

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

DISSERTATION

Koregulation der Angiogenese durch Blutströmung
hämorrheologische Aspekte der Expressionsregulation
der Angiogenese-modulierenden Faktoren
ADAMTS1, Angiopoietin-2 und Interleukin-8

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Margret Hohberg

aus Berlin

Datum der Promotion: 23.06.2013

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3-15
Titel, Autor, Abstract.....	3-4
Einleitung, Zielstellung.....	4-6
Methoden.....	6-8
Ergebnisse.....	8-9
Diskussion.....	9-12
Literatur.....	12-15
Eidesstattliche Versicherung/Anteilserklärung	16-17
Publikationen	18-43
Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries.....	18-29
Regulation of Foxo-1 and the angiotensin-2/Tie2 system by shear stress.....	30-37
Suppression of zinc finger protein 580 by high oxLDL/LDL-ratios is followed by enhanced expression of endothelial IL-8.....	38-43
Lebenslauf	44-45
Publikationsliste	46
Danksagung	47

Titel

Koregulation der Angiogenese durch Blutströmung - hämorrheologische Aspekte der Expressionsregulation der Angiogenese-modulierenden Faktoren ADAMTS1, Angiopoietin-2 und Interleukin-8

Autorin

Margret Hohberg

Abstrakt

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der strömungsabhängigen Expressionsregulation des antiangiogenen Faktors ADAMTS1 und des angiogenen Faktors Angiopoietin-2 in Endothelzellen *in vitro* und *in vivo*.

ADAMTS1 wurde durch Strömung Zeit- und Kraft-abhängig induziert, Angiopoietin-2 dagegen supprimiert. Phospholipase C, Phosphoinositol-3-Kinase, eNOS und FoxO1 waren an der Expressionsregulation von ADAMTS1 beteiligt. Phosphoinositol-3-Kinase, Akt und FoxO1 waren an der Expressionsregulation von Angiopoietin-2 beteiligt. Im Bereich von 20-100 mmHg war die Expression von ADAMTS1 darüber hinaus direkt mit dem Sauerstoffpartialdruck korreliert. Der antiangiogene Effekt von ADAMTS1 wurde durch ein 70 kDa Fragment von Thrombospondin-1 vermittelt. Im scratch wound assay war der Verschluß des Zelldefektes unter Medium von strömungsbehandelten Zellen verzögert. Dieser Effekt wurde durch Blockung (siRNA) von ADAMTS1 teilweise und Blockung von TSP1 vollständig aufgehoben. Sprossende Kapillaren in Totalpräparaten des Rattenmesenteriums ließen sich für Angiopoietin-2, nicht jedoch für ADAMTS1 anfärben. Dagegen waren reife, perfundierte Blutgefäße positiv für ADAMTS1 dessen Expression darüber hinaus mit der intravitalmikroskopisch gemessenen Wandschubspannung dieser Gefäße eng korreliert war. LDL mit niedrigem oxLDL/LDL Quotienten induzierte die Expression von Zinkfingerprotein 580, welches seinerseits die Expression von IL-8 supprimierte. Einer Hemmung von ZNF580 (siRNA) folgte ein Anstieg der Adhäsion von Monozyten am Endothel.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für eine strömungsregulierte Synthese von ADAMTS1 und Angiopoietin-2 in Endothelzellen und den Einfluß des Transkriptionsfaktors ZNF580 auf die Expressionsregulation von IL-8. Die hier untersuchten Mechanismen werden daher eine Rolle spielen für die Steuerung des Wachstums von Blutgefäßen *in vivo* und die Initiierung der Atherosklerose.

Abstract

This study aimed at analyzing blood flow-dependent effects on the expression regulation of ADAMTS1 and angiopoietin-2 in endothelial cells. ADAMTS1 is a putative inhibitor of angiogenesis while angiopoietin-2 promotes angiogenesis.

