

4 Diskussion

In dieser Studie wurde die strömungsabhängige Modulation der Expression von Genen der Thrombospondin Typ-1 Repeat (TSR) Familie in Endothelzellen analysiert. Die Regulation zweier angiogeneserelevanter Mitglieder dieser Familie (Thrombospondin-1 und METH-1/ADAMTS-1) durch Wandschubspannung deutet auf ihre mögliche Beteiligung bei der langfristigen Anpassung von Blutgefäßnetzwerken an veränderte Strömungsbedingungen hin. Die Modulation eines weiteren TSR-Gens (Properdin), das an der Komplementaktivierung beteiligt ist, zeigt die Relevanz hämodynamischer Bedingungen auch für Abwehr und Entzündungsreaktion.

4.1 Modelle zur Untersuchung der wandschubspannungsabhängigen Genexpression

Für die Untersuchung der wandschubspannungsabhängigen Genexpression *in vitro* wurden Endothelzellen mit einem Kegel-Platte-System stimuliert (Bussolari et al., 1982). In einer solchen Apparatur werden durch einen rotierenden Konus über eine Flüssigkeit auf eine mit Endothelzellen bewachsene Petrischale Scherkräfte übertragen. Durch Abstimmung von Konusgeometrie, Mediumviskosität und Rotationsgeschwindigkeit kann ein breites Spektrum an laminarer oder turbulenter Strömung erzeugt werden. Ein weiteres Modell für die *in vitro* Strömungsstimulation sind Flusskammern, bei denen z.B. zwei parallele Objektträger (einer davon mit Zellen bewachsen) einen mit Medium durchströmten Flusskanal begrenzen (Mo et al., 1991). Im Vergleich zu diesem zweiten Modell erlaubt das Kegel-Platte-System die Verarbeitung einer deutlich höheren Menge an Endothelzellen.

Im humanen Blutgefäßsystem herrscht überwiegend laminare Strömung. Die mit dem Kegel-Platte-System bei geringem Kegelwinkel ($\alpha=1^\circ$) und niedriger Rotationsgeschwindigkeit (134 UpM) erzeugte laminare Strömung wird daher dem *in vivo* anzutreffenden Normalzustand am ehesten entsprechen. Lediglich an arteriellen Bifurkationen kommt es zu Turbulenzen. Pathophysiologisch sind

arterielle Bifurkationen deswegen von besonderem Interesse, weil sie Prädilektionsstellen für Arteriosklerose darstellen. Die mit dem Kegel-Platte-System bei größerem Kegelwinkel ($\alpha=2,5^\circ$) und erhöhter Rotationsgeschwindigkeit (300 UpM) erzeugte turbulente Strömung sollte der Situation an solchen Bifurkationen entsprechen. Während die Blutströmung und damit die Wandschubspannung am Endothel *in vivo* pulsatil ist, wurde im hier gewählten Modell konstante Strömung erzeugt, um den Parameter „Wandschubspannung“ isoliert von anderen Effekten untersuchen zu können. Im Bereich der Kapillaren, von denen beim Erwachsenen die Sprossung im Rahmen der Angiogenese ausgeht, ist die Pulsatilität des Blutstroms auch *in vivo* nur sehr schwach ausgeprägt.

Das in dieser Studie eingesetzte Kegel-Platte-System wurde in der institutseigenen Werkstatt erbaut. Die Prüfung seiner Funktion für die Untersuchung der Strömungseffekte auf Endothelzellen erfolgte durch Beobachtung der typischen Veränderung der Zellmorphologie sowie durch Analyse bekannter wandschubspannungsregulierter Gene.

Für die Analyse der Expression angiogeneserelevanter Gene *in vivo* wurde das Prazosin Modell angewandt (Dawson und Hudlicka, 1989). Dies ist ein Modell für die Untersuchung der strömungsinduzierten Angiogenese (überwiegend durch Intussuszeption) im Skelettmuskel. Die chronische Zugabe des α_1 -Antagonisten Prazosin mindert den Strömungswiderstand in präkapillären Arteriolen woraus eine Erhöhung der Wandschubspannung in den nachfolgenden Kapillaren resultiert (von 11.05 auf 20.45 dyn/cm²). Dadurch wird die Angiogenese, gemessen als erhöhter Kapillar-Faser-Quotient (von 1.42 auf 1.70), in Skelettmuskeln induziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde das in Ratten entwickelten Prazosin Modell auf Mäuse übertragen. Die histologische Untersuchung des Skelettmuskels (M. extensor digitorum longus) nach Prazosin-Behandlung zeigte eine signifikante Erhöhung des Kapillar-Faser-Quotienten (K/F). Dies gilt als Beleg einer Prazosin-induzierten Angiogenese. Die Induktion der Angiogenese war schon nach drei Tagen Prazosin-Zugabe zu verzeichnen, erreichte ihren Höchstwert nach 4 Tagen bis er schließlich nach 8-14 Tagen auf ein etwas niedrigeres Plateau zurückging.

Ein solcher Verlauf ist für einen dynamischen, adaptiven Vorgang typisch. Nach Prazosin-Gabe versucht das Gefäßsystem die Erhöhung der Wandschubspannung in den Kapillaren durch Angiogenese zu kompensieren. In dieser Phase (3-4 Tage) entsteht erst ein Überschuss an neuen Gefäßen, die in einer späteren Phase (8-14 Tage) durch „pruning“ zum Teil wieder abgebaut werden, bis ein an die neuen Bedingungen volladaptiertes Gefäßbett resultiert.

4.2 Expression von Genen der Thrombospondin Type-1 Repeat (TSR) Familie nach Wandschubspannungsstimulation.

Zu der Vielzahl der Moleküle, die eine Rolle bei der wandschubspannungsabhängigen Regulation angioadaptiver Prozesse spielen können, gehören Thrombospondin Type-1 Repeat (TSR)-haltige Proteine (Iruela-Arispe et al., 1999; Lawler, 2000). Die meisten Mitglieder dieser Familie werden als anti-angiogene Moleküle eingestuft, wobei TSR Domänen eine wichtige Rolle für die Vermittlung dieser Funktion spielen.

Die vorliegende Untersuchung der endothelialen Expression ausgewählter Gene der TSR Familie zeigt, dass einige (Thrombospondin-1, METH-1/ADAMTS-1 und Properdin) dieser Gene durch Wandschubspannung reguliert werden. Eine vollzählige Modulation aller Mitglieder dieser Familie war nicht zu erwarten, da die Eingruppierung dieser Gene auf einer strukturellen und nicht genregulatorischen Basis erfolgt. Die beobachtete wandschubspannungsabhängige Modulation ist nicht für funktionell verwandte Subgruppen dieser Familie spezifisch, da sowohl angiogeneserelevante (Thrombospondin-1 und METH-1/ADAMTS-1) als auch nicht angiogeneserelevante (Properdin) Gene reguliert werden. Darüber hinaus ist die Modulation angiogeneserelevanter TSR Gene nicht einheitlich, da Thrombospondin-1 durch Wandschubspannung unterdrückt wird, während METH-1/ADAMTS-1 induziert wird.

4.2.1 Angiogenese relevante Mitglieder der TSR Familie

4.2.1.1 Thrombospondin-1

Expressionsregulation durch Strömung und VEGF

Thrombospondin-1 (TSP-1) ist ein multifunktionelles Protein das eine wichtige Rolle bei der Regulation der endothelialen Apoptose (pro-apoptotisch) und der Angiogenese (überwiegend anti-angiogen) spielt (Good et al., 1990; Jimenez et al., 2000; Lawler, 2002). Die vorliegende Arbeit dokumentiert die Expression von TSP-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in kultivierten Endothelzellen unter statischen Bedingungen. Diese Ergebnisse stimmen zum Teil mit denen von Freyberg (2000) überein. Durch eine definierte Strömung wurde die Expression von TSP-1 statistisch signifikant gehemmt. Dieser Effekt ließ sich sowohl in venösen Endothelzellen der menschlichen Nabelschnur als auch in mikrovaskulären Endothelzellen des menschlichen Koronarsystems zeigen. Die wandschubspannungsabhängige Hemmung von TSP-1 scheint also für sehr unterschiedliche Endothelzellen zu gelten.

