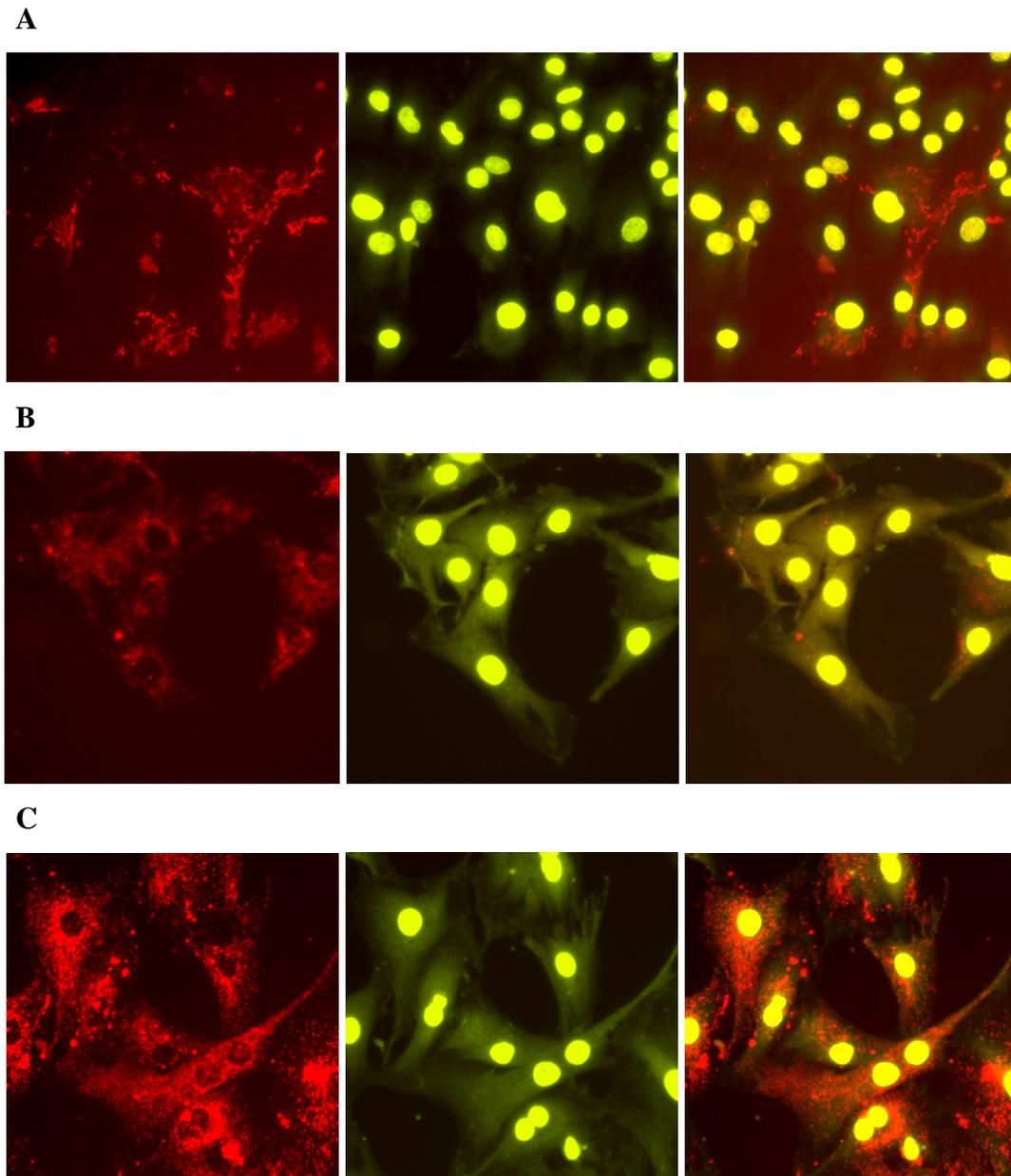
Wie in den Abbildung 3.30 und Abbildung 3.31 ersichtlich erfolgte sowohl in VSMC aus BN als auch aus BN/Ka eine sehr schnelle Oberflächenbindung nach 2 Minuten Inkubation mit HMWK<sup>markiert</sup>, erkennbar durch kompakte Farbflächen, die sich auf den Oberflächen der Zellen lokalisierten (Abbildung 3.30 A, Abbildung 3.31 A). Nach 12 stündiger Inkubation war eine schwache vesikuläre Verteilung innerhalb der Zellen zu finden (Abbildung 3.30 B, Abbildung 3.31 B), die sich nach 24 h in eine stark sichtbare diffuse Verteilung innerhalb der Zellen umwandelte (Abbildung 3.30 C, Abbildung 3.31 C). Durch die Aussparung der Zellkerne wurde eine zytotolische Verteilung des HMWK<sup>markiert</sup> angenommen. Als Negativkontrolle diente jeweils die Inkubation mit unmarkiertem HMWK bzw. reinem Inkubationsmedium (DMEM mit 1 % FBS). Es konnte jeweils keine Eigenfluoreszenz von HMWK bzw. Streufluoreszenz der Fixierung und Färbung mit Hoechst 33342 detektiert werden, wie beispielhaft in Abbildung 3.32 dargestellt ist.

