

Bengi Su Tavis
Dr. med.

Mitochondrial dysfunction in vascular smooth muscle cells of abdominal aortic aneurysms

Fach: Chirurgie
Doktormutter: Prof. Dr. rer. nat. Susanne Dihlmann

Das abdominale Aortenaneurysma wird als eine Erweiterung der Bauchaorta definiert. Die Entzündung der Gefäßwand sowie die beeinträchtigte Gefäßintegrität sind an der Pathophysiologie der Erkrankung beteiligt. Die glatten Gefäßmuskelzellen befinden sich in der medialen Schicht der Bauchaorta und spielen eine entscheidende Rolle für die Gefäßintegrität. Die Apoptose und Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen durch eine phänotypische Umschaltung werden weitgehend mit der Entwicklung des Aneurysmas in Verbindung gebracht, obwohl die genauen Mechanismen, die zu diesen Ereignissen führen, unvollständig geklärt sind.

C57BL/6J-Mäuse weisen eine Keimbahnmutation des mitochondrialen Atmungskettenproteins Nicotinamid-Nukleotid-Transhydrogenase auf und zeigen Anomalien der Mitochondrienfunktion. Frühere Erkenntnisse haben gezeigt, dass C57BL/6J-Mäuse anfälliger für die Entwicklung eines Aortenaneurysmas als C57BL/6N-Mäuse sind, welche diese Mutation nicht aufweisen. Diese Ergebnisse weisen auf eine Rolle der Mitochondrienfunktion in der Pathophysiologie des abdominalen Aortenaneurysmas hin.

In diesem Projekt wurden mitochondriale Dynamik und oxidativer Stress in menschlichen aus Bauchaortenaneurysmen stammenden sowie gesunden glatten Gefäßmuskelzellen in vitro untersucht. Ziel war es, die Veränderungen der Mitochondrienfunktion und Redox-Homöostase in glatten Gefäßmuskelzellen bei der Entwicklung eines abdominalen Aortenaneurysmas beim Menschen zu untersuchen.

Die Vorversuche wurden mit immortalisierten Zelllinien durchgeführt, um Bedingungen zu schaffen, die für die Hauptversuche mit menschlichen Aortenzellen geeignet waren. Die mitochondriale Dynamik wurde anhand von Unterschieden in der mitochondrialen Morphologie zwischen aneurysmatischen und gesunden Zellen untersucht. Die Mitochondrien wurden mit Fluoreszenzfärbung und -mikroskopie visualisiert. Die mitochondriale Morphologie wurde anhand vier Surrogatmarker analysiert: mitochondriale Partikelanzahl, mitochondriale Fläche, Umfang eines Mitochondriums und Zirkularität eines Mitochondriums. Darüber hinaus wurde der intrazelluläre Spiegel der NADP⁺/NADPH-Redoxpaare als ein Parameter für den gesamten Mitochondriengehalt mit einem Biolumineszenz-basierten Assay gemessen.

Oxidativer Stress wurde anhand der DNA-Doppelstrangbrüche und der Aktivität des Antioxidant-Response-Elements in aneurysmatischen und gesunden Zellen analysiert. Um die Aktivität des Antioxidant-Response-Elements zu messen, wurden die Zellen mittels Elektroporation mit einem Reporter-Plasmidvektor transient transfiziert, welcher die Antioxidant-Response-Element-Enhancer-Sequenz gefolgt von dem aus Tiefseegarnelen stammenden NanoLuc-Luciferase-Gen trug. Die von den transfizierten Zellen mit oder ohne Angiotensin-II-Provokation erzeugte Lumineszenz wurde dann mithilfe eines lumineszenz-basierten Assay-Systems gemessen, um die Auswirkungen von additivem oxidativem Stress

auf die Aktivität des Antioxidant-Response-Elements in vitro zu untersuchen. DNA-Doppelstrangbrüche wurden durch Immunfluoreszenzfärbung und -mikroskopie von gamma-H2A.X an kultivierten gesunden und aneurysmatischen Zellen visualisiert. Für die quantitative Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen wurden gamma-H2A.X-positive Kerne manuell gezählt und die nukleären gamma-H2A.X-Foci quantifiziert.

Die mitochondriale Morphologie zeigte, dass die mitochondriale Spaltung (Fission) erhöht und der Gesamtmitochondriengehalt in aneurysmatischen glatten Gefäßmuskelzellen verringert war. Diese Ergebnisse deuteten auf eine beeinträchtigte Mitochondrienfunktion hin. Dementsprechend war der Spiegel der NADP⁺/NADPH-Redoxpaare, die in Mitochondrien reichlich vorhanden sind, in aneurysmatischen glatten Gefäßmuskelzellen verringert. Darüber hinaus waren die Aktivität des Antioxidant-Response-Elements und die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in aneurysmatischen Zellen im Vergleich zu gesunden Zellen erhöht. Diese Ergebnisse deuteten auf ein Umfeld mit hohem oxidativem Stress in aneurysmatischen glatten Gefäßmuskelzellen hin. Interessanterweise wurde ein linearer Anstieg der Antioxidant-Response-Element-Aktivität in Korrelation mit der Angiotensin-II-Behandlung bei gesunden Zellen beobachtet, jedoch nicht bei aneurysmatischen Zellen. Dies ließ auf eine Beeinträchtigung der zellulären antioxidativen Abwehr in aneurysmatischen Zellen schließen. Dementsprechend stieg das Ausmaß der DNA-Doppelstrangbrüche in aneurysmatischen Zellen bei einer Angiotensin-II-Behandlung deutlich an, bei gesunden Zellen jedoch nicht.

Die Ätiologie des abdominalen Aortenaneurysmas ist unvollständig geklärt. Das Verständnis der genauen Pathophysiologie des abdominalen Aortenaneurysmas ist entscheidend für die Entwicklung einer kausalen medikamentösen Therapie gegen die Erkrankung. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine erhöhte mitochondriale Spaltung (Fission) und einen verringerten Gesamtmitochondriengehalt in aneurysmatischen Zellen. Diese Veränderungen in der mitochondrialen Dynamik verursachen höchstwahrscheinlich die mitochondriale Dysfunktion und exazerbieren den oxidativen Stress. Der ständige hohe Stresszustand der Zelle erschöpft die antioxidativen Abwehrmechanismen und erhöht die DNA-Schädigung während der Aneurysmaentwicklung. Mitochondriale Dysfunktion, hoher oxidativer Stress, beeinträchtigte antioxidative Abwehr und erhöhte DNA-Schäden wirken in der Zelle synergistisch zusammen und erzeugen einen Circulus vitiosus, welcher proaneurysmatische Bedingungen verstärkt. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die veränderte mitochondriale Dynamik eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des abdominalen Aortenaneurysmas spielt. Antioxidative Substanzen, die auf Mitochondrien abzielen, könnten die zukünftige Richtung der abdominalen Aortenaneurysma-Therapie sein.