

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Teil die Regulation von vasoaktiven Peptiden durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, im zweiten Teil die Regulation von Mediatoren der Gefäßbildung durch biomechanische Kräfte untersucht.

4.1 Regulation von vasoaktiven Peptiden durch kardiovaskuläre Risikofaktoren

Den ersten Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet die Untersuchung potentieller Wechselwirkungen zwischen dem Renin-Angiotensin-System (RAS) und dem Endothelin-System. Die ppET-1-mRNA-Expression und die ET-1-Peptid-Freisetzung wird durch zahlreiche Stimuli reguliert. Dabei wird in der Mehrzahl der Untersuchungen die Endothelin-1-Expression bzw. -Sekretion durch vasoaktive Substanzen, z.B. Angiotensin II, sowie durch Thrombin in Endothelzellen gesteigert (Yanagisawa *et al.*, 1988; Emori *et al.*, 1989; Kohno *et al.*, 1991). In anderen Untersuchungen wird eine Steigerung der Endothelin-Bildung durch Hypoxie bzw. Kälberserum, jedoch nicht durch Angiotensin II beschrieben (Hieda *et al.*, 1990; Yoshida *et al.*, 1992). Dabei finden Yoshida und Mitarbeiter, obwohl Angiotensin II in unterschiedlichen Konzentrationen keinen Einfluss auf die ET-1-Sekretion hat, dass Hemmer des Angiotensin-Konvertierungs-Enzyms die Induktion der Sekretion durch Kälberserum verhindern können. Die Regulation der Expression von Isoformen des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms (ECE) durch Angiotensin II in humanen Endothelzellen wurde bisher nicht untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Expression der ECE-1-Isoformen in Primärkulturen von humanen Endothelzellen durch Angiotensin II auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten nicht signifikant reguliert wird. Eine Modifikation des Versuchsprotokolls mit Endothelzellmedium bei verringertem Serumanteil (0,5% Serum) und langfristiger Inkubation (24 Stunden) mit Angiotensin II in unterschiedlichen Konzentrationen hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die ET-1-Sekretion. Überraschenderweise wurde die ET-1-Sekretion durch geringere Angiotensin-Konzentrationen tendenziell erhöht, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Darüber hinaus wurden humane Endothelzellen aus der Koronararterie als zusätzliches Zellkulturmodell etabliert. Die Zellen wurden mit Angiotensin II behandelt und die Expression des Endothelin-Systems untersucht. Es wurde keine Regulation des Endothelin-Systems (ECE-1, ppET-1, ETB-Rezeptor) durch eine chronische Inkubation mit Angiotensin II nachgewiesen. Da eine Vielzahl von Mediatoren die Expression von Komponenten des Endothelin-Systems reguliert, sind möglicherweise in *in vivo*-Untersuchungen synergistische Effekte zu beobachten. So kann beispielsweise oxidiertes Low-Density-Lipoprotein die Expression des Angiotensin-Rezeptors 1 steigern (Nickenig *et*

al., 1997) und damit die Wirkung von Angiotensin II potenzieren. Endothelzellen exprimieren Angiotensin-Rezeptoren im Verhältnis 2 (Angiotensin-Rezeptor 1) : 1 (Angiotensin-Rezeptor 2) (Li *et al.*, 1999). Möglicherweise werden die Angiotensin-Rezeptoren (insbesondere AT₁, der für die Mehrzahl der pathophysiologisch relevanten Angiotensin II-Wirkungen verantwortlich ist, in unseren kultivierten Zellen nicht in ausreichender Zahl exprimiert. Obwohl der AT₁-Rezeptor in unseren Endothelzellpräparationen auf mRNA-Ebene nachweisbar ist (Dürschmidt, persönliche Mitteilung), konnte nach Angiotensin II-Inkubation in Zusammenarbeit mit Dr. Pönicke, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, keine Inositolphosphat-Bildung nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass die bereits von anderen Autoren beschriebene gefäß-, präparations- und passagenabhängige Expression des AT₁-Rezeptors die wahrscheinlichste Erklärung für die variable Antwort kultivierter Endothelzellen auf Angiotensin II ist (Ko *et al.*, 1997). In tierexperimentellen Studien *in vivo* erhöht Angiotensin II dagegen die vaskuläre und renale ET-1-Bildung und die ECE-1-Aktivität (Barton *et al.*, 1997b). Möglicherweise sind dafür auch Effekte verantwortlich, die durch glatte Muskelzellen oder andere Zelltypen *in vivo* vermittelt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass der kardiovaskuläre Risikofaktor Adipositas das gewebsständige Renin-Angiotensin-Systems (RAS) aktiviert. Dabei wird das RAS selektiv in nicht adipösem Gewebe der Niere unabhängig von morphologischen Veränderungen und Blutdruck aktiviert. Obwohl die Langzeitblockade des Endothelin-Rezeptors Typ A (ET_A-Rezeptor) keinen Effekt auf das Körpergewicht oder die renalen Endothelin-1-Gewebe-Spiegel hatte, wurde durch Behandlung mit dem ET_A-Rezeptorblocker LU135252 die Aktivierung des Angiotensin-Konvertierungs-Enzyms (ACE) vollständig verhindert. Dies deutet auf eine Rolle des ET_A-Rezeptors bei der ACE Regulation hin. Zusätzlich war die kontraktile Antwort auf Angiotensin II, die durch Zyklooxygenase-abhängige Vasokonstriktoren vermittelt wird, in der Aorta von adipösen C57BL/J6-Mäusen selektiv erhöht. ET_A-Rezeptorblockade als Langzeitbehandlung normalisierte die gesteigerte kontraktile Antwort auf Angiotensin II, was eine Rolle von Endothelin-1 in der Modulation von Prostanoid-vermittelten Kontraktionen nahe legt.

