

1 Einleitung

1.1 Konzept der Angioadaptation

Der menschliche Organismus ist aufgrund sich permanent ändernder innerer wie äußerer Bedingungen ständigem Wandel unterworfen. Die Antwort auf diesen Wandel besteht in entsprechenden Anpassungs- bzw. Adaptationsvorgängen auf unterschiedlichsten Ebenen. Solche Anpassungsvorgänge spielen sich auch an Blutgefäßen ab.

Durchmesser und Architektur von Blutgefäßen werden dem Bedarf des von ihnen versorgten Gewebes angepasst. Kurzfristig führt dies über die Tonusregulation der Gefäßwand zur schnellen Umverteilung des Blutvolumenstroms. Darüber hinaus erfordert die langfristige Bedarfsanpassung den Umbau von Blutgefäßnetzwerken. Dazu gehört die Neubildung von Blutgefäßen durch Angiogenese, der Untergang nicht mehr benötigter Blutgefäße sowie der strukturelle Umbau von Blutgefäßen mit Zunahme des Durchmessers und der Wanddicke wie bei der Arteriogenese (Zakrzewicz, A. et al., 2002). Alle Vorgänge der strukturellen Bedarfsanpassung von Blutgefäßen werden hier unter dem Begriff „Angioadaptation“ zusammengefasst. Tonusregulation und Angioadaptation erfolgen z.T. aufgrund gleicher Stimuli.

1.1.1 Mechanismen der Tonusregulation zur Anpassung an Strömungsbedingungen

Für die kurzfristigen Anpassungsvorgänge sind zum Teil mechanische Kräfte, insbesondere die Wandschubspannung, verantwortlich, die von der Blutströmung auf das Endothel ausgeübt werden. Wandschubspannung induziert die Ausschüttung vasoaktiver Substanzen, die im Endothel selbst gebildet werden, den Vasotonus regulieren und die Thrombozytenaggregation im gut perfundierten Gefäß herabsetzen. Diese als Autakoide bezeichneten Substanzen sind in ihrer chemischen Struktur uneinheitlich. Zu ihnen gehören Prostanoide, hier insbesondere Prosta-

glandin I₂, freie Radikale wie Stickoxid (NO) und Superoxidanionen (O²⁻), das Polypeptid Endothelin-1 (ET-1) und ein noch nicht eindeutig identifizierter Faktor, der als EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) bezeichnet wird.

Prostaglandin I₂ ist stark vasodilatatorisch wirksam und wirkt zusätzlich antithrombotisch durch Hemmung der Plättchenaggregation (Moncada, S. et al., 1976). Für seine Bildung ist die Cyclooxygenase-2 in Endothelzellen ein Schlüsselenzym, weil es der Prostaglandin I-Synthetase die benötigte Vorläufersubstanz bereitstellt. Die Expression der Cyclooxygenase-2 im Endothel wird durch Wandschubspannung erhöht (Berthiaume, F. und Frangos, J. A., 1992). Durch diesen Mechanismus kommt es zu einer langfristigen Erhöhung der Prostaglandin I₂-Freisetzung.

Stickoxid (NO), das auch EDRF (endothelium derived relaxing factor) genannt wird, hat eine noch höhere vasodilatatorische Potenz als Prostaglandin I₂. Es senkt den Blutdruck und hemmt durch die intrazelluläre Erhöhung des cGMP-Spiegels auch die Aggregation der Thrombozyten (Stamler, J. et al., 1989). NO wird im Endothel durch die endotheliale Stickoxidsynthetase (eNOS oder NOS 3) gebildet. Bei einer Erhöhung der durch den Blutstrom auf das Endothel einwirkenden Wandschubspannung kommt es schon innerhalb von Millisekunden zu einem bis zu fünfzigfach erhöhten Ausstoß von NO (Cooke, J. et al., 1991). Darüber hinaus wird auch die Expression der eNOS erhöht.

Im Gegensatz zu den Vasodilatoren Prostaglandin I₂ und NO ist das endotheliale Polypeptid Endothelin-1 (ET-1), von dem drei Isomere identifiziert wurden, stark vasokonstriktorisch wirksam und erhöht die Proliferationsrate vaskulärer glatter Muskelzellen. Auch die Freisetzung von ET-1 wird durch Wandschubspannung reguliert. Diese Regulation hat zwei unterschiedliche Phasen. Kurz nach Strömungsbeginn kommt es zu vermehrter (Maximum nach 30 min.), nach längerer Exposition (24 h) jedoch zu verminderter Expression (Morawietz, H. et al., 2000). Die physiologische Bedeutung dieses Mechanismus ist noch ungeklärt. Interessanterweise setzt ET-1 in hohem Maße Prostacyclin und NO frei, und moduliert dadurch seine eigene vasokonstriktorische Aktivität (Vane, J. R., Botting, R. M. 1992).

Der Endothelium-derived-hyperpolarizing-factor (EDHF) wird zur Gruppe der Autakoide gerechnet, obwohl er bisher nicht eindeutig identifiziert worden ist. Er entfaltet eine dilatatorische Wirkung an der glatten Gefäßmuskulatur durch Hyperpolarisierung (Cohen, R.A. und Vanhoute, P.M., 1995). Der Mechanismus seiner Freisetzung ist allerdings noch weitgehend ungeklärt. Von weitreichender Bedeutung könnte jedoch die Tatsache sein, daß die Freisetzung von EDHF durch einen physiologischen NO-Spiegel inhibiert wird. Denkbar erschiene hierbei eine Art Kompensationsmechanismus durch EDHF bei Versagen des NO-Systems (Bauersachs, J. et al., 1996).

1.1.2 Mechanismen der Angioadaptation

Ein Mechanismus langfristiger Adaptationen von Blutgefäßnetzen ist die Angiogenese. Zunächst galt die Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Kapillaren und Venolen durch Aussprossung (sprouting) oder Gefäßteilung (Intussuszeption) als auf die Embryonalentwicklung beschränkt (Risau, W., 1997). Ausnahmen bezogen sich lediglich auf den weiblichen Reproduktionstrakt und pathologische Situationen, wie z.B. die diabetische Retinopathie, chronisch inflammatorische Prozesse oder die Vaskularisierung solider Tumoren (Risau, W., 1997). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass Angiogenese auch im erwachsenen Organismus als Anpassung an veränderte Versorgungsbedürfnisse des Gewebes oder an veränderte Strömungsbedingungen auftritt. Beispiele hierfür sind die Angiogenese bei Anämie (Metivier, F. et al., 2000) und bei Muskeltraining (Hudlicka, O. et al., 1992). Eine andere Form der Angioadaptation ist die Arteriogenese bei der Bildung von Kollateralen nach der Okklusion von Leitungsgefäßen (Buschmann, I.; Schaper, W., 1999). Für die Angioadaptation ist der Untergang nicht benötigter Blutgefäße („pruning“) genauso bedeutsam wie die Neubildung oder der Umbau von Blutgefäßen. Obwohl der Untergang von Blutgefäßen bei der Involution des Gelbkörpers lange bekannt ist, sind die Mechanismen des „pruning“, das grundsätzlich in allen Geweben vorkommen muss, nur unzureichend untersucht.

1.1.2.1 Gefäßsprossung

Angiogenese durch Gefäßsprossung erfordert den koordinierten Ablauf mehrerer unterscheidbarer zellulärer Funktionen. Nach proteolytischer Auflösung der extrazellulären Matrix der vorbestehenden Gefäßwand bilden Endothelzellen durch Wachstum und Wanderung solide Aussprossungen mit anschließender „Röhrenbildung“. Nach Anschluß dieser bereits offenen Kapillarsprosse an ein bereits existierendes Gefäß werden glatte Muskelzellen sowie Perizyten rekrutiert und verstärken die Gefäßwand. Der komplexe Vorgang der Angiogenese wird durch über 20 Aktivatoren und ebenso viele Inhibitoren koordiniert (Tab. 1), die sich bestimmten Schritten der Gefäßsprossung zuordnen lassen (Conway, E. M. et al., 2001).

Der eigentlichen Angiogenese geht eine Gefäßerweiterung voraus, wobei Stickstoffmonoxid (NO) eine zentrale Rolle spielt. Durch „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) wird anschließend die Wand des Blutgefäßes durchlässig, Plasmaproteine treten aus und bilden Leitstrukturen für die später auswandernden Endothelzellen. Die Ablösung glatter Muskelzellen aus der Gefäßwand durch Blockade des endothelialen Tyrosin-Kinase-Rezeptors Tie-2 durch seinen endogenen Antagonisten Angiopoietin-2 (Ang-2), erleichtert die Wanderung der Endothelzellen. Über 20 verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMPs) stehen zur Verfügung, um nun durch Abbau der extrazellulären Matrix Raum für auswandernde Endothelzellen zu schaffen und gleichzeitig an Matrixproteinen verankerte Wachstumsfaktoren (bFGF, VEGF, IGF-1) freizusetzen. Weitere Proteinase, wie der Urokinase-Plasminogenaktivator (u-Pa), sind – insbesondere im Herzmuskel – an der Gewebsauflockerung beteiligt.

Unter dem Einfluß von VEGF, FGFs und ihren endothelialen Rezeptoren wachsen die Endothelzellen nun sehr schnell, wobei der angiogene Effekt von VEGF durch Angiopoietin-2 erhöht wird (Hanahan, D., 1997). Die migrierenden Endothelzellen bilden eine Gefäßsprosse, wobei VEGF und Angiopoietin-1, das durch Aktivierung von Tie-2 chemotaktisch auf Endothelzellen wirkt (Witzenbichler, B., 1998), und Adhäsionsmoleküle, insbesondere Integrine, eine zentrale Rolle spielen. Integrine

($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$) sind, in Wechselwirkung mit der Extrazellulärmatrix, auch an der anschließenden Bildung des Gefäßlumens beteiligt (Brooks, P. C., 1994a). Durch inhibitorische anti- β_1 -Integrin-Antikörper konnte bei der Ratte die Bildung eines Lumens der Aorta dorsalis inhibiert werden (Drake, C. J., 1992). Auch konnte durch die Anwendung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Antagonisten in angiogenen Blutgefäßen eine Apoptose selektiv induziert werden (Brooks et al., 1994b). Die Weite des Lumens kann durch die kürzeren Splicevarianten von VEGF (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅) und Angiopoietin-1 erhöht, durch VEGF₁₈₉ vermindert werden (Conway, E. M. et al., 2001) PDGF-B und die Aktivierung von Tie-2 führen anschließend zur Rekrutierung von Perizyten und/oder glatten Muskelzellen und damit zum Aufbau der reifen Gefäßwand (Lindahl, P., 1999). Die einzelnen Schritte der Angiogenese unterliegen einer kontinuierlichen Kontrolle durch endogene Inhibitoren, so kann z.B. durch Thrombospondin-1 (TSP-1) die Bildung eines Gefäßlumens verhindert werden (Lawler, J., 2000).

Tab. 1 Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese. Modifiziert nach Conway, E. M. et al., 2001.

