

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Philipps Universität Marburg

Schwerpunkt Kardiologie

Direktor: Prof. Dr. B. Maisch

Matrixmetalloproteinasen in humanen Endothelzellen

**- Produktion, Sekretion und Regulierung der endothelialen
Matrixmetalloproteinasen -**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Nils Ludwig aus Marburg

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am
18.08.2005

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: PD Dr. Christ

Correferent: Prof. Dr. Bertalanffy

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Matrixmetalloproteinasen	5
1.1.1	Struktur und Funktion der Matrixmetalloproteinasen	5
1.1.2	Einteilung der MMPs.....	6
1.1.3	Regulation der Aktivität der MMPs	7
1.1.4	Posttranslationale Aktivierung der MMPs	7
1.2	Die Atherosklerose	10
1.2.1	Pathogenese der Atherosklerose	10
1.2.2	Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf die Atherosklerose	12
1.2.3	Matrixmetalloproteinasen und Atherosklerose.....	15
1.3	Ziel der Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1.1	Präparation der HUVECs.....	17
2.1.2	Kulturmedium.....	17
2.1.3	Kultivierung der HUVEC und Passagierung	18
2.1.4	Wachstumskurven	19
2.1.5	Zellcharakterisierung	19
2.2	Stimulation	19
2.2.1	Vorbereitung der HUVECs.....	19
2.2.2	Stimulation der HUVECs	20
2.2.3	Aufbereitung der Proben.....	20
2.3	Material	20
2.3.1	Proteinbestimmung.....	20
2.3.2	Gelzusammensetzungen	21
2.3.2.1	Gelzusammensetzung (Zymographie).....	21
2.3.2.2	Gelzusammensetzung (Westernblot).....	21

2.3.3	ELISA.....	22
2.3.4	Lösungen und Puffer	22
2.3.4.1	Lösungen und Puffer (Zymographie).....	22
2.3.4.2	Lösungen und Puffer (Westernblots).....	22
2.3.5	Antikörper	23
2.3.6	Substanzen, Chemikalien, Gebrauchsgegenstände.....	23
2.4	Statistik	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Etablierung der Endothelzellkultur.....	25
3.1.1	Austestung verschiedener Medien	25
3.1.1.1	IMDM und Ham´s F12 als Nährmedium	25
3.1.2	M199 als Nährmedium.....	26
3.1.3	Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Endothelzellen	27
3.1.4	Beschichtung der Kulturgefäße	27
3.1.5	Zusammenfassung	28
3.2	MMP-Produktion in Endothelzellen	29
3.2.1	Nachweis von MMPs in der Gelatin-Zymographie.....	29
3.2.2	Nachweis von MMPs im Westernblot	30
3.2.3	Zeitabhängigkeit der pro-MMP-2 Bildung	32
3.3	Regulierung von MMP-2.....	33
3.3.1	Stimulation der MMP-Sekretion und der Aktivierung zum aktiven Enzym.....	33
3.3.1.1	Stimulatorischer Effekt von Bradykinin auf die pro-MMP-2 Sekretion	33
3.3.1.2	Anstieg des aktiven MMP-2 durch Effekte von PMA und IL-1 β	34
3.3.1.2.1	Zeitabhängige Aktivierung von pro-MMP-2 durch PMA und IL-1 β	34
3.3.1.2.2	Dosisabhängige Aktivierung von pro-MMP-2 durch PMA.....	36
3.3.1.2.3	Dosisabhängige Aktivierung von pro-MMP-2 durch IL-1 β	36
3.3.2	Inhibitoren der MMP-2 Sekretion und der Aktivierung zum aktiven Enzym.....	37

3.3.2.1	MMP-2 Synthesehemmung durch Cycloheximid	37
3.3.2.2	Hemmung des vesikalen Transportes von pro-MMP-2 durch Colchicin	38
3.3.3	Zusammenfassung	39
3.4	Modulation der MMP-2 Sekretion durch das Angiotensin-Aldosteron System	40
3.4.1	Einfluss von Aldosteron und Angiotensin auf MMP-2 in Endothelzellen	40
3.4.1.1	Stimulation der MMP-2 Sekretion durch Angiotensin und Aldosteron	40
3.4.1.1.1	Stimulation der MMP-2 Sekretion durch Angiotensin und Aldosteron, Ergebnisse des Elisa	40
3.4.1.1.2	Antagonisierung der Wirkung von Aldosteron beziehungsweise Angiotensin.....	43
3.4.1.1.3	Stimulation der MMP-2 Sekretion durch Angiotensin und Aldosteron, Nachweis in der Zymographie	44
3.4.1.1.4	Stimulation der MMP-2 Sekretion durch Angiotensin und Aldosteron, Nachweis im Westernblot	45
3.4.1.1.5	Zusammenfassung	47
4	Diskussion	48
4.1	Etablierung der Zellkultur	48
4.2	MMP-Produktion in Endothelzellen	49
4.3	Regulierung von MMP-2	49
4.3.1	Einfluss von Bradykinin auf das MMP-2 System	49
4.3.2	Einfluss von PMA auf das MMP-2 System	50
4.3.3	Einfluss von Interleukin-1 beta auf das MMP-2 System	51
4.3.4	Einfluss von Cycloheximid auf das MMP-2 System.....	52
4.3.5	Einfluss von Colchicin auf das MMP-2 System	52
4.4	Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf die Matrixmetalloproteinasen.....	53
4.4.1	Angiotensin, Aldosteron, Atherosklerose und MMP-2	53
4.4.2	Stimulation der endothelialen MMP-2 Sekretion durch Angiotensin und Aldosteron.....	54

4.4.3	Einfluss von Angiotensin und Aldosteron auf das MMP-2 System	55
4.5	Zusammenfassung und Ausblick	58
5	Zusammenfassung.....	59
	Abkürzungen	61
	Literaturverzeichnis	62
	Danksagungen	74
	Verzeichnis der akademischen Lehrer	75

1 Einleitung

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) gehören zu der Familie der Endopeptidasen und sind durch die Fähigkeit charakterisiert, die meisten Komponenten der Extrazellulärmatrix (ECM) zersetzen zu können^{1,2}. Bei gesunden Individuen spielen sie eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, der Schwangerschaft und bei der Knochenresorption³⁻⁷. Eine Überexpression und Aktivierung der MMPs ist in vielen Fällen gekoppelt mit einem Abbau und einer Umgestaltung der ECM. Beispiele hierfür sind die Tumordinvasion, die Metastasierung von Tumoren, die rheumatische Arthritis, und Krankheiten des Periodontiums⁸⁻¹². Aber auch an vaskulären Prozessen wie Angiogenese, Intimahyperplasie, Atherosklerose und der Aneurysmaentstehung sind sie beteiligt¹³⁻¹⁸. Desweiteren werden sie mit neurodegenerativen Erkrankungen, beispielsweise mit Alzheimer und Amyotropher Lateralsklerose in Verbindung gebracht^{19,20}.

In der vorliegenden Arbeit soll die grundlegende Frage einer Beziehung zwischen Endothelzellen und MMP's geklärt werden. Die Hintergründe dieser Fragestellung beruhen auf bekannten pathologischen Effekten der MMPs an kardiovaskulären Prozessen, wie die Beteiligung am vaskulären Remodeling, an der Instabilisierung von atherosklerotischen Plaques, an der Restenose, am linksventrikulären Remodeling nach einem Herzinfarkt und an der dilatativen Kardiomyopathie^{2,21,22}.

1.1 Matrixmetalloproteinasen

1.1.1 Struktur und Funktion der Matrixmetalloproteinasen

Seit ihrer Entdeckung 1962 wurden über 66 Matrixmetalloproteinasen (MMPs), darunter 20 menschliche, beschrieben und ihre Gene sequenziert²³. Dabei findet man diese Enzyme, die vor mehr als 3,5 Billionen Jahren entstanden sind, in fast allen lebenden Organismen, selbst in den einfachsten Bakterien^{24,25}.

Im Aufbau der MMPs zeigen sich einige Charakteristika, die für alle Mitglieder dieser Enzymfamilie zutreffen. Zum einen werden alle MMPs als präpro-Enzyme synthetisiert und als inaktive pro-Enzyme sezerniert²⁶. Zum anderen enthalten diese pro-Enzyme eine einheitliche PRCG(V/N)PD-Sequenz in ihrem um die 80 Aminosäuren langen Propeptid und sie binden mit ihrem aktiven Zentrum Zn^{2+} . Das in dem Propeptid enthaltene Cystein

stabilisiert die pro-Enzyme in ihrer inaktiven Form. Diese Stabilisierung kommt durch die Zn^{2+} -Cystein-Bindung zustande, welche die katalytische Region der MMPs verdeckt und damit blockiert ²⁷. Die Aktivierung erfolgt, mit Ausnahme von MMP23, durch Dissoziation des Cystein vom Zink. Dies führt zu einer Freilegung des katalytischen Zentrums ²⁶⁻²⁸. Dieser Prozess wird in der Literatur oft als „Cystein-Switch“ bezeichnet. Weiterhin haben alle MMPs ausser dem Propeptid und dem aktiven Zentrum noch eine sogenannte Hämopexin-Domäne, die sich am C-terminalen Ende befindet.

Als Besonderheit besitzen MMP-2 und MMP-9 drei eingefügte Fibronectin-Typ II Module in ihrem katalytischen Zentrum, welche mit Collagen, Gelatin und Laminin interagieren, bzw. binden ²⁹⁻³¹. Der Aufbau von MMP-2 und MMP-9 ist in Abbildung 1 skizziert.

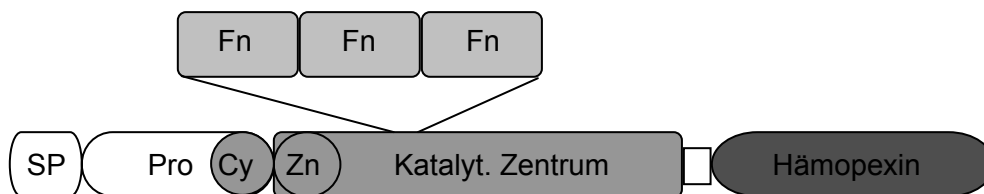


Abb.1 : Aufbau der Matrixmetalloproteinase 2 und 9

In der Abbildung ist schematisch der Aufbau der präpro-Enzyme MMP-2 und MMP-9 gezeigt. Im Unterschied zu den anderen MMPs besitzen die beiden Gelatinasen Fibronectin-Module, die mit Collagen, Gelatin und Laminin interagieren.

Die Zink-Cystein Bindung zwischen dem Zink im katalytischen Zentrum und dem Cystein im Propeptid stabilisiert das Enzym in seiner inaktiven Form. Die Aktivierung erfolgt durch eine Dissoziation des Cystein vom Zink, was zur Freilegung des katalytischen Zentrums führt.

[SP = Signalpeptid ; Pro = Propeptid ; Zn = aktives Zentrum mit gebundenem Zink ; Fn = Fibronektin ; Cy = Cystein]

1.1.2 Einteilung der MMPs

Nach ihrer Struktur und nach ihrer Substratspezifität werden die MMPs heute in fünf Klassen eingeteilt. Man unterscheidet die Collagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18), die Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9), die Stromelysine (MMP-3, MMP-10, MMP-11), die membrangebundenen MMPs (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24, MMP-25) und andere MMP's (MMP-7, MMP-26, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23). Hervorzuheben für diese Arbeit sind die beiden Gelatinasen MMP-2 (72kDa) und MMP-9 (92kDa). Diese Enzyme spalten Collagen Typ IV,V,VII und X sowie Elastin, Gelatin und die Spaltprodukte von Collagen I,II und III nach der Proteolyse durch andere Collagenasen.

Kürzlich wurde entdeckt, dass MMP-2 auch Collagen Typ I spaltet. Das geschieht genau an der gleichen Lokalisation wie bei MMP-1. MMP-9 ist dazu nicht fähig³⁰.

1.1.3 Regulation der Aktivität der MMPs

Die Aktivität der MMPs wird auf drei Ebenen reguliert. Als erstes wird die Aktivität durch die Transkriptionskontrolle gesteuert, als zweites auf der Ebene der posttranslationalen Aktivierung und als drittes wird die Aktivität der sezernierten MMPs durch die TIMPs (Tissue Inhibitor Metalloproteinases) im Gewebe moduliert²¹.

Bei der Transkriptionskontrolle wirken zwei Arten von Strukturen zusammen, die Transkriptionsfaktoren und die Promotor-Region. Letztere enthält meist kurze DNA-Abschnitte, an die Transkriptionsfaktoren binden und so die Transkription beeinflussen können. Ausserdem wird die Transkription durch Co-Aktivator- und Co-Repressor-Proteine reguliert. Eine Vielzahl von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren beeinflussen so die Transkription der MMP-Gene. Dazu gehören IL-1 β , IL-6, TNF- α , EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor) und bFGF (basic Fibroblast Growth Factor)³²⁻³⁵. Bei MMP-2 führt Thrombin und auch eine mehr als 24 Stunden anhaltende Hypoxie zu einer Erhöhung der MMP-2 mRNA^{36,37}.

Andere Faktoren sind wiederum für ihren negativen Einfluß auf die Genexpression bekannt. Dies konnte bei IL-4 und Corticosteroiden gezeigt werden². Allerdings reagieren nicht alle MMPs gleich auf denselben Stimulus und die Wirkung der verschiedenen Faktoren kann zellspezifisch sein.

1.1.4 Posttranslationale Aktivierung der MMPs

Die posttranslationale Aktivierung der Pro-Enzyme kann intrazellulär, auf der Zelloberfläche durch MT-MMPs, in der ECM (Extrazellulärmatrix) durch andere Proteasen oder durch vorher aktivierte MMPs („stufenweise Aktivierung“) geschehen³⁸. Ausserdem können mehrere chemische Reagenzien, wie 4-Aminophenylmercuric-Acetate, oxidiertes Glutathion oder reaktiver Sauerstoff, MMPs in vitro aktivieren²⁷. In vielen Fällen geschieht die Aktivierung allerdings stufenweise. Dabei wird zuerst ein Teil des Propeptids durch eine Proteinase abgespalten. Das führt zu einer Destabilisierung des restlichen Propeptids, inklusive der Cystein-Zink Bindung. Diese Destabilisierung erlaubt in Folge eine intermolekulare Verarbeitung durch teilweise aktivierte intermediäre MMPs oder durch aktivierte MMPs³⁹⁻⁴¹. Dabei wird der Rest des Propeptids entfernt und das katalytische Zentrum freigelegt. Ein anderer wichtiger Faktor für die Aktivierung ist Plasmin, welches pro-

MMP-1, -3, -7, -9, -10 und pro-MMP-13 aktiviert ⁴². Kürzlich wurde entdeckt, dass Plasmin auch pro-MMP-2 zu aktiven MMP-2 konvertieren kann ⁴³.

Der Hauptmechanismus der MMP-2 Aktivierung findet allerdings auf der Zelloberfläche statt. Zuerst bindet dort ein aktives MT-MMP-1 ein TIMP-2 Molekül. Dadurch wird dem MT-MMP-1 die Bildung eines Dimers oder sogar Multimers ermöglicht. Nach der Bildung eines Dimers kann sich pro-MMP-2 mit seiner Hemopexin-Domäne an das C-terminale Ende des TIMP-2 anlagern. In der Folge aktiviert MT-MMP-1 das pro-MMP-2 partiell. Es entsteht ein intermediäres MMP-2. Das intermediäre MMP-2 dissoziiert von der Membran und wird durch intermolekulare Verarbeitung seitens anderer MMP vollständig aktiviert (siehe oben) ⁴¹. Die Aktivierung des pro-MMP-2 durch eine andere membranständige Matrixmetalloproteinase (MT-MMP-2) ist im Unterschied hierzu direkt und von TIMP-2 unabhängig ⁴⁴. Weitere Stoffe, die pro-MMP-2 aktivieren können, sind Thrombin und Faktor Xa ⁴⁵⁻⁴⁷.

Als letztes müssen dann noch die TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinases) Erwähnung finden. Es existieren vier Typen dieser gewebespezifischen Inhibitoren (TIMP-1, -2, -3, -4), die von vielen Zellen, u.a. Muskelzellen und Makrophagen, abgegeben werden können und die über direkte Interaktion die Aktivität der MMPs kontrollieren ⁴⁸.

Abbildung 2 verdeutlicht die posttranslationale Aktivierung von MMP-2 an der Zelloberfläche.

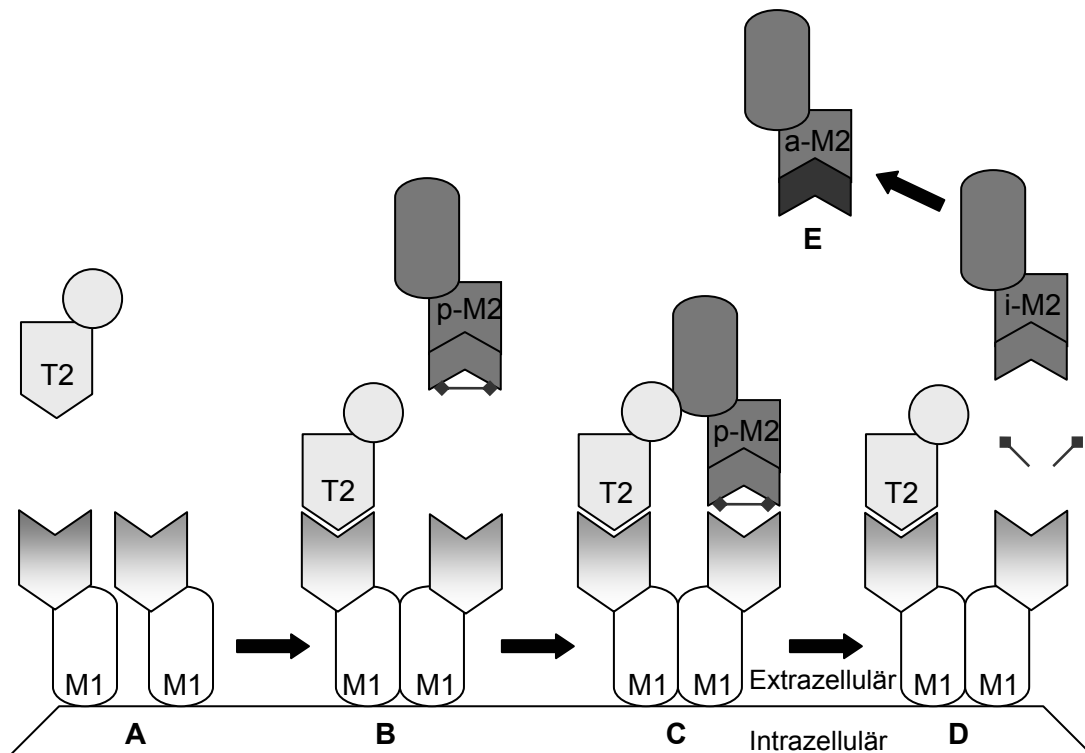
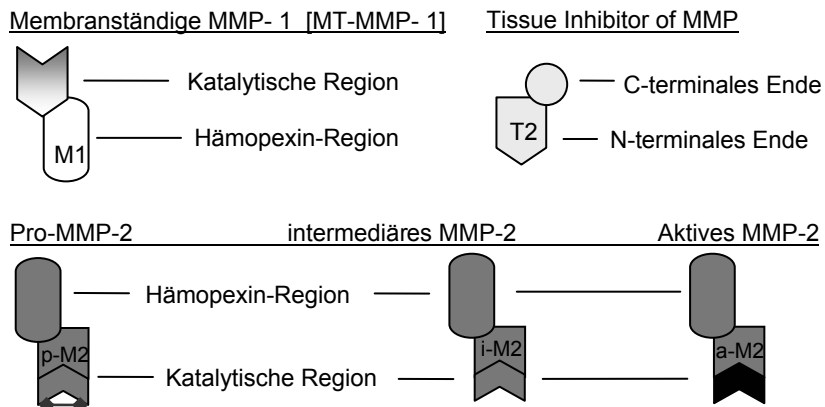


Abb.2 : Aktivierung von pro-MMP-2 zum aktiven MMP-2

Im Modell erkennt man die Aktivierung von pro-MMP-2 zum aktiven MMP-2 mit Hilfe der membranständigen MT-MMP-1 und des TIMP-2.

Am Anfang ermöglicht die Bindung des TIMP-2 an MT-MMP-1 (a+b) die Dimerbildung zweier MT-MMP-1 Moleküle (b). Nun lagert sich ein pro-MMP-2 Molekül mit seiner Hämopexin-Domäne an das C-terminale Ende von TIMP-2 (c). Daraufhin aktiviert das MT-MMP-1 das pro-MMP-2 partiell (d). Am Ende wird das intermediär aktivierte MMP-2 durch intermolekulare Verarbeitung seitens anderer MMPs vollständig aktiviert (e).



1.2 Die Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung der Arterien, die zu epidemiologisch relevanten Krankheitsbildern wie der koronaren Herzkrankheit, peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und zerebrovaskulären Erkrankungen führt. Sie gilt in den westlichen Industrienationen in über 50% aller Todesfälle als Ursache.

Morphologisch kommt es bei der Atherosklerose zu einer herdförmigen Veränderung der Intima, die durch fibröse Einlagerungen verdickt wird und so zunehmend das Gefäßlumen einengt. Zusätzlich kommt es zu einem Elastizitätsverlust und einer Wandverhärtung der Arterien.

1.2.1 Pathogenese der Atherosklerose

Die Pathogenese der Atherosklerose ist trotz vieler Studien noch nicht vollständig geklärt.

Als Modell wird die „response to injury“-Hypothese favorisiert.⁴⁹ Das Modell der „response to injury“-Hypothese ist in Abbildung 3 dargestellt.

Danach begünstigen Risikofaktoren (Hypertonie, Hyperlipidämie, Rauchen, Diabetes mellitus und Hyperhomocysteinämie) pathologische Mechanismen, an deren Ende eine Schädigung der Endothelzellen steht. Als Folge dieser Schädigung nimmt die Durchlässigkeit der Endothelbarriere zu und LDL (Low Density Lipoprotein) gelangt vermehrt in den subendothelialen Raum. Bei intakter Barriere wird das LDL dort von eingewanderten Monozyten, die sich zu Makrophagen umwandeln, über den Apo B100 – Rezeptor identifiziert, aufgenommen und aus der Gefäßwand eliminiert. Diesen Prozess bezeichnet man als „Scavenger mechanism“. Bei einer Belastung dieses Mechanismus, wie man ihn bei gestörter Endothelbarriere findet, bleiben die Makrophagen (teilweise umgewandelt als Schaumzellen) länger in der Gefäßwand und bilden die Grundlage für die zuerst sichtbaren Zeichen der Atherosklerose, den Fettstreifen („fatty streaks“). Während es sich bei den Fettstreifen noch um reversible Zeichen der Atherosklerose handelt, führt die LDL-Überlastung, sei es durch eine gesteigerte Endotheldurchlässigkeit oder durch ein überhöhtes Angebot (Hyperlipidämie), zu einer Verkettung der im Folgenden beschriebenen pathologischen Vorgänge.