Expression of ADAMTS1 was strongly induced by flow-elicited shear stress acting on endothelial cells both on the mRNA- and the protein level. This induction was time- and shear stress-dependent. Activation of phospholipase C, phosphoinositol-3-kinase, and generation of nitric oxide were all likewise necessary to induce the flow-dependent increase in ADAMTS1 with a small contribution of down-regulation of FoxO1. By contrast to ADAMTS1, angiopoietin-2 was reduced by shear stress. This reduction was transmitted via the phosphoinositol-3-kinase-Akt-FoxO1-pathway. In addition to shear stress, increasing oxygen pressure between 20-100 mmHg similarly increased ADAMTS1. Looking for anti-angiogenic mechanisms of ADAMTS1 revealed an increase of a thrombospondin-1 fragment (70 kDa) in shear stress-treated endothelial cells in an ADAMTS1-dependent manner. According to this, scratch wound closure (using the scratch wound assay) was delayed with shear stress-treated cells conditioned medium. This delay was partly abolished if ADAMTS1 was knocked down with specific siRNA and it was completely absent if TSP1 was knocked down. *In vivo*, sprouting capillaries stained positive for angiopoietin-2 and negative for ADAMTS1. Moreover, ADAMTS1 staining of mature blood vessels correlated with the amount of shear stress measured by means of intravital microscopy. LDL with only minute parts of oxLDL (low oxLDL/LDL ratio) induced the expression of a new zinc finger protein (ZNF580) which in turn suppressed the expression of interleukin 8. Consequently, MonoMac6 adhesion to endothelial cells was enhanced if ZNF580 was knocked down (siRNA).

Taken together, the data presented here demonstrate shear stress-dependent endothelial cell mechanisms for the regulation of angiogenesis and the control of atherosclerosis.

Einleitung

Eliot Clark beschrieb bereits 1918 einen Zusammenhang zwischen relativ höherer Blutströmungsgeschwindigkeit und dem Wachstum sowie niedrigerer Blutströmungsgeschwindigkeit und dem Abbau von Blutgefäßen¹. Dem folgte beginnend in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts die Erforschung der Angiogenesefaktoren^{2,3,4}, wobei jedoch die Rolle der Blutströmung für die Regulation der Angiogenese aus dem Blick geriet. Stattdessen

wurde die überwiegende Mehrheit aller Arbeiten auf den Sauerstoffpartialdruck als Angiogeneseregulator konzentriert⁵.

Blutgefäße ermöglichen die Perfusion der Gewebe mit Blut. Daher bildet sich die Funktionalität von Blutgefäßen sowohl im Sauerstoffpartialdruck der versorgten Gewebe als auch in der Blutströmung ab. Während niedrige Sauerstoffpartialdrucke entscheidend sind für die Bildung von Kapillarsprossen aus Kapillaren und postkapillären Venolen⁶, kann bei normalem Sauerstoffpartialdruck nur die Höhe des Blutvolumenstroms signalisieren, ob ein Blutgefäß „benutzt“ wird oder nicht. Nicht benutzte Blutgefäße werden abgebaut, benutzte werden – trotz hohen Sauerstoffpartialdrucks – ausgebaut. Dies entspricht der Beobachtung von Clark und wurde experimentell vielfach bestätigt⁷.

Blutströmung übt auf Endothelzellen eine Schubspannung aus, die über diverse Mechanotransduktionsmechanismen^{8,9} u.a. den Blutgefäßtonus reguliert¹⁰. Bei Verminderung oder zeitlicher Störung dieser Kräfte wird dagegen die Entwicklung von Arteriosklerose begünstigt oder sogar induziert¹¹. Beides sind medizinisch wichtige und daher intensiv bearbeitete Gebiete der vaskulären Biologie.

Es lag die Hypothese nahe, dass ähnliche Mechanotransduktionsmechanismen über die strömungsabhängige Expression von Angiogenesefaktoren in Endothelzellen an der bedarfsgerechten Anpassung des Blutgefäßwachstums beteiligt sind. Tatsächlich wurden neben der Expression anderer Faktoren die von ADAMTS1 und Angiopoietin-2 als strömungsreguliert beschrieben¹² ADAMTS1 ist eine sezernierte, aktive Metalloprotease, die am „turnover“ einiger Matrixproteine beteiligt ist und darüber hinaus die durch Fibroblast growth faktor 2 (FGF2) und vascular endothelial growth faktor-A (VEGF-A) induzierte Kapillarsprossung hemmt¹³ (3). Angiopoietin-2 ist als endogener Inhibitor des endothelialen Tyrosinkinase-Rezeptors Tie-2 im Gleichgewicht mit dem Tie-2-Aktivator Angiopoietin-1 und im cross-talk mit VEGF-A an der Regulation des Blutgefäßwachstums beteiligt^{14,15}.

Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war die genauere Charakterisierung des Einflusses der Wandschubspannung auf die Expression des antiangiogenen Faktors ADAMTS1 und des angiogenen Faktors Angiopoietin-2 in Endothelzellen sowie die Identifizierung beteiligter Signaltransduktionswege.

Darüber hinaus sollten antiangiogene Mechanismen von ADAMTS1 eingegrenzt und die zunächst *in vitro* erhobenen Daten im Sinne eines „proof of principle“ *in vivo* verifiziert werden.

Methodik

Zellkultur

Humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC), humane koronare mikrovaskuläre Endothelzellen (HCMEC), EAhy926 und MonoMac6 wurden wie beschrieben isoliert bzw. kultiviert^{16,17,18}.

Wandschubspannung

Auf konfluente Zellmonolayer wurde über ein Kegel-Platte-System unterschiedliche Wandschubspannung ausgeübt. Dabei wurden je nach gewünschter Höhe der Schubspannung die Umdrehungsgeschwindigkeit des Kegels und/oder die Viskosität des Mediums angepasst. Es wurde laminare Strömung konstanter Richtung und Stärke (nicht-pulsatil) oder mit einem pulsatilen atheroprotektiven oder atherogenen Strömungsprofil verwendet^{19,20,21}.

Sauerstoffpartialdruck

Um Endothelzellen Sauerstoffpartialdrucken von 20 mmHg (Gewebe), 40 mmHg (Vene), 100 mmHg (Arterie) und 150 mmHg auszusetzen, wurden sie im Brutschrank mit Sauerstofffraktionen von 3%, 5,6%, 14%, 21% inkubiert.

Zellinhibitoren

Es erfolgte die Hemmung von Phospholipase C mit U-73122 (inaktive Kontrolle U-73343), von Phosphoinositol-3-Kinase mit LY-294002 und von eNOS mit L-Name (inaktive Kontrolle D-Name)²⁰.

PCR

Real-time RT-PCR, semiquantitative RT-PCR und semiquantitative Duplex PCR wurden wie beschrieben durchgeführt^{18,20}.

Northern

Das northern blotting für ADAMTS1 und GAPDH wurde wie beschrieben durchgeführt²⁰.

SDS-PAGE und Immunoblotting

SDS-PAGE und anschließendes Immunoblotting wurden aus Zellextrakt (FoxO1, Ang-2, Tie2, Akt, P-Akt, p27Kip1, ADAMTS1, ZNF580), Immunpräzipat (P-FoxO, Tie-2) und Zellüberständen (TSP1) wie beschrieben durchgeführt^{18,20}. Die Ladekontrolle erfolgte mit Ponceau-Färbung, Nachweis von PECAM-1 bzw. β -aktin.

Zellulärer knock down mittels siRNA

Die Transfektion genspezifischer siRNA in HUVEC und EAhy926 erfolgte mittels Liposomen-basierter Systeme wie beschrieben, als negative Kontrolle diente scrambled siRNA^{18,20}.

Scratch wound assay

HUVEC Monolayer wurden mit einem definierten Defekt versehen und der zeitabhängige Verschluß unter Kultivierung mit frischem Medium, 24 h statisch- oder dynamisch konditioniertem Medium oder mit durch transfizierte Zellen (siRNA gegen ADAMTS1 oder TSP1) konditioniertem Medium gemessen^{20,22}.

Sprouting assay

Kapillarsprossung wurde im Rattenmesenterium induziert²³ und mittels Immunfluoreszenz wurden FoxO1, ADAMTS1, TSP1, Ang2 und ZNF580 im Totalpräparat des Mesenteriums (oder in HUVEC) visualisiert²⁰.

Intravitalmikroskopie

Zur Bestimmung der Wandschubspannung erfolgte die intravitalmikroskopische Messung der Blutströmungsgeschwindigkeit und der Gefäßdurchmesser in Blutgefäßen des Rattenmesenteriums, anschließend wurden ADAMTS1 und TSP1 an denselben Gefäßen im Totalpräparat des Mesenteriums mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen²⁰.

Monozytenadhäsion

Auf Fibronectin-beschichteten Deckgläsern wurden HUVEC kultiviert und in einer Flusskammer physiologischen Strömungsbedingungen ausgesetzt. Dem strömenden Medium wurden MonoMac6 zugesetzt und die nach 5 min adhärenen Zellen ausgezählt²⁴.

