

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Physiologie
Institut für Physiologie I (Kardiovaskuläre Physiologie)
Direktor: Prof. Dr. Ralf P. Brandes

**Einfluss epigenetischer Modifikationen auf
die Regulation des Gefäßtonus**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Patrick Ulrich Janetzko

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2021

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent/in:	PD Dr. Matthias Leisegang
Korreferent/in:	Prof. Dr. Stefan Müller
ggf. 2. Korreferent/in:	
Tag der mündlichen Prüfung:	07.04.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	12
1.1 Regulation des Gefäßtonus und Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen.....	13
1.1.1 Mechanismus der Gefäßkontraktion.....	13
1.1.2 Vasokonstriktoren.....	16
1.1.2.1 Noradrenalin	16
1.1.2.2 Thromboxan A ₂	16
1.1.3 Mechanismus der Gefäßrelaxation.....	18
1.1.4 Vasorelaxantien.....	20
1.1.4.1 Stickstoffmonoxid (NO).....	20
1.1.4.2 Prostacyclin (PGI ₂)	21
1.1.4.3 Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors (EDHF)	21
1.1.5 Pathogenese der endothelialen Dysfunktion und Herz-Kreislauf- Erkrankungen.....	22
1.2 Grundlegende epigenetische Mechanismen und epigenetische Regulation im Gefäßsystem.....	24
1.2.1 Mechanismen der epigenetischen Regulation.....	25
1.2.1.1 DNA- und RNA-Modifikationen	25
1.2.1.2 Histon-Modifikationen	26
1.2.2 Rolle epigenetischer Modifikationen in Physiologie und Pathophysiologie des Gefäßsystems	28
1.3 Ziel und Fragestellung.....	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Versuchstiere	31
2.2 Gewinnung der Gefäßpräparate	32
2.3 Organ-Kultur	33
2.4 Organbadversuch	34
2.4.1 Aufbau und Durchführung	34
2.4.2 Versuchsprotokoll der Vasoreaktivitätsstudie im Organbad	36
2.5 Zellkultur.....	39
2.6 Protein-Isolation und Western Blot.....	40
2.7 Quantitative RT-qPCR	41
2.9 Statistik.....	42

3 Ergebnisse	44
3.1 Einfluss der Inhibition von EZH2 auf die Gefäßreaktivität von Mausgefäßen in Physiologie und Inflammation	44
3.1.1 EZH2-Inhibition unter physiologischen Bedingungen	44
3.1.1.1 Behandlung mit GSK343 führte zu leicht verzögerter Kontraktion der Maus-Aorta unter nicht-inflammatorischen Bedingungen	44
3.1.1.2 Die eNOS Synthesefunktion von EZH2-inhibierten Mäusen war nicht alteriert	46
3.1.2 EZH2-Inhibition unter inflammatorischen Bedingungen	47
3.1.2.1 Behandlung mit GSK343 verminderte die Hyperkontraktilität von Gefäßen in der Inflammation	47
3.1.2.2 Der kontraktile Apparat wurde durch EZH2-Inhibition nicht beeinflusst	49
3.1.2.3 EZH2-Inhibition beeinflusste nicht die Thromboxan-induzierte Kontraktion	50
3.1.2.4 Die iNOS-Aktivität war unter inflammatorischen Bedingungen nach Behandlung mit GSK343 nicht gesteigert	51
3.2 Charakterisierung des Phänotyps der JARID1B-Knockout Maus	53
3.2.1 JARID1B wird in humanen Endothelzellen stark exprimiert	53
3.2.2 <i>Jarid1b</i> -Knockout zeigte eine beschleunigte Relaxationsfähigkeit ...	55
3.2.3 Reproduktion des Phänotyps durch Inhibitor-Behandlung	57
3.2.4 Phänotypisierung spezifischer Knockout-Tiere	58
3.2.4.1 LysM ⁺ -spezifische <i>Jarid1b</i> -Knockout-Maus zeigte keinen Phänotyp	58
3.2.4.2 Endothelspezifische <i>Jarid1b</i> -Knockout-Maus zeigte keinen Phänotyp	59
3.2.5 NO-vermittelte Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen war im <i>Jarid1b</i> -Knockout nicht alteriert.....	60
3.2.6 Bioverfügbarkeit und Aktivitätsgrad von eNOS und iNOS in <i>Jarid1b</i> -Knockout Mäusen war nicht verändert	61
3.2.6.1 NO-Synthesenaktivität wurde durch <i>Jarid1b</i> -Knockout nicht gesteigert.....	61
3.2.6.2 <i>Jarid1b</i> -Knockout ergab keine gesteigerte iNOS-Induktion	62
3.2.6.3 Der Phosphorylierungsgrad der eNOS wurde durch <i>Jarid1b</i> -Knockout nicht erhöht.....	63
3.2.7 Inkubation mit Arachidonsäure führte im <i>Jarid1b</i> -Knockout nicht zu verstärkter Relaxation	64
4 Diskussion	66
4.1 Rolle von EZH2 in der Regulation des Gefäßtonus	66
4.1.1 Möglicher Einfluss von EZH2 auf die NO-Bioverfügbarkeit	66
4.1.2 Möglicher Einfluss von EZH2 auf vasokonstriktorische Signalwege	67

4.1.3 Möglicher Einfluss von EZH2 auf Interleukin-Signalwege	70
4.2 Klinischer Ausblick: EZH2 in Krebs- und Sepsis-Therapie.....	72
4.3 Rolle von JARID1B in der Regulation des Gefäßtonus	73
4.3.1 Einfluss von <i>JARID1B</i> -Knockout auf die NO-Bioverfügbarkeit nicht nachweisbar	74
4.3.2 Möglicher Einfluss des <i>JARID1B</i> -Knockouts auf Prostanoid-Signalwege.....	77
4.4 Klinischer Ausblick: JARID1B als Zielprotein in Krebstherapie, Gefäßerkrankungen und Inflammation	80
4.5 Kritik der Methodik	82
5.1 Zusammenfassung.....	84
5.2 Conclusion.....	86
6 Literaturverzeichnis	88
7 Eigene Veröffentlichungen	108
8 Schriftliche Erklärung	109

Abbildungsverzeichnis

Nr.	Abbildung	Seite
1	Schema der Kontraktion und Kalziumsensitivierung einer glatten Gefäßmuskelzelle	14
2	Schema der Relaxation und Kalziumdesensitivierung einer glatten Gefäßmuskelzelle	18
3	Schema des Chromatin-Remodellings durch JARID1B	27
4	Präparationsschritte der Mausgefäße	33
5	Organbadkammer	35
6	Schematischer Aufbau des Organbads	36
7	Schematischer Versuchsablauf Vasoreaktivitätsstudie im Organbad	38
8 A	Phenylephrin-induzierte Kontraktion der murinen Aorta nach GSK343-Inkubation	44
8 B	Acetylcholin-induzierte Relaxation der murinen Aorta nach GSK343-Inkubation	45
9	Kontraktion der murinen Aorta durch Inkubation mit L-NAME nach GSK343-Behandlung	46
10 A	Phenylephrin-induzierte Kontraktion der murinen Aorta nach GSK343-Inkubation und Behandlung mit mLPS	47
10 B	Acetylcholin-induzierte Relaxation der murinen Aorta nach GSK343-Inkubation und Behandlung mit mLPS	48
11	Kontraktion der murinen Aorta durch Depolarisation mittels K ⁺ -Inkubation nach GSK343-Inkubation und Behandlung mit mLPS	49
12	Kontraktion der murinen Aorta durch das Thromboxan-Analogon U46619 nach GSK343-Inkubation und Behandlung mit mLPS	50
13	Kontraktion der murinen Aorta durch Inkubation mit L-NIL nach GSK343-Inkubation und Behandlung mit mLPS	51
14	RT-qPCR zur Messung von Histondemethylasen-mRNA Konzentrationen in humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen	53
15	Repräsentativer Western blot für JARID1B in verschiedenen Gewebetypen	54
16 A	Phenylephrin-induzierte Kontraktion der murinen A. mesenterica superior aus tamoxifen-induzierbarem <i>Jarid1b</i> -KO-Mäusen	55
16 B	Acetylcholin-induzierte Relaxation der murinen AMS aus tamoxifen-induzierbarem <i>Jarid1b</i> -KO-Mäusen	56
17	Acetylcholin-vermittelte Relaxation der murinen AMS aus WT-Mäusen nach Inkubation mit JARID1B-Inhibitor PBIT	57

18	Acetylcholin-vermittelte Relaxation der AMS aus LysM ⁺ -spezifischem <i>Jarid1b</i> -KO	58
19	Acetylcholin-vermittelte Relaxation der AMS aus endothel-spezifischem <i>Jarid1b</i> -KO	59
20	Deta-NONOate vermittelte Relaxation der denudierten AMS aus <i>Jarid1b</i> -KO Mäusen	60
21	Kontraktion der AMS aus <i>Jarid1b</i> -KO Mäusen durch Inkubation mit L-NAME	61
22	Kontraktion der AMS von <i>Jarid1b</i> -KO Mäusen durch Inkubation mit L-NIL nach mLPS-Behandlung	62
23	Western-Blot und Densitometrie von eNOS und p-eNOS der AMS von <i>Jarid1b</i> -KO Mäusen	63
24	Relaxation der AMS von <i>Jarid1b</i> -KO Mäusen durch Inkubation mit Arachidonsäure nach Vorkontraktion mit U46619	64
25	Schema des Arachidonsäurestoffwechsels in Endothelzellen	77

Tabellenverzeichnis

Nr.	Tabelle	Seite
1	Primer-Sequenzen der RT-qPCR zur Messung von Histon-demethylasen-mRNA Konzentrationen in HUVEC	42

Abkürzungsverzeichnis

A. / Ae.	Arteria / Arteriae
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AMS	Arteria mesenterica superior
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
Ca ²⁺	Calzium ²⁺ - Ionen
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P
DAG	1,2-Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve
EBM	Endothelial Basal Kulturmedium
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
EET	Epoxyeicosatriensäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EZH2	Enhancer of Zeste homolog 2
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon Deacetylase
HMT	Histon-Methyltransferase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IL-6	Interleukin 6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP ₃	Inositoltriphosphat
K.-H.-Puffer	Krebs-Henseleit Puffer
K _{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver K ⁺ -Kanal
KO	Knockout

LDL	low-density lipoprotein
L-NAME	L-N ^ω -Nitroarginin Methylester
lncRNA	long non-coding RNA
L-NIL	N-(Iminoethyl)-L-Lysin
LPS	Lipopolysaccharid
Lys-M ⁺	Lysozym-M-positive Zellen
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Kinase
miRNA	micro-RNA
MLC	Myosin-leichte-Kette
MLCK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MLCP	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase
mLPS	murines Lipopolysaccharid
ncRNA	non-coding RNA
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
ns	nicht signifikant
PGI ₂	Prostacyclin
Phe	Phenylephrin
PI ₃ K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLCβ	Phospholipase Cβ
PMCA	Plasmalemmale Ca ²⁺ -ATPase
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems
RACK	receptor for activated C kinase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
sEH	Soluble epoxide hydrolase
SEM	standard error of the mean
SERCA	Sarkoplasmatische Reticulum Ca ²⁺ -ATPase

sGC	Soluble guanylyl cyclase
siRNA	small-interfering RNA
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TXA ₂	Thromboxan-A ₂
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit die häufigste Ursache für Tod und Behinderung dar. Mit steigendem Wohlstand nimmt die Inzidenz auch in Niedrig- und Mittellohnländern zu.¹ Im vergangenen Jahrhundert wurden diverse Therapieansätze zur Behandlung dieser Erkrankungen entwickelt. Im neuen Jahrtausend führte die Grundlagenforschung in der Epigenetik zur neuen Therapieansätzen im Feld der personalisierten Medizin und Krebstherapie.²⁻⁴ Die therapeutischen Möglichkeiten auch im Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen erscheinen vielfältig und werden aktuell intensiv untersucht.⁵ Für die Entwicklung solcher neuartigen Therapien ist ein Verständnis für die Rolle epigenetischer Modifikationen in der Regulation des Herz-Kreislauf-Systems notwendig. In dieser Arbeit soll durch Eingriffe in die Histonmethylierung von Gefäßzellen der Einfluss epigenetischer Modifikationen auf die Regulation der Gefäßreaktivität und hiermit verbunden in der Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen untersucht werden. Gleichzeitig wird die Rolle der verwendeten Wirkstoffe als mögliche innovative Therapeutika dargestellt.

Einleitend werden die physiologischen Grundlagen der Gefäßkontraktion und -relaxation sowie bekannte pathophysiologische Prozesse in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen erläutert. Des Weiteren folgt eine Übersicht über epigenetische Regulationsmechanismen und ihre Rolle im kardiovaskulären System.

1.1 Regulation des Gefäßtonus und Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen

Die präzise Regulation des Gefäßtonus ist notwendig für die Blutdruckkontrolle im Herz-Kreislauf-System sowie zur Steuerung der Organdurchblutung. Im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen zeigen Blutgefäße häufig eine fehlerhaft gesteigerte Kontraktion und unzureichendes Relaxationsvermögen. Hier werden die grundlegenden Regulationsmechanismen dargestellt, die zur Gefäßkontraktion und -relaxation führen.

1.1.1 Mechanismus der Gefäßkontraktion

Der Gefäßtonus wird durch die Kontraktion und Relaxation der glatten Muskelzellen in der Tunica muscularis der Gefäße bestimmt. In diesen werden extra- und intrazelluläre Signale integriert und entsprechend kontraktile Elemente aktiviert. Die Kontraktion der glatten Muskelzelle wird durch Aktin-Myosin-Interaktion ausgelöst.^{6,7} Diese wiederum wird auf vielfältige Weise durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration reguliert sowie durch Mechanismen, die die Sensitivität des kontraktile Apparates gegenüber Ca^{2+} -Ionen verstärken oder vermindern.⁸

Auslöser für einen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle und eine entsprechende Kontraktion können dabei eine unspezifische Membrandepolarisation,⁹ die Bindung von Agonisten an Zellwandrezeptoren¹⁰ oder auch die Dehnung der Gefäßwand¹¹ sein. Bei Depolarisation der Zelle treten Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellularraum durch voltage-dependent Ca^{2+} -Kanäle (VDCC) ein.¹⁰ Im Verlauf öffnen sich auch Kalziumkanäle am sarkoplasmatischen Retikulum (SR).¹² Die Ca^{2+} -Ionen strömen jeweils bedingt durch den hohen Konzentrationsgradienten in das Cytosol ein. Dort binden sie an das Protein Calmodulin (CaM) und bilden so den Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex. Dieser aktiviert die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK), welche ihrerseits die leichte Kette des Myosins (MLC) phosphoryliert. So wird der Querbrückenzyklus aktiviert, unter ATP-Verbrauch kontrahiert die glatte Muskelzelle (Abb. 1).¹³

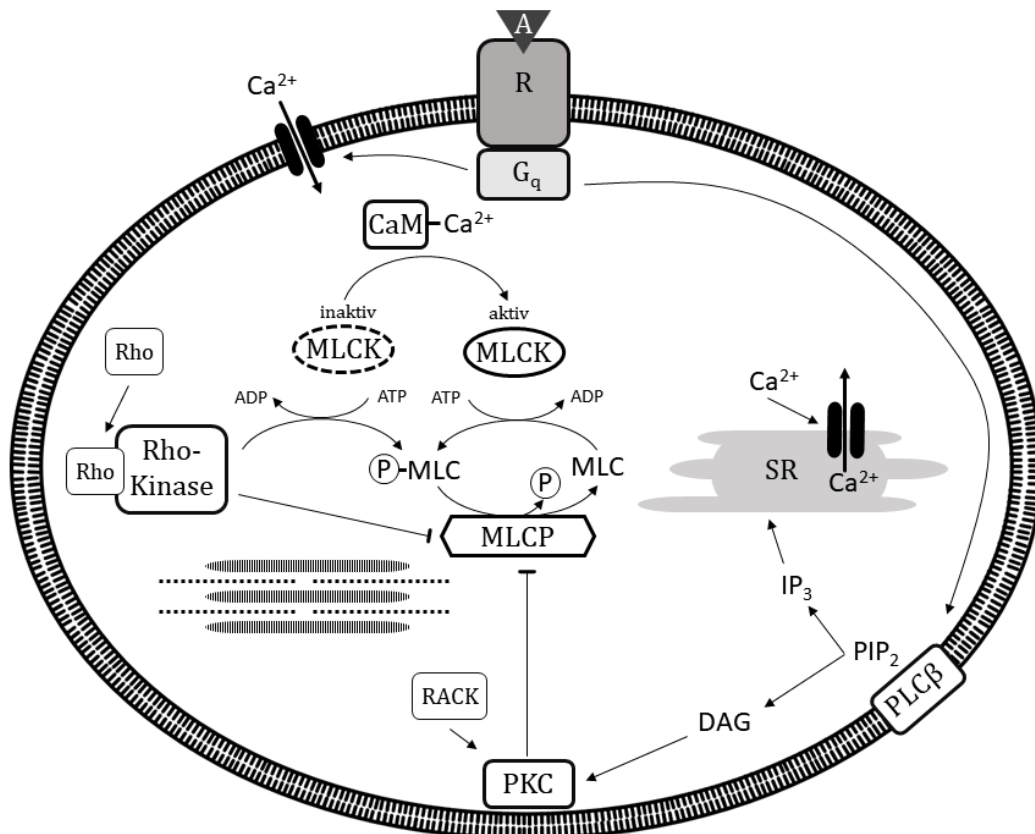


Abb. 1: Schema der Kontraktion und Calciumsensitivierung einer glatten Gefäß-muskelzelle:

A: Agonist; R: Rezeptor; G_q: G_q-Protein, CaM: Calmodulin; MLC: leichte Myosinkette; MLCK: Myosin-leichte-Ketten-Kinase; MLCP: Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase; PKC: Proteinkinase C; RACK: receptor for activated C kinase; PLCβ: Phospholipase Cβ, PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; IP₃: Inositoltriphosphat; DAG: Diacylglycerol; SR: Sarkoplasmatisches Retikulum

Nach Depolarisation der Zellmembran, z.B. durch Bindung von Agonisten am G-Protein-gekoppelten Rezeptor, treten Ca²⁺-Ionen aus dem Extrazellularraum durch voltage-dependent Ca²⁺-Kanäle (VDCC) ein und öffnen Ionenkanäle des sarkoplasmatischen Retikulums. Die Ca²⁺-Ionen strömen ins Cytosol ein, binden dort an das Protein Calmodulin und bilden so den Ca²⁺-Calmodulin-Komplex. Dieser aktiviert die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK), welche die leichte Kette des Myosins (MLC) phosphoryliert. Der Querbrückenzyklus wird aktiviert und die glatte Muskelzelle kontrahiert.

Typischerweise binden Agonisten wie Noradrenalin oder Thromboxan an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und aktivieren so die G_q-Untereinheit, welche dann die Signalkaskade zur Zellkontraktion vermittelt¹⁴. Die G_q-Untereinheit aktiviert die membranständige Phospholipase Cβ (PLCβ), welches Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in der Zellmembran zu Inositoltriphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) spaltet.¹⁵ Der Second Messenger IP₃ diffundiert ins

Cytosol und stimuliert die Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR.^{8,16} Außerdem induzieren erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentrationen die Öffnung von Kalziumkanälen am sarkoplasmatischen Retikulum (sog. Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release).¹⁷

Das von der PLC β produzierte DAG aktiviert parallel die membranständige Proteinkinase C (PKC).¹⁸ Die Phosphorylierungskapazität der aktivierten PKC wird außerdem durch Gerüstproteine wie den receptor for activated C kinase (RACK) modifiziert.¹⁹ Nach Aktivierung nimmt die PKC über Phosphorylierung verschiedener Proteine in der Zelle Einfluss auf die Kontraktion, unter anderem wird die Ca^{2+} -Sensitivität der kontraktilen Elemente erhöht.²⁰ Aber auch die Kontrolle der Demethylierung des Histons H3 Lysin 4 (H3K4) über eine Phosphorylierung des Histons H3 Threonin 6 (H3T6) durch die PKC wird beschrieben.²¹

Neben der PLC führt auch die Aktivierung der Rho-Kinase zu einer Ca^{2+} -Sensitivierung und zu einer verstärkten Kontraktion der glatten Muskelzelle. Über Bindung verschiedener Agonisten an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren²² wird das Protein Rho aktiviert, welches einen Komplex mit der Rho-Kinase eingeht. Diese wiederum hat zwei Funktionen: zum einen kann sie die MLC direkt phosphorylieren, zum anderen inhibiert sie die Funktion der MLCP. So erhöht die Rho-Signalkaskade die Ca^{2+} -Sensitivität.²³⁻²⁵

Neben der Aktivierung des Querbrückenzyklus scheint auch die Induktion von Actin-Polymeren eine wichtige Voraussetzung für die Kontraktion eines Verbandes aus glatten Muskelzellen zu schaffen. Es wurde gezeigt, dass verschiedene Stimuli (Agonisten, mechanische Stimulation) zu einer Remodellierung der Aktin-Filamente in der Zelle führen. Diese Remodellierung verstärkt die Bindung der intrazellulären Aktin-Filamente mit den extrazellulären Matrix-Proteinen sowie die Zellbindung zwischen den glatten Muskelzellen und ermöglicht den Kraftaufbau durch den Querbrückenzyklus.²⁶

1.1.2 Vasokonstriktoren

Die oben beschriebene Kontraktion der Gefäßmuskelzelle wird durch Bindung von Signalstoffen an den glatten Muskelzellen ausgelöst. Noradrenalin und Thromboxan sind potente Vasokonstriktoren, welche auch unter physiologischen Bedingungen im Körper zu den hauptsächlichsten gefäßkontrahierenden Signalstoffen zählen.

1.1.2.1 Noradrenalin

Noradrenalin gehört zur Gruppe der endogenen Katecholamine und stellt einen starken physiologischen Vasokonstriktor dar.²⁷ Es wird im Nebennierenmark synthetisiert und bei Aktivierung des sympathischen Nervensystems ins Blut ausgeschüttet.²⁸ Im Gefäßsystem entwickelt es eine vasokonstriktorische Wirkung durch Bindung an α_1 -Rezeptoren an der glatten Muskulatur der Gefäße. Dieser Adrenorezeptor wird in drei Subtypen unterteilt: α_{1A} -Rezeptoren, α_{1B} -Rezeptoren und α_{1D} -Rezeptoren, wobei alle eine Vasokonstriktion hervorrufen.²⁹ Die Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt und bei Bindung des Agonisten wird durch die Aktivierung der G_q -Untereinheit die Signaltransduktion zur Vasokonstriktion in die Muskelzelle geleitet.³⁰ Der primäre Signalweg ist dabei die Aktivierung der PLC mit konsekutiver Synthese von IP_3 als second messenger der glatten Muskelkontraktion (vgl. Kap. 1.1.1). Dennoch werden auch alternative Pfade durch Bindung von Noradrenalin an den α_1 -Rezeptor der glatten Muskelzelle initiiert. Beschrieben ist die direkte Öffnung von Kalziumkanälen (VOCC), die Freisetzung von Arachidonsäure, Aktivierung der Phospholipase D und die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Kinase (MAP-Kinase).^{27,29}

1.1.2.2 Thromboxan A_2

Thromboxan A_2 ist ein Eicosanoid, welches insbesondere in Thrombozyten produziert wird und im Gefäßsystem die Interaktion zwischen Thrombozyten, Lymphozyten und dem lokalen Gefäßbett vermittelt.³¹ Es wirkt vasokonstriktorisch, Thrombozyten-aktivierend und prothrombotisch.³² Die Synthese erfolgt aus der membranständigen Arachidonsäure, welche durch die Cyclooxygenase 1 (COX-1) über Prostaglandin G_2 zu Prostaglandin H_2 umgesetzt wird. Prostaglandin H_2 ist ein Substrat für vielfältige weitere Signalwege in der Zelle, unter anderem wird es von der Thromboxan- A_2 -Synthase (TXA₂-Synthase) zu

Thromboxan A₂ synthetisiert.³³ Die Gefäßkontraktion wird bei Bindung von Thromboxan A₂ am Thromboxan A₂-Rezeptor initiiert, welcher ebenfalls zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört. Nach Bindung des Thromboxans A₂ an den Rezeptor wird die die PLC aktiviert.³⁴ Entsprechend steigt die IP₃-Konzentration in der Zelle, welches einen Ca²⁺-Anstieg und die Kontraktion der glatten Muskelzelle zur Folge hat.³⁵ Physiologischer Antagonist des Thromboxans ist das Prostacyclin (PGI₂).³³

1.1.3 Mechanismus der Gefäßrelaxation

Eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle kann durch verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Grundsätzlich ist eine Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration notwendig. Dies führt dazu, dass der Ca^{2+} -CaM-Komplex dissoziiert und die MLCK in den inaktiven Zustand überführt wird. Gleichzeitig dephosphoryliert die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) die leichten Ketten des Myosins und es kommt zur Relaxation. Darüber hinaus können Agonisten die Kalzium-Sensitivität des kontraktiven Apparates senken (Abb. 2).

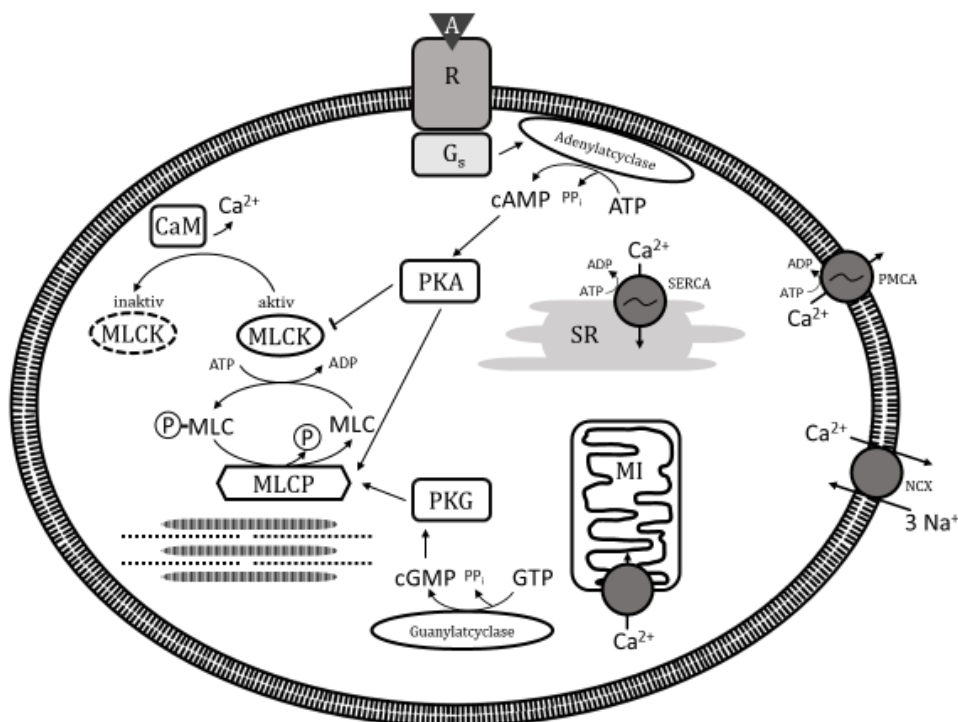


Abb. 2: Schema der Relaxation und Calciumdesensitivierung einer glatten Gefäßmuskelzelle:

A: Agonist; R: Rezeptor; G_q : G-Protein, CaM: Calmodulin; MLC: leichte Myosinkette; PKA: Proteinkinase A; MLCK: Myosin-leichte-Ketten-Kinase; MLCP: Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase; PKG: Proteinkinase G; SR: Sarkoplasmatisches Retikulum; MI: Mitochondrium; PMCA: Plasmalemmale Ca^{2+} -ATPase; NCX: Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher

Durch Bindung von Agonisten am G-Protein-gekoppelten Rezeptor oder durch Aktivierung der Guanylatcyclase wird eine Kalzium-Desensitivierung hervorgerufen, sodass der Querbrückenzyklus nicht weiter abläuft und die glatte Muskelzelle relaxiert. Kalzium-Ionen werden zurück in das sarkoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien gepumpt, ebenso wie in den Extrazellulärraum.

