

4 Diskussion

4.1 TSP-1

4.1.1 Expressionsregulation durch Wandschubspannung

Endothelzellen exprimieren TSP-1 wenn sie ohne Strömung *in vitro* kultiviert werden. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit auf mRNA-Ebene gezeigt und entspricht den Befunden in der Literatur (Freyberg, M. A. et al., 2000). Die Expression von TSP-1 ließ sich sowohl in venösen wie in arteriellen Endothelzellen der menschlichen Nabelschnur und in mikro- und makrovaskulären Endothelzellen des menschlichen Koronarsystems unter statischen Kulturbedingungen zeigen. TSP-1 scheint also von sehr unterschiedlichen Endothelzellen gleichermaßen exprimiert zu werden.

Normalerweise sind Endothelzellen *in vivo* der Blutströmung ausgesetzt. Die Expression von TSP-1 unter statischen Kulturbedingungen muss also nicht der normalen *in vivo* Situation entsprechen. Durch eine definierte Strömung (s. Kap. 2.2.2) ließ sich die Expression von TSP-1 in kultivierten Endothelzellen statistisch signifikant hemmen. Dies ist in Übereinstimmung mit einer Reduktion der Sekretion des Proteins aus strömungsexponierten Endothelzellen (Freyberg, M. A. et al., 2000). *In vivo* dürfte eine nennenswerte Expression von TSP-1 aus Endothelzellen daher auf Ausnahmesituationen beschränkt sein.

Die Hemmung der Expression der TSP-1 mRNA war ab einer Wandschubspannung von 2 dyn/cm^2 statistisch signifikant (siehe Abb. 11). Diese Wandschubspannung wird *in vivo* im menschlichen Blutgefäßsystem in Arterien mit einem Mittelwert von 10 dyn/cm^2 deutlich überschritten und auch in Venen mit einem Mittelwert von 3 dyn/cm^2 sicher erreicht. Die Expression von TSP-1 bzw. ihre Hemmung dürfte daher nicht zur Unterscheidung zwischen Arterien und Venen beitragen. Unübersichtlicher ist die Situation in mikrovaskulären Gefäßnetzwerken. In diesem Gefäßbereich werden sowohl die höchsten wie auch die niedrigsten Wandschubspannungen gemessen (Zakrzewicz, A. et al., 2002).

Dabei kommen in einzelnen Kapillaren durchaus vorübergehend Wandschubspannungen unter 2 dyn/cm^2 vor.

Zeitlich befristete Änderungen der Wandschubspannung genügen jedoch nicht, um die Expression von TSP-1 zu regulieren. Die Hemmung der Expression ist bei einer Wandschubspannung von 6 dyn/cm^2 nach vier Stunden noch nicht signifikant (Abb. 12). Erst nach 24 Stunden wird TSP-1 signifikant supprimiert. Bei weiterhin konstanter Strömung bleibt dieser Effekt bis zur maximalen Versuchsdauer von 72 Stunden erhalten. Es handelt sich also um einen langfristigen Effekt.

Transkriptionsblockade mit Actinomycin D (Abb.18) zeigte, dass die Abnahme der mRNA-Stabilität bzw. deren verstärkter Abbau zumindest einen Beitrag leistet zur Suppression von TSP-1 unter Strömungsbedingungen. Ob auch die Regulation der Transkription dabei eine Rolle spielt, lässt sich aus diesen Experimenten nicht schlussfolgern.

Bei einer Umkehrung des Experiments - auf Strömungsexposition folgt Strömungsstillstand - erreichte die Erhöhung der Expression von TSP-1 nach vier Stunden statistische Signifikanz (Abb. 13). Dies zeigt, dass die Verminderung der nachgewiesenen mRNA Menge unter Strömungsbedingungen nicht auf eine mechanische Beschädigung der Endothelzellen durch die Kulturbedingungen zurückzuführen war. Auch *in vivo* dürfte die verursachte Erhöhung der TSP-1-Konzentration, welcher die Endothelzellen autokrin ausgesetzt sind, erst einige Stunden nach einem dauerhaften Strömungsstillstand wirksam werden.

Dauerhafte Strömungsstillstände sind *in vivo* Ausnahmesituationen. Physiologisch ist der Strömungsstillstand in den Blutgefäßen des in Rückbildung befindlichen Gelbkörpers. Pathophysiologisch ist der Strömungsstillstand hinter einem Gefäßverschluss bedeutsam. In diesen Fällen könnte TSP-1 autokrin auf das Endothel einwirken. Endothelzellen exprimieren verschiedene TSP-1 Rezeptoren. Dazu gehören neben CD47, β_3 -Integrinen und HSPG (Heparan-Sulfat-Proteoglykane) insbesondere CD36, dessen Aktivierung durch TSP-1 die Caspase 3 stimuliert, so

dass die Endothelzelle apoptotisch wird. Allerdings exprimieren HUVEC kein CD36 (Swerlick, R. A. et al., 1992). CD47 wäre in diesem Fall der vorrangige Rezeptor für die Apoptose (Freyberg, M. A. et al., 2000). Bemerkenswert ist, dass neben Stase auch unregelmäßige Strömung (turbulenter Flow) zu verstärkter Apoptose führt. Neben CD47 spielt hier der fas-Rezeptor eine Rolle. Allerdings ist TSP-1 als Ligand hierbei (noch) nicht identifiziert worden (Freyberg, M. A. et al., 2001 a u. 2001 b).

