

## **1. Einleitung**

### **1.1. Blutströmung, Endothelzelle und Gefäßadaptation**

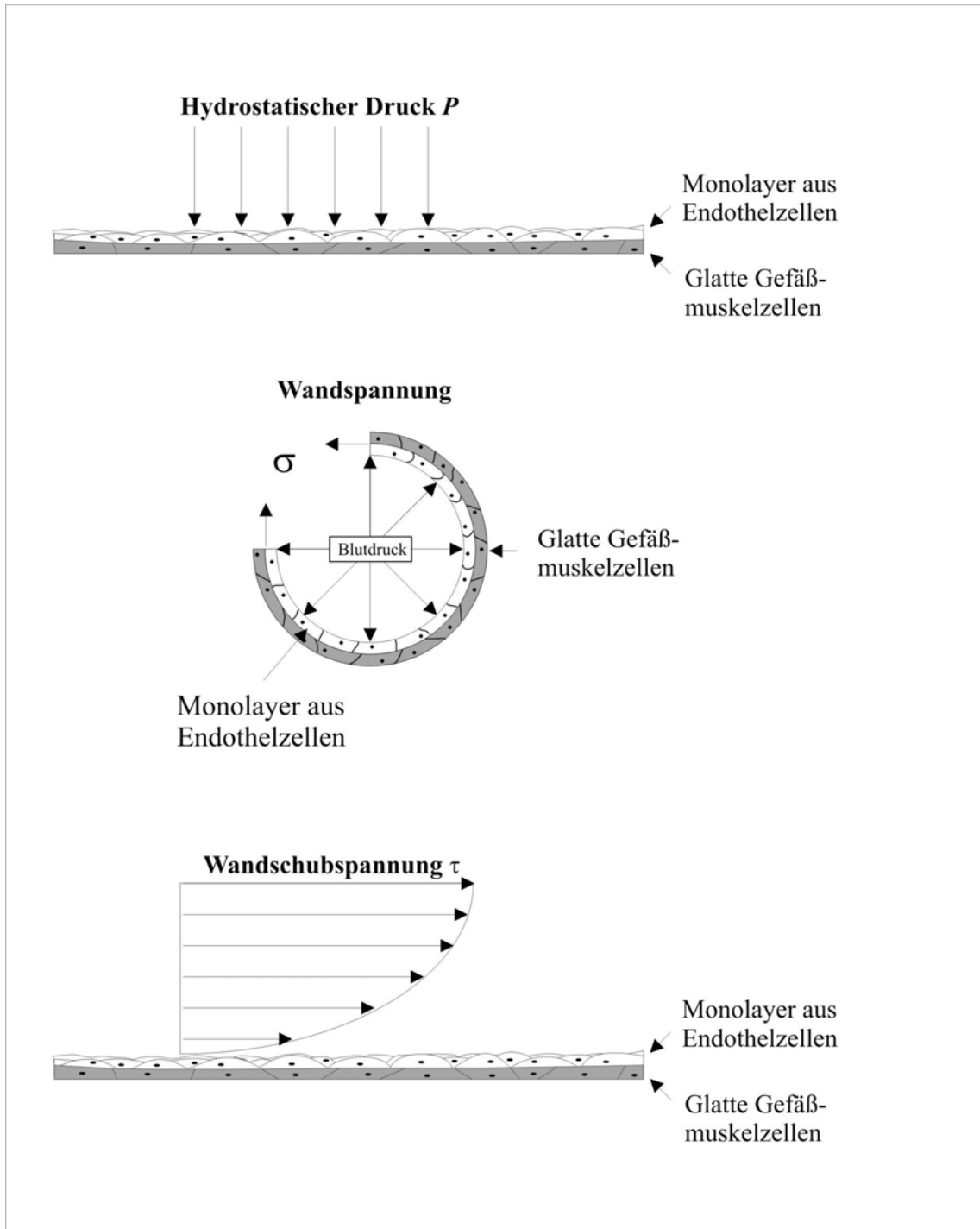
Die Blutströmung und die aus ihr resultierenden Kräfte spielen eine wichtige Rolle bei zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen, denn durch die Ausübung von biomechanischen Reizen auf die Gefäßwand können Adaptationen des vaskulären Systems gesteuert werden.

Die das Gefäß auskleidenden Endothelzellen haben dabei eine Schlüsselposition. Sie verarbeiten den physikalischen Stimulus, der durch die Strömung vermittelt wird und lösen kurzfristige Gefäßregulation und langfristiges vaskuläres Remodeling aus. Insbesondere die langfristigen Umbauvorgänge sind es, die Leistungssteigerung durch Ausdauertraining, Angiogenese bei Anämie, Wundheilung und Kollateralisierung im Rahmen von Herzinfarkt und Apoplex ermöglichen. Auch beim pathophysiologischen Umbau der Gefäße bei Arteriosklerose, Hypertonie, Diabetes mellitus, Retinopathien und Makula-Degeneration haben die von Endothelzellen vermittelten langfristigen Umbauvorgänge zentrale Bedeutung.

#### **1.1.1. Auf die Endothelzelle wirkende biomechanische Kräfte**

Endothelzellen bilden eine mechanische Barriere zwischen Blut und Gefäßwand und werden *in vivo* aufgrund ihrer Position drei hämodynamischen Kräften ausgesetzt (Dobrin et al., 1989):

- Dem hydrostatischen Druck, entsprechend dem transmuralen Druckgefälle zwischen Blutgefäß und Gewebe,
- den rhythmischen Dehnungskräften, die aufgrund der pulsatilen Druckänderungen den Querschnitt des Gefäßes in zirkulärer Richtung belasten,
- und der Wandschubspannung, die durch das strömende Blut auf die Gefäßwand in Richtung der Längsachse des Gefäßes ausgeübt wird (vergleiche Abbildung 1).



**Abbildung 1: Auf die Endothelzelle wirkende biomechanische Kräfte**

Endothelzellen sind durch den Blutfluss verschiedenen biomechanischen Kräften ausgesetzt. Der hydrostatische Druck wirkt senkrecht zur Oberfläche. Durch Blutdruck und Blutdruckamplitude werden die zirkuläre Wandspannung und rhythmische Dehnungen verursacht (Stretch). In axialer Richtung wirkt die durch die Blutströmung ausgeübte Wandschubspannung.