Wichtig für die Kalzium-Homöostase der Muskelzelle ist die Plasmalemmale Ca^{2+} -ATPase (PMCA). Diese ist in der Zellmembran lokalisiert und pumpt ATP-abhängig Ca^{2+} -Ionen in den Extrazellularraum.³⁶ Aktiviert wird sie insbesondere durch Calmodulin.³⁷ Ebenfalls in der Zellmembran arbeitet der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX). Er wird über den Gradient der Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen angetrieben und transportiert in Form eines Antiports drei Na^+ -Ionen gegen ein Ca^{2+} -Ion.^{38,39}

Kalzium wird außerdem in intrazellulären Organellen, dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und den Mitochondrien, gespeichert. Die Sarkoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) pumpt unter ATP-Verbrauch Ca^{2+} -Ionen in das SR. Reguliert wird die SERCA durch das Protein Phospholamban.⁴⁰ So können beispielsweise Agonisten wie Noradrenalin nach Bindung an den Adrenorezeptor über Aktivierung von Phospholamban den Ca^{2+} -Uptake in das SR temporär vermindern.⁴¹ In den Mitochondrien wird Kalzium über einen Kalzium-Uniporter gespeichert.⁴²

Eine Kalziumdesensitivierung wird unter anderem über zwei Mechanismen hervorgerufen: über eine Inaktivierung der MLCK oder eine Aktivitätssteigerung der MLCP.⁴³ Über diese Wege können Agonisten wie Adrenalin, Adenosin oder Stickstoffmonoxid (NO) direkt den Grad der Myosin-Phosphorylierung modulieren, entweder über entsprechende Rezeptorbindung oder, wie im Falle von NO, über Diffusion in die Zelle. Diese Kalziumdesensitivierung wird über die cyclischen Nucleotide cAMP und cGMP als second messenger reguliert.⁴⁴ Bindet ein vasodilatatorischer Agonist am G-Protein-gekoppelten Rezeptor der Zellmembran, so wird über die G_s -Untereinheit die Adenylatcyclase aktiviert, welche wiederum ATP zu cAMP umsetzt. Dieses aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche die MLCP phosphoryliert und damit in den aktiven Zustand versetzt. In der Folge wird Myosin dephosphoryliert und die Zelle relaxiert. Auch phosphoryliert die PKA auch die MLCK und inaktiviert sie dadurch.^{13,43} Relevant ist außerdem die Aktivierung der Guanylatcyclase, beispielsweise über NO. Die aktivierte Guanylatcyclase produziert den second messenger cGMP, der die Proteinkinase G (PKG) aktiviert, welche die MLCP phosphoryliert.⁴⁵

cAMP kann außerdem neben der Aktivierung der MLCP und Inhibition der MLCK sogenannte ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) öffnen. Diese Kanäle

stabilisieren das Ruhemembranpotential der glatten Muskelzelle und führen nach Öffnung zu einer Hyperpolarisation der Zelle durch K⁺-Ausstrom. Aktiviert werden K_{ATP}-Kanäle häufig unter Einfluss vasorelaxierender Autacoide wie NO⁴⁶ oder Prostacyclin.⁴⁷ Vasokonstriktoren können die Kanäle über die PKC deaktivieren.^{48,49}

1.1.4 Vasorelaxantien

Die Gefäßrelaxation wird durch verschiedenste Botenstoffe ausgelöst, einige sind bis heute nicht vollständig identifiziert. Differenziert wird zwischen endothelabhängiger- und endothelunabhängiger Vasorelaxation. Bei der endothelabhängigen Relaxation binden Agonisten an Rezeptoren der Endothelzellschicht, welche daraufhin vasoaktive, relaxierende Autacoide freisetzt, die an die glatte Muskulatur diffundieren. Relevante Moleküle sind hierbei NO, Prostacyclin (PGI₂) und eine Gruppe von Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors (EDHF).⁵⁰ Bei der endothelunabhängigen Relaxation hingegen binden Signalmoleküle direkt an die glatte Muskulatur und können dort die Vasorelaxation auslösen. Beispiele hierfür sind das physiologisch vorkommende brain natriuretic peptide (BNP),⁵¹ aber auch exogen zugeführte Moleküle wie Nitroglycerin⁵² oder Koffein.⁵³

1.1.4.1 Stickstoffmonoxid (NO)

Das hauptsächliche Signalmolekül für die Acetylcholin-induzierte, endothelabhängige Vasorelaxation ist Stickstoffmonoxid, welches primär im Gefäßendothel gebildet wird.^{54,55} Nach Bindung von Acetylcholin an den muskarinergen Acetylcholinrezeptor wird über IP₃ und den CaM-Komplex kalziumabhängig die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aktiviert.⁵⁶ Auch über Scherkräfte durch viskösen Fluss kann eNOS über die Proteinkinase B an Serin1179 phosphoryliert und aktiviert werden.⁵⁷ Bekannt sind auch alternative Signalwege verschiedener Vasorelaxantien wie Bradykinin⁵⁸ oder Histamin,⁵⁹ welche in der Ausschüttung von NO resultieren. eNOS oxidiert L-Arginin zu L-Citrullin und produziert dabei NO.⁶⁰ NO diffundiert aus der Endothelzelle an die glatten Muskelzellen der Tunica muscularis.⁶¹ Dort aktiviert es nach Diffusion durch die Zellmembran die

lösliche Guanylylcyclase (sGC), welche über den second messenger cGMP die in Abschnitt 1.1.3 beschriebene Relaxation der glatten Muskelzelle auslöst.⁶²

Neben der eNOS wurden die neuronale NO-Synthase (nNOS) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS) identifiziert.⁶³ Die iNOS wurde ursprünglich in Makrophagen isoliert, sie wird unter Einfluss von Cytokinen oder auch Lipopolysaccharid (LPS) induziert.⁶⁴ Alle Formen können beispielsweise in der Atherosklerose oder arterieller Hypertension im Gefäßendothel nachgewiesen werden.^{65,66}

1.1.4.2 Prostacyclin (PGI₂)

Prostacyclin ist ein Metabolit der Arachidonsäure, welche im Grundzustand in der Zellmembran der Endothelzelle vorliegt. Nach Bindung eines Agonisten wie Acetylcholin oder Bradykinin wird Arachidonsäure durch Phospholipase A₂ aus der Membran in Zelle freigesetzt⁶⁷ und dort unterschiedlich verstoffwechselt. Cyclooxygenase (COX) katalysiert die Reaktion von Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂, welches durch die Prostacyclinsynthase zu Prostacyclin konvertiert wird.^{50,68} Prostacyclin erreicht nach Freisetzung durch das Endothel die glatte Muskelzelle und bindet an den Prostacyclin-Rezeptor. Dieser bewirkt vor allem durch den second messenger cAMP die Relaxation der Muskelzelle.^{50,55}

1.1.4.3 Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors (EDHF)

Da das Endothel trotz Inhibition von NO und Prostacyclin in der Lage ist, eine Relaxation der glatten Muskelzellen auszulösen, wird außerdem eine Gruppe von Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors (EDHF) beschrieben.⁶⁹ Mittlerweile wurde ermittelt, dass ein großer Anteil des relaxierenden Potentials der EDHF durch Metabolite der Arachidonsäure erklärt werden kann, den Epoxyeicosatriensäuren (EETs).⁷⁰ Neben EETs wurden auch H₂O₂ und Lipoxygenase-Metabolite als Signalmoleküle der endothelabhängigen Relaxation nachgewiesen.⁷¹ Nach Bindung vasorelaxierender Agonisten an Rezeptoren des Endothels wird Arachidonsäure in die Zelle freigesetzt (siehe 1.1.4.2). Ein Teil der Arachidonsäure wird durch Cytochrom P450 zu EETs verstoffwechselt. 14,15-EET, 11,12-EET, 8,9-EET, und 5,6-EET wirken als Vasorelaxantien.⁷² EETs können über zwei mögliche Wege relaxierend wirken: zum einen wurde gezeigt, dass eine Diffusion an die Tunica muscularis erfolgen kann und EETs

direkt an den glatten Muskelzellen wirken.⁷³ Zum anderen können EETs small conductance (SK_{Ca}) und intermediate conductance (IK_{Ca}) Kalziumkanäle der Endothelzelle aktivieren und damit zu einer Hyperpolarisation des Endothels führen.⁷⁴ EETs werden durch die lösliche Epoxyd-Hydrolase (sEH) zu inaktiven Metaboliten hydrolysiert.⁷⁵

1.1.5 Pathogenese der endothelialen Dysfunktion und Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Neben der Funktion als Regulator der Vasokonstriktion und Vasorelaxation bildet das Endothel die Kontaktfläche zum Blut. Gesundes Endothel schüttet antithrombotische Faktoren aus, um Thrombusformation und Leukozytenadhäsion zu vermeiden.⁷⁶ Auch die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen wird durch das Endothel gesteuert.⁷⁷ Zu Beginn vieler Gefäßerkrankungen steht die endotheliale Dysfunktion. Charakteristisch ist, dass das Endothel in der endothelialen Dysfunktion die oben genannten Funktionen nicht mehr vollständig erfüllen kann.⁷⁸ Grundsätzlich ist die Entstehung der endothelialen Dysfunktion ein multifaktorieller Prozess: hier soll verkürzt auf die Pathogenese der Atherosklerose im Allgemeinen und im Kontext von Angiotensin II eingegangen werden.

Die endotheliale Dysfunktion drückt sich primär in einer verminderten NO-Produktion aus. NO vermittelt sämtliche oben genannten Endothelfunktionen. In der Entstehung der Atherosklerose wird durch einen Mangel an NO in einem ersten Schritt zirkulierendes low-density lipoprotein (LDL) Cholesterol oxidiert, welches sich in der subendothelialen Matrix ansammelt.⁷⁹ Ab diesem Punkt entsteht ein multifaktorielles Krankheitsbild, u.a. wandern Leukozyten in die Gefäßwand ein und phagozytieren oxidiertes LDL.⁸⁰ Durch verschiedene Chemokine, Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Transmitter, welche u.a. durch Makrophagen freigesetzt werden, kommt es zur Proliferation der glatten Muskelzellen sowie Zunahme der extrazellulären Matrix – eine arteriosklerotische Plaque bildet sich.⁷⁶ Es entsteht ein inflammatorisches Umfeld mit Einwanderung von Lymphozyten, welche die Plaque weiter destabilisieren können.⁸¹ Instabile Plaques können je nach Lokalisation zu Schlaganfällen, Herzinfarkten oder Thrombosen führen. Im Zuge der inflammatorischen Reaktion spielt der nuclear factor

'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) eine wichtige Rolle in der weiteren Genese der Atherosklerose. Nach der NF- κ B-Aktivierung erfolgt die Induktion z.B. von Leukozytenadhäsionsmolekülen, die durch eine epigenetische Einflussnahme von NF- κ B auf die Chromatin-Remodellierung ausgelöst wird.^{76,82}

Eine Ursache in der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion und später der Atherosklerose und anderen Gefäßerkrankungen ist die Fehlregulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Im physiologischen Zustand wirkt Angiotensin als potenter Vasopressor und reguliert Orthostase⁸³ sowie Organperfusion und wirkt positiv inotrop und chronotrop.⁸⁴ Kommt es zur Fehlregulation des RAAS mit überschießender Wirkung von Angiotensin II aufgrund von Alter, genetischen Faktoren oder Einflüssen des Lebensstils,⁸⁵ hat dies multiple negative Auswirkungen auf Endothel und Gefäßfunktion mit möglicher Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen: Angiotensin II bindet über den Angiotensin₁ (AT₁)-Rezeptor an Zellen in Gefäßen und sämtlichen Organen.⁸⁵ Stimulation mit Angiotensin II am Endothel führt zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), also verschiedenen Formen von Sauerstoffradikalen, welche zum einen die Bioverfügbarkeit von NO herabsetzen, zum anderen multiple negative Wechselwirkungen mit Proteinen, Lipiden etc. eingehen und eine Gefäßinflammation auslösen.^{86,87} ROS induzieren NF- κ B mit o.g. Bedeutung für die Entwicklung der Atherosklerose.⁸⁸ Angiotensin II selbst bedingt eine inflammatorische Reaktion am Gefäß unter Beteiligung von Tumor-Nekrosefaktor- α (TNF α) und inflammatorischen Cytokinen.^{85,89} Als Folgen der pathologischen Angiotensin II-Signalwege in sämtlichen Zellen des Herz-Kreislauf-Systems beschreiben Mehta et al.⁸⁵ erhöhte Level an ROS-Produkten sowie gesteigerte Inflammation und Plättchenaktivierung. Mittel- bis langfristig ergibt dies Veränderungen der Gefäßreaktivität sowie gesteigertes Zellwachstum, verändertes Zellmigrationsverhalten und schließlich auch fibrotischen Umbau. Diese Prozesse sind ursächlich in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen wie Bluthochdruck, Atherosklerose und Herzinsuffizienz, aber auch chronischer Nierenerkrankung, Insulinresistenz und Tumorprogression.⁸⁵

Inflammation kann allerdings nicht nur durch endogene Stimuli im Gefäß entstehen. In der Entstehung der Sepsis und des septischen Schocks, ausgelöst durch bakterielle und seltener durch virale Infektionen, bedingt eine endotheliale

Fehlsteuerung Hypotension, Organversagen und Ödembildung.⁹⁰ Das amerikanische National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) definierte die Sepsis als „endotheliales Dysfunktionssyndrom“ durch Infektionen innerhalb oder außerhalb des Gefäßsystems. Dies führt zu Schäden an der Mikrozirkulation und konsekutiv zu Organversagen.⁹¹ Das Endothel wird zum einen durch Bakterien oder Viren sowie ihren Pathogenitätsfaktoren geschädigt.⁹⁰ Zum anderen entwickeln Patienten mit schwerer Infektion häufig überschießende Immunreaktionen, sodass das Endothel auch körpereigenen proinflammatorischen Signalstoffen wie Cytokinen oder Metaboliten von COX2 und NOS ausgesetzt ist.⁹⁰ Durch Induktion von iNOS wird vermehrt NO gebildet, was als mutmaßlich entscheidender Faktor in der Entstehung des vasoplegen, katecholaminrefraktären septischen Schocks betrachtet wird.⁹² Durch überschießende Produktion von Interleukin 6 (IL-6) und TNF α und folgender Induktion von NF- κ B entwickelt sich eine systemische Inflammation und endotheliale Dysfunktion, welche sich in Hypotonie, Thrombozytopenie und disseminierter intravasaler Gerinnung manifestiert⁹⁰ und mit einer hohen Letalität verbunden ist.⁹³ Die Reaktion in den Gefäßen wird dabei bestimmt durch Induktion verschiedenster proinflammatorischer Proteine. Zukünftig werden hier Therapien auch auf epigenetischer, genomregulatorischer Ebene erwartet.⁹⁴

Im folgenden Abschnitt wird zunächst ein Überblick über epigenetische Mechanismen im Allgemeinen gegeben und aufbauend bekannte epigenetische Regulationsformen im Gefäßsystem erläutert.

1.2 Grundlegende epigenetische Mechanismen und epigenetische Regulation im Gefäßsystem

Das Feld der Epigenetik untersucht intrazelluläre Prozesse veränderter Genexpression, welche nicht durch Veränderungen des DNA-Codes verursacht werden.^{95,96} Diese Mechanismen machen es der Zelle z.B. möglich, sich schnell Veränderungen in der Umgebung oder des Nährstoffangebots anzupassen. Außerdem spielen epigenetische Vorgänge eine wichtige Rolle in der Embryogenese sowie der Zelldifferenzierung.⁹⁷ Epigenetische Modifikationen können dementsprechend rasch auftreten, jedoch auch stabil über Generationen vererbt

werden.⁹⁶ Folgend sollen verschiedene Mechanismen beschrieben werden, die diese Anpassungsreaktionen und Differenzierungsregulation möglich machen.

1.2.1 Mechanismen der epigenetischen Regulation

1.2.1.1 DNA- und RNA-Modifikationen

Ein basaler Mechanismus der DNA-Modifikation stellt die DNA-Methylierung dar. DNA-Methyltransferasen (DNMTs) übertragen dabei einen Methylrest von S-Adenosyl-L-Methionin auf das Cytosinnucleotid an Cytosin/Guanin (CpG)-Dinucleotiden der DNA, sodass ein 5-Methyl-Cytosin entsteht.⁹⁸ Dieser genetische Marker führt über verschiedene Mechanismen zur Genrepression: Transkriptionsfaktoren können in Bereichen mit methylierten Cytosinnucleotiden schlechter binden.⁹⁹ Außerdem können an entsprechend markierte Bereiche Bindeproteine (z.B. Methyl-CpG-binding-protein-2 (MeCP2)) rekrutiert werden, welche die Transkription erschweren.¹⁰⁰ Schließlich können dort auch Proteine rekrutiert werden, die ihrerseits auf die Chromatininformation der DNA einwirken.⁹⁸

Komplexe Regulationsmechanismen ergeben sich aus der Interaktion von nicht-kodierender RNA (ncRNA) und Elementen der Genregulation. NcRNA werden anhand ihrer Nukleotidlänge eingeteilt in kurze (<200 Basenpaare, short ncRNA) und lange ncRNA (>200 Basenpaare, lincRNA).¹⁰¹ Diese ncRNA nehmen auf vielfältige Weise Einfluss auf die Genexpression.⁹⁷ Unter anderem können large intergenic RNAs (lincRNA, Untergruppe der lincRNA) die Chromatin-Dichte an speziellen Gen-loci über die Rekrutierung von Chromatin-Modifikatoren gezielt verändern.¹⁰² Posttranslationale Histon-Modifikationen können durch ncRNAs gesteuert werden.¹⁰³ Short ncRNA kann u.a. als micro RNA (miRNA) oder synthetisch als small interfering RNA (siRNA) auftreten, welche über die gezielte Bindung an mRNA die Translation spezifischer Proteine verhindern bzw. vermindern können, z. B. durch die Einleitung des mRNAs Abbaus mittels des RNA-induced silencing complex (sog. posttranscriptional gene-silencing).^{104,105}

1.2.1.2 Histon-Modifikationen

Neben Modifikationen am DNA-Molekül selbst kann die Struktur der DNA auch durch Modifikationen an DNA-bindenden Proteinen beeinflusst werden. Die Tertiärstruktur der DNA wird durch Histone und weitere Proteine bestimmt, die die Konformation des Nukleotidstrangs beeinflussen und ihn in spezifische dichtere und weniger dichte Bereiche organisieren.¹⁰⁶ Lockere Bereiche sind für die RNA-Polymerase-Maschinerie gut zugänglich und entsprechende Loci werden häufiger transkribiert. Diese Bereiche werden als Euchromatin bezeichnet. Kompaktere DNA-Abschnitte werden seltener transkribiert und als Heterochromatin bezeichnet.¹⁰¹ Histone spielen in der Organisation dieser Strukturen eine fundamentale Rolle.

Ein Histon ist zusammengesetzt aus jeweils zwei Kopien der Histonproteine H2A, H2B, H3 and H4. Um das Histon wickeln sich jeweils 146 Basenpaare, sodass der DNA-Strang mit steigender Anzahl aneinandergereihter Histone eine dichtere Struktur erhält.⁹⁷ Die Dichte des Chromatinstrangs sowie die Interaktion von Histonen mit anderen Proteinen wird durch posttranslationale Modifikation der Histone reguliert. Bekannte Modifikationen sind dabei unter anderem ADP-Ribosylierung, Biotinylierung, Citrullinierung, Crotonylierung, O-GlcNAcylierung, Glutathionylierung, Succinylierung¹⁰⁷ sowie die gut untersuchten Modifikationen Acetylierung und Methylierung,¹⁰⁸ auf welche näher eingegangen werden soll.

Die Histon-Acetylierung geht mit einer Steigerung der Transkriptionsrate einher. Zur Acetylierung eines Histons wird der Acetylrest eines Acetyl-Coenzym A durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) auf Lysine des N-Terminus übertragen.¹⁰⁹ Der DNA-Doppelstrang lockert sich auf und wird für die RNA-Polymerase besser zugänglich. Gleichzeitig können an acetylierte Histone spezifische Transkriptionsfaktoren binden.¹¹⁰ Die Acetylierung ist reversibel – Histon Deacetylasen (HDACs) können Acetylreste entfernen und wirken repressiv auf die Genexpression.⁹⁷

Histon-Methylierungen können je nach Ausmaß und Ort entweder eine Transkriptionssteigerung oder -repression bedingen.⁹⁷ Sowohl Lysin- als auch Argininreste an verschiedenen Histon-Proteinen können methyliert werden. Besonders

differenziert ist dabei die Lysin-Methylierung: ein Lysin-Rest kann sowohl mono-, di- oder trimethyliert werden. Arginin-Reste treten in mono- oder dimethylierter Form auf. Bei der Histonmethylierung werden ein, zwei oder drei Methylgruppen von S-Adenosyl-Methionin durch Histon-Methyltransferasen (HMTs) auf die Aminogruppe des Lysins bzw. Arginins übertragen.¹¹¹ Die HMTs katalysieren diese Reaktion durch eine konservierte „Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax“ (SET)-Domäne.¹¹² Aktuell sind 49 HMTs bekannt, darunter auch das Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2).¹¹¹ Je nach Methylierungsmuster folgt eine Genaktivierung oder Repression: aktive Promotorregionen sind beispielsweise häufig gekennzeichnet durch verstärkte Trimethylierung des Histon-3-Lysin-4 (H3K4).^{97,113} Di- und Trimethylierung von H3K9 hingegen bedingen häufig eine Repression der Transkription.^{97,114} Mittlerweile wurden auch mehrere Enzyme identifiziert, welche Histone aktiv demethylieren können. Darunter findet sich die große Familie der Proteine mit einer Jumonji C (JmjC)-Domäne sowie einer ARID-Domäne (AT-rich interaction domain). Hierzu gehört auch die Histon-Demethylase JARID1B.^{97,115} Eine Demethylierung von H3K4 durch JARID1B führt im Allgemeinen zu einer Verdichtung des Chromatins und somit zur Genrepression (Abb. 3):¹¹⁶

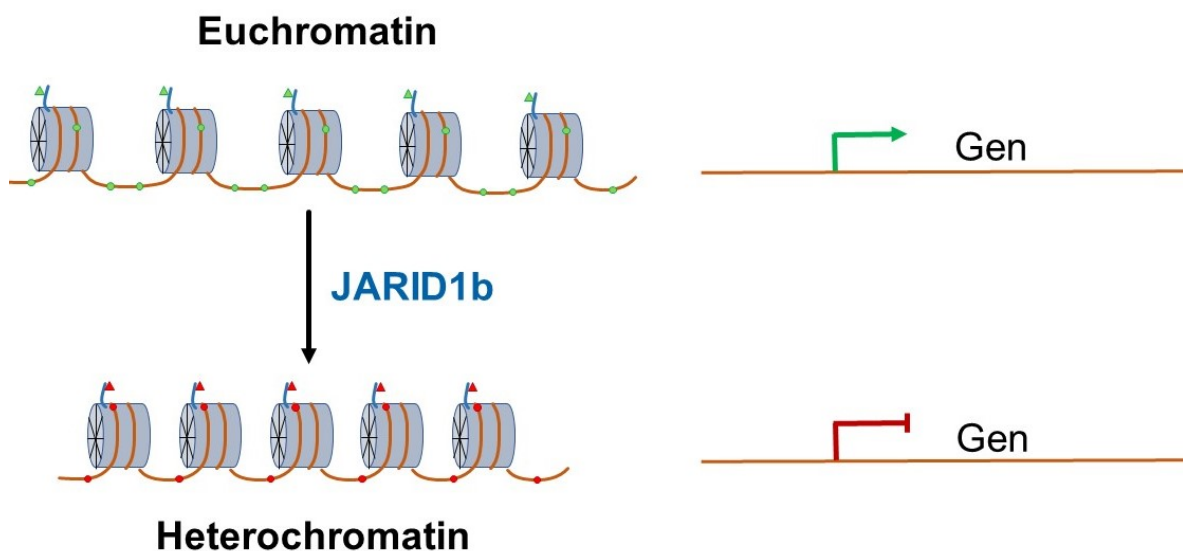


Abb. 3: Schema des Chromatin-Remodellings durch JARID1B: Durch Demethylierung des H3-Lysin-4 führt JARID1B zu Bildung von Heterochromatin und Repression des entsprechenden Genabschnitts auf der DNA

1.2.2 Rolle epigenetischer Modifikationen in Physiologie und Pathophysiologie des Gefäßsystems

Wie im Abschnitt 1.1.5. Pathogenese der endothelialen Dysfunktion und Herz-Kreislauf-Erkrankungen ausgeführt wurde, müssen sich Gefäßzellen jederzeit neuen Umgebungsbedingungen anpassen können, um die Regulation der Blutzirkulation und Endothelfunktionen zu gewährleisten. Dies geschieht über gesteigerte Expression oder Repression spezifischer Gene. Wie oben beschrieben, geschieht dies neben Enhancer- oder Repressor-Bindung an die Promotorregionen auch über DNA- oder Histonmodifikationen durch epigenetische Mechanismen. Das Feld der bekannten epigenetischen Modifikationen im Gefäßsystem ist mittlerweile stark gewachsen. Hier soll exemplarisch auf die Rollen der Histonmethylase EZH2 und der Histondemethylase JARID1B in Physiologie und Pathophysiologie des Gefäßsystems eingegangen werden, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Ein ausführliches Review zur Histonmethylierung im Gefäßsystem haben Wei et al.¹¹⁷ veröffentlicht.

Die Histonmethylase EZH2 reguliert die Angiogenese über Methylierung von H3K27 nach Bindung des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF). Ohne VEGF wird EZH2 durch die microRNA miR-101 im Sinne eines post-transkriptionalen Silencing reprimiert. Nach Bindung von VEGF fällt die Repression durch miR-101 weg, in vitro kann eine gesteigerte Migration, Invasion und Neoangiogenese beobachtet werden.¹¹⁸ Es wurde außerdem gezeigt, dass VEGF-Bindung die Aktivität der Promotorregion des *EZH2*-Gens steigern kann.¹¹⁹ Durch Repression der Matrix-Metalloprotease 9 (MMP9) stellt EZH2 die vaskuläre Integrität sicher.¹²⁰ Zusammengefasst kommt der EZH2-Methylase eine zentrale Rolle in der Regulation der Neoangiogenese zu.

Pathophysiologisch wurde gezeigt, dass EZH2 an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt ist: Zum einen reprimiert EZH2 den *ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1)* über einen Signalweg, welcher in einer DNA-Methylierung am *ABCA1* Promotor durch DNA Methyltransferase 1 (Dnmt1) mündet. *ABCA1* ist für die Cholesteroll-Homöostase in Gefäßzellen verantwortlich. Repression von *ABCA1* führt zu vermehrter Schaumzellbildung und Atherosklerose in ApoE^{-/-}-Mäusen.¹²¹ Unter dem Einfluss erhöhter LDL-Werte führt ein Signalweg über EZH2 zu einer Repression von *Krüppel-like Factor 2 (KLF2)*,

welches eine Suppression von Thrombomodulin und eNOS mit sich bringt, sowie eine Induktion von *Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1)*.¹²² Die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion wird so begünstigt. Die Beteiligung von EZH2 in der Entstehung von Gefäßerkrankungen ist mittlerweile ausführlicher untersucht worden: So begünstigt EZH2 die Neointimaformation nach Angioplastie¹²³, wirkt protektiv dem Entstehen eines Aortenaneurysmas entgegen¹²⁴ und scheint an der Pathogenese des pulmonalen Hypertonus beteiligt zu sein.^{117,125}

Die Familie der JARID1-Histondemethylasen und ihr Einfluss auf das Gefäßsystem ist weniger gut verstanden. Knockout des *Jarid1b*-Gens im Mäuseembryo ist letal, beobachtet werden vor allem neurale Defekte, Skelettdeformitäten und respiratorische Insuffizienz.¹²⁶ Im adulten Endothel reprimiert *JARID1B* den anti-angiogenen Transkriptionsfaktor Homöobox-protein *HOXA5* und behält hiermit die angiogene Kapazität der Endothelzellen bei.¹²⁷ In der Entstehung des chronischen Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonus bindet JARID1B an den Promotor von *NF-κB* und bedingt dessen Induktion. Durch erhöhte Konzentrationen an NF-κB kommt es zu vermehrter Proliferation und Migration pulmonal-arterieller glatter Muskelzellen.¹²⁸ JARID1B reprimiert darüber hinaus die lncRNA MANTIS, welche zum einen pro-angiogen wirken kann¹²⁹, zum anderen wirkt MANTIS gefäßprotektiv durch Vermittlung der positiven Effekte von Laminarfluss und Statintherapie auf das Endothel.¹³⁰

1.3 Ziel und Fragestellung

Epigenetische Modifikationen spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung des kardiovaskulären Systems sowie in der Aufrechterhaltung der zellulären Identität der Epithel- und glatten Gefäßmuskelzellen. Die Proteine EZH2 und JARID1B sind Modulatoren der Histonmethylierung und sind so an der epigenetischen Regulation von Proteinexpression und -repression beteiligt. Über die Rolle der beiden Proteine im Gefäßsystem sowie in der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen ist bisher wenig bekannt.

Die Histon-Lysin N-Methyltransferase EZH2 scheint ein wichtiger Regulator der Endothelfunktion zu sein, beschrieben ist die Rolle von EZH2 in der Ausbildung von Zell-Zell-Adhäsion und -Kommunikation.¹³¹ Zudem kommt EZH2 eine Rolle in der Neoangiogenese¹¹⁹ sowie der fetalen Herzentwicklung^{132,133} zu. Unter hypoxischen Bedingungen steigert eine Repression von EZH2 die NO-Verfügbarkeit durch Expression von eNOS.¹³⁴ Publiziert ist außerdem eine Beteiligung in der Entwicklung atherosklerotischer Plaques.¹²¹ Es ergibt sich die These, dass EZH2 relevanten Einfluss auf Gefäßfunktion und Gefäßtonusregulation nimmt, möglicherweise unter Repression von eNOS. In der vorliegenden Arbeit soll die These untersucht werden, dass sich die Inhibition von EZH2 speziell unter inflammatorischen Bedingungen protektiv auf die Gefäßfunktion auswirkt. Hierbei wird angenommen, dass eine Inhibition von EZH2 die Bioverfügbarkeit von NO steigert.

Die Histon-Demethylase JARID1B ist involviert in der Neoangiogenese¹²⁷ sowie in der Entwicklung des pulmonalen Hypertonus¹²⁸. JARID1B reprimiert außerdem die gefäßprotektive lncRNA RNA MANTIS.¹³⁰ Es wird die These untersucht, dass ein Knockout oder die Inhibition von JARID1B protektiv auf die Gefäßfunktion wirkt. Es sollen hierbei Mechanismen identifiziert werden, wie JARID1B möglichen Einfluss auf die Vasoreaktivität nimmt. Da von der Histondemethylase LSD1 bekannt ist, dass diese Einfluss auf die NO-Signalregulation nimmt¹³⁵, soll die Annahme untersucht werden, dass JARID1B die NO-Bioverfügbarkeit im Endothel senkt.

Abschließend soll die Rolle der verwendeten Wirkstoffe als mögliche innovative Therapeutika dargestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für den Hauptteil der Versuche zur Gefäßreaktivität wurden Präparate aus Labormäusen der Art *Mus musculus* verwendet. Für Versuche ohne Einschluss genetisch modifizierter Mäuse wurden Präparate aus männlichen Mäusen des Stamms C57/Bl6 im Alter von 8-12 Wochen gewonnen. Diese wurden nach Präparation mit Inhibitoren für EZH2 oder JARID1B inkubiert (siehe Abschnitt 2.3).

Die Züchtung spezieller Knockout-Tiere liefert Möglichkeiten, das *Jarid1b*-Gen direkt global oder in spezifischen Geweben zu deletieren, ohne einen Inhibitor zu verwenden. Für die Zucht der globalen tamoxifen-induzierbaren *Jarid1b*-Knockout-Mäuse wurden C57Bl6J-*Jarid1b flox/flox* Mäuse mit Mäusen des cre-Driver Stamms *GT-rosa-cre* gepaart.^{126,136} Für die Zucht des endothelspezifischen Knockouts erfolgte die Paarung mit einem *cdh5-CreERT2* Stamm¹³⁷, für den LysM⁺-Makrophagenspezifischen Knockout Paarung mit *CMV-CreERT2*-Mäusen.¹³⁸ Die Induktion des konditionellen Knockouts erfolgte über die Tamoxifen-vermittelte Induktion der Cre-Rekombinase. Tamoxifen wurde dabei an 10 aufeinander folgenden Tagen oral durch Futteraufnahme (LasCRdiet CreActive TAM400 (400 mg/kg), LASvendi, Soest, Deutschland) zugeführt (1mg/Maus/Tag). Der Versuch begann frühestens 14 Tage nach der letzten Tamoxifenapplikation nach einer „wash-out“ Phase. In allen Experimenten erhielten sowohl Cre-positive als auch Cre-negative Kontrolltiere Tamoxifenfutter, um direkte Effekte des Hormonrezeptorblockers auszuschließen. Die Zucht der Cre-Linien erfolgte durch Paarung von Cre-positiven und Cre-negative Tieren, sodass Cre-positive und Cre-negative Geschwister eines Wurfes verglichen werden konnten.

Die Mäuse wurden in pathogenfreiem Umfeld mit einem 12h-Tag/Nacht Zyklus gehalten und hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und Futter.^{127,139} Der Tierversuch wurde durch das Regierungspräsidium Darmstadt unter der Genehmigungsnummer FU1116 genehmigt.

