

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

DISSERTATION

ZNF580, FoxO1 und ADAMTS1 in Endothelzellen bei  
LDL-Belastung und Blutströmungsreduktion – mögliche neue  
Regulationsmechanismen bei Atherosklerose und  
kompensatorischer Angiogenese

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Johannes Hoffmann

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. R. Pries  
2. Prof. Dr. med. K. Endlich  
3. Prof. Dr. med. J. Vogel

Datum der Promotion: 18. November 2011

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Zusammenfassung</b> .....	4-13
Titel, Autor, Abstract.....	4
Einleitung, Zielstellung.....	5
Methodik.....	6-8
Ergebnisse.....	8-10
Diskussion.....	10-12
Literatur.....	12-13
<b>Anteilsklärung</b> .....	14
<b>Publikationen</b> .....	15
<b>Lebenslauf</b> .....	16
<b>Publikationsliste</b> .....	17
<b>Selbstständigkeitserklärung</b> .....	18
<b>Danksagung</b> .....	19

**Titel**

ZNF580, FoxO1 und ADAMTS1 in Endothelzellen bei LDL-Belastung und Blutströmungsreduktion – mögliche neue Regulationsmechanismen bei Atherosklerose und kompensatorischer Angiogenese

**Autor**

Christian Johannes Hoffmann

**Abstract**

Die Atherosklerose stellt einen der wichtigsten Faktoren in der Entstehung cerebro- und kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Das Endothel spielt in der Pathogenese der Atherosklerose eine entscheidende Rolle. Es ist jedoch ebenso an der Regulation der Angiogenese beteiligt, die zur Bildung kompensatorischer Umgehungskreisläufe bei Gefäßstenosen beiträgt. Es ist daher das Ziel dieser Arbeit, Einflussmöglichkeiten von Endothelzellen auf die Entstehung der Atherosklerose bei LDL-Belastung und auf die Regulation der Angiogenese bei reduzierter Blutströmung zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wurde ein bislang unerforschtes Zinkfinger Protein (ZNF580), ein Transkriptionsfaktor für das angiogene Angiopoietin-2 (FoxO1) und ein antiangiogenes Protein (ADAMTS1) untersucht. Es zeigte sich dabei, dass ZNF580 durch nLDL in Endothelzellen induziert wird, die Expression von IL-8 in diesen Zellen hemmt und dadurch zur Hemmung der Monozytenadhäsion am Endothel beiträgt. Mit steigendem oxLDL/LDL-Quotienten jedoch sinkt die Induktion von ZNF580, welches schließlich sogar supprimiert wird. FoxO1 wird in Endothelzellen strömungsabhängig inaktiviert, weshalb der von ihm induzierte Angiogenesefaktor Angiopoietin-2 nur in nicht perfundierten Kapillarsprossen exprimiert wird. Dagegen wird der Angiogeneseinhibitor ADAMTS1 durch Strömung und Sauerstoffpartialdruck induziert und daher vermehrt in gut perfundierten Gefäßen exprimiert. Durch dieses Expressionsmuster werden in schlecht durchströmten Gefäßbereichen Bedingungen geschaffen, unter denen Angiogenese durch Sprossung ermöglicht wird. Das Endothel vermag also mittels ZNF580 bei niedrigen oxLDL/LDL-Quotienten die Bildung von IL-8 und die Adhäsion von Monozyten zu hemmen. Bei höheren oxLDL/LDL-Quotienten wird dieser antiinflammatorische Mechanismus jedoch unterdrückt. Führt eine daraufhin fortschreitende Atherosklerose zu minderversorgten Gewebereichen, so ist das Endothel durch differentielle Regulation von FoxO1 und ADAMTS1 an der Induktion der kompensatorischen Angiogenese durch Sprossung beteiligt.

