

Aus der Medizinischen Klinik m.S. Kardiologie, Pulmologie und
Angiologie der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss atherogener vs. atheroprotektiver Flussprofile auf
die endotheliale
Genexpression –
G-Protein-abhängige Signaltransduktion und epigenetische
Regulationsmechanismen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Degkwitz

aus Heidelberg

Datum der Promotion: 06.03.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	11
Abstract	13
1. Einleitung	15
1.1 Atherosklerose – Epidemiologie und klinische Relevanz	15
1.2 Atherosklerose – Definition und Pathogenese	15
1.3 Atherosklerose und Blutflussprofile	16
1.3.1 Prädilektionsstellen atherosklerotischer Plaques.....	16
1.3.2 Blutflussprofile und endotheliale Scherkräfte.....	17
1.3.3 Atheroprotektiver vs. atherogener Fluss und Phänotyp.....	18
1.3.4 Atherogene Gene	19
1.4 Endotheliale Mechanotransduktion	21
1.4.1 Heterotrimere G-Proteine	21
1.4.2 G-Proteine als mögliche Mediatoren eines atherogenen Phänotyps	22
1.5 Epigenetik	23
1.5.1 Organisation der DNA	24
1.5.2 Epigenetische Regulationsmechanismen.....	24
1.5.3 Posttranslationale Histon-Modifikationen.....	24
1.5.4 Histon-Azetylierung und -Deazetylierung	25
1.5.5 Histon-Azetylierung und -Deazetylierung: Regulation atherogener Marker	26
1.6 Fragestellung	28
2. Methoden	29
2.1 Das Ibidi-Flusskammer-System	29
2.2 Versuchsaufbau der Flusskammer-Experimente	31
2.3 Kultivierung Humaner Umbilikaler Venöser Endothelzellen	33
2.3.1 Allgemeine Materialien	33
2.3.2 Spezifische Materialien.....	33
2.3.3 Durchführung.....	33
2.4 Versuchsablauf der Flusskammer-Experimente	34
2.4.1 Zellaussaat	34
2.4.2 Transfektion.....	35
2.4.3 Anschluss der kanalisiertem Objektträger und Flusseinstellungen.....	36

2.4.4 Zellernte und -weiterverarbeitung	37
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	38
2.5.1 Allgemeine Materialien	38
2.5.2 RNA-Isolation	38
2.5.3 Reverse Transkription	39
2.5.4 TaqMan-qtRT-PCR.....	40
2.6 Microarray	42
2.7 Statistische Auswertung.....	43
3. Ergebnisse	44
3.1 G _{q/11} -abhängige Genexpression atherogener Marker unter Fluss.....	44
3.2 G _{q/11} -abhängige Regulation Chromatin-modifizierender Enzyme unter Fluss	47
3.3 Funktioneller Knockdown Chromatin-modifizierender Enzyme	49
3.3.1 KAT7-Knockdown.....	49
3.3.2 HDAC9-Knockdown.....	51
4. Diskussion	53
4.1 G _{q/11} -abhängige Signaltransduktion unter atherogenem Fluss.....	53
4.2 Epigenetische Regulation des atherogenen Phänotyps.....	54
4.2.1 KAT7	54
4.2.2 HDAC9	56
Literaturverzeichnis.....	60
Eidesstattliche Versicherung	73
Lebenslauf.....	74
Danksagung.....	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ibidi-Flusskammer-System

Abbildung 2: Funktionsprinzip Ibidi-Flusskammer-System

Abbildung 3: Kanalisierter Objektträger mit Zellrasen

Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau

Abbildung 5: Zeitstrahl Versuchsablauf

Abbildung 6: Relative mRNA-Expression von VCAM-1 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-G α _{q/11}-siRNA

Abbildung 7: Relative mRNA-Expression von PDGF- β unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-G α _{q/11}-siRNA

Abbildung 8: Relative mRNA-Expression von CCL-2 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-G α _{q/11}-siRNA

Abbildung 9: Relative mRNA-Expression von ET-1 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-G α _{q/11}-siRNA

Abbildung 10: Relative mRNA-Expression von KAT7 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-G α _{q/11}-siRNA

Abbildung 11: Relative mRNA-Expression von HDAC9 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-G α _{q/11}-siRNA

Abbildung 12: Relative mRNA-Expression von CCL-2 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-KAT7-siRNA

Abbildung 13: Relative mRNA-Expression von ET-1 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-KAT7-siRNA

Abbildung 14: Relative mRNA-Expression von CCL-2 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-HDAC9-siRNA

Abbildung 15: Relative mRNA-Expression von ET-1 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-HDAC9-siRNA

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema Transfektion

Tabelle 2: Mastermix Reverse Transkription

Tabelle 3: Protokoll TaqMan-qtRT-PCR

Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
AP-1	Aktivator Protein 1
CCL-2	CC-Chemokine Ligand 2
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
c-fos	Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1
c-jun	Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1
Ct	Cycle of treshold
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonucleic Acid
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
E1/2/3/4	Flusseinheit 1/2/3/4
E-Selektin	ein Zelladhäsionsmolekül
ET-1	Endothelin-1
FAK	Focal Adhesion Kinase
GNAT	Gcn5-Related N-Acetyltransferases
G _q , G ₁₁	GTP bindende Proteine
GDP/GTP	Guanosindi-/triphosphat
H	Histonmolekül
HAT	Histon-Azetyltransferase(n)
HDAC	Histon-Deazetylase(n)
HUVEC	Humane Umbilikae Venöse Endothelzellen
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL-8	Interleukin 8

IP3	Inositoltriphosphat
JNK	c-jun N terminal Kinase
KAT7	Eine Histon-Azetyltransferase
KDM2B	Lysine Demethylase 2B
KLF-2	Kruppel-Like Factor 2
LDL	Low-Density Lipoprotein
MEF-2	Myocyte Enhancer Factor 2
MHC II	Major histocompatibility complex II
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MYST	Eine Gruppe von Histon-Azetyltransferasen
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFκB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NRF-2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF-β	Platelet-Derived Growth Factor Beta
PECAM-1	Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
P300/CBP	Eine Gruppe von Histon-Azetyltransferasen
p53	Ein Tumorsupressorgen
p65	Nuclear Factor NF-kappa-B p65 Subunit
RNA	Ribonucleic Acid
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
siRNA	small interfering Ribonucleic Acid
SIRT	Sirtuine, eine Gruppe von Histon-Deazetylasen

TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VE-Cadherin	Vascular Endothelial Cadherin
VEGFR2	vascular endothelial growth factor receptor 2
qtRT-PCR	quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction

Zusammenfassung

Atherosklerose, eine chronisch-inflammatorische und fibroproliferative Erkrankung der arteriellen Gefäße, und deren klinische Krankheitsmanifestationen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall sind führende Ursachen für Mortalität und Morbidität in Deutschland und den westlichen Industrienationen. Risikofaktoren, die zu Atherosklerose führen, sind Rauchen, Dyslipidämie, Diabetes mellitus und arterieller Hypertonus. Trotz der systemischen Wirkung dieser Risikofaktoren treten atherosklerotische Läsionen bevorzugt in bestimmten Bereichen des Gefäßsystems wie Gefäßbifurkationen und Gefäßkurvaturen auf. An diesen Prädilektionsstellen kommt es zu sogenanntem atherogenem Fluss. Dieser ist durch langsamen Fluss, Flussaufspaltung und Flussrichtungsänderungen gekennzeichnet. Daraus resultieren reduzierte endotheliale Scherkräfte, welche zu einem atherogenem Phänotyp mit vermehrter Expression proinflammatorischer Marker führen und damit die Atheroskleroseentwicklung begünstigen. Der Prozess der endothelialen Mechanotransduktion, also die Übertragung Blutfluss-induzierter endothelialer Scherkräfte in biochemische Signale, ist nicht vollständig verstanden. Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen inwieweit die G-Proteinuntereinheiten $G_{q/11}$ unter atherogenem Fluss die Expression atherogener Marker in Endothelzellen regulieren.

Mittels siRNA-Knockdown gegen $G_{q/11}$ in Endothelzellen konnten wir die Expression der atherogenen Marker VCAM-1, CCL-2, PDGF- β , und ET-1 unter atherogenem Fluss deutlich abschwächen. Da es Hinweise gibt, dass die Ausbildung eines atherogenen Phänotyps auch auf epigenetischer Ebene durch posttranslationale Histon-Modifikationen reguliert wird, führten wir einen genomweiten Microarray durch, um eine mögliche Fluss- und $G_{q/11}$ -abhängige Regulation Chromatin-modifizierender Enzyme zu identifizieren. Dabei konnten wir zeigen, dass die Chromatin-modifizierenden Enzyme Histon-Azetyltransferase KAT7 und die Histon-Deazetylase HDAC9 abhängig vom zugrunde liegenden Flussprofil (d.h. atherogener- oder atheroprotektiver Fluss) und $G_{q/11}$ -abhängig reguliert werden. Mittels anschließenden funktionellen Knockdown-Versuchen konnten wir zeigen, dass ein siRNA-Knockdown gegen KAT7 zu einer reduzierten Expression von CCL-2 und ein HDAC9-siRNA-Knockdown zu einer Hochregulation von CCL-2 und ET-1 unter atherogenem Fluss führt.

Schlussfolgerung: In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die Ausbildung eines atherogenen Phänotyps unter atherogenem Fluss und dessen Regulation auf epigenetischer Ebene G_{q/11}-vermittelt ist. Darüber hinaus deuten unsere Ergebnisse auf eine atherogene Wirkung von KAT7 und eine atheroprotektive Wirkung von HDAC9 im Kontext der Atherosklerose hin.

Abstract

Atherosclerosis, a chronic inflammatory and fibroproliferative disease of arterial vessels, and its clinical manifestations myocardial infarction or stroke are leading causes of mortality and morbidity in Germany and western industrial countries. Risk factors that promote atherosclerosis are smoking, dyslipidemia, diabetes mellitus and arterial hypertension. However, despite the systemic effect of these risk factors atherosclerotic lesions preferentially occur at distinct areas of the cardiovascular system like bifurcations and curvatures. At this predisposed sites so-called atherogenic flow can be found. Atherogenic flow is characterized by slow flow, flow separation and direction-changing flow. This results in reduced endothelial shear stress leading to an atherogenic phenotype with increased expression of proinflammatory markers in endothelial cells and thus promoting the development of atherosclerosis. The process of endothelial mechanotransduction, i.e. the transduction of bloodflow-induced endothelial shear stress in biochemical signals, is not completely understood. The aim of this study is to investigate the role of the G-Protein subunits $G_{q/11}$ in regulating the expression of atherogenic markers under atherogenic flow in endothelial cells.

Via siRNA-knockdown of $G_{q/11}$ in endothelial cells we could measurably reduce the expression of the atherogenic markers VCAM-1, CCL-2, PDGF- β and ET-1 under atherogenic flow. Because there is several evidence that the formation of an atherogenic phenotype is regulated on an epigenetical level by posttranslational modification of histones we performed a genome-wide microarray in order to identify a potential flow- and $G_{q/11}$ -dependent regulation of chromatin-modifying enzymes. We could show that the chromatin-modifying enzymes histone-acetyltransferase KAT7 and histone-deacetylase HDAC9 are regulated depending on the flow pattern (i.e. atherogenic or atheroprotective) and in a $G_{q/11}$ -dependent manner. Via knockdown experiments we could show that siRNA knockdown against KAT7 reduces expression of CCL-2 and siRNA knockdown against HDAC9 increases expression of CCL-2 and ET-1 under atherogenic flow.

Conclusion: In this study we could show that the formation of an atherogenic phenotype under atherogenic flow and its regulation on an epigenetical level are mediated by $G_{q/11}$. In addition our results indicate an atherogenic effect of KAT7 and an atheroprotective effect of HDAC9 in the context of atherosclerosis.

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose – Epidemiologie und klinische Relevanz

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören nach wie vor weltweit zu den führenden Todesursachen (Mortality and Causes of Death 2016). Fast ein Drittel aller Tode weltweit wird auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückgeführt – beinahe doppelt so viele wie durch Krebserkrankungen (Townsend, Nichols et al. 2015). Ein Großteil dieser kardiovaskulären Todesfälle geht dabei auf zerebrale oder kardiale Manifestationsformen der Atherosklerose in Form eines Schlaganfalls oder Herzinfarkts zurück. Die gesundheitlichen und daraus resultierenden ökonomischen Folgen stellen das Gesundheitssystem vor große Herausforderungen. Daher kommt der Erforschung der Pathophysiologie der Atherosklerose und der darauf basierenden Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze große Bedeutung zu.

1.2 Atherosklerose – Definition und Pathogenese

Atherosklerose ist eine komplexe, chronisch-inflammatorische und fibroproliferative Erkrankung, die vorzugsweise große und mittelgroße Arterien betrifft (Ross 1999) und durch eine Anreicherung von Lipiden und Faserelementen in der Gefäßwand betroffener Arterien gekennzeichnet ist (Lusis 2000). Die chronische Inflammation entsteht aus einer Interaktion von modifizierten Lipoproteinen, Makrophagen, T-Zellen und den Zellen der Arterienwand, insbesondere Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Glass and Witztum 2001). Wichtige und in bisherigen Untersuchungen gut etablierte Risikofaktoren für die Pathogenese der Atherosklerose sind Dyslipidämie, Rauchen, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus. Daneben gibt es weitere Risikofaktoren wie beispielsweise chronische Infektionen und Feinstaub, deren genaue Rolle und Beitrag zur Atheroskleroseentstehung derzeit noch untersucht wird, die aber künftig im pathophysiologischen Modell der Atherosklerose Berücksichtigung finden könnten (Adar, Sheppard et al. 2013, Kunzli 2013, Campbell and Rosenfeld 2015, Kaufman, Spalt et al. 2016, Hadley, Baumgartner et al. 2018). All diese Faktoren schädigen für sich genommen und insbesondere in Kombination das Gefäßendothel

und bringen seine homeostatischen Eigenschaften aus dem Gleichgewicht. Dadurch entwickelt sich ein proinflammatorischer Zustand, der als endotheliale Dysfunktion bezeichnet wird. Die endotheliale Dysfunktion ist gekennzeichnet durch die Erhöhung der Endothel-Permeabilität, einen erhöhten Zellumsatz, eine Erhöhung der Adhäsivität für Leukozyten und die vermehrte Expression proinflammatorischer Signalmoleküle wie Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), CC-Chemokine Ligand 2 (CCL-2), Platelet-Derived Growth Factor Beta (PDGF- β) und Endothelin-1 (ET-1) (Ross 1999). Infolge der endothelialen Dysfunktion kommt es zur Retention, Akkumulation und Oxidation von im Blutkreislauf zirkulierenden Lipoproteinen niedriger Dichte (Low-Density Lipoprotein, LDL) sowie zum Einwandern von Leukozyten, insbesondere Monozyten, und glatten Muskelzellen in die Intima der Gefäßwand. Dort nehmen Monozyten und glatte Muskelzellen modifiziertes LDL auf, werden zu sogenannten Schaumzellen und bilden einen atherosklerotischen Plaque. Durch eine erhöhte glattmuskuläre Synthese von Molekülen der extrazellulären Matrix entsteht zum Gefäßlumen hin eine den Plaque bedeckende fibröse Kappe (Ross 1999, Glass and Witztum 2001). Durch Apoptose der eingewanderten Zellen und deren ineffiziente Phagozytose kommt es im Zentrum des Plaque zur Anhäufung von zellulärem Debris. So bildet sich im Verlauf ein fettreicher und nekrotischer Kern aus. Durch die anhaltende Migration von glatten Muskelzellen, Makrophagen und Lymphozyten in die Gefäßwand und dem damit einhergehenden Größenwachstum des Plaque kommt es zu einer sukzessiven Lumeneinengung mit reduziertem Blutfluss. Außerdem besteht das Risiko, dass es zum Einreißen der luminal gelegenen fibrösen Kappe mit massiver Freisetzung gerinnungsaktiver Substanzen aus dem nekrotischen Kern des Plaque kommt, was zu einem thrombembolischen Verschluss stromabwärts liegender Gefäßabschnitte führen kann (Libby, Ridker et al. 2011).

1.3 Atherosklerose und Blutflussprofile

1.3.1 Prädilektionsstellen atherosklerotischer Plaques

Obwohl die oben genannten Risikofaktoren wie Rauchen, Arterielle Hypertonie, Diabetes und Dyslipidämie im gesamten Blutkreislauf wirken, treten atherosklerotische Plaques nicht überall im Herz-Kreislauf-System in gleichem Maße auf. Zu den

betroffenen Gebieten zählen vor allem Gefäßaufzweigungen, Gefäßbifurkationen und Gefäßkurvaturen, zusammengefasst also Gefäßareale mit geometrischen Unregelmäßigkeiten (Caro, Fitz-Gerald et al. 1969). Auffällig ist, dass an diesen Prädilektionsstellen besondere Blutflussprofile vorliegen, die durch die dortige Gefäßgeometrie bedingt sind (Chatzizisis, Coskun et al. 2007).

1.3.2 Blutflussprofile und endotheliale Scherkräfte

Das Blutflussprofil im Gefäßsystem hängt von der Blutflussgeschwindigkeit und der geometrischen Beschaffenheit des vaskulären Systems ab. In relativ geraden Gefäßabschnitten ohne geometrische Unregelmäßigkeiten wie beispielsweise Gefäßaufzweigungen ist der Blutfluss unidirektional und durch glatte Stromlinien charakterisiert. In Gefäßabschnitten mit geometrischen Unregelmäßigkeiten hingegen weist der Blutfluss Areale mit langsamem Fluss, Flussaufspaltung und Flussrichtungsänderungen, mit teilweise rückwärtsgerichtetem Fluss, auf. Dies wird zusammengenommen als gestörter Fluss bezeichnet (Malek, Alper et al. 1999, Chatzizisis, Coskun et al. 2007).

Durch das Entlangfließen des Blutes an der Gefäßwand entstehen endotheliale Scherkräfte. Allgemein entstehen Scherkräfte in Flüssigkeiten durch die Reibung zwischen zwei virtuellen Schichten und werden bestimmt durch die unterschiedliche Bewegung der zwei Schichten zueinander (dv/dy) und der Viskosität (μ) zwischen diesen Schichten (Cecchi, Giglioli et al. 2011). Die Formel lautet demnach: endotheliale Scherkraft = $\mu \times dv/dy$, [Dyn/cm²] (Chatzizisis, Coskun et al. 2007). Auf das Gefäßsystem übertragen entsprechen diesen beiden Schichten die Blutschicht und die Endothelzellschicht, wobei es durch den Blutfluss zu einer Abscherung der Endothelzellschicht kommt (Cecchi, Giglioli et al. 2011).

Stromlinienförmiger, unidirektionaler Blutfluss führt zu hohen Scherkräften zwischen 15 und 70 Dyn/cm². Im Gegensatz dazu weisen geometrisch unregelmäßige Gefäßabschnitte mit gestörtem Fluss geringe Scherkräfte mit <10 bis 12 Dyn/cm² auf (Chatzizisis, Coskun et al. 2007, Cecchi, Giglioli et al. 2011).