2.2 Gewinnung der Gefäßpräparate

Die Versuchstiere wurden durch Inhalation mit Isofluran in einer abgeschlossenen Kammer terminal narkotisiert. Es erfolgte das Eröffnen des Abdomens durch einen Transversalschnitt unterhalb des Processus xyphoideus entlang des Rippenbogens zu beiden Seiten. Anschließend wurden die Abdominalorgane freigelegt. Dies erfolgte mittels Durchtrennens der Bauchdecke entlang der Linea alba bis zur Symphysis pubica. Die kaudale Aorta abdominalis wurde ebenfalls durchtrennt. Das Diaphragma wurde beidseitig eröffnet und von ventral nach lateral vom Rippenbogen abgelöst. Es erfolgte die longitudinale Eröffnung des Brustkorbs mittels Durchtrennung des Sternums. Die intrathorakalen Organe wurden durch beidseitiges Entfernen der anterioren Thoraxwand dargestellt, indem die Rippen lateral von kaudal bis zur oberen Thoraxapertur durchtrennt wurden. Die beiden Claviculae wurden durchtrennt. Es schloss sich ein Perfusionsschritt an. Dazu wurde der linke Ventrikel des Herzens mit einer Kanüle punktiert und eisgekühlter Hanks-Puffer mit einem Druck von ca. 50cmH₂O in den Ventrikel perfundiert. Nach ca. 1 min wurde die vollständige Perfusion des arteriellen Systems bis zu Gefäßabgängen ersten Grades angenommen, sodass mit der Präparation fortgefahren wurde. Dazu wurden das Herz und die Lungen, die Nieren sowie die Milz entfernt. Die A. mesenterica superior (AMS) wurde dargestellt und vorsichtig ohne Kontakt zum eigentlichen Gefäß mittels Federscherepräparation unter dem Auflichtmikroskop herauspräpariert und in eisgekühltem Hanks-Puffer gelagert. Die Aorta wurde vorsichtig ab dem Abgang der beiden Ae. iliaca communes durch Scherenpräparation entlang der Wirbelsäule nach cranial bis unter den Aortenbogen abgesetzt und ebenfalls in eisgekühltem Puffer gelagert (Abb. 4 A). Nach Entnahme der Gefäße erfolgte die Feinpräparation unter dem Binokular-Auflichtmikroskop (Abb. 4 B). Die im kalten Hanks-Puffer schwimmenden Gefäße wurden dazu äußerst proximal und distal mit kleinen Pins vor dem Wegschwimmen gesichert und von umgebendem Bindegewebe gesäubert. Die Intima wurde dabei nicht berührt, ebenso erfolgte kein Druck oder Zug auf das Gefäß, um die Integrität der Intima und der Muscularis nicht zu beeinträchtigen. Dann wurden mithilfe eines Skal-

pells nach Unterlegen eines Millimeterpapiers ca. 1mm breite Ringe aus den Gefäßen geschnitten (Abb. 4 C). Diese wurden anschließend entweder direkt dem Organbad zugeführt oder über Nacht inkubiert (siehe 2.3).

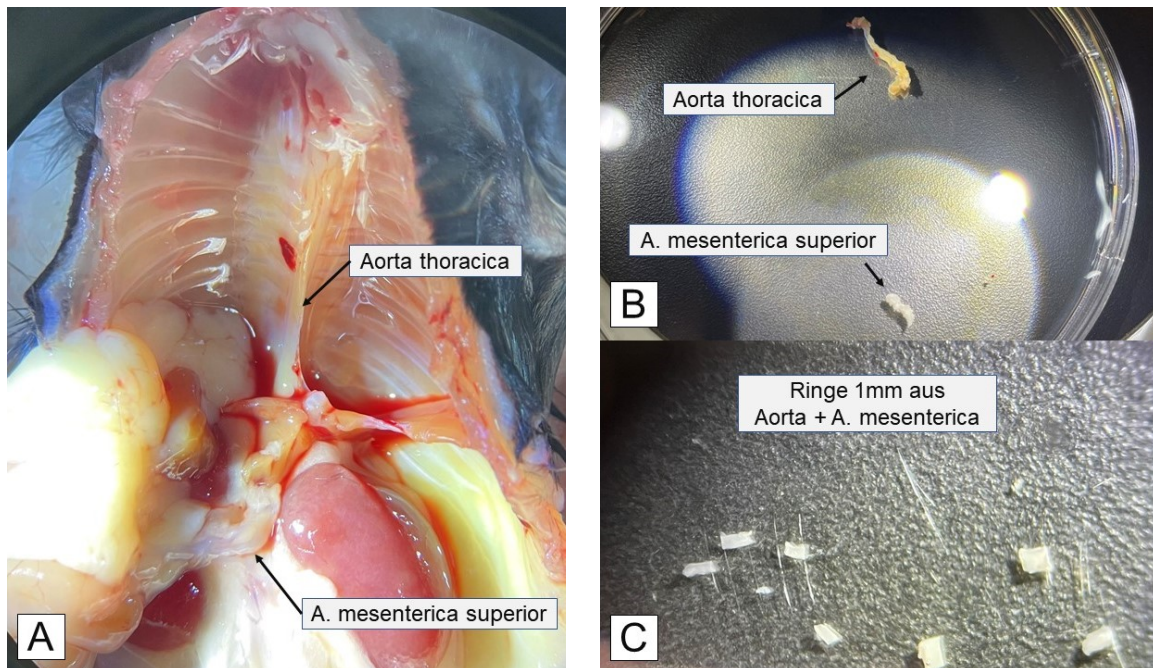


Abb. 4: Präparationsschritte der Mausgefäße

A: In-situ Ansicht der Arteria thoracica und Arteria mesenterica superior nach Eröffnung von Thorax und Abdomen und Entfernen von Lungen und Herz. **B:** isolierte Aorta und Mesenterica unter dem Auflichtmikroskop in Hanks-Puffer **C:** 1mm-Gefäßringe nach Säuberung von adhärentem Fett und Adventitia der Gefäße

2.3 Organ-Kultur

Für die Inhibition von EZH2 steht kein genetisch verändertes Mausmodell zur Verfügung. Aus diesem Grund wurden in den **Versuchen 3.1.1.1 – 3.1.2.4** Präparate aus gewöhnlichen C57/Bl6 Mäusen mit dem „small molecule“ Inhibitor GSK343 inkubiert, um eine Inhibition von EZH2 zu erreichen. In **Versuch 3.2.3** zum *Jarid1b*-Knockout sollten die Ergebnisse, welche zunächst mit den Knockout-Tieren erzielt wurden, durch Behandlung von Wildtyp-Präparaten mit dem JARID1B-Inhibitor 2-(4-(4-methylphenyl)-1,2-Benzisothiazol-3(2H)-on (PBIT) reproduziert werden.

In den Versuchen wurde unter sterilen Bedingungen eine Lösung von Endothelial Basal Kulturmedium (EBM) (#PB-M1166b, PeloBiotech, Planegg/Martinsried,

Deutschland) mit 0,1% Bovine Serum Albumin (BSA) (#PB-AK8917-0100, Pello-Biotech) hergestellt. Die Inhibitoren wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) (#85190, Thermo Fischer, Waltham, MA, USA) gelöst. Die Konzentration des EZH2-Inhibitors GSK343 (#SML0766, Sigma-Aldrich) und des JARID1B Inhibitors PBIT (#SML1058, Sigma-Aldrich) betrug 1µmol/L, diese wurden dem Medium in entsprechender Konzentration hinzugesetzt. Mögliche toxische Wirkungen der Inhibitoren wurden zuvor durch „concentration-course“ Experimente ausgeschlossen. Die Konzentration von DMSO im Medium überschreitet nicht 0,1%. Es wurde jeweils eine Kontrollgruppe mit dem Lösungsmittel ohne Inhibitor angesetzt. Sodann erfolgte der Transfer der Gefäßringe aus eisgekühltem Hanks-Puffer in das Kulturmedium. Die Inkubation erfolgte in einem konventionellen Inkubator bei 37°C bei 5% CO₂ für 14h über Nacht.

Da die Annahme bestand, dass eine Inhibition von EZH2 insbesondere unter inflammatorischen Bedingungen protektiv auf die Gefäßfunktion wirkt, wurde in den **Versuchen 3.1.2.1 – 3.1.2.4** in der Organ-Kultur zusätzlich mit murinem Lipopolysaccharid (mLPS), 1ng/ml (#L3129, Sigma-Aldrich), gelöst in Aqua dest., inkubiert.

2.4 Organbadversuch

2.4.1 Aufbau und Durchführung

Die Organbadversuche wurden in einer Doppelkammer aus Glas durchgeführt (vgl. Abb. 5+6). Durch die Kammer floss kontinuierlich 37°C warmes Wasser, welches im Wasserbad unter Thermostatkontrolle erwärmt wurde. An der Unterseite der Kammer befindet sich ein Gasauslass, durch welchen Carbogengas (95% O₂, 5% CO₂) feinperlig in den Puffer austrat. Verwendet wurde ein Krebs-Henseleit Puffer (K.-H.-Puffer) in folgender Zusammensetzung: NaCl 123mmol/L, KCl 4mmol/L, CaCl₂ 1,6mmol/L, MgCl₂ 0,98mmol/L, NaHCO₃ 11,9mmol/L, NaH₂PO₄ 0,36mmol/L, Glukose 10mmol/L, Ca-EDTA 0,05mmol/L. Notwendig ist die Erwärmung auf 37°C und die konstante Begasung mit Carbogen, um ein Ausfallen der Salze zu vermeiden. Der Puffer wurde in die Organkammern gefüllt und weiterhin temperiert und begast. So wurde ein physiologischer CO₂/Bikarbonat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 erreicht. Die Kraftmessvorrichtung bestand

aus einem stationären Haken, welcher über eine Stange mit dem Kraftaufnehmer-Stativ verbunden war und als untere Befestigung für den Gefäßring diente. Der Kraftaufnehmer (Typ F 30, Hugo Sachs Elektronik | Harvard Apparatus, March, Deutschland) wurde oberhalb der Organkammer positioniert. An ihn wurde ein leichter Drahhaken gehängt, welcher in die Organkammer reichte. Zwischen dem stationären Haken und dem Drahhaken des Kraftaufnehmers wurde der Gefäßring zwischen zwei triangelförmigen Stahlklammern fixiert. Die präparierten Gefäßringe wurden dazu unter dem Binokular-Auflichtmikroskop vorsichtig auf zwei Triangeln aus Edelstahl aufgehängt und an die Haken montiert. Dies geschah erneut ohne Verletzung der Intima und ohne Zug- oder Druckkräfte auf das Gefäß. Isometrische Tonusänderungen der Ringspannung wurden vom Kraftaufnehmer in g aufgenommen. Die gemessene Kraftänderung wurde nach Verstärkung in einem Zwei-Kanal-Brückenverstärker an einen x/y-Mehrkanalschreiber (Typ Rikadenki R40 und R80) aufgezeichnet. Vor jedem Versuchsdurchlauf wurden die Messgeräte erneut geeicht.

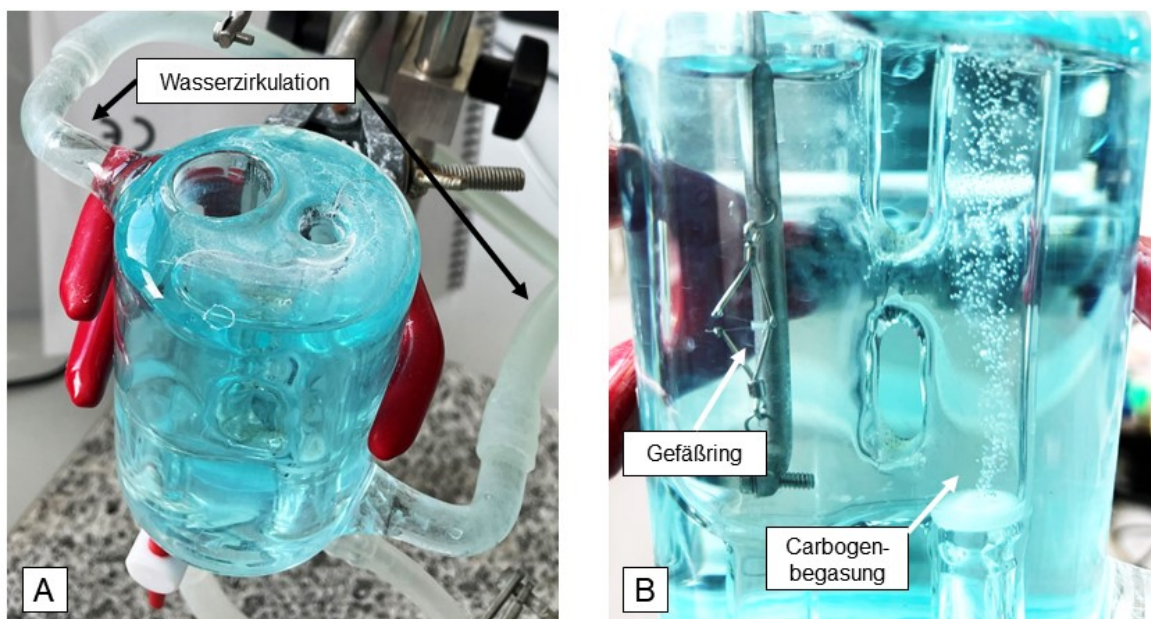


Abb. 5: Organbadkammer

A: Übersicht über Versuchsanordnung B: Gefäßring während der Versuche

Der präparierte Gefäßring wird in zwei Metallfedern eingespannt und an einem Kraftmesser befestigt. Die kontinuierliche Carbogen-Begasung erzeugt einen physiologischen CO₂/Bikarbonat-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4.

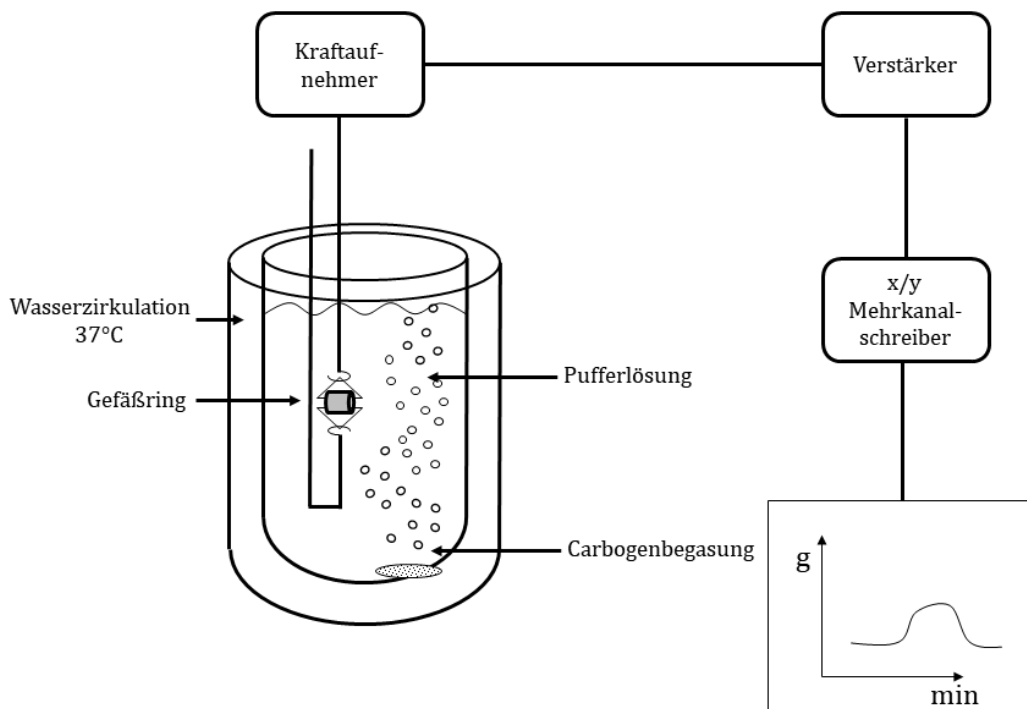


Abb. 6: Schematischer Aufbau des Organbads

Abbildung nach Matziaris¹⁴⁰

2.4.2 Versuchsprotokoll der Vasoreaktivitätsstudie im Organbad

Die Aufzeichnung der Kraftänderungen an den Kraftmessern erfolgte mit der Software LabChart 7.0 (AdInstruments, Oxford, Großbritannien). Vor Versuchsbeginn wurde die Versuchsanordnung geeicht durch Anhängen von 1g-Gewichten an die Kraftaufnehmer. Die Eichung erfolgte gemäß $1\text{g} \approx 9,81\text{N}$. Im Anschluss wurden die Gefäßpräparate in die Organkammer eingebracht, zunächst ohne jegliche Spannung. Dann wurden die Ringe passiv vorgedehnt, im Verlauf von 20 min in fünf Schritten von je 0,2g alle 5 min (vgl. Abb. 7 „**A**“). Die Vorspannung kompensiert Effekte von elastischen Elementen in den Gefäßwänden, sodass im Anschluss möglichst nur noch isometrische Spannungsänderungen beobachtet werden konnten. Von diesem Spannungsniveau aus wurden die anschließenden Messungen durchgeführt, sodass das Niveau als neuer Nullwert festgelegt wurde. Es folgte nun ein Austausch des Kaliumchlorid-armen K.-H.-Puffers (KCl 4mmol/L) durch KCl-reichen K.-H.-Puffer (KCl 80mmol/L) in der Organkammer. Dies führte zu einer starken Depolarisation der Gefäßmuskelzellen und folglich starker Kontraktion der Gefäßringe (vgl. Abb. 7 „**B**“). Es wurde bis zur Ausbildung

eines stabilen Plateaus abgewartet. Dann wurde der kaliumreiche K.-H.-Puffer wieder gegen kaliumarmen K.-H.-Puffer ausgetauscht, sodass es zu einer Repolarisation und Relaxation der Ringe kam. Nach Erreichen eines stabilen Relaxations-Niveaus wurde ein erneuter Schritt von KCl-bedingter Kontraktion und anschließender Relaxation in KCl-armen Puffer angeschlossen (vgl. Abb. 7 „C“). Die hierbei erreichte maximale isometrische Kontraktion der Ringe wurde als maximale Kontraktion der Gefäße $K_{\max}^{K^+}$ definiert. Wurde hierbei eine nicht ausreichende Kontraktionskraft ($<0,4g$) des Ringes gemessen, wurde der Ring für den weiteren Versuch ausgeschlossen unter Annahme einer beschädigten Integrität der kontraktilen Elemente.

Es schloss sich dann die Ermittlung einer Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) der Phenylephrin-vermittelten Kontraktion der Gefäßringe an. Dazu wurde Phenylephrin (Phe) (#P6126, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in Wasser gelöst und in kumulativ steigenden Dosen ($0,1nM-1\mu M$) der Organkammer zugeetzt (vgl. Abb. 7 „D“). Eine Erhöhung der Dosis geschah jeweils nach Erreichen eines stabilen Kontraktionsniveaus. Die Dosissteigerung erfolgte bis zum Erreichen eines Kontraktionsniveaus von $80\% K_{\max}^{K^+}$.

Nach Erreichen dieses Plateaus wurde die DWK der Acetylcholin-vermittelten Relaxation aufgezeichnet. Acetylcholin (ACh) (#A6625, Sigma-Aldrich) wurde in Wasser gelöst und erneut in kumulativ ansteigenden Dosen ($0,1nM-1\mu M$) in den K.-H.-Puffer gegeben (vgl. Abb. 7 „E“). Analog zur Kontraktion erfolgte die Dosissteigerung jeweils nach Ausbildung eines stabilen Niveaus.

Zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit von NO in den **Versuchen 3.1.1.2 + 3.2.6.1** schloss sich noch die Ermittlung der Kontraktionsfähigkeit nach unspezifischer Inhibition der NO-Synthasen mittels L-N^ω-Nitroarginine Methylester (L-NAME) (#N5751, Sigma-Aldrich) an. In den Versuchen **3.1.2.4 + 3.2.6.2** wurde die spezifische Inhibition der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) mittels N-(Iminoethyl)-L-lysine (L-NIL) (#I8021, Sigma-Aldrich) untersucht. Nach einem Waschschrift mit kaliumarmen K.-H.-Puffer wurde zur Vorkontraktion der Ringe Phenylephrin hinzugegeben, bis ein stabiles Kontraktionsniveau von ca. $10\% K_{\max}^{K^+}$ erreicht wurde. Die Substanzen L-NAME oder L-NIL wurden in Aqua dest. gelöst und in einer Konzentration von $100\mu M$ dem Organbad hinzugegeben. Die

darauffolgende maximale Kontraktion der Gefäße nach Erreichen eines stabilen Plateaus nach max. 40min wurde aufgezeichnet und in „% der Vorkontraktion“ notiert. (vgl. Abb. 7 „F“).

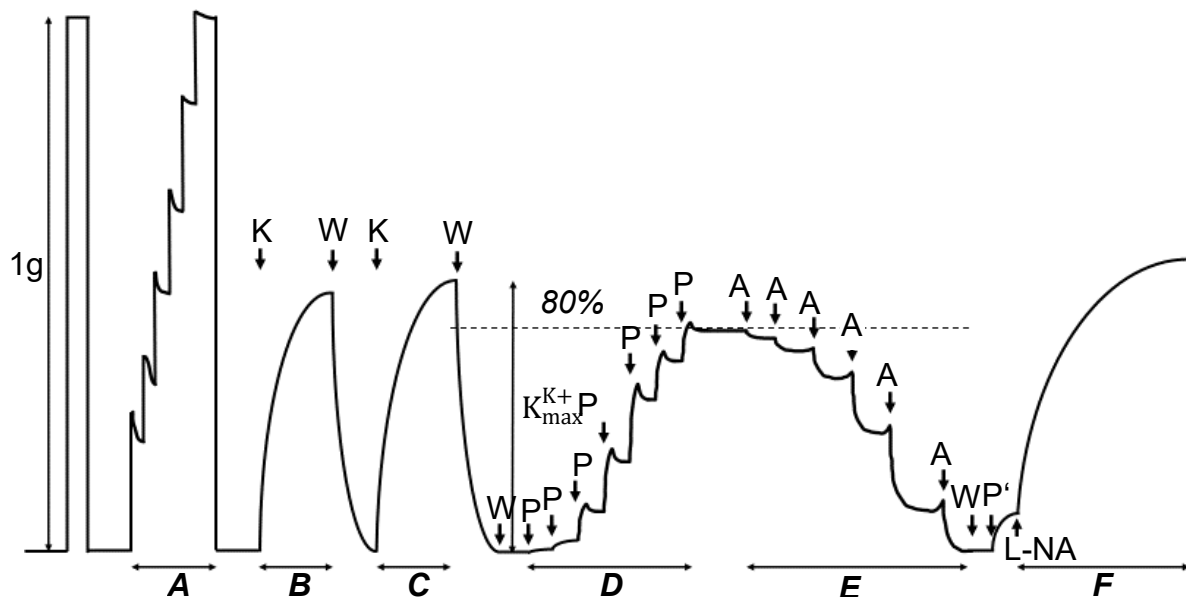


Abb. 7: Schematischer Versuchsablauf Vasoreaktivitätsstudie im Organbad

A: Passive Vorkontraktion; **B:** erste Kontraktion durch KCl-reichem K.-H.-Puffer; **C:** zweite Kontraktion durch KCl-reichem K.-H.-Puffer, **D:** Dosis-Wirkungs-Kurve Phenylephrin; **E:** Dosis-Wirkungs-Kurve Acetylcholin; **F:** ggf. Inkubation mit L-NAME/L-NIL

K: Applikation von KCl-reichem K.-H.-Puffer; W: Waschschr. durch KCl-armen K.-H.-Puffer; P: Hinzugabe Phenylephrin; Ac: Hinzugabe Acetylcholin; ggf. P': Vorkontraktion durch Phenylephrin (auf 20% $K_{max}^{K^+}$); ggf. L-NA: Applikation von L-NAME od. L-NIL

Zum Ausschluss toxischer Effekte des verwendeten Wirkstoffs GSK343 oder einer unspezifischen Wirkung auf den kontraktile Apparat wurden in **Versuch 3.1.2.2** GSK343-inkubierte Präparate im Organbad mit steigenden Konzentrationen von extrazellulärem KCl inkubiert (5mmol/L-40mmol/L, 5mmol/L-Schritte) und hierdurch durch Depolarisation zur Kontraktion gebracht.

In **Versuch 3.1.2.3** wurden zur Analyse einer Thromboxan-vermittelten Gefäßkontraktion GSK343-inkubierte Gefäßpräparate mit kumulativ steigenden Dosen des Thromboxan-A₂ Analogons U46619 (1nM-0,5µM) (#Cay16450-1, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) versetzt und die anschließende Kontraktion gemessen.

In **Versuch 3.2.5** wurde vor dem Organbadversuch das Endothel der Gefäßpräparate abgelöst, um endothelunabhängige Effekte auf den Phänotyp der *Jarid1b*-KO Maus zu testen. Dazu wurden die Aorten-Gefäßpräparate in einer wässrigen Lösung aus Chaps-Puffersalz (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat) (#226947, Sigma-Aldrich) 5mg/ml und Glukose 50mg/ml für 30 Sekunden sanft geschwenkt. Anschließend wurden sie im Organbad durch Applikation von Phenylephrin auf eine Spannung von ca. 80% $K_{\max}^{K^+}$ gebracht. Zum Auslösen der Relaxation wurde anschließend der NO-Donor DETA NONOate (#ALX-430-014, Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland) verwendet, der in kumulativ ansteigenden Dosen (0,1nM-1 μ M) dem Organbad hinzugesetzt wurde.

In **Versuch 3.2.7** wurde zur Testung der Arachidonsäure-vermittelten Relaxation die AMS-Präparate der *Jarid1b*-WT und -KO-Mäuse durch Inkubation mit dem Thromboxan-A₂ Analogon U46619 auf ein Kontraktionslevel von ca. 80% $K_{\max}^{K^+}$ gebracht. Anschließend wurde reine Arachidonsäure (#Cay90010-100, Cayman Chemical), welche jederzeit auf Eis und unter Stickstoff-Schutzatmosphäre gelagert worden war, in einer Konzentration von 1 μ M ins Organbad eingebracht und das maximale Level der anschließenden Relaxation aufgezeichnet.

2.5 Zellkultur

Zur Messung der *Jarid1b*-Expression mittels PCR und Western-Blot wurden für **Versuch 3.2.1** humane Endothelzellen der Nabelschnur (HUVECs) bezogen von Lonza (#CC-2519, Walkersville, MD, USA) und PELOBiotech (#PB-CH-190-8013, Planegg, Deutschland). Die Kultur erfolgte in Fibronectin-beschichteten Platten (#356009, Corning Incorporated, Tewksbury, MA, USA) in „endothelial growth medium“ (EGM). Dieses setzte sich zusammen aus endothelial basal medium (EBM) (#PB-M1166b, PelobBiotech) zusammen mit humanem rekombinantem „epidermal growth factor“ (EGF) (#C029-A, PELOBiotech), EndoCGS-Heparin (#PB-1166, PELOBiotech), 8% fetalem Kälberserum (FCS) (#S0113, Biochrom, Berlin, Deutschland), Penicillin (50 U/ml) + Streptomycin (50 μ g/ml) (#15070063, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Die Inkubation erfolgte in befeuchteter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C. Für die Analysen wurden drei verschiedene Chargen HUVECs aus jeweils dritter Passage verwendet.

2.6 Protein-Isolation und Western Blot

Eine Western-Blot Analyse erfolgte im **Versuch 3.2.1** zum einen zur Messung der Expression von JARID1B in HUVECs, sowie im **Versuch 3.2.6.3** zur Messung des Phosphorylierungsgrades der eNOS in Gefäßpräparaten der *Jarid1b*-Knockout Maus.

Zellkulturplatten in **Versuch 3.2.1** mit HUVECs wurden mittels 150µL Lysepuffer Triton X-100 lysiert (20 mmol/L TRIS/Cl pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L NaPPi, 20 mmol/L NaF, 1% Triton, 2 mmol/L Orthovanadat (OV), 10 nM Okadaäure, Protein-Inhibitor Mix (PIM), 40 µg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid).

Im **Versuch 3.2.6.3** wurden Gefäßpräparate der AMS von WT- und *Jarid1b*-KO-Mäusen ebenfalls in 150µl Lysepuffer inkubiert, danach wurden die Eppendorf Tubes in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Es erfolgte die Homogenisierung im vorgekühlten TissueLyser LT (Quiagen, Hilden, Deutschland) mit 3mm Metallkugeln.

Das Zellysate wurde jeweils zentrifugiert (10min, 16000g) und der Überstand weiterverwendet. Es erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels eines Bradford-Assays. Hierzu erfolgte die Zugabe von Bradford-Reagenz (Roti-Quant 1:5 Verdünnung, # K015.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zu einer 1:100 Verdünnung des Zellüberstands im Verhältnis 2,5:1. Nach Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur in der 96-Well-Platte wurde die OD₅₉₅ im Photometer gemessen und die Überstände je nach gemessener Konzentration mit unterschiedlichen Volumina SDS-Probenpuffer (Laemmli-Puffer, #38733, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verdünnt, um äquivalente Proteinkonzentration zu erhalten. Die Lösung wurde dann in einem Heizblock für 5min bei 100°C gekocht.

Es erfolgte die Gelelektrophorese auf einem selbstgegossenen 12% Polyacrylamid-Gel. Die Gele wurden in der Mini-PROTEAN Tetra Gelelektrophoresekammer (Biorad Laboratories, München, Deutschland) eingespannt und die Kammer mit Tris-Glycin-Laufpuffer (TRIS 25mmol/L, Glycin 192mmol/L und SDS 0,1%) gefüllt. Die Proben wurden in die Geltaschen pipettiert, ebenso wie ein Größenmarker.

Das Blotting erfolgte auf Whatman-Papier durch Elektrophorese im Transfer-Puffer (TRIS 25mmol/L, Glycin 192mmol/L, Methanol 20%) mit 250mA pro Apparatur für 60min. Die Membran wurde dann dreimal in TBS-Puffer gewaschen. Es erfolgte der Blockierungsschritt mittels 3 % BSA in TBS-Puffer für 60 Min. Anschließend wurden nacheinander die Primärantikörper aufgetragen. Verwendet wurden folgende Antikörper: Anti-JARID1B Antikörper (#HPA027179, Sigma Aldrich), Anti-eNOS-Antikörper (#610296, BD Biosciences, San Jose, CA), Anti-Phospho-eNOS (Ser1177)-Antikörper (#9571, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), Anti- β -Actin-Antikörper (#A1978, Sigma Aldrich). Diese wurden jeweils verdünnt in TBS-Puffer mit 3% BSA und 3% Tween20-Detergenz (#P9416, Sigma-Aldrich) und für 12h bei 4°C unter kontinuierlichem Schwenken auf der Membran inkubiert. Es erfolgte nach jedem Antikörper mehrere Waschschrte: 3xTBS-Puffer + 3% Tween20 sowie 1x TBA-Puffer+3% BSA. Anschließend wurden die Sekundärantikörper IRDye Mouse IgG (680RD) (#926-68072), Rabbit IgG (800CW) (#926-32213, Licor, Bad Homburg, Deutschland) in 1:15000 Verdünnung für 1h unter Schwenken inkubiert und anschließend erneut 3x mit TBS-Puffer+ 3% BSA + 3% Tween20 und abschließend 1x mit TBS-Puffer +3% BSA gewaschen. Die Sekundärantikörper sind konjugiert mit einem Infrarot-Farbstoff, welcher auf einem Infrarot-basierten Laser-Scanner (Odyssey Classic, Licor, Bad Homburg, Deutschland) detektiert wurde. Es erfolgte die statistische Auswertung mittels Photometrie.