Das Überangebot von LDL bedingt eine längere Verweildauer der Lipoproteine in der Gefäßwand, welche dort zum Teil oxidiert werden. Oxidiertes LDL hat viele Wirkungen. An glatten Muskelzellen stimuliert es die Proliferation. An Endothelzellen führt es zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen an der Gefäßinnenseite bei gleichzeitiger

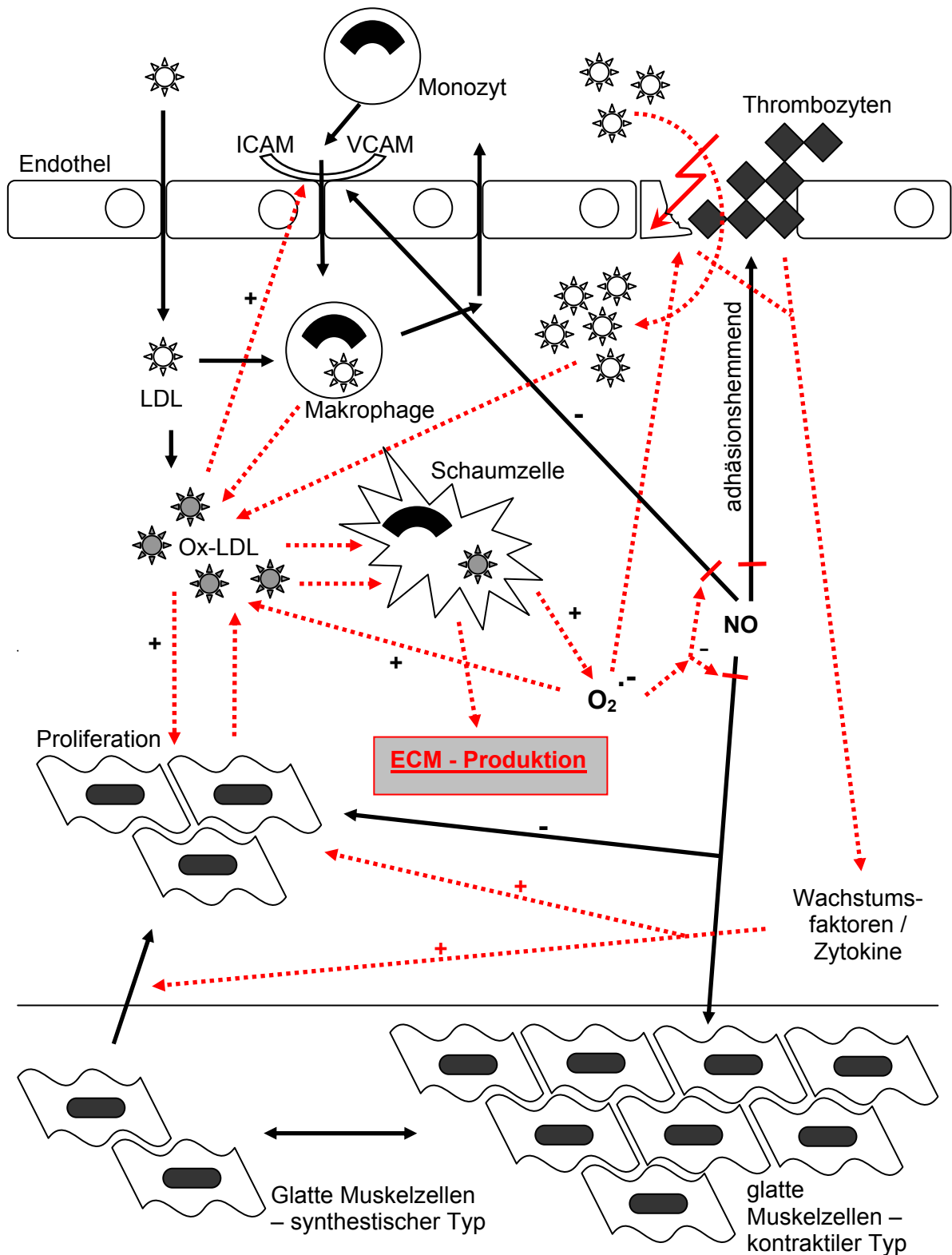


Abb.3 : Pathogenese der Atherosklerose

Die Abbildung zeigt modellhaft die Pathogenese der Atherosklerose. Dabei sind die pathologischen Prozesse als gestrichelte Pfeile dargestellt. Nähere Erläuterungen im Text.

Schädigung der Zellen.⁵⁰ Ausserdem „lockt“ oxidiertes LDL vermehrt Makrophagen an, die das modifizierte LDL nicht mehr über den Apo B100-Rezeptor kontrolliert aufnehmen können. Stattdessen nehmen sie es über ihren, in hoher Dichte vorhandenen, Scavenger-Rezeptor unkontrolliert auf und verwandeln sich in Schaumzellen.^{51,52} Bei diesem unkontrollierten Vorgang geben sie O₂-Radikale (v.a. Superoxidanionen) ab, die allgemein zellschädigend wirken und weitere LDL-Partikel oxidieren.⁵³ Die O₂-Radikale wiederum antagonisieren die Wirkung des von den Endothel- und Muskelzellen gebildeten Stickoxids.⁵⁴ Damit werden die physiologischen Effekte von NO (die thrombocyten- und monocytadhäsionhemmende Wirkung, die antiproliferative Wirkung und die vasodilatierende Wirkung an der Gefässmuskulatur) antagonisiert.

Sowohl das geschädigte Endothel, als auch die am Endothelzelldefekt anhaftenden Plättchen und Makrophagen geben im weiteren chemotaktische Stoffe ab, die zu einer Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima führen. Dort werden sie durch PDGF (Platelet derived growth factor) und anderen Wachstumsfaktoren zur Proliferation angeregt.⁵¹ Die eingewanderten Muskelzellen wandeln sich durch Aufnahme von oxidierten LDL zu Schaumzellen um. Diese Schaumzellen bilden große Mengen einer Extrazellulärmatrize, die aus bindegewebigen Fasermaterial (Kollagen, Elastin, Proteoglycane) besteht.⁵⁵ Später bilden sich aus ihnen verkalkte, fibröse Plaques. Diese Plaques bestehen aus einer Ansammlung von Makrophagen, Schaumzellen, Bindegewebe, Cholesterinkristallen und Zelltrümmern. Sie sind die Ursache der klinischen Manifestation der Atherosklerose.

1.2.2 Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf die Atherosklerose

Die Entwicklung einer Atherosklerose kann durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Nach der „response to injury“-Hypothese steht am Anfang die gestörte Endothelzellfunktion. Verschiedene Risikofaktoren der Atherosklerose begünstigen eine Störung der Endothelzellfunktion und können zu einer Exazerbation führen⁵⁶⁻⁵⁸. Eine Schlüsselposition hat dabei der „oxidative Stress“. Danach können die Risikofaktoren über die Erhöhung der O₂-Radikale in der Gefässwand zu einer Senkung von NO führen, was letztendlich eine endotheliale Dysfunktion begünstigt⁵⁹. Auch Angiotensin erhöht den oxidativen Stress durch eine Erhöhung der reaktiven Sauerstoffverbindungen⁶⁰. Über den AT-1 Rezeptor stimuliert Angiotensin II die Produktion von Peroxiden in Makrophagen, so dass eine Blockierung der

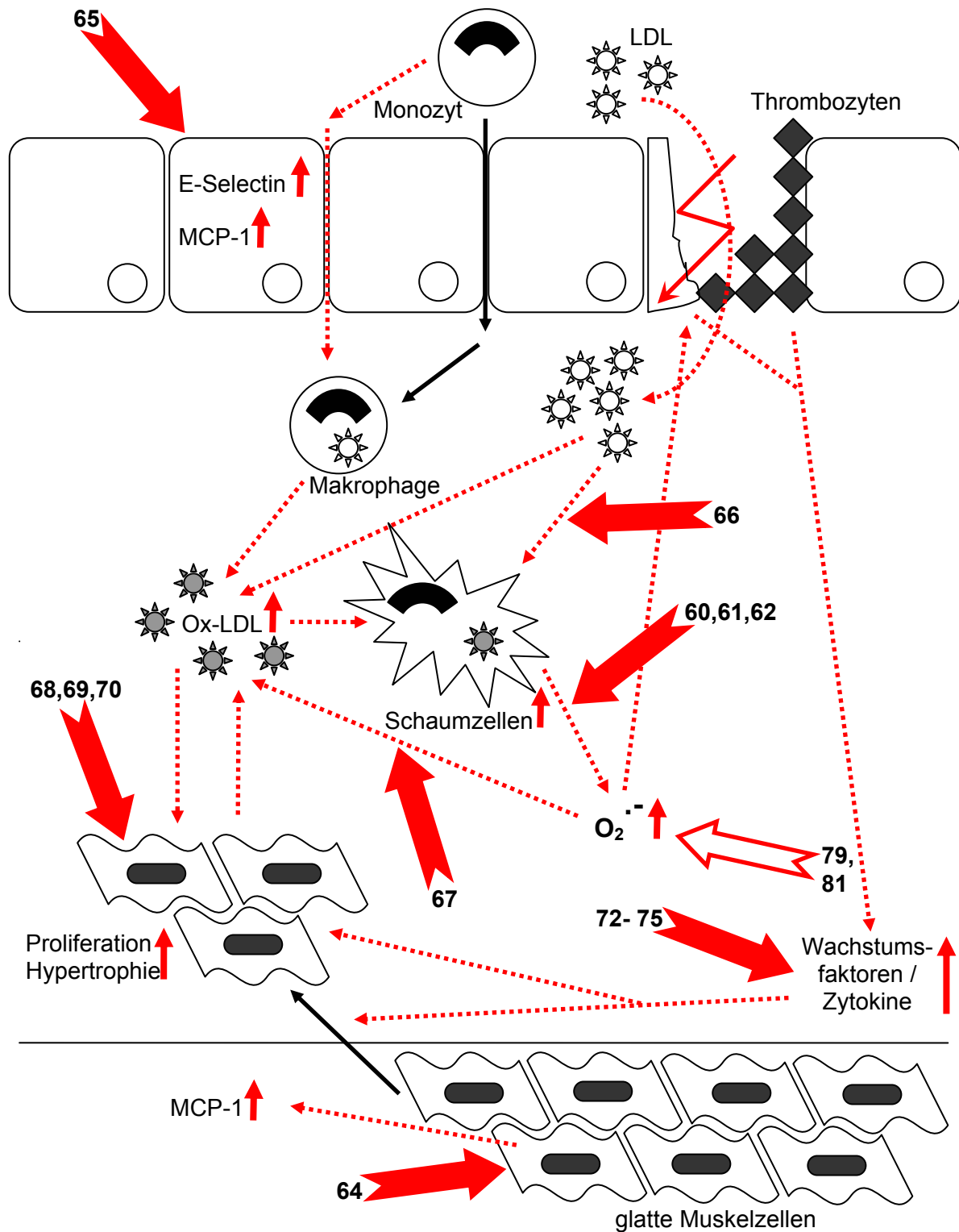


Abb.4 : Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf die Atherosklerose

Analog zu Abb.3 zeigen die gestrichelten, dünnen Pfeile pathologisch relevante Interaktionen bei der Entstehung der Atherosklerose. Die Einflüsse von Angiotensin (gefüllter Pfeil) und Aldosteron (ungefüllter Pfeil) werden durch die dicken Pfeile dargestellt. An deren Ende ist die Referenz angegeben. Nähere Erläuterungen im Text.

Rezeptoren mit einem Angiotensin-I-Rezeptor-Antagonisten hilfreich zur Unterdrückung des oxidativen Stresses im atherosklerotischen Plaque sein könnten ^{61,62}.

Aus der fehlenden NO-Wirkung resultiert aber auch eine erhöhte Thrombocyten- und Monocytenadhäsion am Endothel, sowie ein Wegfall der antiproliferativen und vasodilatierenden Wirkung an der Gefäßmuskulatur. Die sich aus der fehlenden NO-Wirkung ergebende erhöhte Monocytenadhäsion wird direkt durch Angiotensin verstärkt. Mit dieser Erhöhung der Monocytenadhäsion am Endothel könnte also Angiotensin die Atheroskleroseentwicklung beschleunigen ⁶³. Der molekulare Mechanismus der Monozyteninfiltration in die Gefäßwand wird dabei zumindest teilweise durch das MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein) der VSMC (vascular smooth muscle cells) vermittelt. Angiotensin II aktiviert die MCP-1 Genexpression in den glatten Muskelzellen und könnte so die Atheroskleroseentwicklung unterstützen ⁶⁴. Am Endothel erhöht Angiotensin II die E-selectin-mRNA und das Protein via den AT-1 Rezeptor, was eine erhöhte Leukocytenadhäsion und Akkumulation zur Folge hat ⁶⁵.

Auch im Bezug zum LDL greift Angiotensin in das pathologische Geschehen der Atheroskleroseentwicklung ein. Es kann LDL direkt (ohne Oxidation) so modifizieren, dass es vermehrt von Makrophagen über den Scavenger-Rezeptor aufgenommen wird und intrazellulär kumuliert ⁶⁶. Als morphologisches Korrelat resultieren daraus sesshafte Schaumzellen. Darüber hinaus wird auch oxidiertes LDL vermehrt über den Scavenger-Rezeptor aufgenommen und führt zu einer Umwandlung der Makrophagen in Schaumzellen. Angiotensin II stimuliert die Oxidation von LDL durch Makrophagen und könnte so wiederum eine Atheroskleroseentwicklung beschleunigen ⁶⁷.

An den glatten Muskelzellen stimuliert Angiotensin II die Proteinsynthese und die zelluläre Hypertrophie via dem AT-1 Rezeptor ^{68,69}. Eine vermehrte DNS-Produktion, kombiniert mit einer erhöhten Proliferation ist nach Angiotensin II Stimulation in VSMC (vascular smooth muscle cells) zu finden ⁷⁰. Als weiterer Reiz der Zellhypertrophie und Hyperplasie wird auch die vermehrte Superoxidanionen-Produktion der VSMC unter Angiotensin II-Einfluss diskutiert, der dabei als second-messenger fungieren soll ⁷¹. Zudem stimuliert Angiotensin II die Produktion von Wachstumsfaktoren, wie TGF- β 1 (transforming growth factor), PDGF (Platelet derived growth factor), VEGF-mRNA (vascular endothelial growth factor) und IGF-1 mRNA (insulin-like-growth-factor) ⁷²⁻⁷⁵.

Ausserdem wurde in atherosklerösen Plaques eine erhöhte ACE-Menge in Regionen mit inflammatorischen Zellen gefunden. In diesen auch als „hot spots“ bezeichneten Regionen war die ACE-Menge höher als intravasal. Gleichzeitig wurde dort auch Angiotensin II

nachgewiesen ⁷⁶. Wieder wurde vermutet, dass Angiotensin II durch Ankurbelung der Superoxidanionen-Produktion und der Inaktivierung von NO die Atherosklerose beschleunigt. Bei Aldosteron, einem der wichtigen Regulatoren des Elektrolythaushaltes, ist schon länger seine Rolle bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz bekannt. So ist es z.B. an der Entwicklung einer myokardialen Fibrose beteiligt ^{77,78}. Kürzlich wurde die Hypothese aufgestellt, dass manche Angiotensin II-Effekte durch Aldosteron vermittelt werden könnten ^{79,80}. Eplerenone, ein selektiver Aldosteron-Rezeptor-Blocker zeigte in einem Tierversuch folgende Effekte: Reduktion des Blutdruckes, Reduktion der von Makrophagen vermittelten Oxidation von LDL, Reduktion der Superoxidanionen-Produktion. Aldosteron könnte also eine pro-oxidative Wirkung in der Atherosklerose zukommen ⁸¹. Unterstützt wird diese These dadurch, dass in einem anderen Tierversuch die endotheliale Dysfunktion und die Sauerstoffradikalproduktion durch Eplerenone vermindert wurde ⁷⁹. Abbildung 4 gibt einen kurzen Überblick über den Einfluss des RAAS auf die Entwicklung einer Atherosklerose.

1.2.3 Matrixmetalloproteinasen und Atherosklerose

In einigen Arbeiten hat man die MMPs mit dem vaskulären Remodeling bei Atherosklerose und der Instabilität von atherosklerotischen Plaque in Verbindung gebracht. Zum einen wurde von einer lokalen MMP-Überexpression und –Aktivität in menschlichen atherosklerotischen Läsionen berichtet ⁸². Zum anderen wurde durch Experimente die Hypothese aufgestellt, dass MMPs durch den Abbau der Basalmembran und der Extrazellulärmatrix an der Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen beteiligt sein könnten ^{18,83,84}. Diese Aktivierung der glatten Gefäßmuskelzellen konnte bei einer anderen Arbeitsgruppe durch den Tissue-Inhibitor-of-Matrixmetalloproteinase 1 (TIMP-1) gehemmt werden ⁸⁵.

Seit kurzem wird vermutet, dass Endothelzellen durch bestimmte lösliche Faktoren und den direkten Kontakt zu Leukocyten die leukocytaire MMP-Produktion regulieren, was in atherosklerotischen Plaques durchaus eine Rolle spielen kann ⁸⁶. Bei T-Zellen beispielsweise führte eine durch VCAM-1 (vascular cell adhesion factor) vermittelte Adhäsion an Endothelzellen zu einer Ankurbelung der lymphocytären MMP-Produktion, die ihrerseits eine T-Zell-Infiltration in die Gefäßwand erleichtern könnte ⁸⁷. Der enzymatische Abbau der Basalmembran könnte wiederum mit einer gestörten Endothelbarrierefunktion verbunden sein, die den Einstrom von Plasmaproteinen (auch LDL) in die Gefäßwand begünstigt ^{88,89}. Aus den Interaktionen von Leukocyten, Extrazellulärmatrix (in Atheromen v.a. die

Interaktion mit Collagen Typ I) und oxidiertem LDL resultiert dann wieder eine erhöhte Produktion von MMPs in Leukocyten⁹⁰⁻⁹².

Die gesteigerte MMP-Aktivität in atherosklerotischen Plaques könnte damit die strukturellen Veränderungen vorantreiben, ihre Entwicklung ermöglichen und letzten Endes eine Instabilität oder Ruptur des Plaques begünstigen. Es bleibt die Frage, ob sich Endothelzellen an diesen Prozessen durch Produktion von MMPs beteiligen und wenn ja, wie die Produktion, Sekretion und Aktivierung reguliert wird.

1.3 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten folgende Komplexe bearbeitet werden:

1. Etablierung einer Endothelzellkultur aus HUVEC (human umbilical vein endothelial cells)
2. Nachweis der Produktion und Sezernierung von Matrixmetalloproteinasen durch HUVECs
3. Regulation der MMP-Sekretion und der MMP-Aktivierung zum aktiven Enzym
4. Einfluss von Aldosteron und Angiotensin auf das MMP-System

Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Frage, ob das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System einen Einfluss auf das endotheliale MMP-System hat. Dabei war vor allem die Frage interessant, ob die beiden wichtigsten Faktoren im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System in irgendeiner Weise die Produktion, Sekretion und Aktivierung der MMPs beeinflussen können und damit auch über die MMPs in das Geschehen einer Atheroskleroseentwicklung und Progression eingreifen können.

2 Material und Methoden

2.1.1 Präparation der HUVECs

Die Nabelschnur wurde nach der Geburt an beiden Enden abgeklemmt und bis zur Abholung in einem Transportgefäß im Kühlschrank (+4°C) gelagert. In diesem Transportgefäß war PBS w/o Ca/Mg vorgelegt. Alle Nabelschnüre wurden innerhalb der nächsten 48 Stunden abgeholt und präpariert.

Zur Zellgewinnung wurden die abgeklemmten Nabelschnüre dem Transportgefäß entnommen und aussen vorsichtig mit 80% Ethanol gereinigt. Danach wurde noch vorhandenes Blut in der Umbilikalvene entfernt. Hierzu wurde eine blaue Vasofix Kanüle (22G, Braun) in die Umbilikalvene plaziert und mit zwei Klemmen wasserdicht fixiert. Es folgte eine Spülung der Vene mit 15-20ml PBS w Ca/Mg. Nachdem die Vene am unteren Ende wieder abgeklemmt war, erfolgte die Injektion von 5-15ml Collagenase A (0,2%) zur Lösung der Endothelzellen von der Gefäßwand. Anschliessend wurde die Nabelschnur in Alufolie eingewickelt und 15 Minuten über dem Wasserbad (37°C Wassertemperatur) inkubiert. Ein 50ml Gefäss fing die Zellsuspension auf. Durch nochmaliges Spülen der Vene mit 20-30ml PBS w Ca/Mg, kombiniert mit behutsamen „Melken“, ließ sich der Zellgewinn erheblich vergrössern. Es folgte die Zentrifugation bei 1200rpm für 5 Minuten (20°C). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit 13ml Kulturmedium resuspendiert und in die Kulturflaschen überführt (75cm², Greiner).

2.1.2 Kulturmedium

Als Kulturmedium entschieden wir uns für M199 (Sigma), welches für die Kultivierung von HUVECs (Humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen) von anderen Autoren ebenfalls verwendet wurde (z.B. von Peracchia et al.) und nach eigenen Erfahrungen der Kombination von IMDM (E15-819 PAA) und Ham´s F12 (E15-817 PAA) überlegen war (siehe Ergebnisse).

Diesem setzten wir ein Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin; PenStrep, Sigma) zur Kontrolle mikrobiologischer Kontaminationen und L-Glutamin (Biochrom) zu.

Desweiteren kam noch fetales Kälberserum in einer Finalkonzentration von 20% dazu, um die Zellen optimal mit Nährstoffen zu versorgen. Vorher wurde allerdings das Serum zur Denaturierung der zytotoxischen Komplementfaktoren bei einer Temperatur von 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert.

Zuletzt reicherten wir das Medium kurz vor der Benutzung mit dem Wachstumsfaktor ECGF (Sigma) an. Damit bestand das gebrauchsfertige Medium aus M199, 20% FKS (final), Glutamin (2mM), PenStrep und ECGF(1/100).

2.1.3 Kultivierung der HUVEC und Passagierung

Grundsätzlich wurden alle kritischen Zellkulturarbeiten zum Schutz vor Kontaminationen unter einer Laminar-Flow (Envirco, Leag Schirp Reinraumtechnik, Bork) durchgeführt. Der eingesetzte Brutschrank (Heraeus, Heraeus Holding GmbH, Hanau) hielt die Umgebungstemperatur konstant auf 37°C. Ausserdem war das Innere mit einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre von 5% CO₂ gefüllt. Damit liess sich in Kombination mit dem im Nährmedium enthaltenem NaCO₃ der pH-Wert in den physiologischen Grenzen halten und kontrollieren. Die Kulturflaschen (Cellstar; Greiner, Frickenhausen), die Six-Well-Plates (Falcon) und die Chamber Slides (Nunc) wurden vor Benutzung mit Collagen Typ I (rat tail, Sigma) beschichtet.

Die Morphologie der HUVECs wurde mittels eines Phasen-Kontrastmikroskop (Nikon TMS, Japan, 10x) kontrolliert. Die menschlichen Endothelzellen zeigten dabei ihre typische Pflastersteinmorphologie nach nur einem Tag in Kultur (als Endothelzellcluster) und auch bei Konfluenz. Bei längerer Kultivierung war allerdings eine beginnende Desorganisation mit länglich erscheinenden Zellen zu beobachten. Diese Desorganisation war reversibel, sobald die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und in eine neue Collagen-beschichtete Kulturflasche transferiert wurden.

