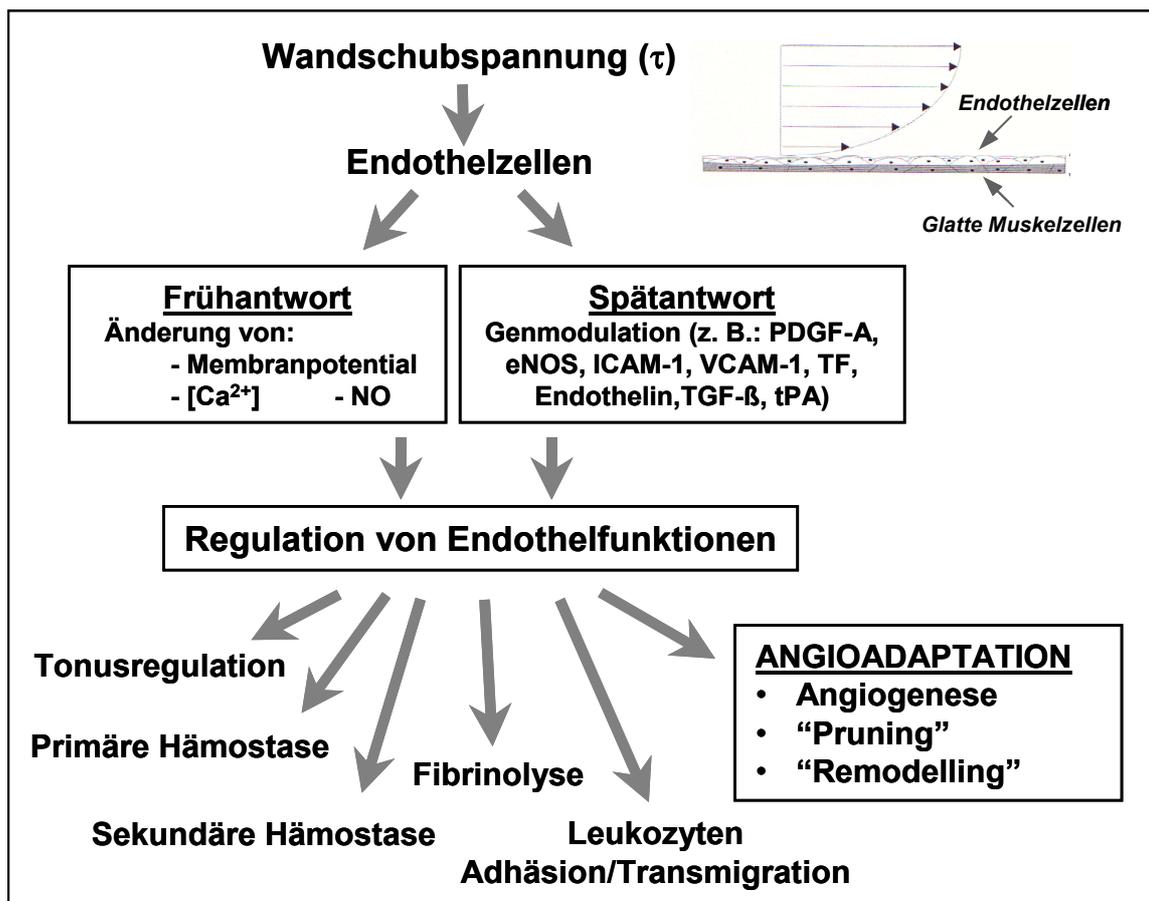


# 1 Einleitung

## 1.1 Blutströmung, Endothelzellen und vaskuläre Adaptation

Die hämodynamischen Kräfte die durch die Blutströmung auf die Gefäßwand einwirken, haben eine entscheidende Bedeutung für die Steuerung verschiedener adaptiver Prozesse des vaskulären Systems (Skalak und Price, 1996; Cowan und Langille, 1996; Papadaki und Eskin, 1997; Zakrzewicz et al., 2002; Resnick et al., 2003; Pries et al., 2003). Aufgrund ihrer Position als Barriere zwischen dem strömenden Blut und der stationären Gefäßwand können Endothelzellen hämodynamische Veränderungen registrieren und verarbeiten. Die Antwort von Endothelzellen auf diesen physikalischen Stimulus stellt das Schlüsselglied für kurzfristige wie langfristige Adaptationsvorgänge des Gefäßsystems dar (Abb. 1-1).



**Abb. 1-1 Wandschubspannungsabhängige Regulation von Endothelfunktionen**  
eNOS: endothelial NO-Synthase; PDGF: platelet derived growth factor; TF: Gewebefaktor; TGF- $\beta$ 1: transforming growth factor  $\beta$ 1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule; ICAM-1: intercellular adhesion molecule; tPA: Gewebsplasminogenaktivator

Für die Vermittlung der langfristigen vaskulären Adaptation ist vor allem die Veränderung der endothelialen Genexpression durch Einwirkung der Blutströmung relevant. Es ist eine erhebliche Anzahl von Genen beschrieben worden, deren Expression durch Einwirkung hämodynamischer Kräfte (insbesondere durch Wandschubspannung) moduliert wird. Durch diese veränderte Genexpression können Endothelzellen verschiedene vaskuläre Funktionen (wie Angioadaptation, Gerinnung, Komplementaktivierung) steuern und so das vaskuläre System den veränderten hämodynamischen Bedingungen anpassen. In dieser Arbeit wurde speziell die Rolle der strömungsabhängigen Genexpression für die Vermittlung von wandschubspannungsregulierten angioadaptiven Prozessen, insbesondere für die Angiogenese, untersucht.

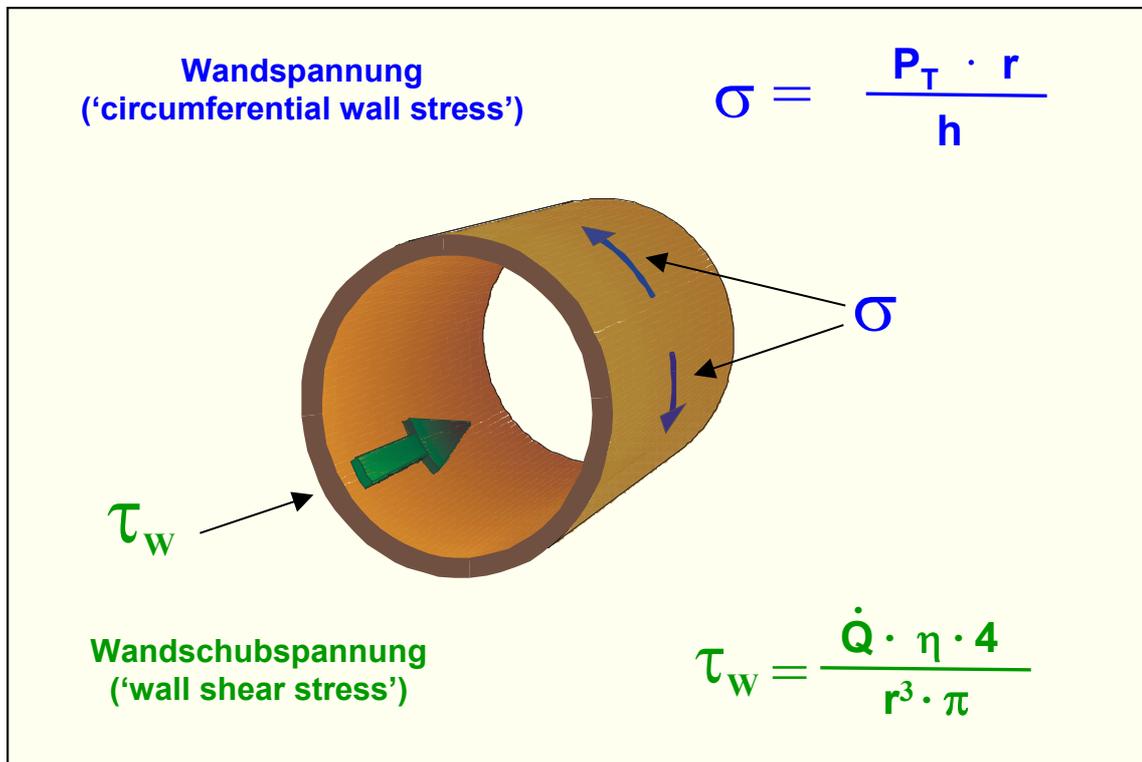
## **1.2 Auf Endothelzellen wirkende hämodynamische Kräfte**

Von den durch die Blutströmung erzeugten Kräften, können zwei eine Bedeutung für die endothelvermittelte Steuerung der vaskulären Adaptation haben (Dobrin et al., 1989) (Abbildung 1-2):

- die Dehnungskräfte, die in der Gefäßwand in zirkulärer Richtung eine Wandspannung ( $\sigma$ ) erzeugen,
- die Wandschubspannung ( $\tau$ ), die durch das strömende Blut auf die Gefäßwand in Richtung der Längsachse des Gefäßes ausgeübt wird.

Die Endothelzellen sind für die Aufnahme der Wandspannung aufgrund ihres geringen Anteils am Aufbau des Gefäßwandquerschnitts nur bedingt geeignet. Mit Ausnahme von Kapillaren wird die Wandspannung im Wesentlichen durch die Lamina propria aufgenommen (Barakat und Davies, 1998). Die Wandspannung ist somit vermutlich nicht das Schlüsselsignal für durch endothelvermittelte vaskuläre Adaptation. Die durch Herzfrequenz und Blutdruckamplitude erzeugte rhythmische Dehnung (Stretch) wird jedoch auf das Endothel übertragen (Davies und Tripathi, 1993). Es sind jedoch bis heute weniger stretchabhängige als wandschubspannungsabhängige Gene beschrieben worden. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß für die meisten stretchabhängig regulierten Gene auch eine

Abhängigkeit von Wandschubspannung nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus werden durch Wandschubspannung Änderung der Zellmorphologie induziert, die bei Einwirken von Stretch nicht zu beobachten sind (Davies und Tripathi, 1992).



**Abb. 1-2 Auf Endothelzellen wirkende hämodynamische Kräfte**

$P_T$ : Druckgefälle (transmural);  $r$ : Radius;  $h$ : Wanddicke;  $Q$ : Blutvolumenstrom;  $\eta$ : Viskosität.