Die strömungsregulierte Expression von TSP-1 würde in diesem Fall einen Mechanismus darstellen, durch den die Rückbildung nicht perfundierter Blutgefäße vermittelt wird. Für diese Interpretation finden sich weitere unterstützende Daten in der Literatur.

In vitro unterliegen unter statischen Bedingungen gehaltene verglichen mit strömungsexponierten Endothelzellen einer wesentlich rascheren Apoptose. Ein Mangel an hämodynamischen Kräften gilt hierbei als wesentlich. Dieser Effekt zeigte sich nicht nur bei als Monolayer kultivierten HUVEC, sondern auch in verschiedenen Organkulturen und den Endothelzellen unterschiedlicher Organe und Spezies, ja sogar bei endothelialen Zell-Linien (z. B. EA hy 926). Bei einem Wechsel von statischen zu dynamischen Kulturbedingungen konnte die Apoptose unterdrückt und das Überleben der Endothelzellen um ein Vielfaches verlängert werden (Kaiser, D. et al., 1999). Das Phänomen einer Verminderung der Apoptoserate von Endothelzellen unter Strömungsbelastung ist also unstrittig. Hier interessiert insbesondere, ob TSP-1 dabei eine Rolle spielen könnte.

Durch Zugabe von TSP-1 (1 µg/ml) zu primär kultivierten Endothelzellen, 24 h nach Erreichen der Konfluenz konnte die Apoptoserate gegenüber unbehandelten Zellen um über den Faktor drei erhöht werden. Ein ähnlicher Effekt ließ sich durch das Hinzufügen von drei Tage altem Medium statisch kultivierter HUVEC erzielen. Bei der kombinierten Behandlung mit TSP-1 (1 µg/ml) und neutralisierendem Hasen-Anti-TSP-1-Antiserum (polyklonal-anti-TSP-1) zeigte sich wiederum eine niedrigere Apoptoserate, die sogar noch unter der erwarteten lag. Die Autoren schlossen hieraus auf eine autokrine Wirkung von TSP-1. Auf dynamisch kultivierte

Endothelzellen hingegen hatte weder TSP-1, noch konditioniertes Medium statisch kultivierter HUVEC einen Apoptose steigernden Einfluss. Dies legte den Schluss nahe, dass durch Strömungsbelastung nicht nur die Expression von TSP-1, sondern auch die seiner Rezeptoren vermindert wird. (Freyberg, M. A. et al., 2000)

Die Expression eines Komplexes aus $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen und dem intergrin-assoziierten Protein (CD 47) ist erforderlich, damit das TSP-1-Molekül über seine RGD-Sequenz und die C-terminale „cell binding domain“ bei gleichzeitiger Ligation beider Rezeptoren eine Apoptose induzieren kann. Während Endothelzellen unter statischen wie dynamischen Bedingungen $\alpha_v\beta_3$ -Integrine exprimieren, erfolgt eine Expression des intergrin-assoziierten Proteins (CD 47) auf ihrer Oberfläche nur unter statischen Versuchsbedingungen (Freyberg, M. A. et al., 2000). Dieselben Rezeptoren, CD47 und $\alpha_v\beta_3$ -Integrine, sind jedoch nicht nur für die Apoptose von Endothelzellen, sondern auch für ihre Migration von Bedeutung (Wang, X. Q. et Frazier, W. A., 1998). Die Apoptoseinduktion über CD47 ist von Caspasen unabhängig (Mateo, V. et al., 1999).

Intrazellulär kann TSP-1 dosisabhängig die Expression von Bax, einem proapoptotischen Gen, steigern und gleichzeitig diejenige von Bcl-2 (antiapoptotisch, VEGF-vermittelt) in mikrovaskulären Endothelzellen supprimieren (Nor, J. E. et al., 2000). Dies mündet in die Aktivierung der Caspase-3, deren Aufspaltung in kleinere Einheiten die Apoptose der Endothelzellen bewirkt.

Dieser caspase-abhängige Apoptosemechanismus ist, ebenso wie die Bindung von TSP-1 an CD36, an die Type-1-Repeats des Thrombospondinmoleküls gebunden (Guo, N. et al., 1997). Die Induktion der Apoptose erfolgt über die sequenzielle Aktivierung von CD36, die Familie der Src-Kinasen, p59fyn, p38MAPK und die Caspasen, Vertreter der Cystein-Proteasen, insbesondere die Caspase-3 in aktivierten, mikrovaskulären Endothelzellen (Jimenez, B. et al., 2000). Für den Ablauf der Apoptose scheint weiterhin bedeutsam zu sein, dass TSP-1 eine „molekulare Brücke“ zwischen der apoptotischen und der phagozytierenden Zelle herstellen kann (Savill, J. et al., 1992).

Darüber hinaus ist für Bax auch ein caspase-unabhängiger Apoptosemechanismus beschrieben worden (Xiang, J. et al., 1996).

Auch über die Expression des fas-Rezeptors auf Endothelzellen ist berichtet worden. Über diesen kann der fas-Ligand die Aktivierung von p38MAPK und damit Apoptose induzieren. Entscheidend für die Ausbildung von fas auf Endothelzellen ist Stase und unregelmäßiger bzw. turbulenter Flow. Unter laminaren Flow ist seine Expression supprimiert (Freyberg, M. A. et al., 2001 b).