Wesentliches Merkmal dieser Kräfte ist ihre Wirkungsrichtung in Bezug auf die Endothelzelle. Während der hydrostatische Druck und die Dehnungskräfte primär senkrecht zur Endothelzelloberfläche ausgerichtet sind, setzt der Vektor der Wandschubspannung tangential zur luminalen Oberfläche in Richtung der Blutströmung an.

Endothelzellen sind für die Detektion von hydrostatischem Druck aufgrund ihrer Position in der Gefäßwand nur bedingt geeignet. Mit Ausnahme von Kapillaren wird der transmurale Druck weniger durch den dünnen Endothelmonolayer als über die viel stärkere Lamina media aufgenommen (Barakat und Davies, 1998). Zudem enthalten Endothelzellen kaum komprimierbare Anteile (Busse und Fleming, 1998). Der hydrostatische Druck ist somit vermutlich nicht das Schlüsselsignal für durch Endothel vermittelte vaskuläre Adaptation.

Herzfrequenz und Blutdruckamplitude werden als rhythmische Dehnung auf das Endothel übertragen. Dieser Stimulus wird als Stretch bezeichnet (Davies und Tripathi, 1992). Stretch scheint nicht entscheidend für vaskuläre Adaptation zu sein. Einerseits sind bis heute weitaus weniger stretchabhängige als wandschubspannungsabhängige Gene beschrieben worden. Zu diesen Genen zählen NOS (Ziegler et al., 1998), MCP-1 (Awolesi et al., 1995), ET-1 (Malek und Izumo, 1992) und ICAM-1 (Cheng et al., 1996). Hierbei ist zu berücksichtigen, daß für jedes einzelne dieser Gene auch eine Abhängigkeit von Wandschubspannung nachgewiesen werden konnte (vergleiche Tabelle 1). Andererseits findet die bei Exposition durch Wandschubspannung beobachtbare Änderung der Zellmorphologie nicht statt (Davies und Tripathi, 1992).

Wandschubspannung wird durch den Blutvolumenstrom an der luminalen Seite der Endothelzelle erzeugt. 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. Die Wandschubspannung ist somit der geeignetste Parameter, um die Anpassung des Blutgefäßes an den Blutfluss zu vermitteln.

### **1.1.2. Modelle zur Untersuchung wandschubspannungsabhängiger Effekte**

Um die Effekte der Wandschubspannung auf das Endothel zu untersuchen, werden *in vitro* zwei verschiedene Modelle verwendet. Bei dem ersten Modell handelt es sich um Flusskammern, bei denen zwei parallele Platten den Flusskanal begrenzen (Mo et al., 1991). Auf einer dieser Platten

werden Zellen kultiviert. Die Kammer wird mit einem Medium bekannter Viskosität durchströmt, so daß die Wandschubspannung, der die Zellen ausgesetzt sind, eine lineare Funktion des Volumenflusses ist.

Das zweite Modell bedient sich einer Apparatur, die ursprünglich für die Bestimmung der Viskosität entwickelt wurde, dem Cone-and-Plate-Viscometer (Higginbotham, 1950). In einem Platte-Kegel-System werden durch einen rotierenden Konus über eine Flüssigkeit auf eine feste Bodenplatte vom Ort unabhängige Scherkräfte übertragen. Wird als Bodenplatte eine mit Zellen bewachsene Petrischale verwendet, so erfolgt die Übertragung der Scherkräfte in Form von Wandschubspannung auf die Zellen (Bussolari und Dewey, 1982). Durch Abstimmung von Konusgeometrie, Mediumviskosität und Rotationsgeschwindigkeit kann bei dieser Anordnung ein breites Spektrum an laminarer oder turbulenter Strömung erzeugt werden. Ein solches Instrument wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet.

### **1.1.3. Kurzfristige strömungsvermittelte Anpassungsvorgänge**

Mechanische Kräfte an der luminalen Seite des Endothels sind entscheidend an der Regulation der Freisetzung vasoaktiver Substanzen beteiligt. Diese Substanzen werden auch als endotheliale Autakoide bezeichnet und weisen große Unterschiede in ihrer chemischen Struktur auf (Busse und Fleming, 1998). Hierzu zählen Prostanoiden wie Prostaglandin  $I_2$ , freie Radikale wie Stickoxid (NO) und Superoxidanionen ( $O_2^-$ ). In ihrer integralen Wirkung sind sie vorwiegend für die Anpassung und Aufrechterhaltung des Vasotonus verantwortlich. Die Wirkung der Autakoide ist jedoch nicht auf die Regulation der Weite des Gefäßlumens beschränkt. Vielmehr können Autakoide auch proliferative und antihämostatische Wirkungen haben (Malek et al., 1993a).

Da im allgemeinen mehrere dieser Substanzen im Anschluss an einen mechanischen Stimulus freigesetzt werden, ist die Abgrenzung ihrer individuellen physiologischen Bedeutung schwierig.

Eine der ersten dokumentierten zellulären Reaktionen des Endothels auf physikalische Stimuli war die Veränderung der Freisetzung von Prostaglandin  $I_2$  (Frangos et al., 1985). Nach Einsetzen von Strömung folgt einem initialen schnellen Anstieg eine über mehrere Stunden abnehmende Rate, die sich letztendlich auf einem gleichmäßig hohen Niveau einpendelt. Der Wert dieser zweiten Phase ist direkt vom Betrag der Wandschubspannung abhängig (Berthiaume und

Frangos, 1992). Die Bildung von Prostaglandin I<sub>2</sub> kann beträchtlich gesteigert werden, wenn der physikalische Reiz bei gleicher durchschnittlicher Wandschubspannung pulsatil vermittelt wird (Grabowski et al., 1985). Prostaglandin I<sub>2</sub> hat eine starke vasodilatorische Wirkung, gleichzeitig ist es der stärkste natürliche Inhibitor der Plättchenaggregation und wirkt auf diesem Wege antithrombotisch (Moncada et al., 1976).

