

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Cx40, HAS2 und ADAMTS1:
Endotheliale Phänotypregulation durch Schubspannung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bernd Josef Vorderwülbecke

aus Mainz

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. R. Pries
2. Prof. Dr. med. J. Vogel
3. Prof. Dr. med. K. Endlich

Datum der Promotion: 30. 11. 2012

Inhaltsverzeichnis

Seite 4	Zusammenfassung
	Abstract
Seite 5	Einleitung
Seite 6	Zielstellung
	Methodik
Seite 7	Ergebnisse
Seite 9	Diskussion
Seite 13	Literatur
Seite 15	Anteilsklärung
Seite 16	Publikation 1 „Regulation of endothelial Connexin40 expression by shear stress“
Seite 26	Publikation 2 „Shear stress increases endothelial hyaluronan synthase 2 and hyaluronan synthesis especially in regard to an atheroprotective flow profile“
Seite 36	Publikation 3 „Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries“
Seite 48	Lebenslauf
Seite 50	Publikationsliste
Seite 51	Erklärung
Seite 52	Danksagung

Zusammenfassung

Abstract

Das Endothel, eine einschichtige Zelldecke, ist als innerste Auskleidung von Blutgefäßen direkt dem strömenden Blut ausgesetzt. Sein Funktionszustand wird neben anderen biochemischen und mechanischen Einflüssen durch Wandschubspannung moduliert. Diese ist je nach Lokalisation im Gefäßnetz unterschiedlich: an Prädilektionsstellen für Atherosklerose herrschen andere Strömungsverhältnisse als in davor geschützten Gefäßabschnitten, sprossende Kapillaren wiederum werden gar nicht perfundiert. Untersucht wurde die schubspannungsabhängige Regulation dreier phänotypisch bedeutsamer Proteine: Connexin-40 (Cx40) verbindet Endothelzellen als Kommunikationsprotein und ist wichtig für koordinierte Gefäßerweiterung, Hyaluronsäuresynthetase-2 (HAS2) bildet Hyaluronan, einen essentiellen Bestandteil der endothelialen Oberflächenschicht, und ADAMTS1 hemmt Gefäßneubildung. *In vitro* induzierte Bestromung mRNA und Protein von Cx40, HAS2 und ADAMTS1 in jeweils spezifischen Zeitverläufen. Das Expressionsmaximum von Cx40 und HAS2 lag bei mittleren Schubspannungsstärken um 6 dyn / cm^2 , ADAMTS1 hingegen war umso stärker exprimiert, je stärker die Strömung war. Pulsatile, typisch atheroprotektive Bestromung hatte den vergleichbar stärksten Effekt, ganz im Gegensatz zu einem typisch atherogenen Flussprofil. In den meisten untersuchten Konstellationen war zwar die Grundexpression von der Aktivität der PI3-Kinase abhängig, nicht aber die strömungsabhängige Induktion, obwohl PI3-Kinase durch Schubspannung aktiviert wird. Im Rattenmesenterium wurde gezeigt, dass ADAMTS1 in perfundierten Gefäßen hoch exprimiert wird, in sprossenden Kapillaren hingegen supprimiert. Zudem konnte Strömung *in vitro* analog zur Induktion von HAS2 auch die Synthese von Hyaluronan steigern. Ein Transfer der schubspannungsabhängigen Regulationscharakteristik von Cx40 in computersimulierte Gefäßnetzwerke führte in letzteren zu realitätsnäherer Adaptation. In den drei vorgelegten Publikationen wurde insgesamt nicht nur der Einfluss von Schubspannung definierter Art, Stärke und Dauer auf die Expression von Cx40, HAS2 und ADAMTS1 detailliert analysiert, sondern es konnten auch funktionelle Konsequenzen und damit eine strömungsabhängige Regulation des endothelialen Phänotyps dargestellt werden.

Einleitung

Als Endothel bezeichnet man die innerste Auskleidung von Blutgefäßen, welche direkt dem strömenden Blut und den durch dieses ausgeübten chemischen und physikalischen Einflüssen ausgesetzt ist. Zu seinen Funktionen gehören die Regulation des Durchtritts von Flüssigkeit, Stoffwechselfsubstraten und Zellen, die Koordination von Gefäßweite und Blutdurchfluss sowie die Kontrolle der Blutgerinnung. Phänotypisch lassen sich vom ruhenden Endothel andere physiologische und pathologische Funktionszustände abgrenzen, beispielsweise jener der Gefäßneubildung (angiogenetisch) oder der Entzündung (inflammatorisch). Unphysiologische mechanische und biochemische Beanspruchungen sowie Alterungsprozesse können dagegen zu Atherosklerose führen, welche vom Endothel aus auf andere Wandschichten übergreifend im gesamten arteriellen Stromgebiet zu Wandversteifung und Stenosen führen kann. Atherosklerotisch bedingte Folgeerkrankungen insbesondere an Herz und Gehirn sind die führende Todesursache in der westlichen Welt [1, 2].