Der Mechanismus der Erhöhung des kardiovaskulären Risikos durch Adipositas ist wahrscheinlich multifaktoriell bedingt (Krauss *et al.*, 1998). Adipositas ist mit Änderungen des Glukose- und Lipid-Stoffwechsels verbunden (Weidmann *et al.*, 1993), beeinträchtigt die endothelabhängige Gefäß- (Steinberg *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1998) und Nierenfunktion (Corcoran *et al.*, 1989). In Mäusen mit Angiotensin II-vermittelter Hypertonie

kommt es zu Glomerulosklerose und vaskulärer Hypertrophie (Kai *et al.*, 1998; Nishijo *et al.*, 1999). In den Untersuchungen in Zusammenarbeit mit PD Dr. Barton, Universität Zürich, wurde gezeigt, dass die renale ACE-Aktivität durch Übergewicht erhöht war. Es kam dabei zu keinen nachweisbaren strukturellen Veränderungen der Niere oder der Gefäße. Dieses unterstützt die Möglichkeit eines druckunabhängigen Mechanismus. Die organspezifische Aktivierung von ACE könnte die Zellproliferation und Vasokonstriktion (Dzau, 1986) direkt durch vermehrte Bildung von Angiotensin II oder indirekt durch Aktivierung von Endothelin-1 bewirken. Für beide Agonisten wurde ein Einfluss auf Nierenkrankheiten (Kai *et al.*, 1998; Barton *et al.*, 2000c) und vaskuläre Hypertrophie (Moreau *et al.*, 1997; Nishijo *et al.*, 1999) gezeigt. Außerdem könnte die erhöhte ACE-Aktivität zur adipositasassoziierten verringerten Nierenfunktion ohne strukturelle Manifestation beitragen (Fiske *et al.*, 1986). Weshalb die ACE-Aktivierung nur in der Niere, jedoch nicht in der Lunge der adipösen Mäuse erfolgt, ist nicht geklärt. Die Lunge ist sehr reich an gewebständigem ACE (Barnes *et al.*, 1995). Möglicherweise haben dabei der höhere Sauerstoffpartialdruck in der Lunge und der geringere Blutdruck in der pulmonalen Zirkulation einen Einfluss. Interessanterweise verhindert eine längerfristige Behandlung mit einem ET_A-Rezeptor-Antagonisten die Aktivierung des renalen Gewebs-ACE vollständig. Dies erfolgte nicht auf transkriptioneller Ebene, da die ACE-mRNA-Expression durch ET_A-Rezeptorblockade nicht verändert wurde. Auch das Körpergewicht und die renalen Endothelin-1-Gewebespiegel waren nicht involviert. Da die ET_A-Rezeptorblockade die ACE-Aktivität nicht in der Lunge und der Leber veränderte, sprechen diese Daten für eine gewebespezifische und blutdruckunabhängige Regulation der ACE-Aktivität durch Endothelin-1 *in vivo*. Die ET_A-Rezeptor-vermittelte Modulation der ACE-Aktivität könnte beispielsweise posttranslationale oder funktionelle Modifikationen des ACE-Proteins oder seiner Stabilität beinhalten.

In der Pathogenese des Adipositas-assoziierten Bluthochdrucks wird eine Rolle des Endothelin-1 diskutiert (Parrinello *et al.*, 1996; Tired *et al.*, 1999). So wird in adipösen Patienten eine beeinträchtigte Endothelfunktion beschrieben (Steinberg *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1998). Für Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) wie ACE und Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT₁-Rezeptor) konnte gezeigt werden, dass sie zu ernährungsbedingten Änderungen in der endothelialen Funktion beitragen (Wilmink *et al.*, 1999). Da sich die vaskuläre Dysfunktion gefäßspezifisch ausprägen kann (Barton *et al.*, 1997a), wurden zwei unterschiedliche Gefäßtypen der Mäuse untersucht. Angiotensin II induzierte Kontraktionen in der Aorta und der Karotis, die größtenteils durch Indometacin bzw. Thromboxan A₂-Rezeptor-Antagonisten blockiert werden konnten. Dabei zeigte sich

kein Unterschied zwischen Gefäßen von Kontrolltieren und adipösen Tieren. Dies deutet daraufhin, dass Angiotensin II-induzierte Kontraktionen die Freisetzung vasokonstriktorischer Prostanoiden zur Folge hat. Daneben wurde postuliert, dass neben Angiotensin II weitere Mediatoren an der Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion beteiligt sein könnten (Takai *et al.*, 1998; Takai *et al.*, 1999). Nur in der Aorta der adipösen Mäuse wurde die kontraktile Antwort auf Angiotensin II erheblich gesteigert und durch ET_A-Rezeptorblockade vollständig verhindert. Offensichtlich beeinflusst Adipositas spezifisch die Kontraktilität nach Angiotensin II-Gabe durch eine ET_A-Rezeptor mediierte Komponente. Dabei ist diese Änderung unabhängig vom Cholesteringehalt der Gewebe und der Endothelin-Rezeptorbindungskapazität. Im Gewebe der Aorta war der ET-1-Gehalt nach ET_A-Rezeptorblockade verringert. Endothelin-1 könnte im Gewebe zur erhöhten Prostanoid-mediierten vaskulären Kontraktilität *in vivo* beitragen. Dies wurde bereits in der Nierenarterie von Dahl-Ratten gezeigt (Barton *et al.*, 2000c). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde eine Rolle von Endothelin-1 bei der Vermittlung der Freisetzung von vasokonstriktorisches Prostanoiden *in vitro* gezeigt (Moreau *et al.*, 1996; Zaugg *et al.*, 1996). Die Gesamt-Cholesterin- und Triglycerid-Spiegel waren bei allen Tieren innerhalb der Normwerte. Adipositas bewirkte einen 60fachen Anstieg des LDL-Cholesterins und eine Verdreifachung des HDL-Cholesterin-Spiegels. Veränderungen im Lipidprofil wurden auch in adipösen Patienten beobachtet (Weidmann *et al.*, 1993; Riches *et al.*, 1999). Niedrige HDL-Cholesterin- im Verhältnis zu hohen LDL-Cholesterin-Spiegeln sind mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko assoziiert (Scandinavian *et al.*, 1994). In unseren Untersuchungen erhöhte ET_A-Rezeptor-Blockade unabhängig von Körpergewicht die Plasma-HDL-Cholesterin-Spiegel in adipösen Mäusen. Damit könnten diese Medikamente ein neues kardioprotektives Potential in adipositas-assoziierten Krankheiten darstellen.