Es wurde ebenfalls untersucht, ob das zweikettige HKa eine gleiche Zell-Lokalisation einnimmt. Dafür wurde rekombinantes HKa ebenfalls mit Fluoreszenzfarbstoff markiert und VSMC aus BN und BN/Ka dem gleichen Versuchsprotokoll unterzogen, wie oben beschrieben. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen repräsentative Fotos aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.



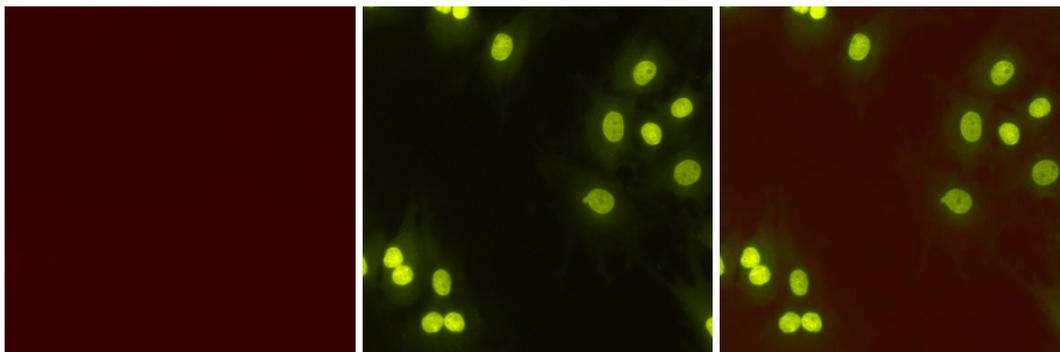
**Abbildung 3.33: Zeitabhängige Aufnahme von HKa in VSMC von BN/Ka.**

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Aufnahme von HKa nach Fluoreszenzmarkierung des Proteins (Vergrößerung x20). VSMC von BN/Ka wurden für die Zeiträume 2 min (**A**), 12 h (**B**) und 24 h (**C**) mit HKa<sup>markiert</sup> inkubiert und die Reaktion durch Fixierung der Zellen für 10 min mit 2 %iger Paraformaldehydlösung, die ebenfalls Hoechst 33342 enthielt, gestoppt. Repräsentative Bilder von der HKa-Fluoreszenz (rot, links), Kernfärbung mit Hoechst 33342 (grün, mitte) und überlagerten Bildern (merge, rechts) sind gezeigt. Als Negativkontrolle diente jeweils die Inkubation mit unmarkiertem HKa bzw. reinem Inkubationsmedium (DMEM mit 1 % FBS).



**Abbildung 3.34: Zeitabhängige Aufnahme von HKa in VSMC von BN.**

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Aufnahme von HKa nach Fluoreszenzmarkierung des Proteins (Vergrößerung x20). VSMC von BN wurden für die Zeiträume 2 min (**A**), 12 h (**B**) und 24 h (**C**) mit HKa<sup>markiert</sup> inkubiert und die Reaktion durch Fixierung der Zellen für 10 min mit 2 %iger Paraformaldehydlösung, die ebenfalls Hoechst 33342 enthielt, gestoppt. Repräsentative Bilder von der HKa-Fluoreszenz (rot, links), Kernfärbung mit Hoechst 33342 (grün, mitte) und überlagerten Bildern (merge, rechts) sind gezeigt. Als Negativkontrolle diente jeweils die Inkubation mit unmarkiertem HKa bzw. reinem Inkubationsmedium (DMEM mit 1 % FBS).