Aktivatoren der Angiogenese	Inhibitoren der Angiogenese
Nitrit-Oxid-Synthetase (NOS), Cyclooxygenase-2: Angiogenese und Vasodilatation [Kimura, H., et al., 2000]	
Angiopoietine: Angiopoietin-1: Stabilisierung der Gefäße durch Verstärkung der Interaktion zwischen Endothel und glatten Muskelzellen, Hemmung der Permeabilität Angiopoietin-2: destabilisiert Gefäße vor dem Aussprossen [Davies, S. et al., 1996] [Suri, C. et al., 1997 / 1998]	Angiopoietin-2 (Tie-2-Ligand, blockierend): Antagonist von Angiopoietin-1; induziert Gefäßregression in Abwesenheit von angiogenetischen Signalen [Hanahan, D., 1997] [Maisonpierre, P. C. et al., 1997]
	Angiostatin und verwandte Plasminogen kringles (proteolytische Fragmente von Plasminogen): Verhinderung des Überlebens und der Migration von Endothelzellen [O'Reilly, M. S. et al., 1994]
HIF-1α: Erhöht die Expression von Angiogenese-Transkriptionsfaktoren (z.B. VEGF) [Carmeliet, P. et al., 1998] [Wenger, R. H., 2000]	
VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF: Stimulation der Angiogenese durch Permeabilitätserhöhung [Senger, D. R. et al., 1996], [Ferrara, N. et al., 1992] VEGF-C: Stimulierung der Lymphangiogenese PIGF: Mitwirkung an pathologischer Angiogenese	VEGFR-1 (löslich) und Neuropilin (NP-1): Absenken von VEGF, VEGF-B, PIGF (VEGFR-1) und VEGF 165 (NP.1)
VEGF-Rezeptoren (R-1, R-2, R-3): VEGFR-1: wichtig für Organisation der embryonalen Gefäße, nicht für endotheliale Zelldifferenzierung [Fong, G. H. et al., 1995] VEGFR-2: Signalrezeptor für Angiogenese VEGFR-3: Signalrezeptor für Lymphangiogenese Neuropilin-1 (Korezeptor von VEGFR-2): Bindet spezifisch VEGF 165	
	Endostatin (Fragment von Typ XVIII-Kollagen): Verhinderung des Überlebens und der Migration von Endothelzellen [O'Reilly, M. S., 1997]
PDGF-BB und Rezeptoren: Rekrutierung glatter Muskelzellen (Lindahl, P. et al., 1999)	
	METH-1,2: Inhibitoren, die Metalloproteasen, Thrombospondin und Disintegrindomänen beinhalten [Vazquez, F. et al., 1999]

Aktivatoren der Angiogenese	Inhibitoren der Angiogenese
<p>FGF, HGF, MCP-1: Stimulation der Angiogenese (FGF, HGF) und Arteriogenese (FGF, MCP-1) [Folkman J. und Shing, Y., 1992] [Carmeliet, P. et al., 2000]</p>	
	<p>Interferon (IFN) α, β, γ Interleukine IL-4, 12, 18, IP-10: Verhinderung der endothelialen Migration IFNα reguliert bFGF herunter [Carmeliet, P. et al., 2000]</p>
<p>Growth hormone: Zusammen mit IGF-1 Neovaskularisierungen, (path.: Retina) über Aktivierung von α_v-Integrinen [Smith, L. E. et al., 1997]</p>	
	<p>Plättchenfaktor-4 (PF-4): Verhindert Bindung von bFGF und VEGF [Carmeliet, P. et al., 2000] [Maione, T. E. et al., 1990]</p>
<p>IGF-1: Über Growth Hormone (GH) Neovaskularisierungen durch Aktivierung von α_v-Integrinen [Carmeliet, P. et al., 2000] [Smith, L. E. et al., 1997]</p>	
<p>TGF-β1-endoglin, TGF-β Rezeptoren: Stabilisierung der Gefäße durch Stimulation extra-zellulärer Matrixproduktion; chemotaktisch wirksam auf Makrophagen (entzündliche Antwort)[Pepper, M. S., 1997] [Frater-Schröder, M., 1987] Reversible Inhibition von basalem/stimuliertem Endothelwachstum [Frater-Schröder, M., 1987]</p>	
<p>Tissue factor (TF): Stabilisierung der Gefäßwand; wirkt auf Perizyten und Myozyten; [Carmeliet, P. et al., 1996]</p>	
	<p>Prothrombin kringle-2, antithrombin III-fragment (Fragmente der hämostatischen Faktoren): Unterdrückung endothelialen Wachstums [Carmeliet, P. et al., 2000]</p>
<p>CXC (Chemokine): Induzierung endothelialen Wachstums [Belperio, J. A. et al., 2000]</p>	
	<p>Vasostatin (NH₂-Domäne von Calreticulin): Verhinderung endothelialen Wachstums (Xiao, F. et al., 2002)</p>
<p>Interleukin-8 (IL-8): Produziert von Makrophagen im Zusammenhang mit chron. inflamm. Prozessen; induziert Proliferation und Chemotaxis von Endothelzellen [Koch, A. E. et al., 1992]</p>	

Aktivatoren der Angiogenese	Inhibitoren der Angiogenese
<p>TNF-α: Multifunktionales Zytokin; in unterschiedlichen Modellen sowohl stimulierende als auch inhibierende Funktion auf Endothelzellen</p> <p>In vitro: Inhibition endothelialer Zellproliferation, mit und ohne Zugabe von FGF In vivo: Stimulation von Neovaskularisierungen im Rahmen einer entzündlichen Antwort (Kornea des Hasen) mit und ohne Zugabe von FGF; durchlässige Blutgefäße [Frater-Schröder, M., 1987]</p>	
<p>Integrine ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_3$): Rezeptoren für Matrixmakromoleküle und Protein- asen (MMP2) [Brooks, P. C. et al., 1994a] [Friedlander, M. et al., 1995]</p>	<p>Thrombospondin-1(+2)(Extrazelluläre Matrix- proteine): Verhinderung endothelialer Migration, Proliferation Adhäsion, Überleben durch Inhibition von MMP-2 und MMP- 9 [Bein, K. et al., 2000] [Lawler, J., 2000]</p>
<p>VE-cadherin, PECAM (CD 31)(junktionale Endothelmoleküle): Essentiell für das Überleben des Endothels [Ilan, N. et al. , 1999] [Knudsen, K. A., 1998]</p>	
<p>Matrixmetalloproteinasen (MMPs) Plasminogen Aktivatoren (PA): Proteinasen eingebunden in zelluläre Migration und Matrixremodeling; Freisetzung von bFGF und VEGF aus der Matrix; Aktivierung von TGF-β; Bildung von Angiostatin [Hiraoka, N. et al., 1998]</p>	<p>Tissue-inhibitors of MMP 1,2,3(TIMPs), PEX (proteolytisches Fragment von MMP2): TIMPs: Untedrückung pathol. Angiogenese PEX: blockiert Bindung von MMP2 an $\alpha_v\beta_3$ [Brew, K. et al., 2000]</p>
	<p>Andere Inhibitoren: 16 kDa-Prolaktin;Canstatin (Fragment der α2- Kette des Kollagen IV), Maspin (Serpin);Troponin- 1; VEGI; Restin; Fragment von SPARC; Osteopontin Fragment; tubedown (tbdn)-1 [Gendron, R. L. et al. 2000]</p>
<p>Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-1): Proteinase-Inhibitor; Stabilisierung entstehender Gefäße durch Verhinderung der Matrixauflösung [Carmeliet, P. et al., 2000]</p>	
<p>Andere Aktivatoren: AC 133: eingebunden in Angioblastendifferen- zierung Chemokine: vielfältige Aufgabe in der Angiogenese Id1/Id3: Inhibitoren der Differenzierung Helix-loop-helix Transkriptionsrepressor</p>	

1.1.2.2 Intussuszeption

Angiogenese durch Intussuszeption wurde ursprünglich für die embryonale Entwicklung der Lunge beschrieben (Buri, P.H. et Djonov, V., 2002). Im adulten Tier findet die durch Prazosin induzierte Angiogenese im Skelettmuskel überwiegend durch diesen Mechanismus statt (Zhou, A. et al., 1998). Es handelt sich hierbei um eine sogenannte „unorthodoxe Angiogenese“ (Egginton, S. et al., 2001). Während bei der Angiogenese durch Aussprossung die Basalmembran stellenweise aufgelöst wird, bleibt sie bei der unorthodoxen Angiogenese vollständig erhalten. Eine Sprossung findet nicht statt. In Myozyten von Prazosin-behandelten Ratten wurde eine höhere Expression von ESAF (endothelial cell stimulating angiogenic factor) festgestellt. Die Kapillaren exprimierten bei zunehmender Wandschubspannung verglichen mit der Kontrollgruppe vermehrt VEGF und Vitronektinrezeptoren (Milkiewicz, M. et al., 2001); (Shyy, J.Y.J., 1997). Eine endotheliale Proliferation blieb aus. Beide Mechanismen, Sprouting sowie Intussuszeption bzw. unorthodoxe Angiogenese, können sich auch nebeneinander in demselben Gewebe vollziehen.

1.1.2.3 Arteriogenese

Veränderte Bedarfslagen des Organismus können allerdings nicht allein durch Angiogenese beantwortet werden. Hinzu kommen Anpassungsmechanismen der vor- und nachgeschalteten Gefäße hinsichtlich Durchmesser und Wandstruktur. Sehr deutlich ist dies im Rahmen der Kollateralenbildung bei arteriellen Gefäßverschlüssen zu sehen (Buschmann, I.; Schaper, W., 1999). Hierbei kommt es zu einem Längen- und Dickenwachstum der Blutgefäße, das den bei der Kollateralisation durch massiv erhöhte Wandschubspannung entstehenden Arteriolen ein geschlängeltes Aussehen verleiht.

1.1.2.4 Pruning

Nachdem der sich entwickelnde Embryo einen primären vaskulären Plexus ausgebildet hat, können die sich durch Sprouting und Intussuszeption daran anschließenden Gefäßmodifikationen im Rahmen der Anpassung an ein funktionales Gefäßsystem ihrerseits weiter modifiziert werden durch sogenanntes „Pruning“.

Die anfangs im Überschuß vorhandene Gefäßzahl wird durch Pruning auf das notwendige Maß reduziert. Während etliche Gefäße wegfallen, können vorhandene im Rahmen der funktionalen Anpassung in Länge, Durchmesser und Verlauf abgeändert, remodelliert werden. Die „beschnittenen“ Endothelzellen können wandern und sich auch zu neuen Gefäßen zusammenlagern (Sprouting / Intussuszeption). Die molekularen Mechanismen des Pruning sind bislang noch ungeklärt (Risau, W., 1997)

1.2 Angioadaptive Triggermechanismen

Während also zahlreiche Faktoren bekannt sind, durch die die strukturelle Angioadaptation durch Angiogenese, Arteriogenese und Pruning verursacht werden kann, ist über die Regulation des geordneten Zusammenwirkens dieser Faktoren nur wenig bekannt. Zur Regelung des Zusammenwirkens der Angiogenesefaktoren bzw. Inhibitoren kommen grundsätzlich angioadaptive Triggermechanismen in Frage, die einerseits die metabolische Situation des jeweiligen Gewebes, andererseits die Hämodynamik reflektieren. Denn nur so können durch Angioadaptation Gefäßnetzwerke erzeugt und erhalten werden, die den Versorgungsbedarf von Geweben vollständig und mit geringstmöglichem Aufwand sichern. Ein geeigneter metabolischer Parameter ist der Sauerstoffpartialdruck, ein entscheidender hämodynamischer Parameter die vom Endothel detektierte Wandschubspannung (Zakrzewicz, A. et al., 2002).