1.3.3 Atheroprotektiver vs. atherogener Fluss und Phänotyp

Atherosklerotische Plaques treten bevorzugt an Stellen mit geometrischen Unregelmäßigkeiten und damit in Gefäßabschnitten mit gestörtem Fluss und daraus resultierend reduzierten Scherkräften auf. An diesen Prädilektionsstellen weist das Gefäßendothel einen atherogenen Phänotyp auf (Passerini, Polacek et al. 2004, Davies, Civelek et al. 2013), was sich in einem proinflammatorischen Genexpressionsprofil widerspiegelt (Dai, Kaazempur-Mofrad et al. 2004). So findet sich der proinflammatorische Transkriptionsfaktor Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFκB) in atherosklerotischen Plaques in aktiviertem Zustand und wird durch gestörten Fluss vermehrt exprimiert (Mohan, Mohan et al. 1997, Nagel, Resnick et al. 1999, Cuhlmann, Van der Heiden et al. 2011), wohingegen in atherosklerosefreien Gefäßabschnitten kein oder kaum aktiviertes NFκB zu finden ist (Brand, Page et al. 1996). Durch NFκB wiederum werden endotheliale Gene aktiviert, die bei der Pathophysiologie der Atherosklerose eine wichtige Rolle spielen. Dazu zählen Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1 und Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) oder E-Selektin, Chemokine wie CCL-2 und Interleukin 8 (IL-8) sowie Wachstumsfaktoren wie PDGF-β (Khachigian, Resnick et al. 1995, Collins and Cybulsky 2001). Die vermehrte Expression der genannten Gene begünstigt die Entwicklung der bereits oben beschriebenen endothelialen Dysfunktion, die sich durch erhöhte Permeabilität für Plasmamoleküle, erhöhte endotheliale Proliferationsrate und erhöhte Adhäsivität für Leukozyten auszeichnet (Ross 1999). Für sich genommen reicht diese geringgradige inflammatorische Aktivierung des Endothels durch gestörten Fluss jedoch nicht aus, um einen anhaltenden inflammatorischen Zustand herzustellen und aufrecht zu erhalten (Conway and Schwartz 2013). Kommen jedoch die oben genannten Risikofaktoren der Atherosklerose wie Arterielle Hypertonie, Rauchen, Diabetes mellitus und Dyslipidämie hinzu, besteht eine erhöhte Gefahr, dass sich eine manifeste vaskuläre Entzündung und ein atherosklerotischer Plaque entwickeln. Man geht also davon aus, dass gestörter Fluss das Endothel in einen für weitere Risikofaktoren anfälligeren Zustand versetzt (Hajra, Evans et al. 2000, DeVerse, Sandhu et al. 2013). Demnach ist der gestörte Fluss kein weiterer individueller Risikofaktor für die Atheroskleroseentstehung, sondern muss im Kontext mit bereits etablierten Risikofaktoren gesehen werden. Im Folgenden wird gestörter

Fluss mit daraus resultierend geringen Scherkräften daher auch als atherogener Fluss bezeichnet (Cheng, Tempel et al. 2006, Chatzizisis, Coskun et al. 2007).

Hier sei jedoch auch angemerkt, dass es Gefäßabschnitte gibt, die weniger oder kaum von Atherosklerose betroffen sind, obwohl dort atherogener Fluss zu beobachten ist. Dazu zählen beispielsweise die Arteria thoracica interna und die Arteria femoris profunda (Marx, Jax et al. 2001, Halvorson, Taylor et al. 2008).

In Gefäßabschnitten, die üblicherweise nicht von Atherosklerose betroffen sind herrscht vorwiegend unidirektionaler und stromlinienförmiger Fluss mit daraus resultierend hohen Scherkräften (Dai, Kaazempur-Mofrad et al. 2004, Libby 2012). In Gefäßabschnitten mit unidirektionalem, stromlinienförmigem Fluss exprimieren die Endothelzellen vermehrt atheroprotektive Gene wie die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) (Kuchan and Frangos 1994, Ranjan, Xiao et al. 1995, Topper, Cai et al. 1996) und Kruppel Like Factor 2 (KLF-2) (Dekker, van Soest et al. 2002, Nigro, Abe et al. 2011, Gimbrone and Garcia-Cardena 2013). Die Expression atherogener Gene hingegen ist herunterreguliert (McCormick, Eskin et al. 2001). Daher wird unidirektionaler, stromlinienförmiger Fluss mit daraus resultierend hohen Scherkräften im Folgenden auch als atheroprotektiver Fluss bezeichnet.

Im Folgenden soll kurz genauer auf einzelne für die Pathophysiologie der Atherosklerose relevante atherogene Gene eingegangen werden.

1.3.4 Atherogene Gene

1.3.4.1 VCAM-1

VCAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül, das die Adhäsion von $\alpha 4\beta 1$ -Integrin exprimierenden, zirkulierenden Monozyten und T-Lymphozyten fördert, die im Initiationsprozess atherosklerotischer Plaques eine wichtige Rolle spielen (Libby, Ridker et al. 2011). So lässt sich insbesondere in Frühstadien atherosklerotischer Plaques eine erhöhte Expression von VCAM-1 im Endothel feststellen (Cybulsky and Gimbrone 1991). Bei Hasen und Mäusen zeigt sich in Gefäßabschnitten, die anfällig für das Entstehen von Atherosklerose sind, eine erhöhte Expression von VCAM-1, die durch eine Hypercholesterinämie, also Dyslipidämie, noch verstärkt werden (Iiyama,

Hajra et al. 1999). Unter atherogenem Fluss wird VCAM-1 vermehrt in Endothelzellen exprimiert (Walpola, Gotlieb et al. 1995, Chappell, Varner et al. 1998). Atheroprotektiver Fluss hingegen führt zu einer Herunterregulation von VCAM-1 in Endothelzellen (Nagel, Resnick et al. 1994, Chiu, Lee et al. 2004).

1.3.4.2 CCL-2

CCL-2 spielt bei der auf die Adhäsion folgenden Diapedese, also dem Einwandern von Leukozyten in die Intima der Gefäßwand, und damit, ebenso wie VCAM-1, in frühen Atherosklerosestadien eine wichtige Rolle (Boring, Gosling et al. 1998, Gu, Okada et al. 1998). CCL-2 verstärkt die Ligandenbindung zwischen VCAM-1 und dem Liganden $\alpha\beta 1$ -Integrin auf Leukozyten und trägt so maßgeblich zur Rekrutierung von Monozyten in die Arterienwand bei (Collins and Cybulsky 2001). Atherogener Fluss hat eine vermehrte endotheliale Expression von CCL-2 zur Folge (Bao, Lu et al. 1999, Hsiai, Cho et al. 2003). Unter atheroprotektivem Fluss kommt es zwar zunächst ebenso zu einer Erhöhung der CCL-2-Expression, diese gesteigerte Expression ist allerdings nur transient und anhaltender atheroprotektiver Fluss führt zu einer Herunterregulation von CCL-2 (Shyy, Hsieh et al. 1994).

1.3.4.3 PDGF- β

PDGF- β ist ein Wachstumsfaktor mit wichtigen chemotaktischen und mitogenen Eigenschaften. Die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen kann durch PDGF- β moduliert werden, was bei Gefäßverletzungen und Atherosklerose eine wichtige Rolle spielt (Palumbo, Gaetano et al. 2002). In atheroklerotischen Plaques findet sich vermehrt PDGF- β -mRNA in Endothelzellen (Wilcox, Smith et al. 1988). Atheroprotektiver Fluss führt, ähnlich wie bei CCL-2, zunächst zu einer transienten Erhöhung der Expression von PDGF- β ; anhaltender atheroprotektiver Fluss führt zu einer Herunterregulation von PDGF- β in Endothelzellen (Hsieh, Li et al. 1991, Malek, Gibbons et al. 1993). Hingegen führt atherogener Fluss zur vermehrten endothelialen Expression von PDGF- β (Hsieh, Li et al. 1991).

1.3.4.4 ET-1

ET-1 ist ein starker vasokonstriktorischer Mediator (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988). Darüber hinaus besitzt ET-1 mitogene Eigenschaften auf glatte Muskelzellen (Hirata, Takagi et al. 1989) und spielt dadurch, vergleichbar mit PDGF- β , ebenfalls in fortgeschrittenen Atherosklerosestadien eine wichtige Rolle. Unter atherogenem Fluss ist ET-1 in Endothelzellen hochreguliert (Yoshizumi, Kurihara et al. 1989, Kuchan and Frangos 1993, Ziegler, Bouzourene et al. 1998). Im Gegensatz dazu führt atheroprotektiver Fluss zu einer Suppression der endothelialen ET-1-Expression (Nollert, Diamond et al. 1991, Malek and Izumo 1992).

Nachdem nun auf die unterschiedlichen Blutflussprofile und die damit einhergehenden Veränderungen der Genexpression eingegangen wurde, stellt sich die Frage, wie Endothelzellen diese unterschiedlichen Blutflussprofile registrieren und in intrazelluläre Signalkaskaden umkodieren. Dieser Prozess wird als endotheliale Mechanotransduktion bezeichnet und soll nun näher erläutert werden.

1.4 Endotheliale Mechanotransduktion

Der Begriff Mechanotransduktion beschreibt den Prozess des Übertragens physikalisch-mechanischer Kräfte in biologische Signale (Jalouk and Lammerding 2009). Was die Wahrnehmung von unterschiedlichen Blutflussprofilen bzw. Scherkräften durch Endothelzellen angeht, wurden unterschiedliche Mechanosensoren postuliert. Zu diesen zählen beispielsweise das Zytoskelett, Cav3.2T-type Kanäle, Dehnungsabhängige Na⁺- und K⁺-Kanäle, Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (PECAM-1), die apikale Glykokalix, Caveolae, primäre Zilien und heterotrimere G-Proteine (Hahn and Schwartz 2009, Frueh, Maimari et al. 2013).

1.4.1 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine erscheinen im Kontext oben beschriebener Mechanotransduktion besonders interessant, da sie auf eine endotheliale Flussexposition hin innerhalb weniger als einer Sekunde aktiviert werden, was wohl die früheste endotheliale Reaktion auf Fluss-induzierte Scherkräfte darstellt (Gudi,

Clark et al. 1996, Gudi, Huvar et al. 2003). Die Funktionsweise von G-Protein-vermittelter Signaltransduktion basiert auf der Interaktion von einem Rezeptor, einem heterotrimeren G-Protein und einem Effektor. Heterotrimere G-Proteine bestehen aus einer α -Untereinheit, die Guanosin triphosphat (GTP) binden und hydrolysieren kann, und einer β - und γ -Untereinheit, die einen nicht-dissoziierbaren Komplex bilden. Im nicht aktivierten Zustand sind die $\beta\gamma$ -Untereinheiten mit der Guanosindiphosphat (GDP)-bindenden α -Untereinheit assoziiert. Bindet ein aktivierter Rezeptor an das Heterotrimer führt dies zu einem Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit. Daraufhin dissoziiert die GTP-bindende α -Untereinheit vom Rezeptor und den $\beta\gamma$ -Untereinheiten, wodurch sowohl die α -Untereinheit als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheiten in die Lage versetzt werden, Effektormoleküle zu modulieren bzw. zu aktivieren. Erst wenn die der α -Untereinheit inhärente GTPase GTP zu GDP hydrolysiert hat, wird die aktivierte Signalkaskade abgebrochen. Es kommt dann wieder zum Ausgangszustand mit GDP-bindender α -Untereinheit und assoziierten $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die funktionelle Vielfalt G-Protein-vermittelter Signalwege basiert auf den verschiedenen Subtypen von G-Proteinen, die man in 4 Familien einteilt: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}/G_{\alpha o}$, $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$, und $G_{\alpha 12}/G_{\alpha 13}$. Die $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ -G-Protein-Familie koppelt Rezeptoren zu β -Isoformen der Phospholipase C, wobei diese Rezeptoren nicht zwischen $G_{\alpha q}$ und $G_{\alpha 11}$ unterscheiden. Phospholipase C hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). DAG fungiert als intrazellulärer second messenger und aktiviert Proteinkinase C wodurch weitere Signalmoleküle phosphoryliert und aktiviert werden. IP₃ bindet an IP₃-Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums, wodurch es zur Freisetzung von Calcium kommt, welches wiederum als second messenger wirkt und weitere intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert (Wettschureck and Offermanns 2005).

1.4.2 G-Proteine als mögliche Mediatoren eines atherogenen Phänotyps

Neben der im vorigen Kapitel beschriebenen Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch einen Liganden, gibt es auch Hinweise dafür, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren direkt durch mechanische Kräfte wie Scherkräfte aktiviert werden können (Zou, Akazawa et al. 2004, Chachisvilis, Zhang et al. 2006, Dela Paz, Melchior et al. 2017). Darüber hinaus führt die Applikation von Fluss zu einer Änderung der Membranfluidität (Butler, Norwich et al. 2001), welche wiederum direkt, also

Rezeptor-unabhängig, die Aktivität von G-Proteinen moduliert (Gudi, Clark et al. 1996, Gudi, Nolan et al. 1998). Wie oben beschrieben induziert atherogener Fluss einen proinflammatorischen endothelialen Phänotyp, der durch eine gesteigerte Expression atherogener Marker wie VCAM-1, CCL-2, PDGF- β und ET-1 reflektiert wird. Daraus ergibt sich die Frage, ob G-Proteine bei der atherogenen Mechanotransduktion und Induktion eines proinflammatorischen Phänotyps eine Rolle spielen. Neuere Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass die G-Protein-Familie $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ (in der Folge vereinfacht als $G_{q/11}$ bezeichnet) und das als atherogen geltende PECAM-1 einen mechanosensitiven Komplex bilden. So findet man in Gefäßabschnitten, die von Atherosklerose weniger betroffen sind, $G_{q/11}$ und PECAM-1 an Zell-Zell-Kontakten zusammen lokalisiert, während in Gefäßabschnitten, die vermehrt atherosklerotische Plaques aufweisen, kein $G_{q/11}$ an Zell-Zell-Kontakten zu finden ist (dela Paz, Melchior et al. 2014). Unter atherogenem Fluss kommt es zur Dissoziation von $G_{q/11}$ und PECAM-1 und zur perinukleären Lokalisierung von $G_{q/11}$, wodurch möglicherweise proinflammatorische Signalwege aktiviert werden (Otte, Bell et al. 2009).

1.5 Epigenetik

Wie oben beschrieben spielen in der Pathogenese der Atherosklerose unterschiedliche Gene eine wichtige Rolle, deren Aktivität unter anderem durch Scherkräfte und möglicherweise durch G-Proteine reguliert werden kann. Darüber hinaus kann die Expression von Genen auch durch epigenetische Prozesse moduliert werden (Wierda, Geutskens et al. 2010). Die Tatsache, dass epigenetische Modifikationen potenziell reversibel sind, machen sie zu interessanten pharmakologischen Zielstrukturen, die therapeutisch beeinflusst werden können (Mai 2007).

Die Zellen eines multizellulären Organismus besitzen zwar alle die gleiche Desoxyribonucleic Acid (DNA), unterscheiden sich aber je nach Funktionalität in ihren Genexpressionsprofilen (Jaenisch and Bird 2003). Es können also auf Grundlage der gleichen DNA-Sequenz unterschiedliche Phänotypen hervorgebracht werden, ohne dass die DNA dabei verändert wird. Die Epigenetik beschäftigt sich mit den

Mechanismen, die dieser Expressionsregulation zu Grunde liegen (Goldberg, Allis et al. 2007).

1.5.1 Organisation der DNA

Jede menschliche Zelle besitzt in ihrem Zellkern 46 Chromosomen. Das Material aus dem sich die einzelnen Chromosomen bilden wird Chromatin genannt. Chromatin besteht aus einem DNA-Protein-Komplex, der sich wiederum zusammensetzt aus DNA und Histon-Proteinen bzw. Nicht-Histon-Proteinen (Luger, Mader et al. 1997). Die nächst kleinere Baueinheit sind die Nukleosomen. Ein Nukleosom besteht aus 8 Histonmolekülen (H), je zwei der vier Histontypen H2A, H2B, H3 und H4, um die 146 Basenpaare DNA gewickelt sind. Die Histonoktamere sind über sogenannte Verbindungs-DNA, welche mit dem Histonmolekül H1 (Verbindungshiston) assoziiert sind, verbunden (Matouk and Marsden 2008). Die einzelnen Nukleosomen bilden aneinandergereiht das Chromatin (Kornberg 1977).

1.5.2 Epigenetische Regulationsmechanismen

Die Wicklung der DNA um die Histonmoleküle ist entscheidend für die Regulation der Transkription, da diese von der Zugänglichkeit eines DNA-Abschnittes abhängig ist. Die Zugänglichkeit eines Chromatinabschnittes bestimmt die Bindungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren, die wiederum durch Interaktion mit regulatorischen Genregionen, Promotoren und Enhancern bzw. Silencern, die Transkription der sich dort befindlichen Gene regulieren können. Epigenetische Regulationsmechanismen lassen sich in 3 große Gruppen einteilen. Diese sind DNA-Basen-Modifikationen, RNA-basierte Mechanismen und posttranslationale Modifikationen von Histonen (Jenuwein and Allis 2001, Webster, Yan et al. 2013).

Im Folgenden soll genauer auf die posttranslationale Modifikation von Histonen als epigenetischer Regulationsmechanismus eingegangen werden.

1.5.3 Posttranslationale Histon-Modifikationen

Posttranslationale Histon-Modifikationen finden vorwiegend an den N-terminalen Histonmolekül-Enden statt. Die für die Histon-Modifikation verantwortlichen Enzyme lassen sich funktionell in drei verschiedene Gruppen einteilen: „Writer-“, „Eraser“- und

„Reader“-Enzyme. „Writer“-Enzyme fügen den Histonen Modifikationen zu, „Eraser“-Enzyme sind in der Lage, diese Modifikationen rückgängig zu machen und „Reader“-Enzyme erkennen die Modifikationen, können mittels spezifischer Bindungsdomänen an diese binden und so biologische Prozesse zu bestimmten Chromatinabschnitten hinleiten (Lachner, O'Carroll et al. 2001, Wang, Allis et al. 2007). Histon-Modifikationen schaffen dadurch optimale Bedingungen für Chromatin-assoziierte biologische Prozesse wie die Transkription oder DNA-Reparaturmechanismen (Wang, Allis et al. 2007). Die Kombination verschiedener Histon-Modifikationen wird auch als „Histon-Code“ bezeichnet (Jenuwein and Allis 2001). Histon-Modifikationen sind potenziell reversibel, was durch antagonistisierende Enzymgruppen abgebildet wird. So stehen beispielsweise den Histon-Azetyltransferasen (HAT) Histon-Deazetylasen (HDAC), den Histon-Methyltransferasen entsprechend Histon-Demethylasen gegenüber (Kouzarides 2007). Bei der Beschreibung einer Histon-Modifikationen gibt man das Histonmolekül (H, z.B. H3), die Aminosäure an, an der die Modifikation stattfinden, z.B. K für Lysin, und die Art der Modifikation, z.B. me3 für dreifache Methylierung (Jiang, Manduchi et al. 2015).

1.5.4 Histon-Azetylierung und -Deazetylierung

Die am besten untersuchte Modifikationsform ist die Azetylierung und Deazetylierung von Histonen. Die Azetylierung wird von HAT katalysiert, die man in 3 Gruppen einteilt: die Gcn5-Related N-Acetyltransferases (GNAT)-Familie, die MYST-Familie und die p300/CBP-Familie (Kouzarides 2007, Matouk and Marsden 2008). Insbesondere von Bedeutung für die Genexpression ist dabei die Azetylierung von Lysinresten, bei der es zur Übertragung von Azetylgruppen von Azetyl-Coenzym A Molekülen auf die ϵ -Aminogruppe des Lysins am Histonende kommt. Die Azetylierung von Lysinresten führt zu einer verringerten Wechselwirkung zwischen der negativ geladenen DNA und dem positiv geladenen Histonschwanz, was zu einer Abnahme der Chromatindichte, auch als Euchromatin bezeichnet, führt und somit die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren erleichtert. Daher wird die Histon-Azetylierung in der Regel mit der Aktivierung von transkriptionellen Prozessen in Verbindung gebracht (Sternier and Berger 2000) und HAT zu den sogenannten „Writer“-Enzymen gezählt (Wang, Allis et al. 2007).