Die Hemmung der Expression der TSP-1 mRNA war in der vorliegenden Studie ab einer Wandschubspannung von 2 dyn/cm^2 statistisch signifikant. Diese Wandschubspannung wird *in vivo* im menschlichen Blutgefäßsystem in Arterien mit einem Mittelwert um 10 dyn/cm^2 deutlich überschritten und auch in Venen 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 Werte der Wandschubspannung gemessen (Pries et al., 2000). 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. 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.

Bei einer Umkehrung des Experiments - auf Strömungsexposition folgt Strömungsstillstand - erreichte die Expression von TSP-1 nach vier Stunden die Werte der unbehandelten Kontrolle. 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 Thrombospondinkonzentration, welcher die Endothelzellen autokrin ausgesetzt sind, erst einige Stunden nach einem dauerhaften Strömungsstillstand wirksam werden.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Hemmung der TSP-1 Expression durch turbulente Strömung mit der durch laminare Strömung vergleichbar ist. Dauerhafte turbulente Strömungsbedingungen sind hauptsächlich bei arteriellen Verzweigungen vorhanden und werden mit Entstehung und Fortschreiten arteriosklerotischer Läsionen verbunden (Gimbrone et al. 2000; Berk et al. 2001). Die Tatsache, dass die TSP-1-Inhibition vom Typ der applizierten Strömung unabhängig ist, lässt keine direkte Verbindung zwischen der Regulation von TSP-1 und der arteriosklerotischen Pathologie vermuten.

Aufgrund seiner zentralen Rolle für die Regulation der Angiogenese (Ferrara, 1999; 2001) wurden in dieser Studie die Effekte des „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) auf die endotheliale Expression von TSP-1 untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte die Behandlung der Endothelzellen mit diesem pro-angiogenen Molekül keine signifikante Veränderung der Expression von TSP-1 erzeugen, weder unter statischen noch unter dynamischen Bedingungen. Im Widerspruch zu diesen Daten existiert in der Literatur eine Arbeit, in der in bovinen, retinalen, mikrovaskulären Endothelzellen die Expression von TSP-1 nach vier Stunden VEGF Stimulation supprimiert, während sie nach 24 Stunden erhöht wird (Suzuma, K. et al., 1999). Die Diskrepanz zwischen diesen Befunde könnte an den unterschiedlichen angewandten Zellsystemen, Expositionszeiten und VEGF Konzentrationen liegen.

Die Expression von TSP-1 *in vivo* wurde in dem Prazosin Modell der strömungsinduzierten Angiogenese untersucht. Durch chronische Zugabe von Prazosin wird die Wandschubspannung in den Kapillaren der Skelettmuskeln von Mäusen erhöht. Die Untersuchung der Genexpression in der Endothelzellfraktion von Skelettmuskeln zeigt eine verminderte Expression von TSP-1. Diese Daten stimmen mit der *in vitro* beobachteten TSP-1-Hemmung durch erhöhte Wandschubspannung überein. Allerdings wird die Expression von TSP-1 im Gesamtmuskelhomogenat nach der Behandlung erhöht. Diese Erhöhung kann also nur auf einer erhöhten TSP-1 Expression ausserhalb des Endothels beruhen. Mit der allgemein verbreiteten Auffassung, dass TSP-1 ein Angiogeneseinhibitor ist, lässt sich die *in vivo* beobachtete differentielle Expressionsregulation zunächst schwer in Einklang bringen.

TSP-1 übt eine Vielzahl seiner Funktionen durch Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren aus (Dawson et al., 1997; Lawler, 2002). Die Untersuchung der Expression dieser Rezeptoren auf strömungsexponierten Endothelzellen kann weitere Hinweise über die funktionelle Bedeutung von TSP-1 bei veränderten hämodynamischen Bedingungen geben. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expression des Integrin-assoziierten Proteins (CD47), ein an der Induktion der Apoptose beteiligter TSP-1 Rezeptor, durch Strömung gehemmt wird (Freyberg et al., 2000; 2001).

In der vorliegenden Studie wurde die Expression von CD36, einem weiteren wichtigen Rezeptor für die Vermittlung der pro-apoptischen und anti-angiogenen Eigenschaften von TSP-1 (Greenwalt et al., 1992; Guo et al., 1997; Febbraio et al., 2001) untersucht. Die Bindung dieses multifunktionellen, transmembranären Proteins an der TSR Region von TSP-1 führt zur Aktivierung der CD36-Fyn-Kaspase-3-p38MAPK-Kaskade und der darauffolgenden Induktion der Apoptose (Nor, J. E. et al., 2000). Zusätzlich wird durch diese Interaktion die Endothelzell-Migration und die Röhrenbildung („tube formation“) *in vitro* (Dawson D.W. et al., 1997) sowie die FGF-2 induzierte Neovaskularisierung der Hornhaut *in vivo* (Jimenez B. et al., 2000) gehemmt. Die hier vorliegende Untersuchung der Expression von CD36 in wandschubspannungsexponierten Endothelzellen zeigt eine deutliche und anhaltende Reduktion der mRNA dieses Gens. Die

wandschubspannungsabhängige Suppression von CD36 ist in ihrem Verlauf der von TSP-1 sehr ähnlich. Die einzigen Unterschiede betrafen die für die Hemmung notwendige Stärke der Wandschubspannung (0.6-1 dyn/cm² für CD36 vs. 1-2 dyn/cm² für TSP-1) und Expositionszeiten (weniger als 4 h für CD36 vs. 4-24 h für TSP-1). Die parallele Suppression von TSP-1 und CD36 durch Wandschubspannung suggeriert eine gegenseitige Verstärkung der Effekte. Allerdings kann aufgrund der Multifunktionalität von CD36 eine von TSP-1 unabhängige Bedeutung der strömungsabhängigen Hemmung der Expression dieses Moleküls nicht ausgeschlossen werden.

Bedeutung für die Regulation der Angioadaptation

Normalerweise sind Endothelzellen *in vivo* der Blutströmung ausgesetzt. *In vivo* dürfte eine nennenswerte Expression von TSP-1 in Endothelzellen daher auf Ausnahmesituationen beschränkt sein. Physiologisch ist 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 und durch Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren (insbesondere CD36 und CD47/ β_3 -Integrinen) die Apoptose von Endothelzellen aktivieren. In dieser Hinsicht könnte die strömungsregulierte Expression von TSP-1 durch Steuerung der endothelialen Apoptose einen Mechanismus für die Vermittlung der Rückbildung nicht perfundierter Blutgefäße darstellen (Abb. 4-1).

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 (Kaiser, D. et al., 1999). Die Rolle von TSP-1 bei der Vermittlung dieses Phänomens wird in verschiedenen Studien unterlegt. Durch Zugabe von TSP-1 (1 µg/ml) zu primär kultivierten Endothelzellen konnte die Apoptoserate gegenüber unbehandelten Zellen um über den Faktor drei erhöht werden (Freyberg, M. A. et al., 2000). Bei der kombinierten Behandlung mit TSP-1 (1 µg/ml) und neutralisierendem Anti-TSP-1-Antiserum zeigte sich wiederum eine niedrigere

Apoptoserate, die sogar noch unter der zu erwarteten lag. Die Autoren schlossen hieraus auf eine autokrine Wirkung von TSP-1.