Das auch als „Endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnete NO weist eine höhere vasodilatorische Potenz bei kürzerer physiologischer Halbwertszeit als Prostaglandin I<sub>2</sub> auf. Innerhalb von Millisekunden nach Einsetzen von Wandschubspannung kommt es zu einem bis zu fünfzigfach erhöhten Ausstoß (Cooke et al., 1991) (Takada et al., 1994). Der Effekt des nun vermehrt gebildeten NO erstreckt sich nicht nur auf die Relaxation glatter Gefäßmuskulatur. Durch die Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels wird auch die Aggregation von Blutplättchen gehemmt (Stamler et al., 1989).

Das Polypeptid Endothelin-1 (ET-1) ist ein starker Vasokonstriktor mit proliferativer Wirkung auf glatte Muskulatur. Es wird nach dem Einsetzen von Strömung zunächst vermehrt freigesetzt, später aber vermindert exprimiert (Malek et al., 1993b). Die biologische Bedeutung dieser zweiphasigen Antwort ist nicht geklärt.

Es ist anzunehmen, daß noch nicht alle Autakoide bekannt sind. Vermutlich gehört auch der „endothelium-derived hyperpolarizing factor“ (EDHF) zu dieser Substanzgruppe. EDHF bewirkt durch eine Hyperpolarisierung der glatten Gefäßmuskelzellen eine Gefäßdilatation (Cohen und Vanhoutte, 1995). Seine molekulare Struktur ist bislang noch nicht eindeutig identifiziert. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, daß es sich um ein den Epoxyeikosatetraensäuren (EETs) verwandtes Molekül handeln könnte (Campbell et al., 1996). EETs sind Cytochrom-P450-abhängige Metabolite der Arachidonsäure. Die strömungsabhängige Regulation der Freisetzung von EDHF ist nicht eindeutig geklärt. Da ein physiologischer NO-Spiegel die Freisetzung inhibiert, wird angenommen, daß EDHF einen Kompensationsmechanismus zur Gefäßdilatation bei Versagen des NO-Systems darstellt (Bauersachs et al., 1996).

Durch die beschriebenen Vorgänge kann das Lumen des Gefäßes zwar innerhalb gewisser Grenzen an den aktuellen Bedarf angepasst werden, während gleichzeitig die Blutgerinnung im

gut perfundierten Gefäß verhindert wird. Langfristige Gefäßadaptation mit grundlegenden Umbauvorgängen der Blutgefäße erfordern jedoch Reaktionen der Endothelzellen auf Ebene der Genexpression.

#### **1.1.4. Langfristige strömungsvermittelte Anpassungsvorgänge**

Die langfristige Adaptation eines Netzwerkes aus Blutgefäßen erfolgt durch Remodeling und Angiogenese (Skalak und Price, 1996). Remodeling bezeichnet strukturelle Veränderungen bereits existierender Gefäße. Dazu gehören alle Veränderungen der Gefäßwand, aber auch die Proliferation und die Regression von Gefäßen. Der Begriff Angiogenese beschreibt die Ausbildung neuer Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßen. Im Gegensatz zur Angiogenese bedeutet Vaskulogenese die Ausbildung neuer Gefäße durch die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (Risau, 1995).

##### **1.1.4.1. Remodeling**

Remodeling wird durch Vorgänge auf zellulärer Ebene vermittelt. Durch Zellhypertrophie, Zellproliferation, Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix und Zelltod wird das Gefäßsystem an den jeweiligen Bedarf adaptiert. Kurzfristige Anpassungsvorgänge, die durch die Kontraktion glatter Gefäßmuskulatur verursacht werden, fallen nicht unter den Begriff Remodeling (Skalak und Price, 1996).

Remodeling kann auf drei verschiedene Arten erfolgen.

- Eine Möglichkeit ist die Anpassung von Lumendurchmesser, Gefäßwand und Länge bereits bestehender Arteriolen. Dazu sind Proliferation und Migration von Endothel- und glatten Muskelzellen sowie Degradierung und Neusynthese der Basalmembran notwendig (Hori et al., 1990). All diese Vorgänge können durch hämodynamische Stimuli hervorgerufen werden.
- Eine weitere Möglichkeit ist die Formation neuer Arteriolen aus den kapillären Gefäßabschnitten. In diesem Fall differenzieren sich Zellen aus der Umgebung kapillärer Segmente zu kontraktilen Elementen (Price et al., 1994).

- Die dritte Möglichkeit ist der Anschluß einer neu gebildeten Arteriole an ein bestehendes arterielles Netzwerk (Skalak und Price, 1996).

Venen und Venolen reagieren ebenfalls auf hämodynamische Veränderungen. Chronische Druckerhöhung im venösen System führt zu Wandverdickung mit verstärkter Bindegewebsbildung (Monos, 1993). Das venöse Remodeling spielt eine wichtige Rolle für autogene Gefäßimplantate aus der venösen Strombahn, insbesondere bei der Koronarbypasschirurgie. Durch Training wird im Skelettmuskel sowohl venöses Remodeling als auch die Neubildung von Venolen ausgelöst (Adair et al., 1995). Diese langfristigen Vorgänge beeinflussen die venöse Kapazität und den durch Venolen erzeugten postkapillären Widerstand.

#### **1.1.4.2. Angiogenese und kapilläres Remodeling**

Neue Kapillaren entstehen bei der Angiogenese durch Sprossung oder Intussuszeption aus bereits bestehenden Kapillaren oder Venolen (Hansen et al., 1996). Dieser Vorgang kann in verschiedene Schritte aufgeteilt werden. Diese Schritte sind im Einzelnen:

- Degradierung der Basalmembran und der extrazellulären Matrix
- Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen
- Formierung eines neuen Lumens und Ausbildung einer neuen Basalmembran
- Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen zum Aufbau der Gefäßwand (Hudlicka et al., 1992).

