

1. Einleitung

Das Endothel bildet die einzellige innere Schicht der Blutgefäße. Mit einer Fläche von insgesamt etwa 100 Quadratmetern gehört es zu den größten Organen des menschlichen Organismus. Dabei bildet das Endothel nicht nur eine Barriere zwischen dem zirkulierenden Blut und den Bestandteilen der Gefäßwand, sondern ist auch metabolisch aktiv. Es produziert und setzt eine Reihe von Substanzen frei, welche die Kontraktion der Gefäßmuskelzellen, die Durchlässigkeit des Gewebes, die Fließeigenschaften des Blutes, die Gerinnung und die intrazellulären Wechselwirkungen im vaskulären Gefäßsystem beeinflussen. Eine verminderte Endothelfunktion erhöht das Risiko für Arteriosklerose und andere Herz-Kreislaufkrankungen, die häufigste Todesursache in den Industrieländern (WHO, 1993; Yusuf, 1998). Bekannte Risikofaktoren für die Entstehung von Herz-Kreislaufkrankungen sind Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Stress, Adipositas, mangelnde Bewegung, fortgeschrittenes Alter, männliches Geschlecht, sowie mögliche genetische Prädispositionen (Kannel, 1997). Bei Patienten mit Risikofaktoren für Arteriosklerose und endothelialer Dysfunktion (gestörte endothelvermittelte Gefäßfunktion), treten häufiger Herzinfarkte, Schlaganfälle und andere schwere kardiovaskuläre Ereignisse auf als bei Patienten mit vergleichbarem Risikoprofil und intaktem Endothel (Schachinger *et al.*, 2000).

Die koronare Herzkrankheit und der Schlaganfall sind die klinischen Endpunkte der Arteriosklerose. Die Arteriosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung und entwickelt sich über Jahre bzw. Jahrzehnte. Dabei führt eine gestörte Endothelfunktion zu zunehmender Cholesterineinlagerung, der Einwanderung von Leukozyten/Makrophagen in die Gefäßwand, der Proliferation glatter Muskelzellen und einer fortschreitenden Gefäßverengung bis zum Gefäßverschluss. Bei der Entstehung der Arteriosklerose kommt dem Endothel eine entscheidende Rolle zu, da es Substanzen produziert, die den Gefäßtonus beeinflussen sowie die Proliferation von glatten Muskelzellen stimulieren können. Zu jenen Substanzen gehören Prostacyclin, Angiotensin II (Ang II), Endothelin (ET), der aus dem Endothel stammende Hyperpolarisationsfaktor (EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor) und Stickstoffmonoxid (NO). Die Freisetzung aus dem Endothel erfolgt durch Einwirkung biomechanischer Kräfte bzw. rezeptorvermittelt durch Substanzen wie Acetylcholin, Serotonin, Histamin, Thrombin, Bradykinin oder Katecholamine. Eine wichtige Rolle spielt dabei die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Dieses Enzym bildet in Anwesenheit von Kalzium und Calmodulin L-Citrullin und NO aus der Aminosäure L-Arginin. Stickstoffmonoxid hat eine Reihe antiarteriosklerotischer Eigenschaften. Es

diffundiert aus den Endothelzellen in die darunter liegenden glatten Muskelzellen und stimuliert intrazellulär die lösliche Guanylatcyclase. Das dabei gebildete cyclische Guanosin-Monophosphat (cGMP) relaxiert die glatten Gefäßmuskelzellen und hemmt deren Proliferation (Garg *et al.*, 1989). NO inhibiert die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, verhindert die Aggregation von Blutplättchen (Radomski *et al.*, 1987; Khan *et al.*, 1996) und hemmt direkt die Oxidation von Lipoproteinen niedriger Dichte (LDL, low density lipoprotein). Ist die erzeugte oder verfügbare Menge an NO erniedrigt, so ist dies ein molekulares Zeichen einer endothelialen Dysfunktion (Britten *et al.*, 1999). Substanzen wie Azetylcholin, die normalerweise NO-vermittelt die Gefäße erweitern, können bei direktem Kontakt glatte Gefäßmuskelzellen kontrahieren und den Gefäßdurchmesser verringern. Die spezifische Antwort ist daher entscheidend von der funktionellen Integrität des Endothels abhängig.

Neben dem Vasodilatator Stickstoffmonoxid setzt das Endothel potente Vasokonstriktoren, wie Endothelin und Angiotensin frei. Das Endothel reguliert im gesamten vaskulären System den Gefäßtonus und die Permeabilität in Abhängigkeit vom Gefäßbett und den spezifischen Organanforderungen. Dies wird durch die spezifische Verfügbarkeit der genannten Mediatoren, biomechanische Kräfte oder Substanzen wie Serotonin, Histamin, Thrombin, Bradykinin sowie Katecholamine vermittelt. Darüber hinaus wird eine Gefäßbett-spezifische phänotypische Differenzierung der Endothelzellen als modulierend angesehen.

Die Regulation des Endothelins durch kardiovaskuläre Risikofaktoren und die Differenzierung des Endothels sind bisher jedoch nur unvollständig verstanden.

1.1 Endothelin

Die Endotheline sind eine Peptid-Familie, die vorrangig von Endothelzellen synthetisiert wird. Endothelin-1 wurde 1988 aus dem Überstand kultivierter Endothelzellen der Schweineaorta isoliert (Yanagisawa *et al.*, 1988). Bisher wurden drei Isoformen identifiziert, Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3). Diese bestehen aus jeweils 21 Aminosäuren (Abb. 1.1) und werden von unterschiedlichen Genen kodiert (Inoue *et al.*, 1989a).