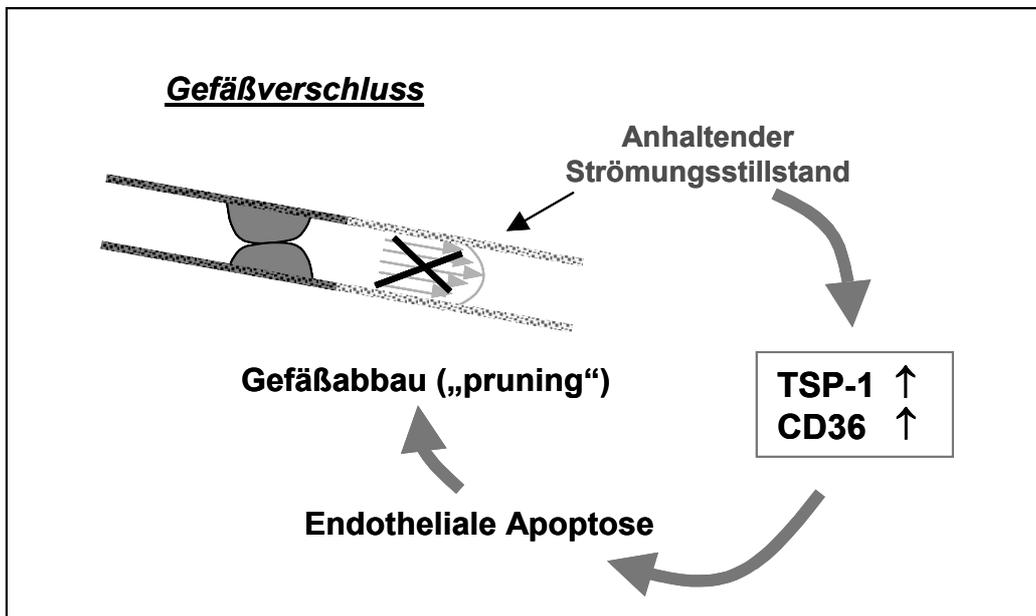


Abb. 4-1 Modell für den Gefäßabbau hinter einem Gefäßverschluss durch die veränderte Expression von TSP-1/CD36 bei Strömungsstillstand.

Auf dynamisch kultivierte Endothelzellen hingegen hatte die Zugabe von TSP-1 keinen apoptosesteigernden Einfluss. Dies legte den Schluss nahe, dass durch Strömungsbelastung nicht nur die Expression von TSP-1, sondern auch die seiner Rezeptoren vermindert wird. Diese Hypothese wird sowohl in der Literatur als auch von den hier vorliegenden Daten unterstützt: Die endotheliale Expression von CD47 (Freyberg et al., 2000) und die von CD36 werden durch Wandschubspannungsexposition gehemmt und sprechen für eine Verstärkung der pro-apoptotischen Wirkung von TSP-1 bei Strömungsstillstand. Darüber hinaus deutet die bevorzugte Lokalisierung von CD47 auf makrovaskulären und von CD36 auf mikrovaskulären Endothelzellen auf unterschiedliche Wege der TSP-1 induzierten Apoptose in unterschiedlichen Gebieten des Gefäßsystems (Swerlick et al., 1992; Freyberg et al., 2000).

Zur vollständigen Beurteilung der Bedeutung der wandschubspannungsabhängigen Regulation von TSP-1 für die Angioadaptation im menschlichen Organismus ist es notwendig, die Effekte weiterer adaptiver Triggermechanismen

auf die Expression von TSP-1 zu betrachten. Neben der Wandschubspannung gilt der Sauerstoffpartialdruck als bedeutendster Trigger. Während die Wandschubspannung die hämodynamischen Verhältnisse im Gefäßbett abbildet, erlaubt der Sauerstoffpartialdruck eine Aussage über die innerhalb des Gewebes herrschende metabolische Situation.

Der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) ist ein starkes pro-angiogenes Molekül dessen Expression im Gewebe vom Sauerstoffpartialdruck kontrolliert wird (Ferrara, 1999; 2001). Vermittelt durch gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 α wird bei Hypoxie VEGF stark induziert (Forsythe et al., 1996). Die durch VEGF geförderte Angiogenese (überwiegend durch Sprossung) sorgt anschließend für eine verbesserte Sauerstoffsversorgung des Gewebes. Aufgrund seiner zentralen Rolle für die Regulation der Angiogenese ist die Steuerung der endothelialen Genexpression durch VEGF von entscheidender Bedeutung. Obwohl in dieser Studie die Stimulation (24 h) durch VEGF keine signifikante Änderung der TSP-1 Expression zeigte, existieren Daten in der Literatur, die eine biphasische Modulation von TSP-1 in VEGF-behandelten Endothelzellen beschreiben (Suzuma et al., 1999). TSP-1 wird durch VEGF nach 4 Stunden gehemmt und nach 24 Stunden induziert. Für die Verknüpfung der Wandschubspannungs- und Sauerstoffpartialdrucksabhängigen Regulation der TSP-1 Expression ist es dann notwendig, die zeitlich unterschiedliche Wirkung dieser Stimuli zu betrachten.

In dem Fall einer durch Hypoxie hervorgerufenen Gefäßsprossung würde zunächst VEGF die durch Strömungsstillstand in der Gefäßsprosse erfolgende Induktion von TSP-1 unterdrücken. 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 pro-angiogene Effekt durch VEGF überwiegen. Zu einem späteren Zeitpunkt wäre die Gefäßsprossung unter physiologischen Bedingungen selbstlimitierend, weil bei Strömungsstillstand anti-angiogenes TSP-1 induziert wird, das sich zusätzlich hemmend auf die VEGF-Expression auswirkt (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.

Anhand der verschiedenen Möglichkeiten des Zusammenwirkens zwischen Wandschubspannung und Sauerstoffpartialdruck als Triggermechanismen für angioadaptive Prozesse können eine Reihe von unterschiedlichen Situationen der Angioadaptation klassifiziert werden (Tab. 4-1). Nimmt man VEGF als wichtigen Effektor der sauerstoffsabhängigen Modulation der Angiogenese, können einige der zellulären Mechanismen der oben erwähnten angioadaptiven Situationen durch die Wandschubspannungs- und VEGF-gesteuerte Expression von TSP-1 erklärt werden.

Tab. 4-1 Hypothetische Kombinationen der Trigger „Wandschubspannung“ und „Sauerstoffpartialdruck“ und zugehörige Phänomene der Angioadaptation sowie deren mutmaßliche zelluläre Mechanismen.

<i>Trigger-Mechanismus</i>	<i>TSP-1 Expression</i>	<i>Angioadaptives Phänomen</i>	<i>Zellulärer Mechanismus</i>	<i>Korrespondierende in vivo Situation</i>	
1. $\tau_w \downarrow$ $P_{O_2} = (\text{VEGF} \downarrow)$	(\uparrow) (-)	\uparrow	Pruning	Apoptose	– Corpus luteum Degeneration – Embryonalentwicklung
2. $\tau_w \downarrow$ $P_{O_2} \downarrow (\text{VEGF} \uparrow)$	(\uparrow) ($\downarrow\downarrow$)	\downarrow	Angiogenese	Sprossung	– Tumolvaskularisation – Poststenotische Hypoxieareale
3. $\tau_w \uparrow$ $P_{O_2} = (\text{VEGF} \downarrow)$	(↓) (-)	\downarrow	(a) Maintenance	Verminderte Apoptose	– Leitungsgefäß
			(b) Arteriogenese	Gefäßwandumbau (remodelling)	– Kollateralisation
			(c) Angiogenese	Intussuszeption bzw. „bridging“	– Angiogenese nach Perfusionserhöhung im Skelettmuskel – Angiogenese in der Lunge
4. $\tau_w \uparrow$ $P_{O_2} \downarrow (\text{VEGF} \uparrow)$	(↓) (↓)	$\downarrow\downarrow$	Angiogenese	Sprossung/ Intussuszeption	– Muskeltraining

Der erste Fall beschreibt eine Gefäßsituation, bei der die Wandschubspannung zwar niedriger (bis zu Strömungsstillstand), der Sauerstoffpartialdruck aber unverändert hoch bzw. physiologisch ist. In einer derartigen Situation, wie z.B. während der Embryonalentwicklung beim Untergang überzähliger Gefäße (Pruning) und der Involution des Gelbkörpers während des weiblichen Zyklus (Risau, W., 1997) kommt es zum Untergang von Blutgefäßen. In diesen Fällen würde bei Strömungsstillstand TSP-1 aufreguliert, vorausgesetzt dieser Zustand hielte längere Zeit an (mindestens 4 Stunden). Die Induktion von TSP-1 hätte dann über die Aktivierung von CD36 oder CD47, die ihrerseits durch Strömungsminderung induziert werden, eine zunehmende Apoptose der Endothelzellen und letztlich den Untergang (Pruning) des betroffenen Gefäßes zur Folge. Dadurch käme 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 bei Kapillarsprossen, die u. a. durch VEGF bei Hypoxie induziert werden. Diese Art der Induktion von Kapillarsprossen ist in Gewebearealen hinter Stenosen (Rieger und Gaehtgens, 1994) und bei der Tumervaskularisation (Carmeliet und Jain, 2000) gut beschrieben worden.