Die kapilläre Angiogenese ist nicht auf proliferative Gewebe beschränkt. Vielmehr herrscht im kapillaren Netzwerk ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Angiogenese und Remodeling (Hansen et al., 1994). Die Steuerung dieser komplexen Vorgänge erfolgt durch Wachstumsfaktoren, die zum Teil von den Endothelzellen selbst sezerniert werden. Trigger der Freisetzung angiogener Faktoren können einerseits eine Gewebshypoxie (Michiels et al., 2000) und andererseits die lokalen hämodynamischen Bedingungen im Gefäß sein (Gimbrone et al., 1997).

Ob Vaskulogenese, das heißt die Ausbildung eines arteriellen Gefäßes aus Stammzellen, im adulten Gewebe existiert, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Voraussetzung für die

Verbindung einer neuen Arteriole mit dem bestehenden Netzwerk ist in jedem Fall die Degradierung der Gefäßwand. Dieser Vorgang muß in Gefäßen mit relativ großer Wanddicke und hohem Blutdruck erfolgen. Vermutlich sind hierfür potente Proteasen notwendig (Schwachtgen et al., 1998). Die vor kurzem beschriebene vermehrte Expression von Metalloproteinase-9 (MMP-9) beim mikrovaskulären Remodeling im Muskulus spinotrapezius der Ratte wird als wichtiger Schritt für den Beweis dieser Form des arteriellen Remodelings gewertet (Van Gieson und Skalak, 2001).

Die Zusammenhänge zwischen Hämodynamik und kapillärer Angiogenese sind nur zum Teil geklärt. Eine Hypothese besagt, daß verlängerter Kontakt mit Erythrozyten und Leukozyten bei langsamer Strömung an Verzweigungen oder Stenosen zu einer direkten Reaktion der Endothelzellen führt (Hansen et al., 1996). Dabei werden lokal Entzündungsmediatoren und angiogene Faktoren ausgeschüttet. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die hämodynamischen Reize durch Endothelzellen aufgenommen und integriert werden. Dies führt zur Expression spezifischer Gene, die eine modulierte Antwort auf die biomechanische Umgebung verursachen. Durch Zugkräfte an der Kapillarwand kann beispielsweise eine vermehrte Freisetzung von basic fibroblast growth factor (bFGF), einem potenten Mitogen für Endothelzellen und glatte Muskelzellen, ausgelöst werden (Malek et al., 1993a).

#### **1.1.5. Optimierung realer Gefäßnetzwerke**

Die unter 1.1.4. aufgeführten Punkte stellen empirisch gewonnene Erkenntnisse dar. Sie belegen, daß die Netzwerkarchitektur der Blutgefäße nur zum Teil genetisch determiniert ist. Vielmehr sind biochemische Mediatoren wie Wachstumsfaktoren und der Sauerstoffpartialdruck im Gewebe sowie mechanische Kräfte an der Vermittlung der Adaptation beteiligt. Während die einzelnen Beobachtungen plausibel erscheinen, entsteht die Frage, welchen Grundsätzen die integrative Adaptation des Gefäßsystems folgt. Aus diesem Grunde wurden theoretische Modelle geschaffen, nach deren Vorgaben die optimale Anpassung an funktionelle Bedürfnisse erfolgen kann.



### **1.1.5.1. Murray`s Law**

Murray entwickelte die Hypothese, daß die Architektur des Gefäßnetzwerkes zwei verschiedenen Anforderungen gerecht werden muß (Murray, 1926). Einerseits müssen die „operating costs“ des Systems, d.h. der energetische Aufwand, möglichst gering gehalten werden. Diese „Betriebskosten“ werden durch zwei Komponenten bestimmt. Eine Komponente ist die Arbeit des Herzens, die aufgebracht werden muß, um die Blutströmung zu erzeugen; die andere ist die metabolische Arbeit, die für die Bereitstellung und die Aufrechterhaltung von Blutgefäßen und Blut notwendig ist. Gleichzeitig muß eine suffiziente Versorgung aller Gewebe gewährleistet sein. Nach Murray hat ein solchermaßen optimiertes Gefäßsystem zwei dominierende Eigenschaften. Der Blutfluss im Gefäß ist proportional zur dritten Potenz des Lumendurchmessers und die Wandschubspannung entlang der Teilabschnitte des Netzwerkes bleibt konstant.

### **1.1.5.2. Pressure-Shear Hypothese**

Die Hypothese von Murray stimmt nur für arterielle Gefäßsegmente mit experimentell erhobenen Daten überein. Der Abfall der Wandschubspannung vom arteriellen zum venösen System in der Endstrombahn macht deutlich, daß „Murray`s law“ nicht auf alle Gefäßabschnitte anwendbar ist. Pries stellte daher 1995 die „Pressure-Shear“ Hypothese vor (Pries et al., 1995). Nach diesem Modell ist die Wandschubspannung an einem bestimmten Punkt des vaskulären Systems eine Funktion des transmuralen Druckes. Das Gefäßnetzwerk wächst und adaptiert, um den charakteristischen Quotienten zwischen Wandschubspannung und Druck zu erreichen bzw. aufrecht zu erhalten.

„Murray`s Law“ und Pressure-Shear Hypothese beschäftigen sich mit der Frage, nach welchen Prinzipien die Architektur von Gefäßnetzwerken ausgerichtet ist. Die publizierten Mechanismen der Gefäßadaptation widersprechen zwar den theoretischen Modellen nicht. Sie stellen jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt kein ausreichendes System dar, um die Wahrung dieser Prinzipien zu ermöglichen. Die Existenz weiterer Mechanismen ist demnach zu erwarten.

## **1.2. Hämodynamik und Genexpression**

### **1.2.1. Mechanotransduktion in Endothelzellen**

Die Frage nach an der strömungsvermittelten Angioadaptation beteiligten Genen impliziert auch die Frage nach deren Aktivierung bzw. Deaktivierung. Obwohl die Mechanotransduktion in Endothelzellen Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war, sind die beteiligten Mechanismen immer noch nicht umfassend erforscht.

Die Komplexität der Verarbeitung des hämodynamischen Stimulus durch die Endothelzelle zeigte, daß zwar Membranproteine die ersten Moleküle sind, die an der Mechanotransduktion beteiligt sind, danach jedoch verschiedene Signalwege eingeschlagen werden (Davies, 1995).