Wandschubspannung wird durch den Blutvolumenstrom an der luminalen Seite des Endothels erzeugt und wirkt daher direkt auf dieses ein. Der Blutvolumenstrom einer Gefäßprovinz ist diejenige Größe, die durch die Adaptation der Gefäßgeometrie (Durchmesser und Länge) und Gefäßtopologie (Verzweigungsstruktur des Netzes) kurz- und langfristig reguliert werden muß. Seine Änderung hat eine direkt proportionale Änderung der Wandschubspannung zur Folge. Darüber hinaus zeigt die mathematische Simulation der Durchmesseränderung von Blutgefäßen, dass die Wandschubspannung auch in mikrovaskulären Gefäßnetzwerken hierfür der quantitativ wichtigste Trigger ist (Pries et al., 2003). Insgesamt ist also die Wandschubspannung der geeignetste

hämodynamische Parameter, um die Anpassung des Blutgefäßes an Perfusionsänderungen zu vermitteln.

### 1.3 Wandschubspannung im Gefäßsystem

Das Spektrum der Wandschubspannung im Gefäßsystem reicht von unter 1 dyn/cm<sup>2</sup> bis zu 100 dyn/cm<sup>2</sup> (Nerem et al., 1998). Die höchsten Werte treten an Bifurkationen von großen zentralen Arterien auf. Entlang der arteriellen Strombahn bis in die Kapillaren erfolgt dann ein starker Abfall auf Werte von ein bis zwei dyn/cm<sup>2</sup>, wobei insbesondere in der Mikrozirkulation große Abweichungen vom Mittelwert auftreten (Pries et al., 2000). In den Venolen am Anfang des venösen Systems werden die niedrigsten Werte beobachtet (Nerem et al., 1998). Die in der Versuchsanordnung gewählte Wandschubspannung von 6 dyn/cm<sup>2</sup> ist ein *in vivo* in vielen Gefäßprovinzen anzutreffender mittlerer Wert.

Wenn eine Newtonsche Flüssigkeit durch ein starres Rohr mit rundem Querschnitt fließt, dann resultiert ein Volumenstrom in Abhängigkeit von Durchmesser und Länge des Rohres, von der Druckdifferenz und von der inneren Reibung der Flüssigkeit, d.h. von der Viskosität (Poiseuille, 1828), soweit laminare Strömung herrscht. Dieses ideale System ist weit von der Situation im Kreislauf entfernt. Die Gefäße sind weder rund noch starr und haben Bifurkationen, der Blutfluss erfolgt pulsatil. Die Viskosität des Blutes ist eine Funktion des Gefäßdurchmessers, des Hämatokrits und des Schergrades (Pries et al., 1992).

Üblicherweise werden turbulente Strömungsbedingungen gewählt, um die Hypothese zu unterlegen, dass turbulenter Blutfluss an arteriellen Bifurkationen pathophysiologische, arteriosklerotische Vorgänge hervorruft (Gimbrone et al. 2000; Berk et al. 2001). Solche Regionen werden als „lesion-prone-areas“ bezeichnet. Im Unterschied dazu herrschen in Bereichen mit einfacher Gefäßarchitektur, wie zum Beispiel in den tubulären Abschnitten der Aorta und ihren großen Ästen sowie weiten Bereichen der Mikrozirkulation, vorwiegend laminare Strömungen. Diese Abschnitte werden als „lesion-protected-areas“ bezeichnet (Zarins et al., 1983). Es wurden verschiedene Gene beschrieben, die durch laminare, nicht jedoch durch turbulente Strömung aktiviert werden können

(Topper et al., 1996). Den zugehörigen Proteinen wird eine arterioprotektive Wirkung zugeschrieben, die bei turbulenter Strömung folglich nicht entfaltet werden kann. Aus diesen Gründen stellt Wandschubspannung mit einem mittleren Wert von  $6 \text{ dyn/cm}^2$  im Vergleich zwischen laminaren und turbulenten Strömungsbedingungen ein geeignetes Modell dar, um typische *in vivo*-Bedingungen zu simulieren.

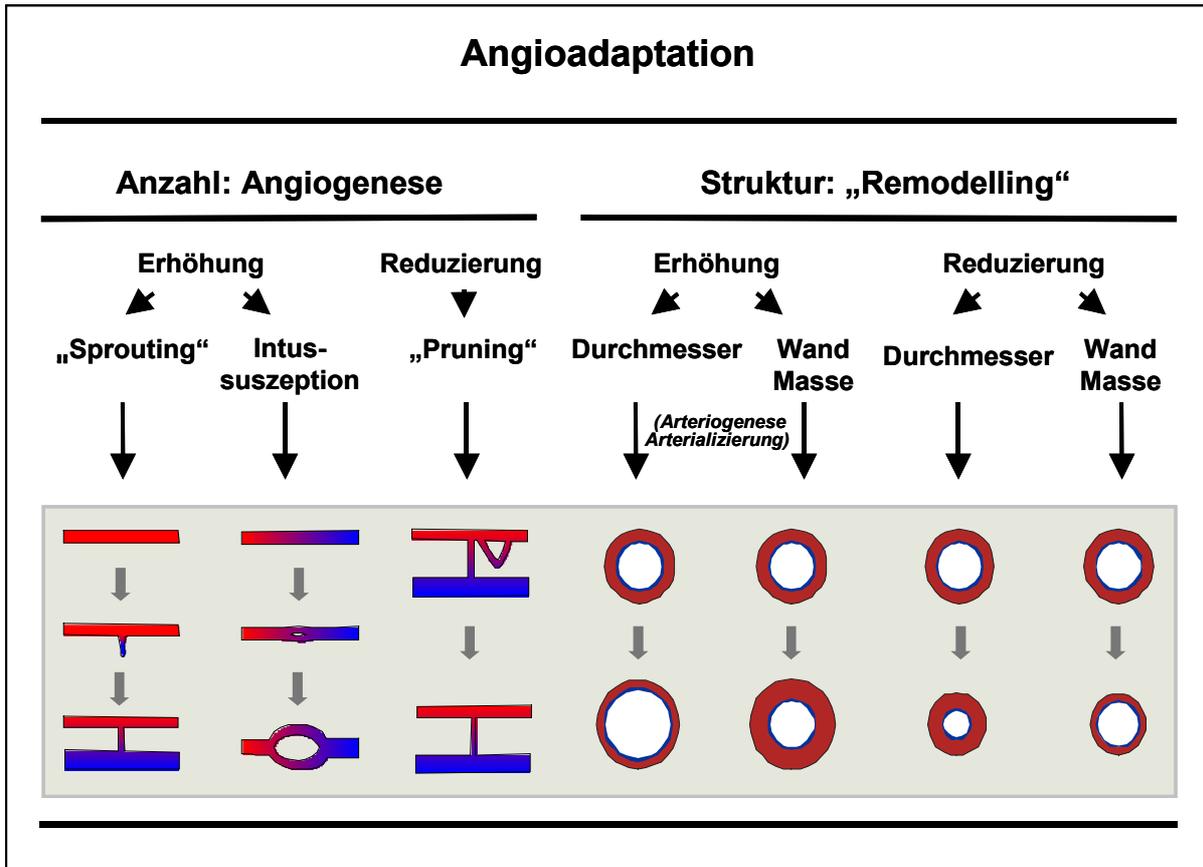
#### **1.4 Konzept und Mechanismen der strömungsvermittelten Angioadaptation**

Die Adaptation des Gefäßsystems ist ein sehr komplexer Prozess und erfolgt als Reaktion auf Änderungen sowohl der hämodynamischen als auch metabolischen Bedingungen. Die entscheidende Rolle der Wandschubspannung für die Regulation der Gefäßanpassung ist eindeutig belegt (Cowan und Langille, 1996; Zakrzewicz et al. 2002; Resnick et al., 2003; Pries et al. 2003).

Kurzfristig führt die Anpassung von Blutgefäßen an Änderungen der Wandschubspannung über die Tonusregulation der Gefäßwand zur schnellen Umverteilung des Blutvolumenstroms. In dieser Phase spielt die Ausschüttung vasoaktiver Substanzen, die im Endothel selbst gebildet werden, den Vasotonus regulieren und die Thrombozytenaggregation im gut perfundierten Gefäß herabsetzen, eine wichtige Rolle. Zu diesen als Autakoide bezeichneten Substanzen gehören Prostanoide, insbesondere Prostaglandin  $I_2$ , freie Radikale wie Stickoxid (NO) und Superoxidanionen ( $O_2^-$ ), das Polypeptid Endothelin-1 (ET-1) und ein noch nicht eindeutig identifizierter Faktor, der als EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) bezeichnet wird. (Berthiaume und Frangos, 1992; Malek und Izumo, 1992; Kuchan and Frangos, 1994; Busse et al. 2002)

Neben dieser kurzfristigen Anpassung über die Tonusregulation erfordert die langfristige Bedarfsanpassung den Umbau von Blutgefäßnetzwerken. Dazu gehört die Neubildung von Blutgefäßen (Vaskulogenese, Angiogenese), der Untergang nicht mehr benötigter Blutgefäße („Pruning“) 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 (Abb. 1-3).



**Abb. 1-3 Mechanismen der strömungsvermittelten Angioadaptation**

### 1.4.1 Angiogenese

Zunächst galt die Neubildung von Blutgefäßen aus bereits bestehenden Kapillaren und Venolen als auf die Embryonalentwicklung beschränkt (Risau, 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, et al., 2000) und bei Muskeltraining (Hudlicka et al., 1992). Die Angiogenese kann durch Aussprossung (sprouting) oder Gefäßteilung (Intussuszeption) stattfinden.

Angiogenese durch Gefäßsprossung erfordert den koordinierten Ablauf mehrerer unterscheidbarer zellulärer Funktionen (Conway 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 (Ferrara, 2001). Durch Blockade des endothelialen Tyrosin-Kinase-Rezeptors Tie-2 durch seinen endogenen Antagonisten Angiopoietin-2 (Ang-2) und durch Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMP) wird der Zellverbund der Gefäßwand gelockert und die extrazelluläre Matrix aufgelöst.

