

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

DISSERTATION

Regulation des Zusammenspiels von
Foxo-1, Angiopoietin-2/Tie-2 und ADAMTS1
bei der Angiogenese durch Mechanismen der
Mechanotransduktion

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sven Chlench

aus Bad Homburg v. d. Höhe

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. R. Pries
2. Prof. Dr. med. H. Hoppeler
3. Prof. Dr. J. Rittweger

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	4-17
Titel, Autor, Abstract.....	4
Einleitung.....	4-5
Methoden.....	5-8
Ergebnisse.....	8-9
Diskussion.....	10-13
Literatur.....	14-17
Anteilsklärung.....	18-19
Publikationen.....	20
Curriculum vitae.....	21
Publikationsliste.....	22
Selbstständigkeitserklärung.....	23
Danksagung.....	24

Zusammenfassung

Titel

Regulation des Zusammenspiels von Foxo-1, Angiopoietin-2/Tie-2 und ADAMTS1 bei der Angiogenese durch Mechanismen der Mechanotransduktion

Autor

Sven Chlench

Abstract

„Angioadaptation“ bezeichnet sowohl die Änderung der Anzahl von Blutgefäßen als auch den kontinuierlichen Umbau bestehender Gefäßnetzwerke an die Bedürfnisse des versorgten Gewebes. Die erfolgreiche Adaptation eines Gefäßnetzes äußert sich in der funktionsgerechten Sauerstoffversorgung eines Gewebes und durch die Optimierung der Strömungsmechanik zur Minimierung der Perfusionsenergie. Tatsächlich kann die Expression verschiedener vaskulärer Gene durch Sauerstoffpartialdruck, Dehnung (Stretch) und Schubspannung (Shear Stress) reguliert werden, wodurch auf zellulärer Ebene Rückkopplungsmechanismen im Sinne einer „Angioadaptation“ bestehen könnten. Unsere Publikationen konzentrierten sich auf die Identifikation von Mechanismen, welche eine Regulation der Angiogenese überwiegend durch Schubspannung ermöglichen. Das von Douglas Hanahan¹ etablierte Modell der Kontrolle von Vaskulogenese, Angiogenese, Maturation, Stabilisierung und Regression von Blutgefäßen durch ein Sauerstoffpartialdruck reguliertes Zusammenspiel von Ang1/Tie2 sowie VEGF konnte so unter Einbeziehung von ADAMTS1, Foxo-1 und der Schubspannung erweitert werden. Die Untersuchung endothelialer Gene, deren Expression durch Wandschubspannung geändert wird, führte uns darüber hinaus zu dem Transkriptionsfaktor ZNF580, welchem durch Beeinflussung von IL-8 eine Rolle sowohl bei der Angiogenese als auch bei der Atherogenese zuzuweisen ist.

Einleitung

„Angioadaptation“ ist eine fortlaufende Umgestaltung des vaskulären Systems im Sinne einer Anpassung an metabolische und mechanische Stimuli, die sich aus dem Versorgungsbedarf des Gewebes und der Struktur des Blutgefäßnetzes ergeben². Man unterscheidet bei der „Angioadaptation“ zwischen der Neubildung von Blutgefäßen - Angiogenese -, dem Umbau bestehender Gefäßnetze - Remodeling sowie der Elimination redundanter Segmente (Rückbildung oder

Pruning). Die Unterteilung der Angiogenese wiederum erfolgt aufgrund zweier unterschiedlicher zellulärer Abläufe bzw. Mechanismen in Sprossung und Teilung (Intussuszeption³).

Entscheidend für die Regulation der Angioadaptation sind mechanische und chemische Stimuli, welche auf die Endothelzellen wirken. Auffälligster mechanischer Stimulus sowohl im Rahmen der Angiogenese als auch bei vaskulären Pathologien - wie Gefäßverschlüssen - ist die Wandschubspannung⁴: Sie wirkt vermittelt der Viskosität und durch die Strömung des Blutes in Richtung der Gefäßachse auf das Endothel. Das Sensing in den Endothelzellen erfolgt durch Mechanorezeptoren, welche den Stimulus mittels einer biochemischen Signalkaskade in das Zellinnere weiterleiten.

Durch erhöhte Wandschubspannung kann der Teilungsmodus (Intussuszeption) der Angiogenese initiiert werden⁵, während im Sprossungsmodus der Angiogenese in noch nicht perfundierten Kapillarsprossen praktisch keine Wandschubspannung auftritt. Daher untersuchten wir, ob ein molekularer Zusammenhang zwischen der Wandschubspannung und wichtigen endothelialen Mediatoren der Angiogenese existiert. Die in den hier zusammengefassten Arbeiten untersuchte Proteine, welche einen Einfluss auf das Wachstum von Blutgefäßen haben können, waren Foxo-1, Angiopoietin-1/-2, Tie2, eNOS, ADAMTS1, ZNF580 und IL-8.