Damit konnte gezeigt werden, dass Adipositas in Mäusen zu einer gewebespezifischen Aktivierung des renalen und vaskulären RAS führt. Dabei hat ET_A-Rezeptorblockade keinen Einfluss auf die Adipositas, kann aber die Aktivierung des RAS in den spezifischen Geweben vollständig verhindern. Die Regulation des RAS durch Endothelin könnte somit zum organprotektiven Potenzial von Endothelin-Rezeptor-Antagonisten beitragen.

Erhöhtes Alter stellt einen weiteren wichtigen kardiovaskulären Risikofaktor dar. In einem weiteren Projekt dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob der physiologische Alterungsprozess mit einer erhöhten Expression von Endothelin-1 verbunden ist. Eine erhöhte Präproendothelin-1-Expression konnte *in vivo* in intakten Arterien und der Niere

blutdruckunabhängig nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die iNOS- und eNOS-mRNA-Expression in Arterien von Tieren höheren Alters induziert ist.

In Hypertonie-induzierter vaskulärer und renaler Hypertrophie sowie bei der Progression der Arteriosklerose wird bei druckunabhängigen Mechanismen dem Endothelin-1 eine wichtige Rolle zugesprochen (Hochoer *et al.*, 1997; Moreau *et al.*, 1997; Barton *et al.*, 1998). So wurde vaskuläre Hypertrophie von intrarenalen Arterien und Glomerulosklerose in alten Tieren mit normalem Blutdruck beobachtet (K. Amann, unpublizierte Beobachtung). Ähnliche Effekte werden in normotensiven ppET-1-transgenen Tieren beschrieben (Hochoer *et al.*, 1997). Die altersabhängige transkriptionelle Aktivierung von Präproendothelin-1 in den Gefäßen könnte zu erhöhter Endothelin-1-Proteinsynthese und erhöhten Endothelin-1-Plasmaspiegel beitragen. Diese sind in Ratten höheren Alters beschrieben worden (Barton *et al.*, 1997a). Die basale Endothelin-1-Proteinexpression ist dabei in unterschiedlichen Gefäßen differentiell exprimiert, welches frühere Beobachtungen in hypertensiven Ratten erweitert (Barton *et al.*, 1997b). Die gefäßspezifische Expression von Endothelin-1 bleibt während der physiologischen Alterung erhalten.

Der Mechanismus, der die altersbedingte Induktion von Endothelin-1 vermittelt, ist nicht bekannt. Die Endothelin-1-Expression wird durch eine Reihe vasoaktiver Substanzen reguliert, die auch durch den Alterungsprozess beeinflusst werden. Zu diesen Faktoren gehören Angiotensin II (Imai *et al.*, 1992), transformierender Wachstumsfaktor (TGF- β 1) (Hahn *et al.*, 1990), reduzierte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) (Boulanger *et al.*, 1990; Barton *et al.*, 1997a) oder Östrogen (Morey *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist Alterung mit einer Steigerung der lokalen Spiegel freier Sauerstoffradikale (Ruiz-Torres *et al.*, 1997; Gwinner *et al.*, 1998; Reckelhoff *et al.*, 1998) verbunden. Reaktive Sauerstoffspezies könnten die Bildung von Endothelin-1 stimulieren (Gabriel *et al.*, 1998), wahrscheinlich durch transkriptionelle Aktivierung des Präproendothelin-1-Promotors (Kahler *et al.*, 2000). Vermutlich ist eine Kombination der genannten Faktoren für die gezeigte altersabhängige Induktion der Endothelin-1-Synthese verantwortlich.

In weiteren Untersuchungen wurde in der Ratten-Aorta eine altersabhängig erhöhte mRNA-Expression von iNOS und eNOS gezeigt. Dies ist ein Widerspruch zu einer vorhergehenden Studie mit 33 Monate alten weiblichen Ratten in denen eine Reduktion der eNOS-mRNA sowie der NO-Bioverfügbarkeit in Aorten-Endothelzellen gezeigt wurde (Tschudi *et al.*, 1996; Barton *et al.*, 1997a). Unsere Befunde einer erhöhten eNOS-Expression in 24 Monate alten männlichen Ratten stimmt dagegen mit der erhöhten eNOS-Proteinexpression in der Aorta von 18 Monate alten Wistar-Ratten überein (Cernadas *et al.*, 1998). Der Unterschied in

diesen Untersuchungen ist nicht klar. Mögliche Ursachen könnten unterschiedliches Geschlecht, Spezies oder Gewebezusammensetzungen (z.B. Gewebe der intakten Aorta im Gegensatz zu aus der Aorta isolierte Endothelzellen) beruhen. Zusätzlich waren die früher untersuchten weiblichen Tiere wesentlich älter. Da auch eine Abnahme der eNOS-Expression in der Aorta alter WAG/Rij-Ratten beschrieben wurde (Challah *et al.*, 1997), könnte die eNOS-Expression auch im erhöhten Alter noch signifikanten Änderungen unterliegt. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass eine Erhöhung der eNOS-Expression nicht zwingend auch zu einer Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit führt, da eine entkoppelte eNOS auch Superoxidanionen generieren kann (Wever *et al.*, 1997; Vasquez-Vivar *et al.*, 1998; Wang W. *et al.*, 2000). Diese können durch Bildung von Peroxynitrit Stickstoffmonoxid inaktivieren. Zusätzlich konnte eine erhöhte Expression der iNOS in intakten Arterien von alten Ratten nachgewiesen werden. Möglicherweise ist dieses Enzym in alternden Arterien konstitutiv exprimiert. Die iNOS fördert die Arteriosklerosebildung und stört die endothelabhängige Gefäßfunktion (Verbeuren *et al.*, 1993; Kessler *et al.*, 1997; Behr-Roussel *et al.*, 2000; Detmers *et al.*, 2000). Das Enzym scheint in diese pathologischen Veränderungen bei älteren Menschen und Tieren involviert zu sein (Zeiger *et al.*, 1993; Barton *et al.*, 1997a). Inwieweit die erhöhte iNOS-Expression in alten Tieren auf chronischen Entzündungsreaktionen oder anderen Mechanismen beruht, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