## **Einleitung**

Vaskuläre Erkrankungen wie Schlaganfall, Herzinfarkt und periphere arterielle Verschlusskrankheit stellen in den industrialisierten Ländern die am häufigsten zu Tod oder Behinderung führenden Erkrankungen dar.<sup>1</sup> Hauptursache ist die Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen der Gefäße mit daraus folgendem Gefäßverschluss durch Stenose oder thromboembolischen Verschluss. In der Pathogenese der Atherosklerose spielt das Endothel eine entscheidende Rolle.<sup>2</sup> Insbesondere Low density lipoprotein (LDL) und modifizierte Formen wie oxidiertes LDL (oxLDL) führen zu einer inflammatorischen Reaktion des Endothels. Dies hat zur Folge, dass Monozyten an das Endothel adhärieren und in den subintimalen Raum migrieren. Dort phagozytieren sie abgelagertes LDL bzw. oxLDL und entwickeln sich zu Schaumzellen. Diese schütten Mediatoren aus, die das Endothel weiter aktivieren und somit erneut Monozyten anlocken. Es bildet sich eine Fibrinkappe über der Plaque. Durch das Wachstum der Plaque kann der Blutstrom zum Erliegen kommen. Zusätzlich werden vom Endothel weitere Faktoren wie Interleukin 8 (IL-8) ausgeschüttet, die ein Aufreißen der Plaque und konsekutive Thrombembolien fördern können.<sup>3</sup> Als Folge des eingeschränkten Blutvolumenstroms kommt es zu einer Minderversorgung des abhängigen Gewebes. Hier stellt das Aussprossen neuer Blutgefäße mit Entwicklung von Umgehungskreisläufen einen wichtigen Kompensationsmechanismus dar. Die Kapillarsprossung wird dabei auch durch das Endothel gesteuert. In Bereichen mit geringem Sauerstoffpartialdruck besteht ein Mikromilieu, in dem das Endothel proangiogene Faktoren bildet.<sup>4-5</sup> In gut perfundierten Blutgefäßen werden dagegen antiangiogene Faktoren gebildet und das Blutgefäßnetzwerk stabilisiert.

## **Zielstellung**

Die zellulären und molekularen Mechanismen der beschriebenen Vorgänge sind jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Ein besseres Verständnis dieser Mechanismen gäbe die Möglichkeit, primär und sekundär präventiv und eventuell auch therapeutisch in die Entstehung und Progression vaskulärer Erkrankungen eingreifen zu können. Daher ist es Ziel dieser Arbeit, die Rolle endothelialer Faktoren in der Entstehung der Atherosklerose und in der Regulation der Angiogenese als Kompensationsmechanismus bei Minderperfusion genauer zu untersuchen. Hierbei stehen ein bislang funktionell nicht charakterisiertes Zinkfinger Protein (ZNF580), ein an der Regulation proangiogener (Forkhead box O1; FoxO1) und ein an der Regulation antiangiogener (A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1; ADAMTS1) Mechanismen beteiligter Faktor im Fokus dieser Arbeit.

## **Methodik**

### Zellkultur

Humane umbilicale venöse Endothelzellen (HUVEC) wurden aus Nabelschnüren isoliert wie beschrieben.<sup>6</sup> HUVEC<sup>7</sup>, humane koronare mikrovaskuläre Endothelzellen (HCMEC)<sup>7</sup>, EAhy92<sup>7</sup> und MonoMac6<sup>8</sup> wurden wie beschrieben kultiviert. Zusätzlich wurden die Zellen für Hypoxie-Experimente in Atmosphären mit Sauerstofffraktionen von 3 %, 5,6 %, 14 % oder 21 % kultiviert.

### Schubspannung

Schubspannung wurde durch ein Kegel-Platte-System erzeugt und über die Viskosität des Zellkulturmediums auf einen konfluenten Zellmonolayer ausgeübt. Die erzeugte Strömung war in jedem Falle laminar und entweder konstant oder pulsatil als atherogenes oder atheroprotektives Strömungsprofil.<sup>9</sup>

### 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 (D-NAME als inaktive Kontrolle).<sup>9</sup>

### RNAi

HUVEC und EAhy926 wurden durch Liposomen-basierte Systeme mit genspezifischer siRNA und als negative Kontrolle mit scrambled siRNA transfiziert.<sup>7,9</sup>