Makro- und mikrovaskuläre Endothelzellen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Mechanismen bezüglich Apoptose. Während makrovaskuläre Endothelzellen einen caspase-unabhängigen Weg über CD47 und Integrine beschreiten (Freyberg, M. A. et al., 2000), ist für mikrovaskuläre Endothelzellen CD36 und der Caspase-Weg von größerer Bedeutung (Jimenez, B. et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die hier vorgelegten Daten wie Daten aus der Literatur darin übereinstimmen, dass die Expression von TSP-1 in Endothelzellen durch Wandschubspannung gehemmt und durch Strömungsstillstand induziert wird. Darüber hinaus zeigen die Daten dieser Arbeit, dass der „setpoint“ dieser Regulation bei 2 dyn/cm^2 liegt, und somit nicht gut geeignet ist, um verschiedene Gefäßtypen zu unterscheiden. Deutlich unterschieden werden dagegen Situationen mit oder ohne Strömung. In der Literatur sind verschiedene Mechanismen zur Stimulation der Apoptose von Endothelzellen durch TSP-1 nachgewiesen worden. Strömungsstillstand würde somit die Aufregulation der Expression von TSP-1 und damit die Apoptose des Endothels zur Folge haben.

4.1.2 Regulation der TSP-1-Expression durch VEGF, Sauerstoffpartialdruck und Progesteron

4.1.2.1 VEGF

Da VEGF angiogenetisch, TSP-1 jedoch überwiegend anti-angiogenetisch wirkt, erschien eine Suppression von TSP-1 durch VEGF denkbar. Die TSP-1-mRNA-Expression konnte jedoch in keiner der Versuchsreihen durch VEGF reguliert werden. Weder unter statischen, noch unter dynamischen Bedingungen (jeweils 24 h) wie auch im Zeitgang (0,5 bis 48 h) zeigte sich unter VEGF (40 ng/ml) gegenüber unbehandelten HUVEC eine signifikante Veränderung in der Höhe der Expression von TSP-1-mRNA (Abb. 14 u. 15). VEGF scheint in HUVEC auf TSP-1 unter diesen Versuchsbedingungen keine Wirkung zu haben.

Im Widerspruch zu diesen Daten existiert in der Literatur eine Arbeit, in der in bovinen, retinalen, mikrovaskulären Endothelzellen eine biphasische Regulation der Expression von TSP-1 durch VEGF beschrieben wird (Suzuma, K. et al., 1999). Durch VEGF wurde dabei dosisabhängig die Expression von TSP-1 nach vier Stunden supprimiert, während sie nach 24 Stunden gegenüber dem Ausgangswert dreifach erhöht war.

Hiermit könnte die Gefäßsprossung durch ein Zusammenwirken von Blutströmung und Sauerstoffpartialdruck reguliert werden. Durch Hypoxie wird die Expression von VEGF und durch diesen die Sprossung induziert. Durch Strömungsstillstand in der Gefäßsprosse würde TSP-1 induziert. Dies geschieht in Gegenwart von VEGF jedoch zunächst nicht. Bei der Kombination von Hypoxie mit Strömungsstillstand könnte also zumindest in einem gewissen Zeitfenster (der Anstieg von TSP-1 erfolgt erst nach neun Stunden, Suzuma, K. et al. 1999) der proangiogene Effekt durch VEGF überwiegen. Zu einem späteren Zeitpunkt wäre die Gefäßsprossung unter physiologischen Bedingungen selbstlimitierend, zumal induziertes TSP-1 sich zusätzlich hemmend auf die VEGF-Expression auswirkt im Sinne eines negativen Feedback (Suzuma, K. et al. 1999). Nur wenn eine Gefäßsprosse Anschluss an ein

weiteres Blutgefäß findet und der einsetzende Blutstrom die Expression von TSP-1 supprimiert, bliebe das neugebildete Gefäß bestehen. Ohne Blutströmung würden die Endothelzellen einer blind endenden Gefäßsprosse durch die nach einiger Zeit zunehmende Expression von TSP-1 apoptotisch werden.

Unter pathophysiologischen Bedingungen könnte diese Selbstbegrenzung entfallen. So ist die TSP-1-Expression in vielen Tumoren vermindert und die Gefäßdichte erhöht (Yao, L. et al., 2000; Grossfeld, G. D. et al., 1997). Hierbei kann nach einem „angiogenic switch“, häufig durch Inaktivierung des Tumorsuppressorgenes p53, TSP-1 supprimiert sein, weil es nicht mehr durch p53 aktiviert wird (Dameron, K. M. et al., 1994). Dadurch würde die Tumorangio-genese nicht gehemmt und VEGF gleichzeitig vermehrt exprimiert, worunter die Gefäßdichte deutlich zunimmt (Maeda, K. et al., 2000). Umgekehrt exprimieren p53-transfizierte Karzinomzellen wieder TSP-1 und verlieren den angiogenen Phänotyp (Volpert, O. V. et al., 1995). p53-exprimierende Wildtyp-Zellen reagieren außerdem sensitiver auf exogene apoptotische Signale durch TSP-1 als Tumorzellen mit p53-Mutation, wie z.B. die des Mamma-Carcinoms MDA-MB-435S (Lesoon-Wood, L. A. et al., 1995). Insgesamt wird, trotz unterschiedlicher Befunde, die Bedeutung von TSP-1 für das Blutgefäßwachstum durch die Tumorangio-genese unterstrichen.