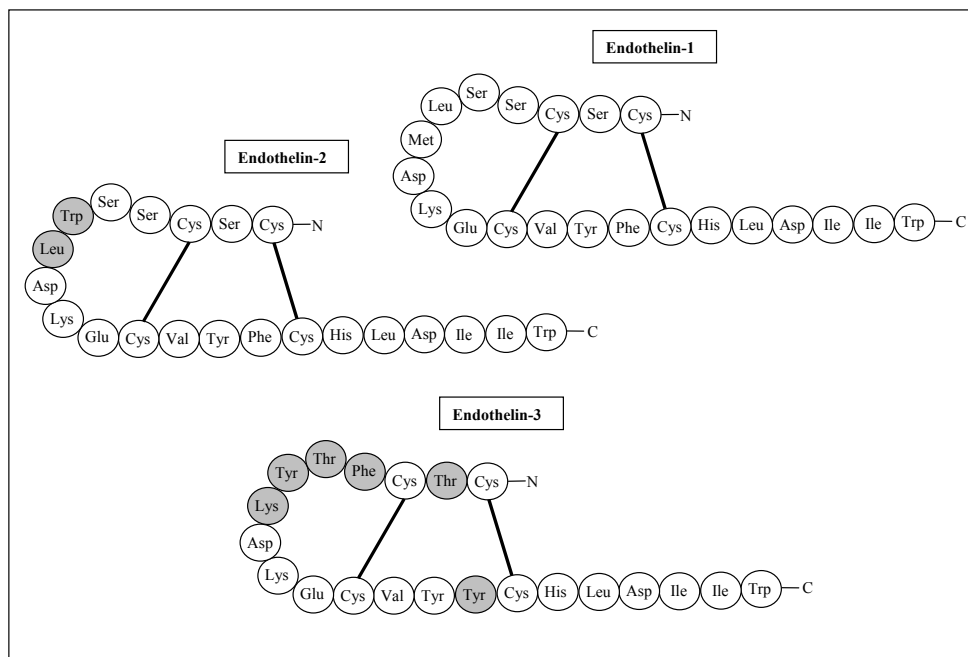


Abb. 1.1: Primärstruktur der Endotheline. Die Endotheline bilden zwei intrachenare Disulfidbrücken aus, die die Stabilität gegenüber Proteasen erhöhen. Essentiell für die Bildung ist das IIW-Motiv vor der Spaltungsstelle ($W^{21}-V^{22}$ bzw. $W^{21}-I^{22}$ in BigET-3), sowie die Aminosäuren am C-terminalen Ende der Big-Endotheline. Grau unterlegt sind die von ET-1 abweichenden Aminosäuren.

Das ET-1 wurde zuerst identifiziert und ist bisher am intensivsten untersucht (Inoue *et al.*, 1989b). Es ist der stärkste bisher bekannte Vasokonstriktor und die häufigste Endothelin-Isoform in Endothelzellen. ET-1 hat zusätzlich positiv inotrope und mitogene Effekte. Darüber hinaus reguliert es die Salz- und Wasser-Homöostase und stimuliert das Renin-Angiotensin-System (RAS) bzw. das sympathische Nervensystem (La *et al.*, 1995; Haynes *et al.*, 1998).

ET-1 wird auch im Herz, der Niere, dem Hypophysenhinterlappen, dem Zentralnervensystem und in glatten Muskelzellen der Gefäßwände gebildet (Gray *et al.*, 1995). Dabei ist die

Expression des ET-1-Gens in glatten Muskelzellen der Aorta 100-fach geringer, als in Endothelzellen.

ET-2 wird auf niedrigem Niveau in Endothelzellen, Herz und Niere gebildet (Howard *et al.*, 1992; Plumpton *et al.*, 1993). Die Bildung von ET-3 wurde bisher im endokrinen System, im Gastrointestinaltrakt und im Zentralnervensystem nachgewiesen (Gray *et al.*, 1995).

Die Biosynthese der Endotheline beinhaltet mehrere proteolytische Schritte. Dabei wird aus dem Primärtranskript Präproendothelin (ppET, alle Isoformen > 200 Aminosäuren) durch die Abspaltung einer kurzen Sekretionssequenz das Proendothelin gebildet. Die proteolytische Spaltung durch Furin bildet inaktive Vorstufen, die Big-Endotheline: BigET-1 (38 Aminosäuren), BigET-2 (37 Aminosäuren) und BigET-3 (41 Aminosäuren). Die aktiven Endotheline (je 21 Aminosäuren mit zwei intrachenaren Disulfidbrücken) entstehen durch proteolytische Spaltung der Trp²¹-Val²²-Peptidbindung (bzw. Trp²¹-Ile²² bei BigET-3) mit Hilfe des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms (ECE) aus den Big-Endothelinen (Rubanyi *et al.*, 1991). Die bisher bekannten ECE-Isoformen haben eine höhere Affinität zur Spaltung von BigET-1 als von BigET-2 und BigET-3.

Ihre Wirkung üben die Endotheline über mindestens zwei Rezeptoren aus. Der Endothelin-Rezeptor A (ET_A) ist spezifisch für ET-1 ($K_i = 0,6$ nmol/L für ET-1, $K_i = 140$ nmol/L für ET-3). Der Endothelin-Rezeptor B (ET_B) hat eine vergleichbare Affinität für ET-1 und ET-3 ($K_i = 0,12$ nmol/L bzw. $K_i = 0,06$ nmol/L). Die Affinität für ET-2 liegt für beide Rezeptoren zwischen denen für ET-1 und ET-3. Die ET-Rezeptoren, die an die G-Proteine G_q bzw. G_i gekoppelt sind, gehören zur Familie der siebenfach-gefalteten Transmembran-Rezeptorproteine. Das G_q-Protein aktiviert die Phospholipase C, die aus Phosphatidylinositol Inositol-3-phosphat und Diacylglycerol freisetzt. Diese „second messenger“ aktivieren die intrazellulären Kalziumspeicher und die Proteinkinase C. Über diese Signalwege kommt es in den Muskelzellen, hauptsächlich ET_A-Rezeptor-vermittelt, zur Kontraktion bzw. zur positiven Inotropie. Das G_i-Protein hemmt die Bildung von cyclischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) durch die Adenylatcyclase, dadurch kann z.B. eine α -adrenerge Stimulation, die über das G_s-Protein stimulierend auf die Adenylatcyclase wirkt, moduliert werden.