Ein wichtiger Effektor von Wandschubspannung auf Endothelzellen ist die Serin/Threonin-Kinase Akt, welche durch Phosphatidyl Inositol 3 Kinase phosphoryliert und aktiviert wird⁶. Akt wiederum führt zu Phosphorylierung und nukleärer Exklusion des Transkriptionsfaktors Forkhead box protein O1A⁷ (Foxo-1).

Methoden

Zellkultur

Humane umbilicale venöse Endothelzellen (HUVEC) wurden wie beschrieben aus Nabelschnüren isoliert¹². HUVEC, humane koronare mikrovaskuläre Endothelzellen (HCMEC), EAhy92 und MonoMac6 wurden wie beschrieben^{13, 14} kultiviert. Einen Tag nach Erreichen der Konfluenz wurden die Endothelzellen den jeweiligen experimentellen Stimuli (Sauerstoffpartialdruck, Schubspannung) exponiert.

Sauerstoffpartialdruck

In einem Begasungsbrutschrank wurden die folgenden Fraktionen bzw. Partialdrucke eingestellt: 3 % (21 mmHg), 5,6 % (40 mmHg), 14 % (100 mmHg) oder 21 % (150 mmHg).

Schubspannung

Die Schubspannung wurde durch ein Kegel-Platte-System erzeugt: Hierbei wurde ein rotierender Kegel (mit α Kegelwinkel und ω Winkelgeschwindigkeit) in eine 100-mm Petrischale eingeführt und eine einheitliche Schubspannung (τ) über die Viskosität (η) des Zellkulturmediums nach der Formel $\tau = (\omega/\alpha)\eta$ erzeugt. Die simulierte Strömung war in jedem Fall laminar und entweder konstant oder pulsatil (atherogenes oder atheroprotektives Strömungsprofil)^{15, 16, 17}. Die Kontrollmedien wurden isoliert und für dieselbe Zeit unter statischen Bedingungen kultiviert.

Inhibitoren

Phospholipase C wurde durch Zugabe von U-73122 (U-73343 als inaktive Kontrolle) zum Kulturmedium gehemmt, Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) durch LY-294002, eNOS durch L-NAME (L-arginine Methylester), als inaktives Isomer diente D-NAME¹⁵.

Transfektion von HUVEC und EAhy926 mit siRNA

Die Transfektion wurde wie beschrieben^{13, 15, 18} mit siRNA, scrambled- siRNA und Positivkontrolle durchgeführt. Das Transfektionsreagenz (DharmafectTM) basierte auf der Verwendung von Liposomen^{13, 15}.

PCR

RT-PCR, semiquantitative RT-PCR, semiquantitative Duplex RT-PCR und Real-time RT-PCR wurden wie beschrieben durchgeführt^{13, 15}.

Northern blot

Das Northern blotting wurde wie beschrieben durchgeführt¹⁵.

ELISA

ELISAs wurden zur Bestimmung von IL-8 aus Zellkulturüberständen und zur Bestimmung des oxLDL/LDL-Quotienten aus humanem Serum wie beschrieben¹⁸ durchgeführt.

Proteinextraktion, Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Immunoblot

Die Proteinextraktion wurde wie beschrieben¹³ durchgeführt, das Zelllysat getrennt vom Überstand asserviert. SDS-PAGE und Immunoblotting wurden mit Zellextrakt, Immunpräzipitat oder Zellkulturüberständen wie beschrieben durchgeführt^{13, 15}. Als Proteinladekontrolle diente die Ponceau-Färbung sowie beta-Actin. Immunoblots wurden mittels Chemiluminescence entwickelt¹³, anschließend gescannt und densitometrisch quantifiziert. Die jeweiligen Antikörper wurden in der angegebenen Verdünnung verwendet^{13, 15, 18}.

Fluoreszenzmikroskopie

Zellen wurden in -20 °C kaltem Methanol fixiert und mit genspezifischen Primärantikörpern und entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden zur semiquantitativen Auswertung mit jeweils identischen Belichtungszeiten und gleichem optischem Aufbau angefertigt^{13, 15, 18}.

Monozytenadhäsion in der Flusskammer

Flusskammer-Experimente wurden wie beschrieben¹⁹ durchgeführt. HUVEC wurden auf Fibronectin-beschichteten Deckgläsern kultiviert und in der Flusskammer einer definierten Strömung ausgesetzt. MonoMac6 wurden dem Perfusionsmedium zugegeben und die unter Strömungsbedingungen adhärenen Zellen nach 5 min ausgezählt.

