

## 4. Diskussion

### 4.1. Simulation vaskulärer Flußbedingungen

Das Spektrum der Wandschubspannung im Gefäßsystem reicht von unter  $1 \text{ dyn/cm}^2$  bis zu  $100 \text{ dyn/cm}^2$  (Nerem et al., 1998). Die höchsten Werte treten an Bifurkationen von großen zentralen Arterien und in einzelnen Kapillaren auf. Entlang der arteriellen Strombahn bis in die Kapillaren erfolgt dann ein starker Abfall auf Werte von ein bis zwei  $\text{dyn/cm}^2$ , wobei insbesondere in der Mikrozirkulation große Abweichungen vom Mittelwert auftreten. In den Venolen am Anfang des venösen Systems werden die niedrigsten Werte beobachtet (Nerem et al., 1998). Die in der Versuchsanordnung gewählte Wandschubspannung von  $\tau=5,4 \text{ dyn/cm}^2$  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 Volumenfluß 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). Es herrscht laminare Strömung. 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 Hämatokrites 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. Das Blutgefäßsystem wird hierbei in der Regel als stark vereinfachtes Modell betrachtet. In diesem Modell existieren arterielle Bifurkationen und Kurvaturen, in denen gestörte Strömungsmuster vorliegen (wie z.B. Aufteilung, Strömungsumkehr, geringe Amplituden und undulierende Wandschubspannung). Solche Regionen werden als „lesion-prone-areas“ bezeichnet. Darüber hinaus herrschen in Bereichen mit einfacher Gefäßarchitektur, wie zum Beispiel in den tubulären Abschnitten der Aorta und ihren großen Ästen, vorwiegend konstante 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. Hierzu zählen

die Gene Cyclooxygenase-2, Mangansuperoxid-Dismutase und endotheliale NO-Synthase (Topper et al., 1996). Den zugehörigen Proteinen wird eine arterioprotektive Wirkung zugeschrieben, die bei turbulenter Strömung folglich nicht entfaltet werden kann. Um die Situation in „lesion-protected-areas“ zu simulieren, kommen in der Regel Flusskammern oder Cone-and-Plate-Viscometer mit laminarer Strömung zum Einsatz. Diese Betrachtungsweise ist jedoch sehr restriktiv und hat wenig mit der komplexen Hämodynamik im Organismus gemein. In der Mikrozirkulation tritt häufig Flussumkehr auf. Darüber hinaus ist im Austauschkompartiment des Gefäßsystems der Durchmesser der Gefäße kleiner als der Durchmesser der Erythrozyten, die Erythrozytenpassage bringt für das Endothel eine Erhöhung der Wandschubspannung mit sich (Bayliss, 1965). Desweiteren sind in Arteriolen und Kapillaren zahlreiche blind endende Gefäßstümpfe vorhanden, in deren Eingangsbereich Turbulenzen beobachtet werden, während das Blut nicht in die Sprossen strömt (Nerem et al., 1981). Werden diese Umstände berücksichtigt, so sind inkonstante Strömungsbedingungen keineswegs auf arterielle Bifurkationen beschränkt. Vielmehr liegt eine zeitliche und örtliche Variabilität der Wandschubspannung vor, die mit Entstehung von turbulenter Strömung assoziiert ist (Davies, 1995). Turbulente Strömung umfasst dabei einen großen Bereich von geringen nicht laminaren Komponenten bis zur voll entwickelten Turbulenz, der Übergang erfolgt kontinuierlich. Aus diesen Gründen stellt Wandschubspannung mit einem Wert von  $\tau=5,4 \text{ dyn/cm}^2$  bei vorwiegend gering turbulenten Strömungsbedingungen vermutlich ein geeigneteres Modell dar, um die zeitliche und örtliche Variabilität der Wandschubspannung, die typisch für die *in vivo*-Bedingungen ist, zu simulieren.

Die Expositionsdauer betrug 24 Stunden. Die Expression zahlreicher strömungsabhängiger Gene zeigt nach Stimulation durch Wandschubspannung häufig nicht nur eine Erhöhung oder Verminderung. Vielmehr ist die Veränderung der normalen Expressionsrate zeitabhängig und kann mehrphasige Maxima und Minima aufweisen. Die durch Wandschubspannung ausgelöste vermehrte Expression des Gens von Monocyte chemotactic proteine-1 (MCP-1) weist zum Beispiel peaks nach 1,5 und 2,5 Stunden auf (Shyy et al., 1994). Hingegen wird die Expression der mRNA von Thrombomodulin nach zwei Stunden induziert und nach neun Stunden inhibiert (Malek et al., 1994). Mit Ausnahme von ICAM-1, das eine stetige Induktion über 48 Stunden

zeigt (Nagel et al., 1994), berichten die vorliegenden Untersuchungen von keiner weiteren Veränderung der Expressionrate nach Ablauf von 24 Stunden. Vermutlich ist nach diesem Zeitraum ein neues, an die veränderten Flussbedingungen angepasstes Gleichgewicht zwischen Stimulus und Expressionrate erreicht. Um die Erfassung von an diesem Gleichgewicht beteiligten, langfristig regulierten Genen zu gewährleisten, wurde deshalb für die Stimulation eine Dauer von 24 Stunden gewählt.

#### **4.2. Analyse differentieller Genexpression durch Differential Display RT-PCR**

Die beiden klassischen Methoden zum Nachweis von Veränderungen auf Ebene der Genexpression sind einerseits die Subtraktionshybridisierung (St John und Davis, 1979) und andererseits die nuclear run off-Transkriptionsanalyse (Strauss et al., 1990). Beide Verfahren sind mit entscheidenden Nachteilen behaftet. Die Subtraktionshybridisierung ist zeitaufwendig und erlaubt in der Regel nur qualitative Aussagen. Die nuclear run off-Transkriptionsanalyse ermöglicht zwar quantitative Bestimmungen. Sie setzt jedoch die Kenntnis des differentiell exprimierten Gens voraus. Mit Differential Display RT-PCR können hingegen qualitative und zum Teil auch quantitative Alterationen der Expression von bekannten und unbekanntem Genen nachgewiesen werden.

Das Verfahren ist zeitsparend und kostengünstig. Zudem kommt es mit relativ geringen RNA-Mengen aus. Die dafür notwendigen PCR und DNA-Sequenzierungstechniken sind gut etabliert. Trotzdem müssen Einschränkungen beachtet werden.

Ein Teil der Fragmente wird allein durch Palindromsequenzen in der mRNA erzeugt. Desweiteren können verschiedene Differential Display RT-PCR-Produkte Fragmente ein und derselben mRNA-Sequenz sein. Dieses Ereignis ist in der vorliegenden Arbeit bei Bande F bzw. Bande G eingetreten. Trotz Verwendung unterschiedlicher Primer stellen beide Banden Fragmente der cDNA der mRNA von METH-1 dar (vergleiche Abschnitt 3.5).

Ein weiteres Problem stellt der starke Hintergrund mit zahlreichen falsch positiven Ergebnissen dar. Nur ein geringer Anteil der differentiell exprimierten Banden lassen sich durch semiquantitative RT-PCR bzw. northern blot verifizieren. Nur sechs der 36 (16,6%) primär differentiell exprimierten Fragmente konnten letztendlich bestätigt werden.

Eine weitere wichtige Frage ist, wieviel Prozent der differentiell exprimierten Gene durch Differential Display RT-PCR erfasst werden können. Das menschliche Genom besteht aus ungefähr 30 000 bis 35 000 Genen. Circa 50% davon werden in den verschiedenen Zelltypen exprimiert (Brazma und Vilo, 2000). Nur ein geringer Anteil wird nach einem Stimulus differentiell exprimiert. Es gab Bemühungen, Differential Display RT-PCR Verfahren zu entwickeln, die das gesamte mRNA-Spektrum darstellen (Maarten und Villeponteau, 1995). Dabei treten verschiedene Probleme auf.

Die durchschnittliche Länge einer mRNA beträgt 1,2 kb. Die ideale Länge für die Darstellung von PCR-Produkten liegt jedoch bei 500 bp. Es ist deshalb zu erwarten, daß längere Fragmente aufgrund unzureichender Auftrennung nicht sichtbar werden und damit der weiteren Analyse entgehen.

Durch die systematische Variierung kurzer Primer (sechs bis sieben bp) ist in der Theorie eine lückenlose Erfassung aller mRNAs möglich. Derartige Primer sind jedoch zu unspezifisch und führen nicht zu reproduzierbaren Ergebnissen (Liang und Pardee, 1992).