1.2.1 Sauerstoffpartialdruck

Ein ausreichendes Sauerstoffangebot ist für alle höheren Organismen unabdingbar. Sauerstoff dient als letzter Elektronenakzeptor innerhalb der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung. Darüber hinaus benötigen viele enzymatische Prozesse molekularen Sauerstoff als Substrat. Während die Antwort auf akute Schwankungen der O_2 -Konzentration (Sekunden bis wenige Minuten) in Veränderungen präexistierender Proteine besteht (Phosphorylierung, Redoxstatus), führt chronische Hypoxie (Minuten bis Stunden und mehr) zu Veränderungen auf der Ebene der Genexpression (Semenza, L.G., 2000). Dabei stellt die Hypoxie einen wichtigen Stimulus für die Angiogenese dar.

1.2.1.1 HIF-1 α

Hypoxie steigert die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α (hypoxia-inducible factor- α). Bei abfallendem O_2 -Partialdruck kommt es physiologischerweise zu einem exponentiellen Expressionsanstieg der HIF-1 α -Untereinheiten. Während die α -Untereinheit des HIF-1-Moleküls unter Normoxie instabil ist, ist sie unter hypoxischen Bedingungen stabil und lagert sich mit der β -Untereinheit zu einem Heterodimer zusammen. Dieses ist in der Lage, die Transkription derjenigen Gene zu aktivieren, die für die Aufrechterhaltung der Sauerstoffhomöostase auf zellulärer, lokaler und systemischer Ebene verantwortlich sind (Wenger, R. H. und Gassmann, M., 1997).

Nach Aktivierung durch Hypoxie kann HIF-1 α an eine spezielle DNA-Bindungsstelle mit der Sequenz A / (G)CGTG binden, die in den Hypoxia-Response-Elements (HRE) vieler Sauerstoff-regulierter Gene vorhanden ist. Für die Transaktivierung benötigt HIF-1 α das Histon Acetyltransferase CBP/p300, das sich an die Transaktivationsdomänen von HIF-1 α und des transkriptionalen Kofaktors ARNT (aryl hydrocarbon receptor translocator) anlagert.

Neben der Aktivierung von HIF-1 α durch Hypoxie bestehen offensichtlich weitere Regulationsmechanismen. Ein bislang unbekannter Mechanismus ist für die verminderte Expression von HIF-1 α mRNA nach verlängerter Hypoxieexposition verantwortlich (Wenger, R. H. et al., 1998). Auf der Ebene der Transaktivierung wurde von einer HIF-1 α -abhängigen Induktion von p35srj berichtet, das seinerseits an den entscheidenden Koaktivator von HIF-1 α , CBP/p300, bindet und dadurch dessen Interaktion mit HIF-1 α blockiert und so die Transaktivierung unterbindet (Bhattacharya, S. et al., 1999).

Für die Degradierung von HIF-1 α unter Normoxie ist eine sogenannte „oxygen-dependent degradation domain“ (ODD) innerhalb des Proteins verantwortlich. An der Steuerung dieses Vorgangs ist das von-Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein (pVHL) beteiligt (Maxwell, P. H. et al., 1999). Zellen mit einem Mangel an funktionalem pVHL zeigen erhöhte Konzentrationen von HIF-1 α und, damit korrespondierend, eine erhöhte Expression von Sauerstoff-regulierten Genen. Entsprechend entwickeln Patienten mit einem von Hippel-Lindau-Syndrom (defektes pVHL) Hämangioblastome, vor allem in der Retina und im Kleinhirn.

Das letztendliche Signal zur Induzierung der HIF- α -Degradation über die ODD-Domäne ist bislang noch unbekannt, wie auch unbewiesen ist, ob diese bereits einen direkten Sauerstoff-Sensor darstellt oder von einem noch unbekanntem Sensor aktiviert bzw. getriggert wird. Mögliche Hinweise auf eine etwaige Sensorfunktion für Sauerstoff liefert die Existenz der PAS-Domäne (Per, Ahr/ARNT, Sim = Transkriptionsfaktoren) innerhalb der HIF- α Untereinheit. Diese auch bei anderen Säugern, Fischen und Drosophila anzutreffende Homologie spielt dort eine wichtige Rolle in verschiedenen Aspekten der Entwicklung, Sauerstoffhomöostase und zirkadianer Rhythmik. Bei Bakterien und Archebakterien-Arten übernimmt die PAS-Domäne häufig die Funktion eines Sensors für Sauerstoff, Licht sowie den Redoxstatus; interessanterweise ist die Häm enthaltende Tasche des bakteriellen Sauerstoffsensors FixL eine PAS-Domäne (Gong, W. et al., 1998). Die mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) p42 und p44, die wahrscheinlich nur indirekt durch Hypoxie aktiviert werden, können durch Phosphorylierung von HIF- α Untereinheiten deren

transkriptionelle Aktivität verstärken, tragen jedoch nicht zur entscheidenden Stabilisierung der ODD-Domäne bei (Richard, D. E. et al., 1999).

1.2.1.2 HIF- α -regulierte Gene

HIF-1 α induziert u.a. die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), eines zentralen Angiogenesefaktors. Dadurch wird über eine Erhöhung der Gefäßdichte eine Verkürzung der Diffusionsstrecke für Sauerstoff erreicht.

Die gleichzeitig erhöhte Expression von Erythropoietin steigert zusätzlich die Sauerstofftransportkapazität des Blutes. HIF-1 α induziert auch die Expression von Transferrin und seinem Rezeptor, so dass vermehrt Eisen für die Hämbiosynthese verfügbar wird. Schließlich ist, auf zellulärer Ebene, neben Energieträgern auch die Bereitstellung von Enzymen erforderlich, die in einer hypoxischen bzw. anaeroben Situation in der Lage sind, die Zelle mit Energie zu versorgen (anaerobe Glykolyse). Die Bereitstellung dieser, wie auch der notwendigen Beförderungsmittel für die erforderliche Energie (Glukose-Transporter) werden durch HIF-1 α induziert bzw. deren Gene aufreguliert. Die Induzierung von Insulin unter hypoxischen Bedingungen wird ebenfalls durch HIF-1 α induziert (Zelzer, E. et al., 1998).

HIF-1 α ist erforderlich sowohl für die Ausbildung von physiologischen Schlüssel-systemen während der Entwicklung als auch für deren Gebrauch im fetalen und postnatalen Leben (Semenza, G. L., 2000). Da hierbei auch das Überleben mesenchymaler Zellen betroffen ist, sterben knock-out-Tiere gegen Mitte der embryonalen Entwicklung. Sie weisen nach noch anfänglich normaler Vaskulogenese kardiovaskuläre Mißbildungen sowie Defekte des Neuralrohres auf (Iyer, N. V. et al., 1998) (Ryan, H. E. et al., 1998). Diese Defekte sind allerdings nicht auf fehlende VEGF-Wirkung, sondern allein auf mesenchymalen Zelltod zurückzuführen (Kotch, L. E. et al., 1999). Mäuse mit nur einem mutanten HIF-1 α Allel entwickeln sich hingegen normal, zeigen aber eine beeinträchtigte physiologische Reaktionsweise gegenüber chronischer Hypoxie (Yu, A. Y. et al., 1999). Die Ausbildung von

Polyglobulie, Rechtsherzhypertrophie, pulmonaler Hypertension und pulmonalem Remodeling ist deutlich verzögert, der Gewichtsverlust signifikant höher als bei den Wildtypmäusen (Yu, A. Y. et al., 1999).

Tab. 2 Zielgene für HIF-1; aus Wenger, H. L.: Mammalian Oxygen Sensing, Signalling and Gene Regulation. *J.Exp.Biol.*, 2000; S. 1257

Zielgene für HIF-1	Referenzen
O₂-Transport: Erythropoese -Erythropoietin -Transferrin (Eisentransport) -Transferrin-Rezeptor (Eisenaufnahme)	Firth, J. D. et al., 1994; Semenza, G. L. et al., 1994 Rolfs, A., et al., 1997 Lok, C. N. et Ponka, P., 1999; Tacchini, L. et al., 1999
O₂-Transport: Angiogenese und Gefäßtonus -VEGF -Flt-1 (VEGF-Rezeptor) -Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 -Endothelin-1 -Stickoxidsynthase (NO-Produktion) -Hämoxxygenase (CO-Produktion) -Adrenomedullin - α -1B-Adrenorezeptor	Forsythe, J. A. et al., 1996; Liu, Y. et al., 1995 Gerber, H. P. et al., 1997 Kietzmann, T. et al., 1999 Hu, J. et al., 1997 Melillo, G. et al., 1995; Palmer, L. A., 1998 Lee, P. J. et al., 1997 Nguyen, S. V. and Claycomb, W. C., 1999 Eckhart, A. D., 1997
Anaerobe Energie: Glykolyse+Glukoseaufnahme -Phosphofruktokinase L -Aldolase A -Phosphoglyceratkinase 1 -Enolase 1 -Laktatdehydrogenase A -Glukosetransporter 1	Semenza, G. L. et al., 1994 Graven, K. K. et al., 1999 Semenza, G. L. et al., 1994, 1996 Semenza, G. L. et al., 1994, 1996 Firth, J. D. et al., 1995 Ebert, B. L., 1995;
Negativ-Feedback Regulation von HIF-1: -p35srj (CBP/p300 Antagonist)	Bhattacharya, S. et al., 1999
Andere: -IGF-bindendes Protein-1 -Retrotransposon VL30	Tazuke, S. L. et al., 1998 Estes, S. D. et al., 1995

1.2.2 Wandschubspannung

Die Endothelzelle stellt das Schlüsselglied für kurzfristige wie langfristige Adaptationsvorgänge des Gefäßsystems dar. Dabei spielt die Einwirkung hämodynamischer Kräfte auf das Endothel die zentrale Rolle. Entscheidend unter den

hämodynamischen Kräften ist die Wandschubspannung, da sie zum Blutvolumenstrom, also derjenigen Größe, die vom Gefäßbett reguliert werden muß, direkt proportional verläuft. Eine Änderung der auf das Endothel einwirkenden Wandschubspannung folgen die Adaptation der Gefäßgeometrie (Durchmesser/Länge) und Gefäßtopologie (Verzweigungsstruktur des Gefäßnetzes). Dieser Angioadaptation durch bzw. an die Wandschubspannung liegen als Mechanotransduktion beschriebene Mechanismen zugrunde. Die Wandschubspannung reguliert bestimmte Faktoren innerhalb der Endothelzelle und kann Signaltransduktionskaskaden in Bewegung setzen. Dazu gehören die Proteinkinasen mitogen-activated-protein-kinase-1 (MAPK-1), extracellular-related-kinase 1 und 2 (ERK 1/2), c-Jun-NH2-terminal-kinase (JNK-2) und die Proteinkinase C (PKC) (Braddock, M. et al., 1998). Diese können daraufhin bestimmte Gene innerhalb der Endothelzelle aktivieren bzw. regulieren.