Scratch wound assay

Mit einer Pipettenspitze wurde durch einen Kratzer ein Defekt im HUVEC Monolayer gesetzt und der zeitabhängige Verschluss gemessen. Das Medium war entweder frisch zubereitet oder mit HUVEC unter statischen oder dynamischen (6 dyn/cm²) Bedingungen konditioniert. Einige HUVEC wurden zuvor mit siRNA (gegen ADAMTS1 oder TSP1) transfiziert.

Quantifizierung der Zellzahl

Die Quantifizierung der Zellzahl als Maß der Zellproliferation erfolgte mittels Kristallviolett-färbung, die anschließende Analyse mit einem ELISA-Reader wie beschrieben¹⁵.

In vivo sprouting assay

Im Mesenterium der Ratte wurde Kapillarsprossung induziert²⁰ und anschließend die Expression verschiedener Gene durch Immunfluoreszenz visualisiert¹⁵.

Intravitalmikroskopie

In Blutgefäßen des Rattenmesenteriums wurde die Blutströmungsgeschwindigkeit mittels Videoanalyse (off-line) bestimmt. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenz-Färbung von ADAMTS1 oder TSP1 in den gleichen Gefäßen¹⁵.

Bioinformatik

Die Promotorregion von ADAMTS1 wurde nach Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren mittels der Transfac database und des Transcription factor affinity prediction tool (TRAP) untersucht¹⁵.

Statistik

HUVEC aus derselben Nabelschnur wurden jeweils für Experimente und Negativ-Kontrollen genutzt. Für statistische Auswertungen wurde der Students t-Test genutzt. Zur linearen Korrelationsanalyse wurde der Pearson's Korrelationskoeffizient r berechnet. Werte von $p \leq 0,05$ wurden als signifikant bezeichnet.

Ergebnisse

Unter Schubspannung (6 dyn/cm^2 , 24 h) konnten wir eine signifikante Supprimierung des Transkriptionsfaktors Foxo-1 auf mRNA- und Proteinebene nachweisen. Das Ausmaß der Differenz der Proteinmenge unter statischen und dynamischen Bedingungen zeigte sich bei anhaltender Strömung über einen längeren Zeitraum (24 h) rückläufig, war jedoch weiterhin statistisch signifikant. Wie wir biochemisch und fluoreszenzmikroskopisch zeigen konnten, wurde Foxo-1 zudem unter Schubspannung phosphoryliert und vom Zellkern exkludiert. Durch diese Translokation wurde Foxo-1 als Transkriptionsfaktor offenbar inaktiviert, denn die Proteinmengen der Zielgene p27Kip1 und eNOS nahmen unter dynamischen Bedingungen signifikant ab. Mittels siRNA gegen Foxo-1 konnte Ang-2 als ein weiteres Zielgen von FoxO1 in Endothelzellen bestätigt werden. Entsprechend war auch die Proteinmenge von Ang-2 unter Schubspannung rückläufig. Im Gegensatz hierzu wurde Tie2 (mRNA und Protein) unter Wandschubspannung induziert, während Ang-1 nicht strömungsreguliert zu sein schien. Unter Schubspannung konnten wir eine Phosphorylierung von Akt nachweisen. Diese und die konsekutive Inaktivierung von Foxo-1 durch Phosphorylierung konnte durch den PI3K-Inhibitor LY-294001 fast vollständig verhindert werden. Jedoch nahm die Proteinmenge von Foxo-1 auch bei Inaktivierung von PI3K über einen Zeitraum von 24 h ab. Ebenso wurde die schubspannungsabhängige Suppression von Ang-2 nur zu einem Teil durch PI3K-Inaktivierung verhindert.

Für endotheliales ADAMTS1 als weiteren zentralen Inhibitor der Angiogenese durch Kapillarsprossung konnten wir eine zeit- und schubspannungsabhängige Induktion unter Beteiligung von Phospholipase C, eNOS sowie PI3K zeigen. Bindungsstellen für Foxo-1, Nuclear factor 1, SP-1 und AP-1 konnten in der Promotorregion von ADAMTS1 bioinformatisch nachgewiesen werden. Eine Hemmung von FoxO-1 mRNA mittels entsprechender siRNA induzierte ADAMTS1 mRNA. Bei verringertem Sauerstoffpartialdruck sank die Expression von ADAMTS1. Durch ein atheroprotektives Strömungsprofil wurde ADAMTS1 induziert, während durch ein atherogenes Strömungsprofil keine Induktion zu beobachten war. Ein durch ADAMTS1 von TSP1 abgespaltenes anti-angiogenes 70 kDa Fragment war unter Strömungsbedingungen vermehrt nachweisbar. In Übereinstimmung hiermit zeigte sich im Scratch Wound Assay ein verzögerter Defektverschluß des Monolayers bei Zellen, die mit Medium behandelt worden waren, welches vorher durch HUVEC unter Strömungsbedingungen konditioniert worden war. Dieser Effekt konnte durch si-RNA vermittelten Knockdown von TSP-1 vollständig, durch ADAMTS1 Knockdown teilweise reduziert werden.