### PCR

RT-PCR, semiquantitative RT-PCR, semiquantitative Duplex PCR und Real-time RT-PCR wurden wie beschrieben durchgeführt.<sup>7,9</sup>

## Northern blot

Northern blot wurde wie beschrieben durchgeführt.<sup>9</sup>

## ELISA

ELISA wurde für IL-8 wie beschrieben mit Zellkulturüberständen und zur Bestimmung des oxLDL/LDL-Quotienten mit Serum durchgeführt.<sup>10</sup>

## SDS-PAGE und Immunoblot

SDS-PAGE und Immunoblot wurden mit Zellextrakt, Immunpräzipitat oder Zellüberständen wie beschrieben durchgeführt. Als Ladekontrolle diente die Ponceau Färbung,  $\beta$ -Actin und eNOS.<sup>7,9</sup>

## Fluoreszenzmikroskopie

Zellen wurden in -20 °C kaltem Methanol fixiert und mit genspezifischen Primärantikörpern und entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert. Fotos wurden mit jeweils identischen Belichtungszeiten aufgenommen.<sup>7</sup>

## Monozytenadhäsion in der Flusskammer

Flusskammer-Experimente wurden durchgeführt wie beschrieben.<sup>11</sup> HUVEC wurden auf Fibrin-beschichteten Deckgläsern kultiviert und physiologischen Strömungsbedingungen in der Flusskammer ausgesetzt. MonoMac6 wurden dem strömenden Medium zugegeben und adhärenzte Zellen nach 5 min ausgezählt.

## Scratch wound assay

Mit einer Pipettenspitze wurde durch einen Kratzer ein Defekt im HUVEC Monolayer gesetzt und sein zeitabhängiger Verschluss entweder bei Kultivierung mit frischem Medium oder mit durch HUVEC unter Strömungsbedingungen oder statischen Bedingungen konditioniertem Medium, mit oder ohne RNAi von ADAMTS1 und TSP1 gemessen.<sup>9</sup>

## Sprouting assay

Im Mesenterium der Ratte wurde Kapillarsprossung induziert<sup>12</sup> und anschließend die Expression verschiedener Gene durch Immunfluoreszenz visualisiert.<sup>9</sup>

## Intravitalmikroskopie

In Blutgefäßen des Rattenmesenteriums wurde die Blutströmungsgeschwindigkeit nach Videoaufzeichnung zur Berechnung der jeweiligen Wandschubspannung bestimmt und diese anschließend durch Immunfluoreszenz-Färbung der gleichen Gefäße zur Expression verschiedener Gene in Beziehung gesetzt.<sup>9</sup>

## Bioinformatik

Die Promotorregion von ADAMTS1 wurde nach Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren mittels der Transfac database untersucht.<sup>9</sup>

## 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**

Zunächst wurde die Funktion eines bislang funktionell nicht charakterisierten Zinkfinger Proteins (ZNF580)<sup>10</sup> in der Pathogenese der Atherosklerose untersucht. Dabei zeigte sich, dass ZNF580 durch Lipoproteine, insbesondere LDL und High density lipoprotein (HDL) reguliert wird. TNF $\alpha$  hatte dagegen keinen Einfluss auf die Expression. Darüber hinaus war diese Regulation vom Grad der Oxidation des LDLs abhängig. LDL mit einem niedrigen oxLDL/LDL-Quotienten induzierte die Expression von ZNF580, dagegen wurde ZNF580 durch LDL mit hohem oxLDL/LDL-Quotienten supprimiert. Auch der Einfluss des HDLs auf ZNF580 war vom oxLDL/LDL-Quotienten abhängig. Bei niedrigem oxLDL/LDL-Quotienten ließ sich



keine Regulation von ZNF580 feststellen. War der Quotient hoch, so wurde ZNF580 durch dieses HDL supprimiert. IL-8 wurde ebenfalls in Abhängigkeit vom oxLDL/LDL-Quotienten durch LDL und HDL reguliert. Allerdings stellte sich diese Abhängigkeit umgekehrt zu der Regulation von ZNF580 dar: IL-8 wurde bei hohen oxLDL/LDL-Quotienten vermehrt gebildet. Darüber hinaus konnte *in vivo* eine direkte Korrelation zwischen dem oxLDL/LDL-Quotienten und dem IL-8 Serumlevel gezeigt werden.