4.1.2.2 Hypoxie

Der Angiogeneseinhibitor TSP-1 wird durch Wandschubspannung und der Angiogenesefaktor VEGF durch Sauerstoffpartialdruck reguliert. Im Gesamteffekt dieser auf die Angiogenese gegensätzlich wirkenden Faktoren ist daher ein Zusammenspiel der beiden Triggermechanismen Wandschubspannung und Sauerstoffpartialdruck möglich. Daher stellt sich die Frage, ob auch TSP-1 nicht nur durch Wandschubspannung, sondern auch durch Sauerstoffpartialdruck reguliert werden kann.

Die Expressionsregulation von TSP-1 durch Hypoxie wird in der Literatur unterschiedlich dargestellt. Es wird sowohl über eine –überwiegend posttranskriptionelle –

Erhöhung (Phelan, M. W. et al., 1998), als auch über Hemmung (Tenan, M. et al., 2000) der TSP-1 Expression durch Hypoxie berichtet. Die vermehrte Expression wurde dabei in Endothelzellen, die verminderte in Tumorzellen beobachtet. Eine weitere Arbeit berichtet über eine ausbleibende bzw. fehlende Regulation von TSP-1 durch Hypoxie (Suzuma, K. et al., 1999). Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch die jeweils untersuchten Zellen zu erklären sein.

4.1.2.3 Progesteron

Die TSP-1-mRNA-Expression konnte in keiner Versuchsreihe durch Progesteron reguliert werden. Bei keiner der untersuchten Zeitdauern und bei keiner der untersuchten Progesteronkonzentrationen zeigte sich eine gegenüber unbehandelten HUVEC signifikante Veränderung in der Höhe der Expression der TSP-1-mRNA (Abb. 16).

Iruela-Arispe et al. (1996) fanden dagegen heraus, dass die TSP-1-Expression im Endometrium zyklusabhängig ist und durch Progesteron induziert wird. Ein Maximum der Expression konnte in Phasen geringen bzw. eingestellten kapillären Wachstums verzeichnet werden. Diese Situation entspricht der Sekretionsphase des weiblichen Zyklus, die hormonell von Progesteron dominiert wird. In der Proliferationsphase zeigten sich entsprechend umgekehrte Verhältnisse. Das Endometrium wies in dieser Zyklusphase, die von deutlicher Angiogenese geprägt ist und in der nicht Progesteron, sondern Östrogen den Haupteinfluss ausübt, nur geringe Expression von TSP-1 auf. TSP-1-Protein ließ sich hauptsächlich in der Basalmembran von Kapillaren der Endometriumpuben der Sekretionsphase nachweisen. Die durch in-situ-Hybridisierung nachgewiesene mRNA befand sich vorwiegend in den Stromazellen des Endometriums. Schwächere Signale wurden in einigen Endothelzellen und glatten Muskelzellen nachgewiesen. Isolierte Stromazellen zeigten, nach 8 Stunden mit 10-50 μ M Progesteron stimuliert, eine vierfach erhöhte Expression von TSP-1-mRNA und -Protein. Durch den Progesteron-Rezeptor-Antagonisten RU-486 ließ sich dieser Effekt unterdrücken.

Progesteroneffekte auf die TSP-1-Expression im Endometrium *in vivo* scheinen also überwiegend durch nicht-endotheliale Zellen vermittelt zu werden. Insofern stehen die referierten Literaturdaten nicht in Widerspruch zu den hier experimentell an HUVEC erhobenen Daten. Die Beobachtungen am Endometrium belegen jedoch nochmals eindrucksvoll den anti-angiogenen Effekt von TSP-1 und seine Rolle bei der Regulation der Angiogenese *in vivo*.

4.1.3 Zelltypisches Expressionsmuster

Sämtliche untersuchte endotheliale, primäre Zellkulturen exprimierten TSP-1, zumindest auf mRNA-Ebene (s. Tab. 4). Dagegen war eine TSP-1 Expression in nur einer der untersuchten epithelialen Zelllinien, die sich überwiegend von Karzinomen ableiteten, nachweisbar. Dies entspricht generell der in der Literatur überwiegenden Ansicht, dass mit zunehmender Malignität einer Zelle ihre TSP-1 Expression sinkt (Zabrenetzky, V. et al., 1994). Auch mit der in Tumoren mit ausgeprägter Angiogenese verminderten TSP-1-Expression (Yao, L. et al., 2000; Grossfeld, G. D. et al., 1997) stimmt das an Zellkulturen beobachtete Expressionsmuster überein.

Beim Vergleich der TSP-1 Expression zwischen verschiedenen, kultivierten Zellen, wurden die Zellen keiner Wandschubspannung ausgesetzt. Unter diesen Bedingungen war die Expression von TSP-1 in allen untersuchten Endothelzelltypen sehr deutlich. Die Expression war hierbei in makrovaskulären Endothelzellen höher als in mikrovaskulären.

Dies könnte auch als Hinweis darauf gewertet werden, dass TSP-1-vermittelte Mechanismen für die vom Endothel vermittelte Adaptation der Blutgefäße an Strömungsbedingungen von Bedeutung sind. Für das Epithel wären von der Blutströmung abhängige Mechanismen dagegen bedeutungslos.

4.1.4 Bedeutung für die Regulation der Angioadaptation

Für die Beurteilung der Bedeutung von TSP-1 für die Angioadaptation im menschlichen Organismus ist es notwendig, die dominierenden Triggermechanismen und deren unterschiedliche Kombinationen voneinander zu unterscheiden. Jeder Triggerkombination sollte ein Phänomen der Angioadaptation zugeordnet werden. Die hier untersuchte Expressionsregulation von TSP-1 durch dieselben Trigger kann sodann als einer der jeweiligen Angioadaptation zugrundeliegender Mechanismus diskutiert werden.