Ein Mechanismus beschreibt die Mechanotransduktion durch ein integrales Membranprotein in ein biochemisches oder elektrophysiologisches Signal. Diese Form der Mechanozeption wird auch als „zentralisierte Form“ bezeichnet. Typische Beispiele sind die Aktivierung von Ionenkanälen (Olesen et al., 1988), G-Proteinen (Simon et al., 1991), und Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (Takahashi und Berk, 1996). Demgegenüber steht eine „dezentralisierte Form“ der Mechanotransduktion. Hier findet durch das Zytoskelett eine Transmission an intrazelluläre Strukturen statt. Der erstmalige Nachweis dieses Phänomens erfolgte 1993. Es wurde damals gezeigt, daß ohne die Bindung von Integrinen an der abluminalen Seite von Endothelzellen die Steifheit des Zellgerüsts nicht aufrecht erhalten werden kann (Wang et al., 1993). 1994 wurde das „Tensegrity“-Modell vorgestellt (Ingber et al., 1994). „Tensegrity“ beschreibt die Koppelung von Proteinen der extrazellulären Matrix an intrazelluläre Strukturen durch das Zytoskelett, das aus Komponenten mit unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften besteht. Unflexible und nicht-komprimierbare Bausteine sind durch elastische „Drähte“ verbunden. Zur Aufrechterhaltung dieses Gerüsts ist eine Grundspannung nötig, die nur durch die Bindung von extrazellulären Adhäsionsmolekülen wie Cadherine, Selectine, Integrine und cell-adhesion-molecules (CAMs) erzeugt werden kann. Sobald sich diese Spannung ändert, kommt es zur Umstrukturierung der einzelnen Elemente. Bei diesem Vorgang aktiviert das Zytoskelett die mit ihm assoziierten Strukturen. Auf diese Weise werden Membranproteine, Zell-Zell-Verbindungen,

Focal Adhesions und der Zellkern an die Signalverarbeitung angekoppelt (vergleiche Abbildung 2).

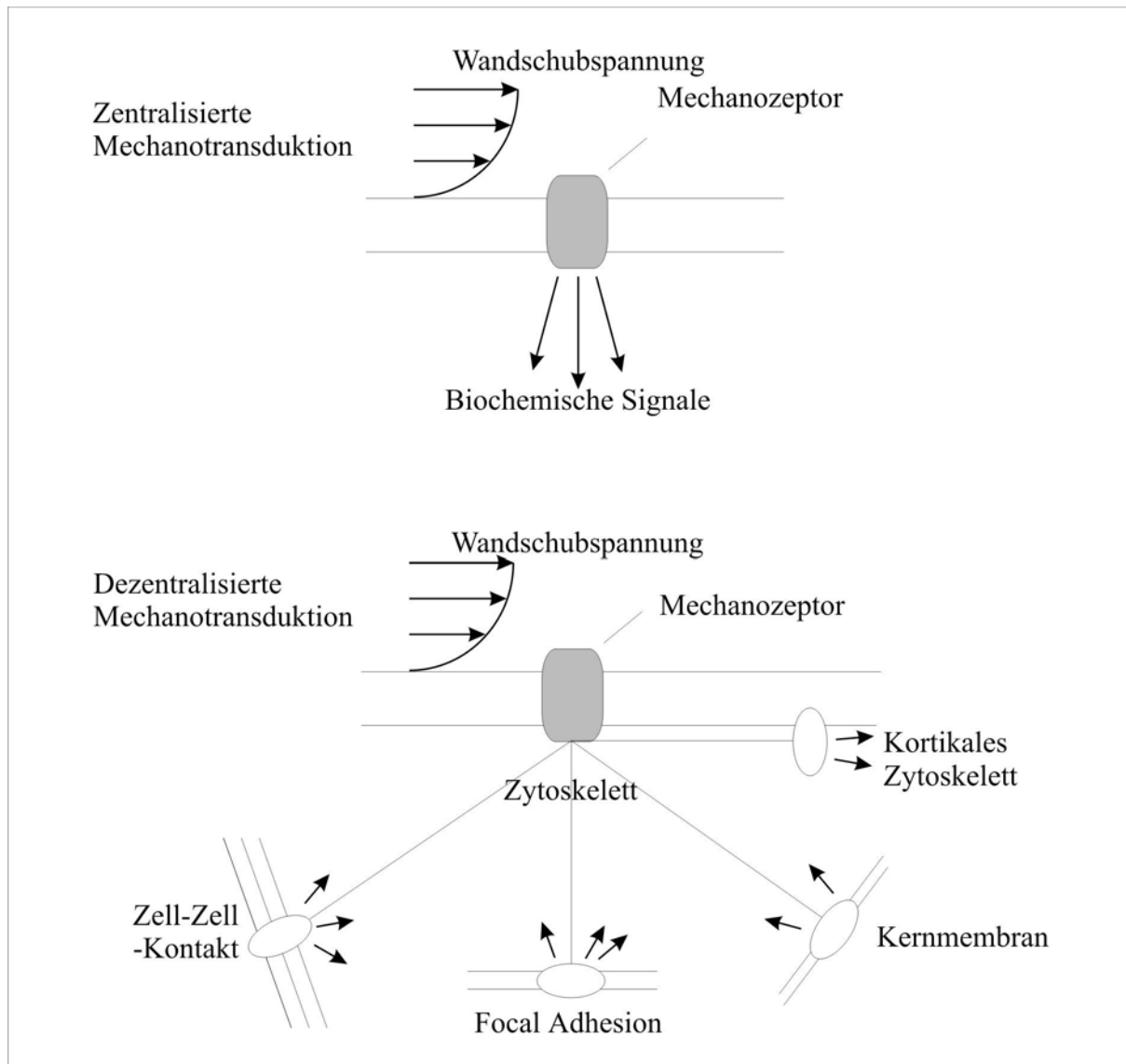


Abbildung 2:  
**Zentralisierte und dezentralisierte Form der Mechanotransduktion**