2.7 Quantitative RT-qPCR

Zur Messung der Histondemethylasen mRNA-Expression in HUVEC in **Versuch 3.2.1** wurde eine Reverse-Transkriptase quantitative PCR (RT-qPCR) verwendet. RNA aus HUVEC wurde mit dem RNA Mini Kit (#BS67.311, Bio&Sell, Nürnberg, Deutschland) extrahiert. Die cDNA Synthese erfolgte mit SuperScript III reverse Transkriptase (#10368252, Invitrogen/Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) unter Verwendung Random-Hexamer-Primer zusammen mit oligo(dT) Primern (Sigma #O4387), Primer-Sequenzen siehe Tabelle 1. Die RT-qPCR wurde mit dem Eva Green Master Mix und ROX als Referenzfärbung (#76.580.5000, Bio&Sell) im Mx3005 Cyclor (Stratagene) durchgeführt. Die relative Expression der Ziel-RNA wurde gegen β -Actin normalisiert. Die Analyse

erfolgte mittels der delta-delta Ct Methodik mithilfe der MxPro Software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Tab. 1: Primer-Sequenzen der RT-qPCR zur Messung von Histodemethylasen-mRNA Konzentrationen in HUVEC

Locus	forward 5' → 3'	reverse 5' → 3'
JMJD3	AGAGTTCAGAGGTCGCGGATGG	GCGCGGGAGTTTGGTAATGGTC
JMJD2C	ATATCGTGAGCCGAGACTGTC	TCTTGGGTAACCTTCATCTAAAG
JMJD2D	AGCCCAGGGTACCAGCCAGC	TAGCAGTGCCACTAACTGCAGATCG
JMJD2B	CCTGAGAGCATCACGAGTAG	TCAAACCTCCACCTGGTAGATG
JARID1C	CAGGTAAGAGAGATCTGGAGC	CCATATGCTGTGGTTCTCATC
JMJD6	TTCGTCAGACTCCGACTCAGAG	TAATCCTGGAGGAGCTGCGCTC
JMJD1A	GAGCTCCACATCAGGTTTCATAAC	CCTGTAATTTATCTTCGTGATTGG
JMJD4	CAACCTGGATGACACCATCTC	TCA GCG ATG ACC TTG AGG AAG
JMJD2A	CAAATGTACCAGGTGGAGTTTG	CTCGTTGCCGTTTCTTTTCTTG
LSD1	ATTTAATGGCTCAGCCAATCACTC	TGGCGAGGCAGCGTATACATG
JARID1A	TATCATGGAGGATGACAGCATG	CAGCTCCTTTGATTTGTCTGC
JARID1B	TGAGGATGAAGATGCCATCTGCC	ACAGCGCACACAGATGTAGTCTTC
β-Actin	AAAGACCTGTACGCCAACAC	GTCATACTCCTGCTTGCTGAT

2.9 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die Programme GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA), sowie Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet. Die Mittelwerte sind mit ihrem Streuungsmaß angegeben als Mittelwert ± Standardfehler (SEM = standard of error of the mean). n gibt die Anzahl der einzelnen unabhängigen Versuchsansätze an. Die Kraft der isometrischen Kontraktion der Ringe wurde als Veränderung zur Vorspannung in Gramm aufgezeichnet. Kontraktionen wurden, soweit nicht anders angegeben, prozentual berechnet in Relation zur maximal erreichten Kraft bei Kaliumvorkontraktion $K_{max}^{K^+}$. Die Relaxation wurde, sofern nicht anders angegeben, prozentual berechnet in Relation zur maximal erreichten Kraft nach Inkubation mit

Phenylephrin. Zu einer DWK wurden jeweils der pD_2 -Wert berechnet, definiert als der negative dekadische Logarithmus der jeweiligen EC50-Konstante der DWK. Die statistische Auswertung der Organbadversuche erfolgte durch zweifache Varianzanalyse (Two-way ANOVA) mit anschließender post-hoc Bonferroni-Korrektur. Im Versuchsablauf der Vasoreaktivitätsstudien im Organbad wurde keine Erhöhung der Agonisten-Konzentration weitergeführt, wenn der Ring bereits die maximale angestrebte Kontraktion von 80% K_{max}^{K+} bzw. maximale Relaxation erreicht hatte. Für fehlende Messdaten bei höherer Agonisten-Konzentrationen wurde vor statistischer Analyse eine last observation carried forward (LOCF) als Ersetzungsstrategie verwendet.

Ungepaarte Stichproben wurden auf Normalverteilung getestet und im Anschluss bei gegebener Normalverteilung mittels einseitigem Zweistichproben-t-Test oder bei fehlender Normalverteilung mittels einseitigem Mann-Whitney-U-Test ausgewertet.

Im Allgemeinen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ als statistisch signifikant eingeschätzt, eine Wahrscheinlichkeit $p < 0,01$ als hochsignifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss der Inhibition von EZH2 auf die Gefäßreaktivität von Mausgefäßen in Physiologie und Inflammation

3.1.1 EZH2-Inhibition unter physiologischen Bedingungen

3.1.1.1 Behandlung mit GSK343 führte zu leicht verzögerter Kontraktion der Maus-Aorta unter nicht-inflammatorischen Bedingungen

Die Histonmethylase EZH2 ist an der epigenetischen Regulation von Proteinexpression und -repression beteiligt.^{118,120-122} Der Einfluss auf die Gefäßreaktivität wurde hier mittels Organbadversuchen untersucht. Dazu wurde der EZH2-Inhibitor GSK343 verwendet und die Phenylephrin-induzierte Kontraktion und die Acetylcholin-induzierte Relaxation der murinen Aorta bestimmt. Präparate der Aorta thoracica aus C57/BL6-Mäusen wurden über Nacht mit in DMSO gelöstem GSK343 in einem EBM-Medium inkubiert. Es wurde zunächst die Dosis-Wirkungskurve unter kumulativ ansteigender Dosierung von Phenylephrin im Organbad aufgezeichnet (Abb. 8 A).

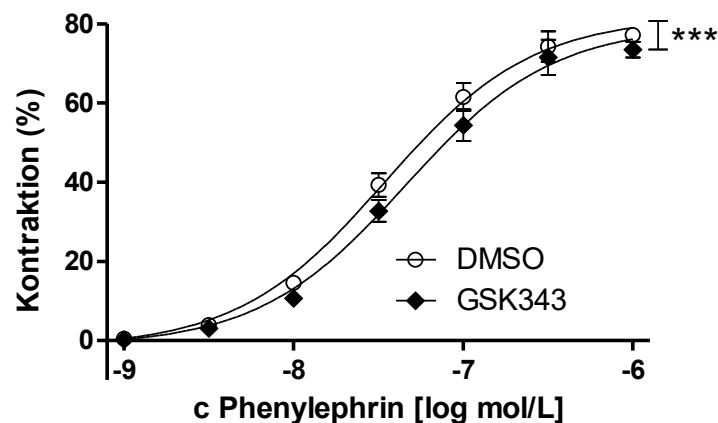


Abb. 8 A: Phenylephrin-induzierte Kontraktion der murinen Aorta nach GSK343-Inkubation: Inkubation der Aortenpräparate ex vivo mit GSK343 1µmol/L, 14h, DMSO-Kontrollgruppe. Kumulativ ansteigende Phenylephrin-Dosierungen im Organbad 0,1nM-1µM, n=5, pD_2 -Werte: DMSO vs. GSK343: $7,400 \pm 0,14$ vs. $7,244 \pm 0,16$, Two-way ANOVA, $***p < 0,01$

Die GSK343-behandelten Aortenpräparate zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant rechtsverschobene, verzögerte, Kontraktion.

Es schloss sich die Untersuchung der Acetylcholin-induzierten Relaxation an. Hierzu wurden die durch Phenylephrin vorkontrahierten Gefäßringe mit kumulativ ansteigenden Dosierungen von Acetylcholin im Organbad inkubiert (Abb. 8 B).

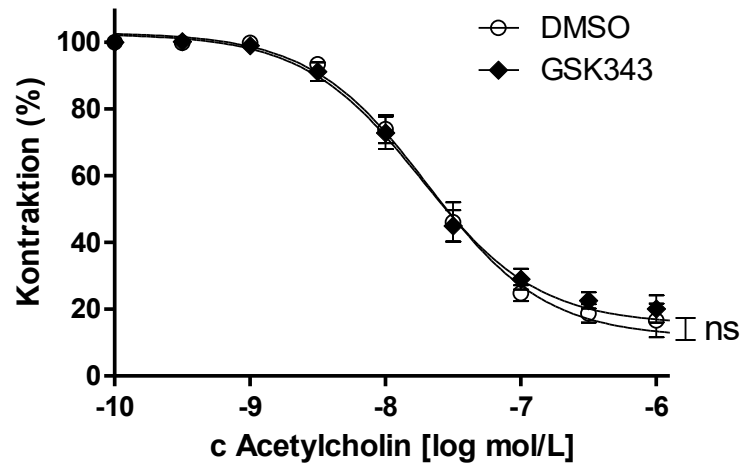


Abb. 8 B: Acetylcholin-induzierte Relaxation der murinen Aorta nach GSK343-Inkubation: Inkubation der Aortenpräparate ex vivo mit GSK343 1 μ mol/L, 14h, DMSO-Kontrollgruppe. Vorkontraktion mit Phenylephrin, kumulativ ansteigende Acetylcholin-Dosierungen im Organbad 0,1nM-1 μ M, n=5, pD_2 -Werte: DMSO vs. GSK343: $7,698 \pm 0,31$ vs. $7,734 \pm 0,28$, Two-way ANOVA, ns $p > 0,05$

Im Gegensatz zur Kontraktion war kein Unterschied im Relaxationsverhalten der Gefäße nach GSK343-Inkubation feststellbar.

Die Daten zeigen, dass die Inhibition der Histonmethylase EZH2 zu einer verminderten Phenylephrin-vermittelten Kontraktion der murinen Aorta führte, jedoch keinen Einfluss auf die Acetylcholin-vermittelten Relaxation nahm.

Es folgte ein Versuch zur Untersuchung der NO-Bioverfügbarkeit als mögliche Ursache der verzögerten Kontraktion unter EZH2-Inhibition.

3.1.1.2 Die eNOS Synthesefunktion von EZH2-inhibierten Mäusen war nicht alteriert

Ziel des Versuches war es, Veränderungen der NO-Synthasenaktivität bzw. -expression als mögliche Ursache des verzögerten Kontraktionsverhaltens nach EZH2-Inhibition zu identifizieren. Erneut erfolgte die Inkubation von Präparaten der Aorta thoracica aus C57/BL6-Mäusen mit GSK343. Im Organbad wurden die Gefäßpräparate mittels Inkubation mit Phenylephrin auf 10% der maximalen KCl-Vorkontraktion gebracht. Es erfolgte dann die Zugabe von L-NAME. Dieses inhibiert unspezifisch die NO-Synthasen im Gefäß.¹⁴¹ Die darauffolgende maximale Kontraktion der Gefäße nach spätestens 40min wurde in „% der Vorkontraktion“ notiert (Abb. 9).

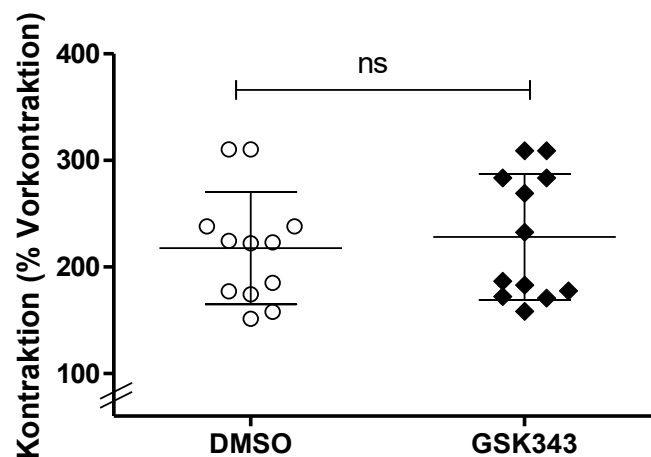


Abb. 9: Kontraktion der murinen Aorta durch Inkubation mit L-NAME nach GSK343-Behandlung: Inkubation der Aortenpräparate ex vivo mit GSK343 1µmol/L, 14h, DMSO-Kontrollgruppe. Vorkontraktion mit Phenylephrin, Zugabe von L-NAME 100µM, n=5, Mittelwerte: DMSO vs. GSK343: 217,7±52,75 vs. 228,1±59,21, einseitiger Mann-Whitney-U Test, ns p>0,05

Bei erhöhter NO-Bioverfügbarkeit wäre eine stärkere Kontraktion der Gefäße nach Inhibition der NO-Synthasenaktivität durch L-NAME zu erwarten. Dies konnte nicht nachgewiesen werden. Da Gefäße in der Entzündungsreaktion hyperkontraktile reagieren und auch die NO-Synthasen verstärkt exprimiert werden, sollte im folgenden Schritt untersucht werden, ob sich der Effekt der EZH2-Hemmung auf die Vasoreaktivität unter inflammatorischen Bedingungen verstärkt zeigt.

3.1.2 EZH2-Inhibition unter inflammatorischen Bedingungen

3.1.2.1 Behandlung mit GSK343 verminderte die Hyperkontraktilität von Gefäßen in der Inflammation

Viele Gefäßerkrankungen gehen mit einer Entzündungsreaktion und Hyperkontraktilität der Gefäße einher. Geprüft werden sollte die These, dass eine EZH2-Inhibierung hierbei protektiv auf die Gefäßfunktion wirkt. Dazu wurde während der Inkubation von Präparaten der Aorta thoracica aus C57/BL6-Mäusen mit GSK343 in EBM-Medium zusätzlich murines Lipopolysaccharid (mLPS) ins Medium gegeben, um inflammatorische Bedingungen zu erzeugen. Es erfolgte die Aufzeichnung der Dosis-Wirkungs-Kurven von Phenylephrin (Abb. 10 A) und Acetylcholin (Abb. 10 B).

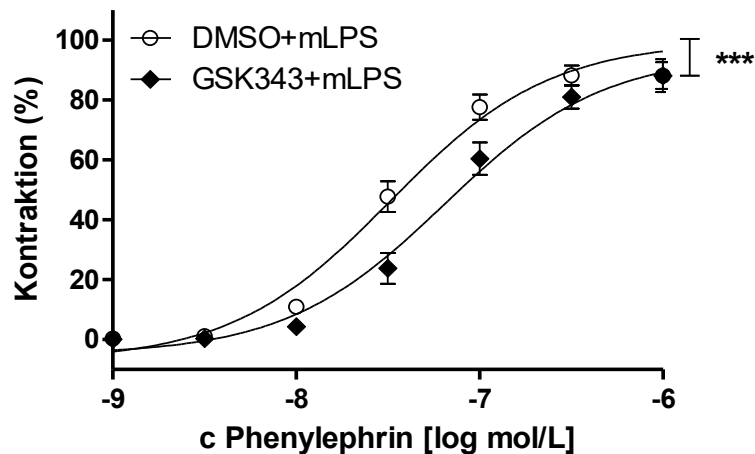


Abb. 10 A: Phenylephrin-induzierte Kontraktion der murinen Aorta nach GSK343-Inkubation und Behandlung mit mLPS: Inkubation der Aortenpräparate ex vivo mit GSK343 1µmol/L + mLPS 1ng/ml, 14h, DMSO-Kontrollgruppe. Kumulativ ansteigende Phenylephrin-Dosierungen im Organbad 0,1nM-1µM, n=5, pD₂-Werte: DMSO+mLPS vs. GSK343+mLPS: 7,39±0,24 vs. 7,09±0,27, Two-way ANOVA, ***p<0,01

Hier zeigte sich nun analog und deutlich verstärkt zu Versuch 3.1.1.1 eine verzögerte Kontraktion unter Phenylephrin-Stimulation. Die Relaxation blieb weiterhin unbeeinflusst (Abb. 11):

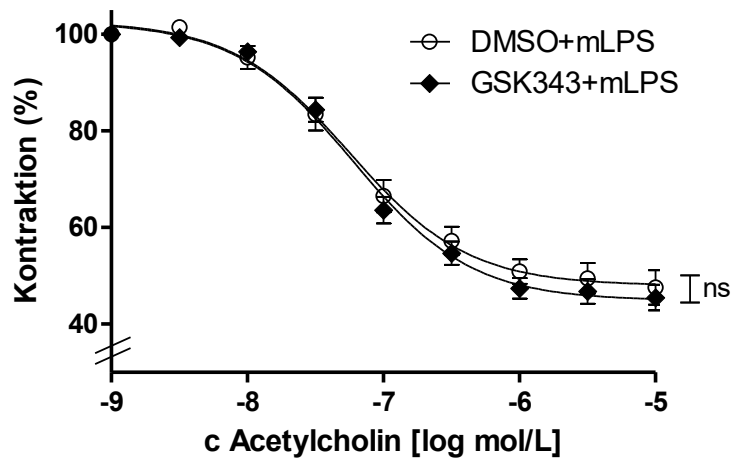


Abb. 10 B: Acetylcholin-induzierte Relaxation der murinen Aorta nach GSK343-Inkubation und Behandlung mit mLPS: Inkubation der Aortenpräparate ex vivo mit GSK343 1 $\mu\text{mol/L}$ + mLPS 1 ng/ml, 14h, DMSO-Kontrollgruppe. Kumulativ ansteigende Acetylcholin-Dosierungen im Organbad 0,1 nM-1 μM , n=5, pD_2 -Werte: DMSO+mLPS vs. GSK343+mLPS: $7,27 \pm 0,29$ vs. $7,21 \pm 0,16$, Two-way ANOVA, $p > 0,05$

Diese Daten zeigen, dass die EZH2-Inhibition eine Hyperkontraktilität der Gefäße unter inflammatorischen Bedingungen verminderte. In den folgenden Versuchen wurden Ansätze für einen molekularen Mechanismus dieses Effektes untersucht.

3.1.2.2 Der kontraktile Apparat wurde durch EZH2-Inhibition nicht beeinflusst

Bei verzögerter Kontraktion durch EZH2-Inhibition nach GSK343-Behandlung sollte zunächst ausgeschlossen werden, dass dies eine toxische Nebenwirkung mit möglicher Beeinträchtigung des kontraktiven Apparates der glatten Muskelzellen ist. Hierzu wurden Präparate der Aorta thoracica aus C57/BL6-Mäusen mit GSK343 und mLPS in EBM-Medium inkubiert und im Organbadversuch mittels kumulativ ansteigender Zugabe von Kaliumchlorid zur Kontraktion gebracht (Abb. 11). Die schrittweise Depolarisation der Zellen führt zur Gefäßkontraktion unabhängig von einer Agonisten-Wirkung.

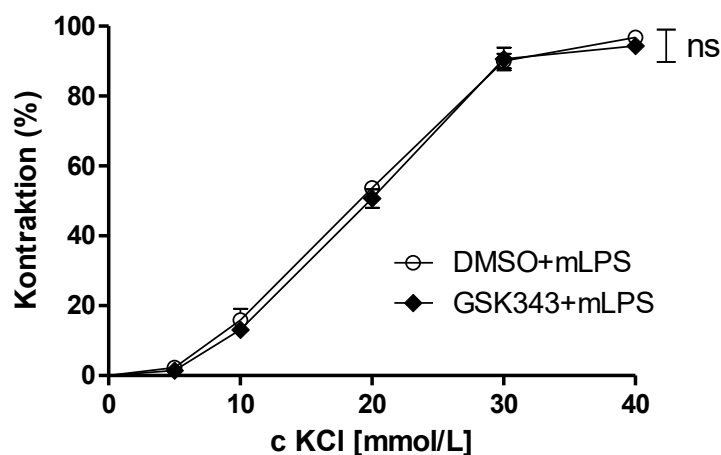


Abb. 11: Kontraktion der murinen Aorta durch Depolarisation mittels K^+ -Inkubation nach GSK343-Inkubation und Behandlung mit mLPS: Inkubation der Aortenpräparate ex vivo mit GSK343 $1\mu\text{mol/L}$ + mLPS 1ng/ml , 14h, DMSO-Kontrollgruppe. Kumulativ ansteigende KCl im Organbad 5mmol/L - 40mmol/L , $n=4$, pD_2 -Werte: DMSO+mLPS vs. GSK343+mLPS: $19,95\pm 0,06$ vs. $19,99\pm 0,06$, Two-way ANOVA, ns $p>0,05$

In diesem Versuch konnte weder eine verzögerte oder abgeschwächte Kontraktion im Vergleich zu Kontrollgruppe festgestellt werden, noch war die maximal erreichbare Kontraktionskraft nach GSK343-Inkubation verringert. Die strukturelle Integrität des kontraktiven Apparates der glatten Muskelzellen war auch nach Behandlung mit GSK343 intakt.

3.1.2.3 EZH2-Inhibition beeinflusste nicht die Thromboxan-induzierte Kontraktion

Die Induktion der Kontraktion durch Phenylephrin erfolgt über den α_1 -Adrenorezeptor der glatten Gefäßmuskelzelle.²⁹ Zur Untersuchung, ob die EZH2-Inhibition spezifisch diesen Signalweg beeinflusst, wurde im folgenden Versuch die Kontraktion durch das Thromboxan-A₂ Analogon U46619 über den Thromboxan-Rezeptor ausgelöst. Hierzu wurden Präparate der Aorta thoracica aus C57/BL6-Mäusen nach Inkubation mit GSK343 und mLPS in EBM-Medium mit kumulativ ansteigenden Dosierungen von U46619 im Organbad zur Kontraktion gebracht

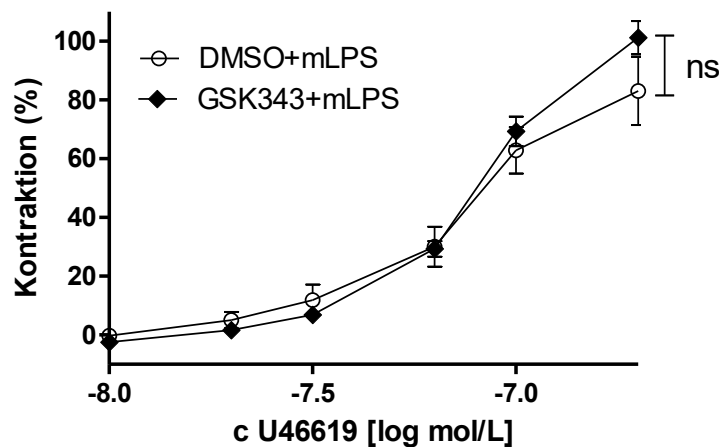


Abb. 12: Kontraktion der murinen Aorta durch das Thromboxan-Analogon U46619 nach GSK343-Inkubation und Behandlung mit mLPS: Inkubation der Aortenpräparate ex vivo mit GSK343 1 μ mol/L + mLPS 1ng/ml, 14h, DMSO-Kontrollgruppe. Kumulativ ansteigende Dosis von U46619 im Organbad 1nM-0,5 μ M, n=4, pD₂-Werte DMSO+mLPS vs. GSK343+mLPS: 6,75 \pm 0,28 vs. 6,55 \pm 0,16, Two-way ANOVA, ns p>0,05

(Abb. 12).

Wurde die Kontraktion über den Thromboxan-Rezeptor ausgelöst, konnte kein Unterschied im Kontraktionsverhalten zwischen Inhibitor-Behandlung und Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese Daten zeigen also, dass das Downstream-Signaling des Thromboxan-Rezeptors durch eine EZH2-Inhibition nicht signifikant beeinflusst wurde.

3.1.2.4 Die iNOS-Aktivität war unter inflammatorischen Bedingungen nach Behandlung mit GSK343 nicht gesteigert

Unter inflammatorischen Bedingungen wird insbesondere induzierbare NO-Synthase iNOS verstärkt exprimiert.⁶⁴ Ziel des Versuches war es, Unterschiede in der NO-Bioverfügbarkeit nach Inkubation mit GSK343 durch den spezifischen iNOS -Inhibitor L-NIL nachzuweisen. Präparate der Aorta thoracica aus C57/BL6-Mäusen wurden nach Inkubation mit GSK343 und mLPS in EBM-Medium und Vorkontraktion mit Phenylephrin im Organbad mit L-NIL versetzt und die anschließende Kontraktion in % der Phenylephrin-Vorkontraktion aufgezeichnet (Abb. 13).

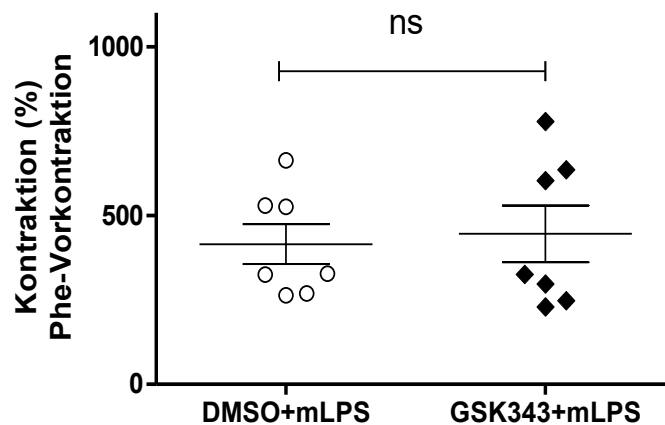


Abb. 13: Kontraktion der murinen Aorta durch Inkubation mit L-NIL nach GSK343-Inkubation und Behandlung mit mLPS: Inkubation der Aortenpräparate ex vivo mit GSK343 1µmol/L + mLPS 1ng/ml, 14h, DMSO-Kontrollgruppe. Zugabe von L-NIL 100µM im Organbad nach Vorkontraktion mit Phenylephrin, n=6, Mittelwerte ± Standardabweichung: DMSO+mLPS vs. GSK343+mLPS: 414,87±156,39 vs. 445,55±221,40, einseitiger Zweistichproben-T-Test, ns p>0,05

Bei erhöhter Aktivität bzw. Expression von iNOS nach Hemmung von EZH2 wäre eine verstärkte Kontraktion nach Inkubation mit L-NIL zu erwarten. Diese ließ sich nicht nachweisen. Unterschiede in der NO-Bioverfügbarkeit waren auch unter inflammatorischen Bedingungen keine Ursache der verzögerten Kontraktion durch Phenylephrin nach EZH2-Inhibition durch GSK343.

Zusammenfassend lässt sich in diesem Kapitel sagen, dass die Inhibition von EZH2 die Hyperkontraktilität von Gefäßen unter inflammatorischen Bedingungen vermindern konnte. Dies geschah nicht durch Beeinflussung des NO-Stoffwechsels oder durch Kompromittierung des kontraktilen Apparates. Ebenso war die Thromboxan-induzierte Kontraktion nicht verändert. Weitere Versuche sind notwendig, um die molekularen Prozesse der möglichen protektiven Wirkung von EZH2-Inhibition in der Entzündungsreaktion von Gefäßen zu untersuchen.

3.2 Charakterisierung des Phänotyps der JARID1B-Knockout Maus

3.2.1 JARID1B wird in humanen Endothelzellen stark exprimiert

Neben Histonmethylasen sind auch Histondemethylasen an der epigenetischen Regulation von Proteinexpression und -repression beteiligt.¹⁴² Über Rolle der Histondemethylasen im Endothel und ihr Einfluss auf die Gefäßreaktivität ist wenig bekannt. Zur Ermittlung einer relevanten und stark exprimierten Histondemethylase in Endothelzellen wurden zunächst die Expressionslevel bekannter Histondemethylasen mittels RT-qPCR in Endothelzellen gemessen. Zur Ermittlung des RNA-Levels erfolgte eine RT-qPCR aus humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) (Abb. 14).

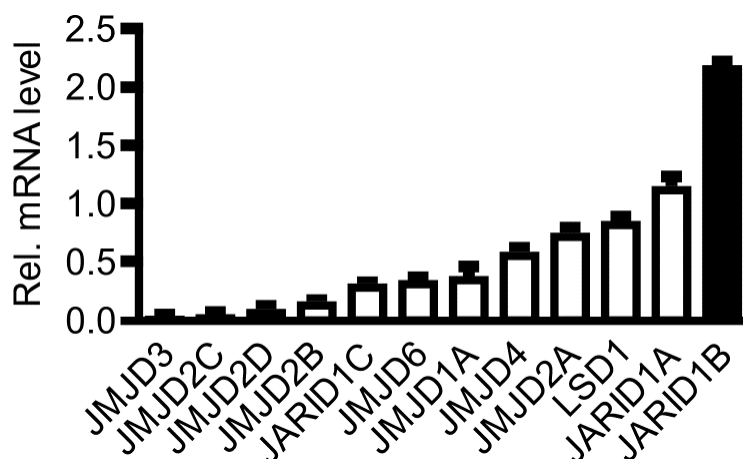


Abb. 14: RT-qPCR zur Messung von Histondemethylasen-mRNA Konzentrationen in humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen

Expressionslevel von verschiedenen Histondemethylasen in HUVEC. mRNA Level wurden gegen β -Actin normalisiert, $n > 3$

aus Fork et al.¹²⁷

Die Daten zeigen, dass die Histondemethylase JARID1B im Vergleich zu anderen Histondemethylasen in HUVEC am stärksten transkribiert wird.

Zur Analyse des Proteingehalts von JARID1B in Endothelzellen sowie und zur Untersuchung der Expression im Vergleich zu anderen Gewebetypen erfolgte außerdem ein qualitativer Western blot von JARID1B, eNOS und β -Actin (Abb. 15).

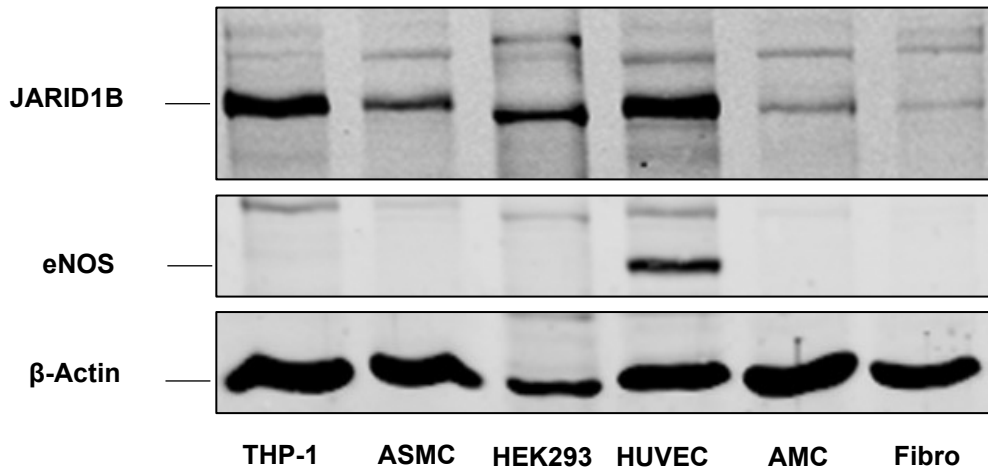


Abb. 15: Repräsentativer Western blot für JARID1B in verschiedenen Gewebetypen

Proteinisolation aus humanen Zellen: Monozyten (THP-1), glatten Muskelzellen der Aorta (ASMC), embryonalen Nierenzellen (HEK293), humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC), angiogenen myeloiden Zellen (AMC) und Fibroblasten (Fibro). Western Blot für von JARID1B, eNOS und β -Actin.

aus Fork et al.¹²⁷

Der Western Blot zeigte, dass JARID1B in HUVEC hochexprimiert ist. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass JARID1b sowohl im Vergleich zu anderen Histondemethylasen im Endothel auf RNA-Ebene am stärksten exprimiert wird als auch, dass das JARID1B Protein in HUVEC vorhanden ist. Daher wurden die Untersuchungen zum Einfluss von Histondemethylasen auf die Gefäßtonusregulation am Beispiel von JARID1B durchgeführt.