Unter dem Einfluß von VEGF, „fibroblast growth factors“ (FGF) und ihren endothelialen Rezeptoren, wachsen die Endothelzellen sehr schnell (Hanahan, 1997) und migrieren, um eine Gefäßsprosse zu bilden. Die Gefäßsprossung wird durch VEGF, Angiopoietin-1 und Adhäsionsmoleküle, insbesondere Integrine, vermittelt. Integrine ( $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ) sind, in Wechselwirkung mit der Extrazellulärmatrix, auch an der anschließenden Bildung des Gefäßlumens beteiligt (Brooks et al., 1994; Witzensbichler et al., 1998). 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 et al., 1999).

Die zweite Form der Angiogenese ist die Intussuszeption. Angiogenese durch Intussuszeption wurde ursprünglich für die embryonale Entwicklung der Lunge beschrieben (Burri und Djonov, 2002). Im adulten Tier findet die durch Prazosin induzierte Angiogenese im Skelettmuskel überwiegend durch diesen Mechanismus statt (Zhou 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 endotheliale Proliferation bleibt begrenzt. Beide Mechanismen, Sprouting sowie Intussuszeption bzw. unorthodoxe Angiogenese, können sich auch parallel in demselben Gewebe vollziehen.

### **1.4.2 Pruning**

Für die Angioadaptation ist der Untergang nicht benötigter Blutgefäße („pruning“) genauso bedeutsam wie die Neubildung oder der Umbau von Blutgefäßen. Der Untergang von Blutgefäßen beim sich entwickelnden Embryo und bei der Involution des Gelbkörpers ist lange bekannt.

Während der Embryogenese werden die aus dem primären vaskulären Plexus im Überschuß ausgebildeten Gefäßen durch Pruning auf das notwendige Maß reduziert. Zugleich können vorhandene Blutgefäße im Rahmen der funktionellen Anpassung in Länge, Durchmesser und Verlauf abgeändert, remodelliert werden. Die molekularen Mechanismen des Pruning sind bislang noch ungeklärt (Risau, W., 1997)

### **1.4.3 Arteriogenese**

Eine andere Form der Angioadaptation ist die Arteriogenese. Arteriogenese bezeichnet die Bildung von Kollateralen nach der Okklusion von Leitungsgefäßen (Buschmann und Schaper, 1999). Diese Form der Angioadaptation kommt ohne eigentliche Gefäßneubildung sondern durch Anpassungsmechanismen der vor- und nachgeschalteten Gefäße hinsichtlich Durchmesser und Wandstruktur zustande. 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.

## **1.5 Mechanotransduktion in Endothelzellen**

Der Prozess, durch den hämodynamische Stimuli in biochemische Signalkaskaden in Endothelzellen übersetzt werden, wird als Mechanotransduktion bezeichnet (Davies, 1995). 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 et al., 1988), G-Proteinen (Simon et al., 1991) und Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (Takahashi und Berk, 1996). Die „dezentralisierte“ Form beschreibt einen Mechanismus der Mechanotransduktion, bei dem das Zytoskelett die Aufgabe der Signaltransmission an intrazelluläre Strukturen übernimmt. Extrazelluläre Adhäsionsmoleküle wie Cadherine, Selektine, Integrine und cell-adhesion-molecules (CAMs) veranlassen durch ihre Bindung die Aufrechterhaltung der Grundspannung innerhalb des Zytoskelettes, („Tensegrity“-Modell: Ingber et al., 1994). Ändert sich die Grundspannung werden die mit dem Zytoskelett assoziierten Strukturen (Membranproteine, Zell-Zell-Verbindungen, Focal Adhesions und der Zellkern) aktiviert und an die Signalverarbeitung angeschlossen.

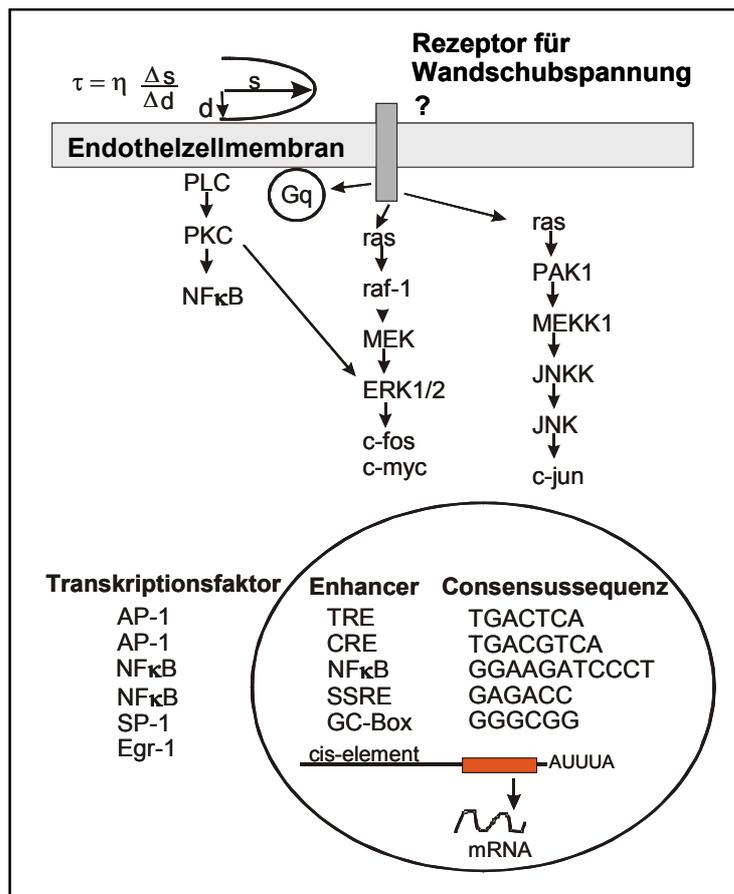
Durch Wandschubspannung können verschiedene Signaltransduktionskaskaden ausgelöst werden (Abb. 1-4). Als deren wichtigste Bestandteile gelten Proteinkinase C, mitogen-aktiviert-protein-kinase-1 (MAPK-1), extracellular-related-kinase-1 und 2 (ERK 1/2) und c-jun-NH<sub>2</sub>-terminal-kinase (JNK-2) (Braddock et al., 1998).

Von diesen Kinasen werden Transkriptionsfaktoren („third messengers“) aktiviert, die ihrerseits die Expression von sogenannten „immediate early response genes“ (IERG) induzieren (Ishida et al., 1997). Die IERGs regulieren wiederum die Expression der „late response genes“.

Zu den durch Wandschubspannung regulierten Transkriptionsfaktoren gehören „Nuklear-Faktor-Aktivator-Protein-1“ (AP-1), Nuklear-Faktor-Kappa-B (NFκB) (Lan et al., 1994) und „early growth response-1“ (egr-1) (Braddock et al., 1998). Weiterhin wurde eine Ets-Familie beschrieben, deren einer Vertreter, Elk-1, durch erhöhte Wandschubspannung aktiviert, während Ets-1 gehemmt wird (Lelièvre et al., 2001).

Viele endotheliale Gene enthalten in ihren Promotorregionen Erkennungssequenzen für diese Moleküle. AP-1 assoziiert mit zwei verschiedenen

cis-Elementen, nämlich mit dem „tumor promoting response element“ (TRE) und mit dem „cAMP Response Element“ (CRE). NFκB ist Transkriptionsfaktor für das PDGF-B-Gen, dessen Transkriptionsrate durch laminare Strömung erhöht wird (Hsieh et al., 1991). Die Enhancer-Sequenz GAGACC, als „shear stress response element“ (SSRE) bekannt, ist für die Transaktivierung verantwortlich (Resnick et al., 1993). Egr-1 („early growth response-1“) wird vermutlich durch die MAP-Kinase-1 aktiviert und bindet an drei „serum response“ Elemente (SREs).



**Abb. 1-4 Wandschubspannungsaktivierte Signalwege**

Wandschubspannungsaktivierte Signalwege, die die Transkription von Genen regulieren. Modifiziert und ergänzt nach Papadaki und Eskin, 1997.

Elk-1 (Ets-Familie) induziert die Expression von egr-1 und erhöht dadurch die Transkriptionsrate des PDGF-A Gens, welches in seiner Promotorregion ein SSRE besitzt mit dem egr-1 interagiert (Khachigian et al., 1997; Schwachtgen 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 et al., 2001).

## 1.6 Wandschubspannungsregulierte Genexpression

Die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden durch Wandschubspannung bewirkt die Modulation der Expression zahlreicher „late response“ Gene. Tabelle 1-1 gibt eine Übersicht über die bis jetzt bekannten wandschubspannungsregulierten Gene.

**Tab. 1-1 Durch Wandschubspannung regulierte Gene in Endothelzellen**

<b>Gen</b>	<b>Stimulus</b>	<b>Verlauf</b>	<b>Funktion</b>	<b>Literatur</b>
ACE	20 dyn/cm <sup>2</sup>	Inhibition nach 8 h	Aktivator des RAAS	Rieder et al., 1997
Angiopietin-2	6 dyn/cm <sup>2</sup>	Inhibition nach 24 h	Angiogeneseinhibitor	Bongrazio et al., 2000
Bax, Bak	15-30 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 24 h	Antiapoptotisch	Bartling et al., 2000
Bcl-X <sub>L</sub> , FasExo6Del	15-30 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 24 h	Antiapoptotisch	Bartling et al., 2000
bFGF	15/36 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 24 h	Proteinsynthese	Malek und Izumo, 1992
COX-1	24 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 1 h, dann Inhibition.	Vasodilation, Antikoagulation	Okahara et al., 1998
COX-2	24 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 1 h,	Vasodilation	Okahara et al., 1998
c-fos, c-myc, c-jun, erg-1	4-25 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 0.5 h	Transkriptionsfaktor	Hsieh et al., 1993
CNP	5/15 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 4/24 h	Gefäßrelaxation	Chun et al., 1997
Endothelin-1	5-20 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion (30 min) und Inhibition (24h)	Vasokonstriktor	Malek und Izumo, 1992
eNOS	3-9 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 1h	NO-Synthese	Topper et al., 1996
Gas-3	6 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 24 h	Zellzyklusregulation	Bongrazio et al., 2000
HSP 70	4,1 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 4 h	Hitzeschock-Protein	Hochleitner et al., 2000
ICAM-1	2,5-46 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 8-48 h	Leukozyten-adhäsion	Nagel et al., 1994
MCP-1	16 dyn/cm <sup>2</sup>	biphasische Induktion nach 1,5 und 2,5 h	Chemotaxis von Monozyten	Shyy et al., 1994
Mn-SOD	10 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 1 h	Antioxidans	Topper et al., 1996
p11-calpactin	6 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 24 h	Exozytoseregulation	Bongrazio et al., 2000
PDGF-A	0-51 dyn/cm <sup>2</sup>	Transiente Induktion (1,5h)	Wachstumsfaktor und Vasokonstriktor	Hsieh et al., 1991
PDGF-B	0-51 dyn/cm <sup>2</sup>	Transiente Induktion (1,5h)	Wachstumsfaktor und Vasokonstriktor	Hsieh et al., 1991
TF	12 dyn/cm <sup>2</sup>	Transiente Induktion (4 h)	Hämostase	Lin et al., 1997
TGF-β1	20 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 2 h	Inhibitor der Prolif.	Ohno et al., 1995