ZNF580 besteht aus drei Zinkfinger Domänen und einer prolinreichen Domäne. Es handelt sich daher hierbei höchst wahrscheinlich um einen Transkriptionsfaktor. Entsprechend konnte eine nukleäre Lokalisation nachgewiesen werden. Ein Knock-down von ZNF580 durch siRNA führte zu einer Steigerung der Expression von IL-8. IL-8 führt zu verstärkter Monozytenadhäsion. Dem entsprechend führte ein Knock-down von ZNF580 zu einer Steigerung der Monozytenadhäsion.

Da atherosklerotische Plaques zu einer Mangel durchblutung führen können, wurde der Einfluss des Endothels auf die Angiogenese als Kompensationsmechanismus durch Bildung neuer Umgehungskreisläufe bei reduzierter Strömung bzw. Wandschubspannung untersucht. Wandschubspannung ist die Kraft, die durch strömendes Blut auf das Endothel ausgeübt wird. Hierbei zeigte sich, dass der Transkriptionsfaktor FoxO1 in der Regulation der Angiogenese durch Wandschubspannung involviert ist. FoxO1 wurde dabei durch Wandschubspannung supprimiert. Hohe Wandschubspannung führte zu einer Aktivierung der PI3-Kinase und anschließend der Akt-Kinase. Diese phosphorylierte daraufhin FoxO1, das dadurch inaktiv und aus dem Kern ausgeschlossen wurde. An der Angiogenese beteiligte Zielgene von FoxO1 – z.B. Angiopoietin-2 (Ang-2) – wurden ebenfalls durch Wandschubspannung supprimiert.

Dagegen wurde der antiangiogene Faktor ADAMTS1<sup>13</sup> durch Wandschubspannung induziert. Niedriger Sauerstoffpartialdruck hemmte die Expression von ADAMTS1. ADAMTS1 wurde unter Beteiligung von Phospholipase C, PI3-Kinase und NO<sup>·</sup> induziert. FoxO1 hemmte die Expression von ADAMTS1. In einer *in silico* Vorhersage konnten Bindungsstellen für FoxO1, Nuclear factor 1, SP-1 und AP-1 in der Promotorsequenz von ADAMTS1 gefunden werden. ADAMTS1 spaltet Thrombospondin-1 (TSP1) in ein 70 kDa Fragment. Dieses Fragment konnte bei Zellen nachgewiesen werden, die Wandschubspannung ausgesetzt waren. Im scratch wound assay war der Verschluss des Defekts des Zellmonolayers verzögert, wenn die Zellen mit Medium kultiviert wurden, das zuvor durch HUVEC unter Wandschubspannungseinfluss konditioniert wurde. Dieser Effekt wurde durch siRNA medierten Knock-down von TSP1 fast vollständig und durch Knock-down von ADAMTS1 teilweise wieder aufgehoben. Im

Rattenmesenterium zeigten nicht perfundierte kapilläre Sprossen verstärkte Ang2 und kaum ADAMTS1 Expression, während in gut durchbluteten Gefäßen die Expression sich umgekehrt darstellte. Auch *in vivo* wurde ADAMTS1 im Rattenmesenterium durch Wandschubspannung erhöht.