Ein weiterer über die ET-Rezeptoren regulierter Signalweg führt über die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (ERKs), die zur Familie der mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) gehören. Diese aktivieren Transkriptionsfaktoren (c-fos, c-jun, egr-1) sowie Translationsfaktoren (PHAS-I) und führen damit z.B. zu erhöhter Proteinsynthese bzw. zur Zellteilung (Sugden *et al.*, 1996). Darüber hinaus gibt es in Endothelzellen Signalwege, die eine ET-vermittelte Freisetzung vasodilatatorischer Substanzen (Stickstoffmonoxid, Prostaglandin) bewirken. Eine intravenöse Injektion von ET-1 führt initial zu einer

Vasodilatation, die anschließend in eine lang anhaltende Vasokonstriktion übergeht (Yanagisawa *et al.*, 1988; Minkes *et al.*, 1989). Erfolgt die ET-1-Gabe langsam (Infusion über 1 Stunde), wird keine transiente Dilatation beobachtet (Mortensen *et al.*, 1990). Dies verdeutlicht die Wirkung von ET-1 über die beiden ET-Rezeptoren (ET_A und ET_B) und ihre unterschiedlichen Wirkungen in verschiedenen Zelltypen. Die glatten Muskelzellen der Gefäße besitzen ET_A- und ET_B-Rezeptoren, wobei die Vasokonstriktion hauptsächlich über den ET_A-Rezeptor vermittelt wird. Die Endothelzellen besitzen im Allgemeinen nur den ET_B-Rezeptor, wobei die Dichte und Verteilung sowie das Vorkommen von ET_A-Rezeptoren in Endothelzellen von den Gefäßen und der untersuchten Spezies abhängig ist (N'Diaye *et al.*, 1997; Heinroth-Hoffmann *et al.*, 1998). In den Endothelzellen vermittelt der ET_B-Rezeptor die Bildung und Freisetzung der Vasodilatoren. Bei der intravenösen Injektion von ET-1 überwiegt kurzfristig der ET_B-vermittelte vasodilatatorische Effekt, bevor das zirkulierende ET-1 die glatten Muskelzellen erreicht und die Vasokonstriktion induziert.

Die lang anhaltende vasokonstriktorische Wirkung von ET-1 ist auf eine sehr feste Bindung zwischen Rezeptor und Agonist zurückzuführen. Der Umsatz von ET-1 im Plasma ist dagegen sehr schnell (Halbwertszeit: 1 min im Plasma). Endothelin wird über zwei Wege aus dem Plasma entfernt: a) Internalisierung durch den ET_B-Rezeptor (daher auch als Clearance-Rezeptor bezeichnet) vor allem in Lunge und Niere (Sirvio *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1992b; Löffler *et al.*, 1993; Fukuroda *et al.*, 1994) und anschließender Abbau in lytischen Kompartimenten (Nakamura *et al.*, 1990; Jackman *et al.*, 1993), sowie b) hydrolytische Metabolisierung durch neutrale Endopeptidase (Abassi *et al.*, 1993).

Die Expression der Endothelgene kann durch eine Vielzahl von Stimuli reguliert werden. Vasoaktive Hormone, Wachstumsfaktoren, freie Radikale, Endotoxine, Cyclosporin und Hypoxie erhöhen die Präproendothelin-Expression; Stickstoffmonoxid, natriuretisches Peptid (ANP), Heparin sowie Prostaglandine verringern sie dagegen (Gray *et al.*, 1995).

In zahlreichen Untersuchungen konnte eine erhöhte Plasmakonzentrationen von ET-1 bei Herz-Kreislaufkrankungen beobachtet werden (Kohno *et al.*, 1990; Saito *et al.*, 1990; Battistini *et al.*, 1993). ET-1 ist jedoch vorrangig ein auto- und parakriner Faktor. Die ET-1-Konzentrationen im Plasma sagen daher nur wenig über die lokale Endothelinwirkung und -verfügbarkeit aus (de Nucci *et al.*, 1988). Zusätzlich werden 80% des von Endothelzellen synthetisierten ET-1 abluminal sezerniert (Wagner *et al.*, 1992a). Trotz der daher gebotenen Zurückhaltung gibt es eine Reihe von Befunden, die für eine enge Korrelation von erhöhten Plasmaendothelinspiegeln und Schweregrad bzw. Prognose von kardiovaskulären Erkrankungen (z.B.: Myokardinfarkt, Arteriosklerose, chronische Herzinsuffizienz,

kardiogener Schock, Subarachnoidalblutungen, Hypertonie) sprechen (Battistini *et al.*, 1993; Monge, 1998).