SMAD 6,7	10 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 24 h	TGF-β1 Regulation	Topper et al., 1997
Thrombo-modulin	ab 15 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 2 h, Inhibition nach 9 h	Antithrombose	Malek et al., 1994
TPA	15/25 dyn/cm <sup>2</sup>	Induktion nach 24 h	Fibrinolyse	Diamond et al., 1990
VCAM-1	0-7,2 dyn/cm <sup>2</sup>	Inhibition nach 1 h	Leukozyten-adhäsion	Ohtsuka et al., 1993

ACE, angiotensine converting enzyme; bFGF, fibroblast growth factor; COX, cyclooxygenase, ICAM-1, intercellular adhesion molecule; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; Mn-SOD, manganese superoxide dismutase; eNOS, endothelial NO-Synthase; PDGF, platelet derived growth factor; TF, Gewebefaktor; TGF- β1, transforming growth factor β1; tPA, Gewebsplasminogenaktivator; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule; RAAS, Renin-Angiotensin I-II-System.

Die Veränderung der Expression dieser Gene kann bezüglich der Art (Induktion/Suppression), der Dauer (transient/permanent) und dem Strömungstyp (laminar/turbulent) sehr unterschiedlich sein. Während beispielsweise die Expression der mRNA von tissue factor (TF) durch Strömungsexposition induziert wird (Diamond et al., 1990), wird die mRNA von „vascular cell adhesion molecule“ (VCAM)-1 bei Strömungsexposition vermindert exprimiert (Ando et al., 1994). Die Zeitabhängigkeit der Regulation der Expression durch Strömungsbedingungen zeigt für einzelne Gene charakteristische Muster. Das IERG c-fos wird innerhalb von weniger als einer Stunde stark exprimiert und fällt dann wieder auf seine ursprüngliche Transkriptionsrate ab. (Hsieh, 1993; Nishida et al., 1992). Die mRNA von platelet derived growth factor (PDGF)-B erreicht ihr Maximum nach 90 Minuten (Hsieh et al., 1991). Erst nach mehreren Stunden kehrt die Transkriptionsrate wieder zu ihrem Ausgangswert zurück. Die Regulation der wandschubspannungsabhängigen Genexpression in Endothelzellen ist auch von Stärke und Typ der applizierten Strömung abhängig. Als Beispiele gelten „intercellular adhesion molecule“ (ICAM)-1 dessen Expression über einen weiten dynamischen Bereich mit steigender Wandschubspannung erhöht wird (Tsuboi et al., 1995) und Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) die durch laminare aber nicht durch turbulente Strömung induziert wird (Topper et al., 1996).

Die bisher beschriebene wandschubspannungsabhängige Modulation der endothelialen Genexpression wurde mit der Regulation verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Prozesse in Verbindung gebracht (Topper und Gimbrone, 1999.). Bezüglich der Angioadaptation befinden sich unter den bekannten wandschubspannungsregulierten Genen einige

Wachstumsfaktoren die einen Teil der strömungsinduzierten Veränderung des Gefäßbettes mitbewirken könnten. Um die Vielzahl der Prozesse, die zur Angioadaptation gehören, erklären zu können, muss jedoch darüber hinaus auch die Existenz bislang nicht entdeckter wandschubspannungsregulierter angiogener bzw. anti-angiogener Substanzen vermutet werden. Zu der Vielzahl der Moleküle, die eine Rolle bei der Regulation der Angiogenese spielen können, gehören die Thrombospondin Type-1 Repeat (TSR)-haltigen Proteine. Die meisten Mitglieder dieser Familie werden als anti-angiogene Moleküle eingestuft.

### 1.7 Thrombospondin Type 1 Repeat (TSR) Familie

Das Thrombospondin Type-1 Repeat (TSR), früher als Properdin Repeat bekannt, ist erstmals 1986 von Lawler und Heynes beschrieben worden. Alle Proteine, die eine solche Repeats aufweisen, gehören zur sogenannten TSR Familie (Tab. 1-2).

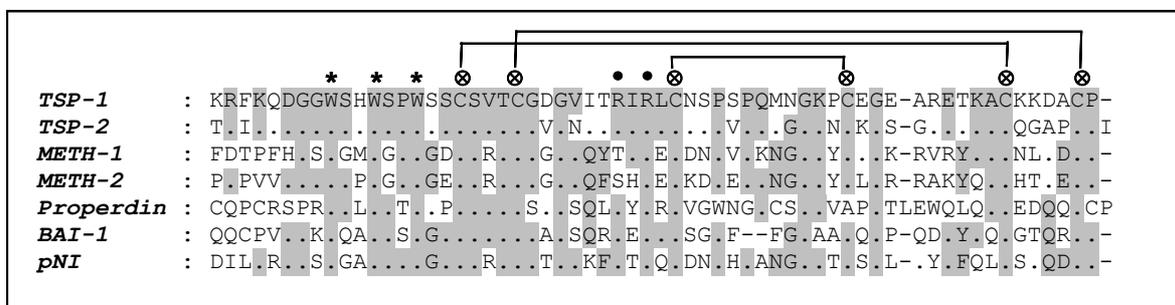
**Tab. 1-2 Wichtige Proteine der Thrombospondin Type-1 Repeat Familie**

<b>Name</b>	<b>TSR-Anzahl</b>	<b>Merkmale</b>	<b>Rolle bei der Angiogenese</b>
Thrombospondin-1	3	Multifunktionell Extrazelluläre Adhäsion Protein	Inhibitor/ Aktivator
Thrombospondin-2	3	Multifunktionell Extrazelluläre Adhäsion Protein	Inhibitor
METH-1 (h)/ ADAMTS-1 (m)	3	Matrix Metalloproteinase	Inhibitor
METH-2 (h)/ ADAMTS-8 (m)	2	Matrix Metalloproteinase	Inhibitor
Prokollagen I N-Proteinase /ADAMTS-2 (m)	4	Prokollagen Verdauung	Unbekannt
Brain Specific Angiogenic Inhibitor-1	5	p53 induziert Gene in gliale Tumoren	Inhibitor
Properdin	6	Regulator der Alternativer Weg der Komplement Aktivierung	Keine
C6, C7, C8A, C8B, C9	3, 2, 2, 2, 1/2	Komponente der Membrane Attacke Komplex (Komplement)	Keine
F-Spondin	6	Regulation von Wachstum und Wegleitung vom Axonen	Keine
Semaphorin 5A, Semaphorin 5b	6	Mögliche Rolle als positive Axonal Signalstoff	Unbekannt

Plasmodium circumsporozoite Protein	1	Oberfläche Antigen von Sporozoite	Keine
Plasmodium TSP-related anonyms Protein (TRAP)	1	Erkennung und Eingriff von Speicheldrüse bei Sporozoite	Keine

(h) = Mensch      (m) = Maus

Thrombospondin Type 1 Domänen haben eine Länge von 55-60 Aminosäuren, wovon einige Positionen hoch konserviert sind: ein hydrophobisches Cluster mit 3 konservierten Tryptophanen (WxxWxxW), ein basisches Cluster mit 2 konservierten Argininen und 6 konservierte Zysteine die 3 Disulfidbrücken bilden (Abb. 1-5).

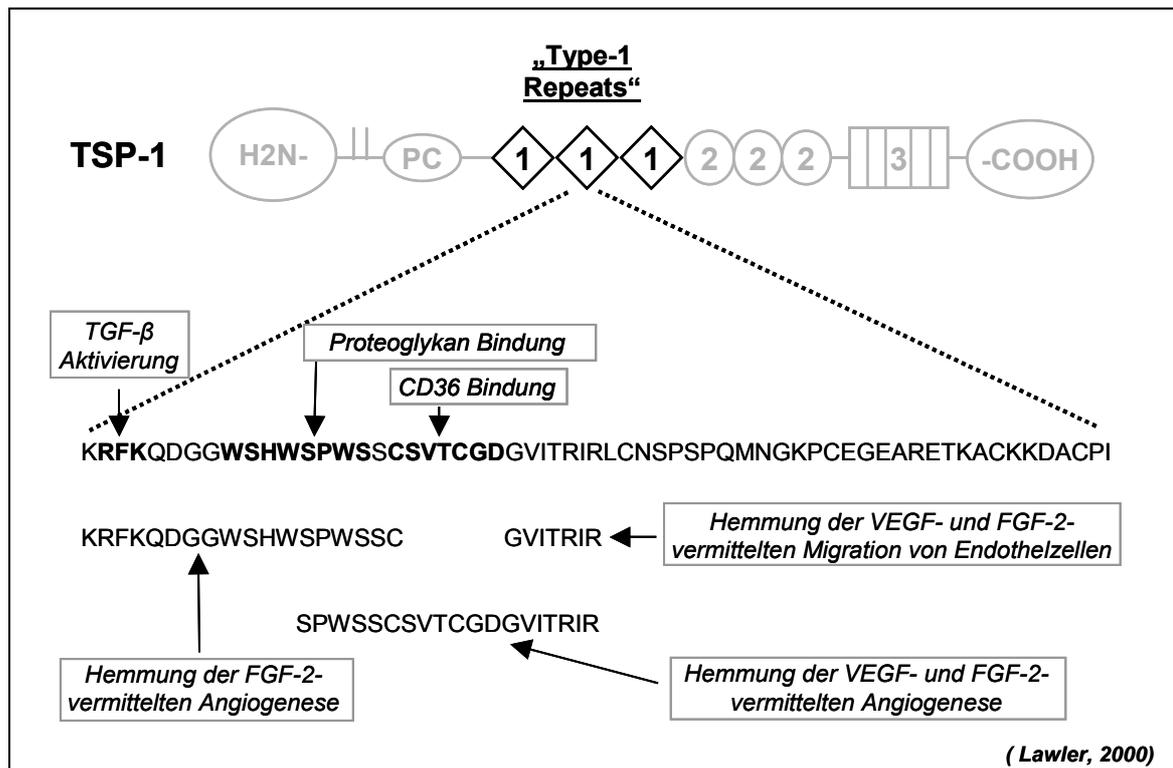


**Abb. 1-5 Homologie zwischen Thrombospondin type 1 Repeat (TSR) von verschiedenen Mitgliedern der TSR Familie.**

•: Hydrophobisches Cluster mit 3 konservierten Tryptophanen (WxxWxxW); •: basisches Cluster mit 2 konservierten Argininen (R); ⊗: konservierte Zysteine (C) und Disulfidbrücken