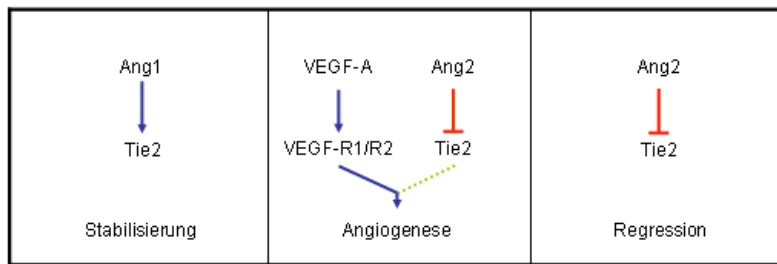
In vivo zeigte sich im Sprouting Assay keine ADAMTS1-abhängige Färbung der nicht perfundierten Sprossen des Rattenmesenteriums, die jedoch Ang2-positiv waren. In konnektierten und perfundierten reifen Gefäßen zeigte sich dagegen umgekehrt eine Anfärbbarkeit für ADAMTS1, nicht jedoch für Ang2. So konnten wir in Übereinstimmung mit den *in vitro* gewonnenen Daten auch *in vivo* mittels der Intravitalmikroskopie im Rattenmesenterium einen Anstieg von ADAMTS1 bei höherer Wandschubspannung beobachten.

In der dritten Publikation erfolgte die erstmalige funktionelle Charakterisierung des Transkriptionsfaktors Zinkfingerprotein 580 (ZNF580). Durch nLDL wurde die Expression von ZNF580 in HUVEC induziert, bei erhöhten oxLDL/LDL-Quotienten dagegen supprimiert. Wir konnten zeigen, dass die IL-8 Produktion der Endothelzellen direkt mit dem oxLDL/LDL-Quotienten und indirekt mit ZNF580 korreliert. Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnten wir die Lokalisation von ZNF580 im Zellkern nachweisen. Bei si-RNA-supprimierter Expression von ZNF580 zeigte sich eine Induktion der IL-8 Expression. In einem Flusskammerexperiment führte der Knockdown von ZNF580 bei gleichzeitiger Stimulation mit TNF α und LDL bzw. oxLDL zu vermehrtem Monozytenarrest an HUVEC unter Strömungsbedingungen. Auch in Patientenserum korrelierten oxLDL/LDL-Quotienten und IL-8 Serumspiegel.

Diskussion

In dieser Arbeit konnte die strömungsabhängige Regulation wichtiger endothelialer Modulatoren des Blutgefäßwachstums, Angiopoietin-2/Tie2 und ADAMTS-1, nachgewiesen werden. Damit wurde die Regulation der Orchestrierung von VEGF-A um die intravasale Blutströmung als biophysikalischen Stimulus und weitere Signaltransduktoren bereichert.

Originäres Modell nach D. Hanahan



modifiziert nach: Hanahan D., Signaling vascular morphogenesis and maintenance. Science. 1997 Jul 4;277(5322):48-50.

Abb. 1 Zusammenwirken von VEGF-A und Angiopoietinen bei der Regulation des Remodelings von Blutgefäßen. Blauer Pfeil: Aktivierung. Roter Pfeil: Blockade. Punktierter Linie: Verminderte Hemmung.

Douglas Hanahan geht in seinem 1997 vorgestellten Modell (s. Abb. 1) von parakrinen Signalen - im Sinne von Proteinliganden - aus, welche für das Remodeling von Blutgefäßen durch Bindung und Modulation transmembraner Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) verantwortlich sind¹. Dabei entscheidet die Kombination dieser Liganden über den erzielten Effekt. Die Frage der Beeinflussung durch weitere biophysikalische Trigger/Auslöser als den Sauerstoffpartialdruck konnte zum damaligen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff wurde als funktionelle Anforderung an das vaskuläre System definiert und sowohl die Regulation der Expression von VEGF-A²¹ als auch von Angiopoietin-2²² durch den Sauerstoffpartialdruck nachgewiesen. Als weiterer wichtiger Stimulus zur Regulation des Blutgefäßwachstums wurden hämodynamische Kräfte beschrieben²³, welche nicht nur bei der Angiogenese, sondern auch bei der Atherosklerose²⁴ eine Rolle spielen.