Als bedeutendste Trigger gelten die Wandschubspannung und der Sauerstoffpartialdruck. Während die Wandschubspannung die hämodynamischen Verhältnisse im Gefäßbett abbildet, erlaubt der Sauerstoffpartialdruck eine Aussage über die innerhalb des Gewebes herrschende metabolische Situation (s.Kap. 1.2).

Tab. 6 Hypothetische Kombinationen der Trigger „Wandschubspannung“ und „Sauerstoffpartialdruck“ und zugehörige Phänomene der Angioadaptation sowie deren mutmaßliche zelluläre Mechanismen.

| Triggermechanismus | Angioadaptives Phänomen | Zellulärer Mechanismus | Korrespondierende <i>in vivo</i> Situation |
|--|-------------------------|---------------------------------|--|
| 1. $\tau_w \downarrow \wedge P_{O_2} =$ | Pruning | Apoptose | Corpus luteum Degeneration |
| 2. $\tau_w \downarrow \wedge P_{O_2} \downarrow$ | Angiogenese | Sprossung | Tumurvaskularisation poststenotische Hypoxieareale |
| 3a. $\tau_w \uparrow \wedge P_{O_2} =$ | Maintenance | Verminderte Apoptose | Leitungsgefäß |
| 3b. $\tau_w \uparrow \wedge P_{O_2} =$ | Arteriogenese | Gefäßwandumbau (remodelling) | Kollateralisation |
| 3c. $\tau_w \uparrow \wedge P_{O_2} =$ | Angiogenese | Intussuszeption bzw. „bridging“ | Angiogenese in der Lunge oder nach Perfusionserhöhung im Skelettmuskel |
| 4. $\tau_w \uparrow \wedge P_{O_2} \downarrow$ | Angiogenese | Sprossung | Muskeltraining |

Der erste Fall beschreibt eine Gefäßsituation, bei der die Wandschubspannung zwar niedriger (bis zu Strömungsstillstand), der Sauerstoffpartialdruck aber unverändert hoch bzw. physiologisch ist.

Eine derartige Situation besteht z.B. während der Embryonalentwicklung beim Remodelling durch Untergang überzähliger Gefäße (Pruning) und der Involution des Gelbkörpers während des weiblichen Zyklus (Risau, W., 1997). In beiden Fällen kommt es zum Untergang von Blutgefäßen. Im Rahmen solcher durch Wachstum und/oder hormonellen Einfluss ausgelösten Umstrukturierung könnte der eintretende Strömungsstillstand bei gleichzeitig optimaler Sauerstoffversorgung signalisieren, dass solche Gefäße überflüssig sind. Diese durch „Pruning“ (Pruning, s.Kap. 1.1.2.4) abzubauen, entspricht einer ökonomischen Vorgehensweise eines gesunden Organismus.

Bei Strömungsstillstand würde TSP-1 aufreguliert, vorausgesetzt dieser Zustand hielte längere Zeit an. Nach den in vitro-Untersuchungen ist dies frühestens nach 4 Stunden zu erwarten (s.Kap. 4.1.1 u. Abb. 13). Die Aufregulierung von TSP-1 hätte bei anhaltender Strömungsverminderung dann über die Aktivierung von CD36 oder CD47 eine zunehmende Apoptose der Endothelzellen und letztlich den Untergang (Pruning) des betroffenen Gefäßes zur Folge. Aufgrund seiner Expressionsregulation durch Wandschubspannung kommt TSP-1 in dem hier beschriebenen „ersten Fall“ als ein Mitspieler der molekularen Mechanismen der Angioadaptation in Frage.

Im zweiten Fall sind beide Parameter, Wandschubspannung und Sauerstoffpartialdruck, herabgesetzt. Diese Situation findet sich in Kapillarsprossen, die u. a. durch VEGF bei Hypoxie induziert werden (vergl. Kap. 1.1.2.1). Diese Art der Induktion von Kapillarsprossen ist bei der Tumervaskularisation (Carmeliet, P. et Jain, R., 2000) und in abhängigen Gewebearealen hinter Stenosen gut beschrieben worden (Rieger, H. et Gaehtgens, P., 1994).

In der Kapillar-Sprosse, in der keine Strömung herrscht, würde TSP-1 vorerst durch VEGF supprimiert. Erst nach längerer Zeit, nach ca. 24 Stunden, käme es bei

anhaltendem Strömungsstillstand zur Aufregulierung von TSP-1 mit der Folge einer Apoptoseinduktion (s. Kap. 4.1.2.1). Innerhalb dieses 24-h-Zeitfensters könnte die Kapillarsprossung ohne Hinderung durch TSP-1 stattfinden. Sollte innerhalb dieses Zeitraums ein Gefäßanschluss geschaffen worden sein, bliebe TSP-1 nun durch die einsetzende Strömung (s. Abb. 11) weiter supprimiert. Wird jedoch kein Anschluss für die Kapillarsprosse geschaffen, so bleibt sie funktionslos und wird durch die Aufregulation von TSP-1 und die damit induzierte Apoptose wieder entfernt. Der hier diskutierte Mechanismus könnte also überzählige Kapillarsprossen beseitigen bzw. verhindern, dass blind endende Kapillaren erhalten bleiben. Bei der derzeitigen Datenlage bleibt er spekulativ.