In der Kapillarsprosse, 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. 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 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 verhindern, dass blind endende Kapillaren erhalten bleiben.

Unter pathophysiologischen Bedingungen (Tumervaskularisierung) könnte diese Selbstbegrenzung entfallen. So ist die TSP-1 Expression in vielen Tumoren

vermindert und die Gefäßdichte erhöht (Yao et al., 2000; Grossfeld 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 et al., 1994). Durch Fehlen der hemmenden Effekte von TSP-1 und gleichzeitig vermehrte VEGF Expression würde während der Tumorangio-genese die Gefäßdichte deutlich zunehmen (Maeda et al., 2000).

Der dritte Fall beschreibt eine Gefäßsituation, in der bei Normoxie die Wandschubspannung hoch (3a) oder erhöht (3b, 3c) ist. Dieser Fall liegt im Organismus in Leitungsgefäße (3a), in Kollateralgefäßen (3b), nachdem die versorgende Hauptarterie des Nachbarsegmentes okkludiert wurde (Infarkt) (Buschmann et Schaper, 1999) und bei intussuszeptiver Angiogenese (3b) im Skelettmuskel nach Prazosin-Behandlung (Dawson und Hudlicka, 1989) oder in der Lunge (Burri und Djonov, 2002) vor.

TSP-1 würde hierbei durch Strömung supprimiert und dadurch die Apoptose von Endothelzellen gehemmt. Gleichzeitig ist bei unverändertem Sauerstoffpartialdruck (VEGF gering) 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 et Gaetgens, 1994). Für beide Fälle ist die Suppression von TSP-1 vielleicht nicht entscheidend, würde sich jedoch plausibel ins Gesamtgeschehen einfügen. Ähnlich gilt es für Gefäßwachstum durch Intussuszeption (3c), wie es in der Lunge oder im Skelettmuskel nach Prazosin-Behandlung stattfindet. Die hier vorgeschlagenen Triggermechanismen Wandschubspannung und Sauerstoffpartialdruck, deren Veränderung in den Situationen 3a, 3b und 3c gleich sind, genügen, zumindest ohne genauere Quantifizierung, offensichtlich nicht, um alle *in vivo* Situationen zu differenzieren.

Im Tiermodell der Situation 3c (Prazosin Modell in der Maus) ließ sich im Endothel die *in vitro* beobachtete Regulation der TSP-1 Expression bestätigen. Damit scheint auch *in vivo* ein Mechanismus vorzuliegen, durch den bei erhöhter Wandschubspannung die autokrine Apoptose-Induktion über TSP-1 supprimiert wird. Bei Untersuchung von Gesamthomogenaten des Muskels zeigte sich jedoch,

dass die TSP-1 Expression während der Prazosin-Behandlung erhöht ist. Diese Erhöhung kann nur durch andere als Endothelzellen verursacht worden sein. *In vivo* ist also eine räumlich differentielle Regulation der TSP-1 Expression zu beobachten. Da der Anstieg der extra-endothelialen TSP-1 Produktion zeitgleich mit der Zunahme des Kapillar-Faser-Quotienten auftritt, kann TSP-1 in diesem Modell nicht nur anti-angiogen wirken. Es liegt vielmehr die Interpretation nahe, dass die Reduktion des endothelialen, autokrinen Apoptosemechanismus das Gefäßwachstum begünstigt, während extra-endotheliales TSP-1 die Gefäßsprossung inhibiert. Aus der Kombination dieser beiden Effekte könnte das Gefäßwachstum ohne Sprossung, die Intussuszeption resultieren. Darüber hinaus werden in der Literatur einige Experimente beschrieben, in denen TSP-1 offensichtlich pro-angiogen wirkt (Tuszynski et al., 1987; Sargiannidou et al. 2001). Die pro-angiogene Wirkung ist dabei von der TSP-1 Konzentration, vom proteolytischen Zustand des TSP-1 und von seiner extrazellulären Lokalisation mit Bindung an die extrazelluläre Matrix abhängig. Vor diesem Hintergrund könnten die hier erhobenen *in vivo* Daten die Auffassung unterstützen, dass in der die Blutgefäße umgebenden Matrix gebundenes TSP-1 pro-angiogen wirkt. In diesem Falle würden die Suppression des endothelialen TSP-1 und die Erhöhung seiner Expression ausserhalb des Endothels während der Fütterung von Prazosin additiv auf eine Erhöhung des Kapillar-Faser-Quotienten hinwirken.

Die vierte mögliche angioadaptive Situation (Tab. 4-1) wird durch die Kombination erhöhter Wandschubspannung und vermindertem Sauerstoffpartialdruck dargestellt. Diese Situation wird bei Muskeltraining, insbesondere bei Ausdauertraining angetroffen, und führt zur Angiogenese durch Kombination von Sprossung und Intussuszeption (Hudlicka et al., 1992). In dieser Situation würden die pro-apoptischen und anti-angiogenen Eigenschaften von TSP-1 durch die wandschubspannungsabhängige Hemmung der TSP-1 Expression unterdrückt. Dazu würde die Erhöhung der VEGF Expression im hypoxischen Gewebe den Reiz zur Kapillarsprossung verstärken. In diesem Fall würden also beide Trigger (erhöhte Wandschubspannung und Hypoxie) zusammen (synergistisch) das Gefäßwachstum begünstigen. Daten, die das Nebeneinander von Sprossung und Intussuszeption durch die beteiligten molekularen Mechanismen begründen könnten, gibt es derzeit noch nicht.

4.2.1.2 METH-1/ADAMTS-1

Expressionsregulation durch Strömung und VEGF und Bedeutung für die Angioadaptation

METH-1/ADAMTS-1 ist ein stark anti-angiogenes Molekül mit Endothel-spezifischen anti-proliferativen Eigenschaften (Vázquez et al., 1999). Bei der vorliegenden Studie war METH-1/ADAMTS-1 in statisch kultivierten Endothelzellen kaum nachweisbar und wurde erst durch Stimulation der Zellen durch Wandschubspannung stark induziert. Dieser Effekt scheint für sehr unterschiedliche Endothelzellen gleich zu sein, da METH-1/ADAMTS-1 sowohl in makrovaskulären (HUVEC) als auch in mikrovaskulären (HCMEC) Endothelzellen induziert wird.

Eine Wandschubspannung von 3 dyn/cm² war notwendig, um eine signifikante Erhöhung der mRNA für METH-1/ADAMTS-1 zu erzeugen. Wie für TSP-1 diskutiert, dürfte die Expression bzw. die Induktion von METH-1 nicht zur Unterscheidung zwischen Arterien und Venen beitragen, da eine Wandschubspannung dieser Höhe in beiden Gefäßtypen erreicht werden kann (Pries et al, 2000). In einzelnen Kapillaren der mikrovaskulären Gefäßnetzwerken kommen dagegen Wandschubspannungen unter 3 dyn/cm² vor. Dabei handelt es sich um eher kurzfristige Zustände.

Zeitlich befristete Änderungen der Wandschubspannung genügen jedoch nicht, um die Expression von METH-1/ADAMTS-1 zu regulieren. Bei einer Wandschubspannung von 6 dyn/cm² wird METH-1/ADAMTS-1 nach vier Stunden signifikant induziert. Bei weiterer Strömungsexposition (bis 48 Stunden) bleibt diese Induktion erhalten, was auf einen langfristigen (nicht-transienten) Effekt deutet. Die wandschubspannungsabhängige Induktion von METH-1/ADAMTS-1 ist nach Wiederherstellung statischer Kulturbedingungen völlig reversibel. Nach 4 Stunden Strömungsstillstand ist die Expression von METH-1/ADAMTS-1 kaum nachweisbar. Diese Situation (der Übergang von dynamischen auf statische Bedingungen) entspricht eher der Lage *in vivo*. Unter physiologischen

Bedingungen sind die Endothelzellen der Strömung ausgesetzt und nur in Ausnahmesituationen erfahren sie Strömungsstillstand. *In vivo* dürfte demnach METH-1/ADAMTS-1 stark exprimiert sein. Aufgrund der für METH-1/ADAMTS-1 beschriebenen Rolle als Inhibitor der Angiogenese und der endothelialen Proliferation, würde die Induktion der Expression dieses Moleküls durch Strömung diese Prozesse unterbinden und zur Stabilisierung gut perfundierter Gefäße beitragen. Bei anhaltender Reduktion der Blutströmung, z.B. nach Gefäßverengung, würde hingegen METH-1/ADAMTS-1 supprimiert und dadurch die Sprossung ermöglicht.