### **1.2.2. Mechanosensitive Genexpression in Endothelzellen**

Die Aktivierung mechanosensitiver Rezeptoren der Endothelzelle hat die Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden zur Folge (vergleiche Abbildung 3). Wichtige Bestandteile dieser Kaskaden sind die Proteinkinasen mitogen-activated-protein-kinase-1 (MAPK-1), extracellular-related-kinase 1 und 2 (ERK1/2), c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal-kinase (JNK-2) und die Proteinkinase C (PKC) (Braddock et al., 1998). Sie aktivieren Transkriptionsfaktoren, die auch als „third messengers“ bezeichnet werden. Sie liegen typischerweise im Zytosol oder in der Plasmamembran vor. Aktivierte Transkriptionsfaktoren induzieren die Expression der „immediate early response genes“ (IERG) (Ishida et al., 1997). Die IERGs regulieren wiederum die Expression der „late response genes“ als letztendliche Antwort auf die vorausgegangenen biomechanischen Stimuli (Wilson et al., 1993). Zwei wichtige Familien von Transkriptionsfaktoren, die durch Wandschubspannung aktiviert werden können, sind „Nuclear-Faktor-Aktivator-Protein-1“ (AP-1) egr-1 und „Nuclear-Faktor-Kappa-B“ (NFκB) (Lan et al., 1994) (Schwachtgen et al., 1998). Viele endotheliale Gene enthalten in ihren Promotorregionen Erkennungssequenzen für diese Moleküle.

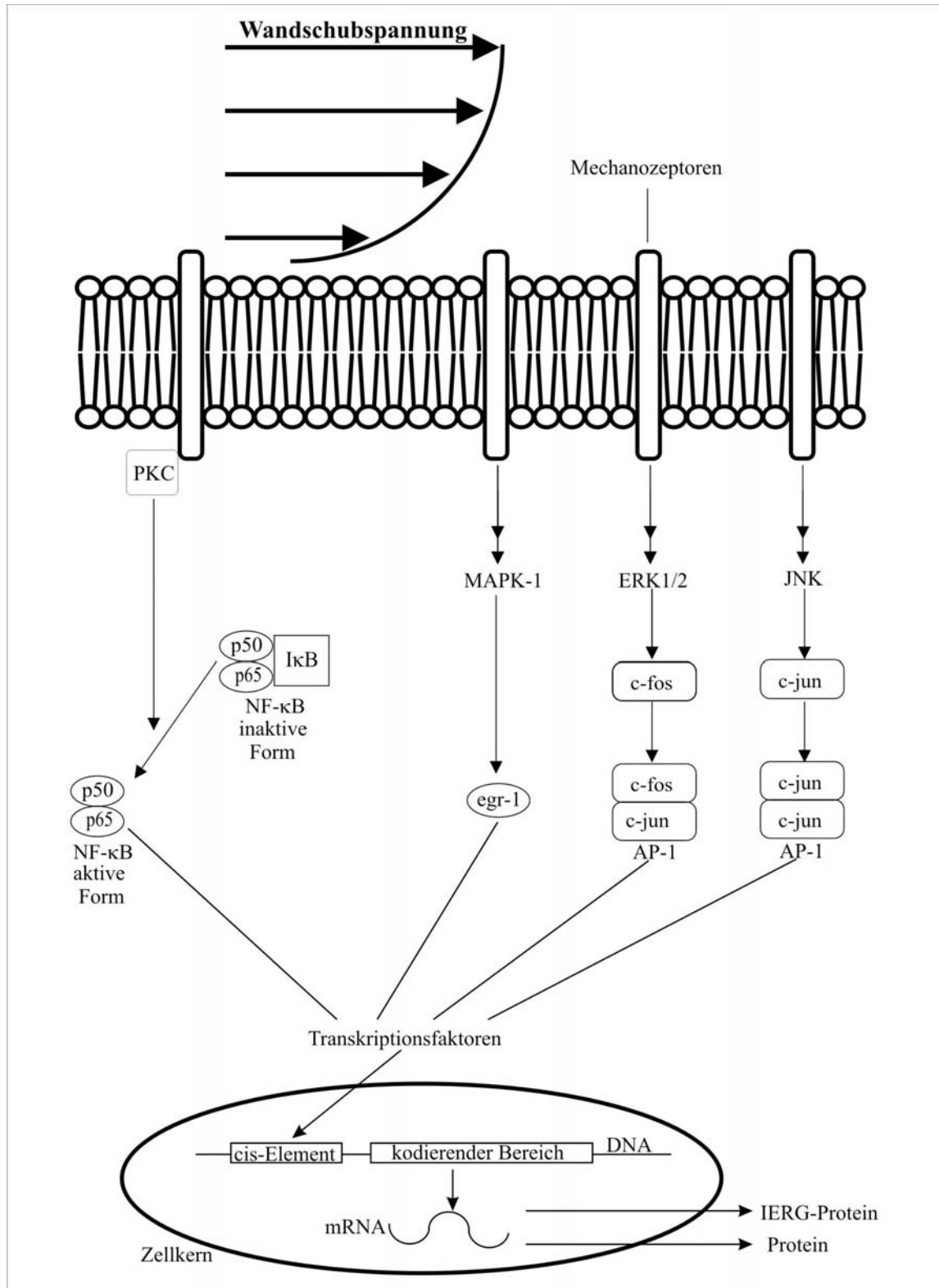


Abbildung 3:  
Genaktivierung in Endothelzellen durch Wandschubspannung

Der AP-1 Komplex wird durch die Dimerisierung von fos- und jun-Proteinen über einen „leucine zipper“ gebildet (Gentz et al., 1989). Dabei gibt es verschiedene Kombinationsmöglichkeiten, die sich in ihrer Bindungsfähigkeit an die AP-1 Erkennungssequenz unterscheiden (Li et al., 1996). Fos/fos-Homodimere sind nicht in der Lage, effektiv an die DNA zu binden. Fos/jun-Heterodimere haben eine höhere Affinität als jun/jun-Homodimere. Trotzdem scheint das Jun/Jun Homodimer der in der Signalkette wirksame Faktor zu sein (Liao et al., 1997). Da die für c-fos und c-jun codierenden Gene zu den IERGs gehören, führt die Aktivierung von AP-1 zur vermehrten Expression seines eigenen und anderer Gene. Auf diese Weise wird eine Verstärkung der zellulären Antwort bewirkt. AP-1 assoziiert mit zwei verschiedenen cis-Elementen, nämlich mit dem „tumor promoting response element“ (TRE) und mit dem „cAMP Response Element“ (CRE).