Die Expression der Gene des Endothelin-Systems im Myokard ist in Abhängigkeit von Pathogenese und Schweregrad bisher widersprüchlich. Im humanen Myokard hat vorrangig der ET_A-Rezeptor funktionelle Bedeutung für das Kontraktionsverhalten der Myozyten. In einer ersten Untersuchung bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ist der ET_A-Rezeptor weder funktionell noch in seiner Dichte verändert (Ponicke *et al.*, 1998). In einer zweiten Untersuchung des linken Ventrikels von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz wurde eine unveränderte mRNA-Expression von Präproendothelin-1, der ET_A-Rezeptor und ECE-1, jedoch eine verringerte Expression des ET_B-Rezeptors gezeigt. Zusätzliche Rezeptorbindungsstudien sprechen in diesen Patienten für eine erhöhte ET_A- und eine verringerte ET_B-Rezeptordichte (Zolk *et al.*, 1999). Bei weiteren Untersuchungen im humanen ventrikulären Myokard wurde bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) eine erhöhte ET_A- bei unveränderter ET_B-Rezeptordichte nachgewiesen (Pieske *et al.*, 1999). Die Regulation der Expression des ECE-1 ist dagegen noch wenig untersucht.

1.2 Endothelin-Konvertierungs-Enzyme

Der letzte Schritt der Endothelin-Synthese wird durch das Endothelin-Konvertierungs-Enzym (ECE) katalysiert. Seit der Klonierung 1994 wurden drei Isozyme beschrieben (ECE-1, ECE-2, ECE-3). Allein von ECE-1 wurden bisher vier Isoformen in unterschiedlichen Spezies identifiziert (Ikura *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1994; Shimada *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1994; Emoto *et al.*, 1995; Shimada *et al.*, 1995a; Shimada *et al.*, 1995b; Schweizer *et al.*, 1997; Hasegawa *et al.*, 1998; Valdenaire *et al.*, 1999). Diese ECE-1-Isoformen wurden aufgrund ihrer fast zeitgleichen Entdeckung in unterschiedlichen Spezies alternativ benannt. In dieser Arbeit werden die Isoformen entsprechend der Nomenklatur von Schweizer und Valdenaire als ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c und ECE-1d bezeichnet (genetische Struktur siehe Anhang 1). Die ECEs gehören zur M13-Familie der Peptidasen mit dem charakteristischen Vertreter Neprilysin (= neutrale Endopeptidase, NEP, EC 3.4.24.11).

ECE-1 (EC 3.4.24.71) gehört zu dem Typ II membrangebundener Metalloendopeptidasen. Diese enthalten ein konserviertes HEXXH-Motiv in der katalytischen Domäne, das über zwei Histidine zwei der drei Koordinierungsstellen für den Co-Faktor Zink bereitstellt und mit Glutaminsäure das katalytische Zentrum bildet. Die ECEs weisen 10 potentielle N-Glykosylierungsstellen auf. Ihre Aktivität ist von der korrekten Kohlenhydratmodifizierung abhängig. (Schweizer *et al.*, 1997; Nelboeck *et al.*, 1998). Das aktive ECE-1 bildet ein kovalentes Dimer von ca. 250 kDa. Die Abbildung 1.2 zeigt die vorgeschlagene Topologie.

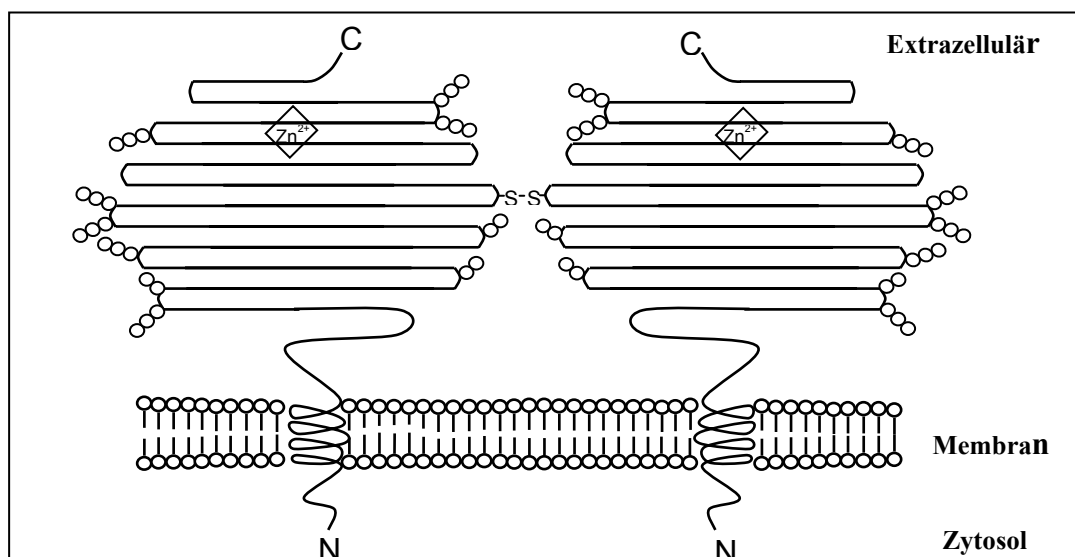


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der ECE-Topologie als integrales, dimeres Typ II- Membranprotein. Das Transmembransegment enthält 21 Aminosäuren. Die beiden Monomere sind durch eine Disulfidbrücke (in ECE-1b Cys⁴¹²) kovalent verknüpft. Offene Kreise symbolisieren die 10 N-Glykosylierungsketten der Monomere. Das Zink-Ion (Zn^{2+}) im katalytischen Zentrum wird von dem konservierten Zinkbindungs-motiv (HEXXH) umgeben. Für die ECE-1-Isoformen ist die gesamte katalytische Domäne identisch, während die N-terminalen Sequenzen der zytosolischen Domäne variieren.