Bei Erreichen einer Subkonfluenz (ca.80-90%) wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das alte Medium entfernt und die Kultur nachfolgend 2x mit 20ml PBS w/o Ca/Mg (Phosphate Buffered Saline; PAA) gewaschen. Die Ablösung erfolgte dann durch Inkubation der Zellen mit 1,5ml Trypsin/EDTA für Endothelzellen (Sigma) für ca. zwei bis fünf Minuten im Brutschrank. Zur Beendigung der Reaktion wurde 11,5ml Medium (M199 mit 20%FKS) hinzugefügt. Ein 50ml Blue Cap (Greiner bio-one, Frickenhausen) fing diese Suspension auf, die nun bei 1200rpm, 20°C, für 5 Minuten zentrifugiert wurde (Heraeus sepatech, Heraeus Holding GmbH, Hanau). Anschliessend wurde der Überstand dekantiert und verworfen.

Das verbleibende Pellet wurde entweder mit 26ml Medium zur sukzessiven Beschickung von zwei 75cm² Kulturflaschen oder mit 4ml Medium zur Zellzählung mit nachfolgender Beschickung von Six-Well-Plates (100000 Zellen pro Well, ca.10cm² Wachstumsfläche pro Well) resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte dabei mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer.

Bei frisch angelegten Kulturen wurde der erste Mediumwechsel ein oder zwei Tage nach der Präparation durchgeführt, bei allen anderen alle zwei bis drei Tage. Die Primärkultur

erreichte eine Konfluenz in etwa 5 Tagen, während die erste Passage schneller konfluent wurde.

Für die Experimente wurden nur Zellen der ersten und zweiten Passage verwendet, da sich mit zunehmender Passagierung die Zellmorphologie verschlechterte.

2.1.4 Wachstumskurven

Mit Hilfe der Wachstumskurven konnte die Vermehrungsgeschwindigkeit der Endothelzellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bestimmt werden. Dazu wurden die Zellen der subkonfluent gewachsenen Primärkultur mit Trypsin/EDTA vom Untergrund gelöst. Zur Beendigung der Reaktion wurde Medium (mit 10% FKS) dazugegeben und die Zellen vom Überstand mittels Zentrifugation (1200 U, 5 min) getrennt. Am Tag 0 wurden die Zellen in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm² oder 15.000 Zellen/cm² ausgesät und kultiviert. Am ersten, zweiten, dritten und fünften Tag wurde die Zellzahl bestimmt. Wieder wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA vom Untergrund gelöst und danach mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.1.5 Zellcharakterisierung

Die Charakterisierung der Endothelzellen erfolgte durch die morphologische und die immunhistochemische Untersuchung. Während bei der morphologischen Untersuchung die für Endothelzellen typische Pflastersteinmorphologie und die Kontaktinhibition geprüft wurde, wurde bei der Immunhistochemie das EN4-Antigen auf den Endothelzellen erfolgreich nachgewiesen. Hierzu wurden die Zellen mit eisgekühltem Aceton auf Chamberslides fixiert, mit PBS w/o Ca/Mg gewaschen und der EN4-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen. Nach einer einstündigen Einwirkzeit erfolgte die Gegenfärbung mit einem Fluoresceinisothiocyanat-konjugierten Hase-Anti-Maus Antikörper in einer Verdünnung von 1:100.

2.2 Stimulation

2.2.1 Vorbereitung der HUVECs

Sobald die Kultur in den Six-Well-Plates subkonfluent (80-90%) gewachsen war, was in ungefähr vier Tagen der Fall war, wurde das alte Medium entfernt und gegen serumarmes

Nährmedium (0,4% FKS) ersetzt. Dieses serumarme Medium blieb über Nacht (12-15 Stunden) auf den Zellen. So konnte erstens das Zellwachstum gestoppt werden und zweitens der Einfluss der im FKS enthaltenen Substanzen auf den Versuchsablauf und das Ergebnis verschwindend gering gehalten werden. Auf ein gänzlich Verzicht von FKS reagierten die Zellen mit Ablösung vom Boden und konsekutiven Zelltod, sodass diese wünschenswerte Vorgehensweise nicht möglich war.

2.2.2 Stimulation der HUVECs

Zu Beginn der Stimulation wurde das serumarme Medium aus den Six-Well Plates abgesaugt und verworfen. Dann erfolgte die Stimulation mit dem Stimulanz gelöst im serumarmen Medium. Auf jeder Six-Well Plate befand sich dabei jeweils eine Kontrolle ohne Stimulantien. Die Inkubationszeit verbrachten die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Am Ende der Stimulation wurde der abgesaugte Zellüberstand fünf Minuten bei 20°C zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene Zellen vom Überstand zu trennen. Der Überstand wurde nachfolgend in vorbereitete Cryo-Tubes dekantiert und bei -80°C tiefgefroren. Mittels Trypsin/EDTA lösten sich die Zellen vom Boden und konnten so nach Zentrifugation und Resuspendierung in einer Neubauer-Zählkammer gezählt werden.

2.2.3 Aufbereitung der Proben

Die tiefgefrorenen Proben konnten mit Hilfe einer Kühlfalle und einer Vakuumpumpe im Verhältniss 1:10 ankonzentriert werden. Dazu wurden die Deckel der Cryo-Tubes mit einer breitleumigen Kanüle durchlöchert. Anschliessend wurden die Proben (1ml je Cryo-Tube) in die vorgekühlte Kühlfalle transferiert und die Vakuumpumpe angeschlossen. Die Proben inkubierten 18-24 Stunden bei ca. 0,1 mbar. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der pulverisierte Überstand in 0,1ml Aqua dest. aufgelöst und aliquotiert. Nun schloss sich die quantitative Proteinbestimmung an.

2.3 Material

2.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit (Best.Nr.: 23225, Pierce). Diese Versuchsanordnung macht sich die Biuret-Reaktion zu Nutze, bei der das Protein Cu⁺² zu Cu⁺¹ im basischen Medium reduziert. In einem zweiten Schritt reagieren die Cu⁺¹

Kationen mit dem BCA und bilden einen Komplex. Dieser wasserlösliche Komplex hat eine starke Absorption bei 562nm, welche linear mit der Proteinkonzentration zunimmt. Die Proteinkonzentration im Überstand lag bei unseren Versuchreihen zwischen 2000 µg/ml und 10000 µg/ml.

2.3.2 Gelzusammensetzungen

2.3.2.1 Gelzusammensetzung (Zymographie)

Zur Herstellung eines Separationsgels, welches Acrylamid in 7,5%iger Konzentration enthielt, fanden folgende Substanzen Verwendung: 2400µl Acrylamid/Bis-Lösung (30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid), 2500µl 1,5M Tris-Puffer (ph:8,8), 1000µl Gelatine aus einem Stock mit 6,6mg/ml Gelatine, 100µl SDS (10%), 3655µl A.dest., 10µl Ammoniumpersulfat (APS 10%) und 30µl TEMED. Das gegossene Trenngel wurde nach dem Giessen mit A.dest. überschichtet. Die Polymerisation war nach 30-45 min abgeschlossen.

Zur Herstellung des Sammelgels, welches Acrylamid in 4%iger Konzentration enthielt, fanden folgende Substanzen Verwendung: 1330µl Acrylamid/Bis-Lösung (30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid), 2500µl 0,5M Tris-Puffer (pH:6,8), 100µl SDS (10%), 6100µl A.dest., 80µl APS (10%) und 10µl TEMED. Nach dem Giessen des Sammelgels wurde der Probenkamm luftblasenfrei eingesteckt und die Polymerisierung abgewartet.

2.3.2.2 Gelzusammensetzung (Westernblot)

Zur Herstellung eines Separationsgels, welches Acrylamid in 10%iger Konzentration enthielt, fanden folgende Substanzen Verwendung: 2650µl Acrylamid/Bis-Lösung (30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid), 2000µl Trenngelpuffer (ph:8,8), 3350µl A.dest., 25µl Ammoniumpersulfat (APS 10%) und 12,5µl TEMED. Das gegossene Trenngel wurde nach dem Giessen mit A.dest. überschichtet. Die Polymerisation war nach 30-45 min abgeschlossen.

Zur Herstellung des Sammelgels, welches Acrylamid in 4%iger Konzentration enthielt, fanden folgende Substanzen Verwendung: 800µl Acrylamid/Bis-Lösung (30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid), 1250µl Sammelgelpuffer (pH:6,8), 2950µl A.dest., 30µl APS (10%) und 10µl TEMED. Nach dem Giessen des Sammelgels wurde der Probenkamm luftblasenfrei eingesteckt und die Polymerisierung abgewartet.

Der Trenngelpuffer bestand aus 18,17g Tris-Base (1,5M) und 0,4g SDS aufgefüllt auf 100ml A.dest. Der Sammelgelpuffer bestand aus 6,06g Tris-Base (0,5M) und 0,4g SDS aufgefüllt auf 100ml A.dest. .

2.3.3 ELISA

Die Bestimmung der MMP-2 Konzentrationen in den Proben wurde mit Hilfe des MMP-2 ELISA System (Amersham, RPN 2617) durchgeführt. Standards und Proben wurden in einer Mikrotiterplatte, die mit Anti-MMP-2 Antikörpern bestückt war, inkubiert. Das an die Antikörper gebundene MMP-2 wurde mittels eines mit Peroxidase beladenen Fab-Antikörper markiert. Durch die Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB, Substrat der Peroxidase) konnte die Konzentration der gebundenen Peroxidase bestimmt werden. Dazu wurde die Reaktion durch Zugabe von 1M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption in einem Spektrophotometer bei 450nm gemessen. Die Konzentration von MMP-2 ergab sich aus einer Interpolation der mitgeführten Standardkurve.

2.3.4 Lösungen und Puffer

2.3.4.1 Lösungen und Puffer (Zymographie)

Probenpuffer: 4,8ml A.dest., 1,2ml Tris-Puffer (0,5M; pH:6,8), 1,0ml Glycerol, 2ml SDS (10%), 0,5ml Bromphenolblau (0,1%)

Laufpuffer: 7,5g Tris-Base, 36g Glycin, 2,5g SDS (10%), mit A.dest auf 2500ml auffüllen (pH:8,3)

Inkubationspuffer: 15,15g Tris-Base, 1,84g CaCl₂, mit A.dest auf 2500ml auffüllen (pH:8,5)

Aktivierungspuffer: 25ml Triton X 100, 975ml A.dest

Ammoniumpersulfat 10%: 1g ad 10ml A.dest

Färbelösung (1%): 1000mg Coomassie Blue, 400ml Methanol, 100ml Essigsäure (Eisessig), 500ml A.dest

Entfärbelösung: 400ml Methanol, 100ml Eisessig, 500ml A.dest

2.3.4.2 Lösungen und Puffer (Westernblots)

Trenngelpuffer: 18,17g Tris-Base (1,5M), 0,4g SDS, ad 100ml A.dest., pH:8,8

Sammelgelpuffer: 6,06g Tris-Base (0,5M), 0,4g SDS, ad 100ml A.dest., pH:6,8

Laufpuffer: 5g Tris-Base, 15g Glycin, 2,5g SDS in 1000ml A.dest., pH:8,6

Probenpuffer: 5ml Tris-Puffer (0,5M, pH:6,8), 5ml SDS (20%), 5ml Glycerin, 1,5ml

Mercaptoethanol, 25mg Bromphenolblau, 33,5ml A.dest

Blockierungspuffer: 5% Milchpulver in PBS (inklusive 0,1% Tween)

Waschpuffer: PBS mit 0,1% Tween

Blotpuffer 1: 50mM Borsäure, 400ml Methanol, in 2l A.dest

Blotpuffer 2: 50mM Borsäure, 100ml Methanol, in 2l A.dest

2.3.5 Antikörper

Westernblot, 1.Antikörper: Anti-MMP-2 Antikörper von der Maus (Oncogene)

Westernblot, 2.Antikörper: Kaninchen-Anti-Maus Antikörper mit Peroxidase gekoppelt (Dako)

Immunhistochemie: Maus-Antikörper gegen menschliches EN4 (Monosan) und FITC-konjugierter Hase-Anti-Maus-Antikörper (Dako)

2.3.6 Substanzen, Chemikalien, Gebrauchsgegenstände

Substanzen, Gebrauchsgegenstände	Substanzen, Gebrauchsgegenstände
M199 (Best.Nr.: M4530, Sigma)	Bromphenolblau (Best-Nr.: B-8026, Sigma)
FKS (Best.Nr.: A15-041, PAA)	Rotiphorese Gel 30, Acrylamid (Best-Nr.:3029.2, Roth)
Collagenase A (Best.Nr.:103578, Roche)	Spritzen 5ml, 10ml: (Braun Melsungen AG)
PBS w/o Ca/Mg (Best.Nr.: 14190-094, Gibco)	Steriles OP-Abdecktuch: Klinidrape (50x75 cm) (Mölnycke Health Care AB)
PBS w Ca/Mg (Best.Nr.: H15-001, PAA)	Tubes, 15ml, 50ml (Cellstar, Greiner)
L-Glutamin (Best-Nr.: K-0282, Biochrom)	Saran Folie
Trypsin/EDTA (Best-Nr.: L11-004, PAA)	Cryo-Tube Vials (Nunc)
Endothelial Cell Growth Factor, ECGF (Best-Nr.: E-9640, Sigma)	Bakterienfilter: Millex-GS (0,22µm) (Millipore)
Cycloheximid (Best-Nr.: C-7698, Sigma)	Standardtips 20µl, 100µl, 1000µl (Eppendorf)
Colchicin (Best-Nr.: C-9754, Sigma)	Pipetten 5,10,25ml: (Cellstar, Greiner Bio-one)
Angiotensin (Best-Nr.: A-9525, Sigma)	Cellstar Kulturflaschen 75cm ² (Greiner bio-one GmbH)
Aldosteron (Best-Nr.: 5521, Fluka)	6-Well-Plates (Falcon)
Interleukin 1-beta (I-9401, Sigma)	Tupfer (Hartmann)
Losartan (Reinsubstanzanforderung, MSD Sharp&Dohme GmbH)	Vasofix 22G (Braun Melsungen AG)
Spironolacton (S-3378, Sigma)	WB-Röhrchen: Schott GL45
Bradykinin (Best-Nr.: B-3259, Sigma)	FlexClamp für Minigele (Pharmacia)

PMA (Best-Nr.: sc-3576, Santa Cruz)	
Heparin (Best-Nr.: H-3149, Sigma)	Geräte
ECGS (Best-Nr.: E-0760, Sigma)	Arbeitsbank (Flow): Envirco (Leag Schirp R.)
Collagen Typ I (Best-Nr.: E-7661, Sigma)	Pipetten: Pipetus-akku (Hirschmann)
PenStrep (Best-Nr.: P-0781, Sigma) MMP-2 ELISA(Best-Nr.:RPN2617,Amersham)	Zentrifuge: Heraeus sepatech (Heraeus Holding GmbH)
DMSO (Best-Nr.: D-2650, Sigma)	Brutschrank: Biosafe 70040 (Integra Biosc.)
Trypsin/EDTA f.EC (Best-Nr.: T-4299, Sigma)	Power Supply „Consort E452“ (MAGV GmbH)
BOA prot.marker (Bst-Nr.: BOA002, MoBiTec)	Blotkammer: Multiphor II (Pharmacia)
Aktives MMP-2 (Best-Nr.: PF023, Oncogene)	Inkub.kammer Westernblots: Micro 4 (Hybaid)
Glycin (Best-Nr.: 3908.2, Roth)	Horizontalschüttler: IKA-Vibrax VXR (IKA)
Borat (Best-Nr.:17-1322-01, Pharmacia Biom.)	Mikroskop (Nikon TMS)
Tris-Hydrochloride-Puffer (T-3253, Sigma)	Fluoreszenzmikroskop: DMRXE (Leica) mit 3 CCD-Kamera (Sony)
Gelatine (G-8150, Sigma)	Kühlfalle mit Vakuumpumpe: Alpha I-5 (Christ) und Vacuum (Pfeiffer)
SDS (Best-Nr.: Biorad)	Gelkammer: Whatman (Biometra)
TEMED (Best-Nr.: 17-1312-01, Pharmacia B.)	AGFA-Entwickler: Curix 60
Tris-Base (Best-Nr.:T-6066, Sigma)	Filme: Kodak X – Omat AR Film 13x18
Triton-X (Best-Nr.:T-8787, Sigma)	Kühlschränke +4°C, -20°C, -80°C : Liebherr
Coomassie-Blue (Best-Nr.: 35051, Serva)	Elisa-Reader: MRX Revelation (Dynex Tech.)
Methanol (Best-Nr.:32213, Riedel-de-Haen)	
Essigsäure (Best-Nr.: 1.00063, Merck)	
APS (Best-Nr.: 161-0700, Biorad)	

2.4 Statistik

Alle im Ergebnisteil aufgeführten Daten verstehen sich, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert \pm Standardabweichung. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Test oder die Friedmann-Analyse mit nachfolgendem Paarvergleich benutzt. Ein $p < 0,05$ ist als statistisch signifikant gewertet worden.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Endothelzellkultur

3.1.1 Austestung verschiedener Medien

Ziel der Untersuchungen war es, den Einfluss verschiedener Nährmedien auf das Wachstum der Endothelzellen zu beschreiben und die beste Kombination von Nährmedium und Supplementen zu finden.

3.1.1.1 IMDM und Ham's F12 als Nährmedium

Bei der Kultivierung der ersten Endothelzellen verwendeten wir zunächst als Nährmedium eine Kombination von IMDM und Ham's F12 zu je gleichen Teilen. Zusätzlich wurde das fertige Gemisch mit FKS [fötalem Kälberserum] angereichert.

Abbildung 5 und 6 zeigen den Einfluss verschiedener FKS-Seren auf das Endothelzellwachstum. Im Vergleich zu Abbildung 5 verdeutlicht Abbildung 6 die Abhängigkeit des Zellwachstums von der FKS-Konzentration im Medium.

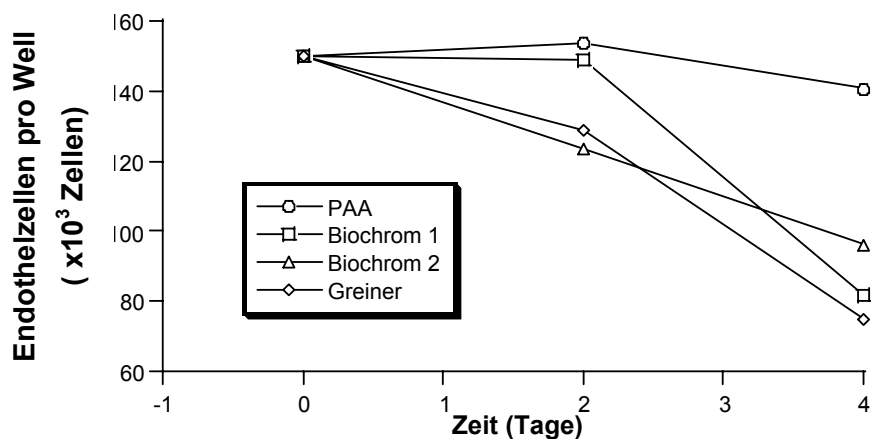


Abb. 5 : Wachstumskurven von HUVEC in Abhängigkeit verschiedener Wachstumsseren

Gezeigt sind Wachstumskurven von HUVEC in Abhängigkeit vom Serum unterschiedlicher Hersteller (PAA, Biochrom, Greiner). Dem IMDM/Ham's F12 Medium (1:1) wurde je 10% FKS (final) zugesetzt.

In Abbildung 5 (Medium + 10% FKS) zeigen sich fallende Zellzahlen nach zwei und vier Tagen. Nur bei Benutzung des Serums von PAA bleibt die Zellzahl annähernd konstant. In Abbildung 6 (Medium + 20% FKS) zeigt sich nach drei Tagen überwiegend eine verminderte Gesamtzellzahl. Nach fünf Tagen in Kultur erreicht die Gesamtzellzahl bei drei Seren wieder die Inokulationszahl. Nur bei dem Serum von PAA ist eine Erhöhung der Zellzahl zu erkennen.

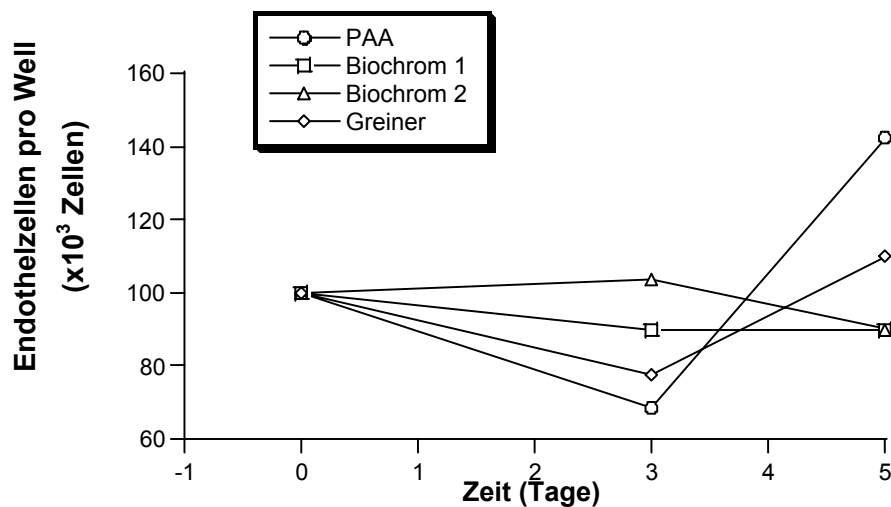


Abb. 6 : Wachstumskurven von HUVEC in Abhängigkeit verschiedener Wachstumsseren

Das Wachstum von HUVEC ist hier dargestellt in Abhängigkeit von Seren unterschiedlicher Hersteller (PAA, Biochrom und Greiner). Dem IMDM / Ham's F12 Medium (1:1) wurde 20% FKS (final) zugesetzt.

3.1.2 M199 als Nährmedium

Mit M199 und gleichbleibender FKS-Konzentration (20%) erhöht sich die Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zum IMDM+Ham's Medium deutlich. Nach fünftägiger Kultur lässt sich die Zellausbeute fast vervierfachen. Eine vergleichende Wachstumskurve der beiden Medien zeigt Abbildung 7.

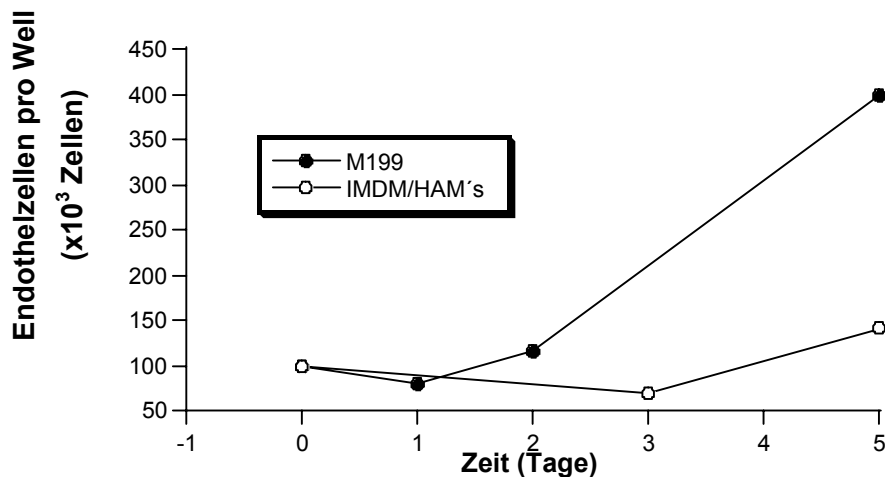


Abb. 7 : Vergleich der Wachstumsmedien IMDM/Ham's (1:1) mit M199

Dargestellt sind zwei Wachstumskurven von HUVEC in Abhängigkeit unterschiedlicher Kulturmedien (M199 und IMDM/Ham's F12). Dabei enthalten beide Medien 20% FKS (PAA).