Aus diesem Grunde kommen längere Primer zum Einsatz. Oligonukleotide mit einer Länge von 15 bis 25 bp sollten die Amplifikation weniger, aber hochspezifischer Produkte bewirken. Die experimentelle Überprüfung zeigt aber abweichende Ergebnisse, durch die Verwendung längerer Primer wurde die Anzahl der erzeugten Fragmente noch gesteigert (Liang et al., 1995). Hierfür werden zwei Ursachen verantwortlich gemacht. Zum einen haben kurze Primer für effiziente PCR eine zu niedrige Schmelztemperatur. Zum anderen werden mehrere falsche Basenpaarungen bei der Bindung des Zufallsprimers toleriert. Die Wahl der Primer für die RT-PCR stellt also einen Kompromiss zwischen Spezifität und Reproduzierbarkeit dar. Aus diesen Gründen ist die systematische Untersuchung aller mRNA Spezies einer Zellpopulation mit Hilfe der Differential Display RT-PCR schwierig. Vielmehr handelt es sich um eine „Schrotschuß“-Methode, mit der häufig, aber nicht immer Alterationen auf Ebene der Genexpression detektiert werden können. Die Erfassung aller funktionell wichtigen aktivierten bzw. deaktivierten Gene ist nicht gewährleistet.

Das hier entwickelte Protokoll der durchgeführten RT-PCR weicht vom Originalprotokoll für Differential Display RT-PCR ab. Ursprünglich wurde das Verfahren allein mit niedrigen Bindungstemperaturen durchgeführt (Liang und Pardee, 1992). Bei diesen Bedingungen ist die Reproduzierbarkeit jedoch gering. Darüber hinaus treten zahlreiche falsch positive Banden auf. Der hier verwendete Algorithmus beinhaltet lediglich drei Zyklen mit niedriger Bindungstemperatur, gefolgt von 30 Zyklen mit hoher Bindungstemperatur. Durch den Wechsel von niedrig- und hochstringenten Bedingungen werden weniger PCR-Produkte mit dafür höherer Trennschärfe erzeugt (Tsuji-shita et al., 1997). Eine weitere Modifikation ist die Silberfärbung. Üblicherweise wird die Auftrennung der PCR-Produkte durch Autoradiographie dargestellt. Die Färbung durch Silbernitrat hat zwei Vorteile. Einerseits ist sie kostengünstiger und erfordert nicht die bei Verwendung radioaktiver Nukleotide notwendigen Sicherheitsvorkehrungen. Andererseits erlaubt die Direktvisualisierung ein exaktes Herauslösen derjenigen Banden, die einer weiteren Analyse unterzogen werden sollen.

### **4.3. Strömungsregulierte Gene**

#### **4.3.1. Angiopoietin-2**

In der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, daß die Expression von Angiopoietin-2 (Ang2) durch Wandschubspannung stark vermindert werden kann. Angiopoietin-2 ist wie das strukturverwandte Angiopoietin-1 (Ang1) ein Protein, welches an der Steuerung der Angiogenese beteiligt ist (Maisonpierre et al., 1997). Beide Substanzen vermitteln ihre Wirkung über den gleichen Rezeptor, eine Tyrosinkinase mit der Bezeichnung Tie2 (beim Menschen) oder Tek (bei der Maus). Diese wird nur auf endothelialen Zellen und auf jungen Zellen der hämatopoetischen Reihe exprimiert (Dumont et al., 1992; Iwama et al., 1993; Schnürch und Risau, 1993). Die Affinität beider Liganden zum Rezeptorprotein beträgt ungefähr  $K_D \sim 3$  nM (Maisonpierre et al., 1997). Ähnlich dem Vascular endothelial growth factor (VEGF), ist das Vorhandensein von Angiopoietin-1 und seinem Rezeptor unerlässlich für eine normale Vaskulogenese (Maisonpierre et al., 1997). Die Effekte von VEGF und Angiopoietin-1 unterscheiden sich jedoch deutlich. VEGF kann an den VEGF-Rezeptor 1 (VEGF-R1) und an den VEGF-Rezeptor 2 (VEGF-R2)

binden. VEGF-R1 und VEGF-R2 werden auf Hämangioblasten exprimiert (Risau, 1997). Hämangioblasten sind bipotente Vorläuferzellen, die entweder zu hämatopoetischen Zellen oder zu Endothelzellen differenzieren. Mäuse mit Defekt des VEGF-R1-Gens verfügen über normale hämatopoetische Progenitorzellen und zahlreiche endotheliale Zellen. Die Endothelzellen migrieren und proliferieren zwar, formieren sich aber nicht zu Gefäßen (Fong et al., 1995). Mäuse mit Defekt des VEGF-R2 Gens haben dagegen ein sich entwickelndes hämatopoetisches System, weisen aber keinerlei endotheliale Zellen auf (Shalaby et al., 1995). Beide Defekte führen am achten Entwicklungstag zum Tod des Embryos. Mäuseembryonen mit einem Defekt des Tie2-Gens sterben am zehnten bis elften Entwicklungstag an schweren vaskulären Defekten der Mikrogefäße (Dumont et al., 1994; Suri et al., 1996). Diese Defekte entstehen durch eine reduzierte Anzahl von Endothelzellen, abnormale Gefäßverzweigungen und verminderte Verankerung der Endothelzellen in der extrazellulären Matrix (Sato et al., 1995). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde gefolgert, daß Tie2 für die Differenzierung des Endothels nicht notwendig ist, dann aber eine Schlüsselposition bei der Ausbildung der Gefäße während der embryonalen Vaskulogenese hat. In der Tat gehen Punktmutationen im für Tie2 codierenden Gen mit venösen Mißbildungen einher. Zwar sind hier die Gefäße ausgebildet, weisen aber dilatierte Lumina und eine verminderte Assoziation von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix auf (Vikkula et al., 1996).

Die Funktion von Tie2 ist nicht auf die embryonale Entwicklung beschränkt. Es lässt sich auch in den Gefäßen fast aller ruhenden adulten Gewebe nachweisen. Besonders hoch ist die Expression jedoch in proliferierenden Geweben, insbesondere im Uterus und in heilendem Wundgewebe (Wong et al., 1997). Tie2 scheint also sowohl eine Funktion bei der Vaskulogenese als auch bei der Angiogenese zu haben (zur Definition von Vaskulo- und Angiogenese vergl. Abschnitt 1.1.4.). Die Bindung von Ang1 an seinen Rezeptor Tie2 hat eine schnelle Autophosphorylierung zur Folge, die vermutlich einer Aktivierung entspricht. Ang2 wirkt an Tie2 wie ein endogener Rezetorantagonist. Bei fast gleicher Dissoziationskonstante bindet es kompetitiv zu Ang1 an Tie2. Dabei hat Ang2, gemessen an der Autophosphorylierung von Tie2, keinerlei intrinsische Aktivität (Hanahan, 1997). Während Ang1, wenn auch in geringen Mengen, in nahezu jedem untersuchten Gewebe nachgewiesen werden konnte, ist die Expression von Ang2

physiologischerweise auf Ovarien, Uterus und Plazenta beschränkt (Maisonpierre et al., 1997). In diesen Organen findet auch im Erwachsenenalter in größerem Umfang Angiogenese mit Kapillarsprossung statt. Die Kapillarsprossung lässt sich in folgende Einzelvorgänge unterteilen: Proliferation, Migration und Differenzierung von Endothelzellen, Degradierung von Basalmembran und extrazellulärer Matrix durch Proteinase, Formierung eines neuen Kapillarlumens, Bildung einer neuen Basalmembran und Rekrutierung von Perizyten (Skalak und Price, 1996). Alle diese Vorgänge werden durch zahlreiche, miteinander interagierende Wachstumsfaktoren gesteuert und sind somit Angriffspunkte von angiogenen Faktoren.

Der erste Schritt bei der Ausbildung einer Kapillare ist die Proliferation von Endothelzellen (Klagsbrun und D'Amore, 1991). Da die Kapillarstümpfe noch blind enden, können auf die endotheliale Oberfläche keine Scherkräfte wirken. Entsprechend der hier vorgelegten Ergebnisse müsste in diesen Zellen aufgrund des Fehlens der Wandschubspannung die Expression von Ang2 stark erhöht sein. Diese Überlegung wird durch die Beobachtung gestützt, daß Ang2 Transkripte besonders stark an den Blutgefäßen in der Theka interna in der späten präovulatorischen Follikelphase und dann an der Spitze der einsprossenden Gefäße des sich entwickelnden Corpus luteum nachweisbar sind (Goede et al., 1998). Auch in degenerierenden Gefäßen des alternden Corpus luteum herrscht verminderter oder völlig sistierender Blutfluss. Dabei kann ebenfalls eine vermehrte Expression von Ang2 beobachtet werden, die zur Blockade von Tie2 führt und auf diese Weise die Angiogenese inhibiert (Wong et al., 1997).