In unseren Experimenten konnten wir eine 24 h anhaltende, wandschubspannungabhängige Phosphorylierung und Deaktivierung des Transkriptionsfaktors Foxo-1 durch Akt - vermittelt über PI3K – nachweisen. Zugleich war auch die Expression von Foxo-1 über wenigstens 48 h vermindert. In der Folge wurden Angiopoietin-2 vermindert, Tie-2 und ADAMTS-1 vermehrt exprimiert. Bezogen auf die „Hanahan Hypothese“ und ihre schrittweise Erweiterung um die biophysikalischen Stimuli Sauerstoffpartialdruck und Schubspannung ergeben sich grundsätzlich vier unterschiedliche Konstellationen (Abb. 2), die sich biologisch wie folgt interpretieren lassen:

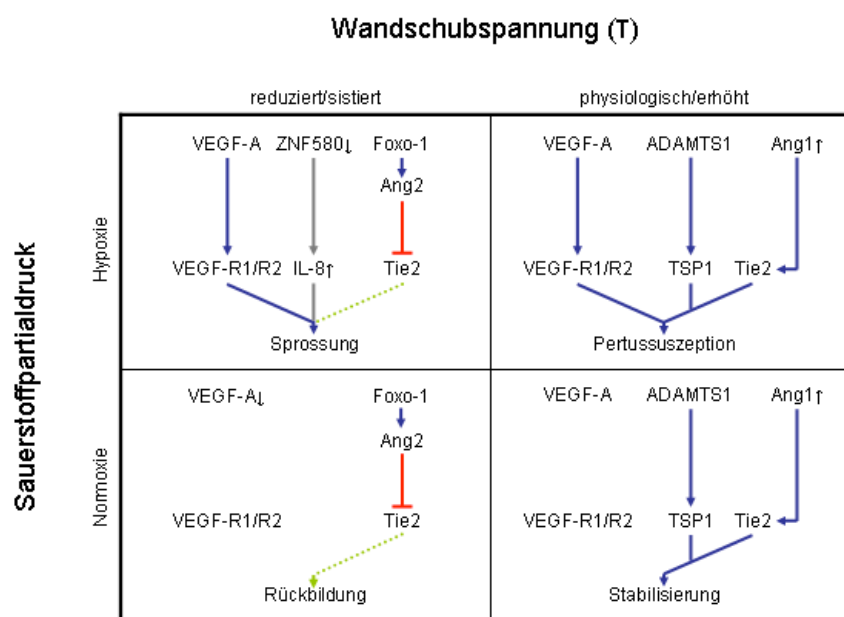


Abb. 2 Erweitertes Hanahan-Modell. Blauer Pfeil: Aktivierung. Roter Pfeil: Blockade. Punktierte Linie: Verminderte Hemmung. Grauer Pfeil: Hypothetische Aktivierung.

Bei **verminderter Schubspannung und Hypoxie** wurde Foxo-1 aktiviert, ebenso sein Zielgen ANG2²². Eine daraus folgende Deaktivierung des Rezeptors Tie2⁹ führt bekanntermaßen zur Separation glatter Muskelzellen vom Endothel¹ und erleichtert damit die Diffusion von VEGF-A zu den Endothelzellen^{9, 25}. Dies kann insgesamt als eine Vorbereitung der Angiogenese durch Kapillarsprossung interpretiert werden²⁶. Wie unsere Daten darüber hinaus zeigen wird dieser Mechanismus bei derselben Konstellation biophysikalischer Stimuli durch die Suppression des antiangiogenen Faktors ADAMTS1¹⁵ unterstützt. Die Suppression von ADAMTS1 war dabei von zentralen mechanosensitiven Signaltransduktionswegen (PLC, PI3K, NO) und zu einem Teil von Foxo-1 abhängig. Insgesamt sind die Daten mit der Ausbildung neuer Gefäßsprossen in unter-

versorgten Geweben in Einklang (Abb. 2, „Sprossung“). Bezüglich des Zeitverlaufs der Expression von Foxo-1 nach Einsetzen von Strömung in einer erstmals perfundierten Kapillare lassen unsere Ergebnisse für die ersten Stunden eine Deaktivierung von Foxo-1 durch einen posttranskriptionellen Mechanismus im Sinne einer Phosphorylierung vermuten, während für längere Zeitperioden additive Signaltransduktionswege für die Foxo-Phosphorylierung verantwortlich sind. Hierbei scheint ein durch AMP-activated protein kinase (AMPK) vermittelter Signaltransduktionsmechanismus ebenfalls eine Rolle zu spielen²⁷.