Der dritte Fall beschreibt eine Gefäßsituation, in der bei Normoxie die Wandschubspannung zunimmt. Im Organismus liegt dieser Fall in Kollateralgefäßen vor (s. Abb. 2), nachdem die versorgende Hauptarterie des Nachbarsegmentes okkludiert wurde (Infarkt) (Buschmann, I. et Schaper, W., 1999). Sie selbst befinden sich in einem normoxischen Gebiet und befördern aufgrund der Umleitungssituation ein größeres Blutvolumen als zuvor. Die Wandschubspannung ist daher erhöht.

TSP-1 würde hierbei durch die zunehmende Strömung weiter supprimiert (vergl. Abb.11), die Apoptose von Endothelzellen gehemmt. Gleichzeitig ist bei unverändertem Sauerstoffpartialdruck kein Anreiz zur Angiogenese durch Sprossung gegeben. Diese Signale bedeuten bei den durchströmten Gefäßen eine Aufrechterhaltung (3a; Maintenance) und/oder Erweiterung des Lumens und Verstärkung der Wand (3b; Arteriogenese, Kollateralisation); (Rieger, H. et Gaehtgens, P., 1994). Für beide Fälle ist die Suppression von TSP-1 vielleicht nicht entscheidend, würde sich jedoch plausibel ins Gesamtgeschehen einfügen. (Siehe auch Kap.1.1.2.3: Arteriogenese). Ähnliches gilt für das Gefäßwachstum durch Intussuszeption (3c), wie es in der Lunge stattfindet. Die hier vorgeschlagenen Triggermechanismen Wandschubspannung und Sauerstoffpartialdruck genügen, zumindest ohne genauere Quantifizierung, offensichtlich nicht, um alle *in vivo* Situationen zu differenzieren.

Kombination erhöhter Wandschubspannung mit vermindertem Sauerstoffpartialdruck stellt die vierte mögliche Situation dar. Diese Situation wird bei Muskeltraining, insbesondere bei Ausdauertraining, angetroffen. Dieses führt zur Angiogenese durch Sprossung (Hudlicka, O. et al., 1992).

Vermehrte Strömung würde zu einer Suppression von TSP-1 führen (Abb. 11), die Apoptose würde unterdrückt. Die Hypoxie ist dagegen (eher) ein Reiz zur Kapillarsprossung, weil sie die Expression von VEGF induziert. VEGF stimuliert seinerseits die Kapillarsprossung. Dies erfolgt besonders effektiv, solange der Angiogenese(Sprossungs)inhibitor TSP-1 supprimiert ist. Beide Trigger (Hypoxie und erhöhte Wandschubspannung) weisen also zusammen (synergistisch) in Richtung Kapillarsprossung.

4.2 9/B

Die Diskussion der über 9/B erhobenen Daten lässt sich kaum in den Kontext der Literatur einfügen, weil bis auf die DNA- und mRNA-Sequenz nichts über 9/B publiziert worden ist. In humanen Deciduazellen (Stromazellen des Endometriums) wurde offenbar eine Induktion der 9/B-mRNA unter Progesteron verzeichnet und daraus ein Name (DEPP; decidual protein induced by progesterone) abgeleitet. (NCBI, Accession number NM 007021; Autoren: Fujita J., Watanabe H.).

4.2.1 Expressionsregulation durch Wandschubspannung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Endothelzellen venösen wie arteriellen Ursprungs unter statischen Versuchsbedingungen *in vitro* 9/B (DEPP) exprimieren. Diese Situation entspricht allerdings, bis auf Ausnahmen (Gelbkörper, Endometrium), nicht der physiologischen Situation im Organismus. Endothelzellen sind in der Regel *in vivo* einer Blutströmung ausgesetzt.

Unter zunehmender laminarer Strömung nimmt *in vitro* die Expression der 9/B-mRNA ab, dabei ist die Höhe der Inhibition von der Stärke der laminaren Strömung abhängig (Abb. 19). Dieser Effekt ist ab einer Wandschubspannung von 2 dyn/cm^2 statistisch signifikant und nimmt bei höherer Wandschubspannung weiterhin zu. Die Mittelwerte der Wandschubspannungen im humanen arteriellen System mit 10 dyn/cm^2 und im humanen venösen System mit 3 dyn/cm^2 liegen beide über diesem Wert, so dass unter physiologischen Bedingungen auf eine Supprimierung von 9/B in weiten Strecken des Gefäßsystems geschlossen werden kann. Die hier untersuchten Wandschubspannungen führen nach 24 Stunden zu signifikanter Hemmung der 9/B-Expression (s. Abb. 20). Auch bei längerer Expositionszeit bleibt dieser Effekt erhalten. Es handelt sich bei der Regulation von 9/B durch Strömung also um eine langfristige und nicht nur vorübergehende Wirkung.

Bei einer Umkehrung der Versuchsanordnung – auf Strömungsexposition folgt Strömungsstillstand – erreichte die Erhöhung der Expression von 9/B nach 24 Stunden statistische Signifikanz (Abb. 21). Dieser Sachverhalt beweist in erster Linie, dass die Reduktion der 9/B-mRNA unter Strömungsbedingungen nicht auf eine mechanische Schädigung der Endothelzellen zurückzuführen war. Andererseits dürfte eine etwaige Wirkung von 9/B *in vivo* erst etliche Stunden nach Strömungsstillstand auftreten.