Die Heilung von Hautläsionen stellt ebenfalls eine Situation mit erhöhter Angiogenese dar. Solche Läsionen bewirken unter anderem eine reaktive Hyperämie durch Dilatation der die Wunde umgebenden Gefäße. Nach 48 Stunden kann hier eine verstärkte Expression von Tie2 beobachtet werden (Wong et al., 1997). Ab dem vierten Tag wird Tie2 auch in den neu gebildeten Mikrogefäßen stark exprimiert, welche das Granulationsgewebe durchdringen. Wenn sich die Wundränder nach acht Tagen kontrahiert und geschlossen haben und die Mikrogefäße zurückgebildet worden sind, wird auch die Expression von Tie2 auf die Blutgefäße am Wundrand beschränkt. Die Abschwächung der über Tie2 vermittelten angiogenen Wirkung kommt jedoch nicht nur durch verminderte Expression des Rezeptors, sondern auch durch dessen verminderte Aktivierung zustande (Wong et al., 1997). Dieser Effekt könnte durch die Aufregulation von

Ang2 bei verminderter Strömung verursacht sein, wodurch die Aktivierung von Tie2 durch Ang1 blockiert wird.

Während Angiotensin-1 einen chemotaktischen Effekt auf Endothelzellen besitzt, fehlt diese Wirkung bei Angiotensin-2 (Witzenbichler et al., 1998). Um die Wechselwirkungen von VEGF und Ang1 bzw Ang2 zu untersuchen, wurden die Effekte der drei Substanzen bei der Neovaskularisierung der Cornea untersucht (Asahara et al., 1998). Hierbei konnte gezeigt werden, daß Stimulation mit VEGF Neovaskularisierung induziert, während die Stimulation mit Ang1 oder mit Ang2 keinerlei Effekt erzielt. Die Kombination von Ang1 und VEGF rief hingegen bereits makroskopisch erkennbar verstärkte Gefäßdurchblutung hervor. Mikroskopisch konnte eine Vergrößerung des luminalen Durchmessers und eine Verdickung der Basalmembran beobachtet werden. Ang1 und VEGF hatten allerdings keine Auswirkungen auf die Mikroarchitektur, d.h. die Länge der Gefäßteilstücke und die Anzahl der Gefäßneubildungen blieb unverändert. Die Kombination von Ang2 und VEGF führte hingegen zur Ausbildung längerer Gefäße sowie zu mehr Gefäßsprossen an den Enden der sich ausbildenden Kapillaren. Der Gefäßdurchmesser erfuhr keine Veränderung. Auch diese Beobachtungen können mit der These in Einklang gebracht werden, daß bei Mangel an Strömung vermehrt gebildetes Ang2 die Neovaskularisation initiiert, während Angiotensin-1 eher eine Rolle bei Reifung und Festigung des bestehenden Gefäßnetzwerkes zu spielen scheint (Asahara et al., 1998). Die angeführten Effekte von VEGF, Ang1 und Ang2 an ihren jeweiligen Rezeptoren sind in Abbildung 16 zusammengefasst.

Die Steuerungsfunktion von Angiotensinen und ihrem Rezeptor Tie2 stellt einen vielversprechenden Ansatzpunkt bei der Tumorthherapie dar. In einer neueren Untersuchung (Lin et al., 1998) wurde ein rekombinanter löslicher Tie2-Rezeptor konstruiert, welcher in der Lage ist, die Aktivierung des endothelialen Tie2 durch Konkurrenz um die Liganden zu inhibieren. Dies führte bei murinem Mammakarzinom und bei murinem Melanom zu deutlich geringerer Vaskularisierung im histologischen Tumorpräparat, zudem waren Metastasen praktisch nicht mehr auffindbar.

Die parallele Existenz von natürlichen strukturverwandten Agonisten und Antagonisten einer Rezeptortyrosinkinase ist bei Vertebraten völlig ungewöhnlich. Ein derartiges System wurde



bislang nur bei *Drosophila* beschrieben (Schweitzer et al., 1995). Bei diesem Insekt zeigen strukturverwandte Proteine gegensätzliche Wirkung an ihrem Rezeptor Epidermal-growth-factor-homolog-torso. Für die Seltenheit dieses Mechanismus gibt es zwei verschiedene Erklärungen. Einerseits könnte es sein, daß in Zukunft noch mehr durch Agonisten/Antagonisten-Balance regulierte Tyrosinkinasen-Rezeptor-Systeme entdeckt werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß Tie2 einer extrem ausgewogenen Feinregulation unterliegt, die die Steuerung durch aktivierende und inhibierende Faktoren am selben Rezeptor notwendig macht (Maisonpierre et al., 1997).

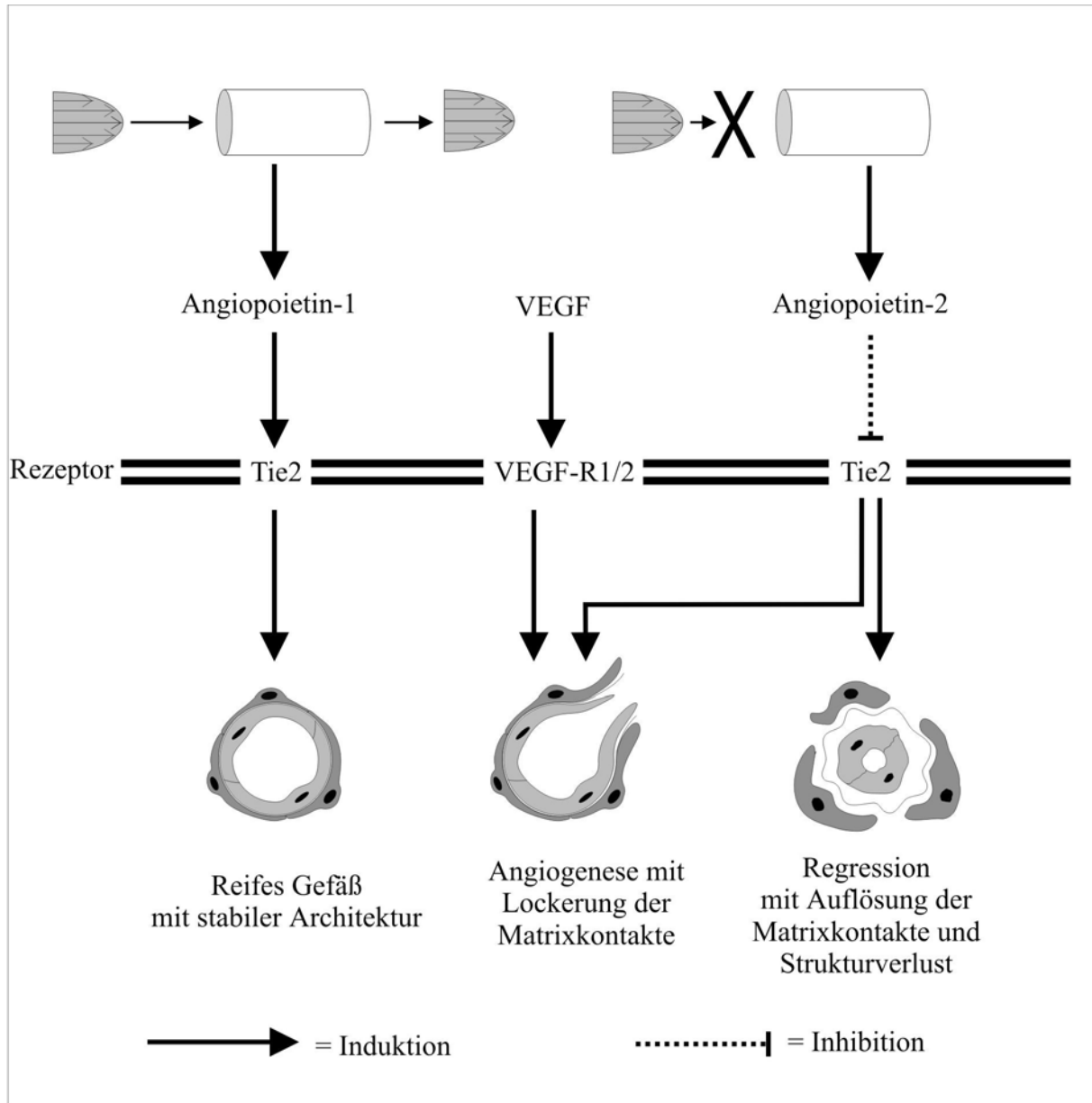


Abbildung 16: **Wirkung des Angiopoietin/Tie2-Systems**

Durch Bindung von Ang1 an Tie2 wird eine Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen ausgelöst, die Matrixkontakte werden gefestigt. Diese Effekte können durch Bindung von Ang2 an Tie2 aufgehoben werden. Das Signal von Ang2 bewirkt einerseits eine erhöhte Zugänglichkeit für das angiogene VEGF. Beim Ausbleiben eines angiogenen Faktors wird andererseits die Gefäßregression herbeigeführt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Strömung ( $5,4 \text{ dyn cm}^{-2}/24 \text{ h}$ ) zu einer verminderten Expression des Gens von Ang2 führt.