Interessanterweise ist die Induktion von METH-1/ADAMTS-1 durch turbulente Strömung niedriger als durch laminare Strömung. Gewöhnlich werden dauerhaft turbulente Strömungsbedingungen, z.B. bei arterieller Verzweigungen, in Verbindung mit Entstehung und Fortschreiten arteriosklerotischen Läsionen gebracht (Gimbrone et al. 2000; Berk et al. 2001). Allerdings lassen die bisher bekannten Eigenschaften von METH-1/ADAMTS-1 eine Beteiligung bei der Arteriosklerose nicht vermuten. Hingegen könnte eine Regulation von METH-1/ADAMTS-1 in Abhängigkeit vom Strömungstyp bei der Angiogenese durch Sprossung von Bedeutung sein (Abb. 4-2).

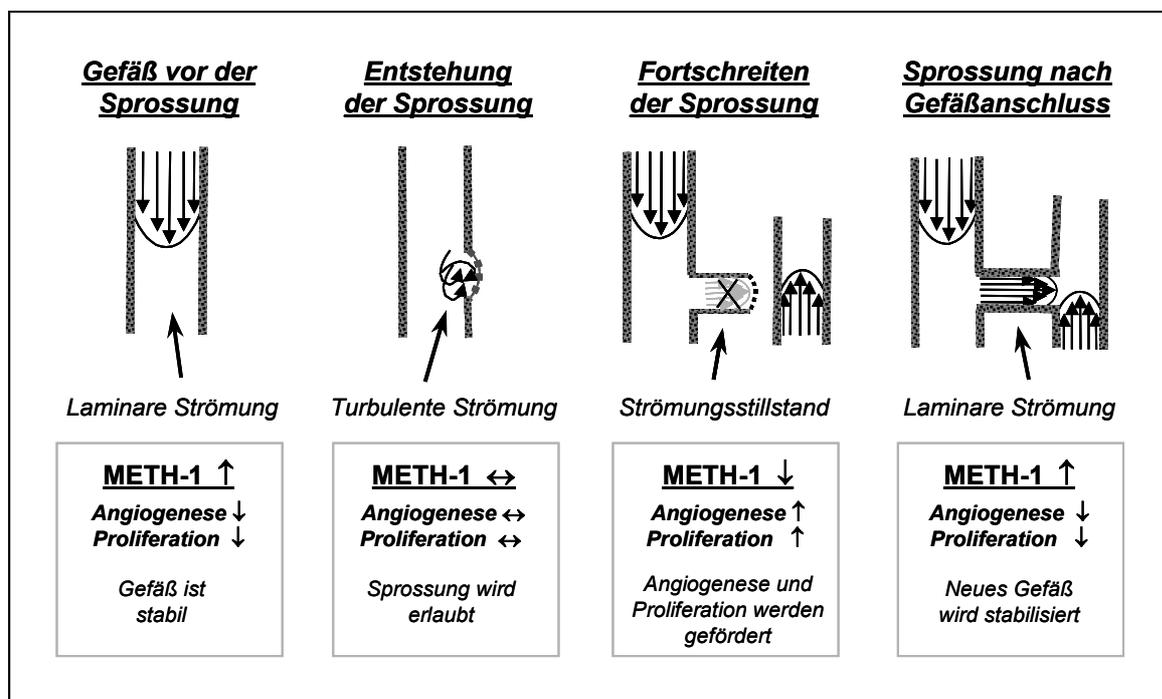


Abb. 4-2 Modell für die Modulation der Gefäßsprossung durch veränderte Expression von METH-1 bei unterschiedlichen Strömungsbedingungen.

Von der Entstehung einer Gefäßsprosse bis zum Anschluss an ein weiteres Blutgefäß sind turbulente und statische Bedingungen, erst nach dem Anschluss an ein durchströmtes Gefäß laminare Strömung vorhanden. Bei dem zeitlichen Übergang zwischen diesen hämodynamischen Zuständen würde eine graduelle Modulation von METH-1/ADAMTS-1 stattfinden. Während das Muttergefäß einer laminaren Strömung ausgesetzt ist, wird in der entstehenden Sprossung turbulente Strömung erzeugt. Es käme also zu einer lokalen Reduzierung der Expression von METH-1/ADAMTS-1. Dadurch würde die Hemmung der Angiogenese aufgehoben und die Sprossung erleichtert. In der wachsenden Sprosse herrscht überwiegend Strömungsstillstand, der eine nahezu vollständige Unterdrückung der Expression von METH-1/ADAMTS-1 verursachen könnte. Durch Ausschalten dieses Inhibitors würde die für das Fortschreiten der Sprossung notwendige endotheliale Proliferation ermöglicht. Bei Anschluss an ein weiteres Blutgefäß würde das fließende Blut (laminare Strömung) METH-1/ADAMTS-1 stark induzieren. Die dadurch erzeugte Hemmung der Angiogenese und der endothelialen Proliferation könnten dann zu der Stabilisierung des neuen entstandenen Gefäßes beitragen. Beim derzeitigen Kenntnisstand bleibt diese Darstellung jedoch eine Hypothese.

VEGF spielt bei der durch Veränderung des Sauerstoffpartialdrucks (Hypoxie) gesteuerten Angiogenese eine zentrale Rolle (Ferrara, 1999; 2001). In dieser Studie konnte die Behandlung von Endothelzellen mit diesem pro-angiogenen Molekül unter statischen Bedingungen keine signifikante Veränderung der Expression von METH-1/ADAMTS-1 erzeugen. Die Zugabe von VEGF unter dynamischen Bedingungen verstärkte jedoch die wandschubspannungsabhängige Induktion von METH-1/ADAMTS-1. Neueste Untersuchungen zeigen, dass METH-1/ADAMTS-1 VEGF bindet und dadurch die Phosphorylierung des VEGF-Rezeptors-2 reduzieren kann (Luque et al., 2003). Das bedeutet, dass unter Strömungsbedingungen VEGF einer negative Rückkopplung durch METH-1/ADAMTS-1 unterworfen wäre.

Die Expression von METH-1/ADAMTS-1 *in vivo* wurde in dem Prazosin Modell der strömungsinduzierten Angiogenese untersucht. Die durch Prazosin-Behandlung erzeugte Erhöhung der peripheren Wandschubspannung korrelierte mit einer

verstärkten Expression von METH-1/ADAMTS-1 im Gesamthomogenat von Skelettmuskel. Obwohl diese Daten mit der *in vitro* beobachteten wandschubspannungsabhängigen Induktion des endothelialen METH-1/ADAMTS-1 im Einklang sind, ist die Bedeutung einer Erhöhung dieses anti-angiogenen Faktors bei der im Skelettmuskel induzierten Angiogenese unklar. In dem Prazosin Modell findet jedoch die Angiogenese überwiegend durch Intussuszeption statt. Bei diesem Vorgang erfolgt die Erhöhung der Gefäßanzahl durch Teilung bestehender Gefäße, wofür die endotheliale Proliferation nicht entscheidend ist. Daher würde die Hemmung der Proliferation durch verstärkte Expression von METH-1/ADAMTS-1 die Intussuszeption nicht behindern.