3.2.2 *Jarid1b*-Knockout zeigte eine beschleunigte Relaxationsfähigkeit

Zunächst wurde überprüft, ob ein Knockout von *Jarid1b* Einfluss auf die Gefäßkontraktion oder -relaxation hat. Hierzu wurden Gefäße aus tamoxifen-induzierbarem globalem *Jarid1b*-Knockout-Mäusen (KO) präpariert und im Vergleich zu Gefäßen aus gewöhnlichen C57/BL6-Wildtyp-Mäusen (WT) im gleichen Alter im Organbad getestet. Hierzu wurden zunächst kumulativ ansteigenden Dosen von Phenylephrin hinzugesetzt und hierdurch eine Kontraktion induziert (Abb. 16 A).

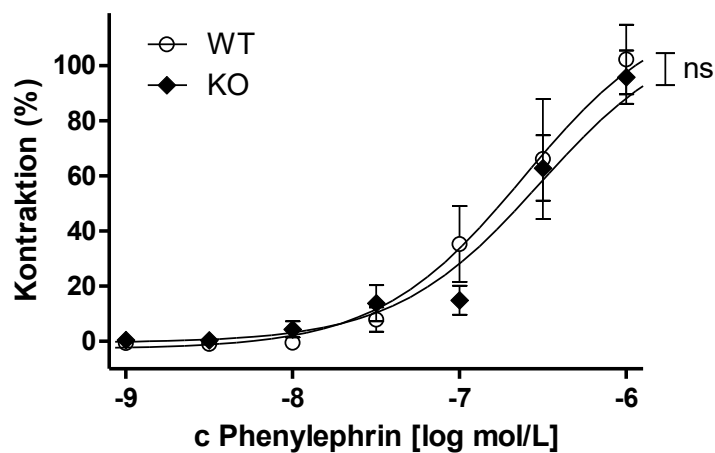


Abb. 16 A: Phenylephrin-induzierte Kontraktion der murinen *A. mesenterica superior* aus tamoxifen-induzierbarem *Jarid1b*-KO-Mäusen: Kontrollgruppe C57/BL6-Wildtyp-Gefäße. Kumulativ ansteigende Phenylephrin-Dosierungen im Organbad 0,1nM-1µM, n=5, pD₂-Werte: WT vs. KO: 7,39±0,24 vs. 7,09±0,27, Two-way ANOVA, ns p>0,05

Es zeigen sich keine Unterschiede im Kontraktionsverhalten, die Kontrolle der Gefäßkontraktion schien unabhängig von *Jarid1b* zu erfolgen.

Im Anschluss wurden die nun vorkontrahierten Gefäße durch Zugabe von Acetylcholin zur Relaxation gebracht (Abb. 16 B).

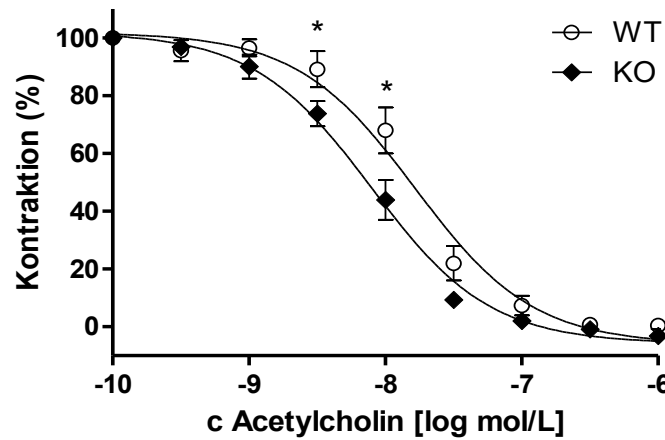


Abb. 16 B: Acetylcholin-induzierte Relaxation der murinen AMS aus tamoxifen-induzierbarem *Jarid1b*-KO-Mäusen: Kontrollgruppe C57/BL6-Wiltyp-Gefäße. Kumulativ ansteigende Acetylcholin-Dosierungen im Organbad 0,1nM-1µM, n=5, pD₂-Werte WT vs. KO: 7,80 ± 0,01 vs. 8.13 ± 0,09, Two-way ANOVA mit posthoc Bonferroni Korrektur, *p<0,05

Bei der Relaxation durch Acetylcholin stellte sich für die Acetylcholin-konzentrationen von 50nM und 100nM eine signifikante Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve der Knockout-Maus dar als Zeichen einer beschleunigten Relaxation. Am deutlichsten zeigte sich dieser Phänotyp an Präparaten der murinen Arteria mesenterica superior.

3.2.3 Reproduktion des Phänotyps durch Inhibitor-Behandlung

Zur Verifikation der zuvor festgestellten beschleunigten Relaxation im *Jarid1b*-Knockout Gefäß wurden Arteria mesenterica superior (AMS)-Präparate aus gewöhnlichen C57/BL6-Mäusen gewonnen und über Nacht mit PBIT inkubiert. PBIT ist ein sogenannter „small molecule“ Inhibitor der Proteinfunktion von JARID1B, in höherer Konzentration der gesamten JARID1-Familie.¹⁴³ Als Kontrollgruppe diente reines DMSO in gleicher Konzentration. Erneut wurde im Organbad die Dosis-Wirkungskurven von Acetylcholin (Abb. 17) gemessen.

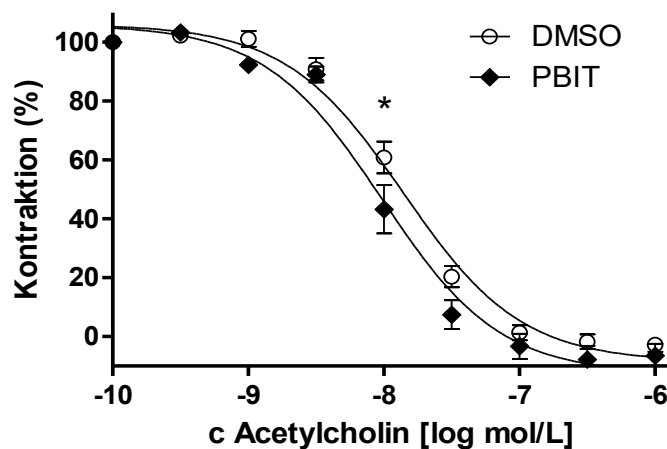


Abb. 17: Acetylcholin-vermittelte Relaxation der murinen AMS aus WT-Mäusen nach Inkubation mit JARID1B-Inhibitor PBIT: Inkubation der AMS-Präparate ex vivo mit PBIT 1 μ mol/L, 14h, DMSO-Kontrollgruppe. Kumulativ ansteigende Acetylcholin-Dosierungen im Organbad 0,1nM-1 μ M nach Vorkontraktion mit Phenylephrin, n=5, pD₂-Werte: DMSO vs. PBIT: 7,85 \pm 0,06 vs. 8,02 \pm 0,07, Two-way ANOVA mit post-hoc Bonferroni-Korrektur, *p<0,05

Analog zu Versuch 3.2.2 zeigte sich eine signifikant beschleunigte Relaxation nach *Jarid1b*-Inhibition durch Acetylcholin bei einer ACh-Konzentration von 100nM. Die Phenylephrin-induzierte Kontraktion blieb weiter unbeeinflusst. Die Beobachtung aus dem Knockout-Tier konnte demnach mittels JARID1b-Inhibitorbehandlung (PBIT) reproduziert werden. Es lässt sich zusammenfassen, dass der Knockout von *Jarid1b* zu einem beschleunigten Relaxationsverhalten der murinen Arteria mesenterica superior führte. Es sollten nun molekulare Mechanismen für diesen Phänotyp gesucht werden mit besonderem Fokus auf den Stoffwechsel gefäßrelaxierender Autacoide im Gefäß.

3.2.4 Phänotypisierung spezifischer Knockout-Tiere

Die Züchtung spezieller Knockout-Tiere liefert Möglichkeiten, das *Jarid1b*-Gen in spezifischen Geweben oder Zellen zu deletieren. Es wurden Mäuse mit induzierbarem *Jarid1b*-Knockout in Makrophagen sowie in Endothelzellen für die nachfolgenden Experimente verwendet.

3.2.4.1 LysM⁺-spezifische *Jarid1b*-Knockout-Maus zeigte keinen Phänotyp

Zur Untersuchung der Frage, ob Makrophageninfiltrationen der Gefäßwände bei der Ausbildung des Phänotyps eine Rolle spielen, wurden Tiere mit induzierbarem, spezifischem Knockout von *Jarid1b* in Lysozym-M-positiven Zellen verwendet. Lysozym-M wird bei Mäusen primär in Makrophagen exprimiert, sodass ein Knockout in Lysozym-M-positiven (Lys-M⁺) Zellen einen spezifischen *Jarid1b*-Knockout in Makrophagen hervorbringt. Getestet wurde die Acetylcholin-induzierte Relaxation an Lys-M⁺-*Jarid1b*-Knockout und Wildtyp-Gefäßen nach Vorkontraktion mit Phenylephrin (Abb. 18).

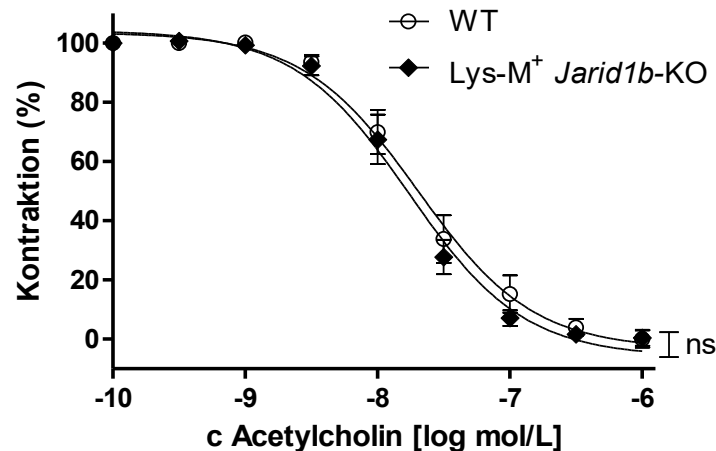


Abb. 18: Acetylcholin-vermittelte Relaxation der AMS aus LysM⁺-spezifischem *Jarid1b*-KO: Kontrollgruppe C57/BL6-Wildtyp-Gefäße. Kumulativ ansteigende Acetylcholin-Dosierungen im Organbad 0,1nM-1µM, n=6, pD₂-Werte WT vs. Lys-M⁺-KO: 7,53±0,63 vs. 7,8±0,33, n=6, r=11, p>0,05, Two-way ANOVA, ns p>0,05

Hierbei zeigte sich die Acetylcholin-induzierte Relaxation der Knockout-Präparate nicht signifikant different zur Wildtyp-Kontrolle. Im folgenden Schritt wurde ein endothelspezifischer *Jarid1b*-Knockout untersucht.

3.2.4.2 Endothelspezifische *Jarid1b*-Knockout-Maus zeigte keinen Phänotyp

Die Endothelzellschicht fungiert als hauptsächlicher Regulator des Gefäßtonus.⁵⁰ Zur Prüfung der Hypothese, dass der beobachtete Phänotyp des *Jarid1b*-Knockout Tieres durch Modifikationen am Endothel bedingt wird, wurden im folgenden Versuch Gefäße aus endothelzell-spezifischem *Jarid1b*-Knockout verwendet. Wie zuvor erfolgte Vorkontraktion mit Phenylephrin und anschließende Relaxation mittels Acetylcholin-Inkubation (Abb. 19) im Organbad.

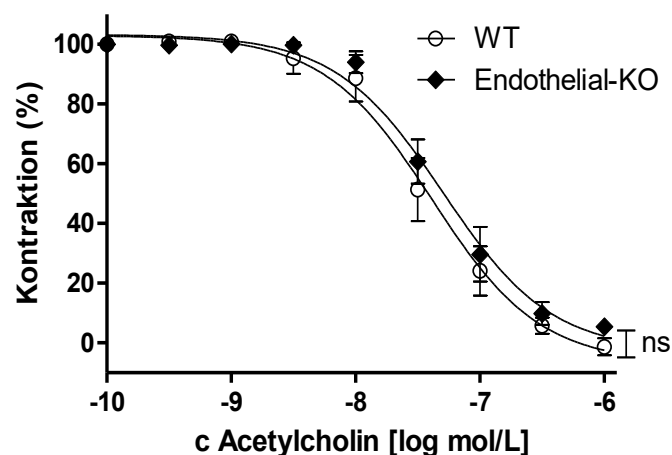


Abb. 19: Acetylcholin-vermittelte Relaxation der AMS aus endothel-spezifischem *Jarid1b*-KO: Kontrollgruppe C57/BL6-Wiltyp-Gefäße. Kumulativ ansteigende Acetylcholin-Dosierungen im Organbad 0,1nM-1µM, n=3, pD₂-Werte WT vs. Endothelial-KO: 7,40±0,51 vs. 7,23±0,36 n=3, r=6, Two-way ANOVA, ns p>0,05

In diesem Versuch zeigte sich kein Unterschied im Relaxationsverhalten der Gefäße. Relativierend muss angemerkt werden, dass Vorversuche gezeigt hatten, dass der endothelspezifische Knockout in den Mäusen teilweise nur unzureichend gelang und die Knockout-Effektivität schwer zu bestimmen ist. Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde im nächsten Versuch das Endothel aus globalen *Jarid1b*-Knockout Gefäßen entfernt.

3.2.5 NO-vermittelte Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen war im *Jarid1b*-Knockout nicht alteriert

Da sich im endothelspezifischen *Jarid1b*-Knockout keine veränderte Relaxation gezeigt hatte, sollte sich die Ausprägung eines Phänotyps auch bei entferntem Endothel zeigen lassen. Hierzu wurde durch Schwenken der Gefäßringe in Chaps-Puffer spezifisch die Endothelzellen aus dem Innern der Gefäße entfernt. Man spricht von „denudierten“ Gefäßen, welche die Untersuchung der isolierten Muscularis möglich machen. Bei intakten Gefäßen produzieren die Endothelzellen Acetylcholin-induziert das gefäßrelaxierende NO. Die Muscularis ist dazu nur in geringem Umfang fähig. Aus diesem Grund muss zur Untersuchung der Relaxationsfähigkeit von denudierten Gefäßen eine Substanz verwendet werden, die NO direkt im Organbad freisetzt. Dafür wurde im vorliegenden Experiment DETA NONOate in kumulativ aufsteigenden Dosierungen nach Vorkontraktion mit Phenylephrin verwendet (Abb. 20).

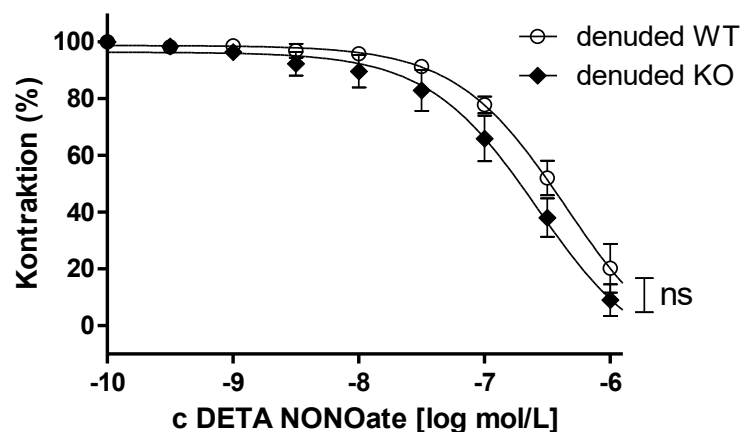


Abb. 20: Deta-NONOate vermittelte Relaxation der denudierten AMS aus *Jarid1b*-KO Mäusen: Vorbehandlung durch Schwenken in Chaps-Puffer 5mg/ml 30sec. Kontrollgruppe denudierte C57/BL6-Wiltyp-Gefäße. Kumulativ ansteigende DETA NONOate Dosierung im Organbad 0,1nM-1µM, n=3, pD₂-Werte denudierter WT vs. denudierter *Jarid1b*-KO: 6,33±0,19 vs. 6,62±0,36, n=3, r=6, Two-way ANOVA, ns p>0,05

Die globale KO-Maus zeigte nach Denudierung im Vergleich zur denudierten WT-Maus keinen statistisch signifikanten Unterschied im Relaxationsverhalten. Dieser Versuch ließ auf die Notwendigkeit des intakten Endothels auf die Ausbildung eines Phänotyps schließen.

3.2.6 Bioverfügbarkeit und Aktivitätsgrad von eNOS und iNOS in *Jarid1b*-Knockout Mäusen war nicht verändert

3.2.6.1 NO-Synthesenaktivität wurde durch *Jarid1b*-Knockout nicht gesteigert

Als Ursache der beschleunigten Relaxation des *Jarid1b*-Knockout Gefäßes kommt der wichtige gefäßrelaxierende Transmitter NO in Frage. Getestet wurde, ob die Aktivität oder die Expressionslevel der NO-Synthesen im *Jarid1b*-Knockout-Gefäß erhöht sind und der Phänotyp durch eine entsprechend höhere Bioverfügbarkeit von NO bedingt wird. Hierzu wurden AMS-Präparate aus globalem *Jarid1b*-KO Tieren mittels Phenylephrin auf 10% der $K_{max}^{K^+}$ vorkontrahiert. Dann wurde der unspezifische NO-Synthesen-Inhibitor L-NAME ins Organbad gegeben. Die maximale Kontraktion der Gefäße nach max. 40min wurde aufgezeichnet und in „% der Vorkontraktion“ notiert (Abb. 21). Als Kontrollgruppe dienen Wildtyp-Gefäßpräparate.

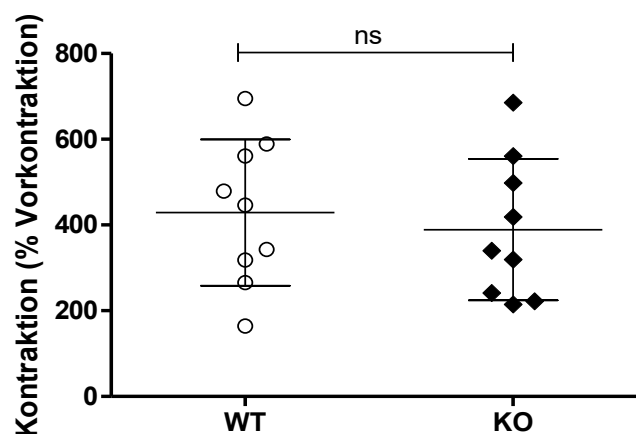


Abb. 21: Kontraktion der AMS aus *Jarid1b*-KO Mäusen durch Inkubation mit L-NAME: Kontrollgruppe C57/BL6-Wiltyp-Gefäße, Zugabe von L-NAME 100 μ M nach Vorkontraktion mit Phenylephrin auf 10% der $K_{max}^{K^+}$, n=6, Mittelwerte WT vs KO: 429 \pm 171 vs. 389 \pm 165, einseitiger Zweistichproben-T-Test, ns p>0,05

Signifikante Unterschiede im Kontraktionslevel zwischen den beiden Versuchsgruppen nach Inhibition der NO-Synthesen ergaben sich nicht. Dies kann bedeuten, dass die beschleunigte Relaxation des *Jarid1b*-Knockouts unabhängig von NO ist.

3.2.6.2 *Jarid1b*-Knockout ergab keine gesteigerte iNOS-Induktion

Die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen oder auch der Sepsis ist mit inflammatorischen Bedingungen im Gefäßsystem verbunden. Hierbei kommt es zur Induktion der iNOS. Untersucht werden sollte, ob der *Jarid1b*-Knockout unter inflammatorischen Bedingungen eine erhöhte Induktion oder Aktivität der iNOS und damit eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit bedingt. Hierzu wurden Arterienringe der AMS von *Jarid1b*-Knockout- und Wildtyp-Mäusen mit mLPS inkubiert. Danach erfolgte im Organbad nach Vorkontraktion mit Phenylephrin auf 10% der K_{max}^{K+} die Zugabe von L-NIL. Dieses inhibiert dabei spezifisch die iNOS.¹⁴⁴ Erneut wurde die maximale Kontraktion der Gefäße nach max. 40min aufgezeichnet und in „% der Vorkontraktion“ notiert (Abb. 22).

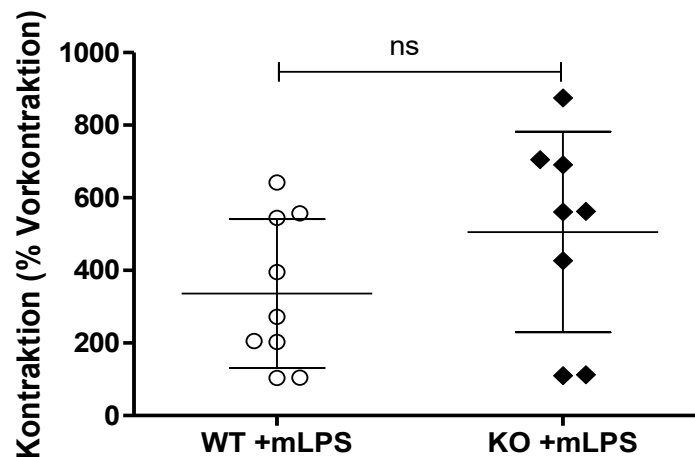


Abb. 22: Kontraktion der AMS von *Jarid1b*-KO Mäusen durch Inkubation mit L-NIL nach mLPS-Behandlung: Inkubation der AMS-Präparate ex vivo mit mLPS 1ng/ml, 14h. Kontrollgruppe C57/BL6-Wildtyp. Zugabe von L-NIL 100µM im Organbad nach Vorkontraktion mit Phenylephrin auf 10% der K_{max}^{K+} , n=6, Mittelwerte ± Standardabweichung: WT+mLPS vs KO+mLPS: 336±205 vs. 506±276, einseitiger Zweistichproben-T-Test,

Auch in diesem Versuch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Kontraktion nach Inhibition der iNOS, sodass Differenzen in der iNOS-Aktivierung oder Expression nicht als ursächlich für den beobachteten Phänotyp angenommen wurden.

3.2.6.3 Der Phosphorylierungsgrad der eNOS wurde durch *Jarid1b*-Knockout nicht erhöht

Zur abschließenden Untersuchung, ob Unterschiede in der eNOS-Aktivität die beschleunigte Relaxation des *Jarid1b*-Knockouts erklären können, wurde der Phosphorylierungsgrad der eNOS bestimmt. Die Syntheseaktivität der eNOS wird durch Phosphorylierungen am Protein reguliert. Eine Phosphorylierung der Aminosäure Ser-1177 führt zu einer verstärkten Syntheseleistung und demnach zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit von NO im Gefäß.⁵⁷ Diese Phosphorylierung kann mithilfe eines Western Blots quantifiziert werden. Dazu wurden Zelllysate aus der gesamten AMS von WT- und *Jarid1b*-KO-Mäusen verwendet und eine Proteinisolation durchgeführt. Im anschließenden Western-Blot wurden Primärantikörper gegen eNOS und Ser-1177-phosphorylierter eNOS (p-eNOS) verwendet. Nach densitometrischer Analyse wurde das Verhältnis von p-eNOS zu eNOS bestimmt (Abb. 23).

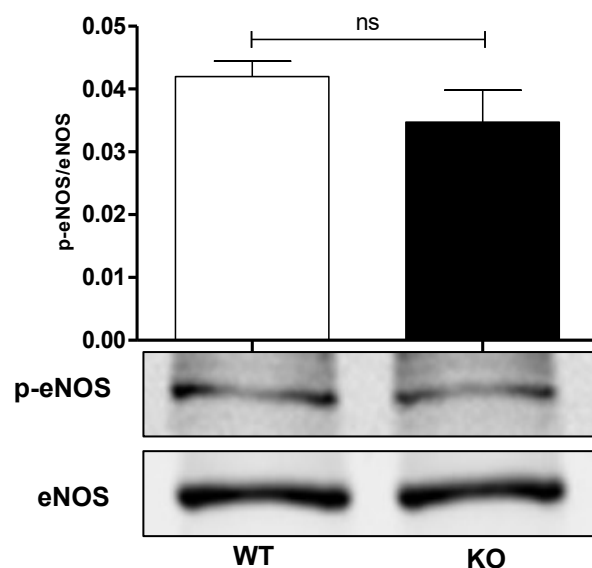


Abb. 23: Western-Blot und Densitometrie von eNOS und p-eNOS der AMS von *Jarid1b*-KO Mäusen: Proteinisolation aus vollständiger AMS von *Jarid1b*-KO- und C57/BL6-WT-Mäusen. Primärantikörper gegen eNOS und Ser1177-phospho-eNOS (p-eNOS). Densitometrische Analyse, Auftragen des Quotienten p-eNOS/eNOS. n=5, Mittelwerte ± Standardabweichung WT vs. KO: 0,042±0,005 vs. 0,035±0,011, einseitiger Zweistichproben-t-Test, ns p>0,05

Unterschiede im Phosphorylierungsgrad der eNOS und damit im Aktivitätsgrad konnten zwischen WT und KO nicht festgestellt werden. Eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit war nach diesen Analysen nicht die Ursache für die beschleunigte Relaxation des *Jarid1b*-Knockouts.

3.2.7 Inkubation mit Arachidonsäure führte im *Jarid1b*-Knockout nicht zu verstärkter Relaxation

Da Veränderungen des NO-Stoffwechsels in *Jarid1b*-Knockout-Mäusen nicht festzustellen waren, stellte sich die Hypothese, dass der Knockout möglicherweise die Verfügbarkeit gefäßrelaxierender Metabolite der Prostanoid-Signalwege erhöht. Prostanoiden werden aus dem Substrat Arachidonsäure synthetisiert. Entsprechend wurden AMS-Präparate von WT- und KO-Mäusen durch Inkubation mit dem Thromboxan-A₂ Analogon U46619 auf ein Kontraktionslevel von ca. 80% $K_{\max}^{K^+}$ gebracht und im Anschluss mit reiner Arachidonsäure inkubiert. Die maximale Kontraktion der Gefäße nach max. 20min wurde aufgezeichnet und in „% der Vorkontraktion“ notiert (Abb. 24). Als Kontrollgruppe dienten Wildtyp-Gefäßpräparate.

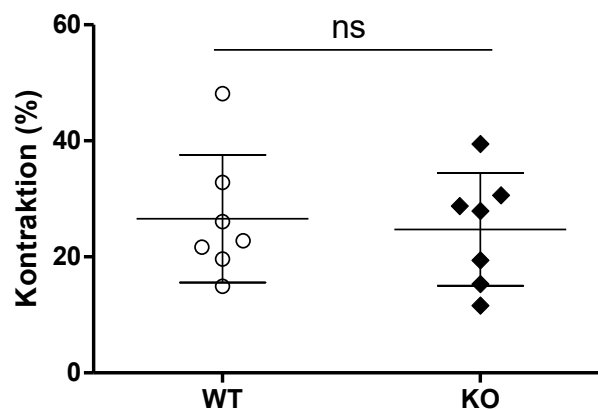


Abb. 24: Relaxation der AMS von *Jarid1b*-KO Mäusen durch Inkubation mit Arachidonsäure nach Vorkontraktion mit U46619: Kontrollgruppe C57/BL6-Wiltyp-Gefäße, Zugabe von Arachidonsäure 0,1µmol/L nach Vorkontraktion mit U46619 auf 80% der $K_{\max}^{K^+}$, n=7, Mittelwerte WT vs KO: 26,58±11,01 vs. 24,74±9,72, einseitiger Zweistichproben-T-Test, ns p>0,05

In diesem Versuchsansatz konnte kein Unterschied im Relaxationsverhalten durch Inkubation mit Arachidonsäure gemessen werden.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen in diesem Kapitel, dass die murine Arteria mesenterica superior nach Knockout oder Inhibition von *Jarid1b* eine verstärkte Acetylcholin-induzierte Vasorelaxation zeigte. Dies wurde nicht durch Veränderungen der NO-Bioverfügbarkeit hervorgerufen, auch war ein Phänotyp nicht im Makrophagen-spezifischen Knockout messbar. Zur Ausprägung des Phänotyps war ein intaktes Endothel notwendig. Die Inkubation mit Arachidonsäure im Organbad ergab zunächst keine Unterschiede im Relaxationsverhalten zwischen Knockout- und Wildtypgefäßen, Auswirkungen auf Prostanoid-Signalwege sollten zur Untersuchung molekularer Abläufe weiter untersucht werden.

4 Diskussion

4.1 Rolle von EZH2 in der Regulation des Gefäßtonus

Es konnte gezeigt werden, dass Aortenpräparate aus Mäusen nach Inkubation mit dem EZH2-Inhibitor GSK343 eine verzögerte Kontraktion aufweisen. Unter diesen weitgehend physiologischen Bedingungen ist ein Einfluss der EZH2-Inhibition auf die Gefäßreaktivität offenbar messbar, jedoch nicht stark ausgeprägt. Eine Gemeinsamkeit vieler kardiovaskulärer Erkrankungen sind inflammatorische Bedingungen im Gefäßsystem^{81,145}, auch in der Sepsis selbst spielt die Gefäßdysfunktion eine wichtige pathophysiologische Rolle⁹³. Simuliert werden kann die Inflammation ex vivo durch Inkubation mit murinem Lipopolysaccharid. Um eine mögliche protektive Wirkung von GSK343 auf die Gefäßfunktion zu zeigen, wurden die Versuche unter inflammatorischen Bedingungen wiederholt. Nun zeigte sich eine deutlich verzögerte Phenylephrin-induzierte Gefäßkontraktion. Im Allgemeinen zeigen Gefäße im Rahmen einer akuten Entzündung, aber auch bei chronischen Gefäßerkrankungen, eine übermäßige Kontraktionsantwort, eine sogenannte Hyperkontraktilität.¹⁴⁶ Die Inhibition von EZH2 scheint dieser entgegen zu wirken. Es soll diskutiert werden, ob und auf welche Weise EZH2 an der Gefäßtonuskontrolle beteiligt ist.

4.1.1 Möglicher Einfluss von EZH2 auf die NO-Bioverfügbarkeit

Bereits unter weitgehend physiologischen, nicht-inflammatorischen Bedingungen zeigt sich eine leicht verzögerte Kontraktion der GSK343-behandelten Präparate im Organbad (siehe 3.1.1.1). Durch Extraktion des Gefäßes aus der Maus und mehrstündiger Inkubation kann ein möglicher inflammatorischer Reaktionszustand des Gefäßes angenommen werden. Die verzögerte Kontraktion im Vergleich zur Vergleichsgruppe stützt die Hypothese, dass die Inhibition von EZH2 einen protektiven Einfluss auf die Gefäßfunktion hat. Häufig werden protektive Effekte durch eine erhöhte Bioverfügbarkeit von NO aus dem Endothel vermittelt.¹⁴⁷ Ein etablierter Versuch zur Quantifizierung der NO-Verfügbarkeit im Organbad ist die Inkubation der Präparate mit dem L-Arginin Analogon N(ω)-Nitro-L-Arginin Methylester (L-NAME).^{148,149} Dieses blockiert unspezifisch die NO-Synthese der bisher im Gefäßsystem bekannten NO-Synthasen

(insb. eNOS und iNOS). Durch den Wegfall des gefäßrelaxierenden NOs durch Inkubation der Gefäße mit L-NAME ist gewöhnlich eine Gefäßkontraktion zu erwarten. Bei Präparaten, in denen zuvor eine verminderte Bioverfügbarkeit an NO bestand, fällt diese Kontraktion entsprechend geringer aus. Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen konnten keine Differenzen nach Inkubation mit L-NAME festgestellt werden (siehe 3.1.1.2). Auch die Acetylcholin-induzierte Relaxation wird nicht beeinflusst, welche primär durch NO vermittelt wird.