Die ECEs zeigen eine hohe Substratspezifität. Sie führen die spezifische Spaltung von BigET zu ET durch. Dabei haben ECE-1 und ECE-2 eine höhere Spezifität für BigET-1, als für BigET-2 oder BigET-3 (1 : 0,1 : 0,1). Der C-Terminus der Big-Endotheline ist von entscheidender Bedeutung für die Substraterkennung (Okada *et al.*, 1991; Okada *et al.*, 1993). Das kürzlich isolierte ECE-3 spaltet dagegen vorrangig BigET-3, während BigET-1 nicht umgesetzt wird (Hasegawa *et al.*, 1998).

In vitro wurde bei sehr hohen Bradykininkonzentrationen auch der Umsatz von Bradykinin durch ECE-1 gezeigt ($K_m = 1 \text{ mM}$ im Gegensatz zu $K_m = 0,5 \text{ }\mu\text{M}$ für BigET-1) (Hoang *et al.*, 1997). Diese Funktion spielt *in vivo* im Vergleich zu den bisher bekannten Bradykinin-inaktivierenden Enzyme NEP und ACE jedoch wahrscheinlich eine eher untergeordnete Rolle (ACE: $K_m = 0,4 \text{ }\mu\text{M}$; NEP: $K_m = 90 \text{ }\mu\text{M}$).

Die drei bisher beschriebenen ECEs unterscheiden sich in ihrem pH-Optimum (ECE-1-Isoformen: pH 6,8 - 7,0; ECE-2: pH 5,5 sogar inaktiv bei pH 7,0; ECE-3: pH 6,6). Durch SDS-Gelelektrophorese wurde die molekulare Masse der glykosylierten Monomere bestimmt (ECE-1: 125-130 kDa, ECE-2: 130 kDa, ECE-3: 140 kDa). Alle ECEs werden durch Phosphoramidon gehemmt ($IC_{50} \approx 1 \text{ }\mu\text{M}$), jedoch durch Thiorphan nicht inhibiert. Dies unterscheidet sie von der neutralen Endopeptidase, die durch beide Inhibitoren gehemmt wird. Die vier humanen ECE-1-Isoformen werden durch alternatives Splicing eines Gens gebildet, das in der Chromosomenregion 1p36.1 lokalisiert ist. Die Expression der ECE-1-Isoformen wird durch unterschiedliche Promotoren reguliert (Orzechowski *et al.*, 1997; Schweizer *et al.*, 1997). Die Isoformen unterscheiden sich in ihrer zytoplasmatischen, N-terminalen Proteinsequenz. Die Transmembrandomäne sowie die katalytische Domäne sind dagegen identisch. Dadurch sind ihre katalytischen Eigenschaften identisch. Für die intrazelluläre Lokalisation der Isoformen sind die zytoplasmatischen Anteile verantwortlich. Die subzelluläre Lokalisation der ECEs wurde lange kontrovers diskutiert. Neuere Untersuchungen ergeben ein genaueres Bild. (Schweizer *et al.*, 1997; Azarani *et al.*, 1998; Barnes *et al.*, 1998; Emoto *et al.*, 1999). Es gibt jeweils mindestens eine extrazelluläre ECE-1-Isoform, die für die Umwandlung von extrazellulärem BigET-1 verantwortlich ist. Diese wird hauptsächlich in Zellen gebildet, die durch extrazelluläre Signale reguliert werden. Zellen, die aktiv ET-1 sezernieren, bilden mindestens eine intrazelluläre ECE-1-Isoform, die einem schnellen Abbau in lytischen Kompartimenten unterliegt. Da gerade die N-terminalen Sequenzen in den unterschiedlichen Spezies variieren, sind Lokalisationen nicht immer von einer Spezies auf die andere übertragbar. In humanen Zellen ist ECE-1a in der Plasmamembran lokalisiert, ECE-1b vermittelt die intrazelluläre Prozessierung von BigET-1.

ECE-1c nimmt eine Zwischenstellung ein, da es zwischen der Plasmamembran und dem Golgi-Netzwerk transloziert wird.

Daher kommt der exakten Kenntnis der Isoformmuster in unterschiedlichen Geweben für das Verständnis der Regulation der ET-1-Produktion und die Entwicklung pharmakologischer Substanzen zur ECE-Inhibition große Bedeutung zu. Die Regulation der unterschiedlichen ECE-1-Isoformen durch proarteriosklerotische Stimuli ist jedoch noch wenig untersucht. Darüber hinaus gibt es bisher nur wenige Untersuchungen zur Regulation der ECE-1-Expression bei kardiovaskulären Erkrankungen. Zu Beginn der Arbeiten war lediglich bekannt, dass die mRNA-Expression des ECE-1-Gens in Patienten mit Myokardinfarkt erhöht ist (Bohnemeier *et al.*, 1998). Tierexperimentelle Untersuchungen an einem Hypertrophiemodell (kultivierte Rattenkardiomyozyten nach α -adrenerger Stimulation) zeigen, dass eine erhöhte ET-1-Produktion zu Hypertrophie führt und der erhöhte ET-1-Spiegel durch eine erhöhte Expression der ECE-1-mRNA verursacht wird (Kaburagi *et al.*, 1999).

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war daher ein besseres Verständnis der Regulation unterschiedlicher ECE-1-Isoformen in humanen Endothelzellen, die Regulation des Endothelin-Systems in tierexperimentellen Modellen kardiovaskulärer Risikofaktoren sowie klinische Untersuchungen im Gewebe von Patienten mit koronarer Herzkrankheit bzw. Herzinsuffizienz.