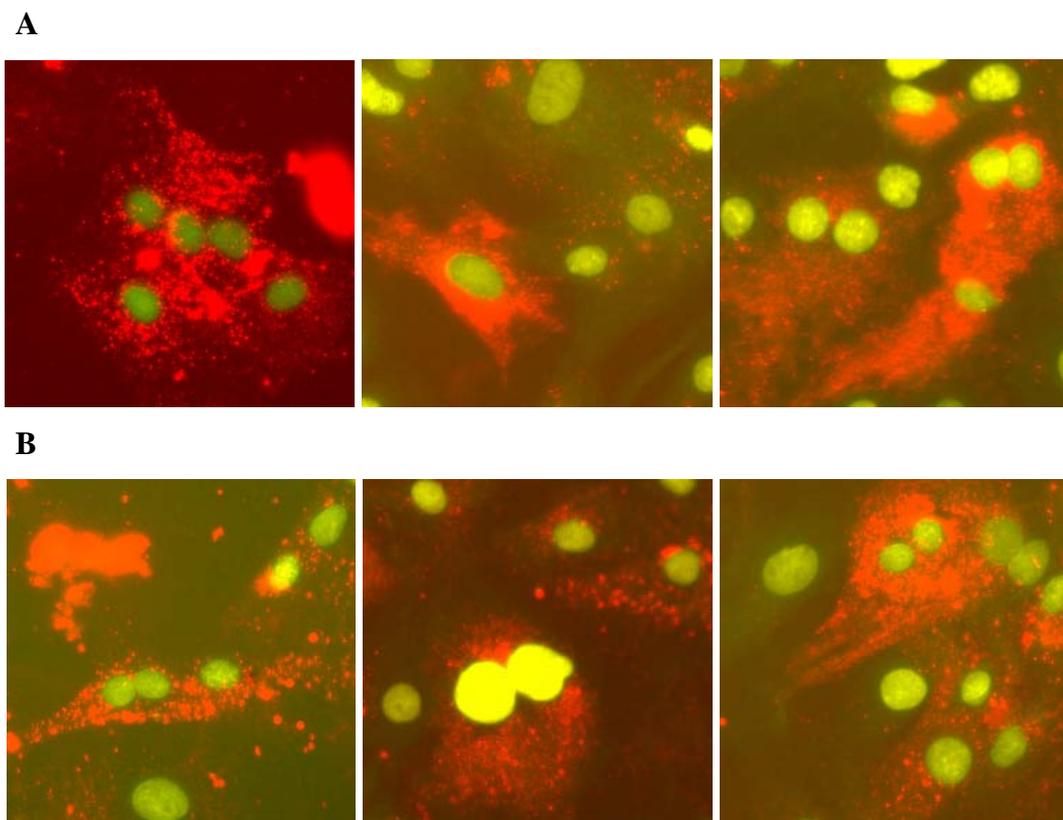
**Abbildung 3.35: Repräsentatives Beispiel der Negativkontrolle für die Aufnahme von HKa in VSMC.**

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Aufnahme von HKa nach Fluoreszenzmarkierung des Proteins (Vergrößerung x20). VSMC von BN und BN/Ka wurden für die Zeiträume 2 min, 12 h und 24 h mit  $\text{HMWK}^{\text{markiert}}$  inkubiert und die Reaktion durch Fixierung der Zellen für 10 min mit 2 %iger Paraformaldehydlösung, die ebenfalls Hoechst 33342 enthielt, gestoppt. Als Negativkontrolle diente jeweils die Inkubation mit unmarkiertem HKa bzw. reinem Inkubationsmedium (DMEM mit 1 % FBS). Repräsentative Bilder für die Negativkontrollen sind gezeigt; jeweils Bild mit Fluoreszenzfilter im Wellenbereich von  $\text{HKa}^{\text{markiert}}$  (links), Kernfärbung mit Hoechst 33342 (grün, mitte) und überlagertes Bild (merge, rechts).