Das Endothel besteht aus einer einzelnen kontinuierlichen Schicht flächiger Endothelzellen. Diese kommunizieren unter anderem über Gap Junctions, aneinander gekoppelte Poren in der Plasmamembran. Gap Junctions sind aus Connexinen zusammengesetzt, von denen sich das endotheliale Connexin-40 (Cx40) als wesentlich für die stromaufwärts gerichtete Weiterleitung vasodilatatorischer Signale erwiesen hat [3]. Die luminale Oberfläche des Endothels ist mit einem bis zu mehrere Mikrometer dicken Endothelial Surface Layer (ESL) bedeckt, der sich aus membranständigen Glykoproteinen und Proteoglykanen zusammensetzt. Dicke und Struktur des ESL sind ein Indikator für physiologische Endothelfunktion und bei Atherosklerose pathologisch verändert. Sie werden maßgeblich durch den Hyaluronan- (HA-) Anteil des ESL bestimmt, die Synthese besonders langer HA-Ketten geschieht dabei durch die endotheliale HA-Synthetase 2 (HAS2) [4, 5, 6]. Die endotheliale Protease ADAMTS1 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs -1) wiederum ist ein potenter Inhibitor der Angiogenese [7].

Die Expression aller drei Proteine Cx40, HAS2 und ADAMTS1 bestimmt auf ihre Weise den Phänotyp des Endothels. Ein wesentlicher lokaler Einflussfaktor auf endotheliale Expressionsmuster und Funktionszustände ist die durch Blutströmung ausgeübte Wandschubspannung, die je nach Lokalisation im Gefäßgebiet unterschiedliche Stärken und zeitliche Charakteristiken aufweist [1, 2].

Zielstellung

Ziel der hier vorgestellten Arbeiten war daher die Untersuchung der endothelialen Phänotypregulation durch Schubspannung anhand detaillierter Analysen der strömungsabhängigen Expression von Cx40, HAS2 und ADAMTS1 sowie deren funktioneller Konsequenzen.

Methodik

Menschliche Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) wurden aus frischen Nabelschnüren isoliert und kultiviert [8, 9, 10], zudem wurden menschliche koronare mikrovaskuläre Endothelzellen (HCMEC) kultiviert [10], jeweils wie beschrieben. Nach der ersten (HUVEC) bzw. achten (HCMEC) Passage wurden Experimente mit laminarer kontinuierlicher oder pulsatiler Beströmung in einem Kegel-Platte-System durchgeführt wie dargestellt [8, 9, 10, 11]. Die Enzyme Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Protein-Kinase B (Akt), Phospholipase C (PLC) und Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) wurden pharmakologisch inhibiert wie aufgeführt [8, 9, 10]. Zellen wurden mit Small Interfering RNA (si-RNA) transfiziert bzw. unter bestimmten Sauerstoffkonzentrationen inkubiert wie beschrieben [10]. Im Anschluss an die Experimente wurde aus HUVEC die Gesamt-RNA extrahiert und mittels Reverser Transkription in komplementäre DNA umgeschrieben wie dargelegt [8, 9, 10]. Die Auswertung erfolgte mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR), quantitativer Real-Time-PCR [8, 9, 10], semiquantitativer Duplex-PCR und Northern Blot [10] wie ausgeführt. Das zelluläre Gesamtprotein wurde extrahiert, mit Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und per Western Blot ausgewertet wie beschrieben [8, 9, 10]. Die Menge an zellulär gebundenem HA wurde mittels eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt wie dargestellt [9]. Migration und Proliferation von HUVEC wurden analysiert mit Scratch Wound Assay und Zellzählung wie aufgeführt [10]. Im Rattenmesenterium wurde Angiogenese mittels intra-peritonealer Injektionen von „Compound 48/80“ ausgelöst und einerseits *in vivo* durch Intravitalmikroskopie als auch andererseits *ex vivo* durch Immunhistochemie ausgewertet, jeweils wie beschrieben. Die Promotorregion des ADAMTS1-Gens wurde bioinformatisch analysiert wie dargelegt [10]. Der Einfluss von Regelcharakteristiken der Connexinexpression auf Gefäßnetzwerke wurde per Computerprogramm simuliert wie beschrieben [8]. Die experimentellen Daten wurden mit Kurvenanpassung [8], Regressionsanalyse [10] und Student'schen T-Tests statistisch ausgewertet wie aufgeführt, als signifikant galten Werte von $p \leq 0,05$ [8, 9, 10].