1.2.2.1 Mechanotransduktion in Endothelzellen

In der Literatur werden eine „zentralisierte“ und eine „dezentralisierte“ Form der Mechanotransduktion unterschieden. Bei der „zentralisierten“ Form übernimmt ein integrales Membranprotein die Funktion, den mechanischen Stimulus (Wandschubspannung) in ein biochemisches oder elektrophysiologisches Signal zu verwandeln. Beispiele hierfür sind die Aktivierung von Ionenkanälen (Olesen, S.P. et al., 1988), G-Proteinen (Simon, M.I. et al., 1991) und Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (Takahashi, M. et Berk, B. C., 1996). Die „dezentralisierte“ Form beschreibt einen Mechanismus der Mechanotransduktion, bei dem das Zytoskelett die Aufgabe der Signaltransmission an intrazelluläre Strukturen übernimmt. Das „Tensegrity“-Modell (Ingber, D. E., et al., 1994) veranschaulicht das Zusammenwirken von extrazellulärer Matrix und intrazellulären Strukturen durch das Zytoskelett. Extrazelluläre Adhäsionsmoleküle wie Cadherine, Selektine, Integrine und cell-adhesion-molecules (CAMs) veranlassen durch ihre Bindung die Aufrechterhaltung der Grundspannung innerhalb des Zytoskelettes, in dem unflexible und unelastische Anteile durch elastische Elemente verbunden sind. Ändert sich die Grundspannung, kommt es zur

Umstrukturierung der einzelnen Elemente. Die mit dem Zytoskelett assoziierten Strukturen wie Membranproteine, Zell-Zell-Verbindungen, Focal Adhesions und der Zellkern werden dabei aktiviert und an die Signalverarbeitung angeschlossen.

1.2.2.2 Mechanosensitive Signalkaskaden in Endothelzellen

Nach der beschriebenen Aktivierung von Mechanorezeptoren durch Wandschubspannung können verschiedene Signaltransduktionskaskaden ausgelöst werden. Als deren wichtigste Bestandteile gelten Proteinkinase C, mitogen-aktiviert-protein-kinase-1 (MAPK-1), extracellular-related-kinase-1 und 2 (ERK 1/2) und c-jun-NH₂-terminal-kinase (JNK-2) (Braddock, M. et al., 1998).

Von diesen Kinasen werden Transkriptionsfaktoren („third messengers“) aktiviert, die ihrerseits die Expression von sogenannten „immediate early response genes“ (IERG) induzieren (Ishida, T. et al., 1997). Die IERGs regulieren wiederum die Expression der „late response genes“. Dieser Schritt bildet die letzte und abschließende Antwort auf die anfangs erfolgte biomechanische Stimulation.

Zu den durch Wandschubspannung regulierten Transkriptionsfaktoren gehören „Nuklear-Faktor-Aktivator-Protein-1“ (AP-1), Nuclear-Faktor-Kappa-B (NFκB) (Lan, Q. et al., 1994) und „early growth response-1“ (egr-1) (Braddock, M. et al., 1998). Weiterhin wurde eine Ets-Familie beschrieben, deren einer Vertreter Elk-1 durch erhöhte Wandschubspannung aktiviert, während Ets-1 gehemmt wird.

Im AP-1 Komplex verbinden sich dimere fos-und jun- Proteine über einen „leucine zipper“ zu einer Einheit (Gentz, R. et. al., 1989). Hierbei gilt das Homodimer jun/jun als der wirksamste Faktor, obwohl dies theoretisch eher bei dem Dimer fos/jun aufgrund seiner höheren Affinität zur DNA zu erwarten wäre (Li, Y. S. et al., 1996). Fos/fos-Homodimere dagegen weisen keine wirksame Affinität zur DNA auf. Interessanterweise gehören die für c-fos und c-jun kodierenden Gene gleichzeitig zu den IERGs. Dieser Tatsache ist bei Aktivierung des AP-Komplexes die verstärkte

Expression seiner eigenen sowie anderer Gene zu verdanken. Dies kann als Verstärkungsfunktion der zellulären Antwort verstanden werden.

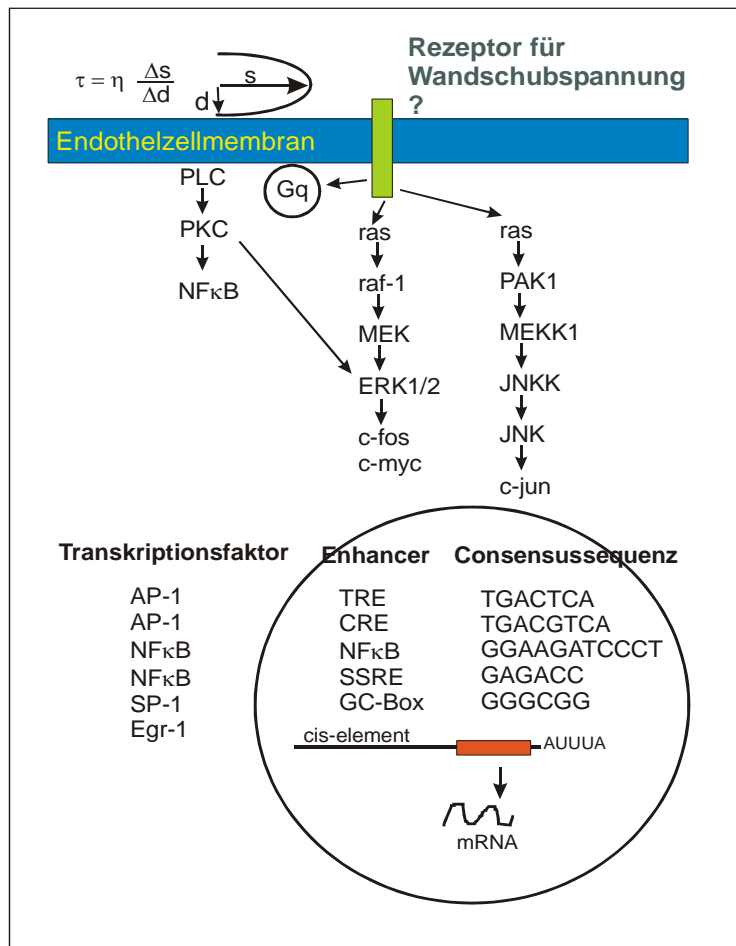


Abb. 1 Wandschubspannungsaktivierte Signalwege, die die Transkription von Genen regulieren.

NFκB befindet sich im Zytoplasma und besteht als Komplex aus den Untereinheiten p50, p65 und dem inhibitorischen Protein IκB. Unter Einwirkung der Proteinkinase C wird der Komplex von seiner inaktiven in eine aktive Form überführt. Dabei dissoziiert IκB vom Komplex ab, wodurch das Dimer p50/p65 in den Zellkern gelangen und an die entsprechende DNA-Erkennungssequenz binden kann.

NFκB ist Transkriptionsfaktor für das PDGF-B-Gen, dessen Transkriptionsrate durch laminare Strömung erhöht wird (Hsieh, H.-J. et al., 1991). Hierbei war die Sequenz

GAGACC für die Transaktivierung verantwortlich (Resnick, N. et al., 1993). Die Enhancer-Sequenz GAGACC wird daher als „shear stress response element“ (SSRE) bezeichnet.

Egr-1 („early growth response-1“) wird vermutlich durch die MAP-Kinase-1 aktiviert und bindet an drei „serum response“ Elemente (SREs). Elk-1 (Ets-Familie) induziert seine Expression und erhöht dadurch die Transkriptionsrate des PDGF-A Gens, welches in seiner Promotorregion ein „shear-stress-response element“ (SSRE) besitzt, mit dem egr-1 interagiert (Khachigian, L. M. et al., 1997); (Schwachtgen, J.-L. et al., 1998).

Zu den Ets-regulierten Genen gehören auch die endothelialen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen VEGF-R1, VEGF-R2, Tie-1, Tie-2 und VE-Cadherin. Eine Beteiligung der Ets-Familie an der Regulation der Angiogenese erscheint daher wahrscheinlich und bietet zugleich die Möglichkeit, das Gefäßwachstum an die Blutströmung zu adaptieren (Lelièvre, E. et al., 2001). Ein Zusammenhang der Ets-Familie mit der Angiogenese im Kükenembryo wurde bereits beschrieben (Vandenbunder, B. et al., 1989). Weiterhin ist das c-ets 1 Proto-Onkogen ein Transkriptionsfaktor, der in Endothelzellen während Tumervaskularisation und anderen Formen der Angiogenese beim Menschen exprimiert wird (Wernert, N. et al., 1992).

1.2.2.3 Wandschubspannungsregulierte Gene

Obgleich die Möglichkeit der wandschubspannungsinduzierten Mechanotransduktion in Endothelzellen generell gezeigt ist, ist in den meisten Fällen unklar, auf welchem Wege die Expression welchen Gens durch Wandschubspannung reguliert wird. Die folgende Tabelle (Tab. 2) faßt alle Gene zusammen, deren Expression in Endothelzellen nach derzeitigem Kenntnisstand durch Wandschubspannung reguliert werden kann.

Tab. 3 Endotheliale Gene, deren Expression durch Wandschubspannung reguliert wird. Die Expressionscharakteristik wird unterschieden in vorübergehend (≤ 24 h) induziert, langfristig (≥ 24 h) induziert, oder langfristig supprimiert. (Gen: Funktion [Referenz])

vorübergehend induziert	langfristig induziert	langfristig supprimiert
c-fos, c-myc, c-jun, egr-1: Regulation der Genexpression (Hsieh, H. -J. et al., 1993)	Gas-3: Regulation des Zellzyklus (Zakrzewicz, A. et al., 2001) (Bongrazio, M. et al., 2000))	Angiopoietin-2: Angiogeneseinhibitor, endogener Tie-2-Antagonist (Zakrzewicz, A. et al., 2001) (Bongrazio, M. et al., 2000))
PDGF-A,-B: Zellwachstum und -migration (Hsieh, H. - J. et al., 1991)	TGF-β: Zellwachstum, -differenzierung, Matrixbildung (Ohno, M. et al., 1995)	Endothelin-1: Vasokonstriktion. (Malek, A. et Izumo, S., 1992)
Endothelin-1: Vasokonstriktion (Morawietz, H. et al., 2000)	Smad 6,7: Modulation von TGF- β -Effekten (Topper, J. N. et al., 1997)	VCAM-1: Endothel-Leukozyten Adhäsion (Ohtsuka, A. et al., 1993)
MCP-1: Chemotaxis von Monozyten (Shyy, Y. J. et al., 1994)	NOS-3: Stickoxid (NO)-Synthese im Endothel (Topper, J. N. et al., 1996)	ICAM-1: Endothel-Leukozyten Adhäsion (Nagel, T. et al., 1994)
COX-1: Vasodilatation, Antikoagulation (Okahara, K. et al., 1996)	bFGF: Regulation der Proteinsynthese von Fibroblasten (Malek, A. et al., 1993a)	Endothelin-1: Vasokonstriktion (Morawietz, H. et al., 2000)
COX-2: Prostazyklin-Synthese im Endothel, Vasodilatation (Okahara, K. et al., 1996)	CNP: Vasodilatation und Diurese (Chun, T. H. et al., 1997)	Thrombomodulin: antithrombogen (Malek, A. M. et al., 1994)
HSP 70: Hitzeschockprotein (Honda, H. M. et al., 1992)	tPA: Aktivierung von Plasminogen, Fibrinolyse (Diamond, S. L. et al., 1990)	ACE: Synthese von Angiotensin II (Rieder, M. J. et al., 1997)
Mn-SOD: Antioxidans (Topper, J. N. et al., 1996)	METH-1: Inhibitor der Angiogenese (Bongrazio, M. et al., 2000)	TSP-1: Inhibitor der Angiogenese und der Lumenbildung (Freyberg, M.-A. et al., 2000)
Gewebefaktor (TF): Initiator der Hämostase (Lin, M. C. et al., 1997)	Bcl-XL, Bcl-2, FasExo6Del: antiapoptotische Faktoren (Bartling, B. et al. 2000)	NADH Dehydrogenase: Komponente der Atmungskette (Zakrzewicz, A. et al., 2001)
Thrombomodulin: antithrombogen (Malek, A. M. et al., 1994)	Bax, Bak: proapoptotische Faktoren (Bartling, B. et al. 2000)	tfcD: Faltung von β -Tubulin (Schubert, A. et al., 2000)
	Properdin: Stabilisierung der C3-Konvertase des alternativen Reaktionsweges des Komplementsystems (Bongrazio, M. et al., 2003)	9/B (DEPP): Funktion noch unbekannt (Bongrazio, M. et al., 2000))
	P11- calpactin: Regulation der Exozytose (Bongrazio, M. et al., 2000)	