Ziel dieser Arbeit war es, neue molekulare Mechanismen der Adaptation von Blutgefäßen an veränderte Strömungsbedingungen zu finden. Die hier beschriebene Hemmung der Expression von Angiopoietin-2 durch Wandschubspannung kommt als ein solcher Mechanismus in Frage. Faßt man das oben referierte Wissen über das Ang1/Ang2/tie2-System zusammen, so ließe sich für vier verschiedene hämodynamische Situationen die zu beobachtende Gefäßadaptation durch eine unter den jeweiligen Bedingungen veränderte Expression von Ang2 erklären.

1. Stenotische Ereignisse führen zur Ausbildung von Kapillaren im poststenotischen Bereich (Rieger und Gaehtgens, 1994). Die Sprossung wird durch Hypoxie in diesem Gefäßabschnitt induziert, die zur Freisetzung von VEGF führt. Zusätzlich könnte durch den sistierenden Blutfluss die Expression von Ang2 ausgelöst werden. Durch die gegenseitige Ergänzung dieser zwei Mechanismen könnte eine besonders effektive Angiogenese ermöglicht werden.
2. Im Körper können insbesondere während der Vaskulogenese Situationen entstehen, in denen überflüssige Gefäße ausgebildet sind. In solchen Gefäßen liegt geringe Strömung vor, während in dem umgebenden Gewebe eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet ist. Ein Beispiel ist das Corpus luteum (Wong et al., 1997). Durch vermehrte Expression von Ang2 bei geringen Flusswerten könnte die Regression des nicht benötigten Gefäßes induziert werden.
3. Blutgefäße werden durch die in ihnen fließende Strömung stabilisiert. Prominente Beispiele sind der Umbau eines venösen Gefäßes zum arteriellen Gefäßtypus bei Autotransplantation, Shuntbildung (Rieger und Gaehtgens, 1994) und die Kollateralenbildung im Sinne der „Arteriogenese“ (Buschmann und Schaper, 1999). In diesem Fall würde die starke Durchblutung eine Verlagerung des Ang1/Ang2-Gleichgewichtes in Richtung Ang1 bewirken. Eine Stabilisierung der Gefäßwand durch enge Verbindung der Endothelzellen durch Ang1 könnte die Folge sein.
4. Durch das Zusammenspiel von Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 können Verbindungen zwischen stark perfundierten und schwach oder nicht perfundierten Gefäßen hergestellt werden. Die Endothelzellen eines kaum durchbluteten Gefäßes werden durch vermehrte

Expression von Ang2 aufgelockert (Hanahan, 1997). Gleichzeitig bewirkt die chemotaktische Wirkung von Ang1 aus Gefäßen mit starker Strömung die Migration von Endothelzellen bis zum Anschluß an das gut perfundierte Gefäß (Witzenbichler et al., 1998).

#### **4.3.2. Decidual protein induced by progesterone (DEPP)**

Eine der differentiell exprimierten cDNA-Sequenzen zeigte hohe Homologie zu der kürzlich publizierten mRNA-Sequenz für Homo sapiens decidual protein induced by progesterone (DEPP) (Duesterhoeft et al., 2000). Die Dezidua der Uteruswand unterliegt im Menstruationszyklus ständiger Angiogenese und Angioregression. Die Beteiligung angiogener Faktoren beim Umbau der Uterusschleimhaut, zum Beispiel von VEGF, ist erwiesen (Goede et al., 1998). Die Dokumentation der Auswirkung von Progesteron durch Duesterhoeft et al. und von Wandschubspannung durch die vorliegende Arbeit auf die mRNA-Konzentration von DEPP läßt dessen Beteiligung an der Angiogenese bzw. Angioadaptation denkbar erscheinen. Da bisher keinerlei Untersuchungen über die funktionellen Eigenschaften dieses Proteins vorliegen, ist es allerdings kaum möglich, jetzt schon eine Hypothese über die Rolle von DEPP bei der Adaptation von Endothelzellen an Strömungsbedingungen aufzustellen.

#### **4.3.3. METH-1**

Zwei der differentiell exprimierten Produkte zeigten hohe Homologie zur cDNA von METH-1. Bei den vorliegenden Versuchsbedingungen war diese Sequenz in statisch kultivierten Zellen kaum nachweisbar und wurde durch Stimulation der Zellen durch Wandschubspannung stark induziert. METH-1 wurde 1999 erstmalig beschrieben (Vázquez et al., 1999). Dabei wurde eine antiangiogene Wirkung dieser Substanz dokumentiert. Durch fibroblast growth factor-2 (FGF-2) wird im cornea pocket assay eine Vaskularisierung ausgelöst. Vascular endothelial growth factor (VEGF) ruft im chorioallantoic membrane assay ebenfalls Angiogenese hervor. In beiden Modellen konnte die Proliferation von Endothelzellen durch METH-1 unterdrückt werden. Das Wachstum von Fibroblasten und glatten Muskelzellen blieb dagegen unbeeinflußt (Vázquez et al., 1999). Weitere Informationen über METH-1 liegen bisher nicht vor.

Hingegen wurde ein orthologes Gen bei Mäusen bereits 1995 identifiziert (Wolfsberg et al., 1995). Es trägt die Bezeichnung **A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs** oder auch ADAM-TS-1. Die Disintegrin/Metalloproteinase (ADAMs) sind eine seit relativ kurzer Zeit bekannte Genfamilie. Es handelt sich um transmembranäre Proteine, die eine signifikante Sequenzhomologie mit schlangengiftartigen Proteinasen und mit Disintegrinen aufweisen. Dieser Dualismus ist insofern einzigartig, daß bislang keine Zelloberflächenproteine beschrieben wurden, die sowohl eine Domäne mit potentieller Adhäsionsfunktion als auch eine Domäne mit potentieller Proteasefunktion in sich vereinen. Die cDNAs dieser Gene wurden in verschiedenen Säugergeweben, aber auch bei niederen eukaryotischen Lebewesen gefunden. Zwar sind bis zum jetzigen Zeitpunkt neunzehn Gene der ADAM-Familie beschrieben worden, die funktionellen Eigenschaften der dazugehörigen Proteine sind aber nur teilweise bekannt (Wolfsberg et al., 1995).

Zu den ADAMs gehören die Fertiline  $\alpha$  und  $\beta$ , die auf der Oberfläche von Spermien entdeckt wurden und in Form von Heterodimeren vorliegen (Almeida et al., 1995). Diese Proteine sind an der durch Integrine vermittelten Bindung und Fusion von Sperma und Eizelle beteiligt. An der apikalen Seite von Epithelzellen des Ductus epididymis wurde ein anderes ADAM mit der Bezeichnung Epididymal Apical Protein (EAPI) beschrieben (Perry et al., 1992). EAPI scheint an der Reifung der Spermien durch Proteolyse beteiligt zu sein.

Ein weiteres ADAM mit der Bezeichnung metalloproteinase-like disintegrin-like cysteine rich protein 15 (MDC 15) wurde aus kultivierten HUVECs und aus kultivierten arteriellen Gefäßzellen isoliert (Herren et al., 1997). Während dieses Protein *in vivo* in gesunden arteriellen Zellen nicht nachweisbar war, konnte eine verstärkte Bildung in arteriosklerotisch veränderten Abschnitten gezeigt werden. Differenziertere Untersuchungen über die Rolle von MDC 15 bei der Pathogenese der Arteriosklerose liegen bis heute nicht vor.

Weitere ADAMs sind das macrophage surface protein-2 (MS2) auf der Oberfläche von Makrophagen (Yoshida et al., 1990) und Meltrin, das zusammen mit Cadherinen und VCAMs an der Ausbildung von Myotubuli bei der Myogenese beteiligt ist (Yagami et al., 1995). Nicht alle ADAMs sind an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt. ADAM 10 ist eine Metalloprotease, die durch

limitierte Proteolyse die inaktive Vorstufe von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  aktivieren kann (Lunn et al., 1997). Trotzdem scheinen Zell-Zell-Interaktionen einen Schwerpunkt ihrer vielfältigen Funktionen darzustellen.