## **Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle endothelialer Faktoren in der Pathogenese der Atherosklerose und in der Regulation der Angiogenese zu erforschen. Es konnte gezeigt werden, dass das bislang nicht charakterisierte Zinkfinger Protein 580 Einfluss auf Atherosklerose-relevante Mechanismen hat. Durch ZNF580 wurde IL-8 supprimiert. IL-8 aktiviert an Monozyten den Rezeptor CXCR2.<sup>14</sup> Dadurch kommt es zur Aktivierung der Monozyten und ihrer Adhäsion an das Endothel und in der Folge zur Migration der Monozyten in den subintimalen Raum.<sup>15</sup> Damit stellt IL-8 einen Faktor dar, der frühe Schritte in der Entstehung der Atherosklerose initiiert. Darüber hinaus kann IL-8 Tissue inhibitors of metalloproteases (TIMP) hemmen, die wiederum matrix metalloproteinases (MMP) hemmen.<sup>3</sup> Durch diese Disinhibition von MMPs kann es zu einem Einreißen der fibrösen Kappe der Plaque kommen. Als Folge kann sich an der offenen atherosklerotischen Plaque ein Thrombus bilden, der entweder die Plaque weiter vergrößert und damit den Blutstrom beeinträchtigt oder es kann zu einem thromboembolischen Ereignis kommen. Es ist bereits eine Induktion von IL-8 durch oxLDL gezeigt worden.<sup>16</sup> Jedoch wurde eine direkte Korrelation des Oxidationsgrads des LDLs mit der IL-8 Expression *in vitro* und dem IL-8 Serumlevel *in vivo* sowie eine Regulation durch HDL, die ebenso vom OxLDL/LDL-Quotienten abhängig ist, erstmals in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt. ZNF580 wurde ebenfalls in Abhängigkeit vom oxLDL/LDL-Quotienten reguliert; es zeigte jedoch eine inverse Regulation zu IL-8. ZNF580 wurde dabei nicht durch andere inflammatorische Faktoren wie TNF $\alpha$  beeinflusst. Entsprechend könnte die Lipoprotein-abhängige Regulation von IL-8 durch ZNF580 vermittelt werden und ZNF580 Teil eines Lipoprotein spezifischen Signalwegs in endothelialen Zellen sein. Darüber hinaus führte ein siRNA medierter Knock-down von ZNF580 zu einer Steigerung der Monozytenadhäsion. Dieser Effekt könnte durch eine Steigerung der IL-8 Expression erklärt werden.

Als Folge der Beeinträchtigung des Blutvolumenstroms kommt es zu einer Verminderung der Wandschubspannung in den entsprechenden Gefäßen und zu einem Absinken des Sauerstoffpartialdrucks in den abhängigen Geweben. Hier wäre Angiogenese als

Kompensationsmechanismus geeignet. Daher wurde der Einfluss verminderter Wandschubspannung und verminderten Sauerstoffpartialdrucks auf zwei endotheliale Regulatoren der Angiogenese untersucht. Es zeigte sich, dass FoxO1 abhängig von der Wandschubspannung und ADAMTS1 zusätzlich durch den Sauerstoffpartialdruck reguliert werden. Bei Verminderung der Wandschubspannung wird FoxO1 über den PI3-Kinase/Akt Signalweg aktiviert. Dies hat eine Induktion von Ang2, einem Antagonisten am Tie2-Rezeptor, zur Folge. Die Expression des Tie2-Rezeptors wird bei verminderter Wandschubspannung supprimiert. Eine Aktivierung des Tie2-Rezeptors führt zu einer Stabilisierung des Blutgefäßes, d.h. zu einer Hemmung der Ausbildung von Gefäßsprossen.<sup>17</sup> Folglich sollte bei Verminderung der Wandschubspannung durch einen reduzierten Blutvolumenstrom eine verstärkte Expression von FoxO1 und darauf folgend von Ang2 durch Hemmung von Tie2 zu Bedingungen führen, unter denen neue Sprossen wachsen können. Darüber hinaus wird bei verminderter Wandschubspannung und unter Hypoxie die Expression des antiangiogenen Faktors ADAMTS1 vermindert. Dies führt zu einer Destabilisierung der Gefäße, wodurch die Ausbildung neuer Gefäßsprossen in mangelversorgten Gebieten begünstigt wird. Die Expression von ADAMTS1 wird durch FoxO1 gehemmt, sodass eine Verbindung dieser beiden strömungsabhängigen Faktoren bestehen dürfte. Entsprechend sollte in gut durchbluteten Gefäßen vermehrt ADAMTS1 gebildet werden, in Sprossen dagegen vermehrt Ang2. Dieses Expressionsmuster konnte in Blutgefäßen des Rattenmesenteriums tatsächlich nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte *in vivo* eine direkte Abhängigkeit der Expression von ADAMTS1 von der Wandschubspannung gezeigt werden. Die antiangiogene Wirkung von ADAMTS1 erfolgt durch Spaltung von TSP1 in ein 70 kDa Fragment. Dieses Fragment ließ sich bei einer Strömung ausgesetzten Zellen vermehrt nachweisen. Wurden Endothelzellen in Medium kultiviert, das zuvor durch Zellen konditioniert wurde, die einer Strömung ausgesetzt waren, so zeigte sich ein verlangsamter Defektschluss im scratch wound assay. Dieser Effekt ließ sich durch Hemmung von TSP1 vollständig und durch Hemmung von ADAMTS1 teilweise aufheben. Dies deutet darauf hin, dass ADAMTS1 ein TSP1-abhängiges System moduliert.