NF $\kappa$ B liegt im Zytoplasma als Komplex aus den Untereinheiten p50, p65 und dem inhibitorischen Protein I $\kappa$ B vor. Nach der Aktivierung dissoziiert I $\kappa$ B vom Komplex ab und ermöglicht so die Translokation des p50/p65 Dimers in den Zellkern, wo es an die entsprechende DNA-Erkennungssequenz bindet.

Sowohl NF $\kappa$ B als auch AP-1 sind pluripotente Transkriptionsfaktoren, die in verschiedensten Zellen des Körpers nachweisbar sind und nicht nur durch biomechanische Stimuli aktiviert werden können (Davies, 1995). Deshalb wurde vermutet, daß besondere Promotorsequenzen existieren, die für physikalische Reize selektiv sind. Ein wichtiger Schritt für die Identifizierung einer derartigen Sequenz war die Isolierung eines Elementes, welches erstmalig in der Promotorregion des PDGF-B-Gens identifiziert wurde. Die Transkriptionsrate von PDGF-B ist in Endothelzellen nach mehrstündiger Belastung durch laminare Strömung deutlich erhöht (Hsieh et al., 1991). Durch Experimente mit Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, daß die Sequenz GAGACC für die Regulation der Genexpression von PDGF-B durch Strömung verantwortlich ist (Resnick et al., 1993). Aus diesem Grunde trägt die Sequenz die Bezeichnung „shear stress response element“ (SSRE). Ihr funktioneller Transkriptionsfaktor im PDGF-B-Gen ist das NF $\kappa$ B Heterodimer (Khachigian et al., 1995). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der bereits vorher erkannten Aktivierung von NF $\kappa$ B durch Strömung (Lan et al., 1994).

Es existieren Hinweise, daß das SSRE nicht die einzige Sequenz ist, die eine selektive Genregulation durch Strömung ermöglicht. Obwohl im Gen von monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) ein SSRE vorliegt, wird seine Aktivierung durch TRE vermittelt, dessen Ligand AP-1 ist (Shyy et al., 1995). Darüber hinaus findet die Aktivierung von TGF- $\beta$ 1 auch statt, wenn das SSRE aus der Promotorregion entfernt worden ist (Ohno et al., 1995). Es ist zu vermuten, daß das SSRE Teil einer ganzen Familie von regulatorischen Sequenzen ist, die auch durch nichtmechanische Reize aktiviert werden können (Davies, 1995). Kürzlich wurde ein weiterer Transkriptionsfaktor identifiziert, der durch Wandschubspannung in Endothelzellen aktiviert wird (Schwachtgen et al., 1998). Er trägt die Bezeichnung „early growth response-1“ (Egr-1) und wird vermutlich durch die MAP-Kinase-1 aktiviert (Schwachtgen et al., 1998). Seine Bindung erfolgt an drei „serum response“-Elemente (SREs).

Wenn auch nicht sämtliche strömungsinduzierten Transkriptionsfaktoren bekannt sein dürften, so ist heute bereits klar, daß die Endothelzelle über Mechanotransduktionswege verfügt, die zur Regulation der Genexpression führen.

### **1.3. Strömungsinduzierte Gene**

Die Expression zahlreicher Gene wird durch Wandschubspannung reguliert. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die bei Beginn der Untersuchung publizierten Gene, deren Expression durch Wandschubspannung moduliert wird. 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) 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 et al., 1993; Nishida et al., 1992). Die mRNA von platelet derived growth factor-B (PDGF) erreicht ihr Maximum nach 90 Minuten (Hsieh et al., 1991). Erst nach mehreren Stunden kehrt die Transkriptionsrate wieder zu ihrem Ausgangswert zurück. Die differenzierten Antworten der Endothelzellen auf einen relativ gleichförmigen Reiz zeigen, daß verschiedene molekulare Mechanismen an der Modulation der Genexpression



beteiligt sein müssen. Die heute bekannten Transkriptionsfaktoren und Mechanotransduktionswege können die komplexen Expressionsmuster nicht befriedigend erklären.

Tabelle 1: **Durch Wandschubspannung regulierte Gene in Endothelzellen**

Gen	Verlauf	Funktion	Stimulus	Zelltyp	Transkriptionsfaktoren/Enhancersequenzen	Literatur
ACE	Inhibition nach 8 h	Aktivator des RAAS	LSS; 20 dyn·cm <sup>-2</sup>	BAEC	SSRE, AP-1, egr-1	(Rieder et al., 1997)
bFGF	Induktion nach 24 h	Regulation der Proteinsynthese von Fibroblasten	LSS; 15 und 36 dyn·cm <sup>-2</sup>	BAEC	nicht bekannt	(Malek und Izumo, 1992)
COX-1	Induktion nach 1 h, dann mind. 11 h konstant	Vasodilation. Antikoagulation	LSS, 24 dyn·cm <sup>-2</sup>	HUVEC	nicht bekannt	(Okahara et al., 1998)
COX-2	Induktion nach 1 h, peak nach 6 h	Vasodilation	LSS, 24 dyn·cm <sup>-2</sup>	HUVEC	nicht bekannt	(Okahara et al., 1998)
c-fos	Induktion nach 0.5 h	IERG, Transkriptionsfaktor	LSS; 4 bis 25 dyn·cm <sup>-2</sup>	BAEC	SSRE	(Hsieh et al., 1993)
CNP	Induktion nach 4 h und 24 h	EDRP, Gefäßrelaxation	LSS, 5 und 15 dyn·cm <sup>-2</sup>	HUVEC, BAEC	nicht bekannt	(Chun et al., 1997)
HB-EGF	peak nach 3 h, Rückkehr zum Ausgangsniveau n. 12 h	Mitogen für glatte Muskelzellen	LSS 8 dyn·cm <sup>-2</sup>	HUVEC	nicht bekannt	(Morita et al., 1993)
ET-1	Inhibition nach 1 h	Vasokonstriktor	LSS; 5 bis 20 dyn·cm <sup>-2</sup>	HUVEC, PAEC	nicht bekannt	(Malek und Izumo, 1992)
Gewebe-faktor	Induktion nach 4 h, Rückkehr z. Ausgangsniveau nach 12 h	Hämostase	LSS, 12 dyn·cm <sup>-2</sup>	HUVEC	egr-1	(Lin et al., 1997)
HSP 70	Induktion nach 4 h	Hitzeschock-Protein	bidirekt./alt. LSS; 4,1 dyn·cm <sup>-2</sup>	HUVEC, BAEC	nicht bekannt	(Honda et al., 1992)
ICAM-1	stetige Induktion von 8 bis 48 h	Leukozyten-adhäsion	LSS; 2,5 bis 46 dyn·cm <sup>-2</sup>	HUVEC	SSRE, AP-1, NF-κB	(Nagel et al., 1994)