Ergebnisse

Für das Cx40-Protein codieren zwei unterschiedliche mRNA-Spleißvarianten, deren Regulation sich als gleichsinnig herausstellte. Schubspannung steigerte die Expression von endotheliale Cx40 auf mRNA- und auch auf Proteinebene, und zwar sowohl zeit- als auch kraftabhängig. Unter Bestromung (6 dyn / cm^2) zeigte sich bei der mRNA ein Zeitgang mit zwei vorübergehenden, voneinander abgrenzbaren Expressionserhöhungen nach vier Stunden bzw. nach 16 Stunden. Auf der Proteinebene wurde eine für wenigstens 24 Stunden andauernde Expressionssteigerung mit einem Maximum nach vier Stunden gezeigt. Die Expressionserhöhung von Cx40-mRNA und -Protein war am deutlichsten bei einer Schubspannung von 6 bis 10 dyn / cm^2 und bei höheren Stärken schwächer ausgeprägt (nach vier Stunden). Eine pharmakologische Blockade von PI3K führte zu einer erheblichen signifikanten Verminderung sowohl der basalen als auch der strömungsabhängigen Cx40-Expression, wobei immer ein strömungsinduzierter Effekt nachzuweisen blieb. Inhibition von Akt schwächte zum einen die strömungsabhängige Induktion von Cx40-mRNA ab und reduzierte zum anderen auch die Grundexpression des Proteins, beides allerdings nicht signifikant. Bei Einspeisung der kraftabhängigen Regelcharakteristik für Cx40-Protein in eine Computersimulation von Gefäßnetzwerken wiesen diese einerseits eine veränderte räumliche Verteilung der Strömungsverhältnisse entlang des Gefäßbaums auf und andererseits ein realitätsnäheres Adaptationsverhalten [8].

Analog zu Cx40 war auch die Expressionsregulation von HAS2 durch Schubspannung (6 dyn / cm^2) zeitabhängig: die mRNA war nach zwei bis vier Stunden verstärkt exprimiert, nach acht Stunden supprimiert und lag nach 16 bzw. 24 Stunden auf dem Niveau der statischen Kontrollen; die Expression des Proteins wies zwei abgrenzbare Maxima nach vier und 16 Stunden Bestromung auf. Im Hinblick auf Kraftabhängigkeit zeigte sich eine signifikante Induktion nur bei einer Schubspannung von 6 dyn / cm^2 , nicht allerdings bei höheren oder niedrigeren Stärken (nach vier Stunden). Beim Einsatz pulsatiler Strömungsprofile, eines davon typisch atheroprotektiv (mittlere Schubspannung 20 dyn / cm^2) und eines atherogen (mittlere Schubspannung $-0,15 \text{ dyn / cm}^2$) [11], wurde HAS2-mRNA nur durch das atheroprotektive Strömungsprofil induziert (24 Stunden). Letzteres führte zudem zu (nicht-signifikant) erhöhten Mengen HA im ESL und im Kulturmedium. Unter pharmakologischer Hemmung von PI3K sank die Expression von HAS2-mRNA stark ab, unabhängig von der Schubspannung (nach vier

Stunden). Auf Proteinebene hingegen supprimierte sowohl die Inhibition von PI3K als auch die von Akt die strömungsabhängige Expressionssteigerung. Bestromung von Zellen mit gehemmter PI3K führte zudem zu einer Reduktion der HA-Menge im ESL [9].

Durch kontinuierliche Schubspannung wurde zudem die Expression von ADAMTS1-mRNA (in HUVEC) und -Protein (in HUVEC und HCMEC) gesteigert. Auf mRNA-Ebene erreichte dieser Effekt sein Maximum nach einer Bestromungsdauer von acht Stunden und blieb für mindestens 48 Stunden stabil. Nach dem Stopp einer 24-stündigen Bestromung ging die erhöhte mRNA-Expression binnen weiterer 24 Stunden auf Kontrollniveau zurück. Der Strömungseffekt erwies sich zudem als kraftabhängig: sowohl mRNA- als auch Proteinexpression stiegen mit zunehmender Strömungsstärke an. Die vergleichsweise stärkste mRNA-Induktion war zu beobachten bei Anwendung des pulsatilen, typisch atheroprotektiven Strömungsprofils, wohingegen das klassisch atherogene Strömungsprofil keine wesentliche Expressionsänderung hervorrief. Eine bioinformatische Analyse der Promotorregion des ADAMTS1-Gens wies auf mögliche Bindungsstellen für strömungsinduzierte Transkriptionsfaktoren hin, namentlich NF1, SP1, AP1 und Foxo1. Ein siRNA-vermittelter Knockdown von Foxo1-mRNA führte entsprechend zu einem geringen, aber signifikanten Anstieg von ADAMTS1-mRNA. Wurden PLC, PI3K und eNOS jeweils spezifisch inhibiert, war die strömungsabhängige Expressionssteigerung von ADAMTS1-mRNA gehemmt. Außerdem erwies sich das mRNA-Expressionsniveau als direkt proportional abhängig vom Sauerstoffpartialdruck, wurde also durch Hypoxie gesenkt. Bestromung von HUVEC führte zu einem Anstieg eines ADAMTS1-abhängig abgespaltenen antiangiogenetischen Thrombospondin-1- (TSP1-) Fragments im Zellkulturmedium. Wurden andere Zellen mit dem so konditionierten Medium kultiviert, verlangsamte sich der Verschluss von definierten Kratzläsionen im Zellrasen. Diese Verlangsamung wiederum konnte durch siRNA-Knockdown von ADAMTS1 teilweise aufgehoben und durch Knockdown von TSP1 komplett verhindert werden. Bei immunhistochemischer Färbung von Gefäßnetzen im Rattenmesenterium konnte ADAMTS1 nicht in sprossenden Kapillaren, wohl aber in perfundierten Gefäßen nachgewiesen werden, während das Gegenteil für das proangiogenetische Angiopoietin-2 (Ang2) der Fall war. In der Immunfluoreszenz war ADAMTS1 im Gegensatz zu TSP1 in solchen Gefäßabschnitten vermehrt nachweisbar, in denen zuvor intravitalmikroskopisch eine erhöhte Wandschubspannung ermittelt worden war [10].