ELISA

Die Konzentration von IL-8 wurde in Zellkulturüberständen wie beschrieben mit einem kommerziell erhältlichen ELISA gemessen und die entsprechende Bestimmung des oxLDL/LDL-Quotienten erfolgte in Serum²⁵.

Bioinformatik

Mittels der Transfac Database wurde die Promotorregion von ADAMTS1 nach möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren untersucht²⁰ und erwartete Bindungsaffinitäten mit dem Transcription factor Affinity Prediction tool (TRAP)²⁶ berechnet.

Statistik

Bei Experimenten mit HUVEC bezieht sich die Anzahl voneinander unabhängiger Experimente (n) auf die Anzahl der zur Isolation von HUVEC eingesetzten Nabelschnüre. Für Experiment und zugehörige Kontrollen wurden jeweils HUVEC aus derselben Nabelschnur verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Students t-Test. Zur linearen Korrelationsanalyse wurde r mit dem Pearson-Korrelationstest berechnet. Als signifikant wurden Werte $p \leq 0,05$ bezeichnet.

Ergebnisse

Um zu untersuchen, inwiefern in Endothelzellen die Effekte der Wandschubspannung auf die Regulation der Angiogenese durch ADAMTS1 und FoxO1 vermittelt werden, wurden humane Endothelzellen Wandschubspannung unterschiedlicher Stärke und Dauer ausgesetzt. Es zeigte sich hierbei, dass ADAMTS1 auf dem mRNA und Protein Level durch laminare Wandschubspannung ab 2 dyn/cm^2 induziert wurde. Diese Regulation war abhängig von der Höhe der Wandschubspannung und der Dauer der Exposition. Der Effekt hielt nach der Exposition bis zu vier Stunden an. Atheroprotektive Strömungsprofile induzierten ADAMTS1, während atherogene Strömungsprofile keinen Einfluss auf die Expression von ADAMTS1 hatten. In der Promotorregion von ADAMTS1 konnten *in silico* Bindungsstellen für NF-1 und SP1, sowie für AP-1 und FoxO1 nachgewiesen werden. Die Untersuchung mechanosensitiver Signalwege zeigte, dass ADAMTS1 durch Phospholipase C, PI3-Kinase und eNOS induziert wird. Dagegen wurde die Expression von ADAMTS1 durch FoxO1 gehemmt.

Es ist bekannt, dass ADAMTS1 TSP1 in ein 70 kDa Fragment spaltet. Unter Wandschubspannung zeigte sich entsprechend eine erhöhte Konzentration des 70 kDa Fragments in den Zellen und im Zellkulturüberstand, wohingegen TSP1 einer Größe von 180 kDa unter Wandschubspannung vermindert nachzuweisen war. Im scratch wound assay war der Verschluss des Defektes verzögert, wenn das Kulturmedium durch strömungsexponierte HUVEC

konditioniert worden war. Dieser Effekt ließ sich durch Hemmung der Expression von ADAMTS1 durch siRNA teilweise und durch Hemmung der Expression von TSP1 vollständig aufheben. Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass ADAMTS1 fast ausschließlich in gut perfundierten Gefäßen exprimiert wird, in Gefäßsprossen dagegen nicht. Durch Intravitalmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Expression von ADAMTS1 *in vivo* mit der Wandschubspannung korreliert. Darüber hinaus wurde ADAMTS1 unter Hypoxie vermindert exprimiert.

FoxO1 wurde dagegen auf dem mRNA und Protein Level durch laminare Wandschubspannung supprimiert und war vermehrt im Zytosol (anstatt im Kern) von Zellen nachweisbar. Unter Wandschubspannung kam es zu einer Aktivierung der PI3-Kinase und Akt. Hierdurch wurde FoxO1 vermehrt phosphoryliert, dadurch aus dem Kern ausgeschlossen und inaktiviert.

Entsprechend wurde Ang-2, das durch FoxO1 transkriptionell induziert wird, unter Wandschubspannung vermindert gebildet. Darüber hinaus wurde Tie2 durch Wandschubspannung vermehrt gebildet.