In einer weiteren tierexperimentellen Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit wurden EPO transgenen Mäusen, die unabhängig von Sauerstoff eine exzessive Erythrozytose (Hämatokritwerte von 80%) ausbilden, untersucht. Die Tiere entwickeln trotz der hohen Hämatokritwerte weder Bluthochdruck noch erleiden sie thromboembolische Komplikationen. Der Grund hierfür ist in einer erhöhten Bioverfügbarkeit von NO (Ruschitzka *et al.*, 2000) zu sehen. Interessanterweise konnten wir nachweisen, dass in diesen Tieren ebenfalls das Endothelin-System aktiviert ist. Die Gabe von NO-Synthase-Inhibitoren führte zum Tod der Tiere nach zwei Tagen. Diese NOS-Inhibitor-vermittelte Mortalität konnte durch gleichzeitige Blockade des ET_A-Rezeptors verzögert werden.

Die Regulation des Endothelin-Systems durch Schubspannung wird kontrovers diskutiert, da sowohl Aktivierung als auch Herabregulation *in vitro* gefunden wurde (Morawietz *et al.*, 2000b, Malek, 1999 #235). Aufgrund der verstärkten NO-Bildung und der negativen Rückkopplung auf die Endothelin-Biosynthese (Boulanger *et al.*, 1990) hätten man reduzierte Endothelin-1-Spiegel in den Tieren mit erhöhtem Hämatokrit erwartet. Darüber hinaus ist bekannt, dass verringerte Sauerstoffverfügbarkeit den Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 α (HIF-

1 α) stabilisiert (Hofer *et al.*, 2002), der wiederum die Endothelin-1-Transkription erhöht (Hu J. *et al.*, 1998; Camenisch *et al.*, 2002). Da Erythrozytose die Sauerstofftransportkapazität des Blutes erhöht und damit die HIF-1 α Spiegel verringert, sollte man ebenfalls eine reduzierte Endothelin-1-Expression erwarten. Möglicherweise führt die exzessive Erythrozytose in diesen Tieren zu einer verringerten Sauerstoffversorgung in den Geweben, da die hohe Zelldichte in den Kapillaren die Erythrozyten an der Sauerstoffabgabe in die Gewebe hindern könnte. Somit könnte es lokal zur Hypoxie und lokal gesteigerter Endothelin-Expression kommen. Überraschenderweise fanden wir eine gesteigerte ET-1-Promotoraktivität und -gewebespiegel, die auf eine langfristige Aktivierung des Endothelin-System durch exzessive Erythrozytose *in vivo* deuten. Parallel zur gesteigerten Endothelin-Synthese kommt es zur Erhöhung der Expression beider Endothelin-Rezeptoren. Dabei ist interessant, dass die ET_B-Rezeptor-mRNA-Expression, die mit der NO-Produktion in Endothelzellen verknüpft ist (Hirata *et al.*, 1993), stärker als die ET_A-Expression erhöht ist. Dies mag auch mit der Funktion des ET_B-Rezeptors als pulmonaler Clearance-Rezeptor, gerade bei gesteigerten ET-1-Spiegeln (Fukuroda *et al.*, 1994) zusammenhängen. Entgegen der erhöhten Expression des ET_A-Rezeptors, war die kontraktile Antwort von Aortenringe auf ET-1 *in vitro* verringert. Die kontraktile Antwort auf ET-1 durch Vorinkubation mit NO-Synthase Inhibitoren war nur in den Aortenringen von transgenen Mäusen erhöht. Dies zeigt, dass *in vivo* die ET-1-Wirkung durch NO moduliert wird. Die Überlebensrate war in transgenen Tieren nach Gabe eines ET_A-Inhibitors auf die NO-Blockade durch L-NAME verdoppelt. Dies zeigt den Einfluss des aktivierten Endothelin-Systems und ist in Übereinstimmung mit der gezeigten Blutdruckerhöhung aufgrund verstärkter peripherer Vasokonstriktion nach Gabe von L-NAME *in vivo* (Ruschitzka *et al.*, 2000). Da selektive ET_A-Rezeptorantagonisten den positiven Effekt der NO-Freisetzung des ET_B-Rezeptors unbeeinflusst lassen, deuten diese Ergebnisse auf einen möglichen therapeutische Nutzen von selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten bei exzessiver Erythrozytose gerade im Kontext der endothelialen Dysfunktion.

Zusammenfassend konnte in dieser Untersuchung gezeigt werden, dass trotz erhöhter NO-Bioverfügbarkeit bei exzessiver Erythrozytose das Endothelin-System aktiviert ist. Da die Behandlung mit einem selektiven ET_A-Rezeptorantagonisten das Überleben nach akuter NO-Blockade verlängerte, könnten therapeutische Modifikationen des Endothelin-Systems eine neue Möglichkeit in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, die mit Erythrozytose verbunden sind, darstellen.