In einem früheren Pilotexperiment konnten wir durch Hypoxie und bei erniedrigter Wandschubspannung eine verminderte Expression von ZNF580 feststellen. Hierdurch kann – wie wir aus späteren Experimenten wissen – vermehrt Interleukin 8 gebildet werden. Il-8 ist als Chemokin dafür bekannt, proangiogene Eigenschaften zu besitzen²⁸. Eine Relevanz für den Sprossungsmodus oder auch die pathologische Tumor-Angiogenese schien plausibel. In späteren Experimenten konnte die Suppression von ZNF580 durch erniedrigte Wandschubspannung nicht reproduziert werden, daher betrachten wir diesen Signaltransduktionsweg als rein hypothetisch (Abb. 2, Sprossungsmodus).

Unter **vermindertem Sauerstoffpartialdruck und erhöhtem Blutstrom**, wie in der arbeitenden Skelettmuskulatur, wird ein großer Teil der induzierten Angiogenese nicht durch Kapillarsprossung, sondern durch Längsteilung bestehender Kapillaren (Intussuszeption bzw. Splitting) erreicht⁵. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch weitgehend unklar²⁹. Unsere Daten legen die Hypothese nahe, dass durch erhöhte Expression von ADAMTS1 und Aktivierung des Ang1/Tie2 Systems die Wirkung der erhöhten VEGF-A Konzentration in Richtung Teilung/Splitting gelenkt wird (Abb. 2, „Intussuszeption“).

Bereits das von Hanahan vorgeschlagene Schema enthält die Möglichkeit der Gefäßregression bei Inaktivierung von Tie2¹. Ein erwachsener Organismus befindet sich in der Regel bezüglich seiner Blutgefäßversorgung in einem „steady state“, so dass eine Perfusionsminderung immer zu sinkenden Sauerstoffpartialdrücken führt. Anders ist es jedoch im Rahmen der Vaskulogenese, die einen Überschuss an Kapillaren erzeugt³. Ausbleiben des Überlebensfaktors VEGF-A bei **Normoxie und zugleich reduzierte Schubspannung** könnten ein nicht benötigtes Blutgefäß charakterisieren und in Verbindung mit erhöhtem Foxo-1, sowie erhöhtem Ang2 mit Blockade von Tie2 ein redundantes Gefäß entfernen (Pruning³) (Abb. 2, „Rückbildung“).

Andersherum wird in gut perfundierten Blutgefäßen über die identischen Signaltransduktionswege eine vermehrte Expression von ADAMTS1 sowie eine Aktivierung von Tie2 erreicht, wodurch es über die Rekrutierung perivaskulärer Zellen und Unterdrückung der Kapillarsprossung zu einer Stabilisierung und Reifung der Gefäße kommt^{9,30}. Entsprechende Expressionsmuster in perfundierten Gefäßen einerseits und Kapillarsprossen andererseits wurden durch unsere in vivo Daten bestätigt. Physiologisch entspricht die Kombination von **Normoxie mit hoher Wandschubspannung** der Situation in den sogenannten Leitungsgefäßen (Abb. 2, „Stabilisierung“).

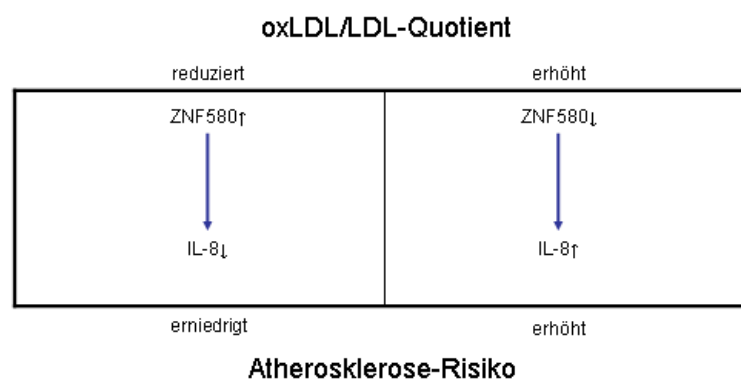


Abb. 3 Einfluß des oxLDL/LDL-Quotienten via ZNF580 auf Interleukin-8.

Die weitere Charakterisierung von **ZNF580** führte uns zur **Atherogenese**: Durch Suppression von Il-8 durch ZNF580 kann eine Aktivierung von Monozyten am Rezeptor CXCR2 erfolgen³¹. Dies führt zu einer Adhäsion der Monozyten an das Endothel mit anschließender Migration dieser in den subintimalen Raum.

Durch Disinhibition von MMPs kann es zudem ein Einreißen fibröser Plaque-Kappen bewirken³², hierdurch ist die Bildung eines Thrombus möglich.