1.3 Regulation typischer angioadaptiver Prozesse durch Sauerstoffpartialdruck und Wandschubspannung

Das Zusammenspiel von Sauerstoffpartialdruck und Wandschubspannung als Triggermechanismen der Angioadaptation lässt sich an typischen angioadaptativen Situationen darstellen (Zakrzewicz, A. et al., 2002).

1.3.1 Kapillarsprossung

Betrachten wir die Antwort eines existierenden Gefäßes auf einen benachbarten Gewebsbezirk mit unzureichender Gefäßversorgung. Die resultierende Hypoxie induziert die Expression von VEGF und Angiopoietin-2. Die Reaktion auf das vom hypoxischen Areal zum versorgenden Gefäß diffundierende VEGF besteht in der Ausbildung von Kapillarsprossen in Richtung der hypoxischen Region.

In einer Sprosse, die noch keine Verbindung zu einem präexistierenden Gefäß hat, ist die Wandschubspannung zu vernachlässigen. Unter diesen Bedingungen ist Tie-2 wahrscheinlich blockiert, was zur Auflockerung der Gefäßwand führt und den Endothelzellen erlaubt, intensiv auf VEGF zu reagieren. Gas-3, das den Zellzyklus zum Stillstand bringen kann und Angiogeneseinhibitor METH-1 sind supprimiert. Dadurch sind optimale Bedingungen für endotheliale Proliferation und Sprossung gegeben. Sprossen, die Anschluss an andere Gefäße finden, werden durch die Aktivierung von Tie-2 stabilisiert. Wenn das zuvor hypoxische Gewebe wieder oxygeniert ist, werden diejenigen Gefäße, die nicht an der Schaffung einer neuen Gefäßverbindung beteiligt waren und nun überflüssig sind, durch Pruning eliminiert. Auf diese Weise können die kombinierten Wirkungen der angioadaptiven Antworten auf P_{O_2} und (Blut-)Strömung in eine funktionell angepasste Gefäßversorgung der ehemals hypoxischen Region münden.

1.3.2 Kollateralisierung

Als weiterer Fall kommt eine Situation in Betracht, bei der eine kleine, ein bestimmtes Gewebsareal versorgende Arterie, verschlossen ist. Häufig können mikrovaskuläre Verbindungen zu einer anderen Arterie einen alternativen Weg für den Blutstrom zu diesem Gewebe darstellen, obwohl dieser Weg für eine ausreichende Versorgung erst einmal zu eng sein dürfte. Blutstrom und Wandschubspannung sind in diesem Verbindungsstück stark erhöht, da es in eine Niedrig-Druck-Region mündet. Ergebnisse aus *in vitro* Untersuchungen weisen darauf hin, daß Tie-2 in dieser Situation deutlich induziert wird, wodurch die Gefäßwand verstärkt werden dürfte.

In diesem Vorgang werden zusätzlich unter dem Einfluß von PDGF, welches ebenfalls durch Wandschubspannung aufreguliert wird, glatte Muskelzellen in die wachsende Gefäßwand rekrutiert. Die Aktivierung von Bcl-2 hat eine zusätzliche antiapoptotische Wirkung. Die erhöhte Produktion des antiangiogenetischen Faktors METH-1 unterdrückt die lokale Bildung von kapillären Sprossen. Das entscheidende Kriterium der Kollateralisierung besteht darin, daß eine drastische Zunahme der Wandschubspannung als Triggermechanismus für vaskuläres Wachstum offenbar sogar in gut oxygenierter Umgebung dienen kann.

Beispiele für Angioadaptation

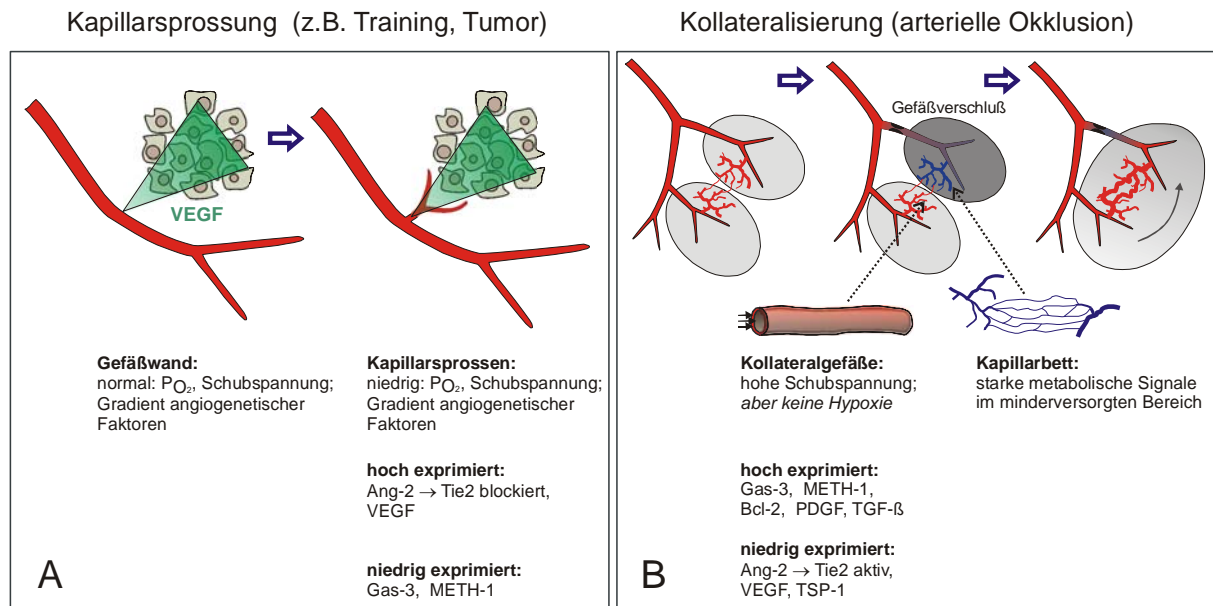


Abb. 2 Gefäßwachstum durch Sprossung (linkes Bild) wird durch Hypoxie induziert und erfolgt bei niedriger Wandschubspannung in den noch blind endenden Gefäßsprossen. Kollateralenbildung (rechtes Bild) wird durch erhöhte Wandschubspannung induziert und erfolgt in einem normoxischen Gebiet. Wandschubspannungsregulierte Expressionsmuster angioadaptiver Gene sind in der Abbildung so angegeben, wie sie aus *in vitro* Experimenten zu erwarten sind (Zakrzewicz, A. et al., 2002).

1.4 Thrombospondin-1 (TSP-1)

Thrombospondine sind extrazelluläre Proteine, die für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation eine wichtige Rolle spielen. Ihre Funktionen entfalten sie auf der Zelloberfläche, wo sie sich zu verschiedenen Multiproteinkomplexen mit speziellen Regulationsregionen zusammenlagern.

Thrombospondin-1 (TSP-1) wurde 1971 identifiziert (Baenziger, N. L. et al., 1971). Der Name „Thrombospondin“ kennzeichnet den Mechanismus seiner Freisetzung aus Thrombozyten nach Thrombin-Stimulation. Die für TSP-1 kodierende cDNA wurde auf Chromsom 2, im Bereich der Bande F lokalisiert und 1986 kloniert (Lawler, J.; Hynes, R. O., 1986).

1.4.1 Molekülstruktur, Vorkommen und Funktion

TSP-1 ist ein homotrimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 420 kDa. Seine drei Untereinheiten bestehen jeweils aus 1151 Aminosäureresten, die postranslational durch N-Glykosylierung und β -Hydroxylierung von Asparaginresten modifiziert werden und unterschiedliche strukturelle Domänen aufweisen (Abb. 3).

Jede Untereinheit besitzt je eine globuläre Domäne am Aminotermius und am Karboxyterminus. Vom Aminotermius ausgehend schließt sich eine Region mit „Prokollagenhomologie“ an, gefolgt von einem Abschnitt bestehend aus drei Type-1-Repeats (Properdin-artig), drei Type-2-Repeats (EGF-artig) und 7 Type-3-Repeats. Aufgrund der „Type-1-Repeats“ wird das Molekül zur Thrombospondin Repeat-1 Supergene Family (TSR) gerechnet, zu der auch Properdin (Regulator des alternativen Weges des Komplementsystems), UNC-5 (netrin-Rezeptor), F-Spondin (Kapselprotein von *Plasmodium falciparum*) und Metallospandine gehören.

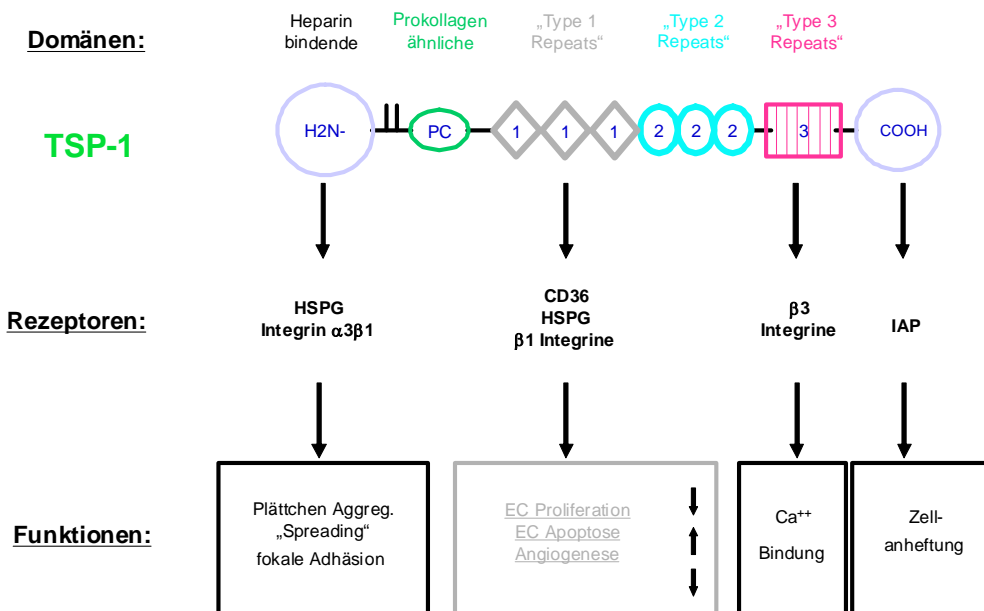


Abb. 3 Thrombospondin-1: Domänen, ihre wichtigsten Rezeptoren sowie die zugeordneten Funktionen.