In weiteren Untersuchungen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die hämodynamische Entlastung von Patienten mit Herzinsuffizienz durch ventrikuläre Assist-Systeme (VAD) zu einer Normalisierung der erhöhten ET_A-Rezeptor-Expression führt. Dabei sind die Daten einer erhöhten ET_A-Rezeptor-Expression im insuffizienten linken Myokard in Übereinstimmung mit Arbeiten, die eine Induktion von ET_A-spezifischen Rezeptorbindungsstellen in Patienten mit Herzinsuffizienz beschreiben (Pieske *et al.*, 1999; Zolk *et al.*, 1999). Für das Myokard des linken Ventrikels wurde gezeigt, dass nur der ET_A-Rezeptor von funktioneller Bedeutung ist (Ponicke *et al.*, 1998). Diese Daten unterstützen nicht nur die Bedeutung des kardialen Endothelin-Systems bei der Herzinsuffizienz, sondern zeigen weiterhin, dass eine mechanische Entlastung des humanen linken Ventrikels von Patienten mit Herzinsuffizienz durch VAD die gesteigerte Expression von Komponenten des Endothelin-Systems *in vivo* verringert. Endothelin-1 stimuliert über den ET_A-Rezeptor Hypertrophie, Kontraktilität, Proteinbiosynthese und Hydrolyse von Phosphatidylinositol in Kardiomyozyten (Suzuki *et al.*, 1990; Sugden *et al.*, 1993; Zeiher *et al.*, 1993; Barton *et al.*, 1997a). In experimentellen Studien wurde durch chronische Endothelin-Rezeptorblockade die kardiale Funktion verbessert, die Progression der Ventrikeldilatation vermindert (Fraccarollo *et al.*, 1997) und die Mortalitätsrate in einem Infarktmodell gesenkt (Sakai *et al.*, 1996). In hypertensiven Ratten verringerte chronische ET_A-Rezeptorblockade die Hypertrophie des linken Ventrikels unabhängig vom Blutdruck (Ehmke *et al.*, 1999). Die gefundene erhöhte Expression des ET_A-Rezeptors im insuffizienten Myokard könnte einen neuen Ansatzpunkt für die Behandlung der Herzinsuffizienz mittels ET_A-Rezeptorantagonisten darstellen. In den untersuchten Patienten konnte dabei kein Effekt durch die Behandlung mit ACE-Hemmern, der aktuellen Standardtherapie, auf die gesteigerte ET_A-Rezeptor-Expression gefunden werden. Aufgrund des geringen zur Verfügung stehenden Materials konnte die ET_A-Rezeptor-Expression nur auf mRNA Ebene quantifiziert werden. Daher kann nicht detailliert untersucht werden, ob die gesteigerte ET_A-Rezeptor-Expression auf einer Steigerung der Expression in Myozyten oder anderen im Homogenat vorhandenen Zelltypen (z.B.: Endothelzellen, glatte Muskelzellen oder Fibroblasten) beruht. Endothelzellen exprimieren jedoch nur den ET_B-Rezeptor (Heinroth-Hoffmann *et al.*, 1998). Die Anzahl der Endothelin-Rezeptoren auf glatten Muskelzellen und Fibroblasten übersteigt nicht ihre Zahl auf Myozyten. Außerdem wurde eine erhöhte ET_A-Rezeptordichte im insuffizienten Myokard beschrieben (Pieske *et al.*, 1999). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die erhöhte ET_A-Rezeptor-mRNA-Expression eine erhöhte ET_A-Rezeptor-Proteinexpression und -Funktion in den Myozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz widerspiegelt.

Die durch VAD normalisierte ET_A-Rezeptor-Expression könnte eine Konsequenz der teilweisen Erholung des insuffizienten Myokards durch hämodynamische Entlastung darstellen. Als kritischer Faktor für die Progression der Herzinsuffizienz wird die Dehnung der Myozyten durch die Überlast angesehen. Die VAD-Implantation führte wahrscheinlich zu einer Verbesserung der kardialen Funktion und des kritischen hämodynamischen Status vor der Implantation. Die angenommenen Verbesserungen konnten nicht exakt quantifiziert werden, da ein zeitweiliges Abschalten des VAD für den Zeitraum der Messung hämodynamischer Parameter ein zu großes Risiko für die Patienten bedeutet hätte. Jedoch zeigt die Abnahme des pulmonalen Kapillardrucks und die Erhöhung des Herzindex eine teilweise Verbesserung infolge mechanischer Entlastung durch VAD (Daten vorliegend für 4 von 10 Patienten kurz vor der Herztransplantation durch Lungenkatheter oder durch transthorakale Echokardiographie bestimmt). Überdies konnte keine Änderung in der Expression von Indikatoren für die Einwanderung inflammatorischer Zellen während der Zeit mit VAD im Myokard des linken Ventrikels der Patienten festgestellt werden (Bartling *et al.*, 1999).

Die Expression des ET_B-Rezeptors war im insuffizienten Myokard von Patienten mit oder ohne ACE-Inhibitor-Therapie nicht verändert. ET_B-Rezeptorbindungsstudien im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz sind in der Literatur widersprüchlich. Während eine Gruppe eine Herabregulation der ET_B-Bindungsstellen beschreibt (Zolk *et al.*, 1999), finden zwei weitere Gruppen in ihren Untersuchungen keine Unterschiede in der Anzahl der ET_B-Bindungsstellen im insuffizienten humanen Myokard (Ponicke *et al.*, 1998; Pieske *et al.*, 1999). Die letztgenannten Befunde würden unsere mRNA-Expressionsdaten unterstützen. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auch Unterschiede in den untersuchten Patientenpopulationen dokumentieren. Die mechanische Entlastung durch VAD beeinflusst die ET_B-Expression nicht. Dieses Ergebnis unterstützt die Bedeutung der beobachteten Normalisierung der gesteigerten ET_A-Expression durch VAD.

Die gesteigerte ECE-1-Expression in Myokard des linken Ventrikels von Patienten mit Herzinsuffizienz deutet auf eine mögliche neue Strategie in der Behandlung der Herzinsuffizienz durch ECE-Inhibition hin. Diese Regulation wurde nicht nur im Myokard des linken Ventrikels, sondern auch im Vorhofmyokard von Patienten mit Herzinsuffizienz gefunden. Die lokal erhöhte ECE-1-Expression im insuffizienten Myokard könnte eine erhöhte lokale ET-1 Synthese in den Kardiomyozyten sowie eine erhöhte proteolytische Spaltung von systemisch erhöhtem BigET-1 in Patienten mit Herzinsuffizienz bewirken. Die gemessenen ET-1-Gewebespiegel deuten auf eine erhöhte lokale ET-1-Synthese im

insuffizienten Myokard hin. Interessanterweise wird die erhöhte ECE-1-Expression im insuffizienten humanen Myokard durch ACE-Inhibitor-Therapie teilweise normalisiert. Diese Daten deuten auf einen zusätzlichen positiven Effekt dieser Therapie hin. Trotzdem war die ECE-1-Expression auch in Patienten mit ACE-Inhibitor-Therapie noch leicht erhöht, was eine mögliche weitere positive Beeinflussung der Herzinsuffizienz durch eine ECE-Inhibitor-Therapie unterstützt. Der Effekt der Therapie könnte auch die Unterschiede zu anderen Untersuchungen erklären, die keine signifikanten Veränderungen in der ECE-1-Expression im insuffizienten humanen Myokard des linken Ventrikels nachweisen konnten (Zolk *et al.*, 1999). Die myokardiale ECE-1-Expression wurde durch mechanische Entlastung mit VAD nicht beeinflusst. Die reduzierte ET_A-Expression wird damit nicht durch eine geänderte ECE-1-Expression im Myokard von Patienten mit VAD-Unterstützung aufgehoben. Dies verstärkt den positiven Effekt der Normalisierung der ET_A-Rezeptor-Expression zusätzlich.