3.1.3 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Endothelzellen

Eine weitere Erhöhung der Wachstumsgeschwindigkeit gelingt durch den Zusatz eines endothelialen Wachstumsfaktors. Ein direkter Vergleich der in der Literatur verwendeten Wachstumsfaktoren ECGF (Endothelial Cell Growth Factor, Sigma), ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement, Sigma), ECGS + Heparin (Sigma) weist erhebliche Unterschiede im Zellwachstum besonders in der zweiten Passage auf. So ist die alleinige Anwendung von ECGS (50µg/ml) und auch die Kombination von ECGS+Heparin (50 µg/ml) dem alleinigen Gebrauch von ECGF schon in der ersten Passage unterlegen. In der zweiten Passage übertrifft ECGF bei weitem die Wachstumsgeschwindigkeit der beiden anderen Alternativen.

3.1.4 Beschichtung der Kulturgefäße

Mit der Beschichtung der Kulturfラスchen mit Collagen Typ 1 wird der Phänotyp und die Pflastersteinmorphologie der Endothelzellen optimiert. Notwendig ist sie bei der Kultivierung der Zellen auf Glasoberflächen, um den Zellen die Möglichkeit der Ansiedelung zu geben. Auch während den Versuchen garantiert sie eine bessere und längere Anheftung der Zellen am Boden.

3.1.5 Zusammenfassung

Die Kombination von M199 (inkl. Glutamin und PenStrep, Sigma) mit 20% FKS und ECGF (1/100) ergibt, auf beschichteten Wachstumsoberflächen, das beste Ergebnis hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeit und der Morphologie.

Abbildung 8 verdeutlicht zusammenfassend den Einfluss von FKS-Konzentrationen im Medium (1%, 10%, 20%) bei An- oder Abwesenheit von ECGF. Schon nach drei Tagen in Kultur sieht man deutliche Unterschiede im Wachstum. Nach fünf Tagen erkennt man bei den Medien mit 10% und 20% FKS deutlich höhere Zellzahlen als beim Medium mit 1% FKS. Ausserdem lässt sich der deutliche Einfluss von ECGF auf die Zellvermehrungsgeschwindigkeit ablesen. Medien derselben FKS-Konzentrationen zeigen hier ab dem dritten Tag höhere und am fünften Tag deutlich höhere Zellzahlen, wenn ECGF zugesetzt wurde.

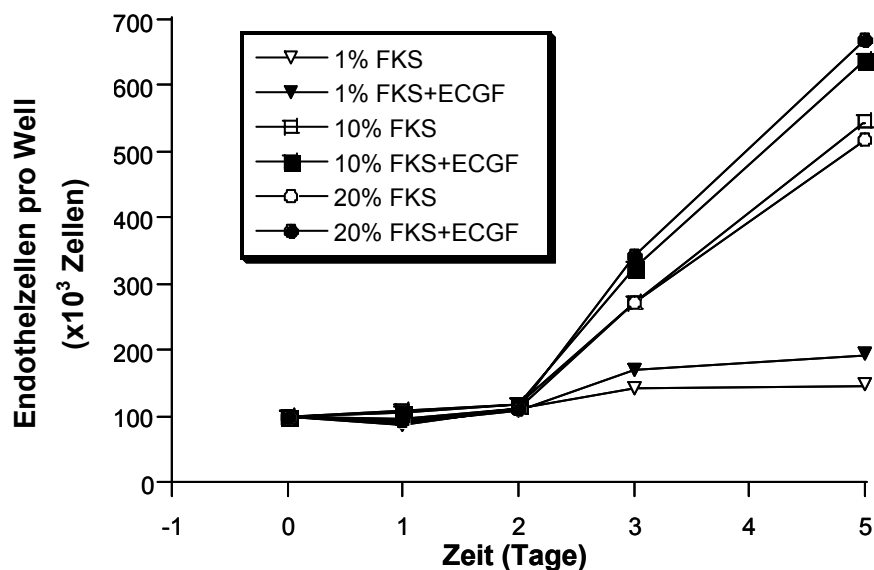


Abb. 8 : Einfluss verschiedener Medienzusammensetzungen auf das Wachstum von humanen Endothelzellen

Gezeigt sind Wachstumskurven von HUVEC in Abhängigkeit unterschiedlicher FKS-Konzentrationen (1%, 10%, 20%) und An- oder Abwesenheit vom Wachstumsfaktor ECGF (1:100).

Am Tag 0 wurden Zellen einer Primärkultur in 6-Well-Plates ausgesät (Inokulationszahl: 100.000/ Well, Wachstumsfläche pro Well ca. 10 cm²) und über einen Zeitraum von fünf Tagen kultiviert. An den Tagen 1, 2, 3 und 5 wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA vom Untergrund gelöst und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Mit der oben genannten Kombination zeigen die Endothelzellen, im Unterschied zu IMDM + Ham's, ein kontinuierliches Wachstum auch jenseits der zweiten Passage. Dabei behalten die Endothelzellen ihre Pflastersteinmorphologie bei. Trotzdem ist mit zunehmender Passagierung eine Verschlechterung der Morphologie mit eher faserig aussehenden Zellen zu beobachten. Für die Versuche wurden deshalb nur Zellen der ersten und zweiten Passage verwendet. Ein Foto einer typischen Endothelzellkultur ist unten gezeigt.

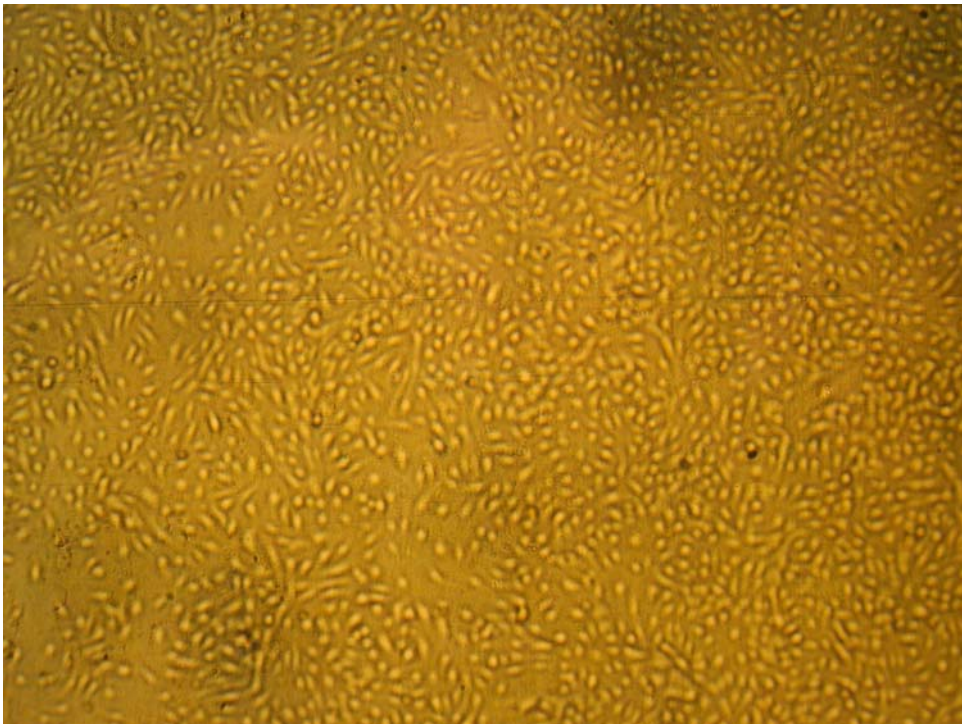


Foto der Endothelzellkultur

3.2 MMP-Produktion in Endothelzellen

In den folgenden Experimenten sollte der Frage nachgegangen werden, ob HUVEC's Matrixmetalloproteinasen (MMPs) produzieren und sezernieren. Zum Nachweis einer MMP-Sekretion wurden der Elisa, der Westernblot und die Zymographie verwendet.

3.2.1 Nachweis von MMPs in der Gelatin-Zymographie

In der Gelatin-Zymographie zeigte sich, dass MMP-2 und MMP-9 im Überstand des gewonnenen Mediums (s.Abschnitt Material und Methoden) vorhanden sind. Dabei macht

die sezernierte Menge an MMP-2 (pro-MMP-2) bei HUVECs den weitaus grössten Teil der sezernierten Gelatinasen aus. MMP-9 wird zu erheblich geringem Ausmaß sezerniert. Ausserdem ist eine Aufspaltung von MMP-2 in verschiedene Fraktionen zu erkennen. Es handelt sich dabei um pro-MMP-2 (72kDa), intermediäres MMP-2 (64kDa) und aktives MMP-2 (62kDa). Ein repräsentatives Gel zeigt Abbildung 9.

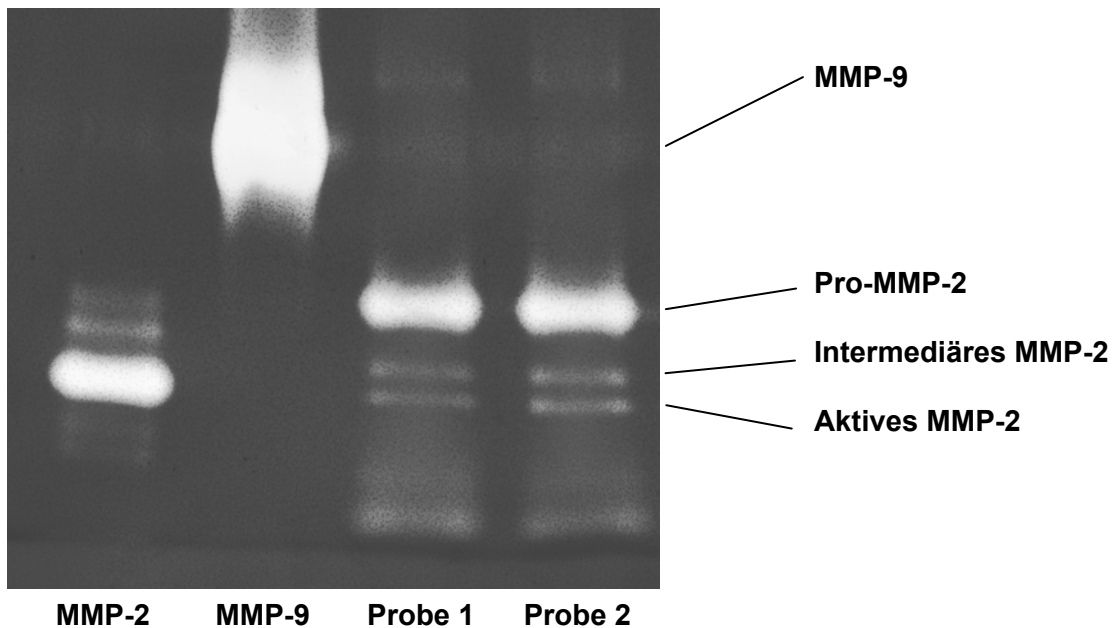


Abb. 9 : Nachweis von Matrixmetalloproteinasen (MMP) im Überstand von menschlichen Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden über 4-5 Tage in 6-Well-Plates kultiviert. Nachdem die Zellen 10-12 Stunden in einem serumarmen Medium (0,4% FKS final) kultiviert wurden, folgte ein erneuter Mediumwechsel mit serumarmem Medium. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Zellen gezählt. Dieser Überstand wurde mit Hilfe einer Kühlfalle im Verhältnis 10:1 konzentriert. Dann schloss sich eine Proteinbestimmung an. In der nun folgenden Zymographie war es damit möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Auf der Abbildung ist eine repräsentative Zymographie dargestellt. Gut zu erkennen ist die Aufspaltung der MMP-2-Fraktion in Pro-, Intermediäres und aktives MMP-2.

[MMP-2 = aktives MMP-2 ; MMP-9 = aktives MMP-9]

3.2.2 Nachweis von MMPs im Westernblot

Der Westernblot bestätigte die Ergebnisse, die bei der Gelatin-Zymographie gewonnen wurden. Auch hier konnte die Präsenz von MMP-2 und MMP-9 im gewonnenen Medium nachgewiesen werden. Zwei repräsentative Westernblots zeigt Abbildung 10.

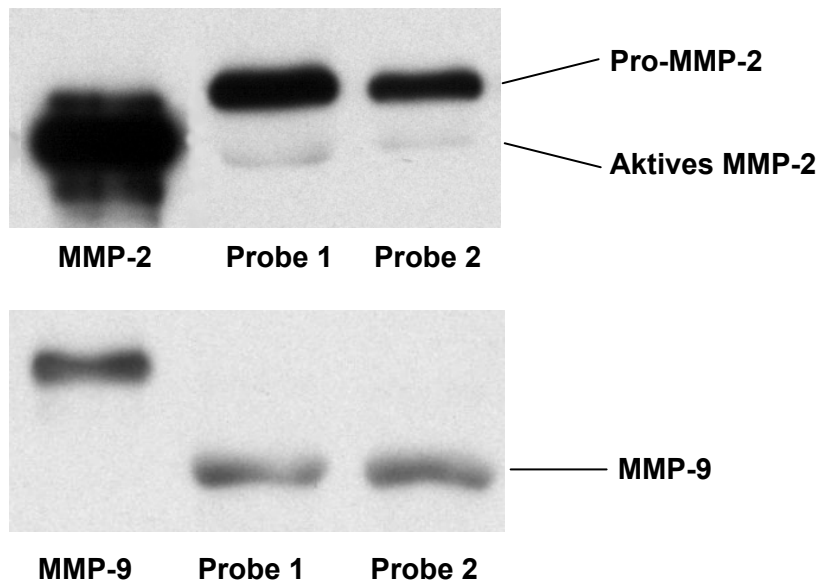


Abb. 10 : Nachweis von Matrixmetalloproteinasen (MMP) im Überstand von menschlichen Endothelzellen

Die Endothelzellen wurden über 4-5 Tage in 6-Well-Plates kultiviert. Nachdem die Zellen 10-12 Stunden in einem serumarmen Medium (0,4% FKS final) kultiviert wurden, folgte ein erneuter Mediumwechsel mit serumarmen Medium. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Zellen gezählt. Dieser Überstand wurde mit Hilfe einer Kühlfalle im Verhältnis 10:1 konzentriert. Nun schloss sich eine Proteinbestimmung an. In dem nun folgenden Westernblot war es damit möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Auf der Abbildung ist ein repräsentativer Westernblot dargestellt. Auch hier ist im Falle von MMP-2 eine Aufspaltung der MMP-2-Fraktion in pro-MMP-2 und aktives MMP-2 zu erkennen.

Oben : Westernblot mit Antikörpern gegen MMP-2
 Unten : Westernblot mit Antikörpern gegen MMP-9

[MMP-2 = aktives MMP-2 ; MMP-9 = aktives MMP-9]

In den nachfolgenden Experimenten konzentrierten wir uns auf die Untersuchung von MMP-2.

3.2.3 Zeitabhängigkeit der pro-MMP-2 Bildung

Den weitaus grössten Teil des im Überstand gemessenen MMP-2 macht das pro-MMP-2 aus. Wir konzentrierten uns auf die zeitabhängige Bildung, bzw. Sekretion von pro-MMP-2. Die Ergebnisse, die mittels eines pro-MMP-2 Elisas gewonnen wurden, sind in Abbildung 11 dargestellt. Dort erkennt man die zeitabhängige Konzentrationserhöhung von pro-MMP-2 im Überstand. Die Zymographie und der Westernblot bestätigten diese Ergebnisse (siehe auch Abb. 13).

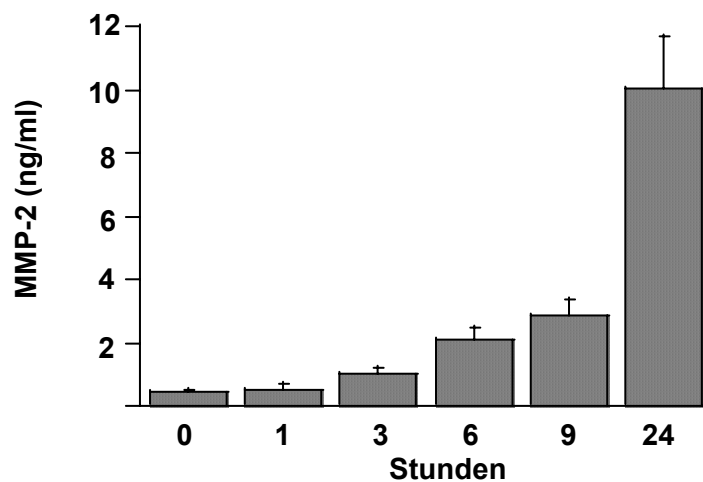


Abb. 11 : Zeitabhängige Sekretion von pro-MMP-2 in HUVEC

Die Endothelzellen wurden über 4-5 Tage in 6-Well-Plates kultiviert. Nachdem die Zellen 10-12 Stunden in einem serumarmen Medium (0,4% FKS final) kultiviert wurden, folgte ein erneuter Mediumwechsel mit serumarmen Medium. Nach einem bestimmten Zeitraum (1, 3, 6, 9 und 24 Stunden) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen ausgezählt. Dieser Überstand wurde mit Hilfe einer Kühlfalle im Verhältnis 10:1 ankonzentriert. Nun schloss sich eine Proteinbestimmung an. In dem nun folgenden Elisa war es damit möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Auf der Abbildung sind die pro-MMP-2 Konzentrationen im Überstand nach 0h (Medium ohne Kontakt zu den Zellen), 1h, 3h, 6h, 9h und nach 24h zu erkennen.

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM aus fünf unabhängigen Experimenten.

3.3 Regulierung von MMP-2

In den nächsten Schritten sollte überprüft werden, ob und inwieweit die Sekretion von pro-MMP-2 reguliert wird. Auch wurde der Frage einer möglichen Stimulierung der Aktivierung von pro-MMP-2 zum aktiven MMP-2 nachgegangen. Dabei wurde analog der Verfahrensweise im vorherigen Abschnitt vorgegangen. PMA, Bradykinin und Interleukin 1-beta sollten die MMP-2 Konzentration im Überstand erhöhen, Cycloheximid und Colchicin sollten sie senken.

3.3.1 Stimulation der MMP-Sekretion und der Aktivierung zum aktiven Enzym

Die Behandlung der Zellen mit PMA (10^{-7} M), Bradykinin (10^{-6} M), Interleukin 1-beta (10ng/ml) über einen Zeitraum von 24 Stunden führte im Falle von Bradykinin zu einer erhöhten Sekretion von pro-MMP-2 und im Falle von PMA und Interleukin zu einer verstärkten Aktivierung des pro-MMP-2 in die intermediäre und aktive Form.

3.3.1.1 Stimulatorischer Effekt von Bradykinin auf die pro-MMP-2 Sekretion

Bei HUVECs bewirkte die Inkubation mit Bradykinin (10^{-6} M) für 24 Stunden eine vermehrte Freisetzung von pro-MMP-2. Die Konzentration des intermediären und aktiven MMP-2 blieb unberührt. Ein repräsentatives Gel zeigt Abbildung 12.

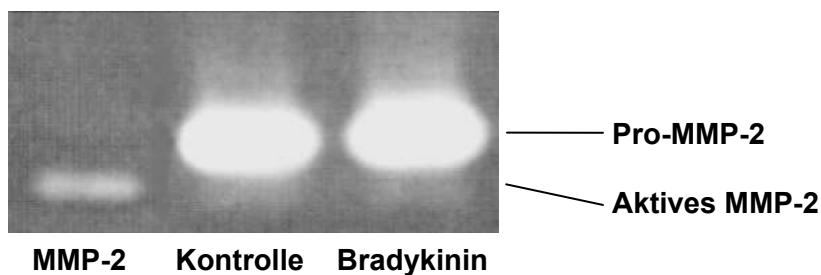


Abb. 12 : Einfluss von Bradykinin (10^{-6} M) auf die Sekretion der Matrixmetalloproteinase-2 (MMP-2)

Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte mit Bradykinin (10^{-6} M) gelöst in serumarmen Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden. Danach wurde der Überstand ankonzentriert und die Proteinmenge bestimmt. Damit war es in der nun folgenden Zymographie möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Auf der Abbildung ist eine repräsentative Zymographie dreier unabhängiger Experimente dargestellt.

[MMP-2 = aktives MMP-2]

3.3.1.2 Anstieg des aktiven MMP-2 durch Effekte von PMA und Interleukin 1-beta

Die Inkubation von HUVEC mit PMA (10^{-7} M) und Interleukin 1-beta (10ng/ml) für 24h führte zu einem Anstieg des intermediären und aktiven MMP-2 im Medium. Dieser Effekt ist sowohl zeit- als auch dosisabhängig (siehe Abbildungen 13,14,15). Der stärkste Anstieg war bei PMA (10^{-7} M) zu beobachten. Etwas schwächer ausgeprägt war beschriebener Effekt bei Interleukin 1-beta (10ng/ml).

3.3.1.2.1 Zeitabhängige Aktivierung von pro-MMP-2 durch PMA und IL-1 β

Die Abbildung 13 zeigt die zeitabhängige Aktivierung des pro-MMP-2 zum aktiven MMP-2 durch PMA und IL-1 β .

Zusammenfassend kann man festhalten, dass eine stetige Sekretion von pro-MMP-2 stattfindet. Nach 24 Stunden ist bei allen MMP-2 Formen die höchste Konzentration im Medium erreicht (Akkumulation). Dasselbe gilt auch für das intermediäre und das aktive MMP-2, welche nach einer Stunde schon in geringen Mengen nachweisbar sind und nach 24 Stunden die höchste Konzentration erreichen. Bemerkenswert ist die von Anfang an bestehende und sich bis zum Schluss fortsetzende geringere Konzentration von pro-MMP-2 in der mit PMA stimulierten Zellreihe. Auch ist bei PMA-Stimulation nach 6 Stunden eine viel geringere Konzentration von intermediären und aktiven MMP-2 im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Das ändert sich deutlich nach 24 Stunden. Hier dominiert dann die erhebliche Erhöhung des intermediären und aktiven MMP-2 bei gleichzeitig niedrigerer pro-MMP-2 Menge.

Bei Interleukin 1-beta Stimulation verändern sich die drei MMP-2 Fraktionen in den ersten 6 Stunden weitgehend identisch mit der Kontrolle. Nach 24 Stunden ist im Vergleich zur Kontrolle eine gering erhöhte pro-MMP-2 Konzentration erkennbar. Auch das intermediäre und aktive MMP-2 zeigen sich in gering vermehrter Menge.