1.3 Das vaskuläre System – Entwicklung, Aufbau und Funktion

Das vaskuläre System ist eines der ersten Organsysteme, das sich während der Embryogenese ausbildet. Dabei bilden sich aus einem ungeordneten vaskulären Plexus in kurzer Zeit ein hochgeordnetes System aus Arterien, Venen und mikrovaskulären Gefäßen sowie die frühe Anlage des Herzens. In diesem Organisationsprozess scheinen die Endothelzellen eine entscheidende funktionelle Rolle zu spielen. Schon im vaskulären Plexus sind distinkte Populationen von venösen und arteriellen Zellen nachweisbar. Genetische Veränderungen dieser Organisation durch Mutationen führen zu massiven, letalen Missbildungen des Embryos, vor allem bei der Ausbildung des Herzens und der Aorta.

Den Endothelzellen wurde früher eine reine Barrierefunktion zur Abgrenzung der Zirkulation von den Geweben zugesprochen. In den letzten 25 Jahren ist immer deutlicher geworden, dass es sich bei Endothelzellen nicht nur um eine innere Auskleidung der Gefäße handelt, sondern um ein komplexes Organsystem mit vielfältigen Funktionen in der Differenzierung des vaskulären Systems, der Regulation des Blutdrucks und der Synthese und Freisetzung auto- und parakriner Faktoren.

In der Entwicklung von Gefäßen werden zwei grundsätzliche Prozesse voneinander unterschieden: Vaskulogenese und Angiogenese. Die Vaskulogenese ist die Neubildung von Gefäßen im Rahmen der Embryonalentwicklung. Die Angiogenese, beschreibt die Neubildung von Gefäßen durch Sprossung oder Teilung aus vorhandenen Gefäßen im Rahmen der Embryogenese, Wundheilung, Reperfusion und Tumorprogression. Während der Vaskulogenese entsteht aus dem primären vaskulären Plexus, einem einfachen, scheinbar ungeordneten Netz von Endothelzellen, das vaskuläre System. Dabei kommt es durch die Wirkung angiogener Faktoren (z.B. vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, VEGF) im Zusammenspiel mit dem Angiopoietin/Tie-System und dem Ephrin/Eph-System durch Progression und Regression von tubulären Strukturen zur Strukturbildung und Reifung von Gefäßen. Die Reifung von Gefäßen erfordert neben der Ausbildung von tubulären Strukturen die Integration der Endothelzellen mit den sie umgebenden Zellen. Von besonderer Bedeutung sind dabei glatte Muskelzellen und Perizyten, die sich gemeinsam aus den mesenchymalen Zellen entwickeln. Die Notwendigkeit dieser Zell-Zell-Interaktionen für den Aufbau intakter Gefäßen zeigen Versuche zur Überexpression von VEGF, wobei die Neubildung von Gefäßen induziert wird (Detmar *et al.*, 1998; Larcher *et al.*, 1998). Diese Gefäße bleiben jedoch ohne die Einwirkung von weiteren Faktoren in einem unreifen, durchlässigen Entwicklungsstand, da offensichtlich die Rekrutierung und Vernetzung der umgebenden Zellen gestört ist (Thurston *et al.*, 1999).

Das derzeitige Modell der vaskulären Entwicklung geht daher von einer Hierarchie von Faktoren aus, bei denen VEGF die essentielle Funktion der Wachstumsförderung übernimmt. Angiopoietin-1 fördert über den Tie2-Rezeptor die Gefäßstabilität, während Angiopoietin-2 durch Blockade des Tie2-Rezeptors eine Sprossung durch Destabilisierung von intakten Gefäßen ermöglicht. Ephrin-B2 und EphB4 werden als entscheidende Faktoren für die arteriovenöse Differenzierung angesehen, wobei die Expression von EphB4 die Bildung von venösen Gefäßen markiert, während die Expression von Ephrin-B2 ein notwendiger Bestandteil bei der Bildung von arteriellen Gefäßen ist (Yancopoulos *et al.*, 2000).

Im adulten vaskulären System bestehen die Arterien aus einer Lage arterieller Endothelzellen, der extrazellulären Basallamina sowie einer je nach Lage im Gefäßsystem unterschiedlich dicken Schicht glatter Muskelzellen. Die großen Arterien verzweigen sich zu immer kleineren Arterien bis zu den Arteriolen in den Organen. An sie schließt sich ein verzweigtes Kapillarnetz (Mikrozirkulation) an, das den Gas- und Stoffaustausch des Blutes mit dem umliegenden Gewebe vermittelt. Diese Kapillaren sind aus einem einschichtigen Endothel mit umgebenden Perizyten aufgebaut. An die mikrovaskulären Gefäße schließen sich Venolen an, die sich in immer größeren Venen sammeln, um das Blut schließlich zum Herzen zurückzuführen. Die Venen sind mit einer Lage venöser Endothelzellen ausgekleidet, die von wenigen Lagen glatter Muskelzellen umgeben sind.

Neben der Transportfunktion des vaskulären Systems, der Versorgung der Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen, der Weiterleitung humoraler Signale und dem Abtransport von Stoffwechselendprodukten, kommen dem Gefäßsystem und insbesondere dem Endothel metabolischen Funktionen zu.

1.4 Das Ephrin/Eph-System

Eines der wichtigsten Ereignisse während der Entwicklung des vaskulären Systems ist die Entwicklung von Arterien und Venen. Über die molekularen Mechanismen der arteriovenösen Differenzierung ist jedoch bisher nur sehr wenig bekannt. Neuere Untersuchungen zeigen, dass arterielle und venöse Endothelzellen sich schon in den frühesten Entwicklungsstadien molekular unterscheiden. Das erste Beispiel eines arteriovenösen Differenzierungsmarkers ist das Expressionsmuster des Tyrosinkinase-Rezeptors EphB4, der überwiegend auf venösen Endothelzellen exprimiert wird, während sein Ligand Ephrin-B2, vorrangig auf arteriellen Endothelzellen exprimiert wird (Wang H. U. *et al.*, 1998; Gerety *et al.*, 1999).