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Angiogenese hat, ist die Inflammation. Eine Dysfunktion des Endothels führt zu einer chronischen Inflammation der Gefäße. Eine Ursache hierfür stellt die subintimale Ablagerung von LDL dar. Es wurde daher der Einfluss von LDL, insbesondere des Oxidationsgrads des LDLs, auf das Zytokin IL-8 untersucht. IL-8 wurde mit steigendem Oxidationsgrad durch LDL auf dem mRNA und Protein Level induziert. IL-8 wurde durch ZNF580 supprimiert. Entsprechend wurde die Expression von ZNF580 bei höherem Oxidationsgrad des LDL gehemmt. Einer Hemmung von ZNF580 folgte ein Anstieg der Adhäsion von Monozyten (MonoMac6) am Endothel (HUVEC) unter Strömungsbedingungen in einer planparallelen Flusskammer.

Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ADAMTS1 und FoxO1 Teil eines endothelialen Systems sind, das die Effekte der Wandschubspannung und des Sauerstoffpartialdrucks auf die Angiogenese vermitteln kann.

Es zeigte sich eine starke zeit- und strömungsabhängige Induktion von ADAMTS1 in Endothelzellen. Damit übereinstimmend zeigte die *in silico* Analyse des ADAMTS1 Promotors Bindungsstellen für FoxO1, NF-1, SP1 und AP-1, die alle als wandschubspannungsregulierte Gene bekannt sind^{18,27,28}. Die experimentell demonstrierte Hemmung von ADAMTS1 durch FoxO1 sowie eine Induktion via PI3K, NO und PLC deutet darauf hin, dass zu wesentlichen

Teilen der klassische MAPK-Signalweg die wand Schubspannungsabhängige Regulation von ADAMTS1 vermittelt.

ADAMTS1 wird ab einer Wand Schubspannung von 2 dyn/cm^2 induziert. Dies ist eine Wand Schubspannung, die im menschlichen Kreislauf unter physiologischen Bedingungen bei aufrecht erhaltenem Blutvolumenstrom nirgends unterschritten wird, aber nicht in Sprossen und nicht-durchbluteten Gefäßen vorkommt²⁹.

In der Literatur sind drei unterschiedliche antiangiogene Mechanismen für ADAMTS1 vorgeschlagen worden: Aktivierung von CD36 durch die Thrombospondin-ähnlichen Domänen von ADAMTS1³⁰, Bindung und damit Inaktivierung von VEGF-A³¹ und die proteolytische Spaltung von Thrombospondin-1 zu einem 70 kDa Fragment³². In Endothelzellen wird CD36 durch Strömung supprimiert¹⁷, daher war dieser Mechanismus für unser Modell nicht sehr attraktiv. Ein VEGF-A „trapping“ ist unwahrscheinlich, da wir ADAMTS1 und VEGF-A nicht ko-präzipitieren konnten. Jedoch war eine erhöhte Bildung von ADAMTS1 unter Strömungsbedingungen mit der verstärkten Spaltung von TSP1 in ein 70 kDa Fragment verbunden. Medium von wand Schubspannungskonditionierten Zellen reduzierte den Wundverschluss im scratch wound assay in einer TSP1- und ADAMTS1-abhängigen Weise. TSP1 hatte dabei eine proliferationssteigernde Wirkung auf die Endothelzellen. Es handelt sich hierbei also um einen ADAMTS1-abhängigen antiangiogenen Mechanismus, bei dem die vermehrte Bildung von ADAMTS1 durch Wand Schubspannung zu einer Spaltung von TSP1 führt und damit dessen proliferationssteigernde Wirkung hemmt bzw. ein antiangiogenes TSP-1 Fragment erzeugt.

Da ADAMTS1 antiangiogene Eigenschaften hat^{30,32}, würde die verminderte Expression in Kapillarsprossen die Angiogenese fördern. Bei einsetzender Perfusion des neu entstandenen Blutgefäßes würde die erhöhte Expression die Angiogenese beenden.

In dieser Studie wurde darüber hinaus eine direkte Korrelation der ADAMTS1 Expression mit dem Sauerstoffpartialdruck gezeigt. In gut durchbluteten und oxygenierten Blutgefäßen könnte daher die vermehrte Bildung von ADAMTS1 zur Stabilisierung dieser Blutgefäße beitragen und die Bildung weiterer, nicht erforderlicher Kapillarsprossen verhindern.