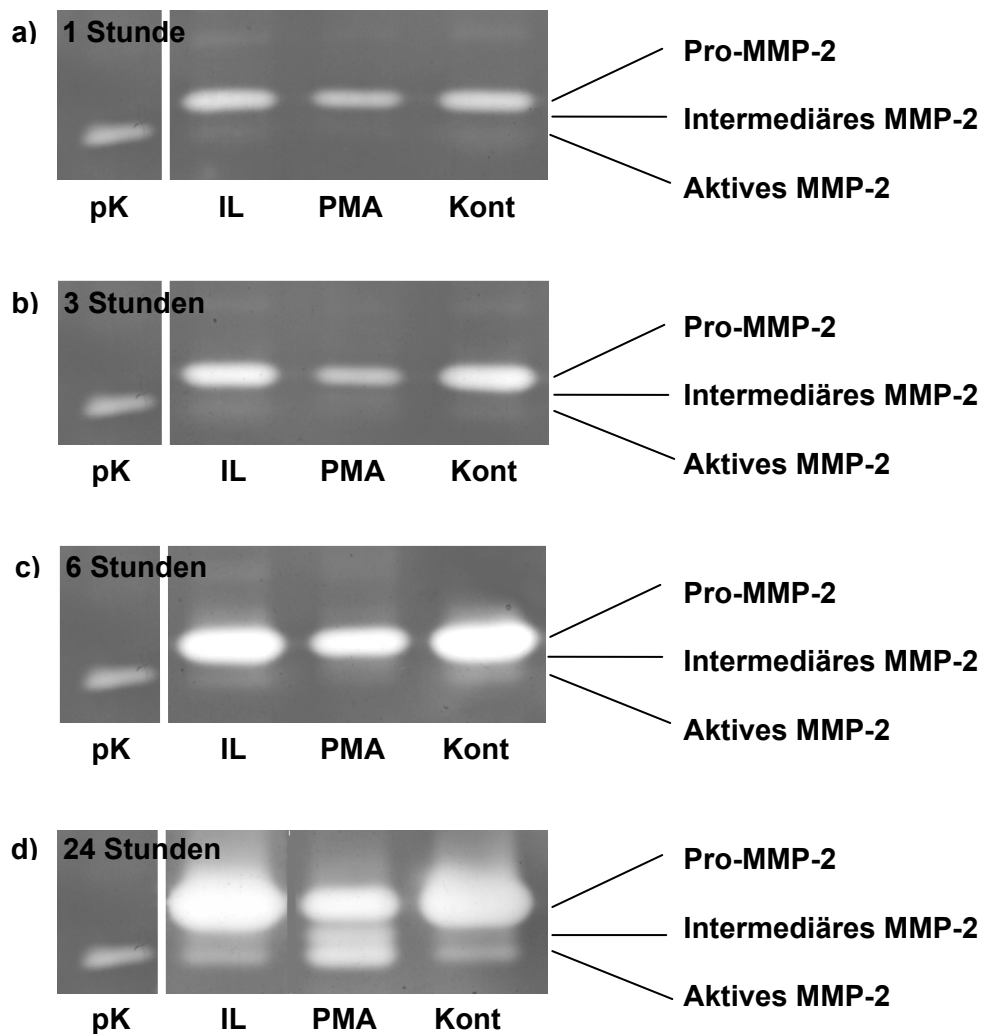


Abb. 13 : Zeitabhängige Effekte von PMA und Interleukin 1-beta auf die Matrixmetalloproteinase-2

Die Endothelzellen wurden über 4-5 Tage in 6-Well-Plates kultiviert. Dann wurde das Medium gegen serumarmes Medium (0,4% FKS final) ausgetauscht, welches über Nacht (10-12 Stunden) auf den Zellen verblieb. Danach erfolgte die Stimulation mit PMA (10^{-7} M) oder IL-1 β (10ng/ml) gelöst in serumarmem Medium. Zu den angegebenen Zeitpunkten (1, 3, 6 und 24 Stunden) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen gezählt. Der Überstand wurde dann mit Hilfe einer Kühlfalle im Verhältnis 10:1 ankonzentriert. Nun schloss sich eine Proteinbestimmung an. In der nun folgenden Zymographie war es damit möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Auf der Abbildung sind die zeitabhängigen Effekte von PMA (10^{-7} M) und IL-1 β (10ng/ml) in einer repräsentativen Zymographie zweier unabhängiger Experimente dargestellt.

[pK = positiv Kontrolle , aktives MMP-2 ; PMA = PMA ; IL = Interleukin 1-beta ; Kont = Kontrolle]

3.3.1.2.2 Dosisabhängige Aktivierung von pro-MMP-2 durch PMA

Wie schon beschrieben findet sich die größte Menge von intermediärem und aktivem MMP-2 bei einer Stimulation der Endothelzellen mit PMA 10^{-7} M. Bei niedrigeren PMA-Konzentrationen verringert sich dieser stimulatorische Effekt deutlich. Bei PMA 10^{-11} M ist aber trotzdem noch eine geringe Vermehrung dieser beiden Fraktionen im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Während pro-MMP-2 bei PMA 10^{-7} M im Vergleich zur Kontrolle noch in erheblich niedrigerer Konzentration vorhanden ist, kommt es bei PMA 10^{-9} M und 10^{-11} M zu einer Steigerung der pro-MMP-2 Konzentration (bei gleichzeitig erhöhtem intermediären und aktiven MMP-2). Nach Inkubation mit PMA 10^{-5} M waren nach 24 Stunden keine adhärenen Zellen mehr zu finden, so dass diese Proben nicht ausgewertet wurden. Abbildung 14 zeigt den beschriebenen Dosis-Wirkungseffekt von PMA.

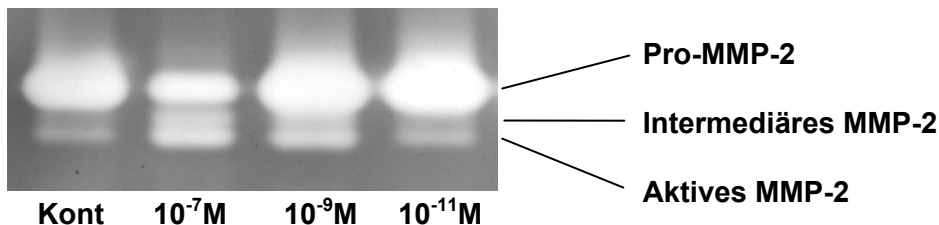


Abb.14 : Dosis-Wirkungseffekte des Phorbolesters PMA auf MMP-2 in humanen Endothelzellen

Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte mit PMA (10^{-7} M, 10^{-9} M, 10^{-11} M) gelöst in serumarmen Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden. Danach wurde der Überstand ankonzentriert und die Proteinmenge bestimmt. Es war nun in der folgenden Zymographie möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Auf der Abbildung ist eine repräsentative Zymographie zweier unabhängiger Experimente dargestellt.

[Kont = Kontrolle ; 10^{-7} M = PMA 10^{-7} ; 10^{-9} M = PMA 10^{-9} M, 10^{-11} M = PMA 10^{-11} M]

3.3.1.2.3 Dosisabhängige Aktivierung von pro-MMP-2 durch IL-1 β

Bei der Inkubation der Zellen mit Interleukin kommt es zu einer geringen Erhöhung aller drei MMP-2 Fraktionen. Ähnlich große Unterschiede wie bei der Stimulierung durch PMA sind bei den unterschiedlichen Konzentrationen von Interleukin 1-beta allerdings nicht auszumachen (siehe Abbildung 15).

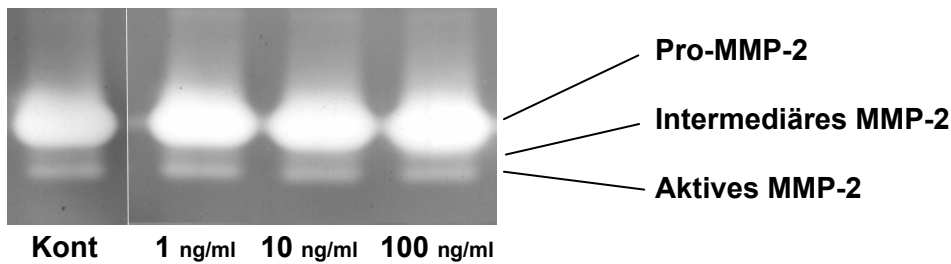


Abb.15 : Dosis-Wirkungseffekt des Zytokins Interleukin 1-beta auf MMP-2 in humanen Endothelzellen

Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte mit Interleukin -1 β (1ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) gelöst in serumarmen Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden. Danach wurde der Überstand ankonzentriert und die Proteinmenge bestimmt. Damit war es in der nun folgenden Zymographie möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Auf der Abbildung ist eine repräsentative Zymographie zweier unabhängiger Experimente dargestellt. gelöst in serumarmen Medium.
[Kont = Kontrolle]

3.3.2 Inhibitoren der pro-MMP-2 Sekretion und der Aktivierung zum aktiven Enzym

Im folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob die MMP-Sekretion von einer de-novo-Proteinsynthese abhängig ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurde Cycloheximid (ein Proteinsynthesehemmer) eingesetzt. Des Weiteren wurde untersucht, ob nach einer de-novo-Synthese der Transport des Enzyms in Vesikeln durch ein Mikrotubulingift gehemmt werden kann. Das Alkaloid Colchicin fand dazu Verwendung.

3.3.2.1 MMP-2 Synthesehemmung durch Cycloheximid

Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 0,02mg/ml und mit 0,001mg/ml Cycloheximid für 24 Stunden. Bei einer Konzentration von 0,02mg/ml zeigte sich nach 24 Stunden eine deutliche Verminderung von pro-MMP-2. Intermediäres und aktives MMP-2 war überhaupt nicht mehr nachweisbar. Auch Cycloheximid in einer Konzentration von 0,001mg/ml führte zu einer deutlichen Verminderung von pro-MMP-2. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

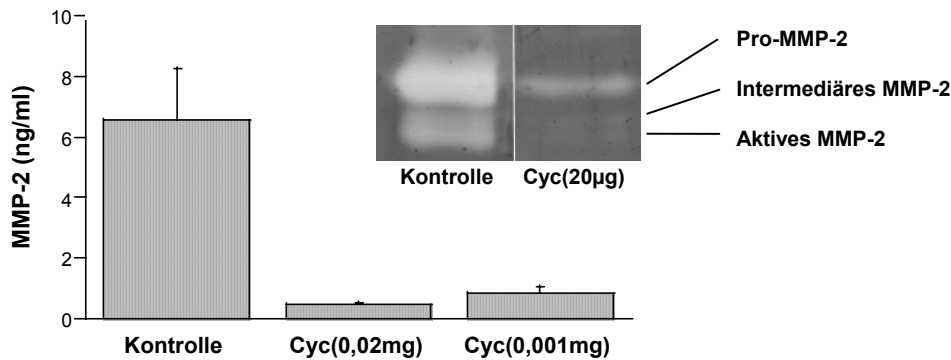


Abb.16 : Effekt des Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid auf MMP-2 in Endothelzellen

Balkendiagramm: Messung von pro-MMP-2 im Überstand mittels Elisa nach Stimulation mit Cycloheximid
 Zymographie: ins Diagramm eingefügter kleiner Ausschnitt einer repräsentativen Zymographie.

Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte mit Cycloheximid (20µg/ml) gelöst in serumarmen Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden. Danach wurde der Überstand ankonzentriert und die Proteinmenge bestimmt. Damit war es im nun folgenden Elisa möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Auf der Abbildung ist eine repräsentative Zymographie in die Ergebnisse des Elisa eingefügt. Dabei handelt es sich um die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente (bei Cyc. 0,001mg war n=2), dargestellt als Mittelwert ± SEM.
 [Cyc(0,02mg) = Cycloheximid (20µg/ml)]

3.3.2.2 Hemmung des vesikalen Transportes von pro-MMP-2 durch Colchicin

Die Inkubation der Zellen mit Colchicin ($10^{-3}M$) für 24 Stunden führte zu einer Verringerung der pro-MMP-2-Konzentration im gewonnenen Medium. Das intermediäre und aktive MMP-2 nahm analog zur pro-MMP-2 Konzentration ab. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

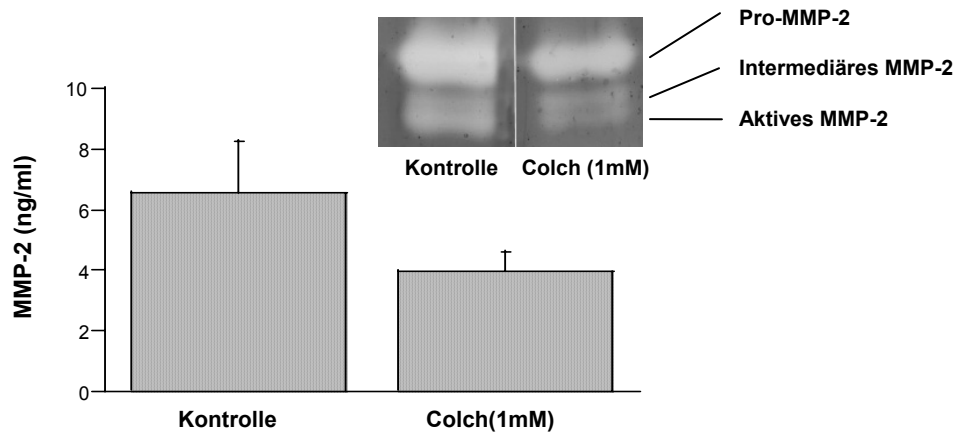


Abb.17: Effekt des Mikrotubulingiftes Colchicin auf MMP-2 in Endothelzellen

Balkendiagramm: Messung von pro-MMP-2 im Überstand mittels Elisa nach Stimulation mit Colchicin (1mM).

Zymographie: ins Diagramm eingefügter kleiner Ausschnitt aus einer repräsentativen Zymographie.

Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte mit Colchicin (1mM) gelöst in serumarmen Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden. Danach wurde der Überstand ankonzentriert und die Proteinmenge bestimmt. Damit war es in dem nun folgenden Elisa möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Auf der Abbildung ist eine repräsentative Zymographie in die Ergebnisse des Elisa eingefügt. Dabei handelt es sich um die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente, dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

[Colch (1mM) = Colchicin (1mM)]

3.3.3 Zusammenfassung

Die Konzentration von pro-MMP-2 im Überstand ist von einer zellulären de-novo-Synthese abhängig (s.Kap.3.3.3.1). Colchicin führt zu einer Verminderung der pro-MMP-2 Freisetzung mit konsekutiver Verminderung von intermediären und aktiven MMP-2. Als Erklärung kann ein gestörter Vesikeltransport angenommen werden. Bradykinin verstärkt die pro-MMP-2-Freisetzung. PMA und Interleukin-1 β fördern die Aktivierung von pro-MMP-2 zum intermediären und aktiven MMP-2.

3.4 Modulation der MMP-2 Sekretion durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron System

Im folgenden wurde der Frage nachgegangen, ob das RAAS mit seinen wichtigsten Hormonen Angiotensin und Aldosteron einen Einfluss auf die MMP-2 Freisetzung der HUVECs hat.

3.4.1 Einfluss von Aldosteron und Angiotensin auf MMP-2 in Endothelzellen

Zur näheren Erfassung des vermuteten Einflusses von Angiotensin und Aldosteron auf die MMP-2 Sekretion wurde anfangs der pro-MMP-2 Elisa durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann durch die Zymographie und den Westernblot ergänzt.

3.4.1.1 Stimulation der MMP-2 Sekretion durch Angiotensin und Aldosteron

3.4.1.1.1 Stimulation der MMP-2 Sekretion durch Angiotensin und Aldosteron, Ergebnisse des Elisa

Die Inkubation von Aldosteron ($10^{-7}M$) und Angiotensin ($10^{-7}M$) führte zu einer tendenziellen Erhöhung der pro-MMP-2 Konzentration im Medium nach drei, sechs, neun und vierundzwanzig Stunden. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die oben erwähnte tendenzielle Erhöhung lässt sich deutlich auf Abbildung 18 erkennen.

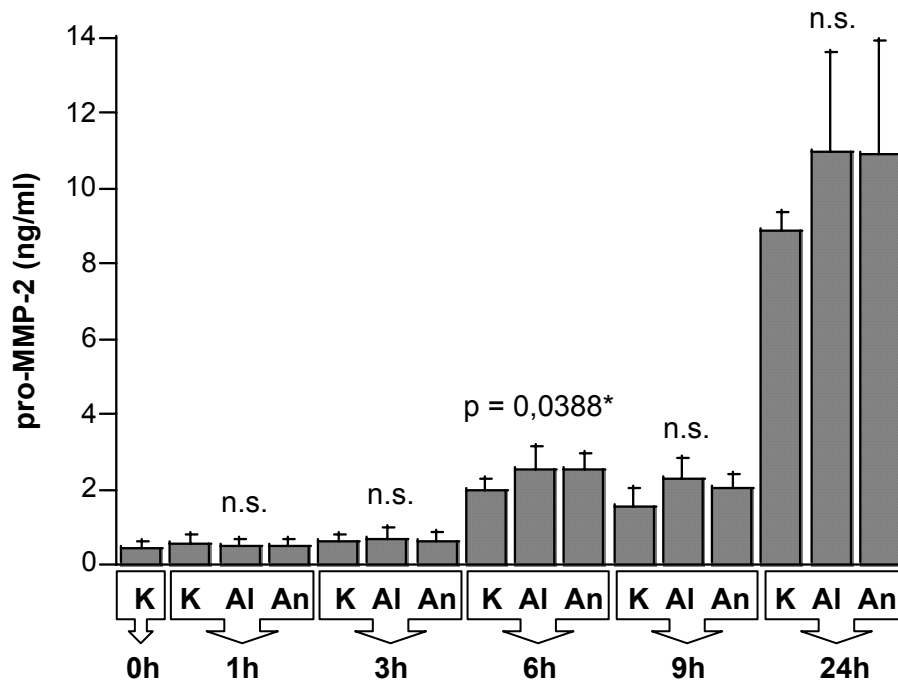


Abb. 18 : Zeitabhängige Sekretion von pro-MMP-2 in HUVEC bei Stimulation mit Aldosteron oder Angiotensin

Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte mit Aldosteron ($10^{-7}M$) oder Angiotensin ($10^{-7}M$) gelöst in serumarmen Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden. Zu den angegebenen Zeitpunkten (1, 3, 6, 9 und 24 Stunden) wurde der Überstand abgenommen, ankonzentriert und die Proteinmenge bestimmt. Damit war es in dem nun folgenden Elisa möglich, bei den Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Auf der Abbildung sind die pro-MMP-2 Konzentrationen im Überstand nach 0h (Medium ohne Kontakt zu den Zellen), 1h, 3h, 6h, 9h und nach 24h zu erkennen.

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM aus vier getrennten Experimenten (n=4).

Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde nicht erreicht. Bei den sechs Stunden Werten ergab sich folgendes Bild:

(*) $p = 0,0388$

Kontrolle vs Aldo : $p=0,068$

Kontrolle vs Angio : $p=0,068$

[n.s. = nicht signifikant ; K = Kontrolle ; Al = Aldosteron ; An = Angiotensin]

Die Auswertung der Experimente mit der Fragestellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen den beiden Stimulanzen und der pro-MMP-2 Sekretion ergab analog zu der vorher gesehenen tendenziellen Erhöhung der pro-MMP-2 Menge wieder nur den selben deutlichen, aber nicht signifikanten Trend (siehe Abb.19). Auch hier war die pro-MMP-2 Menge nach Stimulation mit Aldosteron (10^{-7}M) oder Angiotensin (10^{-7}M) nach 24 Stunden erhöht. Bei niedrigeren Konzentrationslösungen war in beiden Fällen eine geringere pro-MMP-2 Menge als bei der Kontrolle nachweisbar. Dieser Effekt war am deutlichsten bei Angiotensin (10^{-9}M) zu sehen.

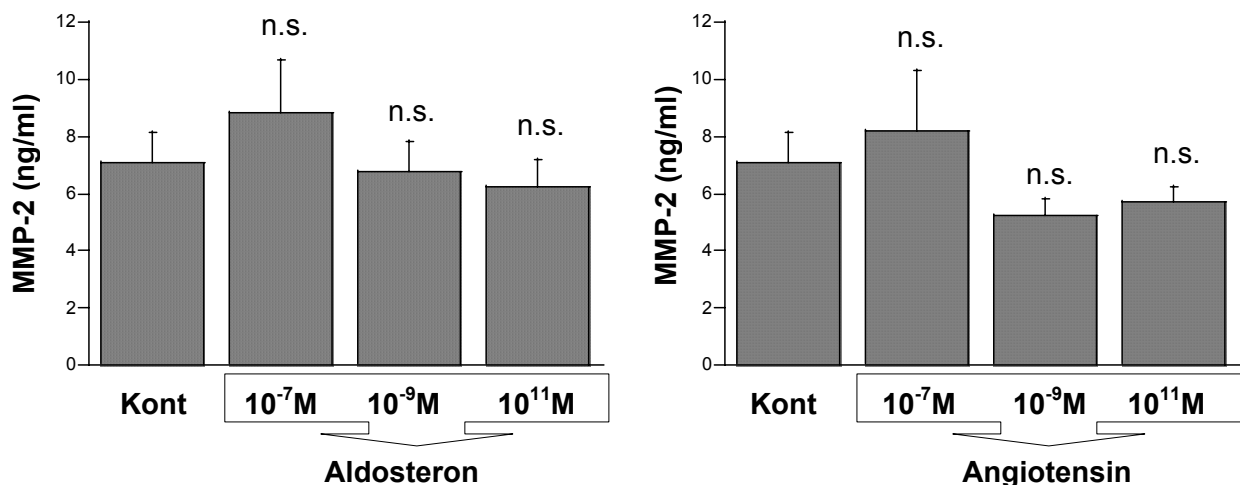


Abb. 19 : Konzentrationsabhängige Effekte von Angiotensin und Aldosteron auf die MMP-2 Sekretion in HUVEC

Die Endothelzellen wurden über 4-5 Tage in 6-Well-Plates kultiviert. Dann wurde das Medium gegen serumarmes Medium (0,4% FKS final) ausgetauscht, welches über Nacht (10-12 Stunden) auf den Zellen verblieb. Danach erfolgte die Stimulation mit Aldosteron (rechte Grafik) oder Angiotensin (linke Grafik) in den angegebenen Konzentrationen. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Zellen gezählt. Der Überstand wurde dann mit Hilfe einer Kühlfalle im Verhältnis 10:1 ankonzentriert. Nun schloss sich eine Proteinbestimmung an. In dem folgenden Elisa war es damit möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können.

Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM aus jeweils sieben unabhängigen Experimenten (n=7).

Nach Friedman ergeben sich folgende p-Werte:

Aldosteron-Grafik : $p = 0,54$

Angiotensin-Grafik : $p = 0,14$

[Kont = Kontrolle]

3.4.1.1.2 Antagonisierung der Wirkung von Aldosteron beziehungsweise Angiotensin

Als nächstes wurde versucht, die Stimulierung der pro-MMP-2 Sekretion durch Aldosteron und Angiotensin durch spezielle Blocker zu antagonisieren. Dafür kamen der Aldosteronantagonist Spironolacton ($10^{-7}M$) und der Angiotensin-1 Rezeptorantagonist Losartan ($10^{-7}M$) zum Einsatz. In Tabellen 1 und 2 sind die Ergebnisse dargestellt. Die tendenzielle Erhöhung der pro-MMP-2 Menge war auch hier zu beobachten, aber nicht signifikant. Während Spironolacton die pro-MMP-2 Menge nach 24 Stunden im Medium (nicht signifikant) senkt, scheint Losartan überhaupt keinen Einfluss auf die pro-MMP-2 Sekretion zu haben.

Tab.1

	MMP-2 (ng/ml)	Signifikanz
Kontrolle	8,91 ± 2,299	n.s.
Aldosteron	9,82 ± 2,575	n.s.
Spironolacton	6,858 ± 1,161	n.s.
Aldosteron + Spironolacton	4,774 ± 0,707	n.s.

Tab. 2

	MMP-2 (ng/ml)	Signifikanz
Kontrolle	10,348 ± 2,277	n.s.
Angiotensin	11,725 ± 2,550	n.s.
Losartan	10,00 ± 2,051	n.s.
Angiotensin + Losartan	10,528 ± 2,684	n.s.