ADAM-TS-1, das murine Ortholog des humanen METH-1, wurde erstmals aus der Zelllinie „murine colon 26 adenocarcinoma“ als tumorselektives Gen isoliert (Kuno et al., 1997b). Es besteht aus sechs funktionellen Domänen, einer Prometalloproteinase, einer Metalloproteinase, einer Spacer-Region und drei Thrombospondin(TSP)-Typ-1-Motiven am carboxyterminalen Ende. Durch zwei Eigenschaften unterscheidet es sich deutlich von anderen Mitgliedern der ADAM-Genfamilie: Zum einen ist bisher kein anderes ADAM mit TSP-Untereinheit beschrieben worden. Zum anderen weist ADAM-TS-1 keine transmembranäre Domäne auf. Aufgrund letzterer Eigenschaft wurde die Hypothese aufgestellt, daß es sich um ein sekretorisches Protein handeln könnte (Kuno et al., 1997b). In einer jüngeren Untersuchung wurde gezeigt, daß ADAM-TS-1 tatsächlich kaum in Zellen nachweisbar ist, sondern sowohl als Precursorprotein als auch als prozessierte Form extrazellulär vorliegt (Kuno und Matsushima, 1998).

ADAM-TS-1 verfügt über drei Thrombospondin-Typ-1-Motive, die konservierte, repetitive Elemente in den Thrombospondinen 1 und 2 darstellen (Kuno et al., 1997a). Die Thrombospondine 1 und 2 sind sekretorische Glycoproteine mit antiangiogener Wirkung (Rastinejad et al., 1989). Darüber hinaus wurde eine Beteiligung bei der Blutgerinnung, bei der Regulation der Zellproliferation und bei der Migration beschrieben (Bornstein, 1992; Frazier, 1991). Thrombospondine bestehen aber aus multiplen diskreten Subdomänen, von denen das TSP-Typ-1-Motiv nur eine darstellt. Die Vermittlung der aufgezählten komplexen Funktionen durch ADAM-TS-1 kann deswegen nicht als gesichert gelten. Es existieren jedoch Hinweise, daß die TSP-Typ-1-Komponente adhäsive Eigenschaften besitzt. Die Adhäsion setzt in der Regel eine Bindung an Zelloberflächen oder an Makromoleküle der extrazellulären Matrix voraus (Bornstein, 1992; Frazier, 1991). TSP-Typ-1 verfügt über zwei potentielle Determinanten für die Bindung sulfatierter Matrixproteine wie Heparansulfat, Fibronectin oder Kollagen (Guo et al., 1992; Prater et al., 1991; Tuszynski et al., 1992). Die TSP-Typ-1-Komponenten im ADAM-TS-1 Protein scheinen diese Funktion auszuüben. So konnte gezeigt werden, daß ADAM-TS-1 an Heparin bindet (Kuno et al., 1997b). Von Zellen sezerniert, ist ADAM-TS-1 fest mit der

extrazellulären Matrix assoziiert und ist nur dann im Zellkulturmedium nachweisbar, wenn seine Bindung durch lösliches Heparansulfat blockiert wird (Creutz, 1992). Zusätzlich zeigten Experimente mit Deletionsmutanten, daß alle drei TSP-Typ-1-Komponenten ebenso wie die Spacer-Domäne zur Bindung von ADAM-TS-1 an die extrazelluläre Matrix beitragen (Kuno und Matsushima, 1998).

Die funktionelle Aktivität der Metalloproteinase-Untereinheit wurde kürzlich nachgewiesen (Kuno et al., 1999). Metalloproteasen 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). Für die Disintegrinkomponente von ADAM-TS-1 konnte dieser Effekt zwar bisher nicht nachgewiesen werden (Kuno et al., 1997b). Da jedoch diese Wirkung nur mit prozessierten Proteinfragmenten von ADAM-TS-1 geprüft wurde, kann eine solche Funktion *in vivo* oder bei Überprüfung mit anderen Methoden nicht ausgeschlossen werden. Ob Integrine anderer Zellen durch die Disintegrinkomponente von ADAM-TS-1 beeinflusst werden können, ist bisher nicht untersucht worden.

Zieht man die beschriebenen Eigenschaften von ADAM-TS-1 in Betracht, so ist es gut denkbar, daß es nach der Sezernierung und Bindung an Proteine der extrazellulären Matrix durch folgende Mechanismen an der vaskulären Adaptation beteiligt ist.

- Durch die Disintegrindomäne von METH-1 könnte den Endothelzellen vermehrte Adhäsionsmöglichkeiten an der Basalmembran bei gesteigerter Strömung geboten werden. Gleichzeitig könnte die Disintegrindomäne der Thrombozytenaggregation im gut perfundierten Gefäß entgegenwirken.
- Durch die Metalloprotease-Untereinheit könnte das Aussprossen von Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese ermöglicht werden.
- Durch die antiangiogene Wirkung von TSP-Typ-1-Komponenten könnte eine Stabilisierung des durchströmten Gefäßes erfolgen (vergleiche Abbildung 17)

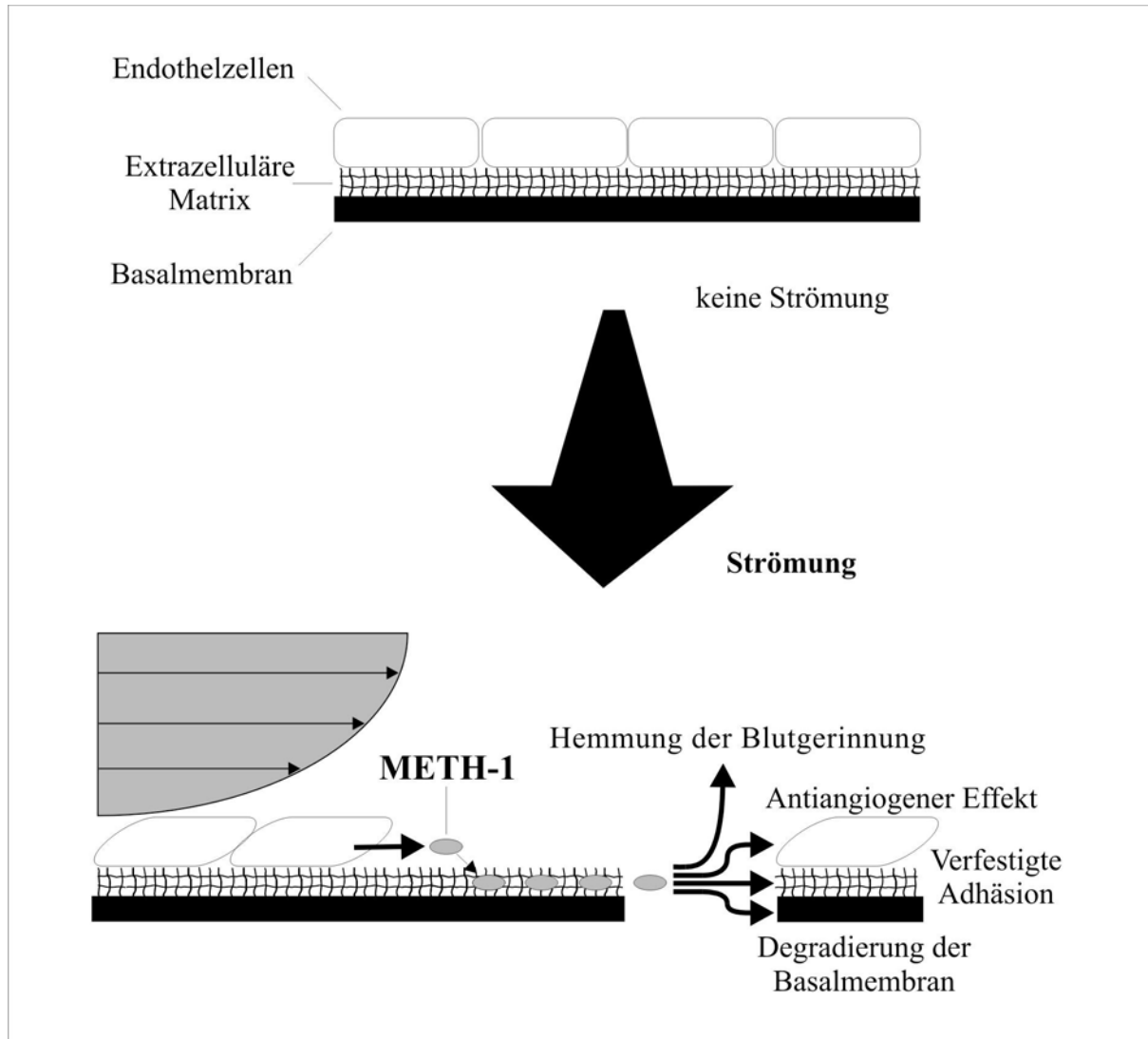


Abbildung 17: **Hypothetische Effekte von METH-1 im Blutgefäß**

Die Expression des Gens von METH-1 wird durch Fluß induziert. Das Genprodukt wird nach extrazellulär sezerniert. Dort bindet seine TSP-Typ-1-Domäne an Proteine der extrazellulären Matrix wie Heparansulfat, Fibronectin oder Kollagen. Durch diese Domäne werden antiangiogene Eigenschaften vermittelt. Die Metalloprotease-Untereinheit könnte eine Degradierung der Basalmembran bewirken und somit die Sprossung neuer Kapillaren ermöglichen. Durch die Disintegrindomäne könnte eine Verstärkung der extrazellulären Matrix und somit eine verfestigte Adhäsion der Endothelzelle an die Basalmembran erfolgen. Die Disintegrindomäne könnte gleichzeitig eine verminderte Aggregation von Thrombozyten erwirken.