4.2 Regulation von Mediatoren der Gefäßbildung durch biomechanische Kräfte

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation von Mediatoren der Gefäßbildung und -differenzierung durch biomechanische Kräfte untersucht. Den Schwerpunkt bildete dabei die Regulation des Ephrin/Eph- und des Angiopoietin/Tie-Systems durch Schubspannung in venösen und arteriellen Endothelzellen.

Die bisherigen Erkenntnisse zur Expression des Ephrin/Eph-Systems basieren fast ausschließlich auf Untersuchungen im Maus-Embryo. Daher wurden zunächst Methoden entwickelt, um die Expression von Ephrin-B2 und EphB4 in humanen Endothel- und glatten Muskelzellen vergleichend zu quantifizieren. Die *real time*-PCR erwies sich dabei als praktikable Methode zur mRNA-Quantifizierung. Ephrin-B2 ist in Endothelzellen aus Nabelschnurarterien (HUAEC) höher exprimiert, als in Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC). Dies ist in prinzipieller Übereinstimmung mit den Befunden im Maus-Embryo (Gerety *et al.*, 1999). Die dort beschriebene exklusive Expression von Ephrin-B2 in embryonalen arteriellen Endothelzellen konnte jedoch in unseren humanen Endothelzellen, insbesondere den vergleichend analysierten Endothelzellen aus Koronararterien, nicht verifiziert werden. Dies könnte entwicklungs- oder speziesspezifisch determiniert sein. Eine veränderte Expression unter Kulturbedingungen ist eher unwahrscheinlich, da auch in frisch isolierten Endothelzellen ohne anschließende Kultivierung und durch *in situ*-Hybridisierung Ephrin-B2 in Endothelzellen arterieller und venöser Gefäße nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise wird Ephrin-B2 deutlich höher in Endothel-, als in glatten Muskelzellen

exprimiert. Dies könnte eine Rolle bei der Differenzierung und Migration dieser Zelltypen im Rahmen der Gefäßbildung bzw. des Remodeling spielen. Durch *in situ*-Hybridisierung konnte Ephrin-B2 in den Endothelzellen von Nabelschnurvenen und -arterien, der Aorta sowie in Kapillargefäßen des linken und rechten Ventrikels nachgewiesen werden. Auch in diesen Untersuchungen war Ephrin-B2 nicht in den benachbarten glatten Muskelzellen signifikant exprimiert. Dies unterstützt unsere *in vitro*-Befunde zur Ephrin-B2-Expression *in vivo*. Der im Maus-Embryo präferentiell venös exprimierte EphB4-Rezeptor war in allen untersuchten Endothel- und glatten Muskelzellen auf deutlich niedrigerem Niveau auf mRNA-Ebene nachweisbar. Auch hier war keine eindeutige differentielle Expression auf arteriellen bzw. venösen Endothelzellen erkennbar. Unsere Befunde deuten daraufhin, dass die vorrangige Expression von Ephrin-B2 auf arteriellen und von EphB4 auf venösen Endothelzellen in der Embryonalentwicklung bei der Vaskulogenese bzw. Angiogenese eine wichtige Rolle spielt, im adulten Gewebe aber nur bedingt erhalten bleibt.

Um erste Rückschlüsse auf die funktionelle Relevanz von Ephrin-B2 und EphB4 für die Adhäsion bzw. Proliferation von Endothelzellen zu erhalten, wurden HUVEC auf Zellkulturschalen mit Fc-Chimären-Beschichtung untersucht. Sowohl Ephrin-B2 als auch EphB4 zeigten dabei konzentrationsabhängig deutlich repulsive Eigenschaften. Auch die Migration bzw. das Einwachsen von HUVEC aus benachbarten unbeschichteten Bereichen war deutlich eingeschränkt. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit den repulsiven Eigenschaften von Ephrin-Liganden und Eph-Rezeptoren in der Differenzierung von Nervenzellen (Zhou, 1998). Dabei scheinen die Proteine der Ephrin/Eph-Familie die räumliche Verteilung von Zellen in sich entwickelnden Gewebe bzw. Embryo zu steuern.

In weitergehenden Studien wurde die Regulation von Ephrin-B2 und EphB4 durch laminare Schubspannung in Endothelzellen untersucht. Die Ephrin-B2-mRNA wird zeit- und dosisabhängig durch laminare Schubspannung auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen in venösen Endothelzellen (HUVEC) herabreguliert. Die Herabregulation von Ephrin-B2 durch chronische arterielle Schubspannung ist vor der initial postulierten präferentiellen Expression von Ephrin-B2 in arteriellen Endothelzellen überraschend. In den bereits dargestellten *in vivo*-Untersuchungen in Gewebeschnitten konnte jedoch diese präferentielle Ephrin-B2 Expression in Maus-Embryonen im humanen Gewebe nicht bestätigt werden. Die Herabregulation von Ephrin-B2 durch Schubspannung kann vor diesem Hintergrund als ein molekularer Mechanismus der Adaptation an einen nicht aktivierten, ruhenden endothelialen Phänotyp angesehen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit bisherigen Untersuchungen, die eine Hemmung der Proliferation (Akimoto *et al.*, 2000) und der Apoptose (Dimmeler *et al.*, 1996;