Die Funktionen der TSR von Thrombospondin-1 (TSP-1) sind am besten charakterisiert (Abb. 1-6). Diese Sequenz kann Heparin binden, latente Formen von TGF-β binden/aktivieren, CD36 binden, Endothelzell-Migration und Angiogenese inhibieren (Lawler, 2000). Die TSR in TSP-1 dienen auch als Bindungsstelle für Matrix Metalloproteinase-2 (MMP2) und hemmen ihre enzymatische Aktivität (Bein und Simons, 2000).

Die Funktion von TSR in anderen Proteinen ist zum Teil noch nicht untersucht worden. Es ist aber auffällig, dass viele dieser Proteine eine Rolle als Inhibitoren der Angiogenese aufweisen (Tab. 1-2). Rekombinante Fusionsproteine mit TSR von TSP-1, Properdin, METH-1 und METH-2 wurden in einem Angiogenese Assay, der Chorion-Allantois-Membran (CAM) des Hühnereis untersucht (Iruela-



#### Abb. 1-6 Funktionen der TSR-Domänen in Thrombospondin-1

TGF- $\beta$ 1: transforming growth factor  $\beta$ 1; VEGF: vascular endothelial growth factor; FGF: fibroblast growth factor.

Arispe et al., 1999). TSP-1-, METH-1- und METH-2-Fusionsproteine haben dabei in unterschiedlichem Maße die VEGF- und FGF-2-induzierte Angiogenese inhibiert, während das Properdin Konstrukt keine Effekte zeigte. Dieser Befund deutet darauf hin, dass sich TSRs trotz ihrer hohen Homologie funktionell voneinander unterscheiden und dass Unterschiede in der Primärstruktur des TSR-haltigen Proteins oder eventuell Nachbarsequenzen der TSR eine Rolle spielen, um die Hemmung der Angiogenese zu vermitteln.

Es gibt eine Reihe von Untersuchungen in Endothelzellen, die der Interaktion von TSR von TSP-1 und dem Zellrezeptor CD36 eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung anti-angiogener und pro-apoptotischer Aktivität zuschreiben. Es ist nicht bekannt, ob auch die anderen TSR-haltigen anti-angiogenen Proteine diesen Effekt über CD36 auslösen.

Zu den TSR-haltigen Proteinen, die eine Rolle bei der Hemmung der Angiogenese aufweisen, gehören Thrombospondine (TSP-1 und -2), Metallospodine (METH-1

und -2, Prokollagen I N-Proteinase) und Brain Specific Angiogenic Inhibitor (BAI)-1.

### **1.7.1 Thrombospondine (TSP)**

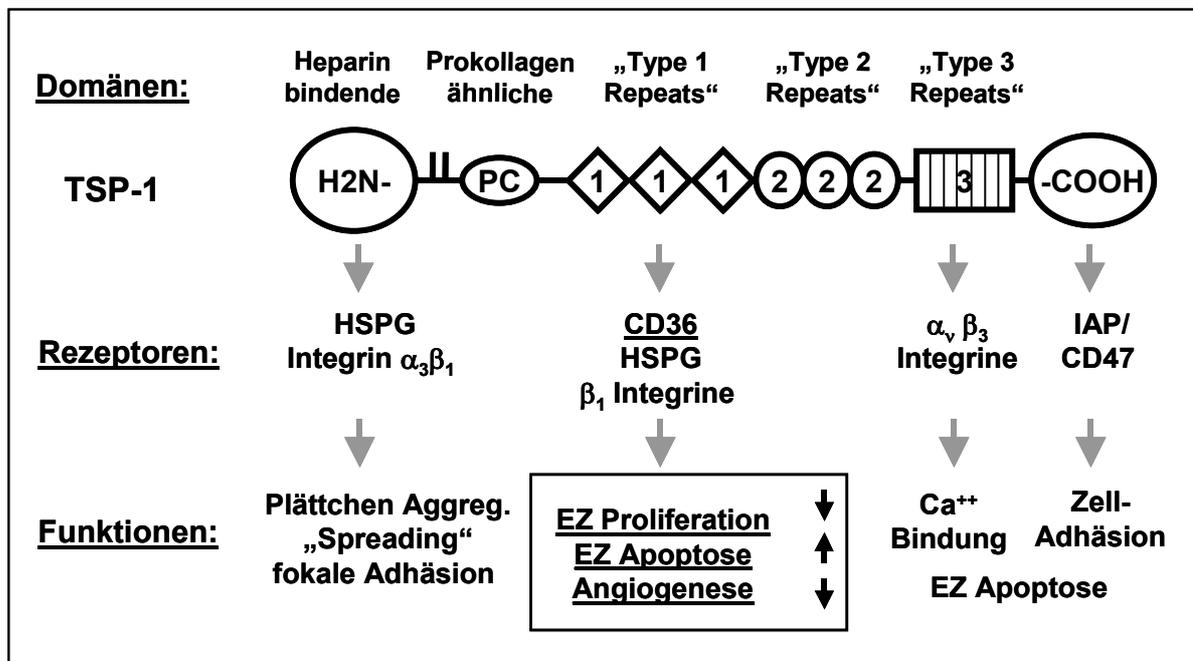
Zu der Thrombospondin Familie gehören fünf Proteine: TSP-1, TSP-2, TSP-3, TSP-4 und COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) (Adams, 2001). Alle Thrombospondine sind multimere Glykoproteine, die an der Zelloberfläche oder in der extrazellulären Matrix ihre Funktion ausüben. Von den fünf bekannten Thrombospondinen verfügen nur TSP-1 und TSP-2 über TSR Sequenzen.

#### **1.7.1.1 Thrombospondin-1 (TSP-1)**

Thrombospondin-1 (TSP-1) wurde zunächst als Protein, das nach Thrombin-Stimulation aus Thrombozyten freigesetzt wird, identifiziert (Baenziger et al., 1971). TSP-1 ist weit verbreitet im Organismus und wird von vielen Zelltypen, wie glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Gliazellen und Endothelzellen sezerniert. Die Expression von TSP-1 wird durch Hitzeschock und Hypoxie (Pehlan et al, 1998), durch die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- $\beta$  und bFGF sowie durch das p53 Tumor Suppressor Genprodukt (Dameron et al., 1994) und Progesteron (Iruela-Arispe 1996) erhöht, durch IL-1 $\beta$ , TNF-alpha vermindert (Mettouchi et al., 1994). Die Expression von TSP-1 ist mit der Wundheilung und mit chronischen entzündlichen Gefäßprozessen assoziiert (Lymn et al., 1999).

Die molekulare Charakterisierung zeigt TSP-1 als ein homotrimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 420 kDa. Jede Untereinheit besitzt je eine globuläre Domäne am Aminoterminus, gefolgt von einer Prokollagen-homologen Region, einem Abschnitt aus drei Type-1-Repeats (TSR), drei Type-2-Repeats (EGF-artig), sieben Type-3-Repeats und einem globulären Karboxyterminus (Abb. 1-7).

Mit den strukturell unterscheidbaren Domänen des TSP-1-Moleküls sind entsprechend unterschiedliche und vielgestaltige Funktionen verbunden, die von dem Molekül über verschiedene Rezeptoren vermittelt werden (Lawler, 2002).



**Abb. 1-7 Thrombospondin-1: Domänen, Rezeptoren und die zugeordneten Funktionen.** HSPG: Heparan-sulfat-proteo-glykane; IAP: integrin-assoziiertes Protein; EZ: Endothelzelle.

Der Aminoterminus wird auch als heparin-bindende Domäne bezeichnet und vermittelt Funktionen wie Zellanhaftung, -sprossung und -migration, wie auch die Unterbrechung von Zellkontakten. Weiterhin moduliert er Zellproliferation, 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 folgende Domäne mit Homologie zu Prokollagen (PC-ähnlich) entfaltet angiainhibitorische Funktionen, die über bFGF vermittelt werden, wahrscheinlich durch die Hemmung der Kollagensynthese, die für die Angiogenese benötigt wird.

Mit den Type-1-Repeats-Domänen sind insbesondere die Funktionen Antiangiogenese, Antiproliferation, Induktion von Apoptose, TGF- $\beta$ -Aktivierung, Protein- und Heparin-Bindung, Hemmung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP)

sowie Zellkontakt und Neuritenwachstum verbunden. Als Rezeptoren für diese Aufgaben stehen CD36, HSPG,  $\beta_1$ -Integrine, Sulfatide und ein 60kDa-Protein zur Verfügung.

Die Type-2-Repeats-Domänen erhöhen die Resistenz des Moleküls gegen Proteolyse und können Kalziumionen binden. Type-3-Repeats-Domänen können Kalziumionen binden und sind darüber hinaus Bindungspartner von  $\beta_3$ -Integrinen.

Die Interaktionen des Karboxyterminus werden schließlich über den Rezeptor CD47 bzw. IAP (integrin-assoziiertes Protein) und ein 105/80 kDa-Protein vermittelt. Neben der Unterstützung der Adhäsion unterschiedlichster Zelltypen hat er zellstimulierende und chemotaktische Wirkung und verstärkt die Plättchenaggregation.