#### **4.3.4. *gas-3/PMP-22***

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Expression von Peripheral Myelin Protein 22 (PMP-22) durch Wandschubspannung induziert werden kann. PMP-22 wird vorwiegend in den Myelinmembranen von Schwann-Zellen gefunden (Snipes und Suter, 1995). Es ist extrem hydrophob und besitzt vier transmembranäre Domänen sowie in einer extrazellulären Schleife das funktionelle Epitop L2/HNK1, das adhäsive Eigenschaften aufweist (Hammer et al., 1993; Snipes et al., 1993a).

Bei verschiedenen, autosomal dominant vererbten Neuropathien des peripheren Nervensystems liegt ein Defekt des PMP-22-Gens vor. Zu diesen Erkrankungen zählen das Dejerine-Sottas Syndrom (DSS), die Charcot-Marie-Tooth Erkrankung (CMT) und eine leichtere Form der peripheren Neuropathie mit sensorischen Ausfällen („hereditary neuropathy with liability to pressure palsies, HNPP“). Die neurologischen Ausfallserscheinungen beruhen vermutlich auf der Defizienz der adhäsiven Eigenschaften von L2/HNK1 (Snipes et al., 1993b).

Das Genprodukt scheint jedoch eine zweite Funktion zu erfüllen. Die mRNA von PMP-22 ist nämlich identisch mit der mRNA Gens von growth-arrest-specific-protein-3 (*gas-3*) (Manfioletti et al., 1990). Hierbei handelt es sich um eines aus einer Gruppe von Genen, deren Expression bei Erreichen der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus induziert wird (Manfioletti et al., 1990). Bei der Regulation des Zellzyklus sind zum einen positive Signale für die Proliferation notwendig. Zum anderen ist jedoch zur Aufrechterhaltung einer stationären Phase das Ausbleiben dieser positiven Signale nicht ausreichend. Vielmehr bedarf es aktiver Faktoren um diesen Zustand einzuleiten bzw. aufrechtzuerhalten (Craig und Sager, 1985). *Gas-3* wird als Bestandteil eines solchen regulatorischen Mechanismus zur Arretierung des Zellzyklus in der G<sub>0</sub>-Phase in vorwiegend nicht neuronalem Gewebe aufgefasst. PMP-22 bzw. *gas-3* tritt also in zwei Bereichen in Erscheinung, nämlich in der Myelinschicht des peripheren Nerven und bei der Regulation von Zellzyklus und Zelldifferenzierung.

Das Gen von PMP-22 befindet sich auf Chromosom 17, besteht aus 40 Kilobasen und beinhaltet die Exons eins bis fünf (Bosse et al., 1994; Takahashi et al., 1992). Für das Exon 1 können alternativ zwei verschiedene Sequenzen transkribiert werden, nämlich die Sequenz 1A in der

neuronalen Version oder die Sequenz 1B in der nichtneuronalen Version. Keine der beiden Sequenzen werden jedoch translatiert (Hayasaka et al., 1992). Während das Exon 1A in seiner Promoterregion eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Nuclear Factor-1 (NF-1) sowie TATA-Box und CCAAT-Box-ähnliche Abschnitte beinhaltet (Suter et al., 1994), wurde bislang kein entsprechender Ligand für die Promotorregion des Exons 1B identifiziert. Wie in Abschnitt 3.5. dargestellt, existiert allerdings innerhalb der Promotorregion des Exons 1B ein zum Shear Stress Response Element (SSRE) komplementäres Stück. Das SSRE ist eine Konsensus-Sequenz, welche die verstärkte Expression von Genen durch hämodynamische Stimuli vermittelt (vergleiche Abschnitt 1.2.2.2) (Resnick et al., 1993). Eine Aktivierung des *gas-3*-Gens durch Wandschubspannung über diese Promotorsequenz ist naheliegend.

Um die differentielle Expression bei Belastung durch Wandschubspannung in HUVECs nachzuweisen, wurden in der RT-PCR Primer verwendet, die spezifisch für das in hohem Maße konservierte 3'-Ende der PMP-22/*gas-3*-mRNA sind. Da der amplifizierte mRNA-Ausschnitt in den zwei verschiedenen mRNAs identisch ist, erlaubt er keine Zuordnung zu Exon 1A oder Exon 1B bzw. zu einer Promotersequenz. Aufgrund der beschriebenen Funktionen der Genprodukte ist jedoch ein Vorliegen der mRNA von *gas-3* wahrscheinlich.

In neueren Untersuchungen wurde das Zusammenspiel zwischen *gas*-Genen und positiv regulierenden Faktoren bei der Steuerung des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung erneut belegt (Evdokiou und Cowled, 1998; Fleming et al., 1998). Darüber hinaus wurde beobachtet, daß NIH3T3 Zellen bei reduzierter Expression von *gas*-Genen ihre Fähigkeit zur Kontaktinhibition verlieren (Evdokiou und Cowled, 1998). Eine erhöhte Expression von *gas-3* könnte bei strömungsexponierten Zellen eine verstärkt eintretende Kontaktinhibition bedeuten.

PMP-22/*gas-3* könnte noch eine weitere Funktion haben. Es wurde beobachtet, daß PMP-22 bei neuronalem Gewebe weniger eine Rolle bei der Ausbildung von Myelin als bei der Kontrolle der Myelinschichtdicke und bei der Aufrechterhaltung der Stabilität des Myelins spielt (D'Urso et al., 1997). Darüber hinaus zeigt PMP-22/*gas-3* Eigenschaften von Adhäsionsmolekülen und von Molekülen aus junktionalen Proteinkomplexen. Zu diesen Eigenschaften gehören das bereits oben erwähnte adhäsiv wirksame L2/HNK-1 Epitop sowie die vier transmembranären Domänen (Snipes et al., 1993a). Ähnliche Strukturen liegen im Myelin des zentralen Nervensystems (Popot

et al., 1991), im Occludin aus tight junctions (Furuse et al., 1993) und in den Connexinen der gap junctions (Bennett et al., 1991) vor. In der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchsanordnung bildete der Zellrasen bei statischen Bedingungen keinen dicht geschlossenen Monolayer. Obwohl die Zellen Konfluenz zeigten, entwickelte sich das feste Zusammenhängen erst nach mehrstündiger Strömungsexposition. Dieses Phänomen kann auch *in vivo* beobachtet werden. Bei zu geringen Flußwerten bilden Endothelzellen keinen festverbundenen Monolayer, sondern sind nur schwach miteinander verknüpft (Vyalov et al., 1996). Die stärkere Verbindung der Endothelzellen untereinander erfordert die Ausbildung stabilisierender interzellulärer Strukturen. Das nach Strömung vermehrt exprimierte PMP-22/gas-3 könnte Bestandteil einer solchen Struktur sein.

PMP-22/gas-3 könnte *in vivo* aufgrund der vorliegenden Informationen mehrere Funktionen erfüllen. Wahrscheinlich stellt eine durch Wandschubspannung erhöhte Expression einerseits einen Mechanismus dar, um in gut perfundierten Blutgefäßen die Proliferationsrate des Endothels zu senken. Gleichzeitig wird seine „Dichtheit“ durch Verstärkung oder Vermehrung interzellulärer Strukturen erhöht. Beide Effekte führen zur Stabilisierung gut perfundierter Blutgefäße (vergleiche Abbildung 18).

Eine zusammenfassende Übersicht über die Effekte von Ang2, METH-1 und gas-3 ist in Abbildung 19 dargestellt.