Die Stabilität der 9/B-mRNA von strömungsexponierten und statisch kultivierten HUVEC erwies sich als gleich hoch (Abb. 27). Dies bedeutet, dass die Expressionskontrolle von 9/B durch die Wandschubspannung transkriptionell erfolgt.

Während einerseits 24 Stunden lang Strömung wirksam sein muss, um eine 9/B-Suppression zu erzielen, muss andererseits mindestens 24 Stunden Strömungsstillstand herrschen, um eine wirksame 9/B-Induktion in Endothelzellen auszulösen. Beide Sachverhalte stützen die Hypothese, dass eine Regulation von 9/B nur im Zusammenhang mit der langfristigen Adaptation von Blutgefäßen an Strömungsbedingungen für den Organismus von Bedeutung ist.

4.2.2 Expressionsregulation durch VEGF und Progesteron

4.2.2.1 VEGF

Unter Zugabe von VEGF zeigte sich für 9/B unter statischen Bedingungen eine biphasische Regulation. Während es unter 40 ng/ml VEGF bei zwei Stunden zu einer signifikanten Suppression von 9/B-mRNA kam (Abb. 23), war bei 24 Stunden eine leichte Induktion zu verzeichnen (Abb. 22 u. 23). Unter Strömungsbedingungen (6 dyn/cm², 24 h) dominierte die Suppression der 9/B-mRNA durch die Strömung und konnte durch VEGF nur teilkompensiert werden. Da der Trend zur Induktion von 9/B durch VEGF nach 24 Stunden unter statischen wie dynamischen Kulturbedingungen ähnlich ausgeprägt ist, scheinen die Expressionsregulationen von 9/B durch Strömung und VEGF voneinander unabhängig zu sein. Deutlich ausgeprägter und daher biologisch, jedenfalls auf zellulärem Niveau, entscheidend, ist aber eher die transiente Hemmung der 9/B-Expression durch VEGF nach zwei Stunden unter statischen Kulturbedingungen.

4.2.2.2 Progesteron

Unter Progesteron (10⁻⁶ molar) zeigte sich nach zwei Stunden eine signifikante Inhibition der mRNA-Expression in HUVEC, außerdem eine Tendenz zur Induktion nach 24-stündiger Inkubation (Abb. 24). Diese Daten könnten den von Fujita und Watanabe erhobenen widersprechen. Diese Autoren benannten das untersuchte Gen nach der induktiven Wirkung von Progesteron auf dessen RNA-Expression (DEPP; decidual protein induced by progesterone). Allerdings liegen keinerlei Informationen über ihre Versuchsanordnung und verwandte Progesteronkonzentrationen vor, so dass über Abweichungen bzw. Unterschiede im Vergleich der Daten keine Aussagen gemacht werden können.

Da die 9/B-Expression bei Fujita und Watanabe in Stromazellen des weiblichen Endometriums gemessen wurde und nicht in Endothelzellen (HUVEC), führen die ggf. abweichenden Ergebnisse in Bezug auf Induktion und Inhibition von 9/B nicht

zwangsläufig zu widersprüchlichen Aussagen. Während Endothelzellen einer permanenten Wandschubspannung durch die vorhandene Blutströmung ausgesetzt sind, haben die Stromazellen keinen direkten Kontakt zu dieser Einflussgröße.

4.2.3 Zell- und gewebetypisches Expressionsmuster

Sämtliche untersuchte endotheliale, primäre Zellkulturen exprimieren unter statischen Kulturbedingungen 9/B zumindest auf mRNA-Ebene (s. Tab. 5). Dagegen war eine 9/B-Expression in keiner der untersuchten epithelialen Zell-Linien, die sich überwiegend von Karzinomen ableiten, nachweisbar (Tab. 5).

Im direkten Vergleich zwischen makro- und mikrovaskulären Endothelzellen des humanen Koronarsystems ist die Expression von 9/B in mikrovaskulären Zellen signifikant höher (Tab. 5, Abb. 26).

Da funktionelle Daten über 9/B bisher fehlen, lassen sich die hier erhobenen Befunde nur schwer interpretieren. Es fällt jedoch auf, dass 9/B in schnell wachsenden, malignen Zellen offenbar nicht exprimiert wird. Dies könnte auf eine Funktion bei der Zellzyklus- oder Transkriptionskontrolle hinweisen.

Unter dem Aspekt der Gewebespezifität waren cDNA-Pools aus Plazenta, Lunge und Pankreas besonders reich an 9/B (s. Abb. 25).

Von den genannten Organen zeigt insbesondere die Plazenta einen ausgeprägten Bezug zur Angiogenese. Unklar dagegen bleibt die Bedeutung der erhöhten 9/B-Expression in Lunge und Pankreas. Möglicherweise hat 9/B auch einen Bezug zu sekretorischen Funktionen, die in allen drei genannten Organen ausgeprägt sind. In der Plazenta geht der Abschluss bzw. das Sistieren der Angiogenese der Aufnahme der Drüsenfunktion zeitlich voraus.

4.3 Bedeutung für die Regulation der Angioadaptation

Auch für die Behandlung von 9/B ist es sinnvoll, die unterschiedlichen (physiologischen) Gefäßbedingungen in Bezug auf Wandschubspannung und Sauerstoffpartialdruck zu unterscheiden (Tab. 6), auch wenn die Schlussfolgerungen in diesem Fall noch spekulativer Natur sind. Dies hängt, wie oben beschrieben, mit den unzureichenden bzw. fast vollständig fehlenden funktionellen Daten bezüglich dieses Gens zusammen.