Die Inhibition der endothelialen Proliferation durch METH-1/ADAMTS-1 wird hauptsächlich durch die TSR Domäne vermittelt. Allerdings besitzt METH-1/ADAMTS-1 auch Proteinase- und Disintegrine-Untereinheiten. Obwohl über ihre Auswirkung wenig bekannt ist, wird eine Beteiligung dieser Domänen bei angioadaptiven Prozessen vermutet. Die Metalloproteinase-Untereinheit könnte zu einer Lockerung der Gefäßwand beitragen, während die Disintegrin-Domäne den Endothelzellen vermehrte Adhäsionsmöglichkeiten an der Basalmembran anbieten würde. In bestimmten Fällen könnte dann METH-1/ADAMTS-1 sogar pro-angiogene Eigenschaften zeigen, die eventuell die Angiogenese bei Intussuszeption ermöglichen könnten.

4.2.1.3 Thrombospondin-1 und METH-1/ADAMTS-1

Bedeutung der kombinierten strömungsabhängigen Modulation für die Angioadaptation

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine entgegengesetzte Regulation von TSP-1 (Hemmung) und METH-1/ADAMTS-1 (Induktion) durch Wandschubspannung. Da beide Moleküle die Angiogenese inhibieren können, suggeriert ihre entgegengesetzte Modulation während der wandschubspannungsabhängigen Angioadaptation eine mögliche Konkurrenz dieser Proteine. Die Möglichkeit, dass

beide Moleküle sich gegenseitig in ihrer Wirkung neutralisieren könnten, ist jedoch eher unwahrscheinlich.

TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 haben keine on/off Schalter Funktion für die Angiogenese. Die gegenseitige vollständige Unterdrückung ihrer anti-angiogenen Effekte würde wiederum voraussetzen, dass sowohl die quantitative Expression der Moleküle, wie auch die Wirkungskraft und die Mechanismen ihrer anti-angiogenen Wirkung identisch sind. Anhand der in dieser Studie und aus der Literatur bekannten Daten ist diese Eventualität jedoch unwahrscheinlich.

In dieser Arbeit wurden keine quantitativen Vergleiche zwischen der wandschubspannungsabhängigen Expression von TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 durchgeführt. Allerdings lässt die unterschiedliche Modulation dieser Gene durch andere angiogeneserelevante Faktoren (z. B. VEGF) eine deckungsgleiche Expression von TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 bei der Angioadaptation nicht vermuten. Bezüglich der Wirkungskraft dieser Gene als Angiogenese Inhibitoren existieren in der Literatur Daten, die METH-1/ADAMTS-1 in bestimmten Assays („cornea pocket assay“ und „chorioallantoic membrane assay“) eine höhere Effektivität zuschreiben (Vázquez et al., 1999). Ob unter anderen Versuchsbedingungen, sprich in anderen Angiogenese Assays, dasselbe Verhältnis besteht, ist nicht bekannt. Auch die Mechanismen, über welche TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 ihre anti-angiogenen Wirkungen ausüben, sind zum Teil unterschiedlich. Während für TSP-1 die Induktion der endothelialen Apoptose eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Angiogenese spielt, ist für METH-1/ADAMTS-1 eine solche Wirkung nicht beschrieben (Vázquez et al., 1999). Zusammenfassend deutet die entgegengesetzte wandschubspannungsabhängige Regulation von TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 auf eine gegenseitige Beeinflussung, aber nicht Neutralisation, während der strömungsgesteuerten Angioadaptation hin.

Für die Interpretation einer möglichen Wechselwirkung während der Angioadaptation ist es außerdem notwendig, die Zeitgänge der wandschubspannungsabhängigen Modulation von TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 zu berücksichtigen. Die in dieser Studie untersuchte Induktion von METH-1/ADAMTS-1 durch Strömung sowie seine Hemmung bei Strömungsstillstand

erreichen schon nach 4 Stunden das Maximum, während die Modulation von TSP-1 erst einige Stunden später erfolgt. In einem gewissen Zeitfenster wären dann TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 nicht divergent moduliert: In den ersten Stunden nach Veränderung der Strömungsbedingungen, statisch-auf-dynamisch beziehungsweise dynamisch-auf-statisch, wären beide Gene hoch, beziehungsweise niedrig exprimiert (Abb. 4-3). In diesen Fällen würden dann TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 zusammenwirken.

Innerhalb von 4 h nach Strömungsexposition, wenn TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 gleichzeitig stark exprimiert werden, wäre ein Antagonismus für die Bindung an einem gemeinsamen Rezeptor denkbar. Ein möglicher Kandidat ist der CD36 Rezeptor. Durch Bindung der TSR Domäne von TSP-1 vermittelt CD36 die proapoptischen und anti-angiogenen Eigenschaften von TSP-1. Auch METH-1/ADAMTS-1 enthält TSR Domänen, die bei der Hemmung der Angiogenese involviert sind. Obwohl noch nicht erwiesen, wird eine Interaktion von METH-1/ADAMTS-1 mit CD36 vermutet. In diesem Fall wäre eine Konkurrenz zwischen TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 für die Bindung an CD36 möglich und damit die gegenseitige Limitierung der Wirkung beider Moleküle. Allerdings wird CD36 seinerseits durch Wandschubspannung moduliert (Hemmung) (Abb. 4-3). In dem obengenannten Zeitfenster erreicht seine Expression das Minimum und die möglichen Effekte einer kompetitiver Bindung von TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 an CD36 werden dadurch minimiert.

Obwohl TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 normalerweise als anti-angiogene Moleküle eingestuft werden, können in bestimmten Situationen TSP-1 und vermutlich METH-1/ADAMTS-1 die Angiogenese sogar unterstützen. Dies bietet eine weitere Möglichkeit für eine synergistische Wirkung bei entgegengesetzter Wandschubspannungsmodulation. Beide Proteine enthalten Domänen, die auch als angiogenesfördernd wirken können, wie z.B. die „zellbindende“ carboxyterminale Domäne für TSP-1 und die Disintegrin-Domäne für METH-1/ADAMTS-1. Während für METH-1/ADAMTS-1 noch keine eindeutigen Beweise einer möglichen pro-angiogenen Wirkung existieren, ist für TSP-1 bekannt, dass es in gewissen Angiogenese Assays („Aorta Ring“) und in Abhängigkeit von der Art seiner Präsentation (matrixgebunden vs. löslich; proteolytisch degradiert vs.