Speziell unter inflammatorischen Bedingungen wird NO nicht nur über die endotheliale NO-Synthase eNOS produziert, vielmehr zeigt sich die induzierbare NO-Synthase (iNOS) stärker exprimiert und aktiviert.¹⁵⁰ Zur genaueren Spezifizierung der NOS-Untergruppen wurden deshalb auch Versuche mit dem Inhibitor L-NIL durchgeführt (siehe 3.1.2.4), dieser inhibiert spezifisch die iNOS-Synthasefunktion.¹⁴⁴ So kann analog zum Versuch mit L-NAME untersucht werden, ob physiologisch relevante Unterschiede in der iNOS-Aktivität oder Induktion vorliegen. Auch hier konnte zwischen den Versuchsgruppen kein Unterschied gezeigt werden. Anhalte für eine gesteigerte Bioverfügbarkeit von NO unter EZH2-Inhibition ergeben sich nicht.

4.1.2 Möglicher Einfluss von EZH2 auf vasokonstriktorische Signalwege

Da eine gesteigerte Produktion gefäßrelaxierenden NOs nicht nachweisbar ist, muss diskutiert werden, ob Hinweise auf den Einfluss auf den Kontraktionsmechanismus der Zelle selbst vorliegen. Zunächst muss dabei ausgeschlossen werden, dass es sich beim beobachteten Effekt einer verzögerten Kontraktion um eine toxische Wirkung des GSK343 handelt. Zudem wäre auch eine Wirkung auf den eigentlichen kontraktile Apparat der glatten Muskelzelle unerwünscht, da die physiologische Funktion der Gefäßmuskelzelle nicht mehr gewährleistet wäre. Im Versuch mit ansteigenden Konzentrationen von extrazellulärem Kalium (siehe 3.1.2.2) und darüber ausgelöste Depolarisation mit folgendem Kalzium-Einstrom wurde keine Differenz im Kontraktionsverhalten zwischen den Versuchsgruppen festgestellt. Auch die maximal erreichbare Kontraktionskraft der Gefäßpräparate bei höheren Dosierungen von Phenylephrin unterscheidet

sich zwischen den Gruppen nicht. Die Kontraktionsfähigkeit der GSK343-behandelten Präparate ist also weiterhin vorhanden, die Phenylephrin-induzierte Kontraktion jedoch verändert. Eine toxische oder unerwünschte Wirkung von GSK343 ist nicht anzunehmen.

Fragwürdig ist zudem, wie die Inhibition von EZH2 Einfluss auf die Kontraktion der glatten Muskelzelle einfluss nehmen kann. Wie unter 1.1.1 ausgeführt, führt unter anderem eine Aktivierung des Rho/Rho-Kinase Signalwegs zur Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzelle. Es ist bekannt, dass EZH2 an der Regulation des *PPAR γ* -Gens beteiligt ist.¹⁵¹ Bei Methylierung des Promotors durch EZH2 wird das *PPAR γ* -Gen supprimiert.¹⁵¹ *PPAR γ* -Liganden können den Rho/Rho-Kinase-Signalweg inhibieren, sodass bei Repression von *PPAR γ* der Rho/Rho-Kinase-Signalweg stärker aktiv ist.¹⁵² Ein denkbarer Mechanismus wäre, dass die Methylierungsaktivität der EZH2 durch den Inhibitor GSK343 reduziert wird, sodass das *PPAR γ* -Gen stärker induziert wird. Entsprechend wäre der Rho/Rho-Kinase-Signalweg inhibiert, die Kalziumsensitivität reduziert und die Phenylephrin-induzierte Kontraktion vermindert. Die Expression von *PPAR γ* ist darüber hinaus unter inflammatorischen Bedingungen erhöht.¹⁵³ Dies könnte erklären, warum der Effekt nach Stimulation mit LPS besonders deutlich auftritt. Die Inkubation mit L-NIL zeigte außerdem keine Hinweise auf Unterschiede in der iNOS-Aktivität. Dies müsste keinen Widerspruch zu einer möglichen *PPAR γ* -Induktion darstellen, da die iNOS ihrerseits durch *PPAR γ* nicht induziert, sondern vielmehr inhibiert wird.¹⁵⁴ Widersprüchlich ist jedoch der Befund, dass bei Stimulation mit dem Thromboxan-Analogon U46619 keine Unterschiede in der Gefäßkontraktion festgestellt werden können. Es ist bekannt, dass insbesondere die Thromboxan A₂-induzierte glatte Muskelkontraktion durch den Rho-/RhoKinase-Weg mediiert wird.²² Bei Stimulation mit U46619 müsste also ebenfalls ein deutlicher Effekt zu erwarten sein, wenn eine Involvierung des Rho-/RhoKinase-Signalwegs angenommen wird.

Wie bereits ausgeführt, löst nicht nur Noradrenalin bzw. dessen synthetisches Analogon Phenylephrin eine Gefäßkontraktion aus, sondern auch andere Agonisten am Endothel wie Thromboxan A₂ bzw. dessen Analogon U46619. Differenzen im Kontraktionsverhalten nach Stimulation mit den verschiedenen Agonisten im Organbad können Rückschlüsse auf Unterschiede im Downstream-

Signaling der Rezeptoren zulassen. In den Versuchen wurde gezeigt, dass ausschließlich die Phenylephrin-induzierte Kontraktion verzögert wird, nicht jedoch die Kontraktion durch das Thromboxan Analogon U46619 (siehe 3.1.2.3). Tsai et. al.¹⁵⁵ konnten zeigen, dass bei Agonisten-Bindung am α_1 -Adrenozeptor durch Phenylephrin in der glatten Muskelzelle eine cytoskelettale Aktin-Polymerisation stimuliert wird. Bei Erregung über den Thromboxan A_2 -Rezeptor tritt eine solche Polymerisation nicht auf.¹⁵⁵ Weiterführende Studien zeigen, dass die cytoskelettale Aktin-Polymerisation eine wichtige Rolle in der kontraktile Funktion der glatten Muskelzelle spielt.²⁶ Es kann die These aufgestellt werden, dass eine Inhibition von EZH2 die Assemblierung der cytosolischen Aktin-Filamente beeinträchtigt, sodass bei Stimulation am Adrenozeptor eine verzögerte Kontraktion gemessen wird. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass EZH2 in T-Zellen und Fibroblasten einen wichtigen Regulationsmechanismus in der Polymerisation der extra-nukleären sowie nukleären Aktin-Filamente darstellt.¹⁵⁶ Eine solche Funktion wäre auch in glatten Gefäßmuskelzellen denkbar. Versuche, bei denen die Aktin-Polymerisation bei Kontraktion der glatten Muskelzellen durch Cytochalasin gehemmt wurde, haben jedoch gezeigt, dass neben einer verminderten Kontraktionsantwort auf externe Stimuli auch eine verringerte absolute Kontraktionskraft der Muskelzellen vorlag, gemessen bei Depolarisation der Muskelzellen durch Depolarisation mittels Inkubation mit K^+ .^{157,158} Entsprechende Ergebnisse müssten auch bei EZH2-inhibierten Gefäßen zu beobachten sein. Die Gesamtkontraktionskraft nach Depolarisation der Gefäße durch K^+ scheint jedoch vergleichbar zu sein. Auch müsste die maximal erreichbare Kontraktion der behandelten Gefäße durch die Phenylephrin-Stimulation ein niedrigeres Niveau erreichen als die Kontrollgefäße. Auch dies konnte in den Versuchen nicht gezeigt werden.

Neben Aktivierung der cytoskelettalen Aktin-Polymerisation gibt es weitere Unterschiede in den Signalketten des α_1 -Adrenozeptors und des Thromboxan A_2 -Rezeptors, welche aufgrund der unterschiedlichen Kontraktionsantwort im Organbad diskutiert werden sollen. Haba et al.¹⁵⁹ zeigten, dass die Bindung von Phenylephrin an G-Protein-gekoppelten Rezeptor G_q/G_{11} die Aktivität von ATP-sensitiven K^+ -Kanälen (K_{ATP}) an glatten Gefäßmuskelzellen vermindern.¹⁵⁹ Bindung von Thromboxan in Form seines Analogons U46619 am Rezeptor

G_{12}/G_{13} hatte hingegen keine Auswirkung auf die Reaktivität der ATP-sensitiven K^+ -Kanäle. Eine Aktivierung der K_{ATP} führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle und hiermit zu abgeschwächter Kontraktion oder verstärkter Relaxation.¹⁶⁰ Als zugrundeliegender Mechanismus wurde von den Autoren Modifikationen im PI3K/Akt-Signalweg identifiziert. Phenylephrin-Bindung, nicht jedoch Thromboxan-Bindung, führt zu Aktivierung spezifischer regulatorischer Untereinheiten der PI3K und mutmaßlich hierdurch zu erhöhten Konzentrationen von phosphorylierten Akt-Proteinen mit Phosphorylierung an Ser473 und Thr308. Akt in seiner aktiven Form Phospho-Akt wirkt dann inhibitorisch auf K_{ATP} und damit vasokonstriktorisch.¹⁵⁹ In Zelllinien von Brustkrebs-Zellen konnten erhöhte Konzentrationen von EZH2 wiederum mit erhöhten Konzentrationen an Phospho-Akt (Ser473) in Verbindung gebracht werden.¹⁶¹ Es ist also anzunehmen, dass EZH2 seinerseits ebenfalls in den PI3K/Akt-Signalweg eingreifen kann. Wird nun EZH2 gehemmt, könnte dies zu erniedrigten Konzentrationen von Phospho-Akt (Ser473) führen, sodass eine Kontraktion abgeschwächt wird, ausgelöst durch Modulation der K_{ATP} der glatten Gefäßmuskelzelle. Dies entspräche den Beobachtungen im Organbad. Der verstärkte Effekt nach Stimulation durch LPS kann dadurch erklärt werden, dass der PI3K/Akt-Signalweg unter LPS-Infektion stärker aktiv ist¹⁶² und sich ein Effekt so deutlicher demaskieren kann. Zur Verifikation dieser Annahme könnten die Organbadversuche mit dem K_{ATP} -Inhibitor Glibenclamid wiederholt werden. Unter K_{ATP} -Inhibition sollte der beobachtete Effekt nicht mehr nachweisbar sein. Außerdem sollte im Western-Blot eine geringere Konzentration von Phospho-Akt nach Inkubation mit GSK343 zu messen sein.

4.1.3 Möglicher Einfluss von EZH2 auf Interleukin-Signalwege

Bisher wurde ausgeführt, dass EZH2 offenbar keinen Einfluss auf die NO-Bioverfügbarkeit nimmt und ein Eingriff in die Signalkaskaden des α_1 -Adrenorezeptors und des Thromboxan A_2 -Rezeptors zunächst nicht nachweisbar waren. Spezifische Vergleiche mit zuvor nicht vorhandenen Studien ergaben, dass EZH2 in der LPS-induzierten Sepsis offenbar eine zentrale Rolle in der Vermittlung inflammatorischer Signale in Endothelzellen der kardialen Mikrozirkulation (CMVECs) einnimmt.¹⁶³ Auch im Skelettmuskel werden Apoptose und

Entzündungsreaktion in der Sepsis durch EZH2 mediiert.¹⁶⁴ Die beiden Studien zeigen die Induktion der lncRNA MALAT1 nach Behandlung von Mäusen mit LPS oder Induktion einer Sepsis durch Peritonitis. MALAT1 rekrutiert EZH2, im Komplex werden proinflammatorische Signalwege in der Zelle aktiviert und Apoptose im Skelettmuskel initiiert. Behandlung der septischen Maus mit Ulinastatin konnte die Induktion von EZH2 und MALAT1 vermindern und inflammatorische Prozesse abschwächen.¹⁶³ So finden sich nach Behandlung mit Ulinastatin deutlich geringere intestinale Konzentrationen von TNF- α und IL-6 in der peritonealen Sepsis.¹⁶⁵ Möglicherweise wird dieser Effekt durch Downregulation von EZH2 vermittelt. Wenn angenommen wird, dass eine Inhibition von EZH2 die Inflammationskaskade unter mLPS im Gefäß abschwächt, kann dies auch den beobachteten Phänotyp in der vorliegenden Arbeit nach Inhibitorbehandlung mit GSK343 erklären. Der Effekt der Inhibitorbehandlung demaskierte sich insbesondere nach Inkubation mit mLPS. Wie Strela et al.¹⁶⁶ ausführten, entwickeln Mauseortenpräparate nach anhaltender Inkubation mit mLPS eine Hyperkontraktilität. Sie stellen die These auf, dass die Hyperkontraktilität durch erhöhte Level an IL-6 und folgende *Smooth Muscle 22 α* (SM22 α)-Induktion bedingt wird. Möglicherweise ist der beobachtete Phänotyp nach GSK343-Behandlung und Inkubation mit LPS durch geringere Konzentrationen von IL-6 begründet, vermittelt durch die Inhibition der Methyltransferase-Aktivität von EZH2. Dies kann eine verzögerte Kontraktion der Aortenpräparate erklären. Inhibition von EZH2 würde hier nicht direkt in die Gefäßtonuskontrolle eingreifen, sondern vielmehr der Inflammation im Gefäßsystem entgegenwirken. Eine Behandlung mit EZH2-Inhibitoren könnten so eine mögliche zukünftige Rolle in der Sepsis-Therapie spielen.

Zusammengefasst zeigt sich nach Inkubation mit dem EZH2-Inhibitor GSK343 eine verzögerte Phenylephrin-induzierte Kontraktion der Aortenpräparate. Deutlich verstärkt wird dieser Effekt unter inflammatorischen Bedingungen. Es konnte ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt eine toxische Wirkung des Wirkstoffs ist, die Integrität des kontraktile Apparates der glatten Muskelzelle bleibt vorhanden. Die Wirkung wird nicht über eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit vermittelt. Auch Hinweise auf Änderungen am Downstream-Signaling von

α_1 -Adrenozeptor und des Thromboxan A₂-Rezeptor liegen nicht vor. Nach aktueller Studienlage könnte der Effekt durch einen veränderten Interleukin-Stoffwechsel unter inflammatorischen Bedingungen erklärt werden. Hierzu sollten in Zukunft weitere experimentelle Ansätze geführt werden, z.B. Messung von Interleukin 6-Konzentration in der Massenspektroskopie nach Inkubation mit GSK343 und mLPS.

4.2 Klinischer Ausblick: EZH2 in Krebs- und Sepsis-Therapie

Vergleichbar mit JARID1B sind Veränderungen der EZH2-Expression initial in verschiedenen Malignomen festgestellt worden. *EZH2* fungiert bei Krebserkrankungen häufig als Onkogen, die Prognose ist bei starker Expression von EZH2 im Tumorgewebe verschlechtert.¹⁶⁷ Eine signifikante Rolle spielt EZH2 in der Zellzykluskontrolle und Apoptose, wie in Zellen des Cholangiocarcinoms gezeigt.¹⁶⁸ Über eine gesteigerte VEGF-Expression induziert EZH2 auch die Neoangiogenese im Tumor und unterhält damit Wachstum und Metastasierung im klarzelligen Nierencarcinom.¹⁶⁹ Aufgrund der hohen Relevanz von EZH2 in der Pathogenese von Tumorerkrankungen und der mittlerweile gut erforschten molekularen Mechanismen im Tumorgewebe wurden mehrere Inhibitoren von EZH2 zur Systemtherapie bei Malignomen bis in die klinische Erprobung gebracht. Aktuell finden zehn klinische Studien mit dem EZH2-Inhibitor Tazemetostat (EPZ-6438, E7438) statt, die Indikation sind unterschiedliche hämatoonkologische Tumorentitäten, insbesondere B-Zell Lymphome, sowie diverse Weichteiltumore.¹⁶⁷ Eine erste klinische Zulassung für Tazemetostat erfolgte Januar 2020 in der Behandlung des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten epitheloiden Sarkoms.¹⁷⁰

Eine EZH2-Induktion wurde neben Tumorgewebe auch in verschiedenen fibrotischen Erkrankungen identifiziert. In der Literatur wird eine überschießende EZH2-Induktion im fibrotischen Umbau u.a. der Niere¹⁷¹, der Leber¹⁷² und der systemischen Sklerose¹⁷³ beschrieben. In der Pathogenese der idiopathischen Lungenfibrose (IPF) konnte eine Suppression der COX2-Synthese durch Methylierung am COX2-Promotor durch EZH2 festgestellt werden. Hierdurch wird die Synthese des antifibrotische Prostaglandins E2 reduziert.¹⁷⁴ Die Fibrose der Herzvorhöfe mit der häufigen klinischen Manifestation eines Vorhofflimmerns

wird durch Anregung von Fibroblasten im Herzmuskel u.a. durch Angiotensin II erklärt. Song et al.¹⁷⁵ zeigen, dass eine Inhibition von EZH2 im Herzen den fibrotischen Umbau durch Fibroblasten unter Angiotensin II-Stimulation verhindern kann. Dabei scheint EZH2 über den TGF- β -Smad Signalweg die Fibroblasten-Differenzierung zu beeinflussen.¹⁷⁵

In der vorliegenden experimentellen Arbeit konnte die Inkubation der Mauseaorta mit GSK343 unter inflammatorischen Bedingungen durch Inhibition von EZH2 eine Hyperkontraktilität nach mLPS-Stimulation vermindern. Dies ergibt unmittelbar die Frage, ob eine Inhibition von EZH2 in der Therapie der Sepsis eingesetzt werden könnte. Zhang et al.¹⁷⁶ beschreiben erstmalig erhöhte H3K27me3-Level und induzierte EZH2-Expression in septischen Patienten. Im Tiermodell wurden septische Mäuse mit dem EZH2-Inhibitor 3-DZNeP behandelt, mit deutlicher Verbesserung des Langzeitüberlebens und niedrigerer Inzidenz eines sepsisvermittelten akuten Lungenversagens (ARDS). Auf molekularer Ebene identifizierten die Autoren eine Verhinderung des Cytokinsturms, spezifisch wurden verminderte Konzentrationen von IFN- γ , TNF- α , IL-1 β und IL-6 nach Inhibitorbehandlung gemessen. Mechanistisch wird eine Induktion des protektiven PPAR γ -Signalwegs beschrieben, während proapoptisches Signaling in Form von STAT3 unterdrückt wird. In der Lunge wird durch Inhibitorbehandlung der Wechsel von Alveolarmakrophagen zu aktivierten M1-Makrophagen verhindert, welche durch proinflammatorische Mediatoren eine Rolle in der Entstehung des ARDS darstellen. Insgesamt ergibt sich das Bild, dass eine Inhibition von EZH2 in der Sepsis multiple protektive Effekte haben kann.¹⁷⁶ Dies entspricht auch den experimentellen Ergebnissen in dieser Arbeit.

4.3 Rolle von JARID1B in der Regulation des Gefäßtonus

Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss der Histondemethylase JARID1B auf den Gefäßtonus. Zunächst konnte mittels RT-qPCR gezeigt werden, dass JARID1B im Vergleich zu anderen Histondemethylasen im Endothel am stärksten transkribiert wird. Im Vergleich mit verschiedenen Zelltypen und Gewebearten im Western-Blot zeigte sich JARID1B insbesondere in humanen Monozyten sowie stärker noch in Gefäßendothelzellen exprimiert. Dies stützt die These, dass

JARID1B im Gefäßsystem eine wichtige Rolle in epigenetischen Anpassungsvorgängen des Endothels spielen könnte.

Zur Untersuchung der Hypothese, dass JARID1B auch Einfluss auf den Gefäßtonus nimmt, wurden Arteria mesenterica superior-Gefäßpräparate aus *Jarid1b*-Knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp in Vasoreaktivitätsstudien verwendet. Im Verlauf der Kontraktion zeigte sich kein messbarer Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Bei der Acetylcholin-induzierten Relaxation jedoch ergibt sich eine deutliche Linksverschiebung der DWK des *Jarid1b*-Knockouts im Vergleich zum Wildtyp (siehe 3.2.2). Dies bedeutet, dass Gefäße mit *Jarid1b*-Knockout eine beschleunigte Relaxation zeigen. Dieser Phänotyp konnte durch Inkubation von Wildtyp-Gefäßpräparaten mit dem JARID1-Inhibitor PBIT reproduziert werden (siehe 3.2.3). Auf welche Weise JARID1B auf die Gefäßtonusregulation Einfluss nehmen könnte, soll im Folgenden diskutiert werden.

4.3.1 Einfluss von *JARID1B*-Knockout auf die NO-Bioverfügbarkeit nicht nachweisbar

Ein Einfluss auf JARID1B auf den Stickstoffstoffmonoxid-Metabolismus von Gefäßzellen ist bisher nicht untersucht worden. Von JARID1B ist bekannt, dass dieses an den *NF-κB*-Promotor binden kann und hiermit *NF-κB* induziert.¹²⁸ Es wurde außerdem gezeigt, dass *NF-κB* die eNOS-Expression inhibiert.¹⁷⁷ Es ergibt sich die These, dass JARID1B inhibitorischen Einfluss auf die Vasodilatation mittels Repression der eNOS bzw. Inhibierung der NO-Synthese über *NF-κB* nimmt. Ein Knockout von *Jarid1b* sollte die *NF-κB*-Konzentration absinken lassen und dementsprechend im Knockout-Tier die eNOS-Synthese stärker induzieren. Ein verstärktes Ansprechen der Gefäße auf ACh-Inkubation im Organbad wäre zu erwarten. Die *Jarid1b*-KO-Maus zeigt eine solche verstärkte Relaxationsfähigkeit auf Inkubation mit Acetylcholin. Es erfolgten Versuche, welche die NO-Bioverfügbarkeit, Expression und Aktivierungszustand der NOS im Allgemeinen sowie von eNOS und iNOS im Vergleich zwischen Knockout- und Wildtyp-tieren untersuchten.

Analog zu den Versuchen mit GSK343 wurden Präparate aus dem *Jarid1b*-Knockout im Vergleich mit Wildtyp-Gefäßen mit dem NO-Synthaseinhibitor

L-NAME inkubiert und die Kontraktion gemessen (siehe 3.2.6.1). Ein signifikanter Unterschied im Kontraktionsverhalten der Präparate konnte nicht gezeigt werden. Da die induzierbare NO-Synthase iNOS im Gegensatz zur eNOS durch NF- κ B nicht reprimiert, sondern induziert¹⁷⁸ wird, wurde ebenfalls spezifisch die iNOS-Aktivität im Organbadversuch mittels Inkubation mit L-NIL untersucht. Auch in diesen Versuchen konnte kein signifikanter Unterschied im Kontraktionsverhalten festgestellt werden (siehe 3.2.6.2). Zusammengefasst lieferten die Versuchsreihen keinen Anhalt für Unterschiede in der NO-Bioverfügbarkeit. Dennoch ließen sie Rückschlüsse darauf zu, dass der Knockout von *Jarid1b* keine verminderte Kontraktionsfähigkeit der Gefäße im Allgemeinen nach sich zieht, wie zum Beispiel durch grundlegende Modifikationen des kontraktilen Apparats der Gefäße. Ansonsten wäre eine Einschränkung der maximalen Kontraktionskraft nach NO-Synthase-Inhibition im Knockout-Tier zu erwarten.

Zum abschließenden Ausschluss des Einflusses von *Jarid1b*-Knockout auf die endotheliale NO-Synthase als Ursache für den gefundenen Phänotyp der Knockout-Maus wurde der Aktivierungsgrad der eNOS in Knockout- und Wildtyp-Tier quantifiziert. Die eNOS-Funktion wird, wie in der Einleitung unter 1.1.4.1. ausgeführt, durch Phosphorylierung am Enzym aktiviert. Es wurde ein Western-Blot der Proteinisolate aus vollständigen Gefäßen der beiden Mausgruppen durchgeführt und anschließend mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper die phosphorylierte Form der eNOS markiert (siehe 3.2.6.3). In der quantifizierenden Fluoreszenzmessung konnte kein signifikanter Unterschied im Phosphorylierungsgrad oder Expressionslevel der eNOS zwischen Wildtyp und Knockout-Tier festgestellt werden.

Makrophagen, welche mit dem Endothel interagieren, kommt in der Entstehung endothelialer Dysfunktion und der Atherosklerose eine entscheidende Rolle zu.¹⁷⁹ Zudem wird, wie im Western-Blot gezeigt, JARID1B in Makrophagen stark exprimiert. Untersucht werden sollte die These, dass Veränderungen im Stoffwechsel oder im Migrationsverhalten dieser Zellen durch den *JARID1B*-Knockout ursächlich für den gefundenen Phänotyp sind. Hierzu wurden spezielle Knockout-Tiere gezüchtet, in welchen das *Jarid1b*-Gen ausschließlich in Zellen mit Lysozym M-Expression ausgeschaltet ist, nicht jedoch im übrigen Gewebe wie im Endothel. In Mäusen wird Lysozym M am stärksten in Makrophagen

exprimiert.¹⁸⁰ Gefäßpräparate dieser spezifischen Knockout-Tiere wurden im Organbad gegen Wildtyp-Tiere getestet (siehe 3.2.4.). Hier konnte der Phänotyp nicht mehr nachgewiesen werden. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass Veränderungen an den Immunzellen durch den *Jarid1b*-Knockout nicht ursächlich für das veränderte Relaxationsverhalten im globalen *Jarid1b*-Knockout Tier sind.

Analog zum spezifischen Knockout von *Jarid1b* in Makrophagen konnten auch Tiere gezüchtet werden, in welchen das Gen selektiv in Endothelzellen der Versuchstiere ausgeschaltet wurde. Die Endothelzellschicht stellt durch ihre Synthesemöglichkeit vasorelaxierender Signalstoffe wie NO, Prostaglandine, und endothelium-derived hyperpolarization (EDHF)-Faktoren sowie auch kontrahierender Transmitter das wichtigste Regulationselement in der Kontrolle des Gefäßtonus dar. Entsprechend stellt sich die Hypothese, dass Veränderungen in der Gefäßreaktivität durch Modifikationen an den Endothelzellen hervorgerufen werden. Um diese Hypothese zu untermauern, können die beschriebenen Knockout-Tiere getestet werden, in denen *Jarid1b* spezifisch in den Endothelzellen ausgeschaltet wurde (siehe 3.2.4.2). In der Testung im Organbad zeigten die Gefäßpräparate dieser Tiere jedoch keinen Unterschied in der Vasoreaktivität im Vergleich zum Wildtyp.

Um die daraus folgende Annahme zu prüfen, dass die Endothelzellschicht im *Jarid1b*-Knockout Tier nicht für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist, wurde ein weiteres Experiment mit Gefäßen durchgeführt, in welchen die Endothelzellschicht entfernt worden war (siehe 3.2.5). Um falsch-negative Ergebnisse im vorhergehenden Versuch auszuschließen, wurde das Endothel von Wildtyp- und globalen *Jarid1b*-Knockout-Tieren vor Testung im Organbad durch Behandlung mit Chaps-Puffer aus den Gefäßen ausgewaschen. Unbeeinflusst bleibt die Funktion der Tunica muscularis. Sollte der beschriebene Phänotyp durch Veränderungen an den Zellen der Muscularis hervorgerufen werden, sollte das spezifisch verstärkte Relaxationsverhalten nun auch bei den sogenannten „denudierten“ Gefäßen erkennbar sein. In den Versuchen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Dies widerspricht den Ergebnissen des endothel-spezifischen Knockouts, bei dem ebenfalls kein Phänotyp gefunden werden konnte. Hier muss relativierend

angemerkt werden, dass die Knockout-Effektivität im endothelspezifischen KO-Tier schlecht gemessen werden kann. Vorversuche zeigten, dass der *Jarid1b*-KO im Endothel teilweise nur unzureichend gelang. Entsprechend könnte es sich bei den Messungen des endothel-spezifischen Knockout-Tiers um falsch negative Ergebnisse handeln. Es ist anzunehmen, dass zur Ausbildung des Phänotyps ein intaktes Endothel benötigt wird.

4.3.2 Möglicher Einfluss des *JARID1B*-Knockouts auf Prostanoid-Signalwege

Veränderungen der NO-Bioverfügbarkeit scheinen den Phänotyp nicht zu begründen. Die neben NO wichtigsten vasoaktiven Autacoide sind Metabolite des Arachidonsäure-Stoffwechsels. Schematisch kann der Arachidonsäure-Stoffwechsel in der Zelle folgenderweise dargestellt werden (Abb. 25):

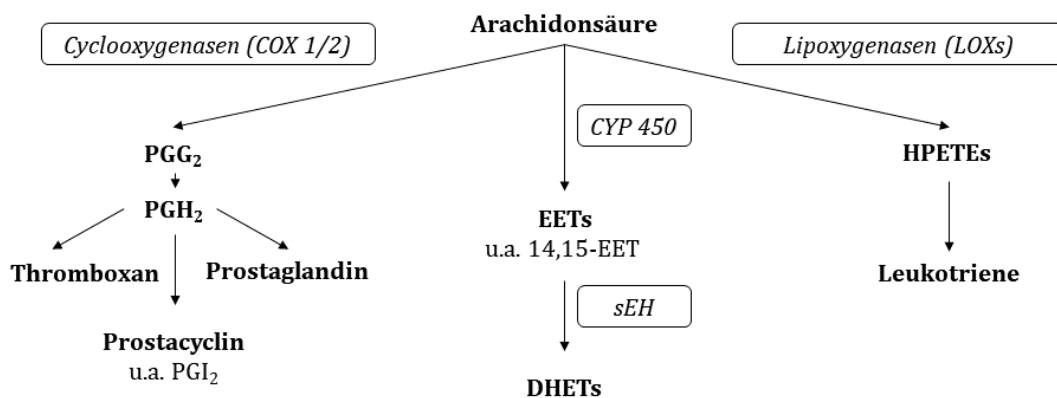


Abb. 25: Schema des Arachidonsäurestoffwechsels in Endothelzellen

Abbildung nach Martinez et. al.¹⁵⁹ und Martel-Pelletier et. al.¹⁶⁰

Neben NO spielt insbesondere das Arachidonsäure-Metabolit Prostacyclin (PGI₂) eine entscheidende Rolle in der endothel-abhängigen Gefäßrelaxation.^{181,182} Prostacyclin wird durch COX 1 und COX 2 in den Gefäßendothelzellen gebildet und ruft nach Diffusion an die glatten Muskelzellen eine starke Hyperpolarisation mit nachfolgender Relaxation hervor.^{182,183} Auf der Suche nach der Ursache des beobachteten Phänotyps sollte Prostacyclin neben NO in Betracht gezogen werden. In der Literatur findet sich eine mögliche Verknüpfung zwischen *JARID1B* und der Cyclooxygenase über den NF-κB Signalweg. *JARID1B* besitzt zwei Bindungsstellen in der Promoter-Region von *NF-κB* und wirkt dort als Promotor

der Transkription.¹²⁸ Gezeigt wurde weiter, dass die Induktion der Cyclooxygenase ebenfalls vom NF- κ B Signalweg abhängig ist.¹⁸⁴ Bei einem Knockout von *JARID1B* wäre also eher eine verminderte NF- κ B Expression zu erwarten und folgend auch eine verminderte COX2-Induktion. Ob Prostacyclin für den beobachteten Phänotyp verantwortlich ist, wäre im Organbad durch Zusatz von Diclofenac, einem COX-Inhibitor, zu untersuchen. Wird der Phänotyp unter Diclofenac-Zusatz nicht mehr beobachtet, käme eine Veränderung der COX-synthetisierten Prostanoiden durch *JARID1B*-KO in Frage.