Durch die Vielzahl seiner Domänen und ihrer Funktionen hat TSP-1 große Bedeutung für die Regulation sehr unterschiedlicher Prozesse, wie z.B. für Thrombozyten-Aggregation und Angiogenese. Aufgrund zum Teil gegensätzlicher Eigenschaften der verschiedenen Domänen ist die Rolle von TSP-1 in diesen Prozesse nicht immer eindeutig festzulegen. Das ist insbesondere bei der Modulation der Angiogenese der Fall, wobei TSP-1 sowohl anti- als auch als pro-angiogene Wirkungen zeigt.

### ***Ambivalente Rolle von TSP-1 bei der Modulation der Angiogenese.***

TSP-1 wurde als erster natürlich vorkommender Angiogenese-Inhibitor sowohl *in vitro* als auch *in vivo* identifiziert (Good et al., 1990). Die Inhibition der Angiogenese durch TSP-1 erfolgt i. W. durch Hemmung der endothelialen Zell-Migration und -Proliferation sowie durch Induktion der Apoptose (Jimenez et al., 2000).

Entscheidend für die anti-angiogene Wirkung zeigten sich die Type-1-Repeats (TSR) und deren Interaktion mit dem CD36 Rezeptor (Tolsma et al., 1993). Dieses Multiligand-Protein wird auf verschiedene Zelltypen exprimiert und übt sehr unterschiedliche Funktionen aus (Greenwalt et al., 1992; Febbraio et al., 2001). Auf Endothelzellen ist CD36 speziell für die Bindung von TSP-1 zuständig,

wodurch es zur Hemmung der Proliferation, Einleitung der Apoptose und Hemmung der Angiogenese kommt. Die Bindungsstelle für CD36 auf TSP-1 ist in der TSR Region (CSVTCG) lokalisiert (Abb. 1-6) (Greenwalt et al., 1992; Asch et al., 1992). Durch diese Bindung werden Endothelzell-Migration, „tube formation“ *in vitro* (Dawson et al., 1997) und die FGF-2 induzierte Neovaskularisation der Hornhaut *in vivo* (Jimenez et al., 2000) inhibiert. Zusätzlich werden anti-angiogene Effekte von TSP-1 durch Aktivierung der CD36-Fyn-Kaspase-3-p38MAPK-Kaskade vermittelt, die zur Apoptose von Endothelzellen führt (Nor et al., 2000).

Weiterhin können TSR Domänen VEGF binden und dadurch die VEGF-induzierte Proliferation und Angiogenese hemmen (Gupta et al., 1999). Die CSVCTG benachbarten Sequenzen RFK und WSHWSPW sind für die Hemmung der FGF2 induzierten Angiogenese zuständig, während die Sequenz GVITRIR die endotheliale Zellmigration hemmt (Dawson und Bouck, 1999).

Zusätzlich zu den TSR Domänen, kommen auch die „Prokollagen-Region“ sowie in bestimmter Konstellation die carboxy-terminale Region für die Hemmung der Angiogenese in Betracht (Adams, 2001). Eine durch bFGF induzierte Angiogenese kann z.B. über die Inhibition der Kollagensynthese durch die „Prokollagen-Region“ von TSP-1 unterbunden werden.

Obwohl mehrere Studien TSP-1 als anti-angiogen beschrieben haben, wird es in anderen Publikationen als pro-angiogenes Molekül eingeordnet. Mehrere Mechanismen kommen infrage, die pro-angiogene Effekte von TSP-1 vermitteln könnten.

Über die Bindung an CD47/IAP (=integrin assoziiertes Protein) an der carboxy-terminalen bzw. „zellbindenden“ Domäne von TSP-1 kommt es zu zellstimulierenden, proliferativen und chemotaktischen, d.h. migratorischen Effekten (Wang und Frazier, 1998; Nesselroth et al., 2001; Morandi 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 et al., 1999).

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

Einen besonderen Bedeutung kommt TSP-1 durch die Bindung und Aktivierung von latentem TGF- $\beta$  an der TSR Domäne bei der Angiogenese und beim Tumorwachstum zu. Es stellt außerdem für viele Zellarten z. B glatte Muskelzellen, neutrophile Granulozyten, Monozyten, Fibroblasten, Mesangiumzellen, sowie unterschiedliche Tumorzellen, ein hochwirksames Chemotaxin und Zelladhäsionsmolekül dar.

Für die indirekte Modulation/Aktivierung der Angiogenese sprechen ferner Versuche an der explantierten Rattenaorta (Nicosia und Tuszynski, 1994). Hierbei ist TSP-1 indirekt angiogen wirksam, indem es das Wachstum von Myofibroblasten fördert, die ihrerseits heparin-bindende angiogene Faktoren produzieren woraufhin sich Mikrogefäße bilden.

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 und Nicosia, 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 und Nicosia, 1996).

Diese referierten Darstellungen belegen die Fülle an Reaktionsmöglichkeiten des TSP-1-Moleküls sowohl hinsichtlich anti- als auch pro-angiogener Wirkungen. Es sind Parameter beschrieben worden, die darüber Aufschluß geben können, in welche Richtung, pro-oder anti-angiogen, TSP-1 wirkt (Sargiannidou et al. 2001):

- Konzentration des exogenen TSP-1: Niedrige Konzentrationen (1-10  $\mu\text{g/ml}$ ) stimulierten *in vitro* die Angiogenese, während höhere Konzentrationen (>15  $\mu\text{g/ml}$ ) diese hemmten (Qian et al., 1997). Eine gegensätzliche Beobachtung

wurde jedoch von anderen Autoren berichtet (Nicosia und Tuszynski, 1994; Taraboletti et al., 1990).

- Präsenz angiogener Faktoren: bFGF oder TGF- $\beta$  in entsprechend hoher Konzentration resultieren in einer pro-angiogenen Wirkung von TSP-1.
- Grad der Proteolyse: Einige TSP-1 Fragmente können sehr effektive Angiogenese-Stimulatoren sein, während andere dagegen gute Inhibitoren der FGF-induzierten Angiogenese sind.
- Art der Präsentation: Matrix-gebundenes TSP-1 fördert die Adhäsion von Plättchen aber auch von Endothelzellen, Fibroblasten, und glatten Muskelzellen (Tuszynski et al., 1987) und dadurch die Angiogenese. Ist TSP-1 dagegen gelöst, so blockiert die „Integrin-Erkennungssequenz“ (RGD-Sequenz) eines Type 3-Repeat die Integrin  $\alpha_v\beta_3$ -vermittelte Zelladhäsion und hemmt dadurch die Angiogenese.
- Expression der Rezeptoren: Die Funktion von TSP-1 wird durch die Interaktion seiner Domänen mit verschiedenen Rezeptoren vermittelt. Die Anwesenheit oder das Fehlen dieser Rezeptoren auf „target“ Zellen kann entsprechend die Auswirkung von TSP-1 verändern.

#### **1.7.1.2 Thrombospondin-2 (TSP-2)**

Das homotrimere Glykoprotein Thrombospondin-2 wurde 1991 beschrieben (Bornstein et al.). Die Molekularstruktur der Untereinheiten von TSP-2 ist der von TSP-1 sehr ähnlich. Jede Untereinheit besitzt je eine globuläre Domäne am Aminoterminus, gefolgt von einer prokollagenhomologen Region, drei Type-1-Repeats (TSR), drei Type-2-Repeats (EGF-artig), sieben Type-3-Repeats und einer globulären Domäne am Karboxyterminus (Bornstein et al., 2000). Die Interaktionen sowie die möglichen Funktionen dieser Domänen sind für TSP-2 nicht ausführlich untersucht. Aufgrund der Ähnlichkeit der Sequenzen zwischen TSP-1 und TSP-2 wird vermutet, dass die Effekte der zwei Proteine sich ähneln könnten. TSP-2 kann mit Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) interagieren (Yang

et al., 2000) sowie Integrin  $\alpha_v\beta_3$ , Heparan-Sulphat-Proteoglykane (Chen et al., 1994, 1996) und die latente Form von TGF- $\beta$ 1 binden (Schultz-Cherry et al., 1995). Im Gegensatz zu TSP-1 kann TSP-2 den TGF- $\beta$ 1 jedoch nicht aktivieren. Auch die Expression von TSP-1 und TSP-2 ist zeitlich wie räumlich verschieden. Während der Mausembryogenese kommt TSP-2 primär in den Bindegeweben vor. In der adulten Maus wird das Protein nach Gewebeverletzung und in wachsenden Tumoren wieder synthetisiert (Bornstein et al. 2000).

TSP-2 ist bei der Regulation der Angiogenese involviert. Es kann die Migration von Endothelzellen *in vitro* inhibieren und wirkt dem pro-angiogenen Effekt von bFGF in der Hornhaut entgegen (Volpert et al., 1995; Panetti et al., 1997). Zusätzlich inhibiert TSP-2 die Angiogenese in verschiedenen Modellen für Tumorwachstum der Maus (Castle et al., 1997; Streit et al., 1999). TSP-2 defiziente Mäuse zeigen eine vermehrte Kapillardichte in der Dermis, im subkutanen Fettgewebe und im Thymus (Kyriakides et al., 1998). Dieser Effekt ist vermutlich durch die fehlende Hemmung der Entstehung neuer Gefäße bei einem Mangel an TSP-2 bedingt.