$\text{HKa}^{\text{markiert}}$  wurde nach 2 Minuten an die Oberflächen der VSMC gebunden (Abbildung 3.33 A, Abbildung 3.34 A) mit einem ähnlichen Bindungsmuster, die schon bei den Experimenten mit  $\text{HMWK}^{\text{markiert}}$  gefunden wurden. In den VSMC von BN und BN/Ka wurde nach 12 h Inkubation ebenfalls eine vesikuläre Verteilung innerhalb der Zellen gefunden, erkennbar durch eine schwache gepunktete Verteilung unter Aussparung der Zellkerne (Abbildung 3.33 B, Abbildung 3.34 B). Die intrazelluläre Verteilung von  $\text{HKa}^{\text{markiert}}$  nahm nach 24 h Inkubation an Intensität zu, allerdings zeigte sich eine Mischung aus schwacher diffuser Fluoreszenz und vesikulärer Verteilung (Abbildung 3.33 C, Abbildung 3.34 C), die allerdings auch durch die deutlich stärkere Markierungseffizienz bedingt sein könnte. Als Negativkontrolle diente erneut die Inkubation mit unmarkiertem HKa bzw. reinem Inkubationsmedium (DMEM mit 1 % FBS). Wie auch bei HMWK konnte keine Eigenfluoreszenz von HKa bzw. Streufluoreszenz der Fixierung und Färbung mit Hoechst 33342 detektiert werden, wie beispielhaft in Abbildung 3.35 dargestellt ist.

### 3.14.2. Irreversibilität der zellulären Aufnahme von HMWK

Für die Untersuchung, ob die zelluläre Aufnahme von HMWK reversibel ist, wurden VSMC von BN und BN/Ka erneut für 24 Stunden mit 100 nM HMWK<sup>markiert</sup> inkubiert. Die VSMC wurden mit PBS gewaschen und für 24 Stunden bzw. 48 Stunden mit Hungermedium re-inkubiert. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen repräsentative Fotos aus jeweils 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.



**Abbildung 3.36: Reversibilität der Aufnahme von HMWK in VSMC von BN und BN/Ka**

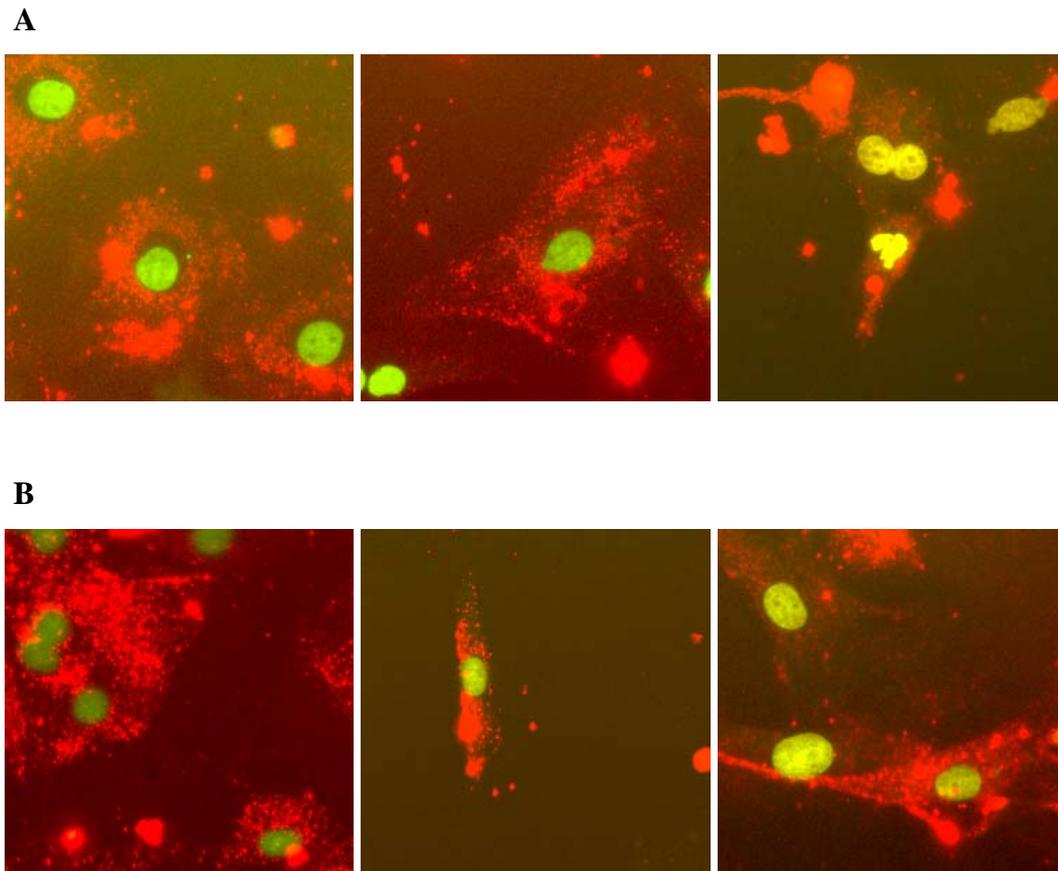
Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Aufnahme von HMWK nach Fluoreszenzmarkierung des Proteins (Vergrößerung x20). VSMC von BN (A) und BN/Ka (B) wurden für 24 h mit HMWK<sup>markiert</sup> inkubiert (links) und für 24 h (mitte) bzw. 48 h (rechts) mit Hungermedium re-inkubiert. Die Reaktion wurde durch Fixierung der Zellen für 10 min mit 2 %iger Paraformaldehydlösung, die ebenfalls Hoechst 33342 enthielt, gestoppt. Repräsentative überlagerte Bilder (merge) von der HK-Fluoreszenz (rot) und Kernfärbung mit Hoechst 33342 (grün) sind gezeigt.