TSP-1 bildet einen großen Bestandteil der Thrombozyten und wird nach Stimulation mit Thrombin aus diesen freigesetzt, wonach es kalziumabhängig an deren Oberfläche haftet, um mit verschiedensten Molekülen, insbesondere Integrinen, zu interagieren. Es findet sich aber auch in Knochen, Brustdrüse, Endometrium, Ovar und wird von vielen Zelltypen wie glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Gliazellen, Entzündungszellen und Endothelzellen sezerniert.

Die große Bedeutung von TSP-1 zeigt sich in der Vielzahl seiner Funktionen. Eine besondere Bedeutung kommt TSP-1 bei der Aktivierung von TGF- β , bei der Angiogenese und beim Tumorwachstum zu. Es stellt für viele Arten von Zellen, z. B. glatte Muskelzellen, neutrophile Granulozyten, Monozyten, Fibroblasten, Mesangiumzellen, sowie unterschiedlichen Tumorzellen ein hochwirksames Chemotaxin und Zelladhäsionsmolekül dar und spielt für die Zellbewegung und Zellproliferation (auch Neuritenwachstum) auch im Rahmen der Angiogenese eine wichtige Rolle.

TSP-1 gehört zu den „immediate early response“ Genen und ist assoziiert mit der Wundheilung, die höchste Expression erreicht es einen Tag nach der Verletzung. Bei chronischen entzündlichen Gefäßprozessen scheint TSP-1 ebenfalls eine Schlüsselrolle einzunehmen. Seine Expression ist in verletzten und kranken Gefäßen (Pathogenese von Atherosklerose und Restenose) deutlich höher als in normalen bzw. gesunden (Lymn, J.S. et al., 1999). Die Verdickung der Neointima wird gefördert; der Glatte-Gefäßmuskel-Proliferations-Index unter TSP-1 auf Seiten der Verletzung erhöht (Chen, D. et al., 1999).

Inkorporiert in Fibrin dient TSP-1 Thrombin und Faktor XIIIa als Substrat, wodurch eine „irreversible Thrombozyten-Aggregation“ durch Stabilisierung der Fibrinbrücken entsteht. Allerdings kann TSP-1 sich auch an der Auflösung von Fibringerinseln, durch Bindung an Plasminogen, Urokinase und Histidin-reichem Glykoprotein, beteiligen. Im Rahmen von entzündlichen Antworten bildet es molekulare Brücken zwischen Thrombozyten und Leukozyten.

Die Expression von TSP-1 wird gefördert durch Hitzeschock und Hypoxie, durch die

Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- β und bFGF sowie durch das p53 Tumor Suppressor Genprodukt (Dameron, K. M. et al., 1994) und Progesteron (Iruela-Arispe, M. L., 1996). Die Transkription wird hingegen vermindert durch IL-1 β , TNF-alpha und Zellen, die transformiert sind mit den Genen c-fos, c-jun und v-src (Mettouchi, A. et al., 1994).

Der Abbau von TSP-1 kann sowohl extrazellulär, als auch, zum überwiegenden Teil, intrazellulär, nach Endozytose und lysosomaler Verdauung, erfolgen. An der Vermittlung dieser Reaktion ist das LDL-Rezeptor-verwandte Protein beteiligt (Adams, J. C. et al., 1995).

1.4.2 TSP-1 Domänen und ihnen zuzuordnende Funktionen

Mit den strukturell unterscheidbaren Domänen des TSP-1-Moleküls sind entsprechend unterschiedliche und vielgestaltige Funktionsbereiche verbunden, die von dem Molekül über unterschiedliche Rezeptoren vermittelt werden (Abb. 3).

Der Aminoterminus wird auch als heparin-bindende Domäne bezeichnet und vermittelt Funktionen wie Zellanhaftung, -sprossung und -migration wie auch die Unterbrechung von Zellkontakten. Weiterhin obliegt ihm die Modulation der Proliferation, die Endozytose von TSP-1 sowie die Plättchenaggregation. Als Rezeptoren für diese Funktionen kommen Syndekan-1, $\alpha_3\beta_1$ -Integrine, Heparan-sulfat-proteo-glykane (HSPG), Sulfatide und das LDL-Rezeptor-verwandte Protein in Betracht.

Die Domäne mit „Homologie mit Prokollagen“ entfaltet angiainhibitorische Funktionen, die über bFGF vermittelt werden, wahrscheinlich durch die Hemmung der Kollagensynthese, die für die Angiogenese benötigt wird. Eine Beteiligung des CD36-Rezeptors wird vermutet. Mit der Type-1-Repeats-Domäne sind insbesondere die Funktionen Antiangiogenese, Antiproliferation, Induktion von Apoptose, TGF- β -Aktivierung, als auch Protein- und Heparin-Bindung sowie Zellkontakt und Neuritenwachstum verbunden. Es kommt zur Hemmung von Matrix-Metalloproteinasen

(MMP). Als Rezeptoren für diese Aufgaben stehen CD36, HSPG, β_1 -Integrine, Sulfatide und ein 60kDa-Protein zur Verfügung.

Die Type-2-Repeats-Domäne hat eher einen strukturell erhaltenden Charakter. Sie macht das Molekül relativ resistent gegenüber Proteolyse. Durch sie können unterschiedliche Bindungsinteraktionen mit anderen Molekülen vermittelt werden. Außerdem gibt es hier zusätzliche Möglichkeiten, Kalziumionen zu binden.

Die Aufgabe der Type-3-Repeats-Domäne besteht hauptsächlich in ihrer Fähigkeit, Kalziumionen zu binden. Als Rezeptoren für diese Domäne sind β -Integrine identifiziert worden. Die Kalzium-Bindung spielt letztlich für viele der Aktivitäten des Thrombospondinmoleküls, insbesondere bei der Zelladhäsion, bei der unterschiedliche Domänen zusammenwirken können, eine wesentliche Rolle.

Die Interaktionen des Karboxyterminus schließlich werden über den Rezeptor CD47 bzw. IAP (integrin-assoziiertes Protein) und ein 105/80 kDa-Protein vermittelt. Neben der Unterstützung zelladhäsiver Funktionen in Bezug auf unterschiedlichste Zelltypen stehen hier insbesondere zellstimulierende und chemotaktische Effekte sowie Plättchenaggregation im Vordergrund. So können insbesondere die (wenigen) proangiogenen Wirkungen auf diese Domäne zurückgeführt werden. Allerdings wurden in Verbindung mit Integrinen auch proapoptotische Wirkungen an HUVEC beobachtet.

Die Multiprotein-Komplexe, an deren Bildung TSP-1 beteiligt ist, enthalten Membranproteine, die sich unter anderem aus Integrinen, dem integrin-assoziierten Protein (bekannt als IAP oder CD 47), CD 36 und Proteoglykanen zusammensetzen. Diese Komplexe können dann ihrerseits regulierend in das Geschehen der Zelladhäsion, Signaltransduktion sowie der Transkription eingreifen. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Komplexe und in Abhängigkeit von der individuellen Rezeptorausstattung einer jeden Zelle können auch die Zellantworten sehr unterschiedlich ausfallen.

Die typische Reaktionsweise in Bezug auf Zell-Matrix-Interaktionen teilt TSP-1 mit TSP-2 und anderen, ihm nicht homologen Proteinen. Für diese Gruppe, zu denen auch SPARC, Tenascin C und Osteopontin gehören, wurde der Begriff „matrizelluläre Proteine“ gewählt. Charakteristisch für diese Gruppe ist ihre vermehrte Expression insbesondere während der Entwicklung, des Wachstums und als Antwort auf Verletzungen. Beim normalen Erwachsenen treten sie dagegen verhältnismäßig selten auf. Ausnahmen bilden Gewebe mit einem kontinuierlichen Turnover, wie z.B. der Knochen (Bornstein, P., 2001).

Dass TSP-1 als Adhäsionssubstrat fungiert, wurde für eine Reihe von Tumorzellen und Zelllinien dokumentiert (Murphy-Ullrich, J. E., 1989). Allerdings verhält es sich, zugefügt zu adhäsiven Proteinen wie Fibronectin auch anti-adhäsiv (Sage, E. H.; Bornstein, P., 1991). Fokale Adhäsionen von aortalen Endothelzellen sowie von auf Fibronectin angeordneten Fibroblasten wurden reduziert. Diese Fähigkeit ist auf die NH₂-terminale globuläre Domäne des Thrombospondinmoleküls zurückzuführen (Murphy-Ullrich, J. E. et al., 1993).

1.4.3 TGF β -vermittelte Effekte von TSP-1

Obwohl Thrombospondin-1 und 2 während der Entwicklung von Vertebraten stark exprimiert werden, weisen Mäuse, die homozygot für die Nullmutation in diesen Proteinen sind, keinerlei Entwicklungsdefizite auf. In TSP-1 defizienten Mäusen ist jedoch sowohl die Anzahl von Gefäßen pro Areal als auch die durchschnittliche Gefäßgröße reduziert. Dies weist auf eine pro-angiogene Wirkung von TSP-1 hin. Darüber hinaus zeigen TSP-1-defiziente Mäuse während der ersten 4-10 Lebenswochen Flecken von akuter und organisierender Pneumonie in den Lungen (Lawler, J. et al., 1998), außerdem leichtere entzündliche Veränderungen im Pankreas (Crawford, S. E. et al., 1998). Auffallend ist die Tatsache, dass die Defekte der TSP-1-defizienten Mäuse denen der TGF- β defizienten Mäuse gleichen (Crawford, S. E. et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, daß die gemeinsame Ursache in der fehlenden Funktion von TGF- β bestand, die Rekrutierung von Ent-

zündungszellen in die Lunge zu unterdrücken, so dass es zu einer übersteigerten Immunantwort gegenüber ortsansässigen Bakterien kam. Die Behandlung der TSP-1 defizienten Mäuse mit einem KRFK-Peptid, einer spezifischen Domäne für TGF- β innerhalb des TSP-1 Moleküls, führte zu einer deutlichen Verbesserung der Lungenpathologie. Zusätzlich wurden Wild-Typ Mäuse mit einem synthetischen LSKL-Peptid, einem Inhibitor von TSP-1 behandelt. Auch hier zeigte sich eine epitheliale Hyperplasie, ähnlich der Situation bei den TSP-1-defizienten Mäusen. Diese Beobachtungen ließen den Schluss zu, dass eine der Funktionen von TSP-1 darin besteht, TGF- β in der normalen Lunge zu aktivieren.