Diskussion

Alle drei untersuchten Proteine ADAMTS1, HAS2 und Cx40 werden in Endothelzellen bei Schubspannung vermehrt exprimiert, jeweils in Abhängigkeit von Zeit, Schubspannungsstärke und Strömungsprofil. Die mRNA-Induktion von ADAMTS1 durch kontinuierliche Bestromung war langanhaltend und durch Strömungsstopp reversibel, die von Cx40 und von HAS2 wies jeweils zwei abgrenzbare Maxima auf und war nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar. Bei HAS2 waren beide vorübergehenden Peaks auch auf der Proteinebene zu detektieren, beim Cx40-Protein hingegen fand sich ein einzelnes Maximum bei ansonsten für mindestens 24 Stunden stabiler Induktion. Je stärker die auf die Zellen ausgeübte kontinuierliche Schubspannung war, desto stärker fiel die Überexpression von ADAMTS1 aus, wohingegen HAS2 und Cx40 am stärksten bei mittleren Stärken von 6 bis 10 dyn / cm² exprimiert wurden. Die mRNA-Expression von ADAMTS1 und von HAS2 wurde durch ein atherogenes, oszillierendes Strömungsprofil ohne nennenswerten Nettofluss nicht verändert. Ein atheroprotektives Profil von im Mittel 20 dyn / cm² hingegen vermochte sie dauerhaft zu steigern, und zwar erheblich deutlicher als eine vergleichbar starke kontinuierliche Bestromung. Aus der Literatur war zuvor lediglich bekannt gewesen, dass Schubspannung generell die Expression von endothelalem ADAMTS1 steigern kann [12], ein Einfluss auf HAS2 war bis dato nicht untersucht. Einige Autoren hatten gezeigt, dass Cx40 in mehrfach passagierten Endothelzellkulturen grundsätzlich durch Schubspannung induziert wird, es lagen aber nur wenige und voneinander verschiedene Messpunkte vor, sodass die Daten im Detail nur schwer miteinander vergleichbar oder gar widersprüchlich waren [13, 14]. In der hier vorgestellten Arbeit wurde erstmalig eine detaillierte Zeit- und Kraftabhängigkeit aufgezeigt [8], deren Komplexität gut erklärt, warum die bisher wenigen herangezogenen Messpunkte uneinheitliche Ergebnisse zu Tage brachten. Außerdem wurden in allen hier präsentierten Studien nur einmalig passagierte HUVEC-Kulturen verwendet [8, 9,10], um eine sonst nachweisbare Entdifferenzierung der Zellen zu vermeiden [15].

Vorübergehende oder persistierende Expressionsänderungen nach Strömungsbeginn oder -stopp stellen eine Anpassungsreaktion der Zellen an die neuen Umgebungsbedingungen dar. Grundsätzlich resultieren erhöhte Mengen an mRNA oder Protein aus vermehrter Synthese (Transkription bzw. Translation) und / oder vermindertem Abbau. Die beschriebenen Gemeinsamkeiten und Verschiedenheiten in den zeitlichen und kraftabhängigen Regelcharakteristiken legen nahe, dass es sowohl gemeinsame wie auch voneinander

