

5 Zusammenfassung

Die strömungsregulierte Genexpression im Endothel kann eine entscheidende Rolle für die Steuerung angioadaptiver Prozesse (z.B. Angiogenese) spielen. Einige Mitglieder der Thrombospondin (TSP) type 1 repeats (TSR) Familie weisen eine starke anti-angiogene Wirkung auf, die zum Teil über die Bindung der TSR Domäne an den CD36 Rezeptor vermittelt wird. In dieser Arbeit wurde die strömungsregulierte endotheliale Expression verschiedener TSR Proteine und des CD36 Rezeptors untersucht.

Humane Endothelzellen (HUVEC, HCMEC) wurden mit einem Kegel-Platte-System unter verschiedenen Strömungsbedingungen kultiviert. Die Expression ausgewählter TSR Mitglieder (TSP-1/ -2, METH-1/ -2, „brain specific angiogenic inhibitor“-1, Prokollagen I N-Proteinase, Properdin) und des CD36 Rezeptors wurde mittels RT-PCR, Real-time PCR, Northern Blot und Western Blot untersucht. Die Expression von TSP-1, METH-1 und CD36 wurde darüber hinaus in einem *in vivo* Modell der strömungsinduzierten Angiogenese (Prazosin Modell; Maus) mittels Genearrays und Western Blot analysiert.

Von den untersuchten angiogeneserelevanten Gene wurden sowohl *in vitro* als *in vivo* TSP-1, METH-1 und der CD36 Rezeptor durch Strömungsveränderungen moduliert. Die Expression von TSP-1 und CD36 wird durch Strömungsstillstand hochreguliert. Die durch Bindung von TSP-1 an CD36 induzierte endotheliale Apoptose, könnte daher zum Abbau nicht-perfundierter Blutgefäße beitragen.

Die Expression von METH-1 wurde durch Strömung induziert. METH-1 kann die Angiogenese und die Proliferation von Endothelzellen hemmen. Unter diesem Aspekt könnte METH-1 zur Stabilisierung gut perfundierter Gefäße beitragen.

Bei komplexeren angioadaptiven Vorgängen, wie der VEGF-induzierten Kapillarsprossung, lässt sich eine mögliche zeitversetzte Wirkung von TSP-1/CD36 und METH-1 postulieren. In der ersten Phase, bei turbulenter Strömung/Strömungsstillstand und in Anwesenheit von VEGF, wäre die Suppression von METH-1 für Sprossung und endotheliale Proliferation entscheidend. Bei Anschluss der Sprosse an ein weiteres Gefäß würde METH-1 durch die einsetzende Strömung induziert und das Gefäß stabilisiert. Bei anhaltendem

Strömungsstillstand in einer blind endenden Sprosse würde dagegen TSP-1/CD36 induziert werden und durch endotheliale Apoptose der Gefäßabbau unterstützt.

Die Expression von Properdin, einem Mitglied der TSR Familie, das die Angiogenese nicht moduliert, wird durch Strömung in Endothelzellen induziert. Damit ist das Endothel die bisher einzige bekannte Quelle dieses Regulators der Komplementaktivierung im Plasma. Die erhöhte Expression von Properdin durch turbulente Strömung weist auf seine mögliche Mitwirkung bei Entstehung und Fortschreiten der Arteriosklerose hin.

6 Summary

The flow-dependent modulation of endothelial gene expression should play a key role for the regulation of angioadaptive processes (i.e. angiogenesis) in response to altered hemodynamic conditions. Several members of the Thrombospondin (TSP) type-1 repeat (TSR) family are able to inhibit angiogenesis, especially through the binding to the CD36 receptor. Aim of this study was the analysis of the flow-dependent modulation of TSR genes and of the CD36 receptor.

Human endothelial cells (HUVEC, HCMEC) were exposed *in vitro* to different flow conditions using a cone-and-plate system. The expression of TSP-1/ -2, METH-1/ -2, brain specific angiogenic inhibitor-1, procollagen I N-proteinase, Properdin and CD36 was analysed by RT-PCR, Real-time PCR, Northern blot and Western blot. The expression of TSP-1, METH-1 and CD36 was further analysed in an *in vivo* model of flow induced angiogenesis (Prazosin Model) using gene arrays and Western blotting.

Among the analysed angiogenesis-relevant genes, the expression of TSP-1, METH-1 and CD36 was modulated in response to altered flow conditions both *in vitro* and *in vivo*. TSP-1 and CD36 were induced in absence of flow. Since the binding of TSP-1 to the CD36 receptor can induce endothelial apoptosis, their increased expression in not perfused vessels (i.e. by stenosis) could contribute to vessel degradation.

The expression of METH-1 was induced by flow. Considering the anti-angiogenic and anti-proliferative features of METH-1, its expression in presence of flow may represent a mechanism contributing to the stabilization of well perfused vessels.

By more complex angioadaptive processes, like the VEGF-induced sprouting, the effects of TSP-1/CD36 and METH-1 could be temporarily differentiated. In the first phase, by turbulent/no flow conditions and in presence of VEGF, the expression of TSP-1/CD36 remains low and the inhibition of METH-1 would permit sprouting and endothelial cell proliferation. After connection of the sprout to a further vessel the expression of METH-1 would be up-regulated by flow and the new vessel stabilized. In absence of this connection, the induction of TSP-1/CD36 by prolonged absence of flow would contribute to the degradation of the blind-ending sprout.

The expression of properdin, a member of the TSR family which does not affect angiogenesis, is modulated by flow exposure. The induction of this complement activating factor proposes the endothelium as the only so far known source for plasma properdin. The increased synthesis of properdin by turbulent flow conditions suggests its involvement in the initiation/progression of arteriosclerosis.