

5. Zusammenfassung

Die Entwicklung chronischer Erkrankungen ist häufig nicht monogen bzw. monofaktoriell bedingt. Die Pathogenese beinhaltet zunehmende Fehlregulationen von Körperfunktionen durch äußere und innere Risikofaktoren. Dabei bilden Gefäßerkrankungen die Grundlage für die häufigsten Todesursachen in den Industrieländern. Lokal und systemisch erhöhte Endothelin-Spiegel könnten an der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt sein. In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Teil die Regulation von vasoaktiven Peptiden, mit Schwerpunkt Endothelin-System, durch kardiovaskuläre Risikofaktoren, sowie im zweiten Teil die Regulation von Mediatoren der Gefäßbildung durch biomechanische Kräfte untersucht.

Die Bildung des Vasokonstriktors Endothelin erfolgt proteolytisch durch das Endothelin-Konvertierungs-Enzym aus dem Vorläuferpeptid Big-Endothelin. Im ersten Teil wurde eine direkte Beeinflussung der Expression des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms durch Angiotensin II in Endothelzellen, dem Hauptbildungsort von Endothelin untersucht. In unterschiedlichen Zellkulturmodellen (HUVEC, HCAEC) konnte keine direkte Beeinflussung der mRNA-Expression des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms oder der Anteile der einzelnen Isoformen an der ECE-1-Gesamtexpression nachgewiesen werden.

Der Einfluss von Übergewicht auf das Renin-Angiotensin- und Endothelin-System wurde in C57B2/6J Mäuse untersucht. In der Niere der übergewichtigen Tiere wurde das Angiotensin-Konvertierungs-Enzym (ACE) aktiviert. Diese ACE-Aktivierung wurde durch Gabe des Endothelin-Rezeptor-Typ A-Antagonisten verhindert. RT-PCR-Analysen zeigten, dass diese Aktivierung in der Niere nicht transkriptionell mediiert ist.

Der Einfluss des Risikofaktors Alter auf die Gefäßintegrität und die Expression von ppET-1 wurde in Gefäße von jungen und alten Ratten analysiert. Blutdruckunabhängig wurde im Alter der Endothelin-1-Peptidgehalt in allen untersuchten Gefäßen fast verdoppelt. RT-PCR-Analysen zeigten, dass die vermehrte Endothelin-1-Synthese auf einer erhöhten ppET-1 mRNA-Expression beruht. Ebenfalls deutlich erhöht war die eNOS- und iNOS-mRNA-Expression in der abdominalen Aorta der alten Tiere.

Der Einfluss erhöhter Bioverfügbarkeit von NO auf die Aktivität des Endothelin-Systems wurde in sauerstoffunabhängig Erythropoietin (EPO)-überexprimierenden transgenen Mäusen untersucht. Das Endothelin-System der transgenen Tiere ist aktiviert. Die mRNA-Expression der Endothelin-Rezeptoren A und B ist in den transgenen Mäusen induziert. Diese Induktion wird durch die Gabe eines spezifischen Endothelin-Rezeptor-A-Antagonisten noch verstärkt.

In atrialem und ventrikulärem Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz bzw. koronarer Herzkrankheit wurde die Expression des Endothelin-Systems und der Endothelin-1-Peptidgehalt bestimmt. Die Expression des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms (ECE) ist im Ventrikel von Patienten mit Herzinsuffizienz erhöht. Diese erhöhte Expression wird durch die ACE-Inhibitor-Therapie teilweise normalisiert. Der Endothelin-1-Peptid-Gehalt im Myokard korreliert mit der Expression des Endothelin-Konvertierungs-Enzyms.

In Biopsien der *Arteria mammaria interna* von Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurde die Expression der ECE-1-Isoformen quantifiziert. Dabei wurde untersucht, ob Reduzierung des Ang II-Spiegels durch medikamentöse ACE-Hemmer-Therapie, Blockade der Ang II-Wirkung durch Behandlung mit AT₁-Rezeptorantagonisten oder Modulation des Lipidprofils durch Cholesterinsyntheseenzym-(CSE)-Hemmern die ECE-1-Isoform-mRNA-Expression beeinflusst. Medikamentöse Behandlung mit einem AT₁-Rezeptorantagonisten führte zu einer signifikanten Herabregulation der ECE-1-mRNA-Expression im Vergleich zu Patienten mit CSE-Hemmer-Therapie. Diese Herabregulation der ECE-1-mRNA-Expression beruht hauptsächlich auf der signifikanten Reduktion der ECE-1a-mRNA-Expression in Patienten mit AT₁-Hemmer-Therapie. Die ECE-1a-mRNA war in Patienten mit AT₁-Blockade darüber hinaus niedriger exprimiert, als in Patienten mit ACE-Hemmer-Therapie.