Die Histon-Deazetylierung wird von HDAC durchgeführt. Auch hier gibt es 3 Unterfamilien: Klasse 1: HDAC1-3 und HDAC8, Klasse 2: HDAC4-7 und HDAC9-10 und Klasse 3: Sirtuine (SIRT) 1-7 (Haberland, Montgomery et al. 2009). Das Entfernen einer Azetylgruppe führt zur Erhöhung der Chromatindichte, auch als Heterochromatin bezeichnet, und damit zur verminderten Transkription (Mau and Yung 2014). HDAC zählen daher zu den „Eraser“-Enzymen (Wang, Allis et al. 2007).

Sowohl HAT als auch HDAC wirken an ihren Ziel-Promotoren in großen Proteinkomplexen und sind in der Lage auch Nicht-Histonmoleküle zu modifizieren. So können beispielsweise HAT die Transkription vieler anderer Moleküle, wie c-jun, p53 und NFκB durch direkte Azetylierung regulieren (Matouk and Marsden 2008).

Nachdem nun auf die Funktionsweise epigenetischer Regulationsmechanismen, im Speziellen die Azetylierung und Deazetylierung von Histonresten eingegangen wurde, soll im Folgenden deren Bedeutung im Rahmen der Atherosklerose und der Regulation atherogener Gene dargelegt werden.

1.5.5 Histon-Azetylierung und -Deazetylierung: Regulation atherogener Marker

Unter statischen Bedingungen gibt es Hinweise dafür, dass Histon-Azetylierungen zur vermehrten Expression proinflammatorischer Marker führen. Proinflammatorische Stimuli wie oxidierte LDL-Partikel oder Hyperglykämie führen in Endothelzellen und Monozyten zur vermehrten Azetylierung in Promotorregionen proinflammatorischer Moleküle wie CCL-2, IL-8 oder ET-1, wodurch es zur erhöhten Expression dieser Gene kommt (Dje N'Guessan, Riediger et al. 2009, Chen, Feng et al. 2010, Yun, Jialal et al. 2011). Eine HAT, die dabei eine wichtige Rolle spielt ist p300/CBP, die über die Azetylierung von NFκB wirkt und deren Inaktivierung durch Hemmstoffe zu einer verminderten Expression atherogener Marker führt (Zhang, Qiu et al. 2011, Mortuza, Feng et al. 2015). Der HAT-Inhibitor Curcumin, der signifikant die Aktivität von p300/CBP verringert und die Aktivität von HDAC2 erhöht, verringert die Cytokinexpression, darunter auch CCL-2, in hyperglykämischen humanen Monozyten (Yun, Jialal et al. 2011). Im Hinblick auf die Expression atheroskleroserelevanter Gene unter unterschiedlichen Flussprofilen hat sich bislang gezeigt, dass die Applikation von Fluss zur Histon-Azetylierung in der Promotorregion wichtiger Transkriptionsfaktoren wie c-fos und c-jun führt (Illi, Nanni et al. 2003). Atheroprotektiver Fluss aktiviert HAT,

beispielsweise p300/CPB (Dunn, Simmons et al. 2015), wodurch es zur Azetylierung in der Promotorregion von eNOS kommt und so vermehrt eNOS exprimiert wird (Fish, Matouk et al. 2005, Chen, Bacanamwo et al. 2008).

Bei den HDAC sind in bisherigen Untersuchungen je nach Subtyp sowohl atheroprotektive als auch atherogene Funktionen aufgezeigt worden. Die Überexpression von HDAC2 führt zu verminderter endothelialer Dysfunktion (Pandey, Sikka et al. 2014) und reduziert die NFκB-vermittelte Genexpression (Yun, Jialal et al. 2011). Ein weiterer möglicher atheroprotektiver Mechanismus von HDAC2 ist die HDAC2-vermittelte Herunterregulation der Antigenpräsentation über Major Histocompatibility Complex (MHC)II-Moleküle in Makrophagen (Kong, Fang et al. 2009). Ist die Funktion von HDAC1 und HDAC2 hingegen eingeschränkt, hat dies eher atherogene Effekte, indem es unter anderem zur vermehrten Expression von CCL-2 (Dje N'Guessan, Riediger et al. 2009) und vermehrter Inflammation (Ito, Hanazawa et al. 2004) kommt. Im Hinblick auf die Relevanz unter unterschiedlichen Flussbedingungen kommt es unter atherogenem Fluss zur vermehrten Transkription und zur Translokation von HDAC3 an die Zellmembran in Endothelzellen, wodurch die endotheliale Integrität über Akt-Aktivierung aufrechterhalten wird. Außerdem führt ein HDAC3-Knockdown in isotranstransplantierten Gefäßen von Apolipoprotein E-Knockout-Mäusen zu schwerer Atherosklerose und Gefäßruptur (Zampetaki, Zeng et al. 2010).

Gleichzeitig gibt es auch Hinweise dafür, dass HDAC atherogene Effekte vermitteln. In Makrophagen führt die Deletion von HDAC3 zu Plaquestabilisierung und reduzierter Lipidakkumulation (Hoeksema, Gijbels et al. 2014) und der HDAC I und II Hemmstoff Trichostatin führt zu einer verminderten Expression von ET-1 in Lipopolysaccharid-stimulierten Makrophagen (Aung, Schroder et al. 2006). Unter Zytokinstimulation kooperieren HDAC4 und die NFκB-Untereinheit p65 in Endothelzellen, reduzieren die Transkriptionsaktivität von Myocyte Enhancer Factor 2 (MEF2) und daraus resultierend die atheroprotektive KLF-2-Expression (Kumar, Lin et al. 2005). Darüber hinaus kommt es unter atheroprotektivem Fluss zum Transport von HDAC5 und HDAC7 aus dem Zellkern (Lee, Lee et al. 2012), wobei es durch den Transport von HDAC5 aus dem Zellkern wiederum zu einer vermehrten Expression von KLF-2 und eNOS kommt (Wang, Ha et al. 2010, Kwon, Wang et al. 2014). Im Gegensatz dazu führt atherogener

Fluss über den Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/Akt)-Signalweg zu einer vermehrten Expression und nukleären Akkumulation von HDAC 1/2/3 und HDAC5/7, die Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF-2) und MEF-2 binden, was eine reduzierte Expression von NADPH Quinone Oxireductase-1 und KLF-2 und damit atherogene Effekte zur Folge hat (Lee, Lee et al. 2012).

1.6 Fragestellung

Bisher gibt es keinen direkten experimentellen Nachweis, dass G-Proteine, im Speziellen die Unterfamilie $G_{q/11}$, die Ausbildung eines atherogenen Phänotyps in Endothelzellen vermitteln. Die erste Hypothese dieser Arbeit ist daher, dass die Ausbildung eines atherogenen Phänotyps unter atherogenem Fluss $G_{q/11}$ -abhängig reguliert wird und sich dies in einer $G_{q/11}$ -abhängigen Expression der atherogenen Marker VCAM-1, CCL-2, PDGF- β , und ET-1 widerspiegelt

Basierend auf den Hinweisen, dass Chromatin-modifizierende Enzyme bei der Vermittlung eines atherogenen Phänotyps eine Rolle spielen und diese durch Fluss reguliert werden können lautet die zweite Hypothese dieser Arbeit, dass a) Chromatin-modifizierende Enzyme wie HAT und HDAC in Endothelzellen Fluss- und $G_{q/11}$ -abhängig reguliert werden und b) dass die Regulation eines atherogenen Phänotyps unter Fluss durch HAT bzw. HDAC vermittelt wird, was sich in einer HAT-/HDAC-abhängigen Regulation atherogener Marker wie CCL-2 und ET-1 widerspiegelt.

2. Methoden

2.1 Das Ibbidi-Flusskammer-System

Das Ibbidi-Flusskammer-System wurde konzipiert, um Zellen unter unterschiedlichen Flussbedingungen zu untersuchen. Das System besteht aus vier Hauptkomponenten: (1) Pumpe, (2) Flusseinheit (Originalbezeichnung: „Fluidic Unit“), (3) Perfusionssystemen (Originalbezeichnung: „Perfusion Sets“) und (4) kanalisiertem Objektträgern (Originalbezeichnung: „ μ -slides“), in denen sich die kultivierten Zellen befinden (siehe Abbildung 1 und 3). Die Pumpe ist ihrerseits an einen PC angeschlossen und wird über die Pumpen-Software „Ibbidi Pump Control“ angesteuert.

Das Funktionsprinzip der Anlage ist Folgendes: Die Pumpe bezieht Luft aus dem Inkubator, die vor Eintritt in die Pumpe durch eine mit Silica-Gel befüllte Trockenflasche entfeuchtet wird. Dann generiert die Pumpe einen Luftdruck, der die Flüssigkeit in den Reservoirs der Flusseinheit, beispielsweise Kulturmedium, von einem Reservoir in das andere befördert. Je nach eingestelltem Luftdruck resultiert ein bestimmter Fluss. Dieser hängt darüber hinaus von der Viskosität des eingesetzten Mediums und vom Widerstand im Perfusionssystem ab. Durch unterschiedliche Flusseinstellungen kann man die in den kanalisiertem Objektträgern befindlichen Zellen definierten Scherkräften aussetzen. Da die Flusseinheit mit zwei Vierwege-Ventilen ausgestattet ist, die über die Pumpe bzw. die Pumpensoftware konfiguriert und angesteuert werden können, lassen sich verschiedene Flussprofile: unidirektional, bidirektional oder oszillierend, einstellen, während die Flüssigkeit in den Reservoirs kontinuierlich hin- und her gepumpt wird (siehe Abbildung 2). Durch Filter in der Pumpe und an der Flusseinheit wird Sterilität gewährleistet.

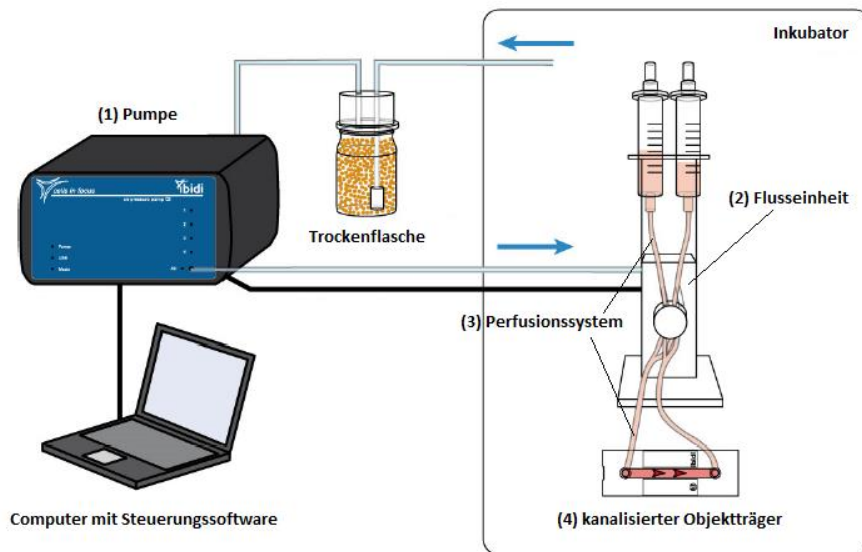


Abbildung 1: Ibidi-Flusskammer-System (modifiziert nach „Ibidi pump system manual“, mit freundlicher Genehmigung von ibidi GmbH, München)

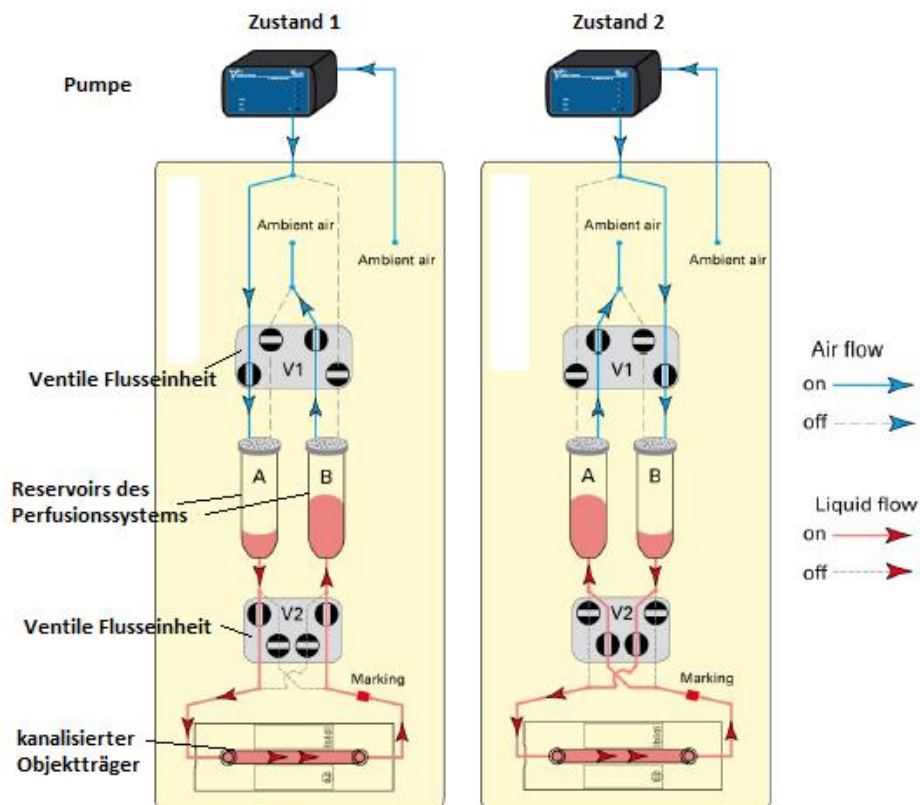


Abbildung 2: Funktionsprinzip Ibidi-Flusskammer-System (modifiziert nach „Ibidi pump system manual“, mit freundlicher Genehmigung von ibidi GmbH, München)

Es gibt verschiedene Ausführungen der Perfusionssysteme, die sich unterscheiden in: 1. Innerem Durchmesser, 2. Schlauchlänge, 3. Totalem Arbeitsvolumen und 4. Totraumvolumen der Schläuche. Außerdem sind die jeweiligen Varianten der Perfusionssysteme nur mit bestimmten Ausführungen der kanalisierten Objektträger kompatibel und ergeben in Kombination mit den unterschiedlichen kanalisierten Objektträgern verschiedene Einstellmöglichkeiten hinsichtlich der Flussbedingungen bzw. Scherkräfte. Die kanalisierten Objektträger (siehe Abbildung 3) sind unterschiedlich große objektträgerähnliche Glasplatten mit einem zentralen Kanal und besitzen unterschiedliche Oberflächenbeschichtungen, beispielsweise Adhäsionsmoleküle wie Kollagen IV oder Fibronectin, in die Zellen ausgesät werden können. Sie bieten eine hohe optische Qualität mit geringer Doppelbrechung und Autofluoreszenz. Die bei dieser Arbeit verwendeten kanalisierten Objektträger vom Typ I 0.6 Luer I haben folgende Eigenschaften: Kanalhöhe 600 μm , Kanalvolumen 150 μl , Oberflächenbeschichtung ibiTreat, Wachstumsfläche 2,5 cm^2 bei empfohlener Zellkonzentration von 400.000 Zellen/ml. Wie oben bereits erwähnt, hängen die Flussrate und die Bandbreite der applizierbaren Scherkräfte von der Kombination aus Perfusionssystem und kanalisiertem Objektträger ab. Die Kombination von kanalisierten Objektträgern vom Typ I 0.6 Luer I mit rotem Perfusionssystem ergibt eine minimale Flussrate von 2,74 ml/min mit einem minimalen Scherstress von 1,65 Dyn/cm^2 und eine maximale Flussrate von 34,98 ml/min mit einem maximalen Scherstress von 21,02 Dyn/cm^2 . Damit ist der für die Experimente nötige Scherkraftbereich von ca. 1 bis $> 12 \text{ Dyn/cm}^2$ abgedeckt.

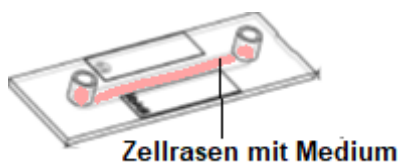


Abbildung 3: Kanalisierter Objektträger mit Zellrasen (modifiziert nach „ibidi Application Note 11“, mit freundlicher Genehmigung von ibidi GmbH, München)

2.2 Versuchsaufbau der Flusskammer-Experimente

In unserem Versuchsaufbau wurde eine Pumpe mit vier Flusseinheiten (in der Folge als E1, E2, E3, E4 bezeichnet) verbunden. An die Flusseinheiten wurden jeweils 2,

insgesamt also 8, kanalisierte Objektträger angebracht. Dabei wurde an jede Flusseinheit angeschlossen: a) ein kanalisierte Objektträger mit Kontroll-Zellen, die mit Kontroll-small interfering Ribonucleic Acid (siRNA) behandelt wurden und b) ein kanalisierte Objektträger mit Knockdown-Zellen, die mit spezifischer siRNA behandelt wurden. Ein einzelner kanalisierte Objektträger wurde mit sogenannter „Cell-Death“-siRNA behandelt, welche bei erfolgreicher Transfektion zum lichtmikroskopisch sichtbaren Absterben der transfizierten Zellen führt und damit als Transfektionskontrolle diente (siehe Abbildung 4).

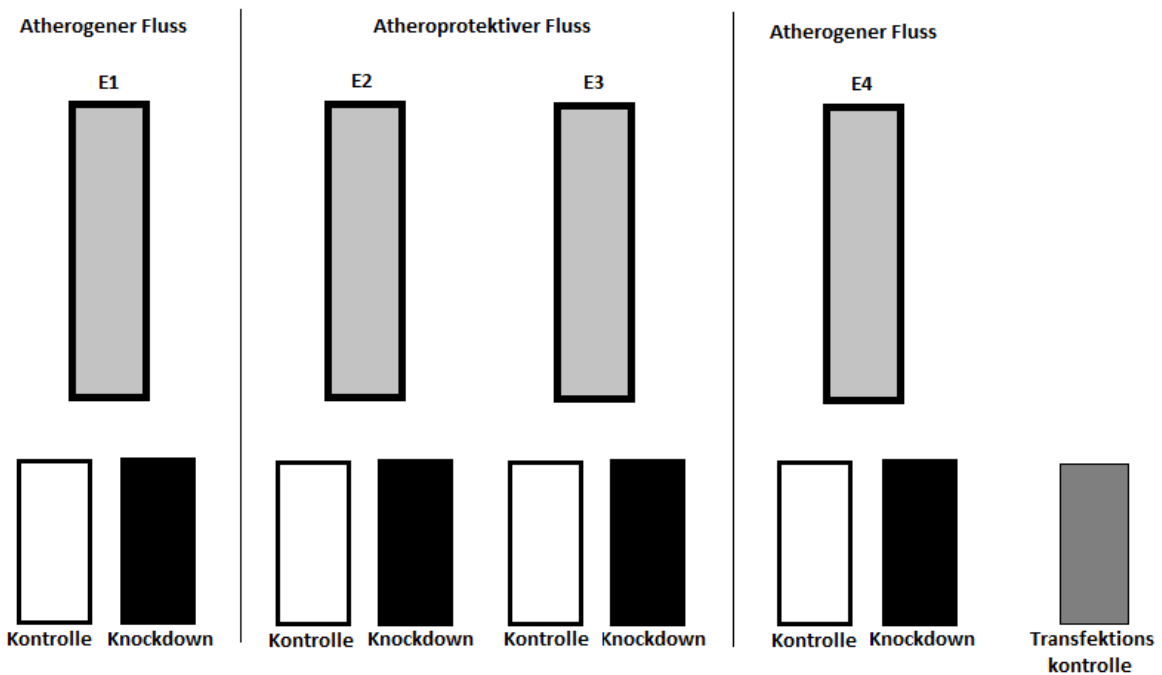


Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau

Im Anschluss wurde folgendes Flussprotokoll angewandt: An E2 und E3 wurden die Zellen in den kanalisierten Objektträgern Scherkräften von $\geq 12 \text{ Dyn/cm}^2$ ausgesetzt. An E1 und E4 wurden Scherkräfte von $\leq 1 \text{ Dyn/cm}^2$ eingestellt. Nach 48 Stunden Flussexposition wurden die Zellen geerntet und weiter verarbeitet.