Das Endothel kann also mittels ZNF580 die Entstehung von atherosklerotischen Plaques beeinflussen. ZNF580 könnte dabei einen protektiven Faktor darstellen, da es IL-8 und den folgenden Monozytenarrest hemmt. Jedoch scheint dieser Mechanismus nur bei niedrigem oxLDL/LDL-Quotienten aktiv zu sein. Bei hohem oxLDL/LDL-Quotienten kommt es sogar zu einer Suppression von ZNF580, was eine stärkere Expression von IL-8 zur Folge hat. Die Angiogenese in Form von Sprossung wird vom Endothel durch das FoxO1/Ang2-System

gefördert und durch ADAMTS1 gehemmt. Entsprechend kann das Endothel die Angiogenese den Erfordernissen strömungsreguliert anpassen. So ist in gut durchbluteten, gut versorgten Gefäßbereichen ADAMTS1 erhöht, was zu einer Stabilisierung der Gefäße führt. Im umgekehrten Fall ist das FoxO1/Ang2-System verstärkt aktiv und könnte so die Bildung von neuen Umgehungskreisläufen durch Kapillarsprossung fördern.

## Literatur

- [1] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006;3:e442.
- [2] Schwartz SM. Role of endothelial integrity in atherosclerosis. *Artery.* 1980;8:305-14.
- [3] 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.
- [4] Germain S, Monnot C, Muller L, Eichmann A. Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Curr Opin Hematol.* 2010;17:245-51.
- [5] Hudlicka O, Brown M, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev.* 1992;72:369-417.
- [6] Bongrazio M, Pries AR, Zakrzewicz A. The endothelium as physiological source of properdin: role of wall shear stress. *Mol Immunol.* 2003;39:669-75.
- [7] 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 angiopoietin-2/Tie2 system by shear stress. *FEBS Lett.* 2007;581:673-80.
- [8] Smith DF, Galkina E, Ley K, Huo Y. GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H1976-84.
- [9] Hohberg M, Knochel J, Hoffmann CJ, Chlench S, Wunderlich W, Alter A, Maroski J, Vorderwulbecke BJ, Silva-Azevedo LD, 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.* 2010; 226(2):350-61.
- [10] 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.

- [11] Zakrzewicz A, Grafe M, Terbeek D, Bongrazio M, Auch-Schwelk W, Walzog B, Graf K, Fleck E, Ley K, Gaehtgens P. L-selectin-dependent leukocyte adhesion to microvascular but not to macrovascular endothelial cells of the human coronary system. *Blood*. 1997;89:3228-35.
- [12] Anderson CR, Ponce AM, Price RJ. Immunohistochemical identification of an extracellular matrix scaffold that microguides capillary sprouting in vivo. *J Histochem Cytochem*. 2004;52:1063-72.
- [13] Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, Lane TF, Oikemus S, Lombardo M, Iruela-Arispe ML. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem*. 1999;274:23349-57.
- [14] Boisvert WA, Curtiss LK, Terkeltaub RA. Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in atherosclerosis. *Immunol Res*. 2000;21:129-37.
- [15] Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr., Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 1999;398:718-23.
- [16] Claise C, Edeas M, Chalas J, Cockx A, Abella A, Capel L, Lindenbaum A. Oxidized low-density lipoprotein induces the production of interleukin-8 by endothelial cells. *FEBS Lett*. 1996;398:223-7.
- [17] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997;277:55-60.