Das Konzept der Differenzierung zwischen atheroprotektiven und atherogenen Strömungsbedingungen scheint auch auf die endotheliale ADAMTS1 Expression anwendbar zu sein, da ein pulsatile atheroprotektives Strömungsprofil eine höhere ADAMTS1 Expression im Vergleich zu nicht-pulsatiler Strömung derselben mittleren Stärke zur Folge hatte. Dies könnte bedeuten, dass die unterschiedlichen Beschleunigungsraten bei pulsatilen Strömungsprofilen einen Effekt auf die endotheliale Genexpression ausüben, der unabhängig von der mittleren

Wandschubspannung ist. Dagegen bewirkte ein pulsatile atherogenes Strömungsprofil (niedrige Wandschubspannung mit Strömungsumkehr) ebenso wie statische Kulturbedingungen keinerlei Induktion von ADAMTS1. Während strömungslose Bedingungen *in vivo* lediglich in aussprossenden Kapillaren und nach Gefäßverschluss vorliegen, können atherogene Strömungsprofile an Prädilektionsstellen für Atherosklerose nachgewiesen werden, sodass wir folgern, dass eine verminderte ADAMTS1 Expression in Endothelzellen an genau diesen Lokalisationen nachweisbar sein sollte.

Im Unterschied zu ADAMTS1 wird der Transkriptionsfaktor FoxO1 in Endothelzellen durch Wandschubspannung supprimiert sowie durch Phosphorylierung (Akt-abhängig) inaktiviert. Dies ist mit einer verminderten Transkription von Angiopoietin-2 verbunden. Angiopoietin-2 ist ein Antagonist des endothelialen Tie-2 Rezeptors dessen Aktivierung zur Stabilisierung der Gefäßwand führt und die Angiogenese hemmt. Auch über diesen Mechanismus würde Blutströmung das Aussprossen von Kapillaren hemmen. In sprossenden Kapillaren ohne Strömung dagegen müsste Angiopoietin-2 hoch exprimiert sein und den VEGF-A Effekt verstärken. Auch in Bereichen vermindert wandnaher Strömung an arteriellen Bifurkationen müsste Angiopoietin-2 hoch exprimiert sein, und könnte dann pro-inflammatorisch wirken³³.

Tatsächlich war ADAMTS1 in gut perfundierten Gefäßen der Mikrozirkulation, nicht jedoch in Kapillarsprossen des Rattenmesenteriums stark exprimiert. Im Gegensatz dazu war Angiopoietin-2 nur in Kapillarsprossen nachweisbar. Dieses *in vivo* Experiment bestätigt („proof of principle“) insofern unsere Schlussfolgerungen aus den *in vitro* erhobenen Daten.

Neben pro-atherogenen Strömungsprofilen ist eine weitere Ursache für die Entstehung atherosklerotischer Plaques die Ablagerung von LDL im subintimalen Raum³⁴. Wesentlich an dem Pathomechanismus beteiligt ist IL-8, das zudem pro-angiogene Eigenschaften hat. Es zeigte sich, dass natives LDL den wenig charakterisierten Transkriptionsfaktor ZNF580 induziert, welcher in unseren Experimenten die Expression von IL-8 hemmte. Dies ist ein vollkommen neuer Regulationsmechanismus in Endothelzellen. Entgegen ersten Ergebnissen hatte die Wandschubspannung keinen Effekt auf die Expression von ZNF580. Mit steigendem oxLDL Anteil kommt es zu zunehmender Hemmung von ZNF580 und Induktion von IL-8. Dies korreliert mit erhöhter Monozytenadhäsion. Reduzierte wandnahe Strömung mit Strömungsumkehr (pro-atherogenes Strömungsprofil) und oxLDL würden bei der Induktion von Atherogenese also synergistisch wirken.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für eine wandschubspannungsregulierte Synthese von ADAMTS1 und FoxO1 in Endothelzellen und den Einfluß von ZNF580 auf die Atherosklerose. Diese neuen Befunde helfen, sowohl mehr Klarheit in die Mechanismen der

wandschubspannungsabhängigen Angioadaptation der Angiogenese als auch der pathophysiologischen Vorgänge in Endothelzellen an Gefäßwandabschnitten mit gestörten Blutströmungsbedingungen zu bringen.