Obwohl in den Zellkulturexperimenten eine direkte Wechselwirkung des Renin-Angiotensin-Systems mit dem Endothelin-System nicht nachgewiesen werden konnte, wurde in unterschiedlichen Tiermodellen sowie in humanen Gewebeproben Wechselwirkungen beider Systeme indirekt nachgewiesen. Die zugrundeliegenden Signalmechanismen, Wechselwirkungen mit weiteren Mediatorsystemen und unterschiedlicher Zelltypen oder der Einfluß gefäßtypischer Differenzierung von Endothelzellen, muss in weitergehenden Untersuchungen analysiert werden.

Biomechanische Kräfte wirken ständig auf die Endothelzellen der Gefäßwand und bewirken dadurch die Freisetzung biologisch aktiver Mediatoren. Der Einfluß veränderter biomechanischer Kräfte auf die phänotypische Differenzierung der Endothelzellen sollte am Beispiel der Expression von Mediatoren der Gefäßbildung und -Identität, dem Ephrin/Eph- und dem Angiopoietin/Tie-System, im zweiten Teil der Arbeit untersucht werden.

In initialen Untersuchungen wurde die Ephrin-B2-Expression in unterschiedlichen humanen Geweben durch *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen. In primären humanen Endothelzellkulturen wurde dann der Einfluss von laminarer Schubspannung untersucht. Die Ephrin-B2-mRNA-Expression wird durch arterielle laminare Schubspannung in HUVEC zeit- und dosisabhängig auf die Hälfte nach 24 Stunden verringert. Diese Herabregulation kann durch

Hemmung der Proteinkinase C sowie durch Hemmung von Tyrosinkinasen verhindert werden. Werden die venösen Endothelzellen auf Kollagen I bzw. auf Laminin kultiviert, so konnte ebenfalls keine Herabregulation der Ephrin-B2-mRNA-Expression beobachtet werden. Interessanterweise reagieren arterielle Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUAEC) nicht mit Herabregulation der Ephrin-B2-mRNA auf arterielle laminare Schubspannung.

Der EphB4-Rezeptor wird in HUVEC transient nach 4 Stunden arterieller laminarer Schubspannung induziert, seine Expression fällt nach 12 Stunden wieder auf Kontrollniveau. Funktionell verhindert sowohl Ephrin-B2 als auch EphB4 dosisabhängig die Anheftung sowie die Migration unterschiedlicher Endothelzelltypen (HUVEC, HUAEC, HCAEC).

Angiopoietin-2 wird durch laminare venöse Schubspannung (1 dyn/cm² für 24 h) induziert, durch arterielle Schubspannung jedoch zeit- und dosisabhängig herabreguliert. Dabei ist die Angiopoietin-2-mRNA-Expression nach 12 Stunden maximal verringert, um nach 24 Stunden etwa 50% der Expression der stationären Kontrolle zu erreichen. Diese Reduktion bleibt zumindest auf Proteinebene bis zu 80 Stunden erhalten und stellt somit eine langfristige Adaptation der Angiopoietin-2-Expression an arterielle laminare Schubspannung dar. Diese Herabregulation wird durch unterschiedliche Matrices (Gelatine, Kollagen I, Laminin) nicht beeinflusst. Die Herabregulation kann durch Blockade des Proteinkinase C-Signalwegs verhindert werden. Dagegen hat die Blockade von Tyrosinkinasen keinen Einfluss auf die Herabregulation der Angiopoietin-2-mRNA-Expression. Interessanterweise erfolgt die in venösen Zellen beobachtete Induktion der Angiopoietin-2-mRNA-Expression durch venöse laminare Schubspannung nicht in arteriellen Endothelzellen der gleichen Nabelschnur (HUAEC). Die Herabregulation von Angiopoietin-2-mRNA erfolgt dagegen durch arterielle laminare Schubspannung in arteriellen und venösen Endothelzellen gleichermaßen.

Der Angiopoietin-2 Rezeptor Tie2 wird in HUVEC nicht durch Schubspannung reguliert. In arteriellen Endothelzellen wird die Tie2-mRNA-Expression dagegen durch chronische arterielle laminare Schubspannung (30 dyn/cm² für 24 h) induziert.

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.