verschiedene Signaltransduktionswege geben muss. Die zeitlich separierten Expressionsmaxima bei Cx40- und HAS2-mRNA weisen entweder auf separate, unterschiedlich schnelle Transduktionsmechanismen oder auf eine Rückkopplung an die Proteinexpression im Sinne von Einschwingvorgängen hin. Endothelzellen registrieren Schubspannung entweder direkt an ihrer luminalen Oberfläche oder indirekt, durch ihr Zytoskelett übertragen, an Adhäsionskontakten zur Basalmembran oder zu Nachbarzellen [16, 17]. Eine zentrale Rolle in den hier ausgelösten Signalkaskaden spielt die Aktivierung von PI3K und anschließend die von Akt und eNOS, zudem wird auch PLC durch Schubspannung induziert [18, 19]. Durch spezifische pharmakologische Blockade dieser Signalenzyme wurde ihre Beteiligung an der strömungsinduzierten Expressionssteigerung von Cx40, HAS2 und ADAMTS1 untersucht. Dabei stellte sich überraschenderweise heraus, dass eine Hemmung von PI3K nur beim HAS2-Protein selektiv die strömungsabhängige Induktion aufhob, in allen anderen Fällen aber die strömungsunabhängige Grundexpression erheblich verminderte. Hingegen wurde der Strömungseffekt durch Inhibition von Akt (bei Cx40 und HAS2) bzw. eNOS oder PLC (bei ADAMTS1-mRNA) supprimiert. Folglich muss es Signaltransduktionswege geben, die zwar über Akt, eNOS und PLC Strömungseffekte vermitteln, allerdings unabhängig von PI3K. Bei der bioinformatischen Analyse der Promotorregion des ADAMTS1-Gens wurden unter anderem mögliche Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Foxo1 identifiziert. In der Zellkultur führte ein siRNA-Knockdown von Foxo1 zu erhöhter ADAMTS1-Expression, sodass Foxo1 als Suppressor von ADAMTS1 gelten muss. Bereits zuvor war gezeigt worden, dass Foxo1 über PI3K und Akt schubspannungsabhängig phosphoryliert und aus dem Zellkern eliminiert wird [20]; ADAMTS1 wird bei Strömung also zumindest teilweise über PI3K, Akt und Foxo1 disinhibiert. Insgesamt wird das Wissen um die hier dargestellten Regulationscharakteristiken von Cx40, HAS2 und ADAMTS1, ihre Zeitverläufe, Abhängigkeiten von Strömungsstärke und -art sowie die beteiligten Signaltransduktoren künftig helfen, experimentell gemessene Expressionsveränderungen einordnen zu können. Die gezeigten Daten aus der Enzyminhibition weisen auf unterschiedliche Wege der Mechanotransduktion hin, deren detaillierte Entschlüsselung noch aussteht.

Im Menschen liegt die mittlere Wandschubspannung auf das Endothel bei 10 dyn / cm² in Arterien und 1 dyn / cm² in Venen [21]. Dass endotheliales Cx40 durch Schubspannung grundsätzlich induziert wird, war der vorbestehenden Literatur bereits zu entnehmen. Völlig neu hingegen war die Erkenntnis, dass der Induktionseffekt laminarer Strömung auf die Cx40-

Expression bei mittleren Schubspannungen von 6 bis 10 dyn / cm² maximal ist und bei stärkerer Bestromung wieder absinkt. Cx40 ist notwendig für die stromaufwärts gerichtete Weiterleitung vasodilatatorischer Signale durch das Endothel [3], die den Blutfluss in Abhängigkeit von den Bedürfnissen des stromabwärts gelegenen Gewebes regulieren. Zwar ist bekannt, dass die Funktion von Gap Junctions auf vielen Ebenen reguliert wird, die sich nicht auf die bloße Expression der Connexine beschränken [14]. Unter der Annahme jedoch, dass nicht allein die Cx40-Expression, sondern auch die Leitfähigkeit von Gap Junctions bei mittlerer Wandschubspannung am stärksten ausgeprägt ist, lassen sich im Computermodell mögliche funktionelle Konsequenzen dieser speziellen Regulationscharakteristik untersuchen. Basierend auf intravital-mikroskopischen Strömungsanalysen in Gefäßnetzen des Rattenmesenteriums können Gefäßnetzwerke simuliert werden, die an Umgebungsbedingungen adaptieren. Wird entsprechend zur eingipfligen Schubspannungsabhängigkeit des Cx40 eine eingipflige Abhängigkeit der endothelialen Längskonstante in das Computermodell eingespeist, verändern sich die Strömungsverhältnisse im Netzwerk dahingehend, dass realitätsnähere Adaptationen als zuvor erreicht werden können. Von Cx40 ist darüber hinaus bekannt, dass es einerseits im Endothel atherosklerotischer Plaques supprimiert ist [22] und andererseits selber antiinflammatorische und atheroprotektive Eigenschaften hat [23]. Im Licht der hier dargestellten Ergebnisse scheint es möglich, dass pathologische Wandschubspannung an disponierten Stellen des Gefäßnetzes auch über Cx40-Suppression zu Atheroskleroseneigung führt. Allerdings sind diese Daten in venösen Endothelzellen erhoben worden und haben damit nur begrenzte Aussagekraft für Prozesse im arteriellen System. In nicht veröffentlichten Vorarbeiten jedoch waren arterielle menschliche Endothelzellen den HUVEC in der Differential Display RT-PCR sogar noch ähnlicher als mikrovaskulären Endothelzellen, und grundsätzlich eignen sich HUVEC als menschliche, frische, primäre Endothelzellen wegen ihrer ubiquitären Verfügbarkeit gut als Endothelzellmodell.