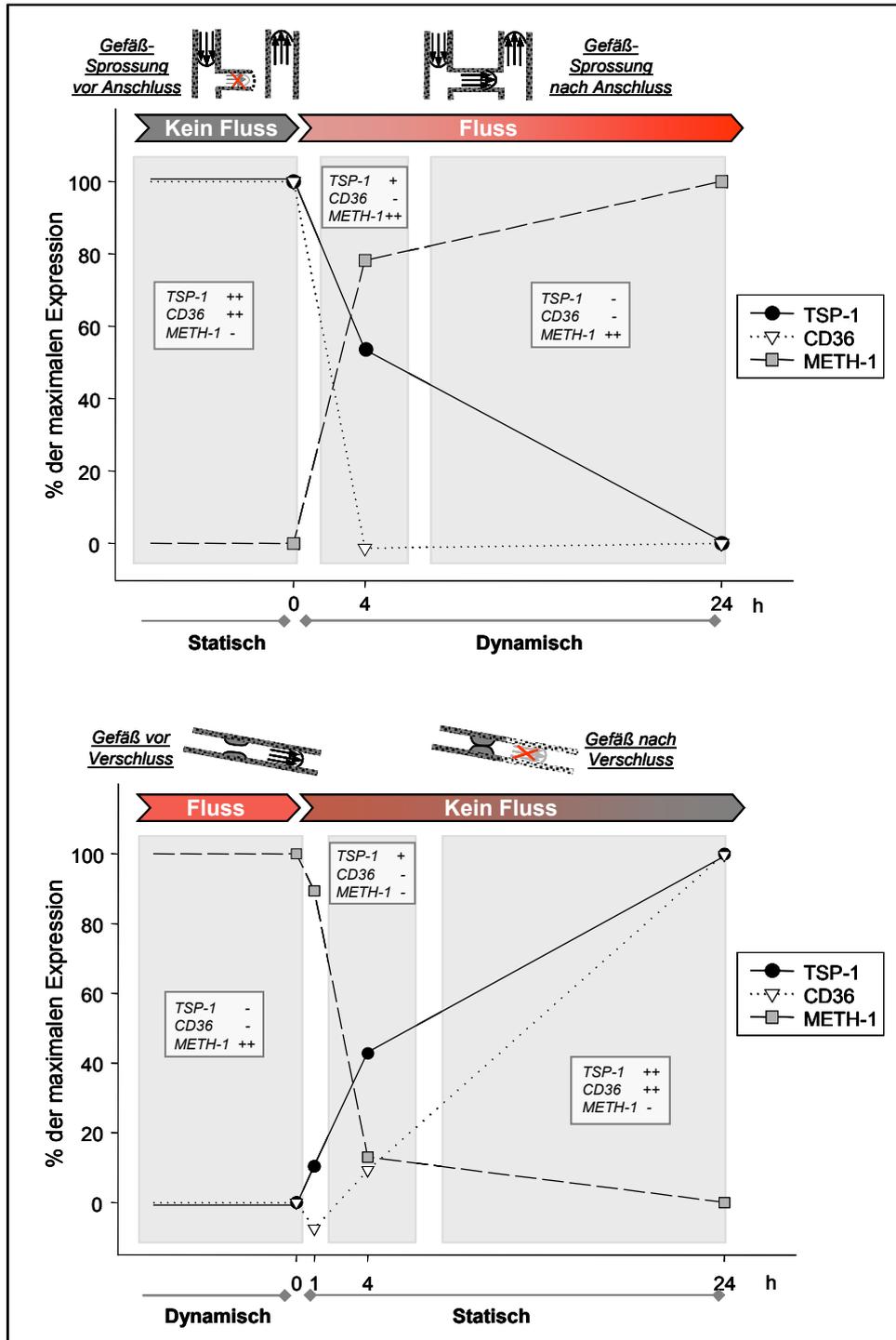


Abb. 4-3 Unterschiedliche Expressionszeitgänge von TSP-1, CD36 und METH-1 bei Veränderung der hämodynamischen Bedingungen.

undegradiert) die Angiogenese fördern kann (Nicosia und Tuszynski 1994; Tuszynski et al., 1987). In bestimmten angioadaptiven Situationen könnte dann die entgegengesetzte Modulation von TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 für eine synergistische Wirkung sorgen.

Durch die beschriebene Vielseitigkeit des möglichen Zusammenwirkens zwischen TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 ist, bei dem derzeitigen Kenntnisstand, die Einordnung der Rolle dieser Gene während der wandschubspannungsabhängigen Angioadaptation nur als Hypothese darstellbar. Bei verschiedenen Phasen oder Situationen des angio-adaptiven Prozesses wäre sowohl eine entgegengesetzte Wirkung wie auch eine gegenseitige Ergänzung der Effekte von TSP-1 und METH-1/ADAMTS-1 vorstellbar. Abbildung 4-4 stellt eine mögliche Mitwirkung dieser zwei Moleküle bei einem konkreten angio-adaptiven Prozess dar: die VEGF-induzierte Gefäßsprossung.

Das durch laminare Strömung perfundierte Muttergefäß befindet sich zuerst in einer „stabilen Lage“. METH-1/ADAMTS-1 wird stark exprimiert und hemmt Zellproliferation und Angiogenese. Zugleich ist durch Suppression von TSP-1 die endotheliale Apoptoserate vermindert. Bei Einwirkung von VEGF wird die Gefäßwand gelockert und eine Nische mit lokaler Präsenz leichter Turbulenzen entsteht. Unter diesen hämodynamischen Bedingungen wird die Expression von METH-1/ADAMTS-1 zum Teil reduziert, während die von TSP-1 weiterhin niedrig gehalten wird. Dies impliziert eine Reduzierung der allgemeinen anti-angiogenen Kräfte und die Angiogenese wird ermöglicht. Beim Voranschreiten der Sprossung herrscht in dem wachsenden Gefäß Strömungsstillstand. In der erste Phase dieses Zustandes wird die Expression von METH-1/ADAMTS-1 nahezu vollständig gehemmt, während die Induktion von TSP-1 durch Strömungsstillstand noch nicht maximal ist. Außerdem wird die Expression von TSP-1 in Endothelzellen in den ersten Stunden durch VEGF unterdrückt (Suzuma, K. et al., 1999). Das bedeutet, dass in dieser Phase beide anti-angiogenen Moleküle niedrig exprimiert werden und die Angiogenese sich voll entfalten kann.

Findet die Gefäßsprosse Anschluss an ein perfundiertes Gefäß, so wird das neuentstandene Gefäß durchströmt (überwiegend laminare Strömung) und durch das oben beschriebene TSP-1/METH-1/ADAMTS-1 Expressionsmuster stabilisiert. Fehlt jedoch der Gefäßanschluss, kann die Überexpression von TSP-1 eine wichtige Rolle zum Abbau („pruning“) der „erfolglosen“ Gefäßsprosse spielen. Während METH-1/ADAMTS-1 weiterhin gering exprimiert ist, wird bei langfristigem Strömungsstillstand (24 Stunden) TSP-1 stark induziert. Zu diesem

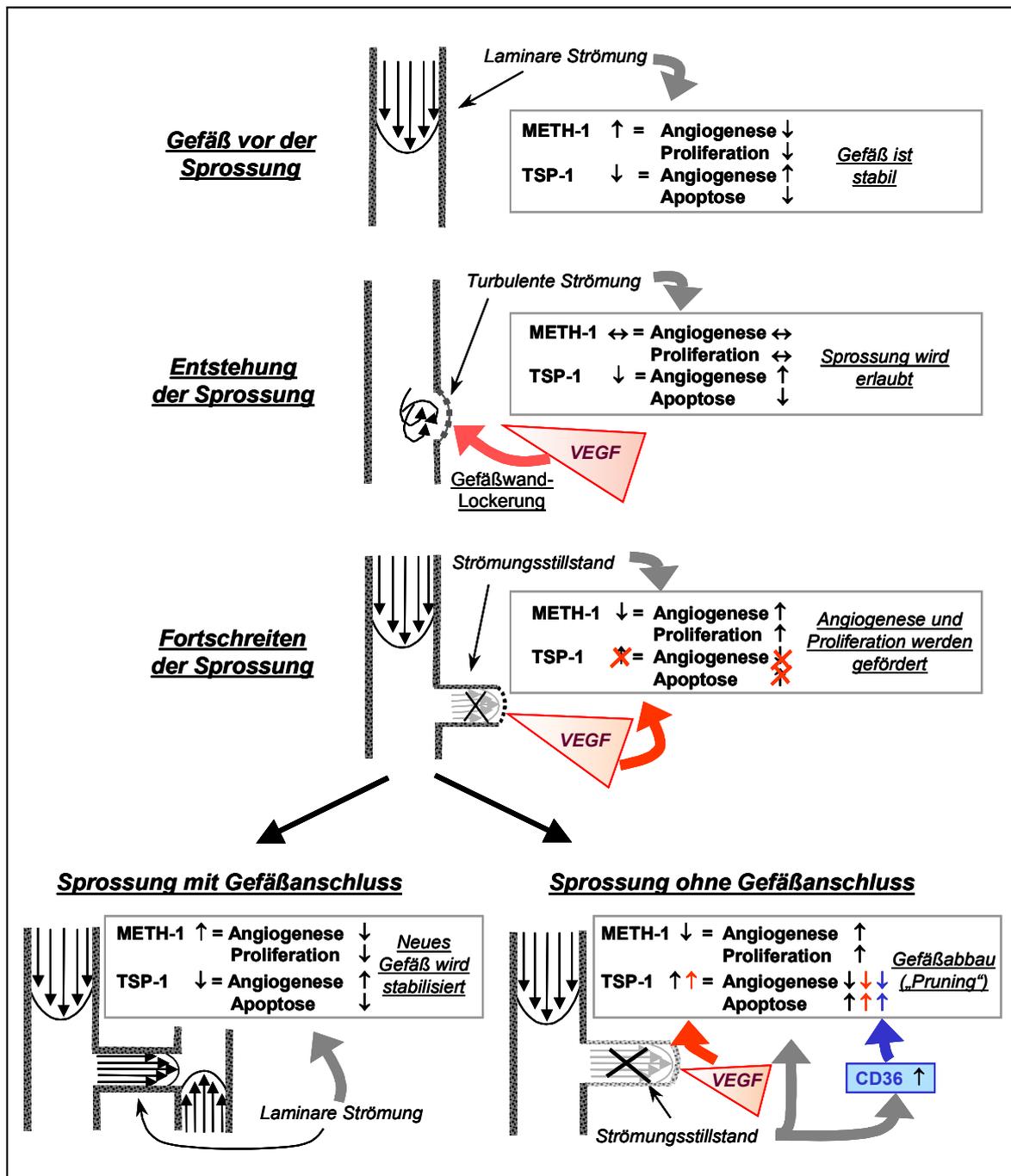


Abb. 4-4 Modell der kombinierten Wirkung von TSP-1 und METH-1 bei der VEGF-induzierten Gefäßsprossung.