Wir fanden eine oxLDL/LDL-Quotienten abhängige Regulation von ZNF580 mit hierzu inversen Il-8 Serumlevel. Funktionell konnte mittels Knockdown von ZNF580 durch siRNA eine gesteigerte Monozytenadhäsion beobachtet werden. Dies führen wir auf vermehrte Il-8 Expression zurück. ZNF580 könnte folglich atheroprotektiv wirken, der oxLDL/LDL-Quotient im Serum erscheint uns als **prädiktiver Marker für das individuelle Atherosklerose-Risiko** aussagekräftig (Abbildung 3).

Literatur

- [1] Douglas Hanahan. Signaling Vascular Morphogenesis and Maintenance. *Science* 4 July 1997; 277 (5322), 48-50.
- [2] Zakrzewicz A, Secomb TW, Pries AR. Angioadaptation: keeping the vascular system in shape. *News Physiol Sci*. 2002 Oct;17:197-201.
- [3] Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997 Apr 17;386(6626):671-4.
- [4] Papadaki M, Eskin SG. Effects of fluid shear stress on gene regulation of vascular cells. *Biotechnol Prog*. 1997 May-Jun;13(3):209-21.
- [5] Hudlicka O, Brown MD. Adaptation of skeletal muscle microvasculature to increased or decreased blood flow: role of shear stress, nitric oxide and vascular endothelial growth factor. *J Vasc Res*. 2009;46(5):504-12. Epub 2009 Jun 26.
- [6] Lehoux S, Castier Y, Tedgui A. Molecular mechanisms of the vascular responses to haemodynamic forces. *J Intern Med*. 2006 Apr;259(4):381-92.
- [7] Burgering BM, Kops GJ. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci*. 2002 Jul;27(7):352-60.
- [8] Daly C, Wong V, Burova E, Wei Y, Zabski S, et al. Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). *Genes Dev*. 2004 May 1;18(9):1060-71.
- [9] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997 Jul 4;277(5322):55-60.
- [10] Vázquez F, Hastings G, Ortega MA, et al. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem*. 1999 Aug 13;274(33):23349-57.

- [11] Iruela-Arispe ML, Carpizo D, Luque A. ADAMTS1: a matrix metalloprotease with angi-inhibitory properties. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 May;995:183-90.
- [12] Bongrazio M, Baumann C, Zakrzewicz A, Pries AR, Gaehtgens P. Evidence for modulation of genes involved in vascular adaptation by prolonged exposure of endothelial cells to shear stress. *Cardiovasc Res.* 2000 Aug;47(2):384-93.
- [13] Chlench S, Mecha Disassa N, Hohberg M, Hoffmann C, Pohlkamp T, Beyer G, Bongrazio M, Da Silva-Azevedo L, Baum O, Pries AR, Zakrzewicz A. Regulation of Foxo-1 and the angiotensin-2/Tie2 system by shear stress. *FEBS Lett.* 2007 Feb 20;581(4):673-80. Epub 2007 Jan 22.
- [14] Smith DF, Galkina E, Ley K, Huo Y. GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Nov;289(5):H1976-84. Epub 2005 Jun 3.
- [15] Hohberg M, Knöchel J, Hoffmann CJ, Chlench S, Wunderlich W, Alter A, Maroski J, Vorderwülbecke BJ, Da Silva-Azevedo L, Knudsen R, Lehmann R, Fiedorowicz K, Bongrazio M, Nitsche B, Hoepfner M, Styp-Rekowska B, Pries AR, Zakrzewicz A. Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries. *J Cell Physiol.* 2011 Feb;226(2):350-61.
- [16] Bussolari SR, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. Apparatus for subjecting living cells to fluid shear stress. *Rev Sci Instrum.* 1982 Dec;53(12):1851-4. No abstract available.
- [17] Dewey CF Jr, Bussolari SR, Gimbrone MA Jr, Davies PF. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng.* 1981 Aug;103(3):177-85.
- [18] Hoffmann CJ, Hohberg M, Chlench S, Maroski J, Drab M, Siegel G, Pries AR, Zakrzewicz A. Suppression of zinc finger protein 580 by high oxLDL/LDL-ratios is followed by enhanced expression of endothelial IL-8. *Atherosclerosis.* 2011 Jan 22.