2.3 Kultivierung Humaner Umbilikaler Venöser Endothelzellen

2.3.1 Allgemeine Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Inkubationsschrank <i>Function line</i>	Heraeus Instruments
Lichtmikroskop <i>DMIL</i>	Leica Leitz DM IL
Sicherheitswerkbank <i>Tecnoflow</i>	Integra Biosciences
Wasserbad <i>SW-20c</i>	Julabo
Zählkammer	Neubauer
Eismaschine	Sctosman AF 200
Zentrifuge <i>Universal 32 R</i>	Hettich Zentrifugen
Laborpipette eppendorf research 1-1000 µl	eppendorf
Laborpipette eppendorf reference 1-1000 µl	eppendorf
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Spritze 5 ml/20 ml	BRAUN
sterile Einmalpipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Falcon
Zellkulturflaschen (T75)	Falcon
Freezing Container	Thermo Scientific

2.3.2 Spezifische Materialien

Bezeichnung	Hersteller
HUVEC EGM-2 (Kryoampulle)	Lonza
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories
Cryo-SFM (Serumfreies Medium für Cryopreservation)	PromoCell
Trypsin/EDTA	Thermo Scientific
EBM-2 Basal Medium 2	Lonza
EGM-2 SingleQuot Kit Supplements & Growth Factors	Lonza

2.3.3 Durchführung

Die Prozeduren in der Zellkultur wurden steril ausgeführt. Zur Kultivierung der Zellen wurden Inkubatoren verwendet, die eine Temperatur von 37°C, 5% CO₂ und gesättigte Luftfeuchtigkeit gewährleisten.

In Vorbereitung auf die Flussversuche wurden von der Firma Lonza bezogene Humane Umbilikale Venöse Endothelzellen (HUVEC) passagiert und damit expandiert. Dazu wurden die Zellen bei Konfluenz mit PBS gewaschen, anschließend mittels Trypsin/EDTA trypsinisiert und neu ausgesät. Die Zellen wurden mittels Trypsinierung

von den Kulturflaschen geerntet, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und dann für 5 Minuten mit 1200rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet mit so viel Cryo-SFM- Einfriermedium resuspendiert, dass sich eine Konzentration von 0,5 ml Cryo-SFM/1.000.000 Zellen ergab. Von der Cryo-SFM-Zellsuspension wurden je 0,5 ml in Cryovials pipettiert und diese mittels Freezing Container zunächst bei -80°C schrittweise heruntergekühlt. Am Folgetag wurden die Cryovials dann zur Lagerung in den Stickstofftank überführt.

2.4 Versuchsablauf der Flusskammer-Experimente

Material	Hersteller
µ-Slide Rack	ibidi
µ-Slide I Luer 0.6 ibiTreat (kanalisierter Objektträger)	ibidi
Fluidic unit (Flusseinheit)	ibidi
Serial Connector for µ-slides (Verbindungsstück)	ibidi
Perfusion Set RED 15 cm, ID 1.6 mm (Perfusionssystem)	ibidi
Luftdruckpumpe ibidi pump	ibidi

Um die Bildung von Luftblasen in den besäten kanalisierten Objektträgern zu verhindern, wurden das Kulturmedium und die für das Experiment benötigten 9 kanalisierten Objektträger einen Tag vor Beginn des Experimentes (also an Tag 0) über Nacht im Brutschrank equilibriert.

2.4.1 Zellaussaat

An Tag 1 des Flusseexperimentes wurden die stickstoffgefrorenen HUVEC zügig aufgetaut und im vorinkubierten Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer wurde die Zellsuspension 5 Minuten bei 900 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit so viel vorinkubiertem Kulturmedium resuspendiert, dass sich eine Zielkonzentration von 400.000 Zellen/ml ergab. Nun wurden in jeden der 9 kanalisierten Objektträger 150 µl der Zellsuspension hinein pipettiert, so dass sich eine Zellzahl von 60.000 Zellen pro kanalisiertem Objektträger ergab. Nach 30 minütiger Inkubation der kanalisierten Objektträger wurde 160 µl Kulturmedium abwechselnd in die Reservoirs der einzelnen kanalisierten Objektträger pipettiert, um zu verhindern, dass die Zellen inhomogen im

kanalisierten Objektträger verteilt werden. Anschließend wurden die kanalisierten Objektträger über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.4.2 Transfektion

An Tag 2 und Tag 3 des Experimentes wurden die HUVEC mit siRNA transfiziert. Die siRNA-Transfektion der in den kanalisierten Objektträgern kultivierten HUVEC wurde nach der Methode der kationischen lipid-vermittelten Transfektion durchgeführt, bei der speziell konstruierte kationische Lipide wie Lipofectamine das Einschleusen von Nucleinsäuren in die Zelle gewährleisten. Für den Knockdown der α -Untereinheit von G_q und G_{11} wurde siRNA gegen die entsprechenden Gene $G_{\alpha q}$ und $G_{\alpha 11}$ verwendet. Der Knockdown von KAT7 und HDAC9 wurde mittels Anti-KAT7- bzw. Anti-HDAC9-siRNA durchgeführt.

2.4.2.1 Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Schüttler <i>Thermomixer compact</i>	eppendorf
Eppendorfgefäße	eppendorf
AllStars Cell Death Control siRNA (5 nmol)	Qiagen
AllStars Negative Control siRNA (5 nmol)	Qiagen
FlexiTube siRNA Hs_GNAQ_5	Qiagen
FlexiTube siRNA Hs_GNA11_6	Qiagen
FlexiTube siRNA Hs_HDAC9_1	Qiagen
FlexiTube siRNA Hs_MYST2_1 (=KAT7)	Qiagen
Rnase-Free Water	Qiagen
Lipofectamine RNAiMAX, 0.75 ml	lifetechnologies
Opti MEM I	lifetechnologies

2.4.2.2 Durchführung

Je Ansatz wurde zunächst das serumfreie Opti-MEM-Medium mit den jeweiligen siRNA: Transfektionskontrolle („AllStars Cell Death Control siRNA“), Kontrolle („AllStars Negative Control siRNA“) und gewünschtem Knockdown („FlexiTube siRNA Hs_GNAQ_5; Hs_GNA11_6; Hs_GNA11_6; Hs_HDAC9_1; Hs_MYST2_1“) vermischt. Parallel wurde ein Opti-MEM-Lipofectamine-Mix erstellt. Anschließend wurde der Opti-MEM-siRNA-Mix mit dem Opti-MEM-Lipofectamine-Mix

zusammengeführt, kurz gevortext und dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zu jedem Ansatz Zellkulturmedium hinzugegeben und die kanalisierten Objektträger mit je 150 µl des Transfektionsmixes befüllt.

Tabelle 1: Pipettierschema Transfektion

Substanz	Kontrolle	Wildtyp (x6)	Knockdown (x6)
Opti-MEM	15,6 µl	93,62 µl	93,62 µl
siRNA (2 µM)	0,996 µl	5,98 µl	5,98 µl
Opti-MEM	16,6 µl	99,6 µl	99,6 µl
Lipofectamine	0,166 µl	0,996 µl	0,996 µl
Kulturmedium	166 µl	996 µl	996 µl

2.4.3 Anschluss der kanalisierten Objektträger und Flusseinstellungen

In Vorbereitung auf den Anschluss der kanalisierten Objektträger an Tag 4 wurde an Tag 3 das gesamte Flusskammer-System, also 4 Flusseinheiten mit je angeschlossenen Perfusionssystem, über Nacht im Brutschrank equilibriert. Für die Equilibrierung wurden die Spritzenreservoirs der 4 Perfusionssystem mit je ca. 15 ml Kulturmedium befüllt, an die Flusseinheiten angeschlossen, diese wiederum mit der Pumpe und dem Computer verbunden und in der Software das Tutorial „Remove airbubbles“ gestartet. Außerdem wurden Verbindungsstücke (Originalbezeichnung: „Serial Connector for µ-slides“), mit denen sich mehrere kanalisierte Objektträger in Serie schalten lassen, steril in eine Petrischale überführt und diese ebenfalls über Nacht in den Brutschrank gelegt. Zuletzt wurde ausreichend Kulturmedium für die folgenden Prozeduren inkubiert. An Tag 4 wurden, nachdem der Erfolg der Transfektion lichtmikroskopisch überprüft wurde, die 8 kanalisierten Objektträger zunächst über Verbindungsstücke miteinander verbunden. Hierbei war streng darauf zu achten, keine Luftblasen einzuschließen. Daraufhin wurden die Flusseinheiten aus dem Brutschrank genommen, von der Pumpe getrennt und unter die Werkbank gebracht, um die Schläuche der Perfusionssysteme mit den gut befüllten Reservoirs der kanalisierten Objektträger zu verbinden. Dazu wurden jeweils die beiden Schläuche eines Perfusionssystem mit Hilfe der Finger abgeklemmt, direkt über die Reservoirs gehalten und dann unter leichtem Austritt von Medium aus den Perfusionssystem-Schläuchen in die beiden Reservoirs gesteckt, so dass keine Luft in

das System gelangen konnte. Nachdem alle 8 kanalisierten Objektträger mit ihrem jeweiligen Perfusionssystem verbunden waren, wurde gegebenenfalls etwas vorinkubiertes Medium in die Spritzenreservoirs der Perfusionssysteme nachgefüllt. Daraufhin wurden die 4 Flusseinheiten mit angeschlossenen kanalisierten Objektträgern wieder aus der Werkbank genommen und an die Pumpe angeschlossen. Um die in Kapitel 2.2. beschriebenen Flussbedingungen herzustellen wurde mittels ibidi Pump Software ein Fluss eingestellt, der zu Scherkräften von ≥ 12 Dyn/cm² führte.

Aufgrund der angeschlossenen kanalisierten Objektträger und der damit verbundenen Erhöhung des Widerstandes im System war der zu beobachtende Fluss zunächst geringer als eingestellt und musste dementsprechend nachkalibriert werden. Nach Abschluss der Rekalibrierung wurde der Scherstress an E1 und E4 mittels Schraubzwingen auf ≤ 1 Dyn/cm² reduziert und die Zellen für 48h Fluss ausgesetzt (siehe Abbildung 5).

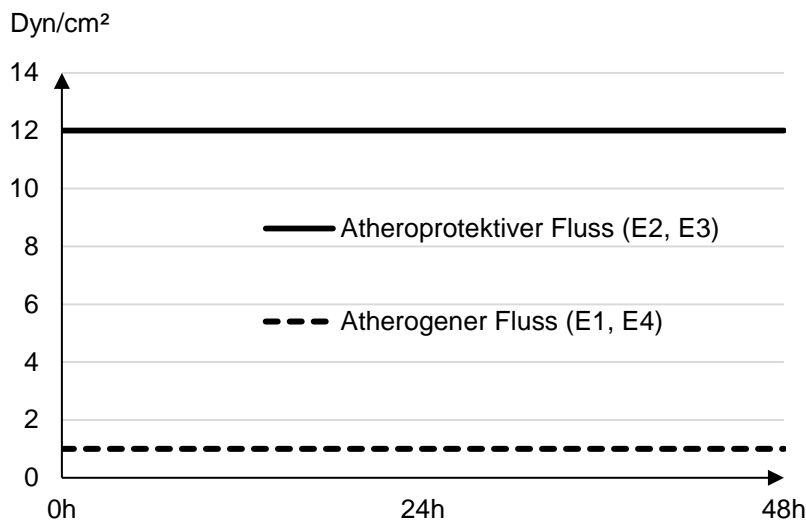


Abbildung 5: Zeitstrahl Versuchsablauf

2.4.4 Zellernte und -weiterverarbeitung

48 Stunden nach Flussbeginn wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die kanalisierten Objektträger von der Anlage getrennt. Die in den kanalisierten Objektträgern befindlichen Zellen wurden mit 1000 μ l PBS gewaschen, anschließend

mit 150 µl Trypsin/EDTA beschichtet und für 2,5 Minuten inkubiert. Nach vorsichtigem Rütteln und Klopfen wurden die kanalisiert Objekträger mit 500 µl Kulturmedium durchspült und die entstehende Zellsuspension in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesammelt. Anschließend wurde direkt mit der RNA-Isolation begonnen (siehe Kapitel: 2.5.2. RNA-Isolation).

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Allgemeine Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Laborpipette eppendorf research 1-1000µl	eppendorf
Laborpipette eppendorf reference 1-1000µl	eppendorf
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt
Eppendorfgefäße	eppendorf
Eppizentrifuge <i>Biofuge pico</i>	Heraeus Instruments
Zentrifuge <i>Labofuge 400R</i>	Heraeus Instruments
Kühlzentrifuge <i>5415R</i>	eppendorf
PCR-Cycler	Eppendorf Thermocycler Gradient
qtRT-PCR Cycler	Applied Biosystems 7300

2.5.2 RNA-Isolation

2.5.2.1 Materialien

Zur Durchführung der RNA-Isolation wurde das RNeasy Micro Kit der Firma Qiagen verwendet.

2.5.2.2 Durchführung

Um nach abgelaufenem Flusseperiment Veränderungen in der Genexpression zu beobachten bzw. zu messen, musste zunächst die mRNA aus den Zellen gewonnen werden. Dazu wurde gemäß des Protokolls des RNeasy Micro Kits weiterverfahren, wobei der Qiashredder nicht verwendet wurde.

2.5.2.3 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die RNA-Konzentrationen wurden darauffolgend mit dem Spectrophometer NanoDrop 2000 von der Firma Thermo Scientific photometrisch untersucht. Dabei wurde der Reinheitsgrad der RNA über das Absorptionsverhältnis von UV-Strahlen bei 260 nm und 280 nm ($A_{260}/A_{280}=1,6-2,1$) gemessen und die Konzentration mittels Beer-Lambert Gesetz bestimmt (A_{260} von 1,0 entspricht etwa 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA). Danach wurden die Proben entweder direkt weiterverarbeitet (siehe 2.5.3. Reverse Transkription) oder bei -80°C im Stickstofftank zwischengelagert.

2.5.3 Reverse Transkription

2.5.3.1 Material

Material	Hersteller
DNase (2 U/ μl)	Invitrogen
Hexamere (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Invitrogen
5x-PCR Puffer	Invitrogen
Dithiothreitol (DTT; 0,1 M)	Invitrogen
Protector Rnase Inhibitor (40 U/ μl)	Invitrogen
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP; 10 mM)	Invitrogen
M-MLV- Reverse Transcriptase (200 U/ μl)	lifetechnologies

2.5.3.2 Durchführung

Da die spätere genetische Analyse mittels quantitativer Realtime Polymerase Chain Reaction (qtRT-PCR) der Proben nur auf Basis von DNA möglich ist, wurde die gewonnene RNA zunächst mittels Reverser Transkription in komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) umgeschrieben. Dazu wurden je Ansatz 200 ng RNA verwendet. Zunächst wurde die RNA mit destilliertem Wasser ad 9 μl verdünnt und mittels Zugabe von 0,5 μl DNase 1 (2U/ μl) von restlicher DNA gereinigt (Thermocycler: 15 min 37°C , dann 10 min 75°C , anschließend auf Eis). Daraufhin wurden 2 μl Hexamere (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) hinzugegeben (Thermocycler: 10 min 70°C , dann auf Eis). Jetzt wurde jeder Ansatz mit folgendem Mastermix versetzt:

Tabelle 2: Mastermix Reverse Transkription

Substanz	Konzentration	Menge je Ansatz
5x Puffer		4,0 µl
DTT	100 mM	2,0 µl
dNTP's	10 mM	1,0 µl
Protector RNase Inhibitor	40 U/µl	0,5 µl
M-MLV Reverse Transkriptase	200 U/µl	1,0 µl

Die gesamte Mischung (20 µl) aus Mastermix (8,5 µl), Hexamere (2 µl) und RNA (9 µl) wurde nun im Thermocycler 5 Minuten bei 25°C (Inkubation) und 60 Minuten bei 37°C (Reverse Transkription) in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden die Proben bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.5.4 TaqMan-qtRT-PCR

2.5.4.1 Materialien

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
TaqMan Gene Expression Master Mix	4369016	lifetechnologies
Zielgen der Taqman Sonde	Assay ID	
18S	Hs03003631_m1	lifetechnologies
GNA11	Hs01588833_m1	lifetechnologies
GNAQ	Hs00966522_m1	lifetechnologies
CCL 2	Hs00234140_m1	lifetechnologies
ET-1	Hs00174961_m1	lifetechnologies
VCAM-1	Hs01003372_m1	lifetechnologies
PDGF-β	Hs00966522_m1	lifetechnologies
HDAC9	Hs00206843_m1	lifetechnologies
KAT7	Hs01561260_m1	lifetechnologies

2.5.4.2 Durchführung

Prinzipiell funktioniert die TaqMan-qtRT-PCR wie jede herkömmliche Polymerase Chain Reaction (PCR): Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation bzw. Amplifikation. Das besondere an der TaqMan-qtRT-PCR ist, dass zusätzlich zu den Primern eine Oligonukleotid-Sonde mit Reporterfarbstoff, sogenannter „FAM-dye“ am 5' Ende der Sonde gelegen, und Quencher, sogenannter „TAMRA-dye“ am 3' Ende

der Sonde gelegen, hinzugegeben wird und, dass die AmpliTaqGold-DNA-Polymerase eine 5'-Nukleaseaktivität und keine 3'-Exonukleaseaktivität besitzt. Nach der Denaturierung hybridisieren Primer sequenzspezifisch und die Sonde zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer, so dass während der Polymerisationsphase die AmpliTaqGold-DNA-Polymerase mittels 5'-Exonukleaseaktivität den Reporterfarbstoff vom Quencher abschneidet. Dadurch kann der zuvor vom Quencher mittels Förster-Resonanzenergietransfer unterdrückte Farbstoff proportional zur PCR-Produktmenge fluoreszieren. Dabei trennt die AmpliTaqGold-Polymerase den Quencher nur dann vom Reporterfarbstoff, wenn die Sonde mit der Probe hybridisiert; außerdem ist das 3'-Ende der Sonde geblockt, um eine Amplifikation der Sonde zu verhindern. Dadurch, dass Fluoreszenz nur dann auftritt und gemessen wird, wenn die Zielsequenz komplementär zur Sonde ist und während der PCR amplifiziert wird, ist die Messung sehr spezifisch.