HA im ESL ist notwendig für einen dicken ESL und physiologische Endothelfunktion, an Blutgefäßabschnitten mit niedriger Wandschubspannung oder bei atherogener Diät wiederum ist die Dicke des ESL vermindert [5, 6, 24]. Zur Beantwortung der Frage, ob Strömung nicht nur HAS2 induziert, sondern auch die Bildung von HA selbst, wurde nach Bestromung die HA-Konzentration im Kulturmedium und in der zellulären Fraktion gemessen. Kontinuierlicher Fluss löste hierbei keine nennenswerte Änderung aus. Das für vor Atherosklerose geschützte Gefäßabschnitte typische pulsatile Strömungsprofil jedoch induzierte HA sowohl im Kulturmedium, in

das es durch mechanische Abscherung aus dem ESL oder durch direkte Sekretion aus dem Endothel gelangt war, als auch zellulär gebunden, also im ESL selber, was eine erhöhte HA-Synthese in den ESL voraussetzt. Diese Neusynthese erwies sich als PI3K-abhängig, denn unter Hemmung von PI3K war HA im ESL nach Beströmung erheblich reduziert. Strömung, insbesondere wenn sie atheroprotektiver Art ist, induziert also über einen PI3K-abhängigen Weg nicht nur HAS2, sondern auch HA selbst. Dies stellt einen neuen Erklärungsansatz für pathologisch veränderten ESL und Endotheldysfunktion an Orten gestörter Beströmung dar.

ADAMTS1 war *in vitro* außer bei niedriger oder nicht-vorhandener Beströmung auch bei Hypoxie supprimiert. Die Kombination von Hypoxie und Strömungsstillstand tritt *in vivo* pathologischerweise nach Gefäßverschluss und physiologischerweise in durch Aussprossung sich neu bildenden, noch nicht in die Blutzirkulation eingebundenen Kapillaren auf. Im Rattenmodell konnte *in vivo* und *ex vivo* gezeigt werden, dass ADAMTS1 in Gefäßen mit hoher Wandschubspannung verstärkt exprimiert ist, in sprossenden Kapillaren hingegen fast nicht vorhanden. Diametral entgegengesetzt verhielt es sich mit dem proangiogenetischen Ang2. Dieses ist demnach hoch exprimiert in angiogenetisch aktivem Endothel, ADAMTS1 hingegen in ruhendem, nicht-angiogenetischem Endothel. Aus der Literatur waren antiangiogenetische Eigenschaften von ADAMTS1 bereits bekannt, stärkere sogar als die von klassischen Angiogenesehemmern wie TSP1 [7]. Zudem war *in vitro* in einem rekonstituierten System gezeigt worden, dass ADAMTS1 TSP1 spaltet und dabei dessen eigentlich antiangiogenetisch aktives Fragment freisetzt [25]. In der hier vorgestellten Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass TSP1-Expression *in vivo* keineswegs durch Beströmung induziert wurde, dass aber dennoch das erwähnte TSP1-Fragment im Kulturmedium beströmter Zellen erhöht war. Wurden andere HUVEC in dem so konditionierten Medium kultiviert, verzögerte sich der Verschluss artifizieller Endothelwunden, vor allem wegen gehemmter Zellmigration. Gleichzeitig konnte durch siRNA-Knockdown belegt werden, dass dieser antiangiogenetische Effekt des beströmt-konditionierten Mediums vollständig durch TSP1 und teilweise auch durch ADAMTS1 vermittelt war. Insgesamt demonstrieren die hier gezeigten Daten, dass endotheliales ADAMTS1 in regelrecht perfundierten, normoxischen Gefäßen induziert wird und seinerseits, unter anderem durch Freisetzung eines antiangiogenetischen TSP1-Fragments, die Endothelzellmigration hemmt und Gefäßneubildungen verhindert. In nicht-perfundierten, hypoxischen Gefäßgebieten hingegen, insbesondere in sprossenden Kapillaren, ist ADAMTS1 supprimiert und die Angiogenese dadurch disinhibiert.

Insgesamt wurden drei verschiedene Muster von Umgebungsbedingungen simuliert, denen das Endothel ausgesetzt sein kann. Als Indikatoren für den daraus resultierenden Funktionszustand wurden Cx40 mit seinem Einfluss auf die Netzwerkkoordination, HAS2 und HA mit ihrer Bedeutung für den ESL und ADAMTS1 als Angiogeneseinhibitor untersucht. Bei völlig fehlender Wandschubspannung und ggf. Hypoxie wie in Kapillarsprossen sind Cx40, HAS2 und ADAMTS1 supprimiert, was einem angiogenetischen Phänotyp entspricht. Dagegen führen physiologische Strömungsbedingungen wie in reifen, gut perfundierten Blutgefäßen zu hoher Expression im Sinne eines normfunktionalen, ruhenden Endothels. Bei niedriger oder gar atherogener Strömung wie an atherosklerosegefährdeten Stellen im Gefäßnetz bleibt diese Induktion stattdessen aus, passend zum Konzept eines dysfunktionalen Endothels.