Zeitpunkt wird die Expression von TSP-1 durch VEGF noch erhöht. In dieser Situation wird die Angiogenese stark gehemmt und vor allem wird die endotheliale Apoptose angeregt. Außerdem ist der CD36 Rezeptor durch Strömungsstillstand induziert: Durch Bindung an diesen Rezeptor übt TSP-1 seine anti-angiogene und pro-apoptotische Wirkung auf Endothelzellen aus. Insgesamt findet eine

Steigerung der TSP-1-Effekte statt. Auf diese Weise kann TSP-1 eine entscheidende Rolle beim Abbau nicht perfundierter Gefäßsprossen spielen.

4.2.2 Nicht Angiogenese relevante Mitglieder der TSR Familie

4.2.2.1 Properdin

Expressionsregulation durch Strömung

Properdin ist ein positiver Regulator des Komplementsystems, indem es die ansonsten instabile C3 und C5 Konvertase des alternativen Weges (C3bBb und C3b_nBb) bindet und stabilisiert (Pangburn 1989; Nolan und Reid 1993). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Properdin in statisch kultivierten Endothelzellen kaum nachweisbar ist und nach Wandschubspannungsstimulation synthetisiert und freigesetzt wird.

Für eine signifikante Induktion von Properdin wird eine Wandschubspannung von 2-3 dyn/cm² benötigt. Dieser Wert liegt etwas über dem typischen Mittelwert im menschlichen venösen System (ca. 1 dyn/cm²) aber deutlich unter dem arteriellen Mittelwert (ca. 10 dyn/cm²) (Langille, 1993; Pries et al., 1995). Aus diesem Grund ist die Synthese von Properdin ein Prozess, der in weiten Teilen des Gefäßsystems stattfinden kann. Unterstützend für diese Hypothese ist der Befund, dass die wandschubspannungsabhängige Expression von Properdin wahrscheinlich nicht auf einen spezifischen Endothelzelltyp begrenzt ist: Sie kommt sowohl in Endothelzellen von mikrovaskulären (HCMEC) als auch von makrovaskulären Gefäßen (HUVEC) vor. Die beobachtete Induktion von Properdin in Endothelzellen ist nicht transient, sondern ist anhaltend in Anwesenheit von Wandschubspannung und wird erst bei dauerhaftem Strömungsstillstand unterbrochen. Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie und der strategischen Position des Endothels entlang der Gefäße ist eine Rolle des Endothels als Quelle für Properdin im Plasma wahrscheinlich.

Bislang war die physiologische Quelle für Properdin im Plasma (4-6 µg/ml) nicht bekannt (Maves und Weiler, 1993; Nolan und Reid 1993). Im Gegensatz zu vielen

Komponenten des Komplementsystems wird Properdin nicht in der Leber synthetisiert. Monozyten und neutrophile Granulozyten (PMN) können Properdin freisetzen (Schwaeble et al., 1994; Wirthmueller et al., 1997). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass diese Zellen für den relativ hohen Plasmaspiegel von Properdin verantwortlich sein können: Die Anzahl der Monozyten im Blut ist zu gering und die Freisetzung von Properdin durch degranulierte PMNs erfolgt in extravaskulären Regionen. Obwohl verschiedene Studien die Rolle von Endothel als extrahepatischer Quelle für Komplementproteine hervorgehoben haben (Brooimans et al., 1989, Julen et al., 1992; Guc et al., 1993; Kawakami et al., 1997; Klegeris et al., 2000; Langeggen et al., 2000) konnte bislang keine endotheliale Synthese von Properdin nachgewiesen werden (Guc et al., 1993). In der vorliegenden Studie erlaubte die Ausdehnung der Untersuchung der Genexpression in Endothelzellen unter Berücksichtigung ihrer hämodynamischen Umgebung die Identifizierung des Endothels auch als extrahepatische Quelle für Properdin.

Bedeutung für die Regulation der Komplementaktivierung

Urbich et al. (2000) haben eine mögliche Involvierung der Wandschubspannung bei der Regulation der Komplementaktivierung angeregt. Clusterin inhibiert die korrekte Bildung von Membran-Angriffs-Komplex (MAK) und ist dadurch in die Regulation des terminalen Weges involviert. Dieser Weg ist für alle drei Wege der Komplementaktivierung (klassische, alternative und Lektine) gleich. Das bedeutet, dass die strömungsabhängige Modulation von Clusterin die Komplementfunktion regulieren kann, unabhängig davon, welcher Weg bei der Aktivierung involviert war.

Die in dieser Arbeit gezeigte Induktion von Properdin bei Wandschubspannung schlägt eine Verbindung zwischen hämodynamischen Bedingungen und der Modulierung des alternativen Weges vor. Das bedeutet, dass Veränderungen der Wandschubspannung (z. B. Stenose) die lokale Konzentration von Properdin verändern und dadurch das Gleichgewicht zwischen dem alternativen und den

anderen Wegen der Komplementaktivierung verschieben kann. Allerdings ist die mögliche Bedeutung einer solchen Verschiebung zur Zeit unklar.

Bezüglich der pathophysiologischen Bedeutung der Regulation der Komplementaktivierung bei Wandschubspannung ist eine Verbindung mit der Entstehung von Arteriosklerose denkbar. Verschiedene Studien haben die Rolle von laminarer Strömung als anti-atherogen und von turbulenter Strömung als pro-atherogen hervorgehoben (Gimbrone et al. 2000; Berk et al. 2001). Auf der anderen Seite gibt es experimentelle Hinweise für eine Beteiligung der Komplementaktivierung am Entstehen und Fortschreiten der Arteriosklerose (Torzewski et al., 1997; Niculescu und Rus, 1999). Sowohl regulatorische Proteine der Komplementkaskade, als auch Aktivierungsprodukte sind im Bereich arteriosklerotischer Plaques nachgewiesen worden. Offenbar spielt die Aktivierung des Komplementsystems eine bedeutende Rolle für die Arteriosklerose.

Urbich et. al (2000) haben Clusterin als möglichen Mediator der anti-arteriosklerotischen Effekte der laminaren Strömung vorgeschlagen. Wie oben diskutiert, ist diese Komponente in Endothelzellen durch laminare Strömung induziert und würde dadurch den terminalen Weg der Komplementaktivierung inhibieren. Eine mögliche differenzielle Modulierung von Clusterin bei turbulenter Strömung ist jedoch nicht getestet worden.

In der hier vorliegenden Studie würde die Induktion von Properdin bei laminarer Strömung eine positive Modulation der Komplementaktivierung durch den alternativen Weg suggerieren. Das könnte bedeuten, dass bei laminarer Strömung die inhibierenden Effekte von Clusterin überwiegen und die Komplementaktivierung auf einem physiologischen Niveau halten. Dagegen wird die Induktion von Properdin unter turbulenten Strömungsbedingungen (z. B. bei arteriosklerotischen Plaques) lokal verstärkt. Das könnte die Clusterin-vermittelte Hemmung der Komplementaktivierung überwinden und das Fortschreiten der Arteriosklerose erlauben (Bhakdi, 1998). Der gleiche Mechanismus könnte nicht nur für das Fortschreiten, sondern auch für das Entstehen von Arteriosklerose bei arteriellen Bifurkation eine Rolle spielen.