Je zu untersuchendem Gen wurde ein Ansatz von 13 µl angesetzt, der sich aus 6,5 µl TaqMan-PCR Master Mix, 0,5 µl TaqMan-Sonde und 1 µl cDNA (entspricht 10ng) und H₂O zusammensetzte. Anschließend wurde das Standardprotokoll gestartet (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Protokoll TaqMan-qtRT-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
UNG-Inkubation	50°C	2 min	1x
AmpliTaqGold-Aktivierung	95°C	10 min	1x
Denaturierung	95°C	15 sec	40x
Polymerisation	60°C	1 min	40x

2.5.4.3 Quantitative Analyse der PCR-Ergebnisse

Bei der Interpretation der Ergebnisse aus der qtRT-PCR wurde der kinetische, also der frühe lineare Reaktionszeitraum der PCR betrachtet. Der Wert für den „Cycle of threshold“ (Ct) – das ist die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz und damit die Amplifikation exponentiell zunimmt - sollte in diese frühe lineare Phase der Reaktion fallen, was sich am besten auf einer logarithmischen Skala ausmachen lässt. Ein niedriger Ct-Wert deutet an, dass sich viele Genkopien in der Probe befinden. Bei einem hohen Ct-Wert ist das Gegenteil der Fall. Dann wurde die quantitative

Veränderung der mRNA-Level in den verschiedenen Stichproben mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode bestimmt. Bei dieser Methode wird zunächst die Expression des untersuchten Gens in Bezug zur Expression eines sogenannten housekeeping gene gesetzt, das als Referenzgen dient, da dessen Expression konstant ist: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$. In diesem Fall wurde die 18S ribosomale RNA als housekeeping gene verwendet. Anschließend wird aus den errechneten ΔCt -Werten je von behandelte Probe und Kontrollprobe nochmals ein $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert gebildet: $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct behandelte Probe} - \Delta\text{Ct Kontrollprobe}$. Um den relativen Expressionsunterschied zu berechnen, setzt man diesen Wert in die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ein.

2.6 Microarray

Die Messung des Microarray wurde von der Firma MACS Miltenyi Biotec durchgeführt. Dazu wurden validierte Proben aus den Experimenten mit Anti- $\text{G}_{\alpha\text{q}}/11$ -siRNA behandelten HUVEC ausgewählt. Als valide galt eine Probe, die eine ausreichende Effizienz des $\text{G}_{\alpha\text{q}}/11$ -Knockdowns aufwies und die unter atherogenem Fluss eine deutliche $\text{G}_{\alpha\text{q}}/11$ -abhängige Regulation atherogener Marker zeigte. Die versandten RNA-Proben unterliefen zunächst einer Qualitätskontrolle, woraufhin $N = 3$ Proben für den Array ausgewählt wurden. Von diesen Proben wurden 100 ng RNA eingesetzt und mittels Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) amplifiziert und mit Cyanin 3 gefärbt. Die Hybridisierung wurde gemäß des Agilent 60-mer oligo microarray processing protocol mittels Agilent Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) durchgeführt. Die Fluoreszenzsignale der hybridisierten Agilent Microarrays wurden durch ein Agilent Microarray Scanner System (Agilent Technologies) detektiert. Zum Auslesen und prozessieren der Signale wurde die Agilent Feature Extraction Software und das „Rosetta Resolver® gene expression data analysis system“ (Rosetta Biosoftware) verwendet. Wir erhielten einen Datensatz mit normalisierten Signalintensitäten zur weiteren Auswertung.

2.7 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Messwerte erfolgte ab $N = 4$ als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und bei $N \leq 3$ als Medianwerte. Ab $N = 4$ wurde bei nicht-normalverteilten Daten eine statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U vorgenommen, wobei ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurde

3. Ergebnisse

3.1 $G_{q/11}$ -abhängige Genexpression atherogener Marker unter Fluss

Um zu überprüfen, ob die Ausbildung eines atherogenen Phänotyps in Endothelzellen unter atherogenem Fluss $G_{q/11}$ -abhängig reguliert ist, verwendeten wir die Ibidi-Flusskammer, um HUVEC geringen Scherkräften (≤ 1 Dyn/cm²), also atherogenem Fluss, und hohen Scherkräften (12 Dyn/cm²), also atheroprotektivem Fluss, auszusetzen. Zusätzlich wurden die HUVEC in jedem Versuchsschenkel mit siRNA gegen die α -Untereinheiten der G-Proteine G_q und G_{11} , also gegen $G_{\alpha q}$ und $G_{\alpha 11}$, behandelt. Im Folgenden wird der Knockdown von G_q und G_{11} zusammengenommen als $G_{q/11}$ -Knockdown bezeichnet. Mittels qtRT-PCR wurde zunächst die Knockdown-Effizienz von G_q und G_{11} bestimmt. Anschließend wurde die Expression der atherogenen Marker VCAM-1 und PDGF- β gemessen.

Die Knockdowneffizienz für G_{11} lag im Versuchsschenkel mit atheroprotektivem Fluss im Mittel bei 93% [$p = 0,002$; $N = 6$], unter atherogenem Fluss bei 89,8% [$p = 0,002$; $N = 6$]. Bei G_q betrug die Knockdowneffizienz bei atheroprotektivem Fluss im Mittel 67% [$p < 0,001$; $N = 18$] und unter atherogenem Fluss im Mittel 73,5% [$p < 0,001$; $N = 18$].

Die Kontrolle zeigte unter atherogenem Fluss eine 2,7-fach erhöhte Expression für VCAM-1 im Vergleich zur Kontrolle unter atheroprotektivem Fluss [$p = 0,091$; $N = 18$]. Durch den Knockdown von $G_{q/11}$ verringerte sich diese Expression unter atherogenem Fluss um 28,9% [$p = 0,323$; $N = 18$]. Bei atheroprotektivem Fluss erhöhte sich die Expression von VCAM-1 im Knockdown um 22% [$p = 0,584$; $N = 18$].

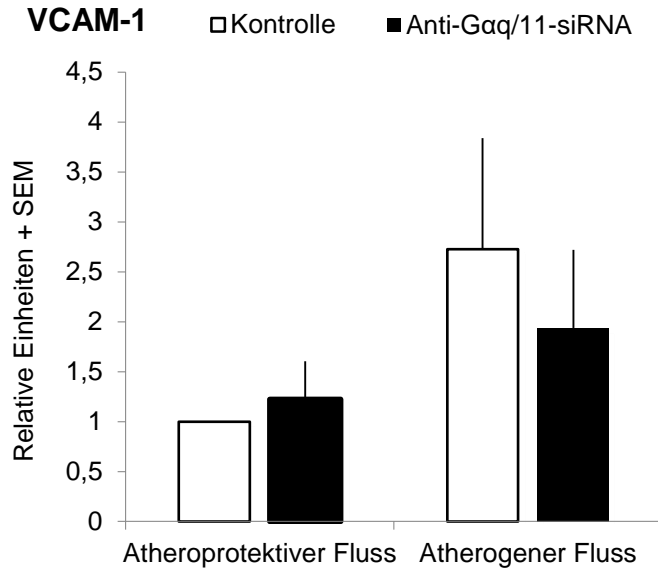


Abbildung 6: Relative mRNA-Expression von VCAM-1 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-G α _{q/11}-siRNA. Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM [N = 18].

Hinsichtlich PDGF- β zeigten die Kontrollen unter atherogenem Fluss eine 2,2-fach erhöhte Expression für PDGF- β im Vergleich zu den Kontrollen unter atheroprotektivem Fluss [p = 0,002; N = 6]. Durch den Knockdown von G α _{q/11} verringerte sich diese Expression unter atherogenem Fluss um 27,3% [p = 0,065; N = 6], bei atheroprotektivem Fluss reduzierte sie sich um 3% [p = 1,0; N = 6].

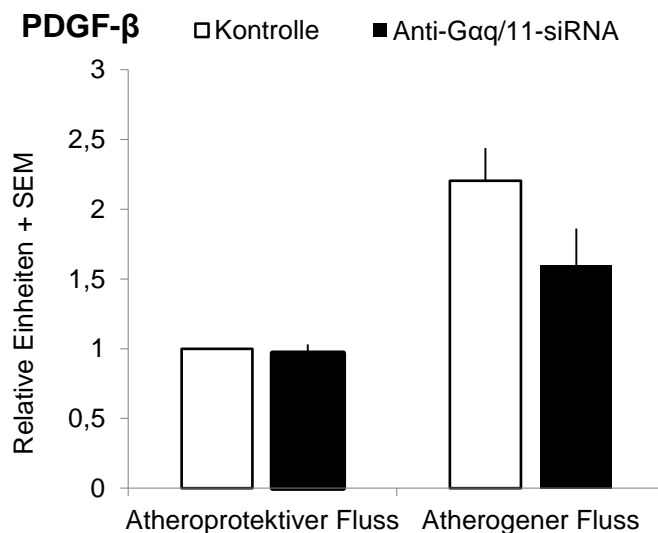


Abbildung 7: Relative mRNA-Expression von PDGF- β unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-G α _{q/11}-siRNA. Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM [N = 6].

Aus den $G_{q/11}$ -Knockdown-Versuchen wurden validierte Proben ausgewählt, die sowohl eine gute Knockdown-Effizienz als auch hohe Unterschiede in der Expression von VCAM-1 unter atherogenem Fluss im Vergleich zu atheroprotektivem Fluss aufwiesen. Diese Proben wurden der Firma Miltenyi Biotec zugesandt, welche die Messung eines genomweiten Microarrays vornahm. Die Ergebnisse wurden in Form einer Genliste mit normalisierten Werten für die Höhe der Expression ausgegeben. Wir untersuchten daraufhin den Datensatz hinsichtlich der Regulation weiterer atherogener Gene. Aufgrund der kleinen Stichprobenzahl von $N = 3$ wurden bei der Auswertung die Mediane herangezogen und keine statistische Auswertung vorgenommen.

CCL-2 zeigte in der Kontrolle unter atherogenem Fluss gegenüber atheroprotektivem Fluss eine 11,1-fach erhöhte Expression. Die erhöhte Expression unter atherogenem Fluss konnte mittels $G_{q/11}$ -Knockdown um 27% gesenkt werden. Bei atheroprotektivem Fluss führte der Knockdown zu einer Erhöhung der Expression von CCL-2 um 7,7%.

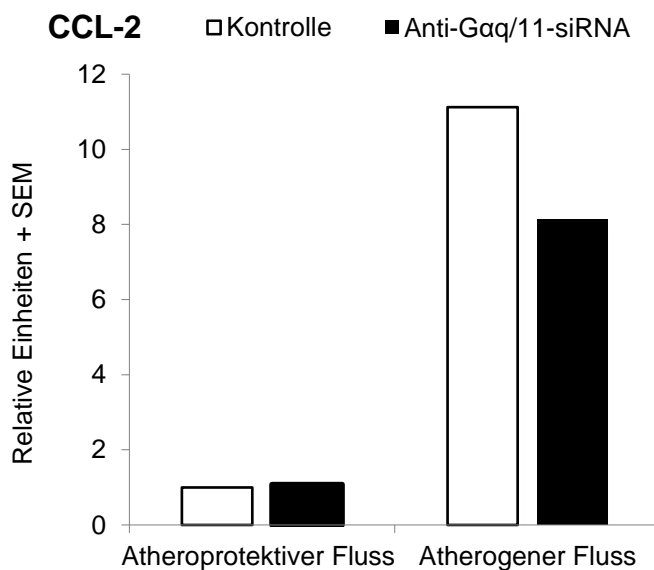


Abbildung 8: Relative mRNA-Expression von CCL-2 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti- $G_{q/11}$ -siRNA. Das Diagramm zeigt Mediane [$N = 3$].

ET-1 zeigte in der Kontrolle unter atherogenem Fluss eine 3,8-fache Erhöhung der Expression gegenüber atheroprotektivem Fluss [$N = 3$]. Der Knockdown von $G_{q/11}$ führte unter atherogenem Fluss zu einer Reduktion der Expression von ET-1 um 23,7%

[N = 3]. Bei atheroprotektivem Fluss kam es zu einer Reduktion der ET-1 Expression um 9% [N = 3].

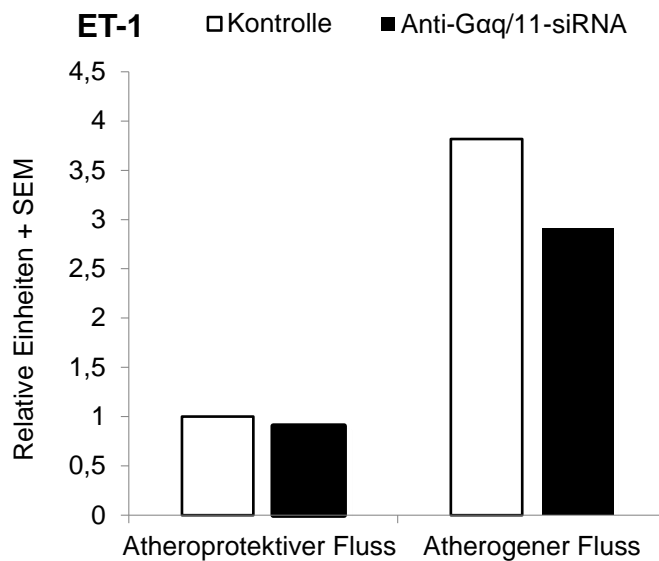


Abbildung 9: Relative mRNA-Expression von ET-1 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-G α _{q/11}-siRNA. Das Diagramm zeigt Mediane [N = 3].

3.2 G α _{q/11}-abhängige Regulation Chromatin-modifizierender Enzyme unter Fluss

Wie in Kapitel 1.5.5 dargelegt, gibt es Hinweise, dass Chromatin-modifizierende Enzyme in der Pathophysiologie der Atherosklerose und der Ausbildung eines atherogenen Phänotyps eine Rolle spielen und diese durch Fluss reguliert werden. So führten wir einen genomweiten Microarray durch, um Fluss- und G α _{q/11}-abhängig regulierte Chromatin-modifizierende Enzyme zu identifizieren. Bei der Auswertung des Microarrays wiesen die Histon-Azetyltransferase KAT7 und die Histon-Deazetylase HDAC9 eine Fluss- und G α _{q/11}-abhängige Regulation auf. Aufgrund der niedrigen Stichprobenzahl von N = 3 erfolgte die Auswertung auf Grundlage der Mediane ohne statistische Auswertung.

Bei KAT7 zeigte sich in der Kontrolle unter atherogenem Fluss eine 3-fache Hochregulation von KAT7 im Vergleich zu atheroprotektivem Fluss [N = 3]. Ein G α _{q/11}-Knockdown reduzierte die Expression von KAT7 unter atherogenem Fluss um 40% [N

= 3]. Unter atheroprotektivem Fluss führte der $G_{q/11}$ -Knockdown zu einer Reduktion der KAT7-Expression um 18% [N = 3].

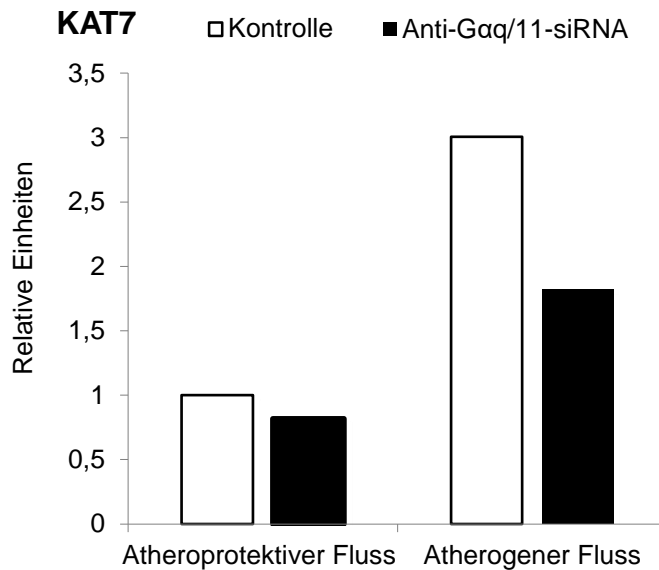


Abbildung 10: Relative mRNA-Expression von KAT7 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti- $G_{q/11}$ -siRNA. Das Diagramm zeigt Mediane [N = 3].

HDAC9 zeigte in der Kontrolle unter atherogenem Fluss eine Reduktion der Expression von 72% [N = 3] im Vergleich zu atheroprotektivem Fluss. Ein $G_{q/11}$ -Knockdown reduzierte die Expression von HDAC9 unter atherogenem Fluss um 10,7% [N = 3]. Unter atheroprotektivem Fluss führte der $G_{q/11}$ -Knockdown zu einer Hochregulation von HDAC9 um das 2,4-fache [N = 3].

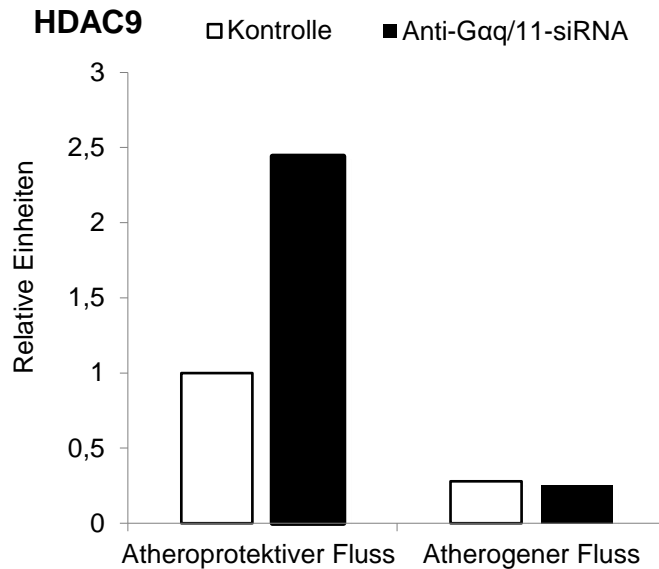


Abbildung 1: Relative mRNA-Expression von HDAC9 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-G α q/11-siRNA. Das Diagramm zeigt Mediane [N = 3].

Um die funktionelle Relevanz der ermittelten G α /11-abhängig regulierten Chromatin-modifizierenden Enzyme unter unterschiedlichen Flussbedingungen und im Hinblick auf die Expression atherogener Marker hin zu ermitteln, wurden für KAT7 und HDAC9 funktionelle Knockdowns mittels siRNA durchgeführt und die Zellen wiederum atherogenem und atheroprotektivem Fluss ausgesetzt. Zur Erkennung eines atherogenen Phänotyps dienten die qRT-PCR-Messungen der proinflammatorischen Marker ET-1 und CCL-2.

3.3 Funktioneller Knockdown Chromatin-modifizierender Enzyme

3.3.1 KAT7-Knockdown

Die Effizienz des Knockdowns für KAT7 betrug bei atheroprotektivem Fluss 54% [p = 0,002; N = 6] und unter atherogenen Fluss 57,8% [p = 0,015; N = 6]. Bei CCL-2 zeigte sich in der Kontrolle unter atherogenem Fluss eine 7,1-fach erhöhte Expression [p = 0,002; N = 6]. Der KAT7-Knockdown führte unter atherogenem Fluss zu einer Reduktion der Expression von CCL-2 um 61,6% [p = 0,009; N = 6]. Unter atheroprotektivem Fluss kam es bei KAT7-Knockdown zu einem 1,2-fachen Anstieg der Expression von CCL-2 [p = 0,394; N = 6].

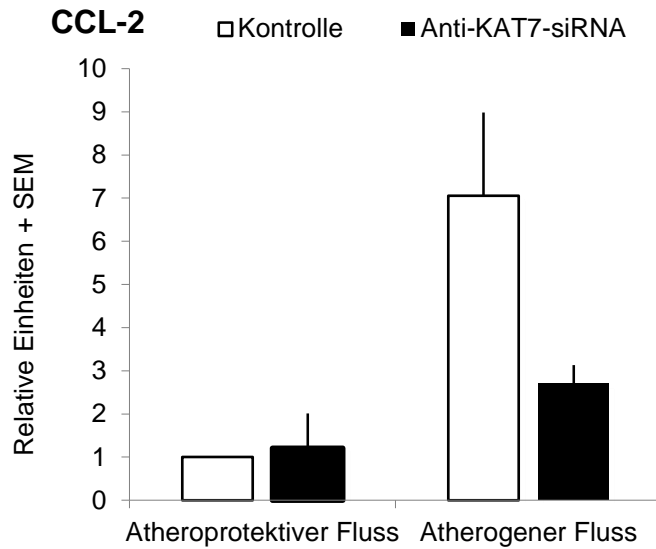


Abbildung 12: Relative mRNA-Expression von CCL-2 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-KAT7-siRNA. Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM [N = 6].