Tab. 1 & 2 : Versuch der Antagonisierung der Wirkung von Aldosteron und Angiotensin

Die Endothelzellen wurden über 4-5 Tage in 6-Well-Plates kultiviert. Nachdem die Zellen 10-12 Stunden in einem serumarmen Medium (0,4% FKS final) kultiviert wurden, folgte wieder ein Mediumwechsel mit serumarmen Medium angereichert mit den Stimulanzen Aldosteron ($10^{-7}M$), Angiotensin ($10^{-7}M$), Spironolacton ($10^{-7}M$), Losartan ($10^{-7}M$), Aldosteron+Spironolacton (beide $10^{-7}M$), oder Angiotensin+Losartan (beide $10^{-7}M$). Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen. Nach Ankonzentrierung und Proteinbestimmung schloss sich der Elisa an. In den Tabellen sind die pro-MMP-2 Konzentrationen als Mittelwerte mit Standardabweichungen von fünf (Tab.1) und sechs (Tab.2) unabhängigen Experimenten dargestellt. [n.s. = nicht signifikant]
[Tab.1 : p = 0,14 ; Tab.2 : p = 0,39]

3.4.1.1.3 Stimulation der MMP-2 Sekretion durch Angiotensin und Aldosteron, Nachweis in der Zymographie

Die Inkubation von Aldosteron ($10^{-7}M$) und Angiotensin ($10^{-7}M$) führte im Falle von Aldosteron in der Zymographie zu einer signifikanten Erhöhung der pro-MMP-2 Konzentration im Medium nach 24 Stunden. Nicht signifikant war die Erhöhung der pro-MMP-2 Konzentration nach Stimulation mit Angiotensin. Eine repräsentative Zymographie zeigt Abbildung 20. In Abbildung 21 sind alle Ergebnisse zusammengefasst.

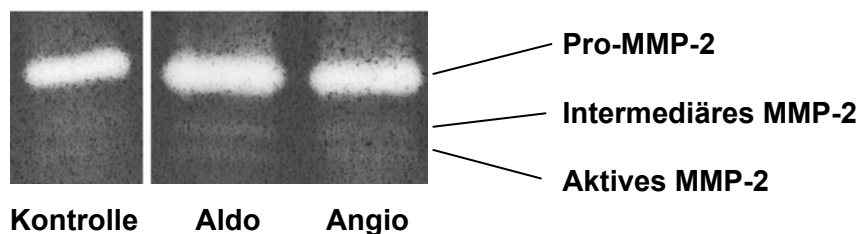


Abb.20 : Effekt von Aldosteron und Angiotensin auf die Matrixmetalloproteinasen in HUVEC

Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte mit Aldosteron ($10^{-7}M$) und Angiotensin ($10^{-7}M$) gelöst in serumarmen Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden. Danach wurde der Überstand ankonzentriert und die Proteinmenge bestimmt. Damit war es in der nun folgenden Zymographie möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Auf der Abbildung ist eine repräsentative Zymographie von fünf unabhängigen Experimenten dargestellt (n=5).

[Aldo = Aldosteron ; Angio = Angiotensin]

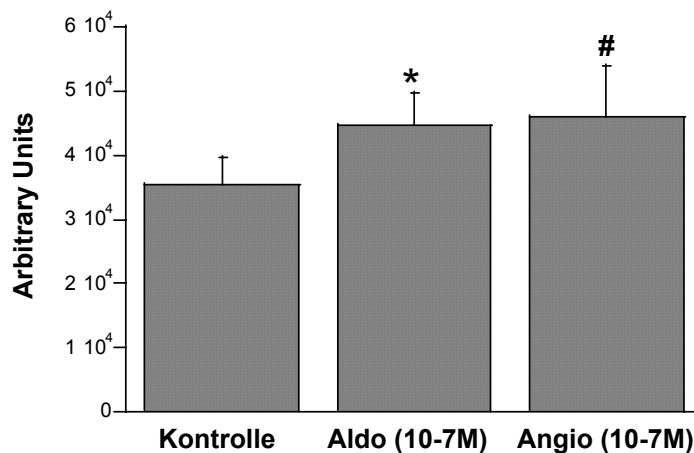


Abb. 21 : Effekte von Aldosteron und Angiotensin auf die Sekretion der Matrixmetalloproteinase-2 in HUVEC : Ergebnisse aller Zymographien

Die Stimulation der Endothelzellen erfolgte mit Aldosteron (10^{-7} M) und Angiotensin (10^{-7} M) gelöst in serumarmen Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden. Danach wurde der Überstand ankonzentriert und die Proteinmenge bestimmt. Damit war es in der nun folgenden Zymographie möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Die einzelnen Banden der Zymographie wurden mit Hilfe eines Gelanalyseprogramms ausgewertet. Auf der Abbildung sind die Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten als Mittelwerte \pm SEM dargestellt ($n=5$).

* Kontrolle vs Aldosteron : $p = 0,043$

Kontrolle vs Angiotensin : $p = 0,08$

[Aldo = Aldosteron ; Angio = Angiotensin]

3.4.1.1.4 Stimulation der MMP-2 Sekretion durch Angiotensin und Aldosteron, Nachweis im Westernblot

Die Stimulation der Endothelzellen mit Aldosteron und Angiotensin ergab bei der Analyse der Westernblots ein einheitliches Bild. Auch hier zeigte die Auswertung eine signifikant erhöhte pro-MMP-2 Konzentration im Medium nach 24 Stunden in der mit Aldosteron stimulierten Probe. In der mit Angiotensin behandelten Probe war eine deutliche, aber wieder nicht signifikante Erhöhung des pro-MMP-2 zu erkennen. Parallel war bei beiden eine geringe Erhöhung des aktiven MMP-2 zu verzeichnen. In Abbildung 22 ist ein repräsentativer Westernblot dargestellt. Abbildung 23 fasst alle Ergebnisse der Westernblots zusammen.

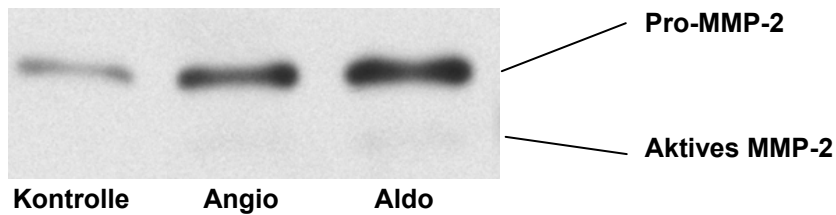


Abb.22 : Effekt von Aldosteron und Angiotensin

Die Endothelzellen wurden mit Aldosteron ($10^{-7}M$) und Angiotensin ($10^{-7}M$) gelöst in serumarmen Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden stimuliert. Danach wurde der Überstand ankonzentriert und die Proteinmenge bestimmt. Damit war es in dem nun folgenden Westernblot möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Auf der Abbildung ist ein repräsentativer Westernblot von fünf unabhängigen Experimenten dargestellt (n=5).

[Aldo = Aldosteron ; Angio = Angiotensin]

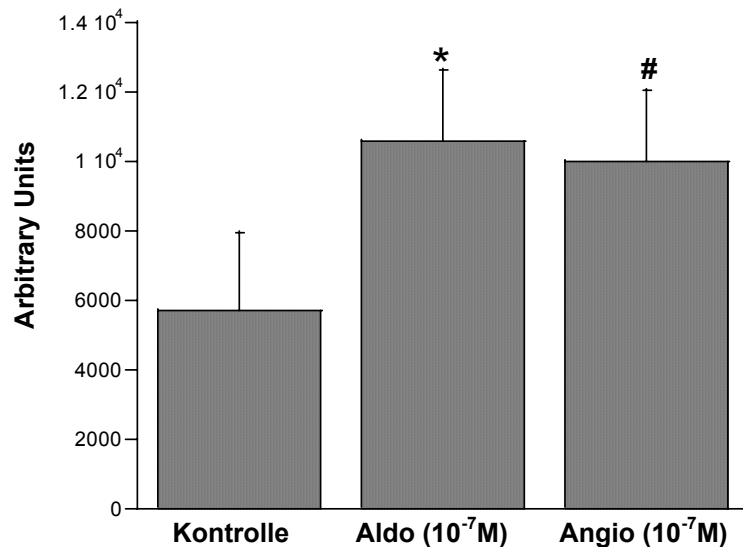


Abb.23 : Effekt von Aldosteron und Angiotensin auf die Sekretion von Matrixmetalloproteinase-2 in HUVEC Ergebnisse der Westernblots

Die Endothelzellen wurden mit Aldosteron ($10^{-7}M$) und Angiotensin ($10^{-7}M$) gelöst in serumarmen Medium über einen Zeitraum von 24 Stunden stimuliert. Danach wurde der Überstand ankonzentriert und die Proteinmenge bestimmt. Damit war es in dem nun folgenden Westernblot möglich, bei allen Proben die gleiche Proteinmenge einzusetzen, um vergleichbare Ergebnisse erhalten zu können. Die einzelnen Banden des Westernblots wurden mit Hilfe eines Gelanalyseprogramms ausgewertet. Auf der Abbildung sind die Ergebnisse von fünf unabhängigen Experimenten als Mittelwerte \pm SEM dargestellt (n=5).

* Kontrolle vs Aldosteron : p = 0,043

Kontrolle vs Angiotensin : p = 0,08

[Aldo = Aldosteron ; Angio = Angiotensin]

3.4.1.1.5 Zusammenfassung

Während der Elisa den stimulatorischen Effekt von Aldosteron und Angiotensin auf die pro-MMP-2 Sekretion nur in der Tendenz zeigt, weisen die Zymographie und der Westernblot auf eine signifikante Erhöhung der pro-MMP-2 Menge im Überstand in der mit Aldosteron stimulierten Probe hin. Im Falle von Angiotensin II ist auch eine konstant nachweisbare, deutliche Erhöhung der pro-MMP-2 Menge im Überstand nachweisbar. Diese ist aber im Gegensatz zu der mit Aldosteron stimulierten Probe nicht signifikant.

4 Diskussion

4.1 Etablierung der Zellkultur

Die Etablierung der Endothelzellkultur aus menschlichen Nabelschnurvenenendothelzellen legte den Grundstein zu der Untersuchung des endothelialen Matrixmetalloproteinase-Systems. Grundlegend für die Kultivierung von Zellen ist die Auswahl eines geeigneten Kulturmediums. In einer Arbeit von Butthep wurden HUVECs mit IMDM + FKS (oder humanem Serum) erfolgreich in vitro kultiviert⁹³. Andere Autoren benutzten IMDM zur Kultivierung von Kardiomyozyten⁹⁴ und in Kombination mit Ham's F12 zur Kultivierung von Hybridoma Cells⁹⁵. In unseren Versuchen gelang es mit einer Kombination von IMDM und Ham's F12 (inklusive FKS) nicht, eine zufriedenstellende Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen zu gewährleisten. Aus diesem Grunde wechselten wir auf das für Endothelzellen genutzte M199^{96,97}. Der Vergleich zwischen den beiden Medien verdeutlichte die Vorteile des M199. Neben einer besseren Zellmorphologie war es mit M199 möglich, die Zellausbeute nach fünftägiger Kultur fast zu vervierfachen. Terramani verglich allerdings M199 wiederum mit MCDB131 und bescheinigte dem MCDB-Medium nach seinen Versuchen eine 1,6-fache Erhöhung der Zellproliferationsrate⁹⁸.

In Bezug auf unterschiedliche FKS-Konzentrationen im Medium fand Terramani heraus, dass Medium mit 20% FKS eine wesentlich höhere Zellproliferationsgeschwindigkeit aufweist als Medium ohne FKS. Dort war nur ein minimales Zellwachstum zu finden. Auch in unserer Kultur war die Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen unter 1%igem FKS Medium sehr gering. Bei 20%igem Zusatz von FKS war die Zellausbeute wesentlich höher. Dieser Umstand bestätigt die These von Terramani, dass das Zellwachstum der HUVECs abhängig von diversen Faktoren im FKS ist und gegenüber anderen Zellarten HUVECs einen hohen Gehalt an FKS benötigen.

Darüberhinaus führte der Zusatz von Heparin und ECGS in seiner Arbeit und bei unseren Versuchen zu einer Steigerung der Wachstumsrate der Endothelzellen. Allerdings war die Kombination von Heparin und ECGS in unseren Versuchen der alleinigen Anwendung von ECGF unterlegen. Es zeigte sich bei ECGF besonders in der zweiten Passage eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit der HUVECs. Obwohl die Zusammensetzung des ECGF vom Hersteller Sigma nicht preisgegeben wurde, entschieden wir uns wegen der besseren Wachstumsstimulation für ECGF.

In Bezug auf eine Beschichtung der Kulturflaschen kam Terramani zu dem Ergebnis, dass diese keine statistischen Unterschiede in Bezug auf die Zellproliferation oder Morphologie

erbringt. Trotzdem konnte bei uns durch die Beschichtung der Kulturflaschen mit Collagen Typ I die Pflastersteinmorphologie der HUVECs subjektiv optimiert werden. Unabdingbar wurde sie zur Kultivierung der Zellen auf Glasoberflächen (z.B. auf Chamberslides).

4.2 MMP-Produktion in Endothelzellen

In unseren Versuchen konnten wir die Sekretion von MMP-2 und MMP-9 durch HUVECs nachweisen und so die Ergebnisse vorhergegangener Studien bestätigen und erweitern.

Unter anderen zeigte Caudroy in seiner Studie, dass HUVECs eine Vielzahl von MMPs produzieren. Dazu gehören MMP-1, -2, -3, -9, MT-MMP-1 und TIMP-1, -2⁹⁹. Weitere Autoren bestätigten die Produktion von MMP-2 in HUVECs, wie z.B. Axelrad¹⁰⁰, Arenas¹⁰¹ und Wang¹⁰². Die Arbeitsgruppe um Wang postulierte auch eine MMP-14 Produktion durch die HUVECs. MMP-1 wurde von Nikkari¹⁰³ und Huang¹⁰⁴ in Endothelzellen und bei Huang auch in HUVECs nachgewiesen. Rajavashisth beschrieb eine Zunahme der MT-MMP-1 Expression in Endothelzellen durch oxidiertes LDL¹⁰⁵. MMP-9 wurde durch Das in retinalen Endothelzellen nachgewiesen¹⁰⁶.

Die Messung der MMP-2 und MMP-9 Sekretion erfolgte – wie in unserem Versuchsaufbau – bei Arenas durch die Gelatin-Zymografie und den Westernblot.

4.3 Regulierung von MMP-2

4.3.1 Einfluss von Bradykinin auf das MMP-2 System

Bei HUVECs bewirkte die Stimulation mit Bradykinin (10^{-6} M) eine vermehrte Freisetzung von pro-MMP-2. Die Arbeitsgruppe um Ehringer wies in HUVECs bereits im Jahr 2000 eine erhöhte Produktion von pro-, intermediären und aktiven MMP-2 in der mit Bradykinin (1μ M, für eine Stunde) stimulierten Probe nach.¹⁰⁷ Dieser Effekt war bei uns nach der 24-stündigen Inkubation im Falle des pro-MMP-2 nur noch schwach zu erkennen. Eine Erhöhung des intermediären und aktiven MMP-2 konnte bei uns nicht festgestellt werden. Diese Differenz könnte sich bei gleicher Stimulationskonzentration (10^{-6} M) aus der unterschiedlichen Inkubationszeit der Zellen ergeben. Weiter wurde in der Arbeit von Ehringer gemutmaßt, dass die erhöhte endotheliale Permeabilität für Makromoleküle, die man beobachtet hatte, durch eine erhöhte Produktion von MMP-2 ausgelöst wird. Unsere Beobachtungen können diese These unterstützen, da unsere Ergebnisse eine leicht erhöhte Konzentration von pro-MMP-2 im durch Bradykinin stimulierten Medium ergeben hatten.

Bei einem anderen Zelltyp (glatte Muskelzellen aus einer Schweinetrachea) konnte Zaczynska zeigen, dass Bradykinin (von einer Konzentration von 10^{-8} bis 10^{-4} M) zu einer Steigerung der MMP-2 Produktion in diesen Zellen führt.¹⁰⁸ Diese Erhöhung war nach 24 Stunden Inkubation deutlich sichtbar (10^{-4} M) und es bestand ein signifikanter Unterschied in der Auswertung zwischen Kontrolle und Probe.

4.3.2 Einfluss von PMA auf das MMP-2 System

Ehringer beschrieb den Einfluss des Phorbolster PMA auf die MMP-2 Sekretion in HUVECs und fand heraus, dass PMA bei HUVECs eine Stimulation der Produktion von intermediären und aktiven MMP-2 auslöst.¹⁰⁷ Er führte die Stimulation mit PMA (10ng/ml) über eine Stunde durch. In unseren Versuchen war nach einer Stunde weder ein Anstieg des intermediären noch des aktiven MMP-2 zu erkennen. Nach 24 Stunden war jedoch deutlich mehr intermediäres und aktives MMP-2 in der mit PMA (10^{-7} M entspricht ca. 62ng/ml) stimulierten Zellpopulation als in der Kontrolle auszumachen. Diese Beobachtung könnte auf dieser unterschiedlichen Stimulationskonzentration beruhen. Unterstützend könnte die von uns durchgeführte Dosis-Wirkungsbeziehung von PMA wirken. Dort zeigte sich eine Erhöhung aller drei MMP-2 Fraktionen nach einer Stimulation mit PMA 10^{-9} M (entspricht ca. 0,62ng/ml). Die von Ehringer gewählte Stimulationskonzentration liegt mit 10ng/ml genau zwischen den von uns gewählten Stimulationskonzentrationen (62ng/ml und 0,62ng/ml), sodass vorstellbar ist, dass eine höhere PMA-Konzentration zu einer vermehrten Aktivierung von MMP-2 mit konsekutiver Verminderung von pro-MMP-2 führen könnte.

Schon früher wurde über die stimulatorischen Eigenschaften von PMA berichtet. So beschreibt Cornelius bereits 1995 eine Stimulation der Produktion der Collagenase, des Stromelysins, der 92-kDa Gelatinase (MMP-9) und des TIMP-1 durch PMA. Allerdings wurde im selbem Versuchsaufbau die Expression von TIMP-2 durch PMA herunterreguliert.¹⁰⁹ Interessant, gerade auch im Bezug auf eine Modellierung des MMP-Systems durch Stimulanzien das RAA-Systems, war eine Arbeit von Iwai. Er beschrieb bei Endothelzellen bereits 1987, dass PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) die zelluläre und die ACE-Aktivität im Medium erhöht. Das könnte mit einer erhöhten Angiotensin II-Konzentration und einer verminderten Bradykinin-Konzentration einhergehen, die wiederum zu einer Zunahme des Stresses an der Endothelzellmembran führen könnte¹¹⁰ und zudem zu einer Erhöhung der MMP-2 Sekretion führt¹⁰¹.

In arteriellen pulmonären Rattenendothelzellen, die mit PMA gereizt wurden, stieg das intrazelluläre Calcium an.¹¹¹ Papadimitriou zeigte an Endothelzellen von adrenalen medullären Ratten, dass PMA durch eine Aktivierung von PKC (Protein-Kinase-C) die Sekretion von MMP-2 erhöht.¹¹² Den gleichen Aktivierungsmechanismus postulierte Parks,

der mit Glioblastomzellen experimentierte. Er fand heraus, dass PMA die Sekretion von MMP-9 ankurbelt, während es die Sekretion von TIMP-1 und TIMP-2 drosselt. Außerdem kommt es zu einem Anstieg der MT-MMP-1 auf der Zelloberfläche und zu einer Aktivierung des pro-MMP-2 zum aktiven Enzym.¹¹³ Man könnte also annehmen, dass dieser Anstieg der MT-MMP-1 auf der Zelloberfläche zu einer verstärkten Aktivierung von pro-MMP-2 führt.

4.3.3 Einfluss von Interleukin-1 beta auf das MMP-2 System

Interleukin-1 beta bewirkt in humanen Endothelzellen einen Anstieg von MT-MMP-1 mRNA und korreliert mit einem späteren Anstieg von MT-MMP-1 in der Zellmembran. Auch oxidiertes LDL erhöht die MT-MMP-1 in der Membran.¹⁰⁵ Dies könnte in Bezug auf die Atheroskleroseentwicklung einen weiteren Hinweis für die Beeinflussung der Atherosklerose durch die MMPs ergeben oder gar eine weitere Erklärung für die im atherosklerotischen Plaque erhöhte MMP-Aktivität liefern. [75]

Auch könnte eine MT-MMP-1 Erhöhung durch Interleukin-1 beta die bei uns festgestellte Erhöhung des aktiven und intermediären MMP-2 in der mit Interleukin-1 beta stimulierten Probe erklären, da MT-MMP-1 das pro-MMP-2 aktivieren kann.

Des Weiteren erhöht IL-1 beta die Produktion von MMP-9 in Makrophagen, während MMP-2 davon unberührt bleibt.¹¹⁴ Nootboom beschreibt in einer Arbeit, dass IL-1 beta die endotheliale Permeabilität von HUVECs um das 2,5 fache erhöht und äußerte die Vermutung, dass die gesteigerte Permeabilität mit einem Cytokin-induzierten Umbau der subendothelialen Matrix (durch MMPs) zusammenhängen könnte.¹¹⁵ Im Bezug auf MMPs und dem RAA-System leitete Saijonmaa eine interessante Untersuchung. Es wurden die Effekte von Cytokinen (TNF-alpha und IL-1 beta) auf HUVECs untersucht. Dabei fand man heraus, dass IL-1 beta (0,1-10ng/ml) die Menge von ACE in der Zellmembran senkt bei gleichzeitiger Verminderung von ACE-mRNA (durch p38 mitogen-activated protein-kinases). Das könnte mit einer Erhöhung des Bradykinin und einer Erniedrigung von Angiotensin II eine gegenregulierende Funktion bei der Atheroskleroseentwicklung besitzen.¹¹⁶

Auch bei anderen Zelltypen konnte der stimulatorische Effekt von Interleukin-1 beta auf das MMP-System nachgewiesen werden. Beispielsweise stimulierte Kaden humane Myofibroblasten aus der Aortenklappe mit IL-1 beta. Das führte zu einer erhöhten Expression von MMP-1 und MMP-2, während MMP-9 davon unberührt blieb.¹¹⁷ In Sehnenzellen kam es zu einer Steigerung von MMP-1 und MMP-3 (Protein) nach IL-1 beta Stimulation.¹¹⁸

Abschließend ist noch als interessant zu erwähnen, dass Ito 1996 berichtete, IL-1 beta, aber nicht IL-1 alpha, könnte durch MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9 inaktiviert, bzw. abgebaut werden. Dieser Abbau konnte durch TIMP-1 effektiv geblockt werden. Seine Ergebnisse

legen den Schluss nahe, dass IL-1 beta sogenannte „Connective Cells“ zur MMP-Produktion anregen kann, aber selber durch die aktivierten MMPs negativ kontrolliert wird.¹¹⁹ Dieser Effekt könnte die bei uns gesehene eher verhaltene Aktivierung von pro-MMP-2 erklären, da eine vermehrte Aktivierung des pro-MMP-2 mit einem vermehrten Abbau der von IL-1 beta einhergeht, welches seinerseits dann nicht mehr für die Stimulation der pro-MMP-2-Aktivierung zur Verfügung steht.