TSP-1 aktiviert auch TGF- β , das rekrutierte Alveolarmakrophagen der Ratte als Antwort auf eine Bleomycin-induzierte Verletzung produzieren (Yehualaeshet, T. et al., 1999). Doppelimmunofluoreszenzstudien zufolge sind TSP-1 und TGF- β dabei als Komplex über CD 36 an die Makrophagenmembran gebunden. Anti-CD 36-Antikörper blockieren diese Bindung und hemmen die Aktivierung von TGF- β .

Im Gegensatz zu Makrophagen und Epithel kann TSP-1 in Thrombozyten aus bislang noch ungeklärten Gründen thrombozytäres TGF- β nur unzureichend aktivieren. Möglicherweise aufgrund einer posttranslationalen Modifikation der TSRs. Die Verhinderung einer selbstinduzierten Aktivierung erscheint jedoch sinnvoll, da beide Proteine in den Thrombozyten gespeichert werden.

Schließlich können eine Reihe von Ähnlichkeiten bzgl. der biologischen Funktionen von TSP-1 und TGF- β beschrieben werden (Tuszynski, P. et Nicosia, R. F., 1996):

- Inhibition der endothelialen Zellproliferation *in vitro* (Bagavandoss, P. et Wilks, J. W., 1990)
- Stimulation der Angiogenese *in vivo* durch Rekrutierung von Entzündungszellen (Mansfield, P. J. et Suchard, S. J., 1994)
- Unterstützende Wirkung auf kapilläre Röhrenbildung und deren Stabilisierung (Qian, X. et et al., 1994), (Sheibani, N. et Frazier, W. A., 1995)

- Stimulierende Wirkung auf Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen (Phan, S. H. et al., 1989), (Majack, R. A. et al., 1988)
- Aufregulation von uPA und PAI-1 in Krebszellen und Aufregulation von PAI-1 in Endothelzellen (Albo, D. et al., 1994), (Arnoletti, J. P. et al., 1995)

Diese Arbeiten legen in ihrer Summe den Schluss nahe, dass pro-angiogene Wirkungen dann durch TSP-1 verursacht werden können, wenn es zur Aktivierung von TGF- β benötigt wird. Insgesamt sind die proangiogenen Wirkungen von TSP-1 noch nicht gut zu erklären, unterschiedliche Mechanismen bzw. Effektorwege und Rezeptoren sind bislang beschrieben worden.

1.4.4 Proangiogene Effekte von TSP-1

Wichtig ist in erster Linie die Tatsache, dass über die carboxy-terminale bzw. „zellbindende“ Domäne von TSP-1 durch die Bindung an CD 47/IAP (= integrin assoziiertes Protein) für die Angiogenese wichtige Funktionen vermittelt werden können. Neben zelladhäsiven kommt es zu zellstimulierenden, proliferativen und chemotaktischen, d.h. migratorischen Effekten (Wang, X. Q. et Frazier, W. A., 1998); (Nesselroth, S.M. et al., 2001); (Morandi, V. et al., 1993). Insbesondere glatte Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen werden über verschiedene Mechanismen durch TSP-1 zur verstärkten Migration angeregt. Hierbei spielt die Bindung an $\alpha_2\beta_1$ -Integrine besonders für glatte Muskelzellen eine wichtige Rolle (Wang, X.Q. et al., 1999). Durch Zugabe von löslichem Kollagen-1 konnte ihre migratorische Antwort noch verstärkt werden (Wang, X. Q. et Frazier, W. A., 1998). Durch die Bindung des 4NIK-Peptids, einer Signalsequenz von TSP-1 im Bereich der carboxyterminalen Domäne, an einen „Signalkomplex“ aus CD 47, β_3 -Integrinen und G-Proteinen, kann das Aussprossen, vornehmlich von Endothelzellen, herbeigeführt werden (Frazier, W. A. et al., 1999). Darüber hinaus kann TSP-1 über ERK (= extracellular signal-related protein kinases) 1/2, Bestandteil des Signalwegs der MAPK (= mitogen activated protein kinase), die Aktivierung und Chemotaxis von glatten Muskelzellen induzieren (Gahtan, V. et al., 1999). Ähnliche Wirkungen kann TSP-1 über die

Induzierung der PI3-K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) und FAK (focal adhesion kinase) in glatten Gefäßmuskelzellen hervorrufen. Verhindert werden kann diese Induktion durch Antikörper gegen CD47, Transfektion mit einer dominant negativen Form von Ras und mit Inhibitoren von p38MAPK und ERK1/2 (Gahtan, V. et al., 1999); (Willis, A. L. et al., 1999). Die Aktivierung dieser Signalwege ist geeignet, um proangiogene Wirkungen von TSP-1 im Rahmen der Interaktion mit CD47 zu vermitteln (Wang, X.Q.; Frazier, W.A., 1998). Neben der Migration kann auch die Proliferation dieser Zellen durch TSP-1 in einem Ausmaß induziert werden, wie es sonst nur unter PDGF beobachtet wurde (Lymn, J. S. et al., 1999); (Gahtan, V. et al., 1999).

Auch für den Aminoterminus von TSP-1 sind proangiogene Wirkungen beschrieben worden. Im Kornea-Modell (Ratte) förderte TSP-1 die Angiogenese (Sargiannidou, I. et al., 2001). Chemotaxis und Aussprossung von Endothelzellen in Lungenkapillaren und Kälberaorta konnten im Zusammenhang mit dieser Domäne nachgewiesen werden (Taraboletti, G. et al., 1990).

Es konnte auch gezeigt werden, dass TSP-1 in der Lage ist, über die Regulation der extrazellulären Proteasen, wie z. B. der Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9), die Angiogenese zu modulieren. Dabei kam es nach Invasion von Kälberendothelien in ein Gel zu einer Röhrenbildung (Qian, X. et al., 1997).

Ein weiteres Beispiel für die proangiogene Wirkung von TSP-1 ist seine immunhistochemisch darstellbare Aufregulation in neu geformten Mikrogefäßen heilender Wunden (Raugi, G. J. et al., 1987). Proliferierende Endothelzellen produzierten dabei mehr TSP-1 als ruhende (Canfield, A. E. et al., 1990).

Der Schritt der „kapillären Röhrenbildung“ kann nachweislich durch TSP-1 gefördert werden (Qian, X. et al., 1994). Während virus-transformierte Endothelzellen, die unfähig waren, Mikrogefäße zu bilden, wenig oder keine TSP-1 mRNA exprimierten, zeigte sich in normalen mikrovaskulären Endothelzellen hohe TSP-1-Expression (RayChaudhury, A. et al., 1994). Die virus-transformierten Endothelzellen konnten in

der Folge nur nach Transfektion mit dem TSP-1-Gen und folgender TSP-1-Expression zur Bildung von Mikrogefäßen veranlasst werden (Sheibani, N. et Frazier, W. A., 1995).

Auch unter serum-freien Bedingungen im Ratten-Aorten-Modell war TSP-1 eindeutig an der Angiogenese beteiligt. Ein TSP-1-Antikörper verhindert diese (Nicosia, R. F. et Tuszynski, G. P., 1994). Im Hasen-Kornea-Modell verfünffachte hochkonzentriertes TSP-1 den angiogenen Effekt von bFGF (BenEzra, D. et al., 1993).

Für die indirekte Modulation/Aktivierung der Angiogenese sprechen ferner Versuche an der explantierten Rattenaorta. Hierbei ist TSP-1 indirekt angiogenetisch wirksam, indem es das Wachstum von Myofibroblasten fördert, die ihrerseits heparin-bindende angiogene Faktoren produzieren, woraufhin sich Mikrogefäße bilden. Eine direkte, TSP-1 abhängige Angiogenese an isolierten Endothelzellen konnte hierbei nicht nachgewiesen werden (Nicosia, R. F. et Tuszynski, G. P., 1994).

Das Stroma reich vaskularisierter Neoplasmen zeigte hohe Konzentrationen an TSP-1. Dessen indirekte Mitwirkung an der Tumorangiogenese über wachstumsfördernde Wirkungen auf Myofibroblasten des Tumorstromas konnte auch in diesem Fall gezeigt werden (Tuszynski, G. P. et Nicosia, R. F., 1994). Dies ist in Übereinstimmung mit dem Befund, dass Tumormetastasen in Mäusen durch TSP-1 gefördert, während sie durch anti-TSP-1-Antikörper gehemmt werden (Tuszynski, G. P. et Nicosia, R. F., 1996).

Aktivierete Makrophagen, die die Angiogenese *in vivo* stimulieren, regulieren die TSP-1-Produktion gegenüber unstimulierten, die nicht angiogen sind, um das 6-fache auf (DiPietro, L. A. et Polverini, P. J., 1993).

1.4.5 Antiangiogene Effekte von TSP-1

Eine sehr viel größere Anzahl von Publikationen ordnet TSP-1 jedoch als einen Angiogenese-Inhibitor ein.

TSP-1 wurde als erstes, natürlich vorkommendes Angiogenese-Inhibitor-Protein sowohl *in vitro* als auch *in vivo* identifiziert (Good, D. J. et al., 1990). Die Inhibition der Angiogenese durch TSP-1 erfolgt i. W. durch Hemmung der endothelialen Zellmigration und –proliferation sowie durch Induktion der Apoptose (Jimenez, B. et al., 2000).

Entscheidend für die angiainhibitorischen Wirkungen zeigten sich die Type-1-Repeats innerhalb des TSP-1-Moleküls (Tolsma, S. S. et al., 1993). Es kommen jedoch auch die „Prokollagen-Region“ sowie in bestimmter Konstellation die carboxyterminale Region für diese Funktion in Frage (Adams, J. C. et al., 1995).

Innerhalb der Typ-1-Repeats von TSP-1 wurden von Tolsma et al. (Tolsma, S. S. et al., 1993) mit blockierenden Peptiden drei einander benachbarte Sequenzen innerhalb des zweiten Repeat als für die Inhibition der Angiogenese notwendig identifiziert.

Für die Sequenz CSVTCG konnte der Multiligand-Rezeptor CD36 als Rezeptor identifiziert werden (Greenwalt, D. E. et al., 1992). Nach Bindung von TSP-1 an endotheliales CD36 kommt es über die Aktivierung der Caspase-3 zur Einleitung der Apoptose. Diese Funktion von CD36 konnte *in vitro* wie *in vivo* bestätigt werden (Jimenez, B. et al., 2000). Der Caspase-3-Inhibitor z-DEVD-FMK konnte die Induktion der Apoptose durch TSP-1 *in vitro* und *in vivo* durch TSP-1 induzierte antiangiogene Effekte hemmen (Nor, J. E. et al., 2000). Eine Verhinderung der angiainhibitorischen Funktion von TSP-1 wurde weiterhin durch ein Fehlen der Kinasen fyn, lyn und yes aus der Src-Familie bewirkt, die in Endothelzellen sowie Thrombozyten mit CD36 kopräzipitieren (Shattil, S. J., 1991).