Bartling *et al.*, 2000) durch chronische laminare Schubspannung in Endothelzellen zeigen. Inwiefern die auf mRNA-Ebene gezeigte Herabregulation von Ephrin-B2 auch auf Proteinebene übertragbar ist, kann aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit von anwendbaren humanen Ephrin-B2-Antikörpern derzeit nicht beantwortet werden. Eigene Experimente zur Herstellung geeigneter Antikörper waren bis zur Expression des humanen Ephrin-B2 in *E.coli* erfolgreich, nach erfolgter Immunisierung konnten jedoch bisher keine funktionell aktiven Antiseren gewonnen werden. Dies ist derzeit ein generelles Problem der Arbeiten auf diesem Gebiet. Der korrespondierende EphB4-Rezeptor wird auf mRNA-Ebene dagegen transient durch Schubspannung in HUVEC induziert. Auch in diesem Fall ist durch das Fehlen geeigneter Antikörper eine Verifizierung auf Proteinebene noch nicht möglich. Da der Focus auf chronische Veränderung des endothelialen Phänotyps durch Schubspannung gelegt wurde, erfolgten alle Untersuchungen zur Signaltransduktion nach 24 Stunden. Als erster potenzieller Mechanismus für die spezifische Antwort auf biomechanische Stimulation wurde der Einfluss unterschiedlicher extrazellulärer Matrices untersucht. Die Herabregulation von Ephrin-B2 in HUVEC auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen war auf Kollagen I und Laminin nicht länger nachweisbar. Dies spricht dafür, dass spezifische Matrix-Integrin-Wechselwirkungen an der Erkennung und Weiterleitung von Schubspannung in die Endothelzelle beteiligt sind. In den letzten Jahren gibt es in der Literatur vermehrt Hinweise, dass Zell-Matrix-Interaktionen entscheidend für die Erkennung und Art der zellulären Antwort auf unterschiedliche mechanische Stimuli sind. So konnte gezeigt werden, dass glatte Muskelzellen auf Kollagen I und Fibronectin verstärkt proliferieren, während sie sich auf Laminin verstärkt differenzieren (Wilson *et al.*, 1993; Reusch *et al.*, 1996). Diese matrix-spezifische Antwort auf mechanische Dehnung wird durch eine matrix-abhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren reguliert (Ling *et al.*, 1999; Morawietz *et al.*, 1999). Auch die schubspannungsabhängige Regulation der Vasodilatation von koronaren Gefäßen und der endothelialen NO-Freisetzung wird durch Integrin- und Laminin-bindende Protein-vermittelte Zell-Matrix-Interaktionen beeinflusst (Muller *et al.*, 1997; Gloe *et al.*, 1999). Die Herabregulation von Ephrin-B2 durch Schubspannung kann durch Hemmung der Proteinkinase C (PKC) verhindert werden. Eine Reihe von intrazellulären Prozessen wird PKC-abhängig durch Schubspannung reguliert. Dies ist gleichzeitig der erste Befund in der Literatur, dass die Ephrin-B2-Expression durch PKC reguliert wird. Schubspannung erhöht transient die PKC-Immunfluoreszenz (Hu Y. L. *et al.*, 1997) und aktiviert die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK1/2) PKC-abhängig in Endothelzellen (Takahashi *et al.*, 1996). Die schubspannungsabhängige Induktion der Expression von PDGFA und B (Hsieh *et al.*,

1992), c-fos (Hsieh *et al.*, 1993), und dem „heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor“ (HB-EGF) (Morita *et al.*, 1993) ist ebenfalls PKC-abhängig. Eine PKC-abhängige Herabregulation von Genen durch chronische Applikation von Schubspannung ist dagegen bisher noch nicht beschrieben worden. Die schubspannungsabhängige Reduktion der Ephrin-B2-Expression scheint auch Tyrosinkinase-abhängig zu sein. Tyrosinkinasen wurden als Mechanosensoren für die intrazelluläre Weiterleitung biomechanischer Stimuli postuliert (Chen *et al.*, 1999). Schubspannung erhöht die eNOS-Expression- und Aktivität über einen Tyrosinkinase-c-Src-abhängigen Signalweg (Ayajiki *et al.*, 1996; Davis M. E. *et al.*, 2001). Wir konnten kürzlich die Herabregulation der Tyrosylprotein-Sulfotransferase-Isoform 1 durch arterielle Schubspannung auf einem Tyrosinkinase-abhängigen Signalweg zeigen (Goettsch S. *et al.*, 2002). Diese Befunde unterstützen eine Rolle von Tyrosinkinasen bei der beschriebenen Ephrin-B2-Regulation durch Schubspannung.

In weitergehenden Analysen wurde die Regulation von Ephrin-B2 und EphB4 durch Schubspannung in venösen und arteriellen Endothelzellen verglichen. Interessanterweise wurde die Ephrin-B2-Expression in venösen Zellen (HUVEC) herabreguliert, in arteriellen Zellen der Nabelschnur (HUAEC) oder der Koronararterie (HCAEC) nicht herabreguliert. Diese Daten sprechen für eine unterschiedliche intrazelluläre Antwort auf gleiche biomechanische Stimuli in venösen und arteriellen Zellen. Vergleichende Befunde zur mechanischen Stimulation von arteriellen bzw. venösen Gefäßzellen sind in der Literatur selten. Mechanische Dehnung führt zu einer Herabregulation der Prostazyklin-Bildung in arteriellen und venösen Endothelzellen. Die höhere Dehnung von arteriellen Endothelzellen könnte so die höhere Prostazyklin-Sekretion von venösen im Vergleich zu arteriellen Endothelzellen erklären, die von der Mehrzahl der Autoren beschrieben wird (Upchurch *et al.*, 1989). Klinisch bedeutsam ist in diesem Zusammenhang die verstärkte proliferative Antwort von glatten Muskelzellen der *Vena saphena magna* im Vergleich zu Zellen der *Arteria mammaria interna* auf erhöhte mechanische Dehnung, die zu der höheren Restenoserate von Venen-Bypässen beitragen könnte (Predel *et al.*, 1992). Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix könnte in venösen bzw. arteriellen Endothelzellen durch mechanische Kräfte unterschiedlich reguliert sein. Während chronische laminare Schubspannung in venösen Endothelzellen zu einer reduzierten Fibronectin-Synthese führt (Gupte *et al.*, 1990), induziert arterielle Schubspannung in arteriellen Endothelzellen die endotheliale Fibronectin- und Laminin-Bildung (Thoumine *et al.*, 1995).