Das Ephrin/Eph-System stellt die größte bekannte Familie von Rezeptortyrosinkinasen dar (Zhou, 1998). Dabei handelt es sich um zwei Untergruppen, die sich sowohl funktionell als auch strukturell unterscheiden. Bisher wurden 8 Mitglieder der EphA-Rezeptoren (A1-A8) identifiziert, die mit 5 Ephrin-A-Liganden interagieren. Von der zweiten Gruppe, den EphB-Rezeptoren, wurden bisher 6 Mitglieder identifiziert (B1-B6). Diese interagieren mit den Ephrinen-B1, -B2 und -B3. Die Eph's sind Rezeptortyrosinkinasen mit Spezifität für die Liganden der jeweiligen Gruppe (EphA binden Ephrine-A; EphB binden Ephrine-B). Die Gruppen sind durch spezifische Bindungskonstanten und Aktivierungsparameter gekennzeichnet. Durch temporär und spatial überlappende Expression der Bindungspartner können fein regulierte Gradienten entstehen, die vor allem in der Strukturausprägung und Differenzierung von Nerven und der Gehirnentwicklung intensiv untersucht wurden (Wilkinson, 2001). Die Liganden sind in der Membran verankert und können ein Signal in die ligandentragende Zelle transduzieren. Die Ephrin-A-Liganden sind über einen GPI-Anker an der Membran gebunden und benötigen für die Signalweitergabe Adaptormoleküle, die bisher noch nicht bekannt sind. Die Ephrin-B-Liganden sind durch eine membrandurchspannende Helix in der Membran verankert. Ihre zytoplasmatische Domäne enthält Tyrosinreste, die bei Aktivierung phosphoryliert werden (Palmer *et al.*, 2002). Allerdings fehlt auch den Ephrin-B-Liganden eine intrinsische Kinase-Domäne. Die Aktivierung aller Eph-Rezeptoren erfolgt nicht durch monomere lösliche Liganden. Sie erfordert vielmehr eine Zusammenlagerung (clustering) von mehreren Liganden. Die Anzahl der benötigten Liganden ist dabei von den Rezeptoren und den Liganden selbst abhängig. Experimentell wurden für die Aktivierung der Rezeptoren Ligand-Fc-Chimären hergestellt. Dabei handelt es sich um die jeweilige extrazelluläre Domäne des entsprechenden Ephrins, die mit dem Fc-Fragment eines Immunglobulins gekoppelt werden (Fc-Chimäre). Durch Bindung eines Antikörpers an den Fc-Teil der Ligand-Fc-Chimäre kann eine Multimerisierung und damit eine Aktivierung der

möglichen Rezeptoren induziert werden (Davis S. *et al.*, 1994). *In vivo* wird die Multimerisierung durch die Membranverankerung der Liganden ermöglicht. Das Ephrin/Eph-System kann daher ausschließlich Signale von einer Zelle zur anderen weitergeben, wenn diese in direktem Kontakt miteinander stehen. Schwerpunkt der Untersuchungen in dieser Arbeit bilden die für die arteriovenöse Differenzierung wichtigen EphB4 und Ephrin-B2.

Die Phänotypen der Ephrin-B2 und EphB4 „knock out“-Tiere sind vergleichbar (Wang H. U. *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 1999; Gerety *et al.*, 1999). Die Mäuseembryos sterben zwischen Tag 9.5 – 10 mit schweren Defekten in der Vaskularisierung und sowie mangelhafter Ausbildung von Trabekeln und Endokardkissen am Herzen. Während Ephrin-B2 neben endothelialen Zellen auch in anderen Zelltypen exprimiert wird, ist die Expression von EphB4 auf endotheliale Zellen beschränkt (Gerety *et al.*, 1999). EphB4 bildet unter den Eph-Rezeptortyrosinkinasen eine Ausnahme, da es ausschließlich Ephrin-B2 mit hoher Affinität bindet (Brambilla *et al.*, 1996). Sowohl EphB2, als auch EphB3 stellen Rezeptoren für Ephrin-B2 dar. Beide sind in Endothelzellen exprimiert. Im Gegensatz zu den EphB4-„knock out“-Tieren weisen EphB2- und EphB3-„knock out“-Mäuse keinen pathologischen Phänotyp auf. Ein Ausfall beider Rezeptoren bewirkt einen semiletalen Phänotyp (der 30% der Tiere betrifft). Diese Befunde unterstützen eine besondere *in vivo* Relevanz des Ligand-Rezeptorpaars Ephrin-B2/EphB4 bei der vaskulären Entwicklung. Während Ephrin-B2 im vaskulären System der Maus exklusiv auf arteriellen Endothelzellen exprimiert wird (Wang H. U. *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 1999), kann EphB4 vorrangig auf venösen Endothelzellen nachgewiesen werden.

Über die Expression des Ephrin-B2/EphB4-Systems in humanen Geweben, sowie die funktionelle Relevanz liegen bisher wenige Erkenntnisse vor. Darüber hinaus ist die Regulation des Ephrin/Eph-Systems durch biomechanische Kräfte in Endothelzellen nicht untersucht worden.