Der erste Fall beschreibt eine Gefäßsituation, bei der die Wandschubspannung erniedrigt, der Sauerstoffpartialdruck aber unverändert hoch bzw. physiologisch ist (Normoxie).

Im Organismus wäre an eine Situation zu denken, in der trotz Abnahme der Blutströmung der Sauerstoffpartialdruck konstant bliebe. Diese Verhältnisse finden sich z.B. während der Vaskulogenese in der Embryonalentwicklung und im Gelbkörper während des weiblichen Zyklus wieder und sind Ausdruck von Umverteilungen bei veränderten Bedarfslagen des Organismus. Sie erfordern Anpassungsmechanismen, um den geringsten (Versorgungs-) Aufwand bei maximaler Funktionalität zu gewährleisten. Das Einsparen bzw. der Abbau von überflüssig gewordenen Gefäßen ist hierfür wichtig. Das sogenannte Pruning beschreibt diesen Mechanismus zutreffend (s. Kap. 1.1.2.4).

9/B wird (wie auch TSP-1) durch Strömung supprimiert (s. Abb. 19). Eine Induktion erfolgt bei Strömungsstillstand (s. Abb. 21). Diese Effekte werden erst nach ca. 24 h wirksam. Eine Mitwirkung von 9/B bei der langfristigen Angioadaptation wäre daher zumindest denkbar.

Da auch *in vitro* schon ein Hinweis auf eine apoptotische Wirkung von 9/B auf kultivierte Endothelzellen beobachtet werden konnte (M. Bongrazio, persönliche Mitteilung), wäre eine Rolle dieses Gens beim Pruning denkbar.

Im zweiten Fall sind beide Parameter, Wandschubspannung und Sauerstoffpartialdruck, herabgesetzt. Diese Aussage bezieht sich auf die Verhältnisse innerhalb sich neu bildender und noch blind endender Kapillarsprossen, die zuvor durch Hypoxie und VEGF induziert wurden.

Diese Art der Induktion von Kapillarsprossen ist bei der Tumervaskularisation und in abhängigen Gewebearealen hinter Stenosen (Rieger, H. et Geahrgens, P., 1994) gut beschrieben worden.

Unter anhaltendem Strömungsstillstand (> 24 h) würde 9/B aufreguliert und es käme möglicherweise zur Apoptose der Endothelzellen in der Gefäßspore. 24 Stunden könnten allerdings ausreichen, um einen Gefäßanschluss vor Eintritt einer etwaigen Apoptose zu gewährleisten.

Entscheidend könnte die Tatsache sein, dass VEGF, der unter Hypoxie vermehrt auch von Endothelzellen sezerniert wird, die Expression von 9/B in statisch kultivierten Endothelzellen bald nach Beginn seiner Einwirkungszeit deutlich supprimiert (Abb. 23, Max. bei 2 h). Während dieses Zeitpunktes und darüber hinaus könnte die proapoptotische Wirkung von 9/B unterdrückt werden, um während dieser Zeitspanne die Angiogenese durch Sprossung nicht zu behindern. Nach Ablauf von 24 Stunden würde sich dann die gegenläufige Tendenz abzeichnen: unter weiterem Einfluss von VEGF käme es zur Aufregulierung von 9/B (s. Abb. 22 u. 23), verbunden mit seinen proapoptotischen, antiangiogenen Wirkungen. Dieser Mechanismus könnte möglicherweise eine limitierende Funktion auf überschießende oder ineffiziente Sprossungen ausüben.

Der dritte Fall beschreibt eine Gefäßsituation, in der bei Normoxie die Wandschubspannung zunimmt. Im Organismus liegt dieser Fall in Kollateralgefäßen vor (Abb. 2), nachdem die versorgende Hauptarterie des Nachbarsegmentes okkludiert wurde (Infarkt). Sie befinden sich in einem normoxischen Gebiet, befördern aber aufgrund der Umleitungssituation ein größeres Blutvolumen als zuvor. Die Wandschubspannung ist daher erhöht.

9/B würde hierbei (wie TSP-1) durch die zunehmende Strömung weiter supprimiert (vergl. Abb. 19), ggf. auch die Apoptose von Endothelzellen gehemmt. Gleichzeitig ist bei unverändertem Sauerstoffpartialdruck kein Anreiz zur Angiogenese durch Sprossung gegeben. Diese Signale bedeuten bei den durchströmten Gefäßen eine Aufrechterhaltung (3a; Maintenance) und/oder Erweiterung des Lumens und Verstärkung der Wand (3b; Arteriogenese, Kollateralisation); (Rieger, H. et Gaethgens, P., 1994), (siehe auch Kap. 1.1.2.3: Arteriogenese)

Die vierte Möglichkeit entsteht durch Kombination erhöhter Wandschubspannung und vermindertem Sauerstoffpartialdruck wie bei Muskeltraining. Dies führt zur Angiogenese durch Sprossung (Hudlicka, O. et al., 1992).

Vermehrte Strömung würde zu einer Suppression von 9/B führen (Abb. 19), die Apoptose würde ggf. unterdrückt. Die Hypoxie ist ein Anreiz zur Kapillarsprossung über VEGF, der in der Anfangsphase (bei zwei Stunden) die 9/B-Expression unterdrückt und dadurch eine ungestörte Sprossung gewährleisten könnte. Beide Trigger wiesen daher synergistisch in Richtung Kapillarsprossung.