- [19] Zakrzewicz A, Gräfe M, Terbeek D, et al. L-selectin-dependent leukocyte adhesion to microvascular but not to macrovascular endothelial cells of the human coronary system. *Blood*. 1997 May 1;89(9):3228-35.
- [20] Anderson CR, Ponce AM, Price RJ. Immunohistochemical identification of an extracellular matrix scaffold that microguides capillary sprouting in vivo. *J Histochem Cytochem*. 2004 Aug;52(8):1063-72.
- [21] Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, Gassmann M, Marti HH. Hypoxia-inducible factor-1 alpha is regulated at the post-mRNA level. *Kidney Int*. 1997 Feb;51(2):560-3.
- [22] Mandriota SJ, Pepper MS. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res*. 1998 Oct 19;83(8):852-9.
- [23] Hudlicka O, Graciotti L, Fulgenzi G, et al. The effect of chronic skeletal muscle stimulation on capillary growth in the rat: are sensory nerve fibres involved? *J Physiol*. 2003 Feb 1;546(Pt 3):813-22.
- [24] Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Jun 26;49(25):2379-93. Epub 2007 Jun 8.
- [25] Daly C, Wong V, Burova E, et al. Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). *Genes Dev*. 2004 May 1;18(9):1060-71.
- [26] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):242-8.
- [27] Dixit M, Bess E, Fisslthaler B, et al. Shear stress-induced activation of the AMP-activated protein kinase regulates FoxO1a and angiopoietin-2 in endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2008 Jan;77(1):160-8. Epub 2007 Sep 19.

- [28] Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001 Dec;12(4):375-91.
- [29] Williams JL, Weichert A, Zakrzewicz A, Da Silva-Azevedo L, Pries AR, Baum O, Eginton S. Differential gene and protein expression in abluminal sprouting and intraluminal splitting forms of angiogenesis. *Clin Sci (Lond).* 2006 May;110(5):587-95.
- [30] Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):685-93.
- [31] Boisvert WA, Curtiss LK, Terkeltaub RA. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in atherosclerosis. *Immunol Res.* 2000;21:129-37.
- [32] Moreau M, Brocheriou I, Petit L, Ninio E, Chapman MJ, Rouis M. Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque. *Circulation.* 1999;99:420-6.

Anteilsklärung

Sven Chlench hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1: **Sven Chlench**, Nigussie Mecha Disassa, Margret Hohberg, Christian Hoffmann, Theresa Pohlkamp, Gabriele Beyer, Mauro Bongrazio, Luis Da Silva-Azevedo, Oliver Baum, Axel Radlach Pries, Andreas Zakrzewicz. "Regulation of Foxo-1 and the angiotensin-2/Tie2 system by shear stress." FEBS letters. 2007;581:673-80.

70 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Proteinanalyse (Immunpräzipitation, Immunoblotting), Zellkultur, Durchführung von shear stress Experimenten, Verfassen des Manuskripts für die Publikation., Erstellen der Abbildungen drei und vier.

Publikation 2: Margret Hohberg, Judith Knöchel, Christian J. Hoffmann, **Sven Chlench**, Wulf Wunderlich, Alexander Alter, Julian Maroski, Bernd J. Vorderwülbecke, Luis Da Silva-Azevedo, Rose Knudsen, Robert Lehmann, Katarzyna Fiedorowicz, Mauro Bongrazio, Bianca Nitsche, Michael Hoepfner, Beata Styp-Rekowska, Axel R. Pries, Andreas Zakrzewicz. "Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries." Journal of cellular physiology. 2010;226(2):350-61.

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Proteinanalyse (Immunpräzipitation, Immunoblotting), Zellkultur, Erstellung der Abbildungen eins D und E sowie Abbildung sechs A-D.

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

10 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Proteinanalyse (Immunpräzipitation, Immunoblotting).

Sven Chlench

Promovend

Prof. Dr. Axel R. Pries

Betreuender Hochschullehrer

Publikationen

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

Die elektronische Veröffentlichung dieser Arbeit wird durch die Zeitschrift nicht genehmigt.
Eine online-Version findet sich unter

PMID: 17258205 [PubMed - indexed for MEDLINE]

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

Die elektronische Veröffentlichung dieser Arbeit wird durch die Zeitschrift nicht genehmigt.
Eine online-Version findet sich unter

PMID: 20665671 [PubMed - indexed for MEDLINE]

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

Die elektronische Veröffentlichung dieser Arbeit wird durch die Zeitschrift nicht genehmigt.
Eine online-Version findet sich unter

PMID: 21310414 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Curriculum vitae

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

Publikationsliste

Originalarbeit als Erstautor

IF

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

3.541

Originalarbeiten als Koautor

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

4.586

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

4.086

Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Sven Chlench, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Regulation des Zusammenspiels von Foxo-1, Angiopoietin-2/Tie-2 und ADAMTS1 bei der Angiogenese durch Mechanismen der Mechanotransduktion.“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Ich danke
meiner Familie,
Stefanie Majer
sowie meinem Doktorvater
für die
vorbildliche Betreuung.