Wie in der Abbildung 3.36 ersichtlich zeigte sich eine gleichbleibende Intensität der Aufnahme von HMWK<sup>markiert</sup>. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den Proben, die für 24 h bzw. 48 h mit reinem Medium reinkubiert wurden, festgestellt.

### **3.14.3. Keine Blockierung der Aufnahme von HMWK durch Endozytose-Inhibitor**

Die Endozytose stellt einen wichtigen Aufnahmemechanismus von Zellen für extrazelluläres Material dar. Die Beteiligung der Endozytose kann durch eine Vorbehandlung der Zellen mit Endozytose-Inhibitoren untersucht werden. In einer Vorversuchsreihe wurden VSMC aus BN und BN/Ka mit verschiedenen Konzentrationen von dem Endozytose-Inhibitor Phenylarsinoxid (PAO) für 24 h behandelt (10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM, 1 nM). Es zeigte sich eine Toxizität für die Zellen ab der Konzentration 1  $\mu$ M, so dass für weitere Experimente 10 und 100 nM PAO eingesetzt wurden.

Die VSMC wurden für 24 h mit 10 bzw. 100 nM PAO bzw. mit Hungermedium für die Kontrollgruppe vorbehandelt. Danach wurden jeweils 100 nM HMWK<sup>markiert</sup> hinzugefügt und die VSMC erneut für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben fixiert. Die nachfolgenden Abbildung 3.37 zeigt repräsentative Fotos aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.



**Abbildung 3.37: Blockierung der zellulären Aufnahme von HMWK mit dem Endozytose-Inhibitor Phenylarsin Oxid**

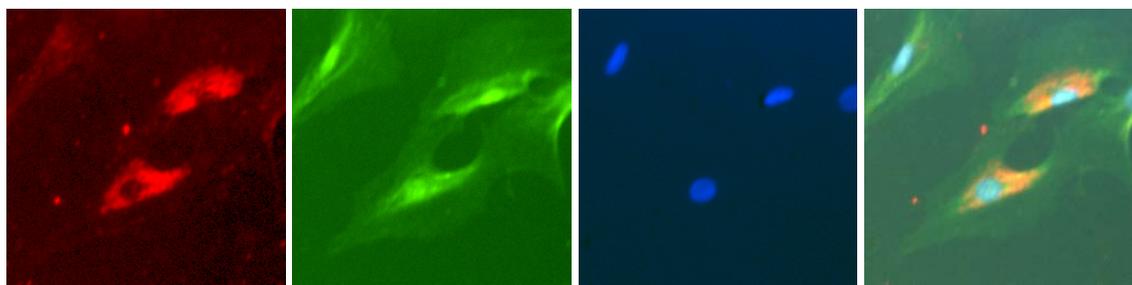
Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Aufnahme von HMWK nach Fluoreszenzmarkierung des Proteins (Vergrößerung x20). VSMC von BN (**A**) und BN/Ka (**B**) wurden für 24 h mit Hungermedium (links), 10 nM PAO (mitte) bzw. 100 nM PAO (rechts) prä-inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen für weitere 24h mit HMWK<sup>markiert</sup> inkubiert. Die Reaktion wurde durch Fixierung der Zellen für 10 min mit 2 %iger Paraformaldehydlösung, die ebenfalls Hoechst 33342 enthielt, gestoppt. Repräsentative überlagerte Bilder (merge) von der HMWK-Fluoreszenz (rot) und Kernfärbung mit Hoechst 33342 (grün) sind gezeigt.