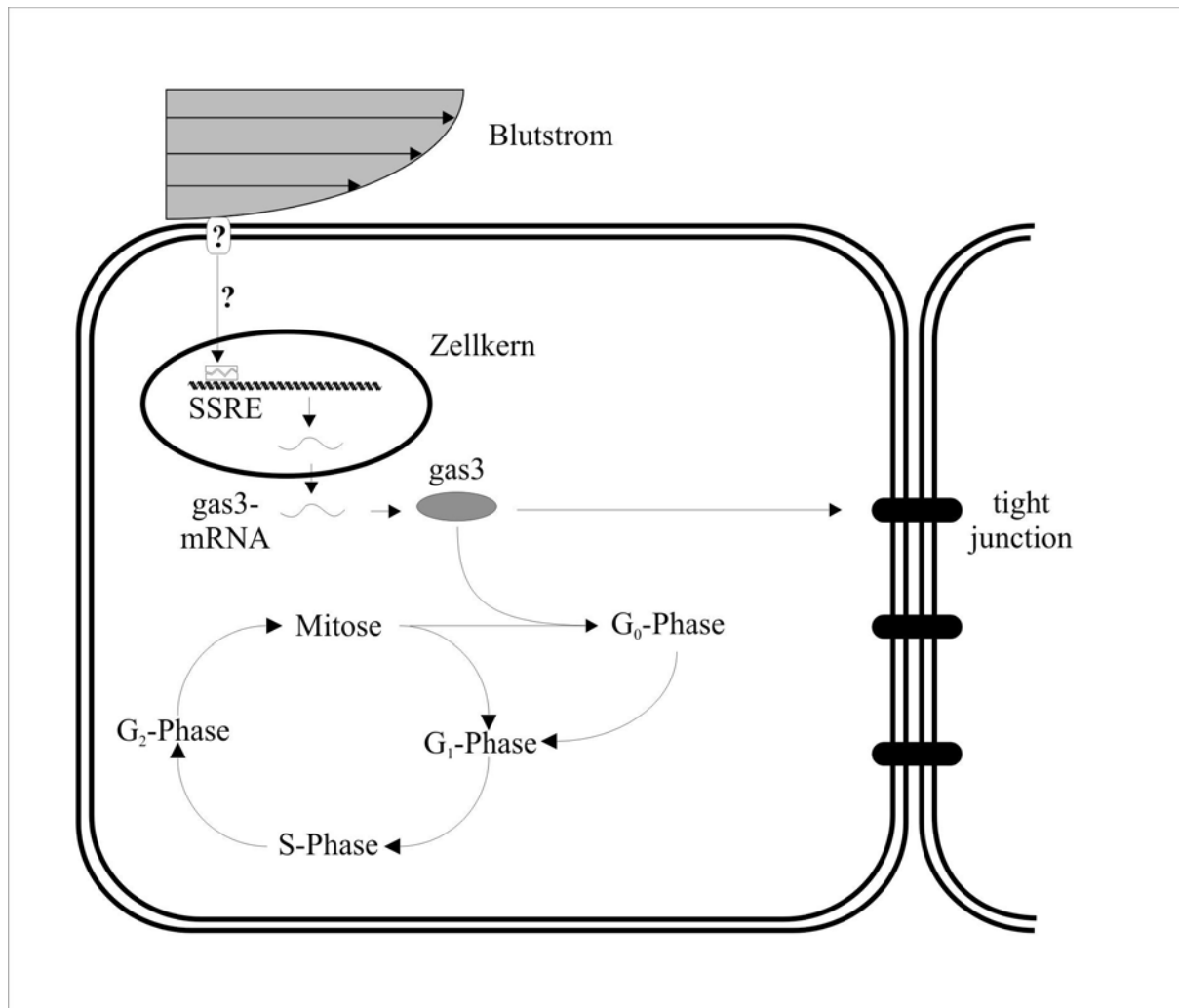


Abbildung 18: **Strömungsvermittelte Stabilisierung gut perfundierter Blutgefäße durch Induktion von *gas-3***

Durch einen luminalen Mechanorezeptor wird ein Transkriptionsfaktor aktiviert, der an das shear stress response element binden kann. Auf diese Weise wird eine verstärkte Transkription hervorgerufen. Das Genprodukt *gas-3* hat zwei Effekte. Einerseits hat es junctionale Eigenschaften und kann als Bestandteil von tight-junctions die Zell-Zell-Verbindungen stärken. Andererseits bewirkt es als regulierender Faktor im Zellzyklus die Einleitung und Aufrechterhaltung der stationären  $G_0$ -Phase.

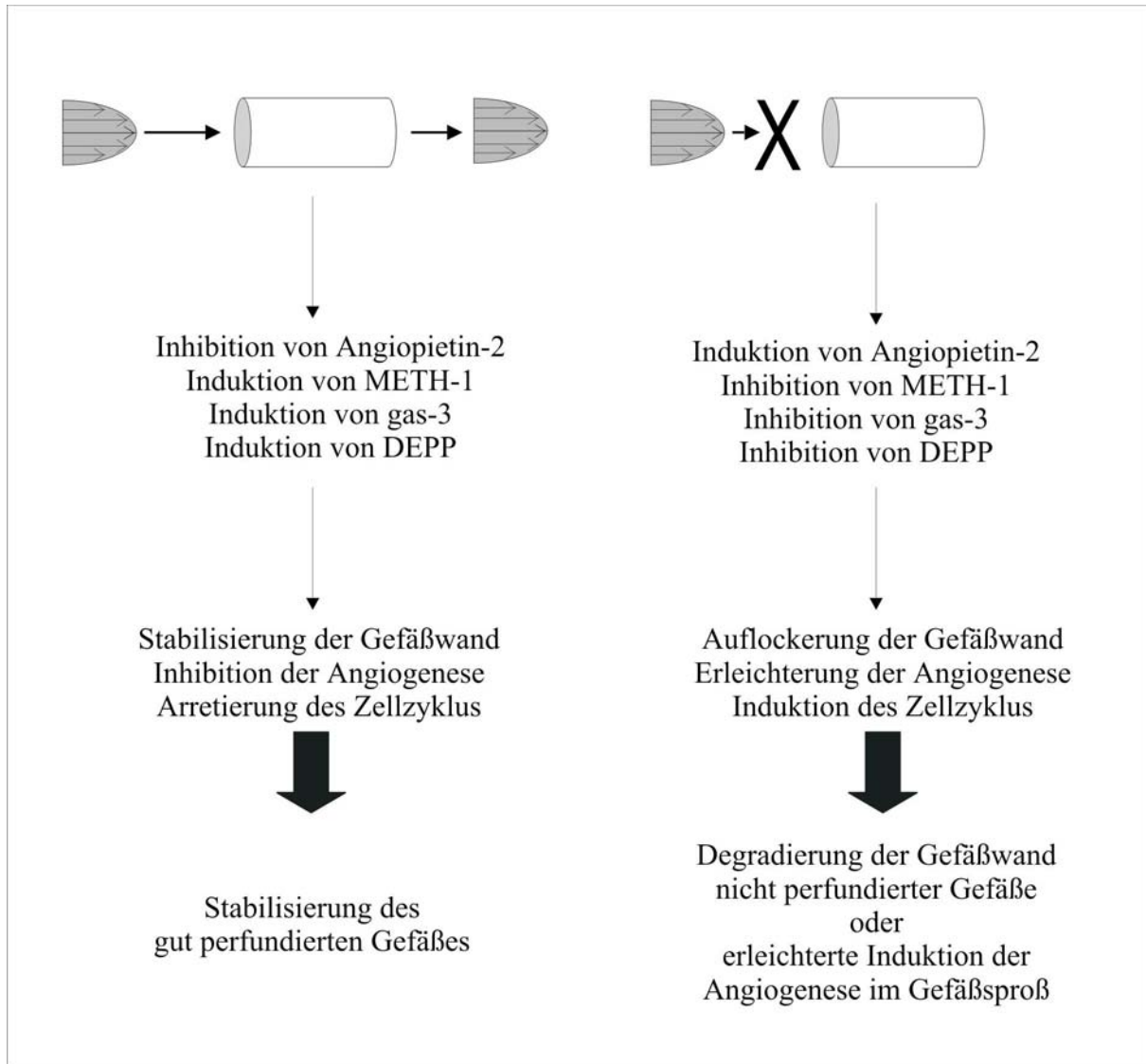


Abbildung 19:  
**Effekte von Ang2, METH-1 und gas-3 auf der Ebene des einzelnen Blutgefäßes**

#### 4.3.5. p11

Die Bande J wurde durch Wandschubspannung induziert und konnte als mRNA des Proteins p11 identifiziert werden. Zwei p11-Moleküle bilden zusammen mit zwei Annexin-2 Molekülen den heterotetrameren Komplex Calpactin-1, deshalb wird p11 auch als „Calpactin-1 light chain“ bezeichnet (Erikson et al., 1984). p11 ist Voraussetzung für die Translokation und die feste Verankerung von Calpactin-1 am submembranösen Zytoskelett (Thiel et al., 1992) und reduziert die Menge  $\text{Ca}^{2+}$ , die nötig ist, um Phospholipide an Calpactin-1 zu binden (Powell und Glenney, 1987). Die Expression von p11 und Annexin-2 ist eng aneinander gekoppelt. (Zokas und Glenney, 1987).