Literatur

- [1] Cecchi E, Giglioli C, Valente S *et al.* Role of hemodynamic shear stress in cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2011;214:249-56.
- [2] Chiu JJ, Chien S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* 2011;91:327-87.
- [3] Figueroa XF, Paul DL, Simon AM *et al.* Central role of connexin40 in the propagation of electrically activated vasodilation in mouse cremasteric arterioles in vivo. *Circ Res* 2003;92:793-800.
- [4] Itano N, Sawai T, Yoshida M *et al.* Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J Biol Chem* 1999;274:25085-92.
- [5] Pahakis MY, Kosky JR, Dull RO *et al.* The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355:228-33.
- [6] Noble MI, Drake-Holland AJ, Vink H. Hypothesis: arterial glycocalyx dysfunction is the first step in the atherothrombotic process. *QJM* 2008;101:513-8.
- [7] Vázquez F, Hastings G, Ortega MA *et al.* METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem* 1999;274:23349-57.
- [8] Vorderwülbecke BJ, Maroski J, Fiedorowicz K *et al.* Regulation of endothelial Connexin40 expression by shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302:H143-52.
- [9] Maroski J, Vorderwülbecke BJ, Fiedorowicz K *et al.* Shear stress increases endothelial hyaluronan synthase 2 and hyaluronan synthesis especially in regard to an atheroprotective flow profile. *Exp Physiol* 2011;96:977-86.
- [10] Hohberg M, Knöchel J, Hoffmann CJ *et al.* Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries. *J Cell Physiol* 2011;226:350-61.

- [11] Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S *et al.* Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:14871-6.
- [12] Bongrazio M, Baumann C, Zakrzewicz A *et al.* Evidence for modulation of genes involved in vascular adaptation by prolonged exposure of endothelial cells to shear stress. *Cardiovasc Res* 2000;47:384-93.
- [13] Ebong EE, Kim S, DePaola N. Flow regulates intercellular communication in HAEC by assembling functional Cx40 and Cx37 gap junctional channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H2015-23.
- [14] Johnson TL, Nerem RM. Endothelial connexin 37, connexin 40, and connexin 43 respond uniquely to substrate and shear stress. *Endothelium* 2007;14:215-26.
- [15] Pfenniger A, Derouette JP, Verma V *et al.* Gap junction protein Cx37 interacts with endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:827-34.
- [16] Shyy JY, Chien S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res* 2002;91:769-75.
- [17] Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB *et al.* A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 2005;437:426-31.
- [18] Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601-5.
- [19] Ishida T, Takahashi M, Corson MA *et al.* Fluid shear stress-mediated signal transduction: how do endothelial cells transduce mechanical force into biological responses? *Ann N Y Acad Sci* 1997;811:12-24.
- [20] Chlench S, Mecha Disassa N, Hohberg M *et al.* Regulation of Foxo-1 and the angiotensin-2/Tie2 system by shear stress. *FEBS Lett* 2007;581:673-80.
- [21] Langille BL. Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle, and matrix. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21 Suppl 1:S11-7.
- [22] Brisset AC, Isakson BE, Kwak BR. Connexins in vascular physiology and pathology. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:267-82.
- [23] Chadjichristos CE, Scheckenbach KE, van Veen TA *et al.* Endothelial-specific deletion of connexin40 promotes atherosclerosis by increasing CD73-dependent leukocyte adhesion. *Circulation* 2010;121:123-31.
- [24] van den Berg BM, Spaan JA, Rolf TM *et al.* Atherogenic region and diet diminish glycocalyx dimension and increase intima-to-media ratios at murine carotid artery bifurcation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H915-20.
- [25] Lee YJ, Koch M, Karl D *et al.* Variable inhibition of thrombospondin 1 against liver and lung metastases through differential activation of metalloproteinase ADAMTS1. *Cancer Res* 2010;70:948-56.

Anteilserklärung

Bernd Josef Vorderwülbecke hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

B. J. Vorderwülbecke, J. Maroski, K. Fiedorowicz, L. Da Silva-Azevedo, A. Marki, A. R. Pries, A. Zakrzewicz:

Regulation of endothelial Connexin40 expression by shear stress.

American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology, 2012

Anteil: 40 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Herleitung der Fragestellung, Erstellung des Studienkonzepts, Isolation und Kultivierung der Endothelzellen, Durchführung der Versuche mit Wandschubspannung und Enzyminhibition, mRNA-Isolation, Reverse Transkription, PCR, Erstellung von Standardreihen und Messung mittels quantitativer real-time-PCR, Datenauswertung, Anfertigung von Abbildungen, Anfertigung des Manuskripts.

Publikation 2:

J. Maroski, B. J. Vorderwülbecke, K. Fiedorowicz, L. Da Silva-Azevedo, G. Siegel, A. Marki, A. R. Pries, A. Zakrzewicz:

Shear stress increases endothelial hyaluronan synthase 2 and hyaluronan synthesis especially in regard to an atheroprotective flow profile.

Experimental Physiology, 2011

Anteil: 20 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Isolation und Kultivierung von Endothelzellen, Durchführung von Versuchen mit Wandschubspannung und Enzyminhibition, mRNA-Isolation, Reverse Transkription, PCR, Erstellung von Standardreihen und Messung mittels quantitativer real-time-PCR, Datenauswertung, Anfertigung von Abbildungen.