ET-1 war in der Kontrolle unter atherogenem Fluss um den Faktor 4,2 hochreguliert [$p = 0,002$; N = 6]. Durch den KAT7-Knockdown erhöhte sich die Expression von ET-1 unter atherogenem Fluss um das 1,2-fache [$p = 0,589$; N = 6]. Bei atheroprotektiven Flussbedingungen bewirkte der Knockdown eine 2,4-fach erhöhte Expression von ET-1 [$p = 0,394$; N = 6].

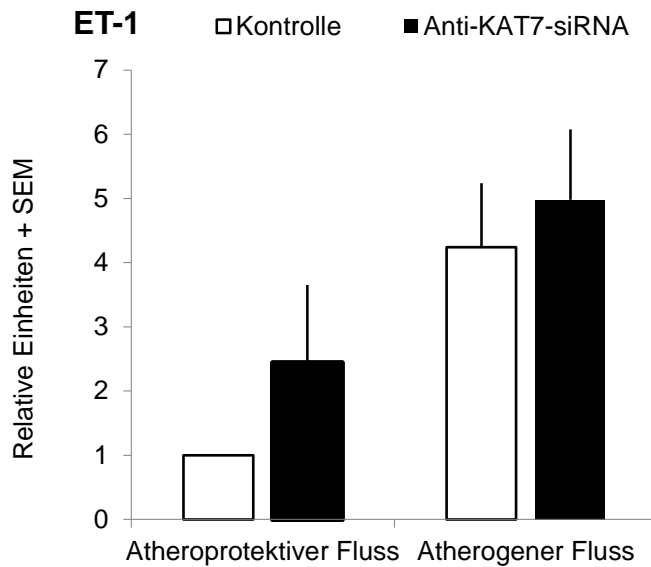


Abbildung 13: Relative mRNA-Expression von ET-1 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-KAT7-siRNA. Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM [N = 6].

3.3.2 HDAC9-Knockdown

Die Effizienz des Knockdowns für HDAC9 betrug bei atheroprotektivem Fluss 45% [p = 0,114; N = 4], unter atherogenen Flussbedingungen 46,6% [p = 0,343; N = 4]. Bei CCL-2 zeigte sich in der Kontrolle unter atherogenem Fluss eine 7,2-fach erhöhte Expression [p = 0,029; N = 4]. Der HDAC9-Knockdown führte unter atherogenem Fluss zu einer 1,9-fachen Erhöhung der Expression von CCL-2 [p = 0,343; N = 4]. Unter atheroprotektivem Fluss führte der Knockdown von HDAC9 zu einem 3,9-fachen Anstieg der Expression von CCL-2 [p = 0,029; N = 4].

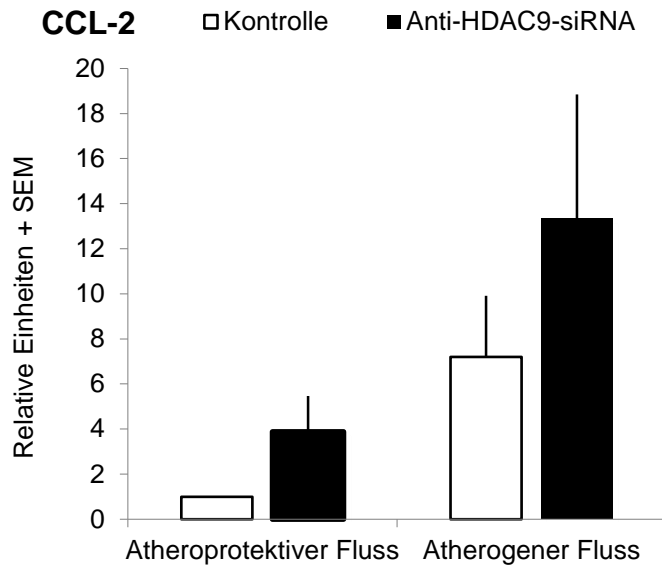


Abbildung 14: Relative mRNA-Expression von CCL-2 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-HDAC9-siRNA. Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM [N = 4].

ET-1 war in der Kontrolle unter atherogenem Fluss um den Faktor 3,6 hochreguliert [p = 0,029; N = 4]. Bei atherogenen Flussbedingungen bewirkte der Knockdown eine 1,4-fach erhöhte Expression von ET-1 [p = 0,686; N = 4]. Unter atheroprotektivem Fluss kam es durch den HDAC9-Knockdown zu einer Erhöhung der Expression um 11% [p = 1,0; N = 4].

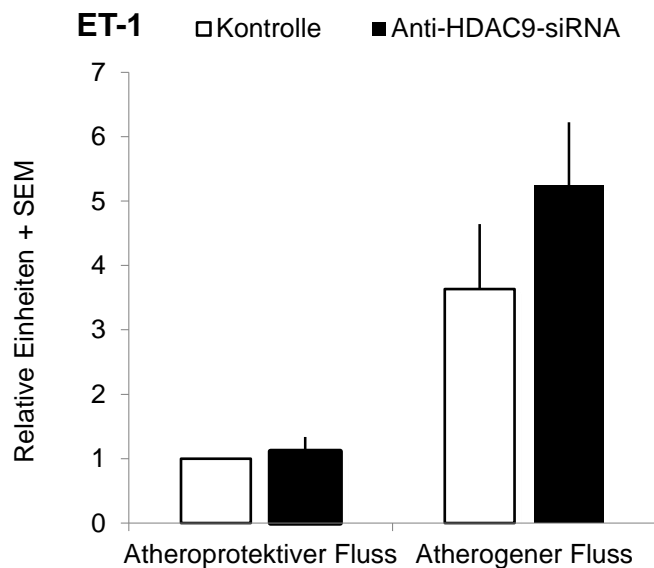


Abbildung 15: Relative mRNA-Expression von ET-1 unter atheroprotektivem vs. atherogenem Fluss, jeweils Kontrolle und Anti-HDAC9-siRNA. Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM [N = 4].

4. Diskussion

4.1 $G_{q/11}$ -abhängige Signaltransduktion unter atherogenem Fluss

Um zu überprüfen, ob die Entwicklung eines atherogenen Phänotyps unter atherogenem Fluss $G_{q/11}$ -abhängig reguliert wird, wurde zunächst ein siRNA-Knockdown für die Untereinheiten der G-Proteine G_q und G_{11} vorgenommen, da bei diesen bereits eine schnelle Fluss-abhängige Aktivierung vorbeschrieben ist (Gudi, Clark et al. 1996). Anschließend wurden die Zellen atheroprotektivem bzw. atherogenem Fluss ausgesetzt und die Expression der atherogenen Marker VCAM-1 und PDGF- β mittels qRT-PCR gemessen. Wie vorbeschrieben (Malek, Gibbons et al. 1993, Walpola, Gotlieb et al. 1995, Chappell, Varner et al. 1998), zeigte sich in der Kontrolle auf atherogenen Fluss hin eine Hochregulation der proinflammatorischen Marker VCAM-1 und PDGF- β . Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass die Expression von VCAM-1 und PDGF- β in diesem Kontext $G_{q/11}$ -abhängig reguliert ist. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Expression von VCAM-1 und PDGF- β sind aufgrund ihrer fehlenden statistischen Signifikanz als Trends zu werten. Die $G_{q/11}$ -abhängige Expression von VCAM-1 und PDGF- β unter atherogenem Fluss wurde in unserer Arbeitsgruppe mittlerweile validiert.

Zur Bestimmung möglicher weiterer $G_{q/11}$ -abhängig regulierter atherogener Marker unter atherogenem Fluss führten wir einen genomweiten Microarray durch. Hier zeigten sich, neben VCAM-1 und PDGF- β , mit CCL-2 und ET-1 zwei weitere atherogene Marker, die $G_{q/11}$ -abhängig reguliert sind. Während die erhöhte Expression dieser Gene unter atherogenem Fluss bereits vorbeschrieben ist (Malek and Izumo 1992, Kuchan and Frangos 1993, Shyy, Hsieh et al. 1994, Ziegler, Bouzourene et al. 1998, Bao, Lu et al. 2001, Hsiai, Cho et al. 2003), war eine $G_{q/11}$ -abhängige Regulation in diesem Kontext bis dato nicht bekannt. Aufgrund der geringen Stichprobenzahl sind die Ergebnisse aus dem Microarray als Trends zu werden. Die $G_{q/11}$ -abhängige Expression von CCL-2 unter atherogenem Fluss wurde in weiterführenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe validiert.

Die Tatsache, dass G-Proteine nach Applikation von Scherkräften bzw. Fluss sehr schnell aktiviert und moduliert werden (Gudi, Clark et al. 1996, Gudi, Nolan et al. 1998), könnte ein Indiz dafür sein, dass G-Proteine bei der Wahrnehmung und Mechanotransduktion Fluss-induzierter Scherkräfte eine Rolle spielen. Wir konnten Hinweise dafür finden, dass ein Knockdown der G-Protein Unterfamilie $G_{q/11}$ unter atherogenem Fluss zur reduzierten Expression atherogener Genprodukte beiträgt. Weitere in-vitro und in-vivo Versuche unserer Arbeitsgruppe ergaben jedoch Hinweise dafür, dass $G_{q/11}$ nicht als Mechanosensor im engeren Sinne fungiert. Vielmehr scheint der Kationenkanal Piezo1 der primäre Mechanosensor zu sein, welcher in der Folge $G_{q/11}$ aktiviert. Die Piezo1- und $G_{q/11}$ -vermittelte Mechanotransduktion wird dabei sowohl durch atheroprotektiven als auch atherogenen Fluss aktiviert (Wang, Iring et al. 2015, Wang, Chennupati et al. 2016) und über einen Komplex, bestehend aus PECAM, Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin) und Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2) vermittelt (Fleming, Fisslthaler et al. 2005, Tzima, Irani-Tehrani et al. 2005, Wang, Iring et al. 2015). Dabei spielt die Aktivierung von Integrinen eine wichtige Rolle (Feaver, Gelfand et al. 2010, Sun, Fu et al. 2016). Weitere Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass es unter atherogenem Fluss zu einer Piezo1- und $G_{q/11}$ vermittelten „Inside-Out“-Aktivierung von Integrin $\alpha 5\beta 1$ kommt, die zu einer Focal Adhesion Kinase (FAK)-abhängigen Aktivierung von NF κ B führt. NF κ B vermittelt in der Folge die Expression atherogener Marker wie VCAM-1, CCL-2, PDGF- β und ET-1.

4.2 Epigenetische Regulation des atherogenen Phänotyps

In dem von uns durchgeführten Microarray identifizierten wir KAT7 und HDAC9 als Fluss- und $G_{q/11}$ -abhängig regulierte Chromatin-modifizierende Enzyme. Mittels siRNA-Knockdown gegen KAT7 und HDAC9 untersuchten wir anschließend deren Relevanz im Hinblick auf die Regulation eines atherogenen Phänotyps unter Fluss.

4.2.1 KAT7

Im Microarray bewirkte atherogener Fluss eine Hochregulation von KAT7, die durch einen $G_{q/11}$ -Knockdown reduziert wurde. Dies werteten wir als Hinweis für eine Fluss- und darüber hinaus $G_{q/11}$ -abhängige Regulation von KAT7.

Zusätzlich konnten wir durch einen Anti-KAT7-siRNA-Knockdown zeigen, dass die Hochregulation des proinflammatorischen Markers CCL-2 unter atherogenem Fluss KAT7-abhängig reguliert ist. Dabei deuten unsere Ergebnisse auf eine atherogene Wirkung von KAT7 hin.

Bei KAT7 handelt es sich um eine Histon-Azetyltransferase aus der MYST-Familie, die je nach Bindungspartner H3 oder H4 azetyliert (Lalonde, Avvakumov et al. 2013). Die Ergebnisse aus unseren Knockdown-Experimenten deuten darauf hin, dass KAT7 bei der Vermittlung eines atherogenen Phänotyps involviert ist, da ein KAT7-Knockdown unter atherogenem Fluss zu einer deutlichen Reduktion der CCL-2 Expression führte. Unsere Ergebnisse werden durch Studien gestützt, die bereits unter statischen Bedingungen eine atherogene Wirkung von Histon-Azetyltransferasen im Sinne einer erhöhten Expression proinflammatorischer Marker wie CCL-2 in Reaktion auf proinflammatorische Stimuli beschrieben haben (Dje N'Guessan, Riediger et al. 2009, Chen, Feng et al. 2010, Yun, Jialal et al. 2011). Was den Einfluss unterschiedlicher Flussprofile angeht, gibt es bislang Daten, die zeigen, dass atheroprotektiver Fluss über die Azetylierung der eNOS-Promotorregion und die damit einhergehende erhöhte Expression von Stickstoffmonoxid atheroprotektive Effekte zur Folge (Fish, Matouk et al. 2005). Unsere Daten sind hingegen ein Hinweis dafür, dass die Histon-Azetyltransferase KAT7 unter atherogenem Fluss an der Vermittlung eines atherogenen Phänotyps beteiligt ist.

KAT7 fungiert als Coaktivator von Zielgenen von Aktivator Protein 1 (AP-1) (Miotto and Struhl 2006). Nicht-genotoxischer Stress, wie beispielsweise die „unfolded protein response“ bei fehlgefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum, führt über eine c-jun N terminal Kinase (JNK)-vermittelte Phosphorylierung von c-jun zur Assoziation von KAT7 mit c-jun und H4-Azetylierung an AP-1 Zielpromotoren (Miotto and Struhl 2011). AP-1 Zielgene wiederum fördern die Expression atherogener Marker (Bryan, Duckles et al. 2014). So ist AP-1 ein Transkriptionsfaktor für das sogenannte 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate (TPA) responsive element, das die Scherkraft-induzierte Expression von CCL-2 vermittelt (Shyy, Li et al. 1993, Chien 2003). Dies könnte ein möglicher Mechanismus sein, über den KAT7 unter atherogenem Fluss einen proinflammatorischen Phänotyp, im Sinne einer erhöhten CCL-2-Expression, fördert.

Neuere Daten geben Hinweise dafür, dass KAT7 in Endothelzellen die Expression von VEGFR2 reguliert und ein Knockdown von KAT7 zur verringerten Expression von VEGFR2 führt (Yan, Turgeon et al. 2018). VEGFR2 ist Bestandteil des in Kapitel 4.1. beschriebenen mechanosensiven Komplexes bestehend aus PECAM, VE-Cadherin und VEGFR2, der unter atherogenem Fluss $G_{q/11}$ -abhängig atherogene Effekte vermittelt (Tzima, Irani-Tehrani et al. 2005). Insofern könnte die durch den KAT7-Knockdown beobachtete Herunterregulation atherogener Marker bei atherogenem Fluss durch eine verminderte Expression von VEGFR2 bedingt sein. Es ließe sich postulieren, dass es unter atherogenem Fluss zu einer $G_{q/11}$ -abhängigen Aktivierung von KAT7 kommt, die wiederum über eine vermehrte Expression von VEGFR2 zur vermehrten Expression atherogener Marker führt.

4.2.2 HDAC9

Im Microarray bewirkte atheroprotektiver Fluss eine vermehrte Expression von HDAC9, die durch den $G_{q/11}$ -Knockdown weiter verstärkt wurde. Dies deuteten wir als Hinweis für eine Fluss- und darüber hinaus $G_{q/11}$ -abhängige Regulation von HDAC9.

Zusätzlich konnten wir durch einen Anti-HDAC9-siRNA-Knockdown zeigen, dass die Hochregulation des proinflammatorischen Markers CCL-2 sowohl unter atherogenem als auch atheroprotektivem Fluss und die Hochregulation von ET-1 unter atherogenem Fluss HDAC9-abhängig reguliert ist. Dabei deuten unsere Ergebnisse auf eine atheroprotektive Wirkung von HDAC9 hin.

Bei HDAC9 handelt es sich um eine Histon-Deazetylase, die in vielen verschiedenen Geweben und Zelltypen, unter anderem auch Endothelzellen, exprimiert wird (Haberland, Montgomery et al. 2009). Unsere Ergebnisse reihen sich in Untersuchungen ein, die zeigen, dass HDAC im Allgemeinen eine atheroprotektive und antiinflammatorische Wirkung entfalten (Ito, Hanazawa et al. 2004, Choi, Nam et al. 2005, Dje N'Guessan, Riediger et al. 2009, Kong, Fang et al. 2009, Zhou, Margariti et al. 2011, Pandey, Sikka et al. 2014) und die endotheliale Integrität aufrecht erhalten können (Zampetaki, Zeng et al. 2010).

Genomweite Assoziationsstudien zeigen, dass eine genetische Variante im HDAC9-Genlokus mit Schlaganfällen (Bellenguez, Bevan et al. 2012) und der Anfälligkeit für

Schlaganfall und Koronare Herzkrankheit assoziiert ist (Dichgans, Malik et al. 2014, Wang, Han et al. 2016). Hierbei ist jedoch über die Assoziation hinaus der genaue pathophysiologische Zusammenhang bislang unklar. Die daraufhin durchgeführten Untersuchungen zeigten zwar, dass die HDAC9-Expression in verschiedenen atherosklerotischen Plaques in Aorta und Karotiden erhöht ist (Markus, Makela et al. 2013), allerdings bleibt unklar, ob HDAC9 in diesem Zusammenhang atherogen wirkt oder kompensatorisch als atheroprotektiver Faktor im Gewebe vermehrt exprimiert wird. Darüber hinaus ist die Wirkung von HDAC9 vermutlich zellspezifisch, so dass eine Erhöhung der Expression in Plaquetgewebe, das aus unterschiedlichen Zelltypen besteht, relativ unspezifisch ist und keine sicheren Hinweise darauf gibt, welche Funktion HDAC9 in diesem Zusammenhang ausübt. Durch unsere Versuche in isolierten Endothelzellen hingegen, konnten wir eine endothelzellspezifische atheroprotektive Wirkung von HDAC9 aufzeigen. Dass bei der Bedeutung von HDAC, und damit möglicherweise auch bei HDAC9, der Zelltyp eine wichtige Rolle spielt, zeigt sich auch bei HDAC3, dessen Deletion in Makrophagen zur Plaquestabilisierung führt (Hoeksema, Gijbels et al. 2014), in Endothelzellen aber atheroprotektive Wirkung hat (Zampetaki, Zeng et al. 2010). In Makrophagen gibt es sowohl Hinweise für eine atherogene Wirkung von HDAC9 (Cao, Rong et al. 2014, Smith 2014, Azghandi, Prell et al. 2015) als auch eine mögliche atheroprotektive Wirkung, da HDAC9 ein Zielgen der MicroRNA-18 ist, die HDAC9 in Makrophagen hemmt, wodurch es zu vermehrter Expression proinflammatorischer Zytokine und dadurch vermehrter Atherosklerose kommt (Cheng, Gong et al. 2017).

Histon-Deazetylasen können, ebenso wie Histon-Azetyltransferasen, neben Histonen auch Nicht-Histonmoleküle modifizieren (Kouzarides 2000) und dadurch als transkriptionelle Coaktivatoren, z.B. p300/CBP, (Ogryzko, Schiltz et al. 1996) oder Corepressoren fungieren (Cress and Seto 2000). Dies könnte ein weiterer Mechanismus sein durch den HDAC9 atheroprotektive Effekte im Endothel ausübt. So ist für andere Histon-Deazetylasen ein potenzieller antiinflammatorischer Mechanismus über die direkte Hemmung von NF κ B beschrieben (Ito, Barnes et al. 2000, Lee, Kim et al. 2000, Chen, Fischle et al. 2001, Zhong, May et al. 2002, Yeung, Hoberg et al. 2004, Dje N'Guessan, Riediger et al. 2009).