Literatur

- 1 Clark ER. Studies on the growth of blood-vessels in the tail of the frog larva—by observation and experiment on the living animal. *Am J Ant.* 1918;23:37-88.
- 2 Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161(2):851-8.
- 3 Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 1985;43:175-203.
- 4 Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol.* 1991;53:217-39.
- 5 Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2000;35(2):71-103.
- 6 Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386(6626):671-4.
- 7 Hudlicka O, Brown MD. Adaptation of skeletal muscle microvasculature to increased or decreased blood flow: role of shear stress, nitric oxide and vascular endothelial growth factor. *J Vasc Res.* 2009;46(5):504-12.
- 8 Papadaki M, Eskin SG. Effects of fluid shear stress on gene regulation of vascular cells. *Biotechnol Prog.* 1997;13(3):209-21.
- 9 Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: The wisdom of the cell. *Am J Physiol Haert Circ Physiol.* 2007; 292: H1209-H1224.
- 10 Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989;3(9):2007-18.
- 11 Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial

dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;902:230-9.

12 Bongrazio M, Baumann C, Zakrzewicz A, Pries AR, Gaehtgens P. Evidence for modulation of genes involved in vascular adaptation by prolonged exposure of endothelial cells to shear stress. *Cardiovasc. Res.* 2000;47:384-393.

13 Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, Lane TF, Oikemus S, Lombardo M, Iruela-Arispe ML. 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;274:23349-23357

14 Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997;277:55-60.

15 Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science.* 1997;277(5322):48-50.

16 Smith DF, Galkina E, Ley K, Huo Y. GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H1976-1984

17 Bongrazio M, Pries AR, Zakrzewicz A The endothelium as physiological source of properdin: role of wall shear stress. *Mol Immunol.* 2003;39:669-675.

18 Chlench S, Mecha Disassa N, Hohberg M et al. Regulation of Foxo-1 and the angiopoietin-2/Tie2 system by shear stress. *FEBS Lett.* 2007;581:673-680.

19 Bussolari SR, Dewey CF Jr., Gimbrone MA Jr. Apparatus for subjecting living cells to fluid shear stress. *Rev. Sci. Instrum.* 1982;53:1851-1854.

20 Hohberg M, Knochel 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(2):350-61.

- 21 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(9):977-86.
- 22 Alter A, Schmiedeck D, Fussnegger MR, Pries AR, Freesmeyer WB, Zakrzewicz A. Angiopoietin-1, but not platelet-derived growth factor-AB, is a cooperative stimulator of vascular endothelial growth factor A-accelerated endothelial cell scratch closure. *Ann Vasc Surg*. 2009;23(2):239-45.
- 23 Anderson CR, Ponce AM, Price RJ. Immunohistochemical identification of an extracellular matrix scaffold that microguides capillary sprouting in vivo. *J Histochem Cytochem*. 2004;52(8):1063-72.
- 24 Zakrzewicz A, Gräfe M, Terbeek D et al. L-selectin-dependent leukocyte adhesion to microvascular but not to macrovascular endothelial cells of the human coronary system. *Blood*. 1997;89(9):3228-35.
- 25 Hoffmann CJ, Hohberg M, Chlench S et al. Suppression of zinc finger protein 580 by high oxLDL/LDL-ratios is followed by enhanced expression of endothelial IL-8. *Atherosclerosis*. 2011;216(1):103-8.
- 26 Roider HG, Manke T, O'Keeffe S, Vingron M, Haas SA. PASTAA: identifying transcription factors associated with sets of co-regulated genes. *Bioinformatics*. 2009;25(4):435-42.
- 27 Nagel T, Resnick N, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(8):1825-34.
- 28 Chien S, Shyy JY. Effects of hemodynamic forces on gene expression and signal transduction in endothelial cells. *Biol Bull*. 1998;194(3):390-1.
- 29 Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. Structure and hemodynamics of microvascular networks: heterogeneity and correlations. *Am J Physiol*. 1995;269(5 Pt 2):H1713-22.

30 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 13;274(33):23349-57.

31 Luque A, Carpizo DR, Iruela-Arispe ML. ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *J Biol Chem.* 2003;278(26):23656-65.

32 Lee NV, Sato M, Annis DS et al. ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *EMBO J.* 2006;25(22):5270-83.

33 Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(3):165-77

34 Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-26.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Margret Hohberg, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Koregulation der Angiogenese durch Blutströmung -hämorrhheologische Aspekte der Expressionsregulation der Angiogenese-modulierenden Faktoren ADAMTS1, Angiopoietin-2 und Interleukin-8 selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

04.12. 2012

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Margret Hohberg hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1: Sven Chlench, Nigussie Mecha Disassa, **Margret Hohberg**, Christian Hoffmann, Theresa Pohlkamp, Gabriele Beyer, Mauro Bongrazio, Luis Da Silva-Azevedo, Oliver Baum, Axel Radlach Pries, Andreas Zakrzewicz. Regulation of Foxo-1 and the angiopoietin-2/Tie2 system by shear stress FEBS Lett. 2007;581:673-680