1.5 Das Angiopoietin/Tie-System

Parallel zu den VEGF-Rezeptoren wurden die Tie-Rezeptortyrosinkinasen Tie1 und Tie2 (auch Tek genannt) entdeckt (Sato *et al.*, 1993; Ziegler *et al.*, 1993). Obwohl sich die VEGF-Rezeptoren sich molekular von den Tie-Rezeptoren eindeutig unterscheiden, zeigen die Phänotypen der „knock out“-Modelle, dass VEGF-Rezeptoren und Tie-Rezeptoren für die normale Entwicklung der Blutgefäße essentiell sind (Dumont *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1995). Die Tie-Rezeptoren haben eine extrazelluläre Region mit zwei Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen, die durch drei Epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-ähnliche Cystein-Wiederholungen getrennt sind. Daran schließen sich drei Fibronectin Typ III-homologe Domänen an. Intrazellulär haben die Tie-Rezeptoren eine ähnliche Domänenstruktur, wie die VEGF-Rezeptoren. Beide Rezeptor-Familien bestehen intrazellulär aus zwei Tyrosinkinasedomänen, die jeweils durch einen kurzen Bereich von Aminosäuren („Kinase insert“) getrennt sind.

Die spezifischen Liganden des Tie2-Rezeptors sind eine neue Gruppe von Wachstumsfaktoren mit hoher Spezifität für das vaskuläre Endothel, die Angiopoietine. Die bisher bekannten vier Angiopoietine (Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Angiopoietin-3 und Angiopoietin-4) binden ausschließlich extrazellulär an den Tie2-Rezeptor. Der natürliche Agonist für den Tie1-Rezeptor konnte bisher nicht identifiziert werden. Ungewöhnlich ist dabei, dass die Angiopoietine entgegengesetzte Reaktionen in Endothelzellen hervorrufen. Angiopoietin-1 und Angiopoietin-4 wirken als aktivierende Liganden (Agonisten), während Angiopoietin-2 und Angiopoietin-3 spezifisch als blockierende Liganden (Antagonisten) wirken (Maisonpierre *et al.*, 1997).

Die Tie-Rezeptoren scheinen für das angiogene Remodeling und die Stabilisierung der Gefäße nach der initialen Vaskulogenese notwendig zu sein. Mausembryonen mit Defekten im Tie2-Signalweg sterben in der Embryonalentwicklung zwischen Tag 9.5 und 12.5 als Folge einer unzureichenden Erweiterung und Erhaltung des primären kapillären Plexus (Sato *et al.*, 1995). Dabei kommt es zu schweren Defekten durch eine unvollständige Entwicklung der Herzregion, mit Ablösung des Endokards von der myokardialen Wand und Abwesenheit von myokardialen Projektionen (Trabekeln). Zusätzlich wird eine hämorrhagische Vaskulatur mit geringer Anzahl an Begleitzellen und eine geringere Anzahl von Endothelzellen beobachtet. Bei Ausfall des Tie1-Rezeptors sterben die Embryonen wenig später in der Entwicklung Tag 13.5, aufgrund unvollständig entwickelter Gefäße. Die kardiale Entwicklung verläuft in diesen Embryonen jedoch normal. In den Gefäßen von Embryonen mit Tie2- oder Angiopoietin-1-Gen-Defekt sind zusätzlich die Verbindungen zwischen den

Endothelzellen und den benachbarten Zellen gestört (Suri *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu zeigen Angiopoietin-1-überexprimierende Mäuse größere und stärker verzweigte Gefäße, die eine hohe Resistenz gegenüber inflammatorischen und permeabilitätssteigernden Stimuli aufweisen (Thurston *et al.*, 1999).

Vermutlich handelt es sich bei dem Tie-Signalweg um einen zellautonomen Signalweg, der für das Überleben der Endothelzellen notwendig ist. Die geringere Rekrutierung periendothelialer Zellen scheint ein sekundärer Effekt zu sein. Dafür spricht die Beobachtung, dass ein konditionaler „knock out“ des Tie2-Gens zu einer erhöhten Endothelzellapoptose führt und der Tie2-Rezeptor auch in adulten Endothelzellen exprimiert und phosphoryliert ist (Wong *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2001).

Das Angiopoietin/Tie-System spielt offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung und Destabilisierung von Gefäßen. Während Angiopoietin-1 durch die Aktivierung von Tie2 stabilisierend auf die Gefäße wirkt, kommt es durch die Bindung von Angiopoietin-2 zu einer Destabilisierung, mit möglicher Gefäßsprossung. In Abwesenheit von weiteren angiogenen Faktoren kommt es durch Angiopoietin-2 dagegen zu einer Regression von Gefäßen. Diese Bedeutung von Angiopoietin-2 wird durch seine Expression in Bereichen aktiven Gefäßumbaus und in stark vaskularisierten Tumoren untersetzt (Stratmann *et al.*, 1998; Holash *et al.*, 1999; Zagzag *et al.*, 1999).

Die Angiopoietine sind lösliche Liganden mit einer rezeptorbindenden, fibrinogen-ähnlichen und einer „coiled-coil“-Domäne, die die Multimerisierung der Liganden ermöglicht (Procopio *et al.*, 1999). Für das humane Angiopoietin-1 sind bisher drei unterschiedliche gespleißte Isoformen nachgewiesen worden (Huang *et al.*, 2000). Das humane Angiopoietin-2 hat zwei Isoformen. Das in der Maus identifizierte Angiopoietin-3 ist das orthologe Protein zum humanen Angiopoietin-4. Viele Rezeptortyrosinkinasen werden durch die Bindung ihrer multimerisierten Liganden aktiviert. Die unterschiedlichen Potenz zur Multimerbildung, könnte die unterschiedliche Wirkung von Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 auf den Tie2-Rezeptor erklären (Procopio *et al.*, 1999).

Die Regulation der Expression des Angiopoietin/Tie-Systems durch biomechanische Kräfte ist in humanen Endothelzellen bisher nicht untersucht worden.

Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung der Expression des Ephrin/Eph- und des Angiopoietin/Tie-Systems durch Schubspannung in humanen Endothelzellen. Darüber hinaus wurden erste Experimente zur Aufklärung der zugrunde liegenden Signaltransduktionsmechanismen durchgeführt.