Zusammengenommen konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass die Ausbildung eines atherogenen Phänotyps und dessen epigenetische Regulation unter Fluss $G_{q/11}$ -abhängig reguliert sind. Darüber hinaus deuten unsere Ergebnisse auf eine atherogene Wirkung von KAT7 und eine atheroprotektive Wirkung von HDAC9 im Kontext der Atherosklerose hin.

Die tatsächliche Relevanz dieser Ergebnisse, auch im Hinblick auf eine mögliche pharmakotherapeutische Therapie der Atherosklerose mit Chromatin-modifizierenden Enzymen als Zielstrukturen, ist mittels in vivo loss-of-function und gain-of-function-Studien weiter zu untersuchen.

Darüber hinaus soll an dieser Stelle auf einige Limitationen und offen stehende Fragen dieser Dissertation eingegangen werden.

Zum einen werden in dieser Arbeit und dem von uns verwendeten Versuchsaufbau keinerlei individuelle und systemisch wirksame Risikofaktoren wie Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie oder Feinstaub und Infektionen berücksichtigt, so dass sich über den Zusammenhang lokaler Flussverhältnisse und systemischer Risikofaktoren aus unseren Ergebnissen keine Aussagen machen lassen. Zur Erarbeitung eines umfassenderen pathophysiologischen Modells der Atherosklerose und zur besseren Prädiktion des individuellen Atheroskleroserisikos sollten jedoch in künftigen experimentellen Untersuchungen und möglichen Weiterentwicklungen unseres Versuchsaufbaus auch individuelle und systemisch wirksame Risikofaktoren untersucht werden, beispielsweise durch die Verwendung von glukosehaltigerem Medium zur Simulation einer diabetischen Stoffwechsellage. Letztlich wird der Zusammenhang von lokalen Flussprofilen und systemischen Risikofaktoren im Hinblick auf die Pathogenese der Atherosklerose dann durch in-vivo-Experimente weiter überprüft werden müssen. Dabei sollten neben den von mir genannten und etablierten Risikofaktoren Rauchen, Dyslipidämie, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie auch bislang weniger gut etablierte aber sich weiterhin in Untersuchung befindliche Risikofaktoren wie chronische Infektionen und Feinstaub berücksichtigt werden. Insbesondere hinsichtlich Feinstaub zeichnet sich eine Bedeutung in der Pathophysiologie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen und damit auch der Atherosklerose ab (Kunzli, Jerrett et al. 2010, Adar, Sheppard et al. 2013, Kunzli

2013, Kaufman, Spalt et al. 2016). Vor dem Hintergrund der aktuellen ökologischen und politischen Lage stellt Feinstaub zudem einen wichtigen und globalen gesundheitspolitischen Aspekt dar.

Zum Anderen bleibt unsere Arbeit eine Antwort auf die Frage schuldig, warum es Abschnitte im menschlichen Gefäßbett gibt, in denen zwar atherogener Fluss herrscht, die aber dennoch nicht regelhaft von Atherosklerose betroffen sind wie beispielsweise die A. thoracica interna (Marx, Jax et al. 2001, Furjanic 2008) und die A. femoris profunda (Poulsen and Bertelsen 1968, Halvorson, Taylor et al. 2008). Dies macht deutlich, dass die regionale Verteilung atherosklerotischer Plaques nicht allein durch atherogenen Fluss bestimmt wird und weitere Faktoren eine Rolle spielen müssen, wie etwa anatomische Varianten der Gefäßabgänge und gleichzeitig vorliegende systemische Risikofaktoren wie Diabetes mellitus (Jude, Oyibo et al. 2001, Burusapat, Nanasilp et al. 2016). Beispielsweise könnte bei der A. thoracica interna die anatomische Beschaffenheit mit vermehrt elastischen Fasern für eine geringere Atheroskleroseanfälligkeit von Bedeutung sein (Marx, Jax et al. 2001). Für die Beantwortung dieser offenen Frage könnte zunächst eine experimentelle Annäherung an in-vivo-Bedingungen, zum Beispiel durch die Nutzung von kanalisierten Objektträgern mit Kalibersprüngen oder Bifurkationen hilfreich sein. Zudem sollten wie bereits oben erwähnt auch systemische Risikofaktoren in den Versuchsaufbau mit einbezogen werden. Letztlich müssen die damit gewonnenen in-vitro-Ergebnisse dann mittels in-vivo-Versuchen weiter untersucht und etabliert werden.

Literaturverzeichnis

Adar, S. D., L. Sheppard, S. Vedal, J. F. Polak, P. D. Sampson, A. V. Diez Roux, M. Budoff, D. R. Jacobs, Jr., R. G. Barr, K. Watson and J. D. Kaufman (2013). "Fine particulate air pollution and the progression of carotid intima-medial thickness: a prospective cohort study from the multi-ethnic study of atherosclerosis and air pollution." *PLoS Med* 10(4): e1001430.

Aung, H. T., K. Schroder, S. R. Himes, K. Brion, W. van Zuylen, A. Trieu, H. Suzuki, Y. Hayashizaki, D. A. Hume, M. J. Sweet and T. Ravasi (2006). "LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression." *Faseb j* 20(9): 1315-1327.

Azghandi, S., C. Prell, S. W. van der Laan, M. Schneider, R. Malik, K. Berer, N. Gerdes, G. Pasterkamp, C. Weber, C. Haffner and M. Dichgans (2015). "Deficiency of the stroke relevant HDAC9 gene attenuates atherosclerosis in accord with allele-specific effects at 7p21.1." *Stroke* 46(1): 197-202.

Bao, X., C. Lu and J. A. Frangos (1999). "Temporal gradient in shear but not steady shear stress induces PDGF-A and MCP-1 expression in endothelial cells: role of NO, NF kappa B, and egr-1." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(4): 996-1003.

Bao, X., C. Lu and J. A. Frangos (2001). "Mechanism of temporal gradients in shear-induced ERK1/2 activation and proliferation in endothelial cells." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(1): H22-29.

Bellenguez, C., S. Bevan, A. Gschwendtner, C. C. Spencer, A. I. Burgess, M. Pirinen, C. A. Jackson, M. Traylor, A. Strange, Z. Su, G. Band, P. D. Syme, R. Malik, J. Pera, B. Norrving, R. Lemmens, C. Freeman, R. Schanz, T. James, D. Poole, L. Murphy, H. Segal, L. Cortellini, Y. C. Cheng, D. Woo, M. A. Nalls, B. Muller-Myhsok, C. Meisinger, U. Seedorf, H. Ross-Adams, S. Boonen, D. Wloch-Kopec, V. Valant, J. Slark, K. Furie, H. Delavaran, C. Langford, P. Deloukas, S. Edkins, S. Hunt, E. Gray, S. Dronov, L. Peltonen, S. Gretarsdottir, G. Thorleifsson, U. Thorsteinsdottir, K. Stefansson, G. B. Boncoraglio, E. A. Parati, J. Attia, E. Holliday, C. Levi, M. G. Franzosi, A. Goel, A. Helgadottir, J. M. Blackwell, E. Bramon, M. A. Brown, J. P. Casas, A. Corvin, A. Duncanson, J. Jankowski, C. G. Mathew, C. N. Palmer, R. Plomin, A. Rautanen, S. J. Sawcer, R. C. Trembath, A. C. Viswanathan, N. W. Wood, B. B. Worrall, S. J. Kittner, B. D. Mitchell, B. Kissela, J. F. Meschia, V. Thijs, A. Lindgren, M. J. Macleod, A. Slowik, M. Walters, J. Rosand, P. Sharma, M. Farrall, C. L. Sudlow, P. M. Rothwell, M. Dichgans, P. Donnelly and H. S. Markus (2012). "Genome-wide association study identifies a variant in HDAC9 associated with large vessel ischemic stroke." *Nat Genet* 44(3): 328-333.

Boring, L., J. Gosling, M. Cleary and I. F. Charo (1998). "Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis." *Nature* 394(6696): 894-897.

Brand, K., S. Page, G. Rogler, A. Bartsch, R. Brandl, R. Knuechel, M. Page, C. Kaltschmidt, P. A. Baeuerle and D. Neumeier (1996). "Activated transcription factor

nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion." *J Clin Invest* 97(7): 1715-1722.

Bryan, M. T., H. Duckles, S. Feng, S. T. Hsiao, H. R. Kim, J. Serbanovic-Canic and P. C. Evans (2014). "Mechanoresponsive networks controlling vascular inflammation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(10): 2199-2205.

Burusapat, C., T. Nanasilp, P. Kunaphensaeng and A. Ruamthanthong (2016). "Effect of Atherosclerosis on the Lateral Circumflex Femoral Artery and Its Descending Branch: Comparative Study to Nonatherosclerotic Risk." *Plast Reconstr Surg Glob Open* 4(9): e856.

Butler, P. J., G. Norwich, S. Weinbaum and S. Chien (2001). "Shear stress induces a time- and position-dependent increase in endothelial cell membrane fluidity." *Am J Physiol Cell Physiol* 280(4): C962-969.

Campbell, L. A. and M. E. Rosenfeld (2015). "Infection and Atherosclerosis Development." *Arch Med Res* 46(5): 339-350.

Cao, Q., S. Rong, J. J. Repa, R. St Clair, J. S. Parks and N. Mishra (2014). "Histone deacetylase 9 represses cholesterol efflux and alternatively activated macrophages in atherosclerosis development." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(9): 1871-1879.

Caro, C. G., J. M. Fitz-Gerald and R. C. Schroter (1969). "Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man." *Nature* 223(5211): 1159-1160.

Cecchi, E., C. Giglioli, S. Valente, C. Lazzeri, G. F. Gensini, R. Abbate and L. Mannini (2011). "Role of hemodynamic shear stress in cardiovascular disease." *Atherosclerosis* 214(2): 249-256.

Chachisvilis, M., Y. L. Zhang and J. A. Frangos (2006). "G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(42): 15463-15468.

Chappell, D. C., S. E. Varner, R. M. Nerem, R. M. Medford and R. W. Alexander (1998). "Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium." *Circ Res* 82(5): 532-539.

Chatzizisis, Y. S., A. U. Coskun, M. Jonas, E. R. Edelman, C. L. Feldman and P. H. Stone (2007). "Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior." *J Am Coll Cardiol* 49(25): 2379-2393.

Chen, L., W. Fischle, E. Verdin and W. C. Greene (2001). "Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation." *Science* 293(5535): 1653-1657.

Chen, S., B. Feng, B. George, R. Chakrabarti, M. Chen and S. Chakrabarti (2010). "Transcriptional coactivator p300 regulates glucose-induced gene expression in endothelial cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(1): E127-137.

Chen, W., M. Bacanamwo and D. G. Harrison (2008). "Activation of p300 histone acetyltransferase activity is an early endothelial response to laminar shear stress and is essential for stimulation of endothelial nitric-oxide synthase mRNA transcription." *J Biol Chem* 283(24): 16293-16298.

Cheng, C., D. Tempel, R. van Haperen, A. van der Baan, F. Grosveld, M. J. Daemen, R. Krams and R. de Crom (2006). "Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress." *Circulation* 113(23): 2744-2753.

Cheng, H. P., D. Gong, Z. W. Zhao, P. P. He, X. H. Yu, Q. Ye, C. Huang, X. Zhang, L. Y. Chen, W. Xie, M. Zhang, L. Li, X. D. Xia, X. P. Ouyang, Y. L. Tan, Z. B. Wang, G. P. Tian, X. L. Zheng, W. D. Yin and C. K. Tang (2017). "MicroRNA-182 Promotes Lipoprotein Lipase Expression and Atherogenesis by Targeting Histone Deacetylase 9 in Apolipoprotein E-Knockout Mice." *Circ J*.

Chien, S. (2003). "Molecular and mechanical bases of focal lipid accumulation in arterial wall." *Prog Biophys Mol Biol* 83(2): 131-151.

Chiu, J. J., P. L. Lee, C. N. Chen, C. I. Lee, S. F. Chang, L. J. Chen, S. C. Lien, Y. C. Ko, S. Usami and S. Chien (2004). "Shear stress increases ICAM-1 and decreases VCAM-1 and E-selectin expressions induced by tumor necrosis factor-[alpha] in endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(1): 73-79.

Choi, J. H., K. H. Nam, J. Kim, M. W. Baek, J. E. Park, H. Y. Park, H. J. Kwon, O. S. Kwon, D. Y. Kim and G. T. Oh (2005). "Trichostatin A exacerbates atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(11): 2404-2409.

Collins, T. and M. I. Cybulsky (2001). "NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?" *J Clin Invest* 107(3): 255-264.

Conway, D. E. and M. A. Schwartz (2013). "Flow-dependent cellular mechanotransduction in atherosclerosis." *J Cell Sci* 126(Pt 22): 5101-5109.

Cress, W. D. and E. Seto (2000). "Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer." *J Cell Physiol* 184(1): 1-16.

Cuhlmann, S., K. Van der Heiden, D. Saliba, J. L. Tremoleda, M. Khalil, M. Zakkar, H. Chaudhury, A. Luong le, J. C. Mason, I. Udalova, W. Gsell, H. Jones, D. O. Haskard, R. Krams and P. C. Evans (2011). "Disturbed blood flow induces RelA expression via c-Jun N-terminal kinase 1: a novel mode of NF-kappaB regulation that promotes arterial inflammation." *Circ Res* 108(8): 950-959.

Cybulsky, M. I. and M. A. Gimbrone, Jr. (1991). "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis." *Science* 251(4995): 788-791.

Dai, G., M. R. Kaazempur-Mofrad, S. Natarajan, Y. Zhang, S. Vaughn, B. R. Blackman, R. D. Kamm, G. Garcia-Cardena and M. A. Gimbrone, Jr. (2004). "Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible

and -resistant regions of human vasculature." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(41): 14871-14876.

Davies, P. F., M. Civelek, Y. Fang and I. Fleming (2013). "The atherosusceptible endothelium: endothelial phenotypes in complex haemodynamic shear stress regions in vivo." *Cardiovasc Res* 99(2): 315-327.

Dekker, R. J., S. van Soest, R. D. Fontijn, S. Salamanca, P. G. de Groot, E. VanBavel, H. Pannekoek and A. J. Horrevoets (2002). "Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2)." *Blood* 100(5): 1689-1698.

Dela Paz, N. G., B. Melchior and J. A. Frangos (2017). "Shear stress induces Galphaq/11 activation independently of G protein-coupled receptor activation in endothelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 312(4): C428-C437.

dela Paz, N. G., B. Melchior, F. Y. Shayo and J. A. Frangos (2014). "Heparan sulfates mediate the interaction between platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and the Galphaq/11 subunits of heterotrimeric G proteins." *J Biol Chem* 289(11): 7413-7424.

DeVerse, J. S., A. S. Sandhu, N. Mendoza, C. M. Edwards, C. Sun, S. I. Simon and A. G. Passerini (2013). "Shear stress modulates VCAM-1 expression in response to TNF-alpha and dietary lipids via interferon regulatory factor-1 in cultured endothelium." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305(8): H1149-1157.

Dichgans, M., R. Malik, I. R. Konig, J. Rosand, R. Clarke, S. Gretarsdottir, G. Thorleifsson, B. D. Mitchell, T. L. Assimes, C. Levi, C. J. O'Donnell, M. Fornage, U. Thorsteinsdottir, B. M. Psaty, C. Hengstenberg, S. Seshadri, J. Erdmann, J. C. Bis, A. Peters, G. B. Boncoraglio, W. Marz, J. F. Meschia, S. Kathiresan, M. A. Ikram, R. McPherson, K. Stefansson, C. Sudlow, M. P. Reilly, J. R. Thompson, P. Sharma, J. C. Hopewell, J. C. Chambers, H. Watkins, P. M. Rothwell, R. Roberts, H. S. Markus, N. J. Samani, M. Farrall and H. Schunkert (2014). "Shared genetic susceptibility to ischemic stroke and coronary artery disease: a genome-wide analysis of common variants." *Stroke* 45(1): 24-36.

Dje N'Guessan, P., F. Riediger, K. Vardarova, S. Scharf, J. Eitel, B. Opitz, H. Slevogt, W. Weichert, A. C. Hocke, B. Schmeck, N. Suttorp and S. Hippenstiel (2009). "Statins control oxidized LDL-mediated histone modifications and gene expression in cultured human endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29(3): 380-386.

Dunn, J., R. Simmons, S. Thabet and H. Jo (2015). "The role of epigenetics in the endothelial cell shear stress response and atherosclerosis." *Int J Biochem Cell Biol* 67: 167-176.

Feaver, R. E., B. D. Gelfand, C. Wang, M. A. Schwartz and B. R. Blackman (2010). "Atheroprone hemodynamics regulate fibronectin deposition to create positive feedback that sustains endothelial inflammation." *Circ Res* 106(11): 1703-1711.

Fish, J. E., C. C. Matouk, A. Rachlis, S. Lin, S. C. Tai, C. D'Abreo and P. A. Marsden (2005). "The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code." *J Biol Chem* 280(26): 24824-24838.

Fleming, I., B. Fisslthaler, M. Dixit and R. Busse (2005). "Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells." *J Cell Sci* 118(Pt 18): 4103-4111.

Frueh, J., N. Maimari, T. Homma, S. M. Bovens, R. M. Pedrigi, L. Towhidi and R. Krams (2013). "Systems biology of the functional and dysfunctional endothelium." *Cardiovasc Res* 99(2): 334-341.

Furjanic, M. (2008). "Analyse zur Offenheitsrate der Arteria thoracica interna - versus Venenbypasses anhand angiographischer Daten bei 663 symptomatischen Patienten." Dissertation, LMU München: Fakultät für Biologie

Medizinische Fakultät

Gimbrone, M. A., Jr. and G. Garcia-Cardena (2013). "Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis." *Cardiovasc Pathol* 22(1): 9-15.

Glass, C. K. and J. L. Witztum (2001). "Atherosclerosis. the road ahead." *Cell* 104(4): 503-516.

Goldberg, A. D., C. D. Allis and E. Bernstein (2007). "Epigenetics: a landscape takes shape." *Cell* 128(4): 635-638.

Gu, L., Y. Okada, S. K. Clinton, C. Gerard, G. K. Sukhova, P. Libby and B. J. Rollins (1998). "Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice." *Mol Cell* 2(2): 275-281.

Gudi, S., I. Huvar, C. R. White, N. L. McKnight, N. Dusserre, G. R. Boss and J. A. Frangos (2003). "Rapid activation of Ras by fluid flow is mediated by G α (q) and G β gamma subunits of heterotrimeric G proteins in human endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(6): 994-1000.

Gudi, S., J. P. Nolan and J. A. Frangos (1998). "Modulation of GTPase activity of G proteins by fluid shear stress and phospholipid composition." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5): 2515-2519.

Gudi, S. R., C. B. Clark and J. A. Frangos (1996). "Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction." *Circ Res* 79(4): 834-839.

Haberland, M., R. L. Montgomery and E. N. Olson (2009). "The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy." *Nat Rev Genet* 10(1): 32-42.

Hadley, M. B., J. Baumgartner and R. Vedanthan (2018). "Developing a Clinical Approach to Air Pollution and Cardiovascular Health." *Circulation* 137(7): 725-742.

Hahn, C. and M. A. Schwartz (2009). "Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(1): 53-62.