10 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Immunfluoreszenzfärbung, Mikroskopie, Translokation von FoxO1, Anfertigung einer Abbildung, Datenauswertung

Publikation 2: Margret Hohberg, Judith Knöchel, Christian J. Hoffmann, Sven Chlench, Wulf Wunderlich, Alexander Alter, Julian Maroski, Bernd J. Vorderwülbecke, Luis Da Silva-Azevedo,

Rose Knudsen, Robert Lehmann, Katarzyna Fiedorowicz, Mauro Bongrazio, Bianca Nitsche, Michael Hoepfner, Beata Styp-Rekowska, Axel R. Pries, Andreas Zakrzewicz. Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries. J Cell Physiol. 2011;226(2):350-61.

65 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Sprouting assay, Immunfluoreszenzmikroskopie, scratch wound closure assay, Intravitalmikroskopie, Datenauswertung, Anfertigung von Abbildungen, Entwicklung des Projekts, Verfassen der Veröffentlichung

Publikation 3: Christian J. Hoffmann, Margret Hohberg, Sven Chlench, Julian Maroski, Marek Drab, Günter Siegel, Axel R. Pries, Andreas Zakrzewicz. Suppression of Zinc finger protein 580 by high oxLDL/LDL-ratios is followed by enhanced expression of endothelial IL-8. Atherosclerosis. 2011;216(1):103-8.

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Immunfluoreszenzfärbung, Mikroskopie, Anfertigung einer Abbildung

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers Prof. Dr. Axel R. Pries

Unterschrift der Doktorandin Margret Hohberg

Hohberg M, Knöchel J, Hoffmann CJ, Chlench S, Wunderlich W, Alter A, Maroski J, Vorderwülbecke B, Da Silva-Azevedo L, Knudsen R, Lehmann R, Fiedorowicz K, Bongrazio M, Styp-Rekowska B, Pries AR, Zakrzewicz A. Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries. *J Cell Physiol.* 2011;226(2):350-61.

Chlench S, Mecha Disassa N, Hohberg M, Hoffmann C, Pohlkamp T, Beyer G, Bongrazio M, Da Silva-Azevedo L, Baum O, Pries AR, Zakrzewicz A. Regulation of Foxo-1 and the angiotensin-2/Tie2 system by shear stress. FEBS Lett 2007;581:673-80.

Hoffmann CJ, Hohberg M, Chlench S, Maroski J, Drab M, Siegel G, Pries AR, Zakrzewicz A. Suppression of Zinc finger protein 580 by high oxLDL/LDL-ratios is followed by enhanced expression of endothelial IL-8. *Atherosclerosis* 2011; 216(1):103-8.

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Originalarbeiten als Erstautor

- | | IF |
|---|-----------|
| 1. Hohberg M , Knöchel J, Hoffmann CJ, Chlench S, Wunderlich W, Alter A, Maroski J, Vorderwülbecke B, Da Silva-Azevedo L, Knudsen R, Lehmann R, Fiedorowicz K, Bongrazio M, Styp-Rekowska B, Pries AR, Zakrzewicz A. Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries. <i>J Cell Physiol.</i> 2011;226(2):350-61. | 3,986 |

Originalarbeiten als Koautor

- | | IF |
|---|-----------|
| 1. Chlench S, Mecha Disassa N, Hohberg M , Hoffmann C, Pohlkamp T, Beyer G, Bongrazio M, Da Silva-Azevedo L, Baum O, Pries AR, Zakrzewicz A. Regulation of Foxo-1 and the angiotensin-2/Tie2 system by shear stress. <i>FEBS Lett</i> 2007;581:673-80. | 3,538 |
| 2. Hoffmann CJ, Hohberg M , Chlench S, Maroski J, Drab M, Siegel G, Pries AR, Zakrzewicz A. Suppression of Zinc finger protein 580 by high oxLDL/LDL-ratios is followed by enhanced expression of endothelial IL-8. <i>Atherosclerosis</i> 2011; 216(1):103-8. | 3,794 |

Ich danke
Klaus Arden,
meiner Familie,
sowie meinem Doktorvater
für die
vorbildliche Betreuung.