### 1.7.2 Metallospandine/ADAMTS

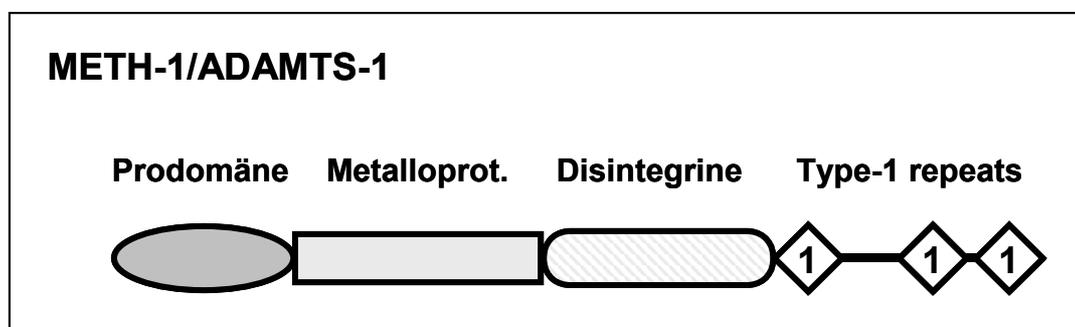
Die doppelte Bezeichnung dieser Proteinfamilie resultiert aus der unterschiedlichen Benennung im Menschen (Metallospandine) und in der Maus (ADAMTS). ADAMTS-1 (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-1) wurde als tumorselektives Gen aus der Zelllinie „murine colon 26 adenocarcinoma“ isoliert (Kuno et al., 1997b). Zwei Jahre später beschrieben Vázquez et al. (1999) das menschliche Ortholog von ADAMTS-1, welches als Metallospandin METH-1 (Metallproteinase mit Thrombospondin Type-1 Domäne-1) bezeichnet wurde. In der gleichen Studie wurde ein weiteres menschliches Ortholog (METH-2) zu ADAMTS-8 beschrieben. Zur Zeit sind etwa neun Mitglieder der ADAMTS Familie in der Maus bekannt (Tang, 2001). Die Molekularstruktur dieser Proteine ist durch Metalloproteinase-, „disintegrin-like“- und Thrombospondin Type-1 (TSR) Domänen charakterisiert. Die Anwesenheit einer variablen Anzahl von TSR am Karboxiterminus unterscheidet die ADAMTS

Proteine von den eng verwandten Proteinen der ADAM Familie (Wolfsberg et al., 1995). Die TSR Domänen sind sowohl für die anti-angiogene Eigenschaft dieser Proteine als auch für die Bindungsfähigkeit und Stabilität der katalytischen Domäne entscheidend. Im Unterschied zu den meist transmembranären ADAM Proteinen werden ADAMTS Proteine sezerniert und das Spektrum ihrer Substrate ist begrenzter.

Von den im Menschen beschriebenen Metallopondinen wurden METH-1/ADAMTS-1 und METH-2/ADAMTS-8 eindeutig als potente anti-angiogene Faktoren beschrieben. Für ein vor kurzem entdecktes weiteres Metallopondin (Prokollagen I N-Proteinase/ADAMTS-2) ist eine Beteiligung bei der Modulation der Angiogenese noch nicht bewiesen.

#### 1.7.2.1 METH-1/ADAMTS-1

Die Molekularstruktur von METH-1/ADAMTS-1 ist in Abbildung 1-8 gezeigt. Es besteht aus einer Prodomäne, einer katalytischen Metalloproteinase Domäne, einer Cystein-reichen/Disintegrin Domäne, einem TSR Motiv, einer „spacer“ Region und zwei weiteren TSR Motiven. Die mRNA für METH-1 ist besonders in der Nebenniere, in Herz und Plazenta exprimiert, während embryonal die stärkste Expression in der Niere gefunden wird. Von den untersuchten Zelltypen, zeigen Hautfibroblasten, glatte Muskelzellen, einige Endothelzellen sowie einige epitheliale Zelllinien (HeLa, G631) die höchste Expression von METH-1.



**Abb. 1-8 Molekularstruktur von METH-1/ADAMTS-1**

In der Studie von Vázquez et al. (1999) wurde für METH-1 eine starke anti-angiogene Wirkung dokumentiert. Die Zugabe von METH-1 konnte die durch FGF-2 (im „cornea pocket assay“) und VEGF (im „chorioallantoic membrane assay“) ausgelöste Angiogenese unterdrücken. Diese Hemmung war für METH-1 ausgeprägter als für TSP-1. Auch die VEGF- und FGF-2-induzierte Proliferation von Endothelzellen wird durch METH-1 unterdrückt. Dieser Effekt ist reversibel und spezifisch für Endothelzellen, da das Wachstum von Fibroblasten und glatten Muskelzellen unbeeinflusst bleibt (Vázquez et al., 1999).

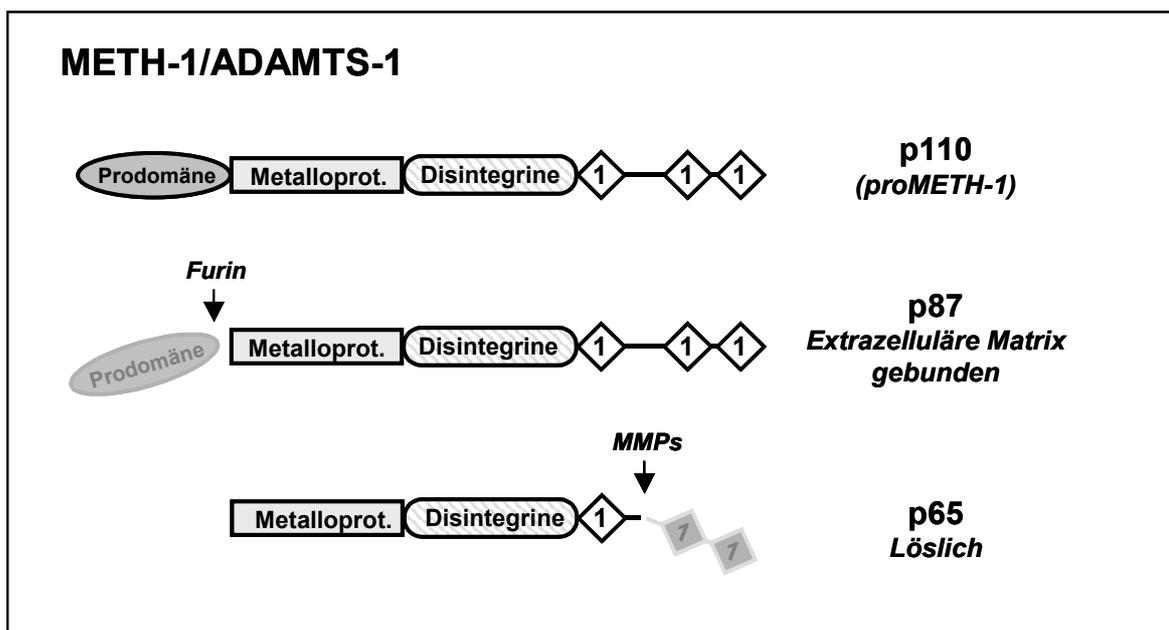
Die METH-1-abhängige Hemmung der VEGF-Induzierten Proliferation von Endothelzellen resultiert aus der Bindung und Sequestrierung von VEGF und der anschließenden Reduzierung der Phosphorylierung des VEGF-Rezeptors-2 (Luque et al., 2003). Wie schon für TSP-1 beschrieben, sind die TSR Domänen, aber nicht die Metalloproteinase- oder Disintegrine-ähnliche Regionen für die Bindung von VEGF verantwortlich. Eine wichtige Rolle bei dieser Interaktion spielt auch die „spacer“ Region zwischen dem ersten und dem zweiten TSR.

*In vivo* ist die Funktion der TSR Domäne nicht eindeutig geklärt. Obwohl dieser Domäne anti-angiogene Eigenschaften zugeschrieben werden, sind Konstrukte mit den drei TSR von METH-1 nicht in der Lage, Tumorstadium zu hemmen (Iruela-Arispe et al., 2003). Dagegen sind Konstrukte mit dem ersten TSR allein hochwirksam. Diese Diskrepanz könnte von der unterschiedlichen Löslichkeit dieser Konstrukte abhängig sein: Im Gegensatz zu dem Konstrukt mit einem TSR, ist das Konstrukt mit drei TSR unlöslich.

METH-1 zeigt eine Reihe von Regionen, die durch Veränderung der extrazellulären Mikro-Umgebung die Angiogenese beeinflussen können. Metalloproteinasen sind klassischerweise Bestandteil von Schlangengiften. Sie rufen bei Bißopfern Hämorrhagien hervor, indem sie die Basalmembran von Kapillaren degradieren (Bjarnason und Fox, 1995). Diese Wirkung wird durch lösliche Disintegrine unterstützt, die in der Lage sind, an die Integrine von Thrombozyten zu binden und auf diesem Wege die Thrombozytenaggregation zu inhibieren (Niewiarowski et al., 1994). Ob Integrine anderer Zellen durch die Disintegrin-Komponente von METH-1 beeinflusst werden können, ist bisher nicht untersucht worden.

Tumore, die METH-1 überexprimieren, wachsen langsamer, sind schlecht vaskularisiert und zeigen einen „sacular-like“ Aufbau mit einem Rand von lebendigen Tumorzellen um einen hämorrhagischen und nekrotischen Kern (Iruela-Arispe et al., 2003). Eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung dieser Effekte spielt die katalytische Domäne (Metalloproteinase-Domäne) von METH-1. Allerdings ist die Bedeutung der Notwendigkeit eines funktionierenden katalytischen Aktivität für die Hemmung der Angiogenese unklar: *In vitro* kann METH-1 nur Aggrecan und Versican spalten, zwei Proteoglykane, die vermutlich keine Rolle beim Tumorwachstum spielen (Rodríguez-Manzanares et al. 2002); Darüber hinaus werden MMPs in der Regel eher als pro-angiogen eingestuft (Heissig et al., 2003; Rundhaug, 2003).

Die Funktionen von METH-1 könnten durch die Konvertierung des freigesetzten pro-METH-1 reguliert werden (Abb. 1-9). Pro-METH-1 wird durch Furin und einige MMPs in zwei aufeinanderfolgenden Schritten gespalten, wodurch zwei aktive Formen (p87 und p65) resultieren (Rodríguez-Manzanares et al., 2000). Das p87 Protein wird verstärkt in die extrazelluläre Matrix eingebunden, während das p65 Fragment in Lösung bleibt. Obwohl beide Fragmente eine anti-angiogene Wirkung behalten, könnte ihre verschiedene Lokalisation und TSR-Anzahl eine wichtige Rolle bei der METH-1-abhängigen Regulation der Angiogenese spielen.