Publikation 3:

M. Hohberg, J. Knöchel, C. Hoffmann, S. Chlench, W. Wunderlich, A. Alter, J. Maroski, B. J. Vorderwülbecke, L. Da Silva-Azevedo, R. Knudsen, R. Lehmann, K. Fiedorowicz, M. Bongrazio, B. Nitsche, M. Höpfner, B. Styp-Rekowska, A. R. Pries, A. Zakrzewicz:

Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries.

Journal of Cellular Physiology, 2011

Anteil: 5 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Anteile an Isolation und Kultivierung von Endothelzellen, Durchführung von Versuchen mit Wandschubspannung, mRNA-Isolation, Reverse Transkription, PCR, Erstellung von Standardreihen und Messung mittels quantitativer real-time-PCR, Datenauswertung, Anfertigung einer Abbildung.

Publikation 1

B. J. Vorderwülbecke, J. Maroski, K. Fiedorowicz, L. Da Silva-Azevedo, A. Marki,
A. R. Pries, A. Zakrzewicz:

Regulation of endothelial Connexin40 expression by shear stress.

American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology 302 : H143-52

Publikation 2

J. Maroski, B. J. Vorderwülbecke, K. Fiedorowicz, L. Da Silva-Azevedo, G. Siegel,
A. Marki, A. R. Pries, A. Zakrzewicz:

Shear stress increases endothelial hyaluronan synthase 2 and hyaluronan synthesis especially in regard to an atheroprotective flow profile.

Experimental Physiology 96 : 977-986

Publikation 3

M. Hohberg, J. Knöchel, C. Hoffmann, S. Chlench, W. Wunderlich, A. Alter, J. Maroski, B. J. Vorderwülbecke, L. Da Silva-Azevedo, R. Knudsen, R. Lehmann, K. Fiedorowicz, M. Bongrazio, B. Nitsche, M. Höpfner, B. Styp-Rekowska, A. R. Pries, A. Zakrzewicz:

Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries.

Journal of Cellular Physiology 226 : 350-361

Lebenslauf

(Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen
in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.)

Publikationsliste

- 2012 F. Thilo, B. J. Vorderwülbecke, A. Marki, K. Krueger, Y. Liu, D. Baumunk, A. Zakrzewicz, M. Tepel:
Pulsatile atheroprone shear stress affects the expression of transient receptor potential channels in human endothelial cells.
Hypertension 59 : 1232-40
- B. J. Vorderwülbecke, J. Maroski, K. Fiedorowicz, L. Da Silva-Azevedo, A. Marki, A. R. Pries, A. Zakrzewicz:
Regulation of endothelial Connexin40 expression by shear stress.
American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology
302 : H143-52
- 2011 J. Maroski, B. J. Vorderwülbecke, K. Fiedorowicz, L. Da Silva-Azevedo, G. Siegel, A. Marki, A. R. Pries, A. Zakrzewicz:
Shear stress increases endothelial hyaluronan synthase 2 and hyaluronan synthesis especially in regard to an atheroprotective flow profile.
Experimental Physiology 96 : 977-986
- M. Hohberg, J. Knöchel, C. Hoffmann, S. Chlench, W. Wunderlich, A. Alter, J. Maroski, B. J. Vorderwülbecke, L. Da Silva-Azevedo, R. Knudsen, R. Lehmann, K. Fiedorowicz, M. Bongrazio, B. Nitsche, M. Höpfner, B. Styp-Rekowska, A. R. Pries, A. Zakrzewicz:
Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries.
Journal of Cellular Physiology 226 : 350-361
- 2010 B. J. Vorderwülbecke, J. Maroski, K. Fiedorowicz, L. Da Silva-Azevedo, A. R. Pries, A. Zakrzewicz:
Endothelial Connexin 40 expression requires PI3 kinase activity and is specifically enhanced by shear stress.
21st European Students' Conference, Berlin (Vortrag)
European Journal of Medical Research 15 (Supplement I): 183
- 2008 B. J. Vorderwülbecke, J. Maroski, L. Da Silva-Azevedo, A. R. Pries, A. Zakrzewicz:
Shear stress regulates endothelial Connexin 40 by a PI3K-dependent pathway.
87. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Köln (Poster)
Acta Physiologica 192 (Supplement 663): 193

Erklärung

Ich, Bernd Josef Vorderwülbecke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Cx40, HAS2 und ADAMTS1: Endotheliale Phänotypregulation durch Schubspannung“ selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 31. 07. 2012

Danksagung

Meinem Doktorvater Axel R. Pries,
meinem väterlichen Freund und Mentor Andreas Zakrzewicz,
meinem unermüdlichen Kollegen Julian Maroski
und all den anderen Mitstreitern am Institut für Physiologie
für Kollegialität, ständige Ansprechbarkeit und tatkräftige Unterstützung,

meiner Familie, insbesondere meinen lieben Eltern,
und meinen Freunden und Weggefährten
für ihre Geduld, für Aufmunterung und Zuspruch

sowie der Studienstiftung des deutschen Volkes
für alle finanzielle und ideelle Förderung

von Herzen Dank – vergelt's Gott!