Die Inkubation der VSMC mit HMWK<sup>markiert</sup> ohne Vorbehandlung mit PAO zeigte die bereits bekannte zelluläre Aufnahme. Eine Vorbehandlung mit 10 nM PAO zeigte keine Unterschiede in der Intensität und Verteilung zu der Kontrollgruppe, wohingegen nach der Vorbehandlung mit 100 nM eine geringfügig schwächere Fluoreszenzintensität bei gleicher intrazellulärer Verteilung gefunden wurde.

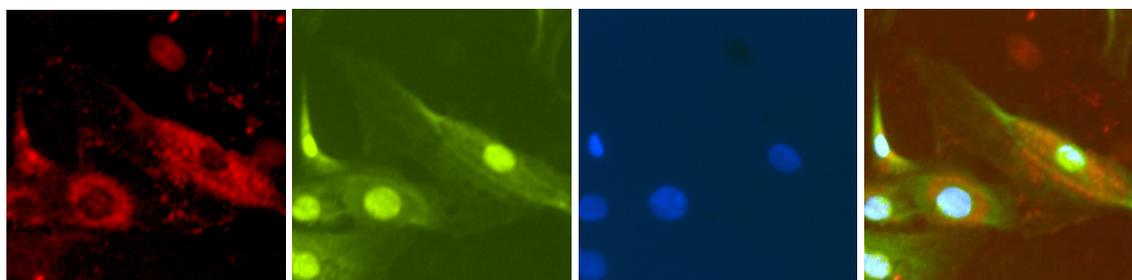
### 3.14.4. Kolokalisation von HMWK mit aktiven apoptotischen Proteasen

In einem weiteren Experiment sollte geklärt werden, ob nach apoptotischer Induktion das intrazelluläre HMWK mit den durch Apoptose aktivierten Formen der Proteasen kolokalisiert. VSMC von BN und BN/Ka wurden für 24 h mit HMWK<sup>markiert</sup> inkubiert, anschließend für 6 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail behandelt und nachfolgend dem Protokoll für Immunzytofluoreszenz (siehe 2.2.2.5) unterzogen.. Als repräsentative Vertreter für die zu untersuchenden Proteasen-Gruppen wurde Caspase-3 und Cathepsin B gewählt. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen repräsentative Fotos aus 3 unabhängig durchgeführten Experimenten.