4.3.4 Einfluss von Cycloheximid auf das MMP-2 System

Für den Effekt von Cycloheximid auf das MMP-System existieren nur wenige Arbeiten. In einer Untersuchung von Migita inhibiert Cycloheximid die Serum-Amyloid-induzierte MMP-2/-3 Freisetzung bei synovialen Fibroblasten. Dabei wurden Cycloheximidkonzentrationen von 1µg/ml, 10µg/ml und 50µg/ml benutzt und schon mit der niedrigsten Konzentration von Cycloheximid (1µg/ml) die MMP-2/-3 Sekretion komplett gehemmt.¹²⁰ In unseren Versuchen konnte die MMP-2 Sekretion nicht komplett gehemmt werden, obwohl wir mit einer Cycloheximidkonzentration von 1µg/ml und 20µg/ml uns ungefähr in den gleichen Hemmkonzentrationen bewegten wie Migita. Dieser Umstand könnte bedeuten, dass zwar die De-novo-Synthese des MMP-2 in HUVECs durch Cycloheximid gehemmt wird, aber schon in Transportvesikeln vorhandenes MMP-2 durchaus noch sezerniert werden kann. Dies würde für die Fibroblasten von Migita bedeuten, dass sie nur durch die vorherige Stimulation mit Serum-Amyloid anfangen, MMP-2 zu produzieren und nicht wie die HUVECs immer eine Produktion von MMP-2 stattfindet.

Die unterschiedliche Inkubationszeit von 48 Stunden bei Migita und 24 Stunden bei unseren Versuchen dürfte keine Rolle spielen, da im Falle einer Sekretion MMP-2 im Überstand kumulieren müsste und somit auch nach 48 Stunden nachweisbar wäre.

4.3.5 Einfluss von Colchicin auf das MMP-2 System

Die Proteinsynthesehemmung mittels Cycloheximid konnte also die MMP-2 Freisetzung nicht völlig verhindern. Wir versuchten deshalb in den folgenden Experimenten, den angenommenen Vesikeltransport von MMP-2 mit Hilfe des Spindelgiftes Colchicin zu behindern, bzw. zu hemmen. Hier zeigte sich eine Verminderung aller drei MMP-2 Fraktionen, sodass man von einer verminderten pro-MMP-2-Sekretion mit nachfolgender Verminderung von intermediären und aktiven MMP-2 ausgehen kann. Dabei war die Hemmung nicht so effektiv wie bei Cycloheximid. Als Erklärung bietet sich eine zu niedrige Konzentration von Colchicin an (10^{-3} M), die zwar den Transport behindert aber nicht komplett verhindert. In Fibroblasten führte Colchicin (10^{-8} M bis 10^{-6} M) zu einer Suppression der TGF-beta-induzierten Erhöhung der Typ I-Collagen mRNA (und zu einer minimalen Erhöhung der MMP-1 mRNA). Allerdings wird in der Veröffentlichung keine Aussage zu der Anzahl der

Experimente, der Standardabweichung oder der Signifikanz getroffen.¹²¹ Bei Osteosarkomzellen führte Colchicin zu einer vermehrten Expression von MT-MMP-1 und TIMP-2 mRNA und es führt zu einer vermehrten Produktion von MMP-2, ohne dass es zu einem gesteigerten Gehalt von TIMP-1- oder MMP-2-mRNA/Protein kam.¹²² In einer Arbeit von Loennechen wurden die Zellen 48 Stunden mit Colchicin in einer Konzentration von 0,1µM, 0,5µM, 1µM (=10⁻⁶M) und 2µM inkubiert. Dabei kam es zu einer Erhöhung des aktiven MMP-2 und zu einer Erniedrigung des pro-MMP-2. Das legt die Vermutung nahe, dass Colchicin, welches das tubuläre Cytoskelett auflösen kann, auch – zellspezifisch – eine veränderte Regulation von mehreren Proteinen auslöst, die wiederum zu einer gesteigerten Aktivierung von pro-MMP-2 führen. In unseren Versuchen zeigte sich keine gesteigerte Aktivierung des MMP-2. Im Gegenteil: Es waren niedrigere Mengen aller drei MMP-2 Fraktionen im Medium zu erkennen. Als Erklärung kann neben der Zellspezifität auch eine unterschiedlich hohe Inkubationskonzentration angenommen werden, die bei unseren Versuchen mit 10⁻³M weit über den von Loennechen benutzten Konzentrationen lag.

4.4 Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf die Matrixmetalloproteinasen

4.4.1 Angiotensin, Aldosteron, Atherosklerose und MMP-2

Angiotensin II, bekannt durch seine starken vasokonstriktorisches Eigenschaften, spielt auch bei der lokalen Entstehung und Progression einer Atherosklerose eine wichtige Rolle. Wie schon in der Einleitung beschrieben, kann es in die Pathologie der Atherosklerose an zahlreichen Stellen modulierend eingreifen. Abbildung 4 gab einen schnellen Überblick über die verschiedenen Angriffspunkte von Angiotensin II und Aldosteron in der Atheroskleroseentwicklung.

Der Einfluss von MMPs auf eine atherosklerotische Läsion wurde in mehrere Arbeiten bereits untersucht (siehe Einleitung). Beispielsweise fand man eine erhöhte Aktivität von MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-2, MMP-9, MMP-3 und MMP-10 in atherosklerotischen Plaques. Der Abbau von Extrazellulärschubstanz und der Basalmembran könnte die Migration von glatten Muskelzellen in die Intima erleichtern, die dort proliferieren und die Atheroskleroseentwicklung vorantreiben.¹⁸ Außerdem wird die Festigkeit des Plaques durch den Abbau der ECM herabgesetzt.^{82,123,124} MMP-2 ist in koronaren Plaques massiv erhöht und ist maßgeblich an dem Abbau der Basalmembran und der ECM beteiligt.⁸² Dazu vervielfacht MMP-2 die vWF-induzierte GPIIb Expression und Thrombozyten Adhäsion und besitzt so einen proaggregatorischen Effekt.¹²⁵ Diese Beispiele machen deutlich, dass eine

Erhöhung der MMP-Aktivität durch einen Stimulus aus dem RAA-System pathogenetisch für die Atheroskleroseentwicklung und Unterhaltung relevant sein dürfte. Im Ergebnisteil konnte gezeigt werden, dass zumindest Aldosteron die MMP-2 Sekretion durch HUVECs erhöhen kann und dass dieser Umstand eventuell für die Atheroskleroseentstehung und Unterhaltung eine wichtige Rolle spielt. Ein stimulatorischer Effekt von Angiotensin II auf die pro-MMP-2 Sekretion konnte nicht überzeugend gezeigt werden, war aber in allen Experimenten tendenziell zu beobachten. Eventuell könnten mit einer höheren Anzahl an Experimenten überzeugendere Ergebnisse gezeigt werden.

4.4.2 Stimulation der endothelialen MMP-2 Sekretion durch Angiotensin und Aldosteron

Im Ergebnisteil wurde schon auf die unterschiedlichen Ergebnisse im ELISA und der Zymografie/des Westernblots hingewiesen. Es stellt sich nun die Frage, warum der Westernblot und die Zymografie eine signifikante Erhöhung der MMP-2 Sekretion durch Aldosteron zeigen, während der ELISA dies nur tendenziell bestätigen kann. Darüber hinaus ist zu klären, warum die Ergebnisse in den mit Angiotensin II stimulierten Proben zwar konstant auf eine Stimulierbarkeit der MMP-2 Sekretion durch Angiotensin II hinweisen, aber trotzdem keine Signifikanz erreichen.

Für ersteres könnte die unterschiedliche Substratspezifität der genannten Nachweismethoden einen Erklärungsansatz liefern.

In der Zymografie werden alle drei MMP-2 Fraktionen nach ihrer Größe und Ladung im Separationsgel aufgetrennt. Nach dem Gellauf werden alle drei Fraktionen aktiviert und bauen Gelatine ab. In der folgenden Coomassie-Färbung werden sie als Aussparungen sichtbar.

Im Westernblot werden die MMP-2 Fraktionen auch nach Größe und Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt. Der von uns benutzte MMP-2 Antikörper erkennt nur das inaktive MMP-2 (72kDa) und das aktive MMP-2 (66kDa). Er zeigt keine Kreuzreaktion mit MMP-1, -3, -9 oder MMP-13.

Der ELISA erkennt nur freies pro-MMP-2 und das MMP-2, welches an TIMP-2 gebunden ist. Er erkennt nicht das aktive MMP-2 und zeigt keine Kreuzreaktivität mit MMP-1, -3, -7, -8, -9 und MT-MMP-1.

Durch die oben genannten Tatsachen wird klar, dass die Zymografie und der Westernblot ähnliche Ergebnisse liefern müssten, weil sie überwiegend das Gleiche messen - das pro-MMP-2 und das aktive MMP-2. Der ELISA misst aber nur das pro-MMP-2 und nicht das aktive oder intermediäre MMP-2. Außerdem hat er noch einen weiteren Nachteil, der die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte: Es wird, ohne Differenzierung, auch das an

TIMP-2 gebundene MMP-2 mit gemessen, welches durch die anderen Nachweismethoden nicht detektiert wird. Durch diese zusätzlichen Einflüsse könnten die unterschiedlichen Ergebnisse in den drei Nachweismethoden erklärt werden. Damit ist auch klar, dass dieser MMP-2 ELISA, ohne zusätzliche Messung des an TIMP-2 gebundenen MMP-2, keine mit den Zymografie- und Westernblotergebnissen vergleichbaren Ergebnisse liefern kann.

Die beiden letztgenannten Methoden, die Zymographie und der Westernblot, zeigten beide einen deutlichen MMP-2 Konzentrationsunterschied zwischen der Kontrolle und der mit Angiotensin II und Aldosteron stimulierten Probe. Dabei war der Unterschied bei Aldosteron größer als der bei Angiotensin II. Nach der statistischen Auswertung der Ergebnisse ergab sich für den Vergleich Aldosteron mit der Kontrolle ein $p=0,043$ und für den Vergleich von Angiotensin II mit der Kontrolle ein $p=0,08$, sodass wir im Falle von Angiotensin II nur von einer tendenziellen Erhöhung der MMP-2 Sekretion sprechen. Für diesen Umstand könnte einerseits eine vergleichsweise geringe Stimulierbarkeit der endothelialen MMP-Sekretion verantwortlich sein. Andererseits könnte auch die interexperimentelle Variabilität der Versuchsergebnisse eine Rolle spielen.

Zusammenfassend gehen wir aber trotzdem von einem stimulatorischen Effekt der beiden Komponenten des RAA-Systems aus. Unterstützung in der Frage, ob Angiotensin und Aldosteron einen stimulierenden Einfluss auf das MMP-2 System in HUVECs haben, erhalten wir von Arenas¹⁰¹: HUVECs wurden für 24 Stunden mit Angiotensin in einer Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-5} M stimuliert. Nachfolgend wurde ein signifikanter ($p<0,05$) Anstieg der pro-MMP-2 Menge im Überstand nachgewiesen. Diese Arbeit unterstützt also unsere Hypothese, dass Angiotensin zu einer erhöhten MMP-2 Sekretion in HUVECs führt.

Auch bei einem anderen Zelltyp (Schweinekardiomyozyten) wurde nach Stimulation mit Angiotensin II (10^{-6} M) eine erhöhte MMP-2 Expression und Aktivität gefunden.¹²⁶

4.4.3 Einfluss von Angiotensin und Aldosteron auf das MMP-2 System

Wie schon etwas weiter oben erwähnt, ist MMP-2 in koronaren Plaques erhöht und maßgeblich an dem Abbau der Basalmembran und der ECM beteiligt.⁸² Damit erleichtert es die Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen [VSMC] in der atherosklerotischen Läsion.^{127,128} Saito konnte in seiner Arbeit zeigen, dass ein MMP-2/-9 Inhibitor die Angiotensin II vermittelte Migration der VSMCs blockieren kann.¹²⁹ Das könnte bedeuten, dass die Migration durch eine erhöhte Aktivität von MMP-2/-9 hervorgerufen wird und dass Angiotensin II diese Migration über eine Aktivitätssteigerung von MMP-2/-9 vermittelt. In einer Arbeit von Cipollone stabilisiert eine Angiotensin-Typ I Rezeptor-Blockade den atherosklerotischen Plaque durch eine Inhibierung der von Prostaglandin E2 abhängigen MMP-2/-9 Aktivität. Der Mechanismus ist unklar. Eine weitere Erkenntnis dieser Studie war,

dass der Angiotensin-Typ I-Rezeptor-Antagonist (Irbesartan) die Entzündungsreaktion im Plaque und die Produktion von Prostaglandin E2 vermindert und so durch eine MMP-Inhibierung zur Plaquestabilisierung beitragen könnte.¹³⁰ Bei Perizyten führte Angiotensin (10^{-7} M) zu einem Anstieg der pro-MMP-2-Konzentration im Zelllysate.¹³¹ Endothelzellen könnten genauso auf eine Angiotensinstimulation reagieren. Vielleicht hätte die Untersuchung des Zelllysates der HUVECs in unseren Versuchsreihen ein deutlicher nachweisbares Ergebnis gezeigt. Dies erscheint plausibel, da 24 Stunden für die HUVECs eine relativ geringe Zeit ist, um neues pro-MMP-2 zu bilden. Die Tatsache, dass eine Stimulation der pro-MMP-2 Sekretion größtenteils von einer de-novo-Synthese abhängig ist, haben wir bereits im Ergebnisteil gezeigt (siehe Kap.3.3.2.1).

Weitere Hinweise auf eine Interaktion von Aldosteron/Angiotensin II und dem MMP-System geben beispielsweise folgende Studien:

- Die ACE-Hemmer Captopril und Ramiprilat inhibierten in einer klinischen Studie die MMP-2 und -9 Aktivität bei Patienten mit Herzinsuffizienz.¹³² Das könnte die Vermutung nahelegen, dass MMP-2/-9 in Endothelzellen gebildet werden und dass sie hier durch Angiotensin oder Aldosteron reguliert werden.
- In einer Versuchsreihe mit Osteopontin-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass bei diesen die Angiotensin II vermittelte Atheroskleroseentwicklung und Aneurysmaentstehung abgeschwächt ist. Interessanterweise ging diese Abschwächung mit einer verminderten Aktivität von MMP-2/-9 einher. Daraus schloss man, dass das Osteopontin aus den Leukozyten eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung von Angiotensin II-vermittelter Atherosklerose und Aneurysmaentstehung besitzt.¹³³ Aber auch die verminderte MMP-2/-9 Aktivität spielt dabei eine Rolle und könnte durch eine ineffektive Stimulation des leukozytären Osteopontin durch Angiotensin II mit nachfolgender Verminderung der MMPs zurückzuführen sein. Nach diesem Ansatz könnte Angiotensin über eine leukozytäre Osteopontinsekretion die Aktivität der MMPs, vielleicht auch in Interaktion mit den Endothelzellen, regulieren.
- Bei hypertensiven Patienten mit Glomerulonephritis senkte Fosinopril (ein ACE-Hemmer) signifikant die MMP-Serumaktivität, während Irbesartan (ein AT-1-Blocker) keinen Effekt hatte. Ausserdem wurde die Aktivität von MMP-2/-9 von Fosinopril und nicht von Irbesartan inhibiert.¹³⁴ Das könnte bedeuten, dass ACE-Hemmer und AT-1-Antagonisten unterschiedlich die MMP-Aktivität regulieren und im Umkehrschluss, dass Angiotensin II einen stimulatorischen Effekt auf MMP-2/-9 haben könnte. Wieder

liegt es nahe, den Einflussort bei den Endothelzellen zu vermuten, zumal die Serumaktivität von MMP-2/-9 gemessen wurde.

- Bei Primaten löst das Altern eine Steigerung der aortalen MMP-2 Aktivität und gleichzeitig der Angiotensin II Menge aus. Somit teilen sich der alters vermittelte arterielle Umbau und die Entstehung einer Atherosklerose die gleichen pathologischen Mechanismen: MMP-2 Aktivierung und erhöhte Anwesenheit von Angiotensin II.¹³⁵ Eine direkte oder indirekte Aktivierung der MMP-2 Sekretion durch Angiotensin II wäre damit wieder denkbar. Nur ist unklar, wo das vermehrte MMP-2 produziert wird. Naheliegender wäre, den Ort der Produktion in Endothelzellen zu vermuten.
- In einer Arbeit von Papakonstantinou, in der eine Angiotensin II -Stimulation ($10^{-6}M$) bei glatten Gefäßmuskelzellen die MMP-2 Sekretion nicht steigerte, sondern verringerte, konnte er darüber hinaus den Angiotensin II Effekt durch die Gabe von Losartan (ein AT-1-Blocker) antagonisieren. Losartan alleine führte zu einer Steigerung der MMP-2 Freisetzung in den glatten Gefäßmuskelzellen.¹³⁶ Diese Verringerung der MMP-2 Sekretion ist wohl als zellspezifisch zu sehen, beweist aber die Regulation der MMP-2 Sekretion durch Angiotensin.
- Bei kardialen Myozyten ergibt sich im Gegensatz zu den oben beschriebenen Effekten der vaskulären Myozyten ein ganz anderes Bild der Interaktion von RAAS und MMPs. Hier wurden Veränderungen in der myokardialen MMP-Aktivität mit dem LV-Remodeling in Verbindung gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass kardiale Myozyten MMPs synthetisieren und sezernieren. Coker erreichte mit einer Angiotensin II Stimulation seiner Myozyten eine um 40% gesteigerte MMP-2 Aktivität im Überstand.¹²⁶

Zusammenfassend kann man festhalten, dass der Einfluss von Angiotensin auf das MMP-System zellabhängig ist und deswegen die oben genannten Ergebnisse schwer vergleichbar sind. In Bezug auf Aldosteron und MMP-2 sind keine relevanten Daten veröffentlicht, sodass die in dieser Arbeit gezeigte Stimulierbarkeit der endothelialen MMP-2 durch Aldosteron eine Erkenntnis ist, deren genaue Rolle in den pathophysiologischen Zusammenhängen der Atheroskleroseentwicklung noch näher untersucht werden müsste. Aldosteron könnte nach unseren Ergebnissen, außer der in der Einleitung beschriebenen pro-oxidativen Wirkung in der Atheroskleroseentwicklung, auch eine pathogenetische Bedeutung im „atherosklerotischen“ MMP-System, z.B. als direkter Stimulator der MMP-2 Aktivität, einnehmen.

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Endothelzellkultur aus humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) etabliert und der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren untersucht. Dadurch konnten die optimalen Bedingungen für das Wachstum der HUVECs gefunden werden.

In den weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass HUVECs verschiedene Matrixmetalloproteinasen produzieren und diese auch sezernieren. In den untersuchten Endothelzellen konnte die Produktion der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 nachgewiesen werden. In der Zymografie zeigte sich hierbei die typische Aufspaltung der MMP-2 Fraktion in die Vorstufe pro-MMP-2, das intermediäre und das aktive MMP-2.

Bei der Regulierung von MMP-2 wurde bei Bradykinin ein stimulatorischer Effekt auf die MMP-2 Synthese festgestellt, der schon vorher beschrieben war und somit einen korrekten Versuchsaufbau bestätigte. Das gleiche gilt sowohl für den stimulatorischen Effekt von PMA auf die intermediäre und aktive Fraktion von MMP-2, als auch für den stimulatorischen Effekt von IL-1 β auf alle drei MMP-2 Fraktionen.

Außerdem wurde durch Inkubation mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid gezeigt, dass die Freisetzung von pro-MMP-2 überwiegend durch eine de-novo-Synthese erfolgt und nur relativ geringe Mengen an synthetisierten pro-MMP-2 in Vesikeln zur Sezernierung bereitstehen. Der Vesikeltransport konnte mit Colchicin inhibiert werden.

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss verschiedener Hormone des Renin-Angiotensin-Aldosteron System auf die Freisetzung von MMPs untersucht. Aldosteron zeigte in den Versuchen einen signifikanten stimulatorischen Effekt auf die pro-MMP-2 Menge im Überstand der HUVECs. Nach Inkubation mit Angiotensin II konnte die pro-MMP-2 Menge im Überstand der HUVECs nicht gesteigert werden. Tendenziell zeigte sich jedoch eine grenzwertige Erhöhung der Angiotensin-II induzierten MMP-2 Bildung. Zusammenfassend ist von einer Beeinflussung der endothelialen MMP-Bildung durch Komponenten des RAAS auszugehen. Die geringe Stimulierbarkeit der endothelialen MMP und die hohe interexperimentelle Variabilität der MMP-Bildung lassen jedoch keine abschließende Bewertung zu.

5 Zusammenfassung

Matrixmetalloproteinasen beeinflussen die Entstehung, die Progression und die Komplikationen der Atherosklerose. Sie spielen eine wichtige Rolle beim Abbau der vaskulären Basalmembran und der Extrazellulärmatrix. Vermutlich sind sie über diese Mechanismen und über die Beeinflussung der Endothelzellbarriere wesentlich an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt.

Im ersten Teil der Arbeit beschäftigten wir uns mit der Frage, ob MMPs durch Endothelzellen gebildet werden können. Bei unseren Versuchen konnten wir die Präsenz von MMP-2 und MMP-9 im Überstand von humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs) nachweisen. Somit sind menschliche Endothelzellen direkt an der lokalen Produktion von MMPs beteiligt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, wie MMP-2 in den Nabelschnurendothelien gebildet und reguliert wird. MMP-2 wird in Endothelzellen zeitabhängig sezerniert. Bradykinin führt dosisabhängig zu einer gesteigerten pro-MMP-2 Sekretion. Bei der Stimulation mit PMA und Interleukin 1-beta wird demgegenüber vermehrt intermediäres und aktives MMP-2 im Überstand detektiert. Nach der Vorbehandlung der Zellen mit dem Proteinsynthesehemmer Cycloheximid war nach 24 Stunden nahezu kein pro-MMP-2 mehr im Überstand der Endothelzellkulturen nachweisbar. Das Tubulusgift Colchicin führte zu einer signifikanten Verringerung der freigesetzten pro-MMP-2 Menge. Es ließ sich jedoch noch eine geringe Menge an intermediären und aktiven MMP-2 nachweisen.

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob die Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems, welche als wichtige Faktoren in der Pathogenese der Atherosklerose diskutiert werden, die endotheliale Synthese und Freisetzung von MMP-2 regulieren.

Dabei zeigte sich, dass Aldosteron einen signifikanten stimulatorischen Effekt auf die pro-MMP-2 Menge im Überstand der HUVECs besitzt. Im Gegensatz dazu ließ sich bei der Stimulation der Endothelzellen mit Angiotensin II nur eine tendenziell vorhandene Erhöhung der Angiotensin II induzierten MMP-2 Bildung nachweisen.

Zusammenfassend ist von einer Beeinflussung der endothelialen MMP-Bildung durch Komponenten des RAAS auszugehen. Die geringe Stimulierbarkeit der endothelialen MMP und die hohe interexperimentelle Variabilität der MMP-Bildung lassen jedoch keine abschließende Bewertung zu.

Das humane Endothelzellmodell scheint also zur näheren Charakterisierung der Mechanismen der Renin-Angiotensin-Aldosteron modulierten MMP Freisetzung nicht

geeignet zu sein. Vermutlich wird es notwendig sein, über molekularbiologische Ansätze an zellulären Modellen die Interaktionen oben genannter Faktoren weiter zu charakterisieren, um weitere innovative Therapieansätze in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen zu ermöglichen.