**Abb. 1-9 Spaltung des freigesetzten METH-1/ADAMTS-1 und Lokalisierung der p87 und p65 Fragmenten**

### **1.7.2.2 METH-2/ADAMTS-8**

METH-2/ADAMTS-8 wurde gemeinsam mit METH-1 von der Arbeitsgruppe von Iruela-Arispe beschrieben (Vázquez et al. 1999) und auch als Molekül mit anti-angiogener Wirkung charakterisiert. Allerdings ist die weitere Charakterisierung von METH-2 weit unvollständiger als die für METH-1. METH-2 verfügt über zwei TSR und seine Molekularstruktur ist der von METH-1 sehr ähnlich (51.7 % der Aminosäuren sind identisch). Das Expressionsmuster dieser beiden Metallospandine ist jedoch unterschiedlich. Die mRNA für METH-2 wird nur in wenigen Geweben und in niedriger Kopienzahl exprimiert. Die höchste Expression ist in der Lunge zu finden. In den meisten Geweben wird entweder METH-1 oder METH-2 aber nicht beide gleichzeitig exprimiert (Vázquez et al. 1999).

METH-2 hemmt die Proliferation von Endothelzellen und wirkt als anti-angiogenes Molekül im "cornea pocket assay" sowie im „chorioallantoic membrane assay“. Diese Effekte sind weniger ausgeprägt als für METH-1, aber stärker als bei TSP-1 (Vázquez et al. 1999).

### **1.7.2.3 Prokollagen I N-Proteinase/ADAMTS-2**

Die Prokollagen I N-Proteinase (pNPI) wurde ursprünglich als Enzym, das die Verdauung von Prokollagen Typ I und II in Kollagen katalysiert, beschrieben (Lapiere et al. 1971). Aufgrund seiner Domänenstruktur (Metalloproteinase-, Disintegrin- und vier TSR Domänen) wurde pNPI später als ADAMTS Protein klassifiziert (ADAMTS-2) (Colige et al., 1997; Colige et al., 1999). Über die funktionelle Bedeutung von pNPI ist wenig bekannt, seine starke Homologie zu METH-1 lässt eine anti-angiogene Wirkung vermuten (Vázquez et al. 1999). Die mRNA für pNPI wird nur in wenigen Geweben und in niedriger Kopienzahl exprimiert, nur in der Haut liegt eine höhere Expression vor (Tang, 2001). Ein Defekt dieses Gens ist für das menschliche Ehlers-Danlos Syndrom Type VII verantwortlich, eine Krankheit, die mit einer schweren Hautfragilität verbunden ist

(Colige et al., 1999). Ein ähnliches Krankheitsbild zeigen pNPI defiziente Mäuse, die zusätzlich einen Defekt der Spermatogenese aufweisen (Li et al., 2001).

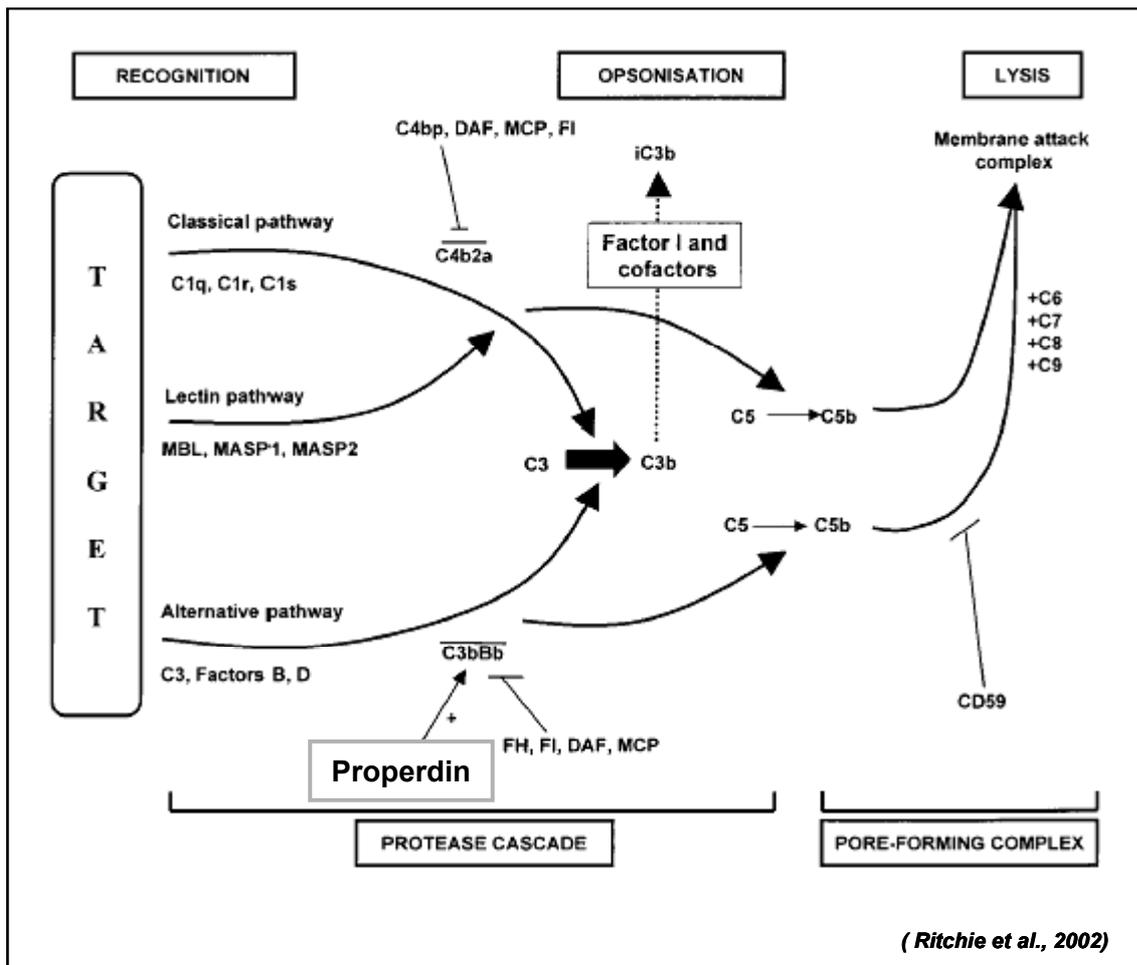
### **1.7.3 Brain Specific angiogenic inhibitor-1**

„Brain Specific Angiogenic Inhibitor“ (BAI)-1, ein Membranprotein mit fünf extrazellulären TSR, wurde als p53-induziertes Gen in glialen Tumoren identifiziert (Nischimori et al., 1997). Die anti-angiogenen Eigenschaften von BAI-1 wurden durch mehrere Studien belegt. Ein Konstrukt mit TSR Domänen von BAI-1 ist in der Lage, die *in vivo* durch bFGF-induzierte Angiogenese in der Ratten Kornea zu hemmen (Nischimori et al., 1997). Außerdem wird die Tumor-Angiogenese in immundefizienten Mäusen durch Überexpression von BAI-1 unterdrückt (Duda et al. 2002). Auf Endothelzellen wirkt die Überexpression von BAI-1 leicht zytotoxisch und die Zugabe extrazellulärer Anteile von BAI-1, die TSR-Domänen enthalten, hemmt die Proliferation von Endothelzellen, aber nicht von Tumorzellen. Dieser Effekt wird nicht durch CD36 sondern durch  $\alpha_v\beta_5$  Intergrine vermittelt.

### **1.7.4 Properdin**

Properdin gehört zu den TSR-haltigen Proteinen, die keine Effekte bei der Modulation der Angiogenese aufweisen. Dafür ist Properdin bei der Aktivierung des Komplementsystems (Abb. 1-10) entscheidend. Properdin ist der positive Regulator des alternativen Weges des Komplementsystems, indem es die ansonsten instabile C3 und C5 Konvertase des alternativen Weges (C3bBb und C3b<sub>n</sub>Bb) bindet und stabilisiert (Pangburn 1989; Nolan und Reid 1993). Patienten mit Properdin-Defizienz leiden an fulminanten bakteriellen Infektionen (Fijien, et al, 1999).

Die physiologische Quelle für Properdin ist unbekannt (Maves und Weiler, 1993; Nolan und Reid 1993). Obwohl Properdin im Plasma in einer Konzentration von 4-6 µg/ml vorhanden ist wird es nicht in der Leber, der üblichen Quelle vieler Komplementfaktoren, synthetisiert.



**Abb. 1-10 Verschiedene Wege der Komplementaktivierung**

FI: Faktor I; FH: Faktor H; DAF: „decay accelerating factor“; MBL „mannose-binding lectin“; MASP: MBL-associated serine protease“; MCP: „membrane cofactor protein“

## 1.8 Fragestellung

Der Zusammenhang zwischen Blutströmung und dem Umbau von Blutgefäßen und Blutgefäßnetzwerken ist in der Literatur vielfältig beschrieben. Ein zellulärer Mechanismus zur Regelung dieser langfristigen Angioadaptation ist die wand Schubspannungsregulierte Genexpression im Endothel. Obwohl inzwischen verschiedene wand Schubspannungsregulierte Gene beschrieben wurden, reichen sie nicht aus, um die Komplexität der angioadaptiven Prozesse zu beschreiben. Um Abläufe wie „sprouting“, Intussuszeption, „pruning“ und Arteriogenese zu erklären, wird die Aktivierung oder die Ausschaltung einer größeren Anzahl von angiogenesemodulierenden Genen benötigt.

Einige Mitglieder der Familie der Thrombospondin type 1 repeats (TSR) haltigen Proteine sind in der Lage, die Angiogenese zu regulieren (hauptsächlich zu hemmen). Eine mögliche wandschubspannungsabhängige Modulation der Expression dieser Gene würde deren Bedeutung für die Angioadaptation bei veränderten hämodynamischen Bedingungen nahelegen.

In dieser Arbeit soll daher die endotheliale Expression von TSR-haltigen Genen in Abhängigkeit von der Wandschubspannung untersucht werden. Darüber hinaus sollen die Effekte von VEGF, einem wichtigen Modulator der Angiogenese, auf die Expression TSR-haltiger Gene geprüft werden. Die zunächst *in vitro* gewonnenen Ergebnisse sollen anschließend in einem *in vivo* Modell überprüft werden.

Auf diese Weise soll nach einer Verbindung zwischen veränderten hämodynamischen Bedingungen und der Expression von anti-angiogenen Genen gesucht werden, um die komplexe Regulation angioadaptiver Prozesse besser beschreiben zu können.