In weitergehenden Analysen wurde die Regulation des Angiopoietin/Tie-Systems durch Schubspannung in humanen Endothelzellen untersucht. Angiopoietin-2 ist zeitabhängig durch

arterielle Schubspannung herabreguliert. Dies ist in Übereinstimmung mit der kürzlich beschriebenen Herabregulation der Angiopoietin-2-mRNA im Rahmen eines differential display-Ansatz zur Identifizierung Schubspannungsregulierter Gene (Bongrazio *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Befund durch detaillierte Zeit- und Dosisstudien sowie Untersuchungen zur Signaltransduktion erweitert. Überraschenderweise finden wir eine Induktion der Angiopoietin-2-Expression bei venöser Schubspannung, während arterielle Schubspannung Angiopoietin-2 herabreguliert. Diese Ergebnisse lassen sich auch auf Proteinebene bestätigen. Diese Daten sprechen für eine höhere angiogene Aktivierbarkeit bei niedriger Schubspannung. Die Herabregulation von Angiopoietin-2 durch höhere arterielle Schubspannung kann dagegen erneut als Adaptation an einen ruhenden Endothelzell-Phänotyp interpretiert werden, der die vaskuläre Integrität stabilisiert.

Im Gegensatz zu Ephrin-B2 wird Angiopoietin-2 auch auf Kollagen I- und Laminin durch arterielle Schubspannung herabreguliert. Dies unterstützt die matrixspezifische Antwort der Ephrin-B2-Expression, spricht jedoch gegen eine Integrin- oder Laminin-binding Protein-vermittelte Herabregulation von Angiopoietin-2 durch arterielle Schubspannung. Die Herabregulation von Angiopoietin-2 durch arterielle Schubspannung ist wie Ephrin-B2 PKC-vermittelt. Bereits beschrieben sind bisher eine PKC-vermittelte Induktion von Angiopoietin-2 durch VEGF und Hypoxie (Oh *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 2000) sowie Angiotensin II in Endothelzellen (Fujiyama *et al.*, 2001; Otani *et al.*, 2001). Dabei handelt es sich jeweils um transiente Induktionen der Angiopoietin-2-Expression. Unsere Daten fokussieren jedoch auf langfristige Änderungen der Angiopoietin-2-Genexpression. Tyrosinkinase sind im Gegensatz zu Ephrin-B2 in die Herabregulation von Angiopoietin-2 nicht involviert. Das unterstützt die Spezifität des Ephrin-B2-Befundes. Der korrespondierende Tie2-Rezeptor wird dagegen durch Schubspannung auf Gelatine-beschichteten Schalen nicht reguliert. Eine kompensatorische Regulation wie beim Ephrin-B2/EphB4-Ligand/Rezeptor-Paar konnte damit in venösen Zellen nicht beobachtet werden. Besonders interessant sind die vergleichenden Untersuchungen zur Regulation von Angiopoietin-2 und Tie2 durch Schubspannung in venösen und arteriellen Endothelzellen. Während die Herabregulation von Angiopoietin-2 durch arterielle Schubspannung in venösen und arteriellen Endothelzellen nachgewiesen wurde, erfolgte im Gegensatz zu venösen in arteriellen Endothelzellen keine Induktion bei venöser Schubspannung. Wahrscheinlich ist die gefäßspezifische Differenzierung für diese unterschiedliche intrazelluläre Antwort auf identische biomechanische Stimuli verantwortlich. Die mehrfach passagierten arteriellen Koronarendothelzellen liegen aufgrund ihres aktivierten eher proliferativen Phänotyp in der

Stärke ihrer Antwort zwischen beiden Zelltypen. Die gefäßspezifische Regulation ist auch für den Rezeptor Tie2 nachweisbar, der in venösen Zellen nicht, in arteriellen Endothelzellen dagegen induziert wird. Damit ist in arteriellen Endothelzellen eine vergleichbare kompensatorische Expression des Angiopoietin-2/Tie2-Ligand/Rezeptor-Paars zu beobachten, wie für das Ephrin-B2/EphB4 Paar in venösen Endothelzellen.

Um erste Hinweise auf Transkriptionsfaktoren zu erhalten, die diese differentielle mRNA-Expression durch Schubspannung vermitteln, wurden electrophoretic mobility shift assays (EMSA) durchgeführt. Wir konnten dabei eine transiente Induktion der Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1, jedoch eine verringerte Bindungsaktivität nach chronischer Applikation arterieller Schubspannung in venösen Endothelzellen nachweisen. Da Ephrin-B2 und Angiopoietin-2 potentielle AP-1-Bindungsstellen in ihrem Promotor besitzen, könnte AP-1 (wahrscheinlich als c-jun Homodimer) in die Herabregulation durch arterielle Schubspannung in HUVEC involviert sein. Ein weiterer interessanter Kandidat ist NF- κ B, der ebenfalls durch Schubspannung transient induziert, jedoch chronisch herabreguliert wird (Mohan *et al.*, 1997).

Zusammenfassend konnte damit eine Regulation von Genen des Ephrin-B2/EphB4- bzw. Angiopoietin-2/Tie2-Systems durch biomechanische Stimuli in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden. Die intrazelluläre Antwort ist zum Teil gefäßspezifisch und involviert PKC, Tyrosinkinasen und Zell-Matrix-Interaktionen. Die Herabregulation von Ephrin-B2 und Angiopoietin-2 spricht für eine Differenzierung in einen ruhenden Endothelzellphänotyp durch arterielle laminare Schubspannung. Dies könnte zum antiangiogenen und die Gefäßintegrität stabilisierenden Effekt von laminarer Schubspannung beitragen.