Abkürzungen

ACE = Angiotensin Converting Enzyme

ALS = Amyotrophe Lateralsklerose

AT-1 = Angiotensin 1

bFGF = basic Fibroblast Growth Factor

ECM = Extrazellulärsbstanz

EGF = Epidermal Growth Factor

ECGF = Endothelial Cell Growth Factor

ECGS = Endothelial Cell Growth Supplement

FKS = fetales Kälberserum

HUVEC = Human umbilical vein endothelial cells

IL = Interleukin

KHK = Koronare Herzkrankheit

LDL = Low Density Lipoproteine

MMP = Matrixmetalloproteinasen

MT-MMP = membranständige Matrixmetalloproteinasen

PDGF = Platelet Derived Growth Factor

PKC = Protein Kinase C

PMA = Phorbol 12-myristate 13-acetate

RAAS = Renin Angiotensin Aldosteron System

TIMP = Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinasen

TGF- β 1 = Transforming Growth Factor

TNF = Tumor Necrosis Factor

VCAM = Vascular Cell Adhesion Molecule

VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

VSMC = Vascular Smooth Muscle Cells

Literaturverzeichnis

1. Falk E. Stable versus unstable atherosclerosis: clinical aspects. *Am Heart J.* 1999;138:S421-5.
2. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res.* 2001;89:201-10.
3. Jeffrey JJ. Collagen and collagenase: pregnancy and parturition. *Semin Perinatol.* 1991;15:118-26.
4. Hieta N, Impola U, Lopez-Otin C, Saarialho-Kere U, Kahari VM. Matrix metalloproteinase-19 expression in dermal wounds and by fibroblasts in culture. *J Invest Dermatol.* 2003;121:997-1004.
5. Yager DR, Zhang LY, Liang HX, Diegelmann RF, Cohen IK. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol.* 1996;107:743-8.
6. Vaes G, Delaisse JM, Eeckhout Y. Relative roles of collagenase and lysosomal cysteine-proteinases in bone resorption. *Matrix Suppl.* 1992;1:383-8.
7. Everts V, Delaisse JM, Korper W, Niehof A, Vaes G, Beertsen W. Degradation of collagen in the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine-proteinases and matrix metalloproteinases. *J Cell Physiol.* 1992;150:221-31.
8. Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE, Jr. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Faseb J.* 1993;7:1434-41.
9. Harris ED, Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med.* 1990;322:1277-89.
10. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol.* 1993;64:474-84.
11. Nasatzky E, Rubinstein Y, Goultschin J, Schwartz Z. The role of Matrix Metalloproteinases in the progression of periodontitis, and the use of specific inhibitors to these enzymes in the treatment of the periodontal disease. *Refuat Hapeh Vehashinayim.* 2003;20:38-45, 81.
12. Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY, Hsieh YS. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal

- pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodontal Res.* 2002;37:196-203.
13. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* 1991;64:327-36.
 14. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:960-70.
 15. Rotmans JI, Velema E, Verhagen HJ, Blankensteijn JD, De Kleijn DP, Stroes ES, Pasterkamp G. Matrix metalloproteinase inhibition reduces intimal hyperplasia in a porcine arteriovenous-graft model. *J Vasc Surg.* 2004;39:432-9.
 16. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb.* 2003;10:275-82.
 17. Saito S, Zempo N, Yamashita A, Takenaka H, Fujioka K, Esato K. Matrix metalloproteinase expressions in arteriosclerotic aneurysmal disease. *Vasc Endovascular Surg.* 2002;36:1-7.
 18. Zempo N, Kenagy RD, Au YP, Bendeck M, Clowes MM, Reidy MA, Clowes AW. Matrix metalloproteinases of vascular wall cells are increased in balloon-injured rat carotid artery. *J Vasc Surg.* 1994;20:209-17.
 19. Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ, Tokes ZA. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J Neurosci.* 1996;16:7910-9.
 20. Lim GP, Backstrom JR, Cullen MJ, Miller CA, Atkinson RD, Tokes ZA. Matrix metalloproteinases in the neocortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neurochem.* 1996;67:251-9.
 21. Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 2002;90:251-62.
 22. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 2002;90:520-30.
 23. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 2000;19:623-9.
 24. Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;878:388-403.

25. Benjamin IJ. Matrix metalloproteinases: from biology to therapeutic strategies in cardiovascular disease. *J Investig Med*. 2001;49:381-97.
26. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274:21491-4.
27. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:5578-82.
28. Gururajan R, Grenet J, Lahti JM, Kidd VJ. Isolation and characterization of two novel metalloproteinase genes linked to the Cdc2L locus on human chromosome 1p36.3. *Genomics*. 1998;52:101-6.
29. Steffensen B, Wallon UM, Overall CM. Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J Biol Chem*. 1995;270:11555-66.
30. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J*. 1995;309:299-306.
31. Patterson ML, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett*. 2001;503:158-62.
32. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Libby P. Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;748:501-7.
33. Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res*. 2000;86:1259-65.
34. Feinberg MW, Jain MK, Werner F, Sibinga NE, Wiesel P, Wang H, Topper JN, Perrella MA, Lee ME. Transforming growth factor-beta 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. *J Biol Chem*. 2000;275:25766-73.
35. Uzui H, Harpf A, Liu M, Doherty TM, Shukla A, Chai NN, Tripathi PV, Jovinge S, Wilkin DJ, Asotra K, Shah PK, Rajavashisth TB. Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation*. 2002;106:3024-30.

36. Duhamel-Clerin E, Orvain C, Lanza F, Cazenave JP, Klein-Soyer C. Thrombin receptor-mediated increase of two matrix metalloproteinases, MMP-1 and MMP-3, in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1931-8.
37. Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, Bitterman H, Miller A. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res.* 2002;90:784-91.
38. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res.* 2003;59:812-23.
39. Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry.* 1990;29:10261-70.
40. Nagase H, Enghild JJ, Suzuki K, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry.* 1990;29:5783-9.
41. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92:827-39.
42. Lijnen HR. Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost.* 2001;86:324-33.
43. Lijnen HR. Matrix metalloproteinases and cellular fibrinolytic activity. *Biochemistry (Mosc).* 2002;67:92-8.
44. Morrison CJ, Butler GS, Bigg HF, Roberts CR, Soloway PD, Overall CM. Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *J Biol Chem.* 2001;276:47402-10. Epub 2001 Oct 2.
45. Zucker S, Conner C, DiMassmo BI, Ende H, Drews M, Seiki M, Bahou WF. Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. Physiologic regulation of angiogenesis. *J Biol Chem.* 1995;270:23730-8.
46. Galis ZS, Kranzhofer R, Fenton JW, 2nd, Libby P. Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:483-9.
47. Rauch BH, Bretschneider E, Braun M, Schror K. Factor Xa releases matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) from human vascular smooth muscle cells and stimulates the conversion of pro-MMP-2 to MMP-2: role of MMP-2 in factor Xa-induced DNA synthesis and matrix invasion. *Circ Res.* 2002;90:1122-7.

48. Fabunmi RP, Sukhova GK, Sugiyama S, Libby P. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in human atheroma and regulation in lesion-associated cells: a potential protective mechanism in plaque stability. *Circ Res.* 1998;83:270-8.
49. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J.* 1999;138:S419-20.
50. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 1991;251:788-91.
51. Martinez-Gonzalez J, Llorente-Cortes V, Badimon L. Cellular and molecular biology of atherosclerotic lesions. *Rev Esp Cardiol.* 2001;54:218-31.
52. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:223-61.
53. Pritchard KA, Jr., Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P, Wolin MS, Stemerman MB. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res.* 1995;77:510-8.
54. Vidal F, Colome C, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem.* 1998;252:378-84.
55. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801-9.
56. Moyna NM, Thompson PD. The effect of physical activity on endothelial function in man. *Acta Physiol Scand.* 2004;180:113-23.
57. Jarasuniene D, Simaitis A. Oxidative stress and endothelial dysfunction. *Medicina (Kaunas).* 2003;39:1151-7.
58. Poredos P. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2002;32:274-7.
59. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-4.
60. Holtz J, Goetz RM. Vascular renin-angiotensin-system, endothelial function and atherosclerosis? *Basic Res Cardiol.* 1994;89 Suppl 1:71-86.
61. Yanagitani Y, Rakugi H, Okamura A, Moriguchi K, Takiuchi S, Ohishi M, Suzuki K, Higaki J, Ogihara T. Angiotensin II type 1 receptor-mediated peroxide production in human macrophages. *Hypertension.* 1999;33:335-9.

62. Potter DD, Sobey CG, Tompkins PK, Rossen JD, Heistad DD. Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain angiotensin II. *Circulation*. 1998;98:800-7.
63. Kim JA, Berliner JA, Nadler JL. Angiotensin II increases monocyte binding to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;226:862-8.
64. Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1998;83:952-9.
65. Grafe M, Auch-Schwelk W, Zakrzewicz A, Regitz-Zagrosek V, Bartsch P, Graf K, Loebe M, Gaehtgens P, Fleck E. Angiotensin II-induced leukocyte adhesion on human coronary endothelial cells is mediated by E-selectin. *Circ Res*. 1997;81:804-11.
66. Keidar S, Kaplan M, Aviram M. Angiotensin II-modified LDL is taken up by macrophages via the scavenger receptor, leading to cellular cholesterol accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:97-105.
67. Keidar S, Kaplan M, Hoffman A, Aviram M. Angiotensin II stimulates macrophage-mediated oxidation of low density lipoproteins. *Atherosclerosis*. 1995;115:201-15.
68. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res*. 1988;62:749-56.
69. Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1989;13:305-14.
70. Weber H, Taylor DS, Molloy CJ. Angiotensin II induces delayed mitogenesis and cellular proliferation in rat aortic smooth muscle cells. Correlation with the expression of specific endogenous growth factors and reversal by suramin. *J Clin Invest*. 1994;93:788-98.
71. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74:1141-8.
72. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest*. 1992;90:456-61.
73. Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989;83:1419-24.

74. Williams B, Baker AQ, Gallacher B, Lodwick D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1995;25:913-7.
75. Delafontaine P, Lou H. Angiotensin II regulates insulin-like growth factor I gene expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1993;268:16866-70.
76. Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ. Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation*. 1996;94:2756-67.
77. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation*. 1991;83:1849-65.
78. Wilke A, Funck R, Rupp H, Brilla CG. Effect of the renin-angiotensin-aldosterone system on the cardiac interstitium in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 1996;91 Suppl 2:79-84.
79. Rajagopalan S, Duquaine D, King S, Pitt B, Patel P. Mineralocorticoid receptor antagonism in experimental atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:2212-6.
80. Oestreicher EM, Martinez-Vasquez D, Stone JR, Jonasson L, Roubanthisuk W, Mukasa K, Adler GK. Aldosterone and not plasminogen activator inhibitor-1 is a critical mediator of early angiotensin II/NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced myocardial injury. *Circulation*. 2003;108:2517-23.
81. Keidar S, Hayek T, Kaplan M, Pavlotzky E, Hamoud S, Coleman R, Aviram M. Effect of eplerenone, a selective aldosterone blocker, on blood pressure, serum and macrophage oxidative stress, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003;41:955-63.
82. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1994;94:2493-503.
83. Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, Galardy RE, Reidy MA. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res*. 1994;75:539-45.
84. Southgate KM, Fisher M, Banning AP, Thurston VJ, Baker AH, Fabunmi RP, Groves PH, Davies M, Newby AC. Upregulation of basement membrane-degrading metalloproteinase secretion after balloon injury of pig carotid arteries. *Circ Res*. 1996;79:1177-87.

85. Forough R, Koyama N, Hasenstab D, Lea H, Clowes M, Nikkari ST, Clowes AW. Overexpression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 inhibits vascular smooth muscle cell functions in vitro and in vivo. *Circ Res*. 1996;79:812-20.
86. Amorino GP, Hoover RL. Interactions of monocytic cells with human endothelial cells stimulate monocytic metalloproteinase production. *Am J Pathol*. 1998;152:199-207.
87. Romanic AM, Madri JA. The induction of 72-kD gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent. *J Cell Biol*. 1994;125:1165-78.
88. Rosenberg GA, Kornfeld M, Estrada E, Kelley RO, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. *Brain Res*. 1992;576:203-7.
89. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. 1998;29:2189-95.
90. Xu XP, Meisel SR, Ong JM, Kaul S, Cercek B, Rajavashisth TB, Sharifi B, Shah PK. Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation*. 1999;99:993-8.
91. Wesley RB, 2nd, Meng X, Godin D, Galis ZS. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:432-40.
92. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*. 1997;96:396-9.
93. Butthep P, Khuhapinant A, Bunyaratvej A, Fucharoen S, Kitaguchi H, Funahara Y. Thalassemic serum inhibits endothelial cell mitosis in vitro. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1997;28 Suppl 3:155-60.
94. Yokomuro H, Mickle DA, Weisel RD, Li RK. Optimal conditions for heart cell cryopreservation for transplantation. *Mol Cell Biochem*. 2003;242:109-14.
95. Du SY. The use of low-molecular-weight components from adult cattle serum in culture of hybridoma cells in vitro. *Chin J Biotechnol*. 1990;6:287-92.
96. Gorman L, Mercer LP, Hennig B. Growth requirements of endothelial cells in culture: variations in serum and amino acid concentrations. *Nutrition*. 1996;12:266-70.

97. Ek A, Strom K, Cotgreave IA. The uptake of ascorbic acid into human umbilical vein endothelial cells and its effect on oxidant insult. *Biochem Pharmacol.* 1995;50:1339-46.
98. Terramani TT, Eton D, Bui PA, Wang Y, Weaver FA, Yu H. Human macrovascular endothelial cells: optimization of culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2000;36:125-32.
99. Caudroy S, Polette M, Nawrocki-Raby B, Cao J, Toole BP, Zucker S, Birembaut P. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis.* 2002;19:697-702.
100. Axelrad TW, Deo DD, Ottino P, Van Kirk J, Bazan NG, Bazan HE, Hunt JD. Platelet-activating factor (PAF) induces activation of matrix metalloproteinase 2 activity and vascular endothelial cell invasion and migration. *Faseb J.* 2004;18:568-70. Epub 2004 Jan 8.
101. Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286:C779-84. Epub 2003 Nov 26.
102. Wang BW, Chang H, Lin S, Kuan P, Shyu KG. Induction of matrix metalloproteinases-14 and -2 by cyclical mechanical stretch is mediated by tumor necrosis factor-alpha in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2003;59:460-9.
103. Nikkari ST, O'Brien KD, Ferguson M, Hatsukami T, Welgus HG, Alpers CE, Clowes AW. Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation.* 1995;92:1393-8.
104. Huang Y, Mironova M, Lopes-Virella MF. Oxidized LDL stimulates matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2640-7.
105. Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, Tripathi S, Laufs U, Tripathi J, Chai NN, Xu XP, Jovinge S, Shah PK, Libby P. Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem.* 1999;274:11924-9.
106. Das A, Fanslow W, Cerretti D, Warren E, Talarico N, McGuire P. Angiopoietin/Tek interactions regulate mmp-9 expression and retinal neovascularization. *Lab Invest.* 2003;83:1637-45.

107. Ehringer WD, Wang OL, Haq A, Miller FN. Bradykinin and alpha-thrombin increase human umbilical vein endothelial macromolecular permeability by different mechanisms. *Inflammation*. 2000;24:175-93.
108. Zaczynska E, Gabra BH, Sirois P. Bradykinin stimulates MMP-2 production in guinea pig tracheal smooth muscle cells. *Inflammation*. 2003;27:307-15.
109. Cornelius LA, Nehring LC, Roby JD, Parks WC, Welgus HG. Human dermal microvascular endothelial cells produce matrix metalloproteinases in response to angiogenic factors and migration. *J Invest Dermatol*. 1995;105:170-6.
110. Iwai N, Matsunaga M, Kita T, Tei M, Kawai C. Regulation of angiotensin converting enzyme activity in cultured human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;149:1179-85.
111. Murphy HS, Maroughi M, Till GO, Ward PA. Phorbol-stimulated influx of extracellular calcium in rat pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol*. 1994;267:L145-51.
112. Papadimitriou E, Waters CR, Manolopoulos VG, Unsworth BR, Maragoudakis ME, Lelkes PL. Regulation of extracellular matrix remodeling and MMP-2 activation in cultured rat adrenal medullary endothelial cells. *Endothelium*. 2001;8:181-94.
113. Park MJ, Park IC, Hur JH, Rhee CH, Choe TB, Yi DH, Hong SI, Lee SH. Protein kinase C activation by phorbol ester increases in vitro invasion through regulation of matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases system in D54 human glioblastoma cells. *Neurosci Lett*. 2000;290:201-4.
114. Yoo HG, Shin BA, Park JS, Lee KH, Chay KO, Yang SY, Ahn BW, Jung YD. IL-1beta induces MMP-9 via reactive oxygen species and NF-kappaB in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;298:251-6.
115. Nootboom A, Van Der Linden CJ, Hendriks T. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate endothelial permeability induced by lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Crit Care Med*. 2002;30:2063-8.
116. Saijonmaa O, Nyman T, Fyhrquist F. Downregulation of angiotensin-converting enzyme by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in cultured human endothelial cells. *J Vasc Res*. 2001;38:370-8.
117. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kilic R, Sarikoc A, Brueckmann M, Vahl C, Hagl S, Haase KK, Borggrefe M. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis*. 2003;170:205-11.

118. Tsuzaki M, Guyton G, Garrett W, Archambault JM, Herzog W, Almekinders L, Bynum D, Yang X, Banes AJ. IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells. *J Orthop Res.* 2003;21:256-64.
119. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1996;271:14657-60.
120. Migita K, Kawabe Y, Tominaga M, Origuchi T, Aoyagi T, Eguchi K. Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts. *Lab Invest.* 1998;78:535-9.
121. Chung KY, Kang DS. Regulation of type I collagen and interstitial collagenase mRNA expression in human dermal fibroblasts by colchicine and D-penicillamine. *Yonsei Med J.* 1999;40:490-5.
122. Loennechen T, Mathisen B, Hansen J, Lindstad RI, El-Gewely SA, Andersen K, Maelandsmo GM, Winberg JO. Colchicine induces membrane-associated activation of matrix metalloproteinase-2 in osteosarcoma cells in an S100A4-independent manner. *Biochem Pharmacol.* 2003;66:2341-53.
123. Ravn HB, Falk E. Histopathology of plaque rupture. *Cardiol Clin.* 1999;17:263-70, vii.
124. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J.* 1985;53:363-73.
125. Radomski A, Stewart MW, Jurasz P, Radomski MW. Pharmacological characteristics of solid-phase von Willebrand factor in human platelets. *Br J Pharmacol.* 2001;134:1013-20.
126. Coker ML, Jolly JR, Joffs C, Etoh T, Holder JR, Bond BR, Spinale FG. Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281:H543-51.
127. Li Z, Froehlich J, Galis ZS, Lakatta EG. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension.* 1999;33:116-23.
128. Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, Franch R, Puato M, Ausoni S, Pauletto P. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res.* 2001;89:1111-21.
129. Saito S, Frank GD, Motley ED, Dempsey PJ, Utsunomiya H, Inagami T, Eguchi S. Metalloprotease inhibitor blocks angiotensin II-induced migration through inhibition of

- epidermal growth factor receptor transactivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;294:1023-9.
130. Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, Pini B, Cuccurullo C, Zucchelli M, de Cesare D, Uccchino S, Spigonardo F, De Luca M, Muraro R, Bei R, Bucci M, Cuccurullo F, Mezzetti A. Blockade of the angiotensin II type 1 receptor stabilizes atherosclerotic plaques in humans by inhibiting prostaglandin E2-dependent matrix metalloproteinase activity. *Circulation.* 2004;109:1482-8.
 131. Nadal JA, Scicli GM, Carbini LA, Scicli AG. Angiotensin II stimulates migration of retinal microvascular pericytes: involvement of TGF-beta and PDGF-BB. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H739-48.
 132. Reinhardt D, Sigusch HH, Hensse J, Tyagi SC, Korfer R, Figulla HR. Cardiac remodelling in end stage heart failure: upregulation of matrix metalloproteinase (MMP) irrespective of the underlying disease, and evidence for a direct inhibitory effect of ACE inhibitors on MMP. *Heart.* 2002;88:525-30.
 133. Bruemmer D, Collins AR, Noh G, Wang W, Territo M, Arias-Magallona S, Fishbein MC, Blaschke F, Kintscher U, Graf K, Law RE, Hsueh WA. Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J Clin Invest.* 2003;112:1318-31.
 134. Lods N, Ferrari P, Frey FJ, Kappeler A, Berthier C, Vogt B, Marti HP. Angiotensin-converting enzyme inhibition but not angiotensin II receptor blockade regulates matrix metalloproteinase activity in patients with glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:2861-72.
 135. Wang M, Takagi G, Asai K, Resuello RG, Natividad FF, Vatner DE, Vatner SF, Lakatta EG. Aging increases aortic MMP-2 activity and angiotensin II in nonhuman primates. *Hypertension.* 2003;41:1308-16.
 136. Papakonstantinou E, Roth M, Kokkas B, Papadopoulos C, Karakiulakis G. Losartan inhibits the angiotensin II-induced modifications on fibrinolysis and matrix deposition by primary human vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;38:715-28.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt :

Meinem Doktorvater PD Dr. M. Christ: Vielen Dank für die Überlassung des Themas, die Einführung in die Techniken wissenschaftlichen Arbeitens und Denkens, die nette Betreuung während der Doktorarbeit und den zahllosen Anregungen und Diskussionen. Mein Dank geht auch an seine Familie.

Prof. Dr. Maisch: Vielen Dank für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten in seinen Laboren der Uniklinik Marburg Abteilung für Kardiologie und die Bereitstellung der notwendigen Mittel.

Den Mitarbeitern des kardiologisch-immunologischen Labores: Mein besonderer Dank gilt Elmar Meyer und Marlies Crombach für Ihre Anregungen, ihre Unterstützung und Ihre freundschaftliche Zusammenarbeit.

Den Hebammen und der Geburtshilfestation des Krankenhauses Wehrda

Allen meinen Eltern: Ihr seid die Besten!

Meiner frisch vermählten Frau Katja: Vielen Dank für so viel, dass es den Platz hier sprengen würde. Te quiero, cariña!

Mirko, Thomas und Theresia für die moralische Stütze und den häufigen fachübergreifenden Meinungsaustausch.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Prof. Dr. Arnold, Prof. Dr. Bach, Prof. Dr. Barth, Prof. Dr. Dr. Basler, Prof. Dr. Baum, PD Dr. Becker, PD Dr. Beyer, PD Dr. Christiansen, Prof. Dr. Dr. Daut, Prof. Dr. Eilers, Dr. Feuser, Prof. Dr. Geus, Prof. Dr. Gotzen, Prof. Dr. Griss, Prof. Dr. Gudermann, Prof. Dr. Happel, PD Dr. Hellinger, PD Dr. Hesse, Prof. Dr. Hofmann, Prof. Dr. Jungclas, Prof. Dr. Kern, Prof. Dr. Klenk, Prof. Dr. Kretschmer, Prof. Dr. Krieg, Prof. Dr. Kroll, Prof. Dr. Lammel, Prof. Dr. Lang, Prof. Dr. Lennartz, Prof. Dr. Moll, Prof. Dr. Mutters, Prof. Dr. Oertel, Prof. Dr. Dr. Renschmidt, Prof. Dr. Renz, Prof. Dr. Schäfer, Prof. Dr. Seyberth, Prof. Dr. Schmidt, Prof. Dr. Steiniger, Prof. Dr. Suske, Prof. Dr. Vohland, Prof. Dr. Werner, HD Dr. Westermann, Prof. Dr. Wulf,

Meine akademischen Lehrer in Badajoz (Spanien) waren:

Prof. Dr. Quiles Galindo, Prof. Dr. Tellez de Peralta