

Marius Andreas Jäger
Dr. med.

Phänotypanalyse arterieller glatter Gefäßmuskelzellen in dreidimensionaler Sphäroidkultur

Fach/Einrichtung: Physiologie

Doktorvater: apl. Prof. Dr. rer. physiol. Thomas Korff

In Arterien regulieren glatte Gefäßmuskelzellen (GMZ) über Kontraktion beziehungsweise Relaxation die Gefäßweite und damit den Blutfluss und -druck. Im gesunden, adulten Organismus besitzen die GMZ dabei einen ruhenden, kontraktilen Phänotyp und proliferieren kaum. Im Rahmen eines oft pathophysiologisch bedingten Umbaus der Gefäßwand (zum Beispiel bei Bluthochdruck) nehmen sie hingegen einen synthetischen Phänotyp an, der durch vermehrte Proliferation, Migration und Synthese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix gekennzeichnet ist. Da ein solcher Umbau mit einer vermehrten Gefäßsteifigkeit und vergrößertem Gefäßwiderstand einhergeht und das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen erhöht, ist die Erforschung von Steuermechanismen der Funktion und Kontraktilität der GMZ von enormer klinischer Relevanz.

Unter den in der Forschung standardmäßig verwendeten, planaren Zellkulturbedingungen (2D-Kultur) verlieren GMZ ihren ruhenden, kontraktilen Phänotyp und wechseln zu einem synthetischen Phänotyp. Damit sind *in vitro*-Bedingungen weit davon entfernt, eine physiologische Umgebung für GMZ zu ermöglichen und es bleibt eine Herausforderung, Bedingungen zu identifizieren, die einen ruhenden Phänotyp fördern. Zentrale Frage dieser Arbeit war, ob eine dreidimensionale Organisation als Sphäroide den ruhenden Phänotyp der GMZ im Vergleich zu 2D-Kultur unterstützt. Dazu wurden das Transkriptom, die Proteinmengen wichtiger Phänotypmarker und die Proliferation der Zellen untersucht.

Eine zu Beginn durchgeführte grundlegende Charakterisierung der verwendeten humanen umbilikalarteriellen glatten Muskelzellen (HUASMC) in 2D-Kultur deutete auf eine gut ausgeprägte Differenzierung der Zellen hin. Änderungen im Gehalt an fetalem Kälberserum (FKS) im Medium beeinflusste lediglich die Proliferation, nicht aber die Proteinmengen von Markern des kontraktilen Phänotyps wie *smooth muscle myosin heavy chain*. Für die 3D-Kultur wurden HUASMC als *hanging drops* kultiviert, wobei sich die Zellen spontan zu viellagigen, sphäroidalen Aggregaten organisierten. Die Transkriptomanalyse brachte hervor, dass in 3D kultivierten HUASMC die Expression von Gengruppen reduziert war, die mit der Proliferation und der Proteinbiosynthese assoziiert sind. Auf Proteinebene bestätigte sich diese Beobachtung: die Proliferation war zum Erliegen gekommen und auch erhöhte FKS-Konzentrationen stellten keinen Proliferationsstimulus mehr dar. Dies war begleitet von einer niedrigeren Aktivität der Proteinkinasen *extracellular signal-regulated kinase 1/2*. Die Proteinmengen der Phänotypmarker *smooth muscle myosin heavy chain* und Calponin blieben konstant, für *alpha smooth muscle actin* wurde eine größere Proteinmenge im Vergleich zu 2D-Kultur festgestellt. Gemeinsam verdeutlichen diese Ergebnisse, dass die dreidimensionale Kultivierung als Sphäroide die Ausbildung eines ruhenden und differenzierten Phänotyps der GMZ unterstützt.

In 3D-Kultur wurde zudem eine verstärkte mRNA-Expression für *transforming growth factor* β 1 (TGF β 1) und TGF β 3 festgestellt, die als entscheidende Determinanten des kontraktilen Phänotyps glatter Muskelzellen gelten. Die daraufhin nachgewiesene vermehrte

Phosphorylierung von SMAD2/3 spricht für eine entsprechend autokrine Aktivierung des TGF β -Signalwegs. Die Behandlung der GMZ-Sphäroide mit dem TGF β -Rezeptor-Inhibitor LY2109761 hatte keinen Einfluss auf die Level der GMZ-Differenzierungsmarker, stimulierte aber die Transkription von proliferationsmodulierenden Genen und von Zielgenen des proinflammatorisch wirkenden Transkriptionsfaktors *nuclear factor - kappa B* (NF- κ B). Funktionell zeigte sich nach TGF β -Rezeptor-Inhibition eine gesteigerte DNA-Synthese und auf Proteinebene waren NF- κ B-Aktivatoren vermehrt und NF- κ B-Inhibitoren vermindert nachweisbar.

Insgesamt stellen GMZ-Sphäroide eine vielseitige Methode der organotypischen Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen dar. Sie ist nicht nur einfach in der Handhabung, sondern auch frei von Einflüssen künstlicher Matrices oder Oberflächen und bietet zudem die Möglichkeit funktioneller Analysen, wie zum Beispiel der Migration. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass 1) die dreidimensionale Kultivierung von HUASMC als Sphäroid ausreichend ist, um einen ruhenden Phänotyp der GMZ zu etablieren, 2) der TGF β -Signalweg dabei zum niedrigen Level der Proliferation beiträgt und 3) die Suppression der transkriptionellen NF- κ B-Aktivität ebenfalls von TGF β abhängig ist.