Hajra, L., A. I. Evans, M. Chen, S. J. Hyduk, T. Collins and M. I. Cybulsky (2000). "The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(16): 9052-9057.

Halvorson, E. G., H. O. Taylor and D. P. Orgill (2008). "Patency of the descending branch of the lateral circumflex femoral artery in patients with vascular disease." *Plast Reconstr Surg* 121(1): 121-129.

Hirata, Y., Y. Takagi, Y. Fukuda and F. Marumo (1989). "Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells." *Atherosclerosis* 78(2-3): 225-228.

Hoeksema, M. A., M. J. Gijbels, J. Van den Bossche, S. van der Velden, A. Sijm, A. E. Neele, T. Seijkens, J. L. Stoger, S. Meiler, M. C. Boshuizen, G. M. Dallinga-Thie, J. H. Levels, L. Boon, S. E. Mullican, N. J. Spann, J. P. Cleutjens, C. K. Glass, M. A. Lazar, C. J. de Vries, E. A. Biessen, M. J. Daemen, E. Lutgens and M. P. de Winther (2014). "Targeting macrophage Histone deacetylase 3 stabilizes atherosclerotic lesions." *EMBO Mol Med* 6(9): 1124-1132.

Hsiai, T. K., S. K. Cho, P. K. Wong, M. Ing, A. Salazar, A. Sevanian, M. Navab, L. L. Demer and C. M. Ho (2003). "Monocyte recruitment to endothelial cells in response to oscillatory shear stress." *Faseb j* 17(12): 1648-1657.

Hsieh, H. J., N. Q. Li and J. A. Frangos (1991). "Shear stress increases endothelial platelet-derived growth factor mRNA levels." *Am J Physiol* 260(2 Pt 2): H642-646.

Iiyama, K., L. Hajra, M. Iiyama, H. Li, M. DiChiara, B. D. Medoff and M. I. Cybulsky (1999). "Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation." *Circ Res* 85(2): 199-207.

Illi, B., S. Nanni, A. Scopece, A. Farsetti, P. Biglioli, M. C. Capogrossi and C. Gaetano (2003). "Shear stress-mediated chromatin remodeling provides molecular basis for flow-dependent regulation of gene expression." *Circ Res* 93(2): 155-161.

Ito, K., P. J. Barnes and I. M. Adcock (2000). "Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12." *Mol Cell Biol* 20(18): 6891-6903.

Ito, K., T. Hanazawa, K. Tomita, P. J. Barnes and I. M. Adcock (2004). "Oxidative stress reduces histone deacetylase 2 activity and enhances IL-8 gene expression: role of tyrosine nitration." *Biochem Biophys Res Commun* 315(1): 240-245.

Jaalouk, D. E. and J. Lammerding (2009). "Mechanotransduction gone awry." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(1): 63-73.

Jaenisch, R. and A. Bird (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." *Nat Genet* 33 Suppl: 245-254.

Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." *Science* 293(5532): 1074-1080.

Jiang, Y. Z., E. Manduchi, J. M. Jimenez and P. F. Davies (2015). "Endothelial epigenetics in biomechanical stress: disturbed flow-mediated epigenomic plasticity in vivo and in vitro." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(6): 1317-1326.

Jude, E. B., S. O. Oyibo, N. Chalmers and A. J. Boulton (2001). "Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome." *Diabetes Care* 24(8): 1433-1437.

Kaufman, J. D., E. W. Spalt, C. L. Curl, A. Hajat, M. R. Jones, S. Y. Kim, S. Vedal, A. A. Szpiro, A. Gassett, L. Sheppard, M. L. Daviglius and S. D. Adar (2016). "Advances in Understanding Air Pollution and CVD." *Glob Heart* 11(3): 343-352.

Khachigian, L. M., N. Resnick, M. A. Gimbrone, Jr. and T. Collins (1995). "Nuclear factor-kappa B interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress response element in vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress." *J Clin Invest* 96(2): 1169-1175.

Kong, X., M. Fang, P. Li, F. Fang and Y. Xu (2009). "HDAC2 deacetylates class II transactivator and suppresses its activity in macrophages and smooth muscle cells." *J Mol Cell Cardiol* 46(3): 292-299.

Kornberg, R. D. (1977). "Structure of chromatin." *Annu Rev Biochem* 46: 931-954.

Kouzarides, T. (2000). "Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation?" *EMBO J* 19(6): 1176-1179.

Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." *Cell* 128(4): 693-705.

Kuchan, M. J. and J. A. Frangos (1993). "Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells." *Am J Physiol* 264(1 Pt 2): H150-156.

Kuchan, M. J. and J. A. Frangos (1994). "Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells." *Am J Physiol* 266(3 Pt 1): C628-636.

Kumar, A., Z. Lin, S. SenBanerjee and M. K. Jain (2005). "Tumor necrosis factor alpha-mediated reduction of KLF2 is due to inhibition of MEF2 by NF-kappaB and histone deacetylases." *Mol Cell Biol* 25(14): 5893-5903.

Kunzli, N. (2013). "Air pollution and atherosclerosis: new evidence to support air quality policies." *PLoS Med* 10(4): e1001432.

Kunzli, N., M. Jerrett, R. Garcia-Esteban, X. Basagana, B. Beckermann, F. Gilliland, M. Medina, J. Peters, H. N. Hodis and W. J. Mack (2010). "Ambient air pollution and the progression of atherosclerosis in adults." *PLoS One* 5(2): e9096.

Kwon, I. S., W. Wang, S. Xu and Z. G. Jin (2014). "Histone deacetylase 5 interacts with Kruppel-like factor 2 and inhibits its transcriptional activity in endothelium." *Cardiovasc Res* 104(1): 127-137.

Lachner, M., D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler and T. Jenuwein (2001). "Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins." *Nature* 410(6824): 116-120.

Lalonde, M. E., N. Avvakumov, K. C. Glass, F. H. Joncas, N. Saksouk, M. Holliday, E. Paquet, K. Yan, Q. Tong, B. J. Klein, S. Tan, X. J. Yang, T. G. Kutateladze and J. Cote (2013). "Exchange of associated factors directs a switch in HBO1 acetyltransferase histone tail specificity." *Genes Dev* 27(18): 2009-2024.

Lee, D. Y., C. I. Lee, T. E. Lin, S. H. Lim, J. Zhou, Y. C. Tseng, S. Chien and J. J. Chiu (2012). "Role of histone deacetylases in transcription factor regulation and cell cycle modulation in endothelial cells in response to disturbed flow." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(6): 1967-1972.

Lee, S. K., J. H. Kim, Y. C. Lee, J. Cheong and J. W. Lee (2000). "Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor." *J Biol Chem* 275(17): 12470-12474.

Libby, P. (2012). "Inflammation in atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(9): 2045-2051.

Libby, P., P. M. Ridker and G. K. Hansson (2011). "Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis." *Nature* 473(7347): 317-325.

Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* 389(6648): 251-260.

Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." *Nature* 407(6801): 233-241.

Mai, A. (2007). "The therapeutic uses of chromatin-modifying agents." *Expert Opin Ther Targets* 11(6): 835-851.

Malek, A. and S. Izumo (1992). "Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium." *Am J Physiol* 263(2 Pt 1): C389-396.

Malek, A. M., S. L. Alper and S. Izumo (1999). "Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis." *JAMA* 282(21): 2035-2042.

Malek, A. M., G. H. Gibbons, V. J. Dzau and S. Izumo (1993). "Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor B chain in vascular endothelium." *J Clin Invest* 92(4): 2013-2021.

Markus, H. S., K. M. Makela, S. Bevan, E. Raitoharju, N. Oksala, J. C. Bis, C. O'Donnell, A. Hainsworth and T. Lehtimaki (2013). "Evidence HDAC9 genetic variant associated with ischemic stroke increases risk via promoting carotid atherosclerosis." *Stroke* 44(5): 1220-1225.

Marx, R., T. W. Jax, G. Plehn, C. M. Schannwell, M. Horlitz, R. M. Klein, H. Lapp and H. Gulker (2001). "Morphological differences of the internal thoracic artery in patients with and without coronary artery disease--evaluation by duplex-scanning." *Eur J Cardiothorac Surg* 20(4): 755-759.

Matouk, C. C. and P. A. Marsden (2008). "Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression." *Circ Res* 102(8): 873-887.

Mau, T. and R. Yung (2014). "Potential of epigenetic therapies in non-cancerous conditions." *Front Genet* 5: 438.

McCormick, S. M., S. G. Eskin, L. V. McIntire, C. L. Teng, C. M. Lu, C. G. Russell and K. K. Chittur (2001). "DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 8955-8960.

Miotto, B. and K. Struhl (2006). "Differential gene regulation by selective association of transcriptional coactivators and bZIP DNA-binding domains." *Mol Cell Biol* 26(16): 5969-5982.

Miotto, B. and K. Struhl (2011). "JNK1 phosphorylation of Cdt1 inhibits recruitment of HBO1 histone acetylase and blocks replication licensing in response to stress." *Mol Cell* 44(1): 62-71.

Mohan, S., N. Mohan and E. A. Sprague (1997). "Differential activation of NF-kappa B in human aortic endothelial cells conditioned to specific flow environments." *Am J Physiol* 273(2 Pt 1): C572-578.

Mortality, G. B. D. and C. Causes of Death (2016). "Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015." *Lancet* 388(10053): 1459-1544.

Mortuza, R., B. Feng and S. Chakrabarti (2015). "SIRT1 reduction causes renal and retinal injury in diabetes through endothelin 1 and transforming growth factor beta1." *J Cell Mol Med* 19(8): 1857-1867.

Nagel, T., N. Resnick, W. J. Atkinson, C. F. Dewey, Jr. and M. A. Gimbrone, Jr. (1994). "Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells." *J Clin Invest* 94(2): 885-891.

Nagel, T., N. Resnick, C. F. Dewey, Jr. and M. A. Gimbrone, Jr. (1999). "Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(8): 1825-1834.

Nigro, P., J. Abe and B. C. Berk (2011). "Flow shear stress and atherosclerosis: a matter of site specificity." *Antioxid Redox Signal* 15(5): 1405-1414.

Nollert, M. U., S. L. Diamond and L. V. McIntire (1991). "Hydrodynamic shear stress and mass transport modulation of endothelial cell metabolism." *Biotechnol Bioeng* 38(6): 588-602.

Ogryzko, V. V., R. L. Schiltz, V. Russanova, B. H. Howard and Y. Nakatani (1996). "The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases." *Cell* 87(5): 953-959.

Otte, L. A., K. S. Bell, L. Loufrani, J. C. Yeh, B. Melchior, D. N. Dao, H. Y. Stevens, C. R. White and J. A. Frangos (2009). "Rapid changes in shear stress induce dissociation of a G α (q/11)-platelet endothelial cell adhesion molecule-1 complex." *J Physiol* 587(Pt 10): 2365-2373.

Palumbo, R., C. Gaetano, A. Antonini, G. Pompilio, E. Bracco, L. Ronnstrand, C. H. Heldin and M. C. Capogrossi (2002). "Different effects of high and low shear stress on platelet-derived growth factor isoform release by endothelial cells: consequences for smooth muscle cell migration." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(3): 405-411.

Pandey, D., G. Sikka, Y. Bergman, J. H. Kim, S. Ryoo, L. Romer and D. Berkowitz (2014). "Transcriptional regulation of endothelial arginase 2 by histone deacetylase 2." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(7): 1556-1566.

Passerini, A. G., D. C. Polacek, C. Shi, N. M. Francesco, E. Manduchi, G. R. Grant, W. F. Pritchard, S. Powell, G. Y. Chang, C. J. Stoeckert, Jr. and P. F. Davies (2004). "Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the adult porcine aorta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8): 2482-2487.

Poulsen, T. and S. Bertelsen (1968). "Significance of the deep femoral artery in atherosclerosis of the arteries in the lower extremities." *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* 2(2): 120-127.

Ranjan, V., Z. Xiao and S. L. Diamond (1995). "Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress." *Am J Physiol* 269(2 Pt 2): H550-555.

Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." *N Engl J Med* 340(2): 115-126.

Ross, R. (1999). "Atherosclerosis is an inflammatory disease." *Am Heart J* 138(5 Pt 2): S419-420.

Shyy, Y. J., H. J. Hsieh, S. Usami and S. Chien (1994). "Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11): 4678-4682.

Shyy, Y. J., Y. S. Li and P. E. Kolattukudy (1993). "Activation of MCP-1 gene expression is mediated through multiple signaling pathways." *Biochem Biophys Res Commun* 192(2): 693-699.

Smith, J. D. (2014). "New role for histone deacetylase 9 in atherosclerosis and inflammation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(9): 1798-1799.

Sterner, D. E. and S. L. Berger (2000). "Acetylation of histones and transcription-related factors." *Microbiol Mol Biol Rev* 64(2): 435-459.

Sun, X., Y. Fu, M. Gu, L. Zhang, D. Li, H. Li, S. Chien, J. Y. Shyy and Y. Zhu (2016). "Activation of integrin alpha5 mediated by flow requires its translocation to membrane lipid rafts in vascular endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(3): 769-774.

Topper, J. N., J. Cai, D. Falb and M. A. Gimbrone, Jr. (1996). "Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(19): 10417-10422.

Townsend, N., M. Nichols, P. Scarborough and M. Rayner (2015). "Cardiovascular disease in Europe - epidemiological update 2015." *Eur Heart J* 36(40): 2696-2705.

Tzima, E., M. Irani-Tehrani, W. B. Kiosses, E. Dejana, D. A. Schultz, B. Engelhardt, G. Cao, H. DeLisser and M. A. Schwartz (2005). "A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress." *Nature* 437(7057): 426-431.

Walpolo, P. L., A. I. Gotlieb, M. I. Cybulsky and B. L. Langille (1995). "Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(1): 2-10.

Wang, G. G., C. D. Allis and P. Chi (2007). "Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications." *Trends Mol Med* 13(9): 363-372.

Wang, S., R. Chennupati, H. Kaur, A. Iring, N. Wettschureck and S. Offermanns (2016). "Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release." *J Clin Invest* 126(12): 4527-4536.

Wang, S., A. Iring, B. Strilic, J. Albarran Juarez, H. Kaur, K. Troidl, S. Tonack, J. C. Burbiel, C. E. Muller, I. Fleming, J. O. Lundberg, N. Wettschureck and S. Offermanns (2015). "P2Y(2) and Gq/G(1)(1) control blood pressure by mediating endothelial mechanotransduction." *J Clin Invest* 125(8): 3077-3086.

Wang, W., C. H. Ha, B. S. Jhun, C. Wong, M. K. Jain and Z. G. Jin (2010). "Fluid shear stress stimulates phosphorylation-dependent nuclear export of HDAC5 and mediates expression of KLF2 and eNOS." *Blood* 115(14): 2971-2979.

Wang, X. B., Y. D. Han, S. Sabina, N. H. Cui, S. Zhang, Z. J. Liu, C. Li and F. Zheng (2016). "HDAC9 Variant Rs2107595 Modifies Susceptibility to Coronary Artery Disease and the Severity of Coronary Atherosclerosis in a Chinese Han Population." *PLoS One* 11(8): e0160449.

Webster, A. L., M. S. Yan and P. A. Marsden (2013). "Epigenetics and cardiovascular disease." *Can J Cardiol* 29(1): 46-57.

Wettschureck, N. and S. Offermanns (2005). "Mammalian G proteins and their cell type specific functions." *Physiol Rev* 85(4): 1159-1204.

Wierda, R. J., S. B. Geutskens, J. W. Jukema, P. H. Quax and P. J. van den Elsen (2010). "Epigenetics in atherosclerosis and inflammation." *J Cell Mol Med* 14(6a): 1225-1240.

Wilcox, J. N., K. M. Smith, L. T. Williams, S. M. Schwartz and D. Gordon (1988). "Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization." *J Clin Invest* 82(3): 1134-1143.

Yan, M. S., P. J. Turgeon, H. J. Man, M. K. Dubinsky, J. J. D. Ho, S. El-Rass, Y. D. Wang, X. Y. Wen and P. A. Marsden (2018). "Histone acetyltransferase 7 (KAT7)-dependent intragenic histone acetylation regulates endothelial cell gene regulation." *J Biol Chem* 293(12): 4381-4402.

Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto and T. Masaki (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." *Nature* 332(6163): 411-415.

Yeung, F., J. E. Hoberg, C. S. Ramsey, M. D. Keller, D. R. Jones, R. A. Frye and M. W. Mayo (2004). "Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase." *EMBO J* 23(12): 2369-2380.

Yoshizumi, M., H. Kurihara, T. Sugiyama, F. Takaku, M. Yanagisawa, T. Masaki and Y. Yazaki (1989). "Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* 161(2): 859-864.

Yun, J. M., I. Jialal and S. Devaraj (2011). "Epigenetic regulation of high glucose-induced proinflammatory cytokine production in monocytes by curcumin." *J Nutr Biochem* 22(5): 450-458.

Zampetaki, A., L. Zeng, A. Margariti, Q. Xiao, H. Li, Z. Zhang, A. E. Pepe, G. Wang, O. Habi, E. deFalco, G. Cockerill, J. C. Mason, Y. Hu and Q. Xu (2010). "Histone deacetylase 3 is critical in endothelial survival and atherosclerosis development in response to disturbed flow." *Circulation* 121(1): 132-142.

Zhang, Y., J. Qiu, X. Wang, Y. Zhang and M. Xia (2011). "AMP-activated protein kinase suppresses endothelial cell inflammation through phosphorylation of transcriptional coactivator p300." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(12): 2897-2908.

Zhong, H., M. J. May, E. Jimi and S. Ghosh (2002). "The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1." *Mol Cell* 9(3): 625-636.

Zhou, B., A. Margariti, L. Zeng, O. Habi, Q. Xiao, D. Martin, G. Wang, Y. Hu, X. Wang and Q. Xu (2011). "Splicing of histone deacetylase 7 modulates smooth muscle cell proliferation and neointima formation through nuclear beta-catenin translocation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(11): 2676-2684.

Ziegler, T., K. Bouzourene, V. J. Harrison, H. R. Brunner and D. Hayoz (1998). "Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(5): 686-692.

Zou, Y., H. Akazawa, Y. Qin, M. Sano, H. Takano, T. Minamino, N. Makita, K. Iwanaga, W. Zhu, S. Kudoh, H. Toko, K. Tamura, M. Kihara, T. Nagai, A. Fukamizu, S. Umemura, T. Iiri, T. Fujita and I. Komuro (2004). "Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II." *Nat Cell Biol* 6(6): 499-506.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alexander Andreas Degkwitz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Der Einfluss atherogener vs. atheroprotektiver Flussprofile auf die endotheliale Genexpression – G-Protein-abhängige Signaltransduktion und epigenetische Regulationsmechanismen 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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation 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.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

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

Danksagung

Für die Möglichkeit dieser experimentellen Arbeit in der Klinik für Kardiologie und Angiologie und die Überlassung des Themas dieser Arbeit möchte ich mich zunächst bei Professor Dr. med. Verena Stangl bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med Till Althoff, für die Betreuung und Geduld über den gesamten Zeitraum der Promotion hinweg.

Daneben gilt mein ausdrücklicher Dank dem ganzen Laborteam des CCR der AG Stangl, die mir während der praktischen Ausführung stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Namentlich möchte ich hier vor allem Minoo Moobed, Cornelia Bartsch, Angelika Vietzke, Andrea Weller, Susanne Metzkow, Dr. Mario Lorenz und Dr. Antje Ludwig sowie Kerstin Wöltke nennen.

Beim Deutschen Zentrum für Herz-Kreislauf-Forschung e.V. möchte ich mich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Doktorandenstipendiums herzlich bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der Arbeit stets unterstützt und bis zuletzt immer wieder ermutigt haben.