## Anteiserklärung

Christian Johannes Hoffmann hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

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

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Real time RT-PCR für FoxO1 und Ang2, Herstellung von FoxO1 spezifischer esiRNA, Etablierung der Transfektion von EAhy926 Zellen mit esiRNA, RNAi-Experimente mit esiRNA für FoxO1.

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.

10 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Real time RT-PCR für ADAMTS1 und FoxO1, Herstellung von FoxO1 spezifischer esiRNA, Etablierung der Transfektion von HUVEC mit esiRNA oder siRNA, RNAi-Experimente mit esiRNA für FoxO1 und siRNA für ADAMTS1 und TSP1.

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.

70 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Real time RT-PCR für ZNF580 und IL-8, RNAi-Experimente mit siRNA für ZNF580, Assay für Monozytenarrest in der Flusskammer, Entwicklung des Projekts, Verfassen der Veröffentlichung.

Christian Hoffmann  
Promovend

Prof. Dr. Axel R. Pries  
Betreuender Hochschullehrer

## Publikationen

1. **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

[doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.017](https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.017)

2. 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

[doi:10.1016/j.febslet.2007.01.028](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.028)

3. 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

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.22340/pdf>

## **Lebenslauf**

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



## Publikationsliste

### Originalarbeit als Erstautor

- |  | <b>IF</b> |
|--|-----------|
| 1. <b>Hoffmann CJ</b> , Hohberg M, Chlench S, Maroski J, Drab M, Siegel G, Pries AR, Zakrzewicz A. Suppression of Zinc finger protein 580 by high oxLDL/LDL-ratios is followed by enhanced expression of endothelial IL-8. <i>Atherosclerosis</i> 2011;216(1):103-8. | 4,522     |

### Originalarbeiten als Koautor

- |  | <b>IF</b> |
|--|-----------|
| 1. Chlench S, Mecha Disassa N, Hohberg M, <b>Hoffmann C</b> , Pohlkamp T, Beyer G, Bongrazio M, Da Silva-Azevedo L, Baum O, Pries AR, Zakrzewicz A. Regulation of Foxo-1 and the angiotensin-2/Tie2 system by shear stress. <i>FEBS Lett</i> 2007;581:673-80.  | 3,541     |
| 2. Da Silva-Azevedo L, Jähne S, <b>Hoffmann C</b> , Stalder D, Heller M, Pries AR, Zakrzewicz A, Baum O. Up-regulation of the peroxiredoxin-6 related metabolism of reactive oxygen species in skeletal muscle of mice lacking neuronal nitric oxide synthase. <i>J Physiol</i> 2009;587:655-68.   | 4,764     |
| 3. Hohberg M, Knöchel J, <b>Hoffmann CJ</b> , Chlench S, Wunderlich W, Alter A, Maroski J, Vorderwülbecke B, Da Silva-Azevedo L, Knudsen R, Lehmann R, Fiedorowicz K, Bongrazio M, Styp-Rekowska B, Pries AR, Zakrzewicz A. Expression of ADAMTS1 in endothelial cells is induced by shear stress and suppressed in sprouting capillaries. <i>J Cell Physiol</i> . 2011;226(2):350-61. | 4,586     |

## **Erklärung**

„Ich, Christian Johannes Hoffmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „ZNF580, FoxO1 und ADAMTS1 in Endothelzellen bei LDL-Belastung und Blutströmungsreduktion – mögliche neue Regulationsmechanismen bei Atherosklerose und kompensatorischer Angiogenese“ 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  
Franziska Hunold und meinen Eltern  
sowie Andreas Zakrzewicz  
für ihre Unterstützung