Calpactin-1 ist ein Mitglied der Annexin-Familie, einer Gruppe stark strukturverwandter Proteine, die kalziumabhängig Phospholipide der Zellmembran binden können (Benz und Hofmann, 1997). Es ist an Membranverschmelzung und Exozytose beteiligt, in pflanzlichen Zellen (Blackbourn und Battey, 1993) und in chromaffinen Zellen der Nebennieren (Furuse et al., 1993) fördert Calpactin die Verschmelzung sekretorischer Vesikel. Es ist auf Endosomen elektronenmikroskopisch nachweisbar und wird auf Akzeptorendosomen transferiert (Emans et al., 1993). Calpactin-1 ist in Endothelzellen unabdingbar für eine kontrollierte und effektive Exozytose (König et al., 1998). Unter Strömung erfolgt eine vermehrte Freisetzung von Mediatoren durch Endothelzellen, wie zum Beispiel von bFGF und PDGF (Papadaki und Eskin, 1997). Die Induktion des p11-Gens könnte die Ursache dieser vermehrten sekretorischen Aktivität sein.

Calpactin-1 wurde auch als Molekül in Tumorzellmembranen von Mauslymphomzellen identifiziert, das unter Bindung von Kationen die Adhäsion an Endothelzellen der Lebersinus vermittelt (Tressler et al., 1993). *In vitro* konnte außerdem eine Bindung an Aktin-Filamente -daher die Bezeichnung „Calpactin“- sowie an andere Elemente des Cytoskelettes wie Fodrin,  $\alpha$ -Aktinin und Clathrin beobachtet werden (Cheney und Willard, 1989; Gerke und Weber, 1984; Glenney, 1986). Die Bedeutung dieser Beobachtungen ist allerdings nicht bekannt.

Calpactin-1 bzw. verwandte Annexine haben auch einen Einfluss auf die Hämostase. Nachdem Annexin V als antikoagulatives Protein aus der Plazenta isoliert wurde (Funakoshi et al., 1987),

wurde diese Wirkung bei den anderen Annexinen überprüft und bestätigt (Chap et al., 1988; Tait et al., 1988). Es existieren zwei Hypothesen zur Erklärung dieser Eigenschaft. Einerseits benötigen einige Schritte in der Gerinnungskaskade, wie zum Beispiel die Aktivierung von Faktor X durch Faktor VIIIa und IXa, Phosphatidylserin (PS) als Kofaktor. Dieses Phospholipid findet sich *in vivo* in der äußeren Schicht der Plasmamembran aktivierter Thrombozyten und Endothelzellen. Dort bildet es eine Oberfläche, an der sich Gerinnungsfaktoren ansammeln und die Koagulation einleiten können. Da Annexine in der Anwesenheit von Calcium in der Lage sind, diese Phospholipide zu binden, könnten sie auf diese Weise die Ansammlung der Gerinnungsfaktoren an der Zelloberfläche verhindern (Ravanat et al., 1992; Thiagarajan und Tait, 1990). Andererseits haben Annexine die Eigenschaft, die Oberflächenspannung von Lipidmonolayern zu erhöhen. Durch diesen Vorgang kann die Invasion von Gerinnungsfaktoren aus dem Blut ins Gewebe vermindert werden (Andree et al., 1992; Pollard et al., 1991). Endothelzellen haben einen sehr hohen Gehalt an Annexinen (Hullin et al., 1989; Römisch et al., 1992), die bei einer Gefäßverletzung freigesetzt werden können. In der Tat wurden erhöhte Annexin-Spiegel im Serum nach ischämischen Gefäßläsionen beobachtet (Relton et al., 1991). Deren Interaktion mit dem Gerinnungssystem könnte einen Mechanismus darstellen, durch den die Ausbildung des Fibrinthrombus limitiert wird. Die Expression eines antikoagulativen Proteins, welches sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch bei Gefäßverletzung in die Blutgerinnung eingreift, könnte ein Beitrag zum homöostatischen Gleichgewicht sein. Eine Steuerung dieses Gleichgewichtes durch Endothelzellen in Richtung Fibrinolyse nach Stimulation durch Strömung bzw. Wandschubspannung durch Induktion von Calpactin-1 ist zwar hypothetisch, erscheint jedoch plausibel.

Calpactin-1 ist auch an der Transduktion mitogener Signale beteiligt. Calpactin-1 ist ein Substrat von Tyrosinkinase, deren Aktivität bzw. Expression Zellteilung bzw. Differenzierung auslöst (Pepinsky und Sinclair, 1986; Radke et al., 1980). Solche Tyrosinkinase sind zum Beispiel der Rezeptor des „epidermal growth factor“ (EGFR) und die Tyrosinkinase pp60v-src, welche vom onkogenen Rous-Sarkom-Virus kodiert wird. Auch die mit dem Insulinrezeptor assoziierte Tyrosinkinase verwendet Calpactin-1 als Substrat (Karasik et al., 1988). Welche Vorgänge im

Anschluss an diese Tyrosinphosphorylierung in Gang gesetzt werden, ist bis heute allerdings noch nicht bekannt.

Darüber hinaus gibt es Hinweise, daß Calpactin-1 an der Transkription teilnimmt. Ein Teil des intrazellulären Calpactins-1 liegt im Zellkern vor und wirkt dort als Aktivator der Polymerase A (Jindal et al., 1991).

Desweiteren wird Calpactin-1 bei einigen malignen Erkrankungen vermehrt exprimiert, beispielsweise beim hepatozellulären Karzinom (Frohlich et al., 1990) und beim Glioblastom (Reeves et al., 1992) Eine vermehrte Expression ist auch nach Stimulation von ruhenden Fibroblasten mit Wachstumsfaktoren nachweisbar (Keutzer und Hirschhorn, 1990).

Es liegen Untersuchungen vor, die die vermehrte Expression von Calpactin-1 in Zusammenhang mit der Zelldifferenzierung belegen, z.B. in Phäochromozytomzellen nach Stimulation durch Nerve-growth-factor (Fox et al., 1991), im Linsenepithel des Hühnerembryos (Talian und Zelenka, 1991) und im Gehirn des Rattenembryos (Burgoyne et al., 1989). Darüber hinaus wird die Expression von Calpactin-1 durch die Wachstumsfaktoren Transforming-Growth-Factor  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1) (Munz et al., 1997) und durch c-fos induziert. Außerdem kann Calpactin-1 als Rezeptor für TNfnA-D fungieren (Chung und Erickson, 1994). Bei TNfnA-D handelt es sich um eine Spleißvariante des Matrixglykoproteins Tenascin-C. TNfnA-D induziert die Auflösung von Focal Adhesions, wirkt mitogen und stimuliert die Zellmigration in Endothelzellen (Chung et al., 1996).

Die enge Assoziation von p11 mit durch Strömung induzierten Genen und Proteinen, die an Exozytose, Adhäsion, Hämostase und an zellulärem Wachstum und Differenzierung beteiligt sind, legt nahe, daß Calpactin-1 an der vaskulären Adaptation beteiligt ist. Eine genaue Zuordnung seiner Aufgaben ist noch nicht möglich, da zwar zahlreiche Vorgänge beschrieben wurden, bei denen Calpactin-1 in Erscheinung tritt, seine Funktionen aber weder eindeutig beschrieben noch auf jeweils Wesentliches eingegrenzt wurden.



#### 4.4. Ausblick

In der vorliegenden Untersuchung wurde gezeigt, daß über die bekannten Gene hinaus zusätzliche Gene in ihrer Expression durch Strömungsbedingungen reguliert werden. Dabei ist für vier der fünf Gene ihre Bedeutung für die Angiogenese, wenigstens *in vitro*, nachgewiesen worden. Die hier erstmals beschriebene Steuerung ihrer Expression durch die Blutströmung wird daher einen zentralen Mechanismus darstellen, um die Angiogenese bzw. auch die Angiodegradation an hämodynamische Erfordernisse zu adaptieren. Die weitere Erforschung strömungsregulierter, endothelialer Gene wird in Zukunft in dem Maße an Bedeutung gewinnen, in dem gentherapeutische Verfahren klinisch anwendbar werden. Strömungsregulierte Promotoren würden dabei die Möglichkeit bieten, die Expression transfizierter Gene unter eine körpereigene Kontrolle zu stellen. Dadurch wäre es möglich, Ort und Zeit der Expression gezielt an die tatsächlichen Erfordernisse anzupassen.

Durch vermehrte Expression des Gens von Angiopoietin-2 könnte beispielsweise die Ausbildung von Kollateralen bei chronischer Ischämie forciert werden. Die Vermeidung von Restenosen könnte die Erfolgsquote bei Gefäßtransplantationen erhöhen. Darüber hinaus erscheint die Bekämpfung bösartiger Erkrankungen durch Inhibition der Vaskularisierung durch selektive Aktivierung angiainhibitorischer Gene hochinteressant. Die profunde Kenntnis der Regulierung der an Zellproliferation, Zelladhäsion und Zell/Matrix-Interaktion beteiligten endothelialen Gene wird Wegbereiter solcher molekularen Therapien sein.