Tabelle 1 (Fortsetzung): **Durch Wandschubspannung regulierte Gene in Endothelzellen**

Gen	Verlauf	Funktion	Stimulus	Zelltyp	Transkriptionsfaktoren/Enhancersequenzen	Literatur
MCP-1	biphasische Induktion mit peak nach 1,5 und 2,5 h	Chemotaxis von Monozyten	LSS; 16 dyn·cm <sup>-2</sup>	HUVEC	SSRE, AP-1, Egr-1	(Shyy et al., 1994)
Mn-SOD	Induktion nach 1 h und 6 h	Antioxidans	10 dyn·cm <sup>-2</sup>	HUVEC	Nicht bekannt	(Topper et al., 1996)
eNOS	Induktion nach 60 min	NO-Synthese	LSS, TSS; 3 bis 9 dyn·cm <sup>-2</sup>	BAEC	SSRE, AP-1, Egr-1	(Topper et al., 1996)
PDGF-A	Induktion nach 1,5 h, Rückkehr zum Ausgangsniveau nach 4 h	Wachstumsfaktor und Vasokonstriktor	LSS; 0-51 dyn·cm <sup>-2</sup>	HUVEC	SSRE, Egr-1	(Hsieh et al., 1991)
PDGF-B	wie PDGF-A bei geringerer Ausprägung	Wachstumsfaktor und Vasokonstriktor	LSS; 0-51 dyn·cm <sup>-2</sup>	HUVEC	SSRE	(Hsieh et al., 1991)
TGF-β1	Induktion nach 2 h	Inhibitor der Prolif. glatter Muskelzellen	LSS; 20 dyn·cm <sup>-2</sup>	BAEC	SSRE, AP-1, NF-κB	(Ohno et al., 1995)
Thrombomodulin	Induktion nach 2 h, Inhibition nach 9 h	Antithrombose	LSS; ab 15 dyn·cm <sup>-2</sup>	BAEC	AP-1	(Malek et al., 1994)
TPA	Induktion nach 24 h	Fibrinolyse	LSS, 15 und 25 dyn·cm <sup>-2</sup>	HUVEC	nicht bekannt	(Diamond et al., 1990)
VCAM-1	Inhibition nach 1 h mit Minimum nach 24 h	Leukozytenadhäsion	LSS; 0-7,2 dyn·cm <sup>-2</sup>	Endothel a. Maus-Lymphknoten.	AP-1, NF-κB	(Ohtsuka et al., 1993)

ACE, angiotensine converting enzyme; bFGF, b fibroblast growth factor; COX, cyclooxygenase, EDRP, endothelium derived relaxing peptide, ET-1, Endothelin-1; HB-EGF, Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, ICAM-1, intercellular adhesion molecule; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; Mn-SO, manganese superoxide dismutase; NOS, NO-Synthase; PDGF, platelet derived growth factor; TGF-β1, transforming growth factor β1; tPA, Gewebsplasminogenaktivator; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule; RAAS, Renin-Angiotensin I-Angiotensin II-System; IERG, immediate early response gene; LSS, laminar shear stress; TSS, turbulent shear stress; HUVEC, human umbilical vascular endothelial cells; BAEC, bovine arterial endothelial cells; PAEC, porcine arterial endothelial cells; SSRE, shear stress response element, EGR-1, early growth response-1; AP-1, nuclear factor activator protein-1, NFκB, nuclear factor κβ

Angiogenese als eine Form der Gefäßadaptation tritt sowohl bei vermehrter Strömung (Training, chronische Gefäßdilatation), als auch bei verminderter Strömung (poststenotisch) auf. Andererseits führt gesteigerte Strömung nicht nur zu Angiogenese sondern auch zu arteriellem und venösem Remodeling. Unter den strömungsregulierten Genen befinden sich zwar einige Wachstumsfaktoren. Deren Wirkungsspektrum erscheint jedoch nicht ausreichend, um die äußerst differenzierte Angioadaptation zu steuern. Die Existenz bislang nicht entdeckter angiogener bzw. antiangiogener Substanzen ist daher sehr wahrscheinlich.

#### **1.4. Fragestellung**

Durch die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen der letzten Jahre werden vor allem die kurzfristigen gefäßtonisierenden Regelkreise, wie zum Beispiel die vaskuläre Autoregulation durch verstärkte Expression von endothelialer NO-Synthase (ecNOS) bei Stimulation durch Wandschubspannung (Ziegler et al., 1998) besser verstanden. Die Wandschubspannung ist aber auch der entscheidende Stimulus bei der Regulation der langfristigen adaptiven Mechanismen Angiogenese und vaskuläres Remodeling. Der zugrundeliegende Mechanismus könnte die Regulation der Genexpression durch Wandschubspannung sein. Die bekannten strömungsregulierten Gene stellen jedoch keine hinreichende Basis dar, um Gefäßadaptation und Gefäßoptimierung zu erklären. Deshalb geht die vorliegende Arbeit der Frage nach, welche weiteren strömungsregulierten endothelialen Gene an den angioadaptiven Vorgängen Angiogenese und Remodeling bzw. an deren Regulation beteiligt sind.