Neben NO und Prostacyclin sind mehrere Autacotide bekannt, welche im Endothel produziert werden und eine Hyperpolarisation und konsekutive Relaxation an der glatten Gefäßmuskulatur bewirken können. Zusammengefasst werden diese als endothelium-derived hyperpolarizing factors (EDHFs) bezeichnet. Hierunter fallen beispielsweise Metabolite des Arachidonsäure-Stoffwechsels wie EETs, aber auch H₂O₂, Kalium-Ionen oder C-type natriuretic peptide (CNP).¹⁸⁵

Um die These zu untersuchen, dass *JARID1B* Einfluss auf den Arachidonsäure-Metabolismus nimmt, wurden Präparate der AMS aus Wildtyp- und Knockout-Mäusen mittels U46619 vorkontrahiert und anschließend mit reiner Arachidonsäure im Organbad inkubiert (siehe 3.2.7). Es wurde, wie erwartet, eine deutliche Relaxation der Gefäßpräparate aufgezeichnet. Zwischen den beiden Gruppen konnte in diesem ersten Versuch kein Unterschied im Relaxationsverhalten gemacht werden. Dies schließt einen Einfluss von *JARID1B* auf die Prostanoid-Signalwege jedoch nicht aus. Im physiologischen Zustand, also ohne Inflammation oder Hypertension, wird ein großer Anteil der Arachidonsäure über COX1 (und zu geringerem Maße COX2) zu Prostaglandinen verstoffwechselt, der übrige Anteil über Cytochrom P450 und Lipoxygenasen zu weiteren, vasoaktiven Prostanoiden.¹⁸⁶ Wenn nun ein Einfluss von *JARID1B* abseits des COX 1 / 2-Signalweges angenommen wird, sollte dieser Versuch mit Inhibitoren der Cyclooxygenasen, beispielsweise mit Diclofenac, wiederholt werden. Ein Effekt auf die Signalwege der Arachidonsäuremetaboliten nach Verstoffwechslung durch Cytochrom P450 oder Lipoxygenasen könnte sich dann demaskieren. Des Weiteren sollten experimentelle Ansätze unter pathologischen Bedingungen wie

Inflammation oder Hypertension verfolgt werden. Hierzu könnten die Organpräparate zusätzlich mit murinem Lipopolysaccharid oder Angiotensin II inkubiert werden.

Wie bereits ausgeführt, induziert *JARID1B* *NF-kB*. Beschrieben ist, dass *NF-kB* auch an der Regulation von Cytochrom P450 beteiligt ist, welches im Gefäßsystem für die Synthese der u.a. vasorelaxierenden EETs verantwortlich ist. In Astrozyten wurde gezeigt, dass *NF-kB* direkt in die Promotor-Region von *CYP2J3* binden kann und dort als Repressor fungiert.¹⁸⁷ *CYP2J3* katalysiert insbesondere die Synthese gefäßrelaxierender Produkte wie 14,15-EET und 11,12-EET.^{188,189} Bei Knockout von *JARID1B* wäre eine verminderte *NF-kB* Expression zu erwarten. Eine mögliche Suppression von *CYP2J3* würde hierbei wegfallen und die Konzentration gefäßrelaxierender EETs wäre erhöht. Dies stellt eine mögliche Erklärung für den beobachteten Phänotyp dar. Experimentell könnte ein Organbadversuch mit Inkubation mit einem Cytochrom P450-Inhibitor wie 1-Aminobenzotriazol erwogen werden. Nach Inkubation mit diesem Inhibitor sollte bei Veränderung der *CYP2J3*-Aktivität durch *JARID1B* der Phänotyp nicht beobachtet werden können.

Tatsächlich konnte unsere Arbeitsgruppe nach Abschluss dieser experimentellen Arbeit zeigen, dass *JARID1B* unter inflammatorischen Bedingungen die lösliche Epoxid-Hydrolase (soluble epoxide hydrolase (sEH)) stabilisiert, welche antiinflammatorische Lipide, darunter 11,12-EET und 14,15-EET, degradiert. Entsprechend wirkt eine stabilisierte sEH proinflammatorisch unter dem Einfluss von Angiotensin II. Auf molekularer Ebene stabilisiert *JARID1B* den untranslatierten 3' Bereich der sEH-mRNA und erhöht damit die sEH-Translation. Im *JARID1B*-Knockout wird die Induktion der sEH durch Angiotensin II vermindert, sodass antiinflammatorische Lipide entsprechend länger bioaktiv bleiben. Somit kann *JARID1B* Knockout oder -Inhibition die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion unter Angiotensin II vorbeugen.¹³⁹ Dieser Einfluss auf den Prostanoid-Stoffwechsel kann den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Phänotyp erklären.

4.4 Klinischer Ausblick: JARID1B als Zielprotein in Krebstherapie, Gefäßerkrankungen und Inflammation

Die ursprüngliche Identifikation von *JARID1B* erfolgte in Zellen des Mammacarcinoms. Hier wurde eine klinische Relevanz der Histon-Demethylase angenommen, da *JARID1B* in Brustkrebszellen induziert ist und in bestimmten Tumorentitäten als Onkogen wirkt.^{190,191} Nach Identifikation des Gens und der Proteinfunktion als epigenetischer Regulator erfolgte auch die Untersuchung weiterer Malignome auf einen relevanten Einfluss von *JARID1B* auf die Tumorgenese oder auch Tumorsuppression. Bisher bekannt ist, dass *JARID1B* bei vielen malignen Erkrankungen als Onkogen oder Tumorsuppressorgen wirkt, hierunter im malignen Melanom, Bronchialcarcinom, Blasenkarzinom, hepatocellulären Carcinom, Leukämien und weiteren.¹⁹⁰ In der überwiegenden Mehrzahl scheint die Rolle von *JARID1B* die eines möglichen Onkogens zu sein. Entsprechend groß ist das Interesse an einem spezifischen und effektiven, enteral oder parenteral verabreichbaren Inhibitor. Bisher wurden mehrere „small-inhibitor“ Moleküle identifiziert, welche jedoch teilweise eine unzureichende Spezifität aufweisen.¹⁹² In der klinischen Erprobung befindet sich aktuell keiner der bekannten Inhibitoren. Es wurde gezeigt, dass *JARID1B* eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung spielt sowie in der Differenzierung von Stammzellen und in der Zellzykluskontrolle. Angenommen wird auch eine relevante Rolle bei DNA-Reparaturmechanismen und möglicherweise bei der Hämatopoese¹⁹⁰. Wie bereits ausgeführt, ist der *Jarid1b*-Knockout im Mäuseembryo letal, im Gegensatz beispielsweise zum *Jarid1a*-Knockout.¹²⁶ Es ist anzunehmen, dass *JARID1B* auch unter physiologischen Bedingungen in der adulten Zelle wichtige Regulationsmechanismen besitzt. Eine Anwendung als Systemtherapie erscheint deshalb bei vielfältigen möglichen unerwünschten Nebeneffekten unwahrscheinlich. Ein Einsatz im Sinne einer modernen „targeted therapy“ bei Malignomen ist in Zukunft jedoch ein vielversprechender Ansatz.¹⁹²

Über die Rolle von *JARID1B* im Gefäßsystem ist bisher wenig bekannt. Auch im Gefäßsystem scheint *JARID1B* eine wichtige Rolle in der Zellregulation und Differenzierung einzunehmen. Unter hypoxischen Bedingungen in der Pulmonalarterie zeigt sich *JARID1B* induziert, hier wurde ein NF- κ B abhängiger Signalweg beschrieben, welcher in der Pathophysiologie des pulmonalen Hypertonus

Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen steigert.¹²⁸ Analog erhält JARID1B im adulten Gefäßendothel durch Suppression von HOXA5 die Möglichkeit zur Neoangiogenese aufrecht.¹²⁷ Auf epigenetischer Ebene reguliert JARID1B die lncRNA MANTIS. Neue Studien geben Hinweise darauf, dass MANTIS nicht nur ein Regulationsfaktor der Angiogenese ist, sondern auch die Gefäßprotektion durch pleiotrope Statinwirkung und durch laminaren Blutfluss vermitteln kann.¹³⁰ Wie oben ausgeführt, nimmt JARID1B auf den Arachidonsäure-Metabolismus des Endothels Einfluss.¹³⁹ Arachidonsäure-Metabolite stellen neben NO wichtige Regulatoren des Gefäßtonus dar und haben häufig protektive Wirkung gegenüber Gefäßinflammation und Entwicklung des arteriellen Hypertonus. Die Rolle von JARID1B in der Gefäßtonusregulation sollte genauer evaluiert werden. Möglicherweise kann durch Inhibition von JARID1B eine gefäßprotektive Wirkung erzeugt werden. Neueste Studien offenbaren auch eine Rolle von Histondemethylasen in systemischer Inflammation und Sepsis. Suppression von JARID1A durch den Wirkstoff Dexmedetomidin verringert das Auftreten von Nierenversagen im Sepsis-Mausmodell.¹⁹³ Die Rolle von Histondemethylasen wie JARID1B im Gefäßsystem verbleiben unvollständig verstanden, sie scheinen aber in der Regulation der Gefäßdifferenzierung als auch im adulten Gefäßsystem relevante Rollen einzunehmen. Durch die Entwicklung spezifischer, ggf. auch zielgerichteter Inhibitoren können klinische Effekte in Zukunft vermutlich besser untersucht werden.

4.5 Kritik der Methodik

Die Inhibitorkonzentration von PBIT und GSK343 war mit jeweils 1 $\mu\text{mol/L}$ über 14h Inkubation recht niedrig gewählt. Bekannt ist ein IC_{50} -Wert für JARID1B für PBIT von 3 $\mu\text{mol/L}$.¹⁴³ Für GSK343 ist in Prostatacarcinomzellen eine IC_{50} für EZH2 von 3-4 $\mu\text{mol/L}$ gemessen worden.¹⁹⁴ In der Literatur ist eine Permeabilität ins Cytosol und Nucleus in der Zellkultur vorbeschrieben. Für beide Inhibitoren wurden vor Beginn der eigentlichen Versuchsreihe verschiedene Verdünnungsstufen im Organbad getestet. Bei Konzentrationen $>1 \mu\text{mol/L}$ zeigten die Gefäßpräparate jeweils eine verminderte Kontraktilität bei Depolarisation mittels kaliumreichen Puffers im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Inhibitor. Entsprechend wurde eine möglicherweise allgemein toxische Konzentration der Inhibitoren angenommen, ohne dass die Versuchsergebnisse auf tatsächliche epigenetische Modifikationen in den Zellen zurückzuführen wären. Bei der gewählten Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ waren solche Effekte nicht zu beobachten. Der Inhibitor PBIT verliert in höheren Konzentrationen außerdem die Spezifität für JARID1B und inhibiert dann die gesamte JARID1-Gruppe (JARID1A IC_{50} 6 $\mu\text{mol/L}$; JARID1C IC_{50} 4,9 $\mu\text{mol/L}$ ¹⁴³) – deshalb wurde hier eine möglichst niedrige Konzentration gewählt. Zur Validierung der Inhibitor-Behandlung wäre bei PBIT eine Messung der H3K4me3/me2-Level zu erwägen gewesen respektive eine Messung von H3K27me3 bei GSK343.

Die Inkubationszeit der Inhibitorbehandlung betrug jeweils ca. 14h. Ob diese Inkubationszeit für signifikante Änderungen der Histonmethylierung in den Gefäßpräparaten ausreichend ist, wurde nicht direkt gemessen. Viele Zellkulturexperimente in der Literatur verwenden längere Inkubationszeiten von mindestens 24h. Für GSK343-Behandlung von Zellkultur-Gliomzellen ist nach 8 Stunden eine signifikante Reduktion der H3K27-Trimethylierung gemessen worden.¹⁹⁵ Für PBIT-Inhibitorbehandlung ist kein solches time-course Experiment beschrieben. Limitierend auf die Inkubationszeit ist bei Gefäßpräparaten die Vitalität der Präparate nach Extraktion aus der Maus. Erfahrungsgemäß verlieren die Präparate bei Inkubation länger als 14h zunehmend an Kontraktilität im Organbadversuch, sodass eine Validität der Beobachtungen möglicherweise nicht mehr gegeben ist. Entsprechend erscheint eine längere Inhibitorbehandlung in diesem Versuchsmodell schwierig zu realisieren.

Die Versuche fanden in den beiden Gruppen *Jarid1b*-Knockout und EZH2-Inhibition an unterschiedlichen Gefäßen statt. In beiden Versuchsreihen wurden zunächst Präparate der Arteria carotis externa, der Aorta thoracica und der Arteria mesenterica superior im Organbad getestet. Beim *Jarid1b*-Knockout zeigte sich der Phänotyp ausgeprägt an der Arteria mesenterica superior, während in Aorta und Carotis weniger eindeutige Ergebnisse erkennbar waren. Für diesen Effekt kämen beispielsweise auch Unterschiede in der Präparationstechnik oder unspezifische Effekte im Inkubationszeitraum in Frage. Dennoch beobachteten auch Zhang et al.¹⁹⁶ an Ratten mit metabolischem Syndrom, dass die Gefäßrelaxation auf ACh-Inkubation in der Aorta insbesondere von NO und Prostacyclin bestimmt wird, während die Relaxation in der Mesenterialarterie von EETs abhängig ist. Da der Phänotyp des *JARID1B*-Knockouts offenbar durch erhöhte EET-Konzentrationen bedingt ist, kann dies den besonders ausgeprägten Effekt an der Arteria mesenterica superior erklären.

In den Versuchen zu EZH2 wurden zunächst ebenfalls verschiedene Gefäße getestet, hier zeigte sich der Effekt nach Inhibitorbehandlung deutlich in Präparaten der Aorta thoracica. Hierbei handelt es sich um ein Leitungsgefäß, im Gegensatz zu Widerstandsgefäßen wie der A. mesenterica superior. Propagiert wird in dieser Arbeit eine protektive Wirkung der Inhibitorbehandlung auf die Gefäßdysfunktion in der mLPS-induzierten Sepsis. Es stellt sich die Frage, ob ein systemisch relevanter Effekt durch eine Inhibitorbehandlung zu erwarten wäre oder ein lokaler Effekt an der Aorta thoracica beobachtet wurde. Farmer et al.¹⁹⁷ zeigten, dass die Veränderungen in der katecholamin-induzierten Vasokonstriktion unter septischen Bedingungen in Aorta und Mesenterica vergleichbar sind. Auch das NO-Stoffwechselprofil in der LPS-Sepsis ist an Leitungs- und Widerstandsgefäßen ähnlich.¹⁹⁸ Entsprechend könnten an der Aorta untersuchte Effekte der Inhibitor-Behandlung von EZH2 auch auf Widerstandsgefäße übertragbar sein, zumindest in der mLPS-induzierten Sepsis, wie in dieser Arbeit durchgeführt.

5.1 Zusammenfassung

Einflüsse epigenetischer Mechanismen auf die Gefäßtonusregulation sind bisher kaum untersucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung bekannter epigenetischer Modifikatoren in der Gefäßtonuskontrolle aufzuzeigen und molekulare Mechanismen zu identifizieren. Hierzu wurden Vasoreaktivitätsstudien an Mausgefäßen im Organbad durchgeführt und molekularbiologische Methoden eingesetzt. Verwendet wurde ein Mausstamm mit induzierbarem Knockout der Histondemethylase JARID1B (KDM5B) sowie verschiedene Inhibitoren von Histonmethylasen und -demethylasen.

Mittlerweile sind eine Vielzahl an Inhibitoren epigenetischer Modifikatoren kommerziell erhältlich. Getestet wurde u.a. der Wirkstoff GSK343, welcher spezifisch die Funktion der H3K27me₃-Methyltransferase Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) inhibiert. Bekannt ist eine Beteiligung von EZH2 in der Carcinogenese sowie Zellzykluskontrolle. Unter basalen Bedingungen sowie deutlich verstärkt nach mehrstündiger Inkubation mit murinem Lipopolysaccharid (mLPS) zeigte sich eine verzögerte Phenylephrin-induzierte Kontraktion von Präparaten der murinen Aorta thoracica. Da unter inflammatorischen Bedingungen die induzierbare NO-Synthase iNOS stark induziert wird, wurde die Hypothese formuliert, dass eine höhere Bioverfügbarkeit von NO ursächlich für diese Beobachtung ist. NO ist ein potenter Vasodilator und wird im Gefäßendothel produziert. Organbadversuche mit Inhibitoren der iNOS und eNOS konnten jedoch keine Differenzen in der NO-Bioverfügbarkeit zeigen, weder vor noch nach Stimulation mit mLPS. Über schrittweise Depolarisation durch K⁺-Ionen konnte eine Beeinträchtigung des kontraktile Apparats der glatten Gefäßmuskelzellen ausgeschlossen werden. Auch die Thromboxan-induzierte Kontraktion, ausgelöst durch das Thromboxan-Analogon U46619, war nicht beeinflusst. Inhibition von EZH2 unter inflammatorischen Bedingungen, wie beispielsweise in der Sepsis, scheint einer Gefäßdysfunktion vorzubeugen. Dies geschieht unabhängig von der NO-Bioverfügbarkeit und ohne Beeinträchtigung der Kontraktilität der glatten Gefäßmuskelzellen sowie der Thromboxan-induzierten Gefäßkontraktion. Es ergibt sich die Hypothese, dass EZH2 nicht in die eigentliche Gefäßtonuskontrolle, sondern in der Transduktion inflammatorischer Signale involviert ist und damit in der Entstehung einer Gefäßdysfunktion. Diese

Annahme sollte weiter untersucht werden, da sich durch Inhibition von EZH2 eine mögliche Therapieoption in der Sepsis bietet. Neuste Publikationen bestätigen eine Rolle von EZH2 in der inflammatorischen Signalkaskade.

Die H3K4me3-Histondemethylase JARID1B wird in Gefäßendothelzellen stark exprimiert, bekannt sind eine Rolle in der Embryogenese, Cancerogenese sowie Angiogenese. Die Arteria mesenterica superior der Tamoxifen-induzierbaren globalen *Jarid1b*-Knockout Maus zeigte eine verstärkte Acetylcholin-induzierte Vasorelaxation. Diese Beobachtung konnte durch Behandlung von Wildtyp-Arterienpräparaten mit dem JARID1B-Inhibitor 2-(4-methylphenyl)-1,2-Benzisothiazol-3(2H)-on (PBIT) reproduziert werden. Ein spezifischer Knockout von *Jarid1b* in LysM+-Makrophagen zeigte keinen vergleichbaren Phänotyp. Untersucht wurde auch hier die Hypothese, dass Veränderungen der NO-Bioverfügbarkeit Ursache des beobachteten Phänotyps sind. Unterschiede in der NO-Bioverfügbarkeit, der Expression oder des Aktivierungsgrades der eNOS konnten in Versuchen mit Inhibitoren der Synthasen sowie mittels Proteinisolation nicht festgestellt werden. Neben NO wirken Metabolite der Arachidonsäure als Vasorelaxantien. Die Inkubation mit Arachidonsäure im Organbad ergab zunächst keine Unterschiede im Relaxationsverhalten zwischen Knockout- und Wildtypgefäßen. Zur weiteren Untersuchung der Hypothese veränderter Prostanoid-Signalwege sind weitere Studien notwendig. Nach Abschluss der Arbeit konnte gezeigt werden, dass der *JARID1B*-Knockout die lösliche Epoxid-Hydroxylase (sEH) destabilisiert und damit über verminderten Abbau von Epoxyeicosatriensäuren (EETs) relaxierend und unter Angiotensin II-Einfluss gefäßprotektiv wirkt.

Modifikationen der epigenetischen Regulation in Gefäßzellen wirken sich auf die Gefäßtonusregulation aus. Die Experimente in dieser Arbeit zeigen, dass dies abseits der häufigsten vasoaktiven Autacoid-Signalwege und unter bestimmten Voraussetzungen stattfinden kann. Epigenetische Regulation ermöglicht es, die Gefäßtonuskontrolle den Umgebungsbedingungen anzupassen und spielt in der Pathophysiologie von Gefäßerkrankungen eine entscheidende Rolle.

5.2 Conclusion

The role of epigenetic mechanisms in the control of the vessel tone are incompletely understood. The aim of this study was to unravel the relevance of known epigenetic modifiers in the regulation of vessel tone and to reveal underlying molecular mechanisms. Therefore, vessel reactivity studies were performed in an organ-bath setting. A mouse strain harboring an inducible knockout of histone-demethylase JARID1B (KDM5a) and different inhibitors of histone-methylases and demethylases were used.

Today, a variety of inhibitors of epigenetic modifying enzymes are commercially available. In this study, the agent GSK343, which specifically inhibits the function of the epigenetic repressor and H3K27me₃-methyltransferase Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), was used. EZH2 is known to play a role in carcinogenesis as well as cell-cycle control. Preparations of the murine thoracic aorta incubated with GSK343 showed a delayed phenylephrine-induced contraction. This effect was strongly increased after incubation with murine lipopolysaccharide (mLPS). Since inducible NO-Synthase (iNOS) is upregulated in inflammatory conditions it was proposed that an increased bioavailability of nitric oxide (NO) is responsible for the delayed contraction. NO is a potent vasodilator and is produced in the vascular endothelium. Nevertheless, organ-bath studies with inhibitors of endothelial NO-synthase (eNOS) and iNOS showed no differences for the bioavailability of NO, both before and after mLPS stimulation. Impairment of the contractile apparatus within vascular smooth muscle cells was excluded by induction of vessel-contraction with low concentrations of potassium ions. Also, thromboxane-induced contraction caused by the thromboxane-analogue U46619 was not affected. Inhibition of EZH2 under inflammatory conditions, like in sepsis, seemed to prevent vessel dysfunction. This was independent from NO-bioavailability and not caused by impairment of contractile apparatus. Also, thromboxane-induced contraction was not affected. It can be hypothesized that EZH2 might not directly interfere with the control of vessel tone but is rather involved in inflammatory signaling which causes vessel dysfunction. This hypothesis should be further investigated, as inhibition of EZH2 might prove valuable in therapy of sepsis and septic shock. Current publications prove an involvement of EZH2 in the inflammatory signaling cascade.

The H3K4me3-histone demethylase JARID1B is strongly expressed in human umbilical vein endothelial cells. It is known for its role in embryogenesis, angiogenesis, and carcinogenesis. Preparations of superior mesenteric arteries from tamoxifen-inducible JARID1B-knockout mice showed an increased acetylcholine-induced relaxation. This was reproduced by treatment with JARID1B-inhibitor 2-(4-(4-methylphenyl)-1,2-benzisothiazol-3(2H)-ylidene)propane-1-thione (PBIT). Specific knockout in endothelial cells and LysM⁺-macrophages did not show this phenotype. Again, it was hypothesized that altered bioavailability of NO causes this finding. However, differences in NO-bioavailability, eNOS activation or expression level between knockout- and wildtype-preparations could not be found using inhibitors of NO-synthases in organ bath as well as on protein level. Besides NO, metabolites of arachidonic acid act as vasorelaxant autacoids. A first approach of incubating both knockout- and wildtype mesenteric artery in organ-bath did not show differences in relaxation between the two groups. Further experiments should be performed to support the hypothesis of an influence of JARID1B-knockout on prostanoid-metabolism. After finishing this experimental study, JARID1B-knockout was proven to destabilize soluble epoxide-hydrolase (sEH), resulting in higher bioavailability of vasorelaxant Epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and therefore has a vasoprotective function under challenge with Angiotensin II.

Modifications of epigenetic mechanisms in the vasculature appear to have direct effects on the control of vessel tone. The results of this experimental study indicate that this is different to the common vasoactive autacoid-signaling pathways and exists under certain preconditions. Epigenetic regulation enables the vasculature to adapt to specific conditions and plays a decisive role in pathophysiology of vessel diseases.

6 Literaturverzeichnis

1. Yusuf S, Wood D, Ralston J, Reddy KS. The World Heart Federation's vision for worldwide cardiovascular disease prevention. *The Lancet*. 2015;386(9991):399-402. doi:10.1016/S0140-6736(15)60265-3.
2. Feinberg AP. Epigenomics reveals a functional genome anatomy and a new approach to common disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1049-1052. doi:10.1038/nbt1010-1049.
3. Werner RJ, Kelly AD, Issa J-PJ. Epigenetics and Precision Oncology. *Cancer J*. 2017;23(5):262-269. doi:10.1097/PPO.0000000000000281.
4. Rasool M, Malik A, Naseer MI, et al. The role of epigenetics in personalized medicine: challenges and opportunities. *BMC Med Genomics*. 2015;8 Suppl 1:S5. doi:10.1186/1755-8794-8-S1-S5.
5. Prasher D, Greenway SC, Singh RB. The impact of epigenetics on cardiovascular disease. *Biochem Cell Biol*. 2020;98(1):12-22. doi:10.1139/bcb-2019-0045.
6. J. Hartshorne D, Gorecka A. Biochemistry of the Contractile Proteins of Smooth Muscle. *Handbook of Physiology*. 1980. doi:10.1002/cphy.cp020204.
7. Kamm K. The Function of Myosin and Myosin Light Chain Kinase Phosphorylation in Smooth Muscle. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1985;25(1):593-620. doi:10.1146/annurev.pharmtox.25.1.593.
8. Liu Z, Khalil RA. Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2018. doi:10.1016/j.bcp.2018.02.012.
9. Benham CD, Hess P, Tsien RW. Two types of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery studied with whole-cell and single-channel recordings. *Circ Res*. 1987;61(4 Pt 2):6.
10. Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev*. 1979;59(3):606-718. doi:10.1152/physrev.1979.59.3.606.
11. Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of Physiology*. 1902;28(3):220-231. doi:10.1113/jphysiol.1902.sp000911.

12. Endo M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev.* 1977;57(1):71-108. doi:10.1152/physrev.1977.57.1.71.
13. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, eds. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie : mit Online-Repetitorium*. Sonderausgabe der 31. Auflage. Berlin: Springer; 2017.
14. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* 1994;372(6503):231. doi:10.1038/372231a0.
15. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* 1984;312(5992):315-321.
16. Somlyo AV, Bond M, Somlyo AP, Scarpa A. Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(15):5231-5235.
17. van Breemen C, Saida K. Cellular mechanisms regulating Ca²⁺ smooth muscle. *Annu Rev Physiol.* 1989;51:315-329. doi:10.1146/annurev.ph.51.030189.001531.
18. Salamanca DA, Khalil RA. Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(11):1537-1547. doi:10.1016/j.bcp.2005.07.017.
19. Mochly-Rosen D, Kauvar LM. Pharmacological regulation of network kinetics by protein kinase C localization. *Semin Immunol.* 2000;12(1):55-61. doi:10.1006/smim.2000.0207.
20. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1325-1358. doi:10.1152/physrev.00023.2003.
21. Metzger E, Imhof A, Patel D, et al. Phosphorylation of histone H3T6 by PKC β (I) controls demethylation at histone H3K4. *Nature.* 2010;464(7289):792-796. doi:10.1038/nature08839.
22. Sakurada S, Okamoto H, Takuwa N, Sugimoto N, Takuwa Y. Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. *Am J Physiol , Cell Physiol.* 2001;281(2):C571-8. doi:10.1152/ajpcell.2001.281.2.C571.
23. Kimura K, Ito M, Amano M, et al. Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase). *Science.* 1996;273(5272):245-248. doi:10.1126/science.273.5272.245.

24. Amano M, Ito M, Kimura K, et al. Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*. 1996;271(34):20246-20249. doi:10.1074/jbc.271.34.20246.
25. Fukata Y, Kaibuchi K, Amano M. Rho–Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2001;22(1):32-39. doi:10.1016/S0165-6147(00)01596-0.
26. Gunst SJ, Zhang W. Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am J Physiol , Cell Physiol*. 2008;295(3):C576-87. doi:10.1152/ajpcell.00253.2008.
27. Guimarães S, Moura D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev*. 2001;53(2):319-356.
28. BERSTROM S, EULER US von, HAMBERG U. Isolation of noradrenaline from suprarenal medulla. *Acta Physiol Scand*. 1950;20(1):101-108. doi:10.1111/j.1748-1716.1950.tb00687.x.
29. Zhong H, Minneman KP. α 1-Adrenoceptor subtypes. *European Journal of Pharmacology*. 1999;375(1):261-276. doi:10.1016/S0014-2999(99)00222-8.
30. Hein L, Kobilka BK. Adrenergic receptor signal transduction and regulation. *Neuropharmacology*. 1995;34(4):357-366. doi:10.1016/0028-3908(95)00018-2.
31. Capra V, Bäck M, Angiolillo DJ, Cattaneo M, Sakariassen KS. Impact of vascular thromboxane prostanoid receptor activation on hemostasis, thrombosis, oxidative stress, and inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2014;12(2):126-137. doi:10.1111/jth.12472.
32. Reilly M, Fitzgerald GA. Cellular activation by thromboxane A₂ and other eicosanoids. *Eur Heart J*. 1993;14 Suppl K:88-93.
33. Crescente M, Menke L, Chan MV, Armstrong PC, Warner TD. Eicosanoids in platelets and the effect of their modulation by aspirin in the cardiovascular system (and beyond). *Br J Pharmacol*. 2018. doi:10.1111/bph.14196.
34. Kinsella BT, O'Mahony DJ, Fitzgerald GA. The Human Thromboxane A₂ Receptor α Isoform (TP α) Functionally Couples to the G Proteins Gq and G11 In Vivo and is Activated by the Isoprostane 8-epi Prostaglandin F₂ α . *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;281(2):957-964. <http://jpet.aspetjournals.org/content/281/2/957.full.pdf>.

35. Brass LF, Shaller CC, Belmonte EJ. Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. *J Clin Invest.* 1987;79(4):1269-1275. doi:10.1172/JCI112947.
36. Raeymaekers L, Wuytack F, Casteels R. Subcellular fractionation of pig stomach smooth muscle. A study of the distribution of the (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase activity in plasmalemma and endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1985;815(3):441-454. doi:10.1016/0005-2736(85)90372-4.
37. Eggermont JA, Vrolix M, Raeymaekers L, Wuytack F, Casteels R. Ca²⁺-transport ATPases of vascular smooth muscle. *Circ Res.* 1988;62(2):266-278. doi:10.1161/01.RES.62.2.266.
38. Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev.* 1999;79(3):763-854. doi:10.1152/physrev.1999.79.3.763.
39. Grover AK, Kwan CY, Rangachari PK, Daniel EE. Na-Ca exchange in a smooth muscle plasma membrane-enriched fraction. *Am J Physiol.* 1983;244(3):C158-65. doi:10.1152/ajpcell.1983.244.3.C158.
40. Wegener AD, Simmerman HK, Lindemann JP, Jones LR. Phospholamban phosphorylation in intact ventricles. Phosphorylation of serine 16 and threonine 17 in response to beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem.* 1989;264(19):11468-11474.
41. Koss KL, Kranias EG. Phospholamban: A Prominent Regulator of Myocardial Contractility. *Circ Res.* 1996;79(6):1059-1063. doi:10.1161/01.RES.79.6.1059.
42. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:395-433. doi:10.1146/annurev.bi.56.070187.002143.
43. Somlyo AP, Somlyo AV. From pharmacomechanical coupling to G-proteins and myosin phosphatase. *Acta Physiol Scand.* 1998;164(4):437-448. doi:10.1046/j.1365-201X.1998.00454.x.
44. Murthy KS. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:345-374. doi:10.1146/annurev.physiol.68.040504.094707.