Darüber hinaus werden durch TSP-1 die stimulatorischen Effekte pro-angiogener Faktoren wie bFGF und VEGF auf Endothelzell-Chemotaxis und -proliferation unterbunden (Dawson, D. W. et al., 1997). Eine durch FGF-2 oder VEGF induzierte Angiogenese in der Chorioallantoismembran des Kükens konnte durch MAL-II, ein Peptid, das die Sequenz CSVTCG enthält, aufgehalten werden (Iruela-Arispe, M. L. et al., 1999). Auch konnte TSP-1 in der Kornea einer Wildtyp-Maus, die mit einem FGF-2 imprägnierten Pellet bestückt war, Angiogenese unterbinden. Bei CD36-defizienten Mäusen hingegen gelang dies nicht (Jimenez, B. et al., 2000).

Die RFK- und WSHWSPW-Sequenz sind der CSVCTG-Sequenz benachbart. Diese inhibieren zwar eine durch FGF-2, nicht jedoch durch VEGF induzierte Angiogenese. Selbst wenn die RFK-Sequenz mutiert wurde, die für die Aktivierung von TGF- β von Bedeutung ist, blieb das Peptid weiterhin aktiv, was nahelegt, dass für die Leistung der Angiogenese-Inhibition TGF- β keine entscheidende Rolle spielte.

Die dritte Sequenz mit angioinhibitorischer Funktion, GVITRIR, befindet sich auch in unmittelbarer Nähe zur CSVTCG-Sequenz. Sie hemmt die endotheliale Zellmigration, wenn die Synthese des Peptids mit D-Isoleuzin erfolgt (Dawson, D. W. et al., 1999).

Ebenfalls an antiangiogenen Wirkungen beteiligt ist die „Region der Homologie mit Prokollagen“, die zweite Domäne innerhalb des TSP-1 Moleküls. Eine durch bFGF induzierte Angiogenese kann hierbei über die Inhibition der Kollagensynthese, die für die Angiogenese benötigt wird, unterbunden werden. Allerdings ist auch eine Mitwirkung von CD 36 möglich (Adams, J. C. et al., 1995).

Iruela-Arispe et al. stellten *in vitro* einen deutlichen Zusammenhang zwischen sinkender TSP-1-Expression in aortalen Kälber-Endothelzellen und deren steigender Fähigkeit, spontan Stränge, Quasi-Vorläufer von „tubes“ zu bilden, fest. TSP-1-Antikörper verstärkten diese Eigenschaft der Zellen (Iruela-Arispe, M. L. et al., 1991). Die Bildung eines Lumens blieb auch hierbei aus. Auch die Anwesenheit von Kollagen (insbesondere Kollagen Typ 1), das in der Lage ist, „spontane Angiogenese“

von Endothelzellen *in vitro* zu fördern, könnte in dieser Versuchsanordnung eine Rolle spielen (Vernon, R. B. et al., 1995). Daher könnte hier auch die „Prokollagen-Region“ von TSP-1, die, wenn sie aktiv ist, die Synthese des Kollagens hemmt, von Bedeutung sein. Tatsächlich wurde durch Zugabe von Kollagen wie durch die Inhibition des TSP-1-Moleküls Angiogenese induziert. Alle diese Befunde zeigen also, dass TSP-1 ein Angiogeneseinhibitor ist bzw. als ein solcher fungieren kann.

Ein Hauptmechanismus der Hemmung der Angiogenese durch TSP-1 könnte die Apoptoseinduktion sein. Unter TSP-1 kam es zur Induktion der Apoptose in Klonen einer chronischen B-Zell Leukämie (Mateo, V. et al., 1999). Diese Fähigkeit von TSP-1 ließ sich weder durch Antikörper gegen CD47, noch von einem Caspase-Inhibitor blockieren (Zitat auch in Diskussion).

Auch verhinderten verschiedene Arten von Tumorzellen mit einer Überexpression von TSP-1 Angiogenese und Tumorwachstum, wenn sie in Mäuse implantiert wurden (Streit, M. et al., 1999). Die auffälligste Dezipierung der Gefäßzahlen ließ sich bei größeren Blutgefäßen verzeichnen (Streit, M. et al., 1999). Die Transfektion von TSP-1 (und TSP-2) in Zellen des humanen Epidermoidkarzinoms A 431 führte zum Verlust der Fähigkeit dieser Zellen, Tumoren zu bilden (Streit, M. et al., 1999).

1.4.6 Kontextabhängigkeit der TSP-1 Wirkung

Diese referierten Darstellungen belegen die Fülle an Reaktionsmöglichkeiten des TSP-1-Moleküls sowohl hinsichtlich anti- als auch pro-angiogener Wirkungen. Parameter, die darüber Aufschluß geben können, in welche Richtung, Pro-oder Anti-Angiogenese, sich eine Entwicklung vollzieht, sind neben einer (gewissen) Spezifität der einzelnen Domänen, von Sargiannidou, I. et al. (2001) beschrieben worden:

- 1) Niedrige Konzentrationen von exogenem TSP-1 (1-10 µg/ml) stimulierten *in vitro* die Angiogenese; Endothelzellen aus Kälberaorta formten dabei mikrogefäßartige Röhren in Kollagengelen. Höhere Konzentrationen (>15 µg/ml) hemmten diese (Qian, X. et al., 1997). Andere Autoren kamen

jedoch mit anderen Assays zu der gegensätzlichen Aussage, hier waren hohe Konzentrationen angiogen und niedrige antiangiogen (Nicosia, R. F. et Tuszynski, G. P. , 1994)(Taraboletti, G. et al., 1990).

- 2) Bei gleichzeitiger Präsenz angiogener Faktoren wie z.B. bFGF oder TGF- β in entsprechend hoher Konzentration, wirkt TSP-1 pro-angiogen.
- 3) Wird TSP-1 außerhalb von Blutgefäßen im Gewebe exprimiert, so wirkt es pro-angiogen.
- 4) Proteolytische Fragmente von TSP-1 können sehr effektive Angiogenese-stimulatoren sein. Andere proteolytische Fragmente dagegen sind gute Inhibitoren FGF-induzierter Angiogenese. Die tatsächliche Wirkung von TSP-1 kann also vom Grad seiner Proteolyse bestimmt werden. Bezüglich der Angiogenese wird daher von einem „optimalen proteolytischen Zustand“ gesprochen, der einem Zustand „exzessiver Proteolyse“ gegenübergestellt wird, in welchem die Angiogenese inhibiert wird (Sargiannidou, I. et al., 2001). Die Proteolyse von TSP-1 könnte über MMP9 rückgekoppelt sein. TSP-1 induziert die Expression von MMP9, welche auch TSP-1 degradiert. Zunächst entstünden so pro-angiogene Fragmente von TSP-1, bei weiterer Degradierung durch höhere Konzentrationen von MMP9 käme es zur „exzessiven Proteolyse“ mit einem Überwiegen anti-angiogener TSP-1 Fragmente. Damit wäre zugleich die Induktion von MMP9 limitiert. TSP-1 kann an unterschiedlichste Proteasen binden und insbesondere das Plasminogen/Plasmin-System regulieren. Auf diesem Wege konnte die Adhäsion und Invasion von Karzinomzellen in Fibrin-Gelen durch TSP-1 verstärkt werden wird (Sargiannidou, I. et al., 2001).
- 5) Matrix-gebundenes TSP-1 befördert die Adhäsion von Plättchen und einer Reihe anderer Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Keratinozyten, Nervenzellen und transformierten Zell-Linien wie Melanomen und Fibrosarkomen (Tuszynski, G. P. et al., 1987). Adhäsion ist ein entscheidender Schritt innerhalb der Tumorprogression, der Metastasierung und eben auch der Angiogenese durch Gefäßsprossung.

Ist TSP-1 dagegen in Lösung, so blockiert die „Integrin-Erkennungssequenz“ (RGD-Sequenz) innerhalb des siebten Type 3-Repeat die Adhäsion Integrin $\alpha_v\beta_3$ -vermittelter Zelladhäsion (Sargiannidou, I. et al., 2001).

1.5 9/B (DEPP:homo sapiens decidual protein induced by progesterone)

Die mRNA des Gens 9/B (DEPP) besteht aus 2114 Basenpaaren (Accession Nr. NM_007021, NCBI). Seine entsprechende DNA ist auf Chromosom 10 lokalisiert, im Bereich q11.21. Es wurde erstmalig 1999 von H. Watanabe und J. Fujita aus humanen endometrialen Stromazellen isoliert, die in Anwesenheit von Progesteron kultiviert wurden. Sie klonierten und charakterisierten im folgenden die DEPP-cDNA. Die Funktion des Gens ist bislang unbekannt. Es liegen keine Publikationen vor. Bekannt ist neben der Sequenz lediglich die Tatsache, daß in mütterlichen Deciduazellen unter dem Einfluß von Progesteron eine Aufregulierung von 9/B erfolgte.

Das Protein hat eine Sequenz von 212 Aminosäuren. Diese ergeben ein Molekulargewicht von etwa 23 kDa und einen Isoelektrischen Punkt von etwa 10.68. Mögliche Glycosylierungsstellen sind die Threonine in Position 58 und 101. Mögliche Phosphorylierungsstellen sind das Threonin in Position 14 sowie die Serine in den Positionen 36 und 81. Die vorhergesagte niedrige Hydrophobizität spricht für ein lösliches Protein. 9/B ist mit einer theoretischen Wahrscheinlichkeit von 62% im Kern lokalisiert (Datenbankanalyse). Es sind keine Homologien zu anderen bekannten Genen auffindbar.

1.6 Fragestellung

Der Zusammenhang zwischen der Blutströmung und dem Umbau von Blutgefäßnetzen ist in der Literatur vielfältig beschrieben. Ein zellulärer Mechanismus zur

Regelung dieser Angioadaptation ist die strömungsregulierte Genexpression im Endothel. Unter den strömungsregulierten endothelialen Genen ist für die Angioadaptation Thrombospondin-1 aufgrund seiner das Gefäßwachstum modulierenden Eigenschaften von besonderem Interesse. Thrombospondin-1 kann das Gefäßwachstum hemmen oder sogar die Apoptose von Endothelzellen induzieren. Ein molekularer Mechanismus, der in spezifischen hämodynamischen Situationen zur Degradation von Blutgefäßen beiträgt, könnte daher die Expressionsregulation von Thrombospondin-1 sein. Der Abbau überzähliger Blutgefäße innerhalb eines Gefäßnetzes ist während der Embryogenese, aber auch im Erwachsenen von zentraler Bedeutung, um funktionell optimierte Gefäßnetze zu erzeugen. Die hämodynamische Modulation der Thrombospondin-1 Expression ist jedoch bisher schlecht charakterisiert. In dieser Arbeit soll daher die endotheliale Thrombospondin-1 Expression in Abhängigkeit von der Wandschubspannung sowie im Zeitgang nach Einsetzen und erneutem Stillstand der Strömung untersucht werden. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob zwei Stimulatoren bzw. Modulatoren der Angiogenese, VEGF und Progesteron, hierbei modifizierend wirken. Dieselbe Fragestellung soll zusätzlich für das endotheliale Gen 9/B (DEPP) untersucht werden, über dessen Funktionen bisher nichts bekannt ist, dessen Expression jedoch durch Wandschubspannung supprimiert werden kann.