**A**



**B**

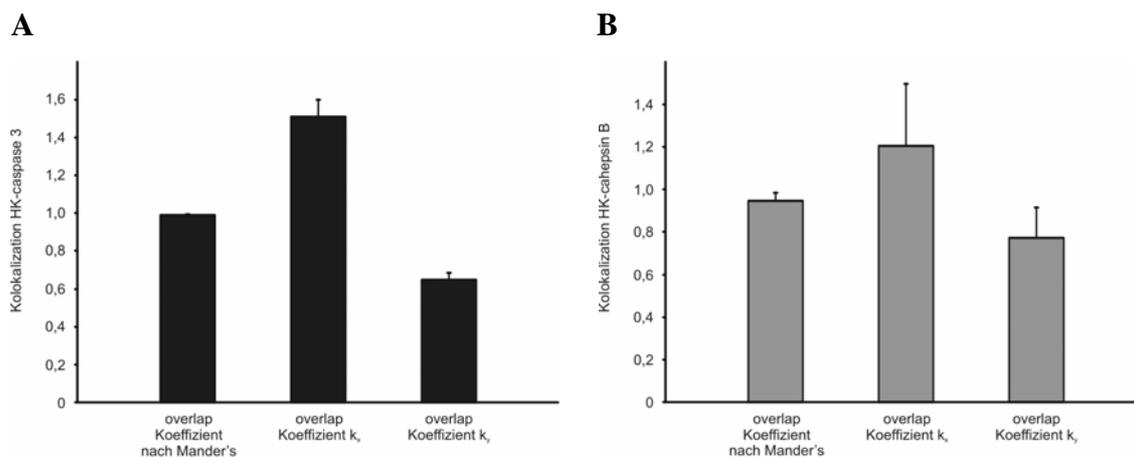


**Abbildung 3.38: Kolokalisation von HMWK mit Caspase-3 bzw. Cathepsin B**

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Kolokalisation von HMWK nach Fluoreszenzmarkierung des Proteins und Immunzytofluoreszenz (Vergrößerung x20). VSMC von BN und BN/Ka wurden für 24 h mit HMWK<sup>markiert</sup> inkubiert und nachfolgend für 6 h mit dem Apoptoseinduktions-Cocktail behandelt. Mittels Immunzytofluoreszenz wurde auf cleaved Caspase-3 (**A**) und Cathepsin B (**B**) untersucht. Repräsentative Bilder von der HMWK-Fluoreszenz (rot, links), Caspase-3/Cathepsin B konjugiert mit FITC (grün, 2. v. links), Kernfärbung mit Hoechst 33342 (blau, 3. v. links) und überlagerten Bildern (merge, rechts) sind gezeigt.

Die Fluoreszenzanalyse der verschiedenen Proteine (Abbildung 3.38) ergab für HMWK erneut eine zytosolische Verteilung innerhalb der VSMC. Dabei ergaben sich für VSMC von BN und BN/Ka keine Unterschiede. Sowohl Caspase-3 als auch Cathepsin B zeigten nach apoptotischer Stimulation eine starke Fluoreszenz im gesamten Zellgebiet. Als Negativkontrolle dienten nicht stimulierte Proben, die nur eine sehr schwache Hintergrundfluoreszenz zeigten, und allein mit dem 2. Antikörper inkubierte Proben, bei denen keine Fluoreszenz erkennbar war.

Bereits in der Überlagerung der Fluoreszenzbilder war eine deutliche Kollokalisierung der HMWK-Verteilung und aktiven Proteasen zu erkennen. Für die Verifizierung wurde die Berechnung verschiedener Überlappungs-Koeffizienten mit herangezogen. Der Überlappungskoeffizient nach Mander's ist eine generell akzeptierte Methode die Kollokalisierung zu berechnen. Er zeigt die Überlappung der Signale und damit das genaue Ausmaß der Kollokalisierung an. Die Werte sind in der Spanne von 0 bis 1.0 definiert, wobei ein Wert von 0.7 eine Überlappung von 70 % der beiden zu vergleichenden Komponenten wiedergibt. Die Überlappungskoeffizienten  $K_x$  und  $K_y$  teilen den Messwert der Kollokalisierung in zwei separate Parameter abhängig von der Summe der Produkte der Intensität der zwei Fluoreszenzkanäle auf. Daher sind diese Koeffizienten sensitiv gegenüber Unterschieden in der Intensität der zwei Signale und sollten parallel benutzt werden.<sup>181</sup> Abbildung 3.39 stellt die Auswertung der Kollokalisierung von HMWK mit Caspase-3 bzw. Cathepsin B dar.



**Abbildung 3.39: Überlappungskoeffizienten der Kolokalisation von HMWK mit Caspase-3 bzw. Cathepsin B**

Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Kolokalisation von HMWK nach Fluoreszenzmarkierung des Proteins und Immuncytofluoreszenz von cleaved Caspase-3 (A) und Cathepsin B (B).

Wie in der Abbildung erkennbar, kolokalisiert HMWK in einem sehr hohen Ausmaß mit den aktiven Proteasen (Caspase-3  $98,9 \pm 0,4$  % bzw. Cathepsin B  $94,6 \pm 3,8$  %). Dabei wird dieser Anteil vor allem durch eine sehr hohe Kolokalisation von HMWK mit Caspase-3/ Cathepsin B bestimmt, wie aus dem Überlappungsfaktor  $K_x$  ersichtlich ist. Die Bestimmung von dem Koeffizienten  $K_y$  ergab für Caspase-3 einen Kolokalisationsgrad von  $65,0 \pm 3,7$  % und für Cathepsin B von  $77,1 \pm 14,3$  %, d.h. in diesem Ausmaß überlagern sich die Pixel der Fluoreszenz der Proteasen mit denen von HMWK.