45. Wu X, Somlyo AV, Somlyo AP. Cyclic GMP-Dependent Stimulation Reverses G-Protein-Coupled Inhibition of Smooth Muscle Myosin Light Chain Phosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996;220(3):658-663. doi:10.1006/bbrc.1996.0460.
46. Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *The Journal of Physiology*. 1995;486 (Pt 1):47-58. doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020789.
47. Siegel G, Carl A, Adler A, Stock G. Effect of the prostacyclin analogue iloprost on K⁺ permeability in the smooth muscle cells of the canine carotid artery. *Eicosanoids*. 1989;2(4):213-222.
48. Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev*. 1997;77(4):1165-1232. doi:10.1152/physrev.1997.77.4.1165.
49. Foster MN, Coetzee WA. KATP Channels in the Cardiovascular System. *Physiol Rev*. 2016;96(1):177-252. doi:10.1152/physrev.00003.2015.
50. Loh YC, Tan CS, Ch'ng YS, Yeap ZQ, Ng CH, Yam MF. Overview of the Microenvironment of Vasculature in Vascular Tone Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(1):120. doi:10.3390/ijms19010120.
51. Zhou H-L, Fiscus RR. Brain natriuretic peptide (BNP) causes endothelium-independent relaxation and elevation of cyclic GMP in rat thoracic aorta. *Neuropeptides*. 1989;14(3):161-169. doi:10.1016/0143-4179(89)90040-1.
52. Maruhashi T, Kihara Y, Higashi Y. Assessment of endothelium-independent vasodilation: from methodology to clinical perspectives. *Journal of Hypertension*. 2018;36(7):1460-1467. doi:10.1097/HJH.0000000000001750.
53. Hatano Y, Mizumoto K, Yoshiyama T, Yamamoto M, Iranami H. Endothelium-dependent and -independent vasodilation of isolated rat aorta induced by caffeine. *Am J Physiol*. 1995;269(5 Pt 2):H1679-84. doi:10.1152/ajpheart.1995.269.5.H1679.
54. Vanhoutte PM. How We Learned to Say NO. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2009;29(8):1156-1160. doi:10.1161/ATVBAHA.109.190215.
55. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric

- oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(24):9265-9269.
doi:10.1073/pnas.84.24.9265.
56. Busse R, Mülsch A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Letters*. [FEBS Letters, 265(1-2), 133-136]. 1990;265(1-2):133-136. doi:10.1016/0014-5793(90)80902-U.
57. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399(6736):601-605. doi:10.1038/21224.
58. Harris MB, Ju H, Venema VJ, et al. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem*. 2001;276(19):16587-16591. doi:10.1074/jbc.M100229200.
59. Thors B, Halldórsson H, Thorgeirsson G. Thrombin and histamine stimulate endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation at Ser1177 via an AMPK mediated pathway independent of PI3K-Akt. *FEBS Letters*. 2004;573(1-3):175-180. doi:10.1016/j.febslet.2004.07.078.
60. Rees DD, Palmer RM, Hodson HF, Moncada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol*. 1989;96(2):418-424. doi:10.1111/j.1476-5381.1989.tb11833.x.
61. Lancaster JR. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide*. 1997;1(1):18-30. doi:10.1006/niox.1996.0112.
62. Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, Kimura H. Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Advances in cyclic nucleotide research*. 1978;9:145-158.
63. Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, et al. Isoforms of nitric oxide synthase Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*. 1991;42(10):1849-1857. doi:10.1016/0006-2952(91)90581-O.
64. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*. 1992;256(5054):225-228. doi:10.1126/science.1373522.

65. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, et al. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997;17(11):2479-2488. doi:10.1161/01.atv.17.11.2479.
66. Zhang YH. Neuronal nitric oxide synthase in hypertension - an update. *Clin Hypertens*. 2016;22:20. doi:10.1186/s40885-016-0055-8.
67. Mouchlis VD, Dennis EA. Phospholipase A2 catalysis and lipid mediator lipidomics. *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids*. 2019;1864(6):766-771. doi:10.1016/j.bbalip.2018.08.010.
68. Parkington HC, Coleman HA, Tare M. Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacological Research*. 2004;49(6):509-514. doi:10.1016/j.phrs.2003.11.012.
69. Mey JG de, Claeys M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 1982;222(1):166-173.
70. Alexandra - Rueben, Rüdiger Popp, Benjamin Keserü, Bruce D. Hammock, Rudi Busse, Ingrid Fleming. CYTOCHROME P450 2C-DERIVED EPOXYEICOSATRIENOIC ACIDS REGULATE CA²⁺ SIGNALLING AND HYPERPOLARIZATION IN ENDOTHELIAL CELLS. *The FASEB Journal*. 2006;20(5):A1288-A1288. doi:10.1096/fasebj.20.5.A1288-b.
71. Félétou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006;26(6):1215-1225. doi:10.1161/01.ATV.0000217611.81085.c5.
72. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res*. 1996;78(3):415-423. doi:10.1161/01.res.78.3.415.
73. Campbell WB, Falck JR. Arachidonic acid metabolites as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Hypertension*. 2007;49(3):590-596. doi:10.1161/01.HYP.0000255173.50317.fc.
74. Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2002;23(8):374-380. doi:10.1016/s0165-6147(02)02050-3.

75. Yu Z, Xu F, Huse LM, et al. Soluble Epoxide Hydrolase Regulates Hydrolysis of Vasoactive Epoxyeicosatrienoic Acids. *Circ Res*. 2000;87(11):992-998. doi:10.1161/01.RES.87.11.992.
76. Gimbrone MA, García-Cardeña G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-636. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
77. Lao KH, Zeng L, Xu Q. Endothelial and smooth muscle cell transformation in atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*. 2015;26(5):449-456. doi:10.1097/MOL.0000000000000219.
78. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109(23 Suppl 1):III27-32. doi:10.1161/01.CIR.0000131515.03336.f8.
79. Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation*. 2002;105(17):2107-2111. doi:10.1161/01.cir.0000014762.06201.06.
80. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, Grechko AV, Orekhov AN. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2017;95(11):1153-1165. doi:10.1007/s00109-017-1575-8.
81. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420(6917):868-874. doi:10.1038/nature01323.
82. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*. 2001;107(3):255-264. doi:10.1172/JCI10373.
83. Campos Munoz A, Vohra S, Gupta M. *StatPearls: Orthostasis*. Treasure Island (FL); 2020.
84. Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol*. 1992;54:227-241. doi:10.1146/annurev.ph.54.030192.001303.
85. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol , Cell Physiol*. 2007;292(1):C82-97. doi:10.1152/ajpcell.00287.2006.

86. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause K-H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly*. 2012;142:w13659. doi:10.4414/smw.2012.13659.
87. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996;97(8):1916-1923. doi:10.1172/JCI118623.
88. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000;20(3):645-651. doi:10.1161/01.atv.20.3.645.
89. Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. *Am J Physiol , Cell Physiol*. 2004;286(4):C779-84. doi:10.1152/ajpcell.00398.2003.
90. Hawiger J, Veach RA, Zienkiewicz J. New paradigms in sepsis: from prevention to protection of failing microcirculation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015;13(10):1743-1756. doi:10.1111/jth.13061.
91. Hawiger J, Musser JM. How to approach genome wars in sepsis? *Critical care (London, England)*. 2011;15(6):1007. doi:10.1186/cc10482.
92. Sharawy N. Vasoplegia in septic shock: do we really fight the right enemy? *Journal of Critical Care*. 2014;29(1):83-87. doi:10.1016/j.jcrc.2013.08.021.
93. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*. 2001;29(7):1303-1310. doi:10.1097/00003246-200107000-00002.
94. Hassan FI, Didari T, Khan F, Mojtahedzadeh M, Abdollahi M. The Role of Epigenetic Alterations Involved in Sepsis: An Overview. *CPD*. 2018;24(24):2862-2869. doi:10.2174/1381612824666180903114253.
95. Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD, eds. *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. [Cold Spring Harbor]: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1996. Cold Spring Harbor monograph; 32.

96. Nicoglou A, Merlin F. Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci*. 2017;66:73-82. doi:10.1016/j.shpsc.2017.10.002.
97. Schleithoff C, Voelter-Mahlknecht S, Dahmke IN, Mahlke U. On the epigenetics of vascular regulation and disease. *Clin Epigenetics*. 2012;4(1):7. doi:10.1186/1868-7083-4-7.
98. Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol*. 2007;213(2):384-390. doi:10.1002/jcp.21224.
99. Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*. 2000;405(6785):482-485. doi:10.1038/35013100.
100. Adkins NL, Georgel PT. MeCP2: structure and function. *Biochem Cell Biol*. 2011;89(1):1-11. doi:10.1139/O10-112.
101. Yan MS-C, Matouk CC, Marsden PA. Epigenetics of the vascular endothelium. *J Appl Physiol*. 2010;109(3):916-926. doi:10.1152/jappphysiol.00131.2010.
102. Khalil AM, Guttman M, Huarte M, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(28):11667-11672. doi:10.1073/pnas.0904715106.
103. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 2009;10(3):155-159. doi:10.1038/nrg2521.
104. Morris KV, Chan SW-L, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science*. 2004;305(5688):1289-1292. doi:10.1126/science.1101372.
105. Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis*. 2015;35(1):3-11. doi:10.1055/s-0034-1397344.
106. Harteis S, Schneider S. Making the bend: DNA tertiary structure and protein-DNA interactions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(7):12335-12363. doi:10.3390/ijms150712335.
107. Xu Y-M, Du J-Y, Lau ATY. Posttranslational modifications of human histone H3: an update. *Proteomics*. 2014;14(17-18):2047-2060. doi:10.1002/pmic.201300435.

108. Tessarz P, Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(11):703-708. doi:10.1038/nrm3890.
109. Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:81-120. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.81.
110. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:75-100. doi:10.1146/annurev.biochem.76.052705.162114.
111. Ferrari KJ, Pasini D. Regulation and Function of DNA and Histone Methylations. *CPD.* 2012;19(4):719-733. doi:10.2174/1381612811306040719.
112. Jenuwein T, Laible G, Dorn R, Reuter G. SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS).* 1998;54(1):80-93. doi:10.1007/s000180050127.
113. Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, et al. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet.* 2007;39(3):311-318. doi:10.1038/ng1966.
114. Barski A, Cuddapah S, Cui K, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell.* 2007;129(4):823-837. doi:10.1016/j.cell.2007.05.009.
115. Seward DJ, Cubberley G, Kim S, et al. Demethylation of trimethylated histone H3 Lys4 in vivo by JARID1 JmjC proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(3):240-242. doi:10.1038/nsmb1200.
116. Yamane K, Tateishi K, Klose RJ, et al. PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Mol Cell.* 2007;25(6):801-812. doi:10.1016/j.molcel.2007.03.001.
117. Wei X, Yi X, Zhu X-H, Jiang D-S. Histone methylation and vascular biology. *Clin Epigenet.* 2020;12(1):30. doi:10.1186/s13148-020-00826-4.
118. Smits M, Mir SE, Nilsson RJA, et al. Down-regulation of miR-101 in endothelial cells promotes blood vessel formation through reduced repression of EZH2. *PLoS ONE.* 2011;6(1):e16282. doi:10.1371/journal.pone.0016282.
119. Lu C, Han HD, Mangala LS, et al. Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. *Cancer cell.* 2010;18(2):185-197. doi:10.1016/j.ccr.2010.06.016.

120. Delgado-Olguín P, Dang LT, He D, et al. Ezh2-mediated repression of a transcriptional pathway upstream of Mmp9 maintains integrity of the developing vasculature. *Development (Cambridge, England)*. 2014;141(23):4610-4617. doi:10.1242/dev.112607.
121. Lv Y-C, Tang Y-Y, Zhang P, et al. Histone Methyltransferase Enhancer of Zeste Homolog 2-Mediated ABCA1 Promoter DNA Methylation Contributes to the Progression of Atherosclerosis. *PLoS ONE*. 2016;11(6):e0157265. doi:10.1371/journal.pone.0157265.
122. Kumar A, Kumar S, Vikram A, et al. Histone and DNA methylation-mediated epigenetic downregulation of endothelial Kruppel-like factor 2 by low-density lipoprotein cholesterol. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2013;33(8):1936-1942. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301765.
123. Liang J, Li Q, Cai W, et al. Inhibition of polycomb repressor complex 2 ameliorates neointimal hyperplasia by suppressing trimethylation of H3K27 in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2019;176(17):3206-3219. doi:10.1111/bph.14754.
124. Li R, Yi X, Wei X, et al. EZH2 inhibits autophagic cell death of aortic vascular smooth muscle cells to affect aortic dissection. *Cell Death Dis*. 2018;9(2):180. doi:10.1038/s41419-017-0213-2.
125. Aljubran SA, Cox R, Tamarapu Parthasarathy P, et al. Enhancer of zeste homolog 2 induces pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e37712. doi:10.1371/journal.pone.0037712.
126. Albert M, Schmitz SU, Kooistra SM, et al. The histone demethylase Jarid1b ensures faithful mouse development by protecting developmental genes from aberrant H3K4me3. *PLoS genetics*. 2013;9(4):e1003461. doi:10.1371/journal.pgen.1003461.
127. Fork C, Gu L, Hitzel J, et al. Epigenetic Regulation of Angiogenesis by JARID1B-Induced Repression of HOXA5. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2015:ATVBAHA.115.305561. doi:10.1161/ATVBAHA.115.305561.
128. Li Y, Liu S, Zhang Y, et al. Histone demethylase JARID1B regulates proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells in mice with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension via nuclear factor-

- kappa B (NFkB). *Cardiovascular Pathology*. 2018;37:8-14. doi:10.1016/j.carpath.2018.07.004.
129. Leisegang MS, Fork C, Josipovic I, et al. Long Noncoding RNA MANTIS Facilitates Endothelial Angiogenic Function Clinical Perspective. *Circulation*. 2017;136(1):65-79. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026991.
130. Leisegang MS, Bibli S-I, Günther S, et al. Pleiotropic effects of laminar flow and statins depend on the Krüppel-like factor-induced lncRNA MANTIS. *Eur Heart J*. 2019;40(30):2523-2533. doi:10.1093/eurheartj/ehz393.
131. Dreger H, Ludwig A, Weller A, et al. Epigenetic regulation of cell adhesion and communication by enhancer of zeste homolog 2 in human endothelial cells. *Hypertension*. 2012;60(5):1176-1183. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.191098.
132. He A, Ma Q, Cao J, et al. Polycomb repressive complex 2 regulates normal development of the mouse heart. *Circ Res*. 2012;110(3):406-415. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.252205.
133. Delgado-Olguín P, Huang Y, Li X, et al. Epigenetic repression of cardiac progenitor gene expression by Ezh2 is required for postnatal cardiac homeostasis. *Nat Genet*. 2012;44(3):343-347. doi:10.1038/ng.1068.
134. Mitić T, Caporali A, Floris I, et al. EZH2 Modulates Angiogenesis In Vitro and in a Mouse Model of Limb Ischemia. *Molecular Therapy*. 2015;23(1):32-42. doi:10.1038/mt.2014.163.
135. Pojoga LH, Williams JS, Yao TM, et al. Histone demethylase LSD1 deficiency during high-salt diet is associated with enhanced vascular contraction, altered NO-cGMP relaxation pathway, and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(5):H1862-71. doi:10.1152/ajpheart.00513.2011.
136. Schmitz SU, Albert M, Malatesta M, et al. Jarid1b targets genes regulating development and is involved in neural differentiation. *The EMBO journal*. 2011;30(22):4586-4600. doi:10.1038/emboj.2011.383.
137. Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, et al. Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*. 2010;465(7297):483-486. doi:10.1038/nature09002.

138. Indra AK, Warot X, Brocard J, et al. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic acids research*. 1999;27(22):4324-4327. doi:10.1093/nar/27.22.4324.
139. Vasconez AE, Janetzko P, Oo JA, et al. The histone demethylase Jarid1b mediates angiotensin II-induced endothelial dysfunction by controlling the 3'UTR of soluble epoxide hydrolase. *Acta Physiologica*. doi:10.1111/apha.13168.
140. Matziaris T. *Charakterisierung des endothelialen hyperpolarisierenden Faktors (EDHF) in renalen Blutgefäßen*. [Frankfurt (Main), Univ., Diss., 2006].
141. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 1990;101(3):746-752. doi:10.1111/j.1476-5381.1990.tb14151.x.
142. Wei X, Yi X, Zhu X-H, Jiang D-S. Histone methylation and vascular biology. *Clin Epigenet*. 2020;12(1):30. doi:10.1186/s13148-020-00826-4.
143. Sayegh J, Cao J, Zou MR, et al. Identification of small molecule inhibitors of Jumonji AT-rich interactive domain 1B (JARID1B) histone demethylase by a sensitive high throughput screen. *J Biol Chem*. 2013;288(13):9408-9417. doi:10.1074/jbc.M112.419861.
144. Moore WM, Webber RK, Jerome GM, Tjoeng FS, Misko TP, Currie MG. L-N6-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem*. 1994;37(23):3886-3888. doi:10.1021/jm00049a007.
145. Pechlivani N, Ajjan RA. Thrombosis and Vascular Inflammation in Diabetes: Mechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Front Cardiovasc Med*. 2018;5. doi:10.3389/fcvm.2018.00001.
146. Birukov KG. Cyclic stretch, reactive oxygen species, and vascular remodeling. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(7):1651-1667. doi:10.1089/ars.2008.2390.
147. Liu Y, Croft KD, Hodgson JM, Mori T, Ward NC. Mechanisms of the protective effects of nitrate and nitrite in cardiovascular and metabolic diseases. *Nitric Oxide*. 2020;96:35-43. doi:10.1016/j.niox.2020.01.006.

148. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-142.
149. Kopincova J, Puzserova A, Bernatova I. L-NAME in the cardiovascular system - nitric oxide synthase activator? *Pharmacol Rep.* 2012;64(3):511-520. doi:10.1016/s1734-1140(12)70846-0.
150. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:707-736. doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.003423.
151. Zhu W-S, Tang C-M, Xiao Z, et al. Targeting EZH1 and EZH2 contributes to the suppression of fibrosis-associated genes by miR-214-3p in cardiac myofibroblasts. *Oncotarget.* 2016;7(48):78331-78342. doi:10.18632/oncotarget.13048.
152. Wakino S, Hayashi K, Kanda T, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Ligands Inhibit Rho/Rho Kinase Pathway by Inducing Protein Tyrosine Phosphatase SHP-2. *Circ Res.* 2004;95(5):e45-e55. doi:10.1161/01.RES.0000142313.68389.92.
153. Simonin M-A, Bordji K, Boyault S, et al. PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am J Physiol , Cell Physiol.* 2002;282(1):C125-33. doi:10.1152/ajpcell.2002.282.1.C125.
154. Colville-Nash PR, Qureshi SS, Willis D, Willoughby DA. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. *J Immunol.* 1998;161(2):978-984.
155. Tsai M-H, Jiang MJ. Rho-kinase-mediated regulation of receptor-agonist-stimulated smooth muscle contraction. *Pflugers Arch.* 2006;453(2):223-232. doi:10.1007/s00424-006-0133-y.
156. Su I, Dobenecker M-W, Dickinson E, et al. Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell.* 2005;121(3):425-436. doi:10.1016/j.cell.2005.02.029.
157. Adler KB, Krill J, Alberghini TV, Evans JN. Effect of cytochalasin D on smooth muscle contraction. *Cell Motility.* 1983;3(5):545-551. doi:10.1002/cm.970030521.

158. Saito SY, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Cytochalasin D inhibits smooth muscle contraction by directly inhibiting contractile apparatus. *J Smooth Muscle Res.* 1996;32(2):51-60.
159. Haba M, Hatakeyama N, Kinoshita H, et al. The Modulation of Vascular ATP-Sensitive K⁺ Channel Function via the Phosphatidylinositol 3-Kinase–Akt Pathway Activated by Phenylephrine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;334(2):673-678. doi:10.1124/jpet.110.167775.
160. Rodrigo G, Standen N. ATP-Sensitive Potassium Channels. *CPD.* 2005;11(15):1915-1940. doi:10.2174/1381612054021015.
161. Gonzalez ME, DuPrie ML, Krueger H, et al. Histone Methyltransferase EZH2 Induces Akt-Dependent Genomic Instability and BRCA1 Inhibition in Breast Cancer. *Cancer Res.* 2011;71(6):2360-2370. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1933.
162. Hattori Y, Hattori S, Kasai K. Lipopolysaccharide activates Akt in vascular smooth muscle cells resulting in induction of inducible nitric oxide synthase through nuclear factor-kappa B activation. *European Journal of Pharmacology.* 2003;481(2-3):153-158. doi:10.1016/j.ejphar.2003.09.034.
163. Yu Z, Rayile A, Zhang X, Li Y, Zhao Q. Ulinastatin protects against lipopolysaccharide-induced cardiac microvascular endothelial cell dysfunction via downregulation of lncRNA MALAT1 and EZH2 in sepsis. *Int J Mol Med.* 2017;39(5):1269-1276. doi:10.3892/ijmm.2017.2920.
164. Yong H, Wu G, Chen J, et al. lncRNA MALAT1 Accelerates Skeletal Muscle Cell Apoptosis and Inflammatory Response in Sepsis by Decreasing BRCA1 Expression by Recruiting EZH2. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2020;19:97-108. doi:10.1016/j.omtn.2019.10.028.
165. Cao Y-Z, Tu Y-Y, Chen X, Wang B-L, Zhong Y-X, Liu M-H. Protective effect of Ulinastatin against murine models of sepsis: inhibition of TNF- α and IL-6 and augmentation of IL-10 and IL-13. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie.* 2012;64(6):543-547. doi:10.1016/j.etp.2010.11.011.
166. Strela FB, Brun BF, Berger RCM, et al. Lipopolysaccharide exposure modulates the contractile and migratory phenotypes of vascular smooth muscle cells. *Life Sci.* 2020;241:117098. doi:10.1016/j.lfs.2019.117098.

167. Yan K-S, Lin C-Y, Liao T-W, et al. EZH2 in Cancer Progression and Potential Application in Cancer Therapy: A Friend or Foe? *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(6):1172. doi:10.3390/ijms18061172.
168. Hubaux R, Thu KL, Coe BP, MacAulay C, Lam S, Lam WL. EZH2 promotes E2F-driven SCLC tumorigenesis through modulation of apoptosis and cell-cycle regulation. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2013;8(8):1102-1106. doi:10.1097/JTO.0b013e318298762f.
169. Xu ZQ, Zhang L, Gao BS, et al. EZH2 promotes tumor progression by increasing VEGF expression in clear cell renal cell carcinoma. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2015;17(1):41-49. doi:10.1007/s12094-014-1195-5.
170. Hoy SM. Tazemetostat: First Approval. *Drugs*. 2020;80(5):513-521. doi:10.1007/s40265-020-01288-x.
171. Zhou X, Xiong C, Tolbert E, Zhao TC, Bayliss G, Zhuang S. Targeting histone methyltransferase enhancer of zeste homolog-2 inhibits renal epithelial-mesenchymal transition and attenuates renal fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2018;32(11):fj201800237R. doi:10.1096/fj.201800237R.
172. Zhao H, Wang Z, Tang F, et al. Carnosol-mediated Sirtuin 1 activation inhibits Enhancer of Zeste Homolog 2 to attenuate liver fibrosis. *Pharmacological Research*. 2018;128:327-337. doi:10.1016/j.phrs.2017.10.013.
173. Wasson CW, Abignano G, Hermes H, et al. Long non-coding RNA HOTAIR drives EZH2-dependent myofibroblast activation in systemic sclerosis through miRNA 34a-dependent activation of NOTCH. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2020;79(4):507-517. doi:10.1136/annrheumdis-2019-216542.
174. Coward WR, Feghali-Bostwick CA, Jenkins G, Knox AJ, Pang L. A central role for G9a and EZH2 in the epigenetic silencing of cyclooxygenase-2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014;28(7):3183-3196. doi:10.1096/fj.13-241760.

175. Song S, Zhang R, Mo B, et al. EZH2 as a novel therapeutic target for atrial fibrosis and atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;135:119-133. doi:10.1016/j.yjmcc.2019.08.003.
176. Zhang Q, Sun H, Zhuang S, et al. Novel pharmacological inhibition of EZH2 attenuates septic shock by altering innate inflammatory responses to sepsis. *Int Immunopharmacol.* 2019;76:105899. doi:10.1016/j.intimp.2019.105899.
177. Lee K-S, Kim J, Kwak S-N, et al. Functional role of NF- κ B in expression of human endothelial nitric oxide synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2014;448(1):101-107. doi:10.1016/j.bbrc.2014.04.079.
178. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 2004;75(6):639-653. doi:10.1016/j.lfs.2003.10.042.
179. Groh L, Keating ST, Joosten LAB, Netea MG, Riksen NP. Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Semin Immunopathol.* 2018;40(2):203-214. doi:10.1007/s00281-017-0656-7.
180. Cross M, Mangelsdorf I, Wedel A, Renkawitz R. Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(17):6232-6236.
181. Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacological Research.* 2004;49(6):503-508. doi:10.1016/j.phrs.2003.11.015.
182. Williams SP, Dorn GW, Rapoport RM. Prostaglandin I₂ mediates contraction and relaxation of vascular smooth muscle. *Am J Physiol.* 1994;267(2 Pt 2):H796-803. doi:10.1152/ajpheart.1994.267.2.H796.
183. Marcus AJ, Weksler BB, Jaffe EA, Broekman MJ. Synthesis of prostacyclin from platelet-derived endoperoxides by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1980;66(5):979-986. doi:10.1172/JCI109967.
184. Syeda F, Grosjean J, Houliston RA, et al. Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cells require cooperation between mitogen-activated protein kinase and NF- κ B pathways. *J Biol Chem.* 2006;281(17):11792-11804. doi:10.1074/jbc.M509292200.

185. Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. 2009;202(2):330-344. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.008.
186. Rosolowsky M, Campbell WB. Role of PGI₂ and epoxyeicosatrienoic acids in relaxation of bovine coronary arteries to arachidonic acid. *Am J Physiol*. 1993;264(2 Pt 2):H327-35. doi:10.1152/ajpheart.1993.264.2.H327.
187. Navarro-Mabarak C, Mitre-Aguilar IB, Camacho-Carranza R, Arias C, Zentella-Dehesa A, Espinosa-Aguirre JJ. Role of NF- κ B in cytochrome P450 epoxygenases down-regulation during an inflammatory process in astrocytes. *Neurochem Int*. 2019;129:104499. doi:10.1016/j.neurochem.2019.104499.
188. Zeldin DC. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem*. 2001;276(39):36059-36062. doi:10.1074/jbc.R100030200.
189. Oltman CL, Weintraub NL, VanRollins M, Dellsperger KC. Epoxyeicosatrienoic acids and dihydroxyeicosatrienoic acids are potent vasodilators in the canine coronary microcirculation. *Circ Res*. 1998;83(9):932-939. doi:10.1161/01.res.83.9.932.
190. Han M, Xu W, Cheng P, Jin H, Wang X. Histone demethylase lysine demethylase 5B in development and cancer. *Oncotarget*. 2017;8(5):8980-8991. doi:10.18632/oncotarget.13858.
191. Barrett A, Madsen B, Copier J, et al. PLU-1 nuclear protein, which is up-regulated in breast cancer, shows restricted expression in normal human adult tissues: a new cancer/testis antigen? *Int J Cancer*. 2002;101(6):581-588. doi:10.1002/ijc.10644.
192. Harmeyer KM, Facompre ND, Herlyn M, Basu D. JARID1 Histone Demethylases: Emerging Targets in Cancer. *Trends Cancer*. 2017;3(10):713-725. doi:10.1016/j.trecan.2017.08.004.
193. Liu Y, Yu Y, Zhang J, Wang C. The therapeutic effect of dexmedetomidine on protection from renal failure via inhibiting KDM5A in lipopolysaccharide-induced sepsis of mice. *Life Sci*. 2019;239:116868. doi:10.1016/j.lfs.2019.116868.
194. Verma SK, Tian X, LaFrance LV, et al. Identification of Potent, Selective, Cell-Active Inhibitors of the Histone Lysine Methyltransferase EZH2. *ACS Med Chem Lett*. 2012;3(12):1091-1096. doi:10.1021/ml3003346.

195. Yu T, Wang Y, Hu Q, et al. The EZH2 inhibitor GSK343 suppresses cancer stem-like phenotypes and reverses mesenchymal transition in glioma cells. *Oncotarget*. 2017;8(58):98348-98359. doi:10.18632/oncotarget.21311.
196. Zhang L-N, Vincelette J, Chen D, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates endothelial dysfunction in animal models of diabetes, obesity and hypertension. *European Journal of Pharmacology*. 2011;654(1):68-74. doi:10.1016/j.ejphar.2010.12.016.
197. Farmer MR, Roberts RE, Gardiner SM, Ralevic V. Effects of in vivo lipopolysaccharide infusion on vasoconstrictor function of rat isolated mesentery, kidney, and aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306(2):538-545. doi:10.1124/jpet.103.051805.
198. Chauhan SD, Seggara G, Vo PA, Macallister RJ, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(6):773-775. doi:10.1096/fj.02-0668fje.

7 Eigene Veröffentlichungen

Fork, Christian; Vasconez, Andrea E.; **Janetzko, Patrick**; Angioni, Carlo; Schreiber, Yannick; Ferreirós, Nerea et al. (2017): Epigenetic control of microsomal prostaglandin E synthase-1 by HDAC-mediated recruitment of p300. In: *Journal of lipid research* 58 (2), S. 386–392. DOI: 10.1194/jlr.M072280.

Rezende, Flavia; Moll, Franziska; Walter, Maria; Helfinger, Valeska; Hahner, Fabian; **Janetzko, Patrick** et al. (2018): The NADPH oxidizers NoxO1 and p47phox are both mediators of diabetes-induced vascular dysfunction in mice. In: *Redox biology* 15, S. 12–21. DOI: 10.1016/j.redox.2017.11.014.

Vasconez, Andrea E.; **Janetzko, Patrick**; Oo, James A.; Pflüger-Müller, Beatrice; Ratiu, Corina; Gu, Lunda et al. (2019): The histone demethylase Jarid1b mediates angiotensin II-induced endothelial dysfunction by controlling the 3'UTR of soluble epoxide hydrolase. In: *Acta Physiologica*. DOI: 10.1111/apha.13168.

Posterpräsentation Jahrestagung DGK Mannheim 2016

Janetzko P, Fork C, Leisegang M.S., Brandes R.P.

The Histone Demethylase JARID1B regulates vessel tone through lipid-mediators

8 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Einfluss epigenetischer Modifikationen auf die Regulation des Gefäßtonus

in dem Institut für Physiologie I (Kardiovaskuläre Physiologie) unter Betreuung und Anleitung von Dr. habil. Matthias Leisegang mit Unterstützung durch Prof. Dr. Ralf R. Brandes und Dr. Christian Fork und ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden (oder werden) in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Fork, Christian; Gu, Lunda; Hitzel, Juliane; Josipovic, Ivana; Hu, Jiong; Wong, Michael SzeKa; Ponomareva, Yuliya; Albert, Mareike; Schmitz, Sandra U.; Uchida, Shizuka; Fleming, Ingrid; Helin, Kristian; Steinhilber, Dieter; Leisegang, Matthias S.; Brandes, Ralf P.: Epigenetic Regulation of Angiogenesis by JARID1B-Induced Repression of HOXA5. In: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 35,1645–1652, 2017

Reichelsheim, 04.10.2021

(Ort, Datum)



(Unterschrift)