

DISSERTATION

**Der Einfluss der Histondemethylase KDM2B auf die
Entstehung von Atherosklerose im *in vivo*-Mausversuch**

The influence of the histone demethylase KDM2B on the
development of atherosclerosis in an *in vivo* mouse
experiment

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Alexandros Krull

Erstbetreuung: Privat Dozent Dr. med. Till Althoff

Datum der Promotion: 29.11.2024

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
1.1 Abstract	3
2 Einleitung	4
2.1 Erkrankungen des kardiovaskulären Systems als Todesursache	4
2.2 Atherosklerose	4
2.2.1 Einfluss von Blutfluss und endothelialer Scherkräfte auf die Entstehung von Artherosklerose	6
2.3 Epigenetik und Histonmodifikation	8
2.4 Das humane KDM2B-Gen	9
2.4.1 Die Struktur von KDM2B	11
2.4.2 Die biologische Bedeutung von KDM2B	12
2.4.3 Die Rolle von KDM2B2 in der Onkologie	13
2.4.4 Die Rolle von KDM2B bei internistischen Erkrankungen	15
2.5 Zielsetzung	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Tamoxifen-induzierter Knockdown	17
3.2 Modell der partiellen Ligatur der Arteria carotis	21
3.3 Perfusionsfixation und Dissektion der rechten und linken Arteria carotis	25
3.3.1 Vorbereitung der Perfusionspritzen und des Operationsplatzes	26
3.3.2 Präparation des Tieres für die Perfusionsfixation	26
3.3.3 Perfusionsfixation	28
3.3.4 Dissektion	28
3.3.5 Aufbewahrung der Gewebeproben	30
3.4 Paraffineinbettung der Gewebeproben	31
3.5 Schnittpräparation der Gewebeproben mit dem Mikrotom	33
3.6 Auswahl der Referenzschnitte	35

3.7	Histologische Färbung	36
3.8	Digitalisierung der Gewebeschnitte	38
3.9	Planimetrie	38
3.10	Berechnung des Plaquevolumens	40
4	Ergebnisse	44
4.1	Operierte Tiere	44
4.2	Gewichtsverlauf	44
4.3	Intima- bzw. Plaquefläche	45
4.4	Fläche unter der Kurve als Plaquevolumen	47
4.5	Repräsentative histologische Gewebeschnitte	49
4.6	Männliche und weibliche Unterscheidung	51
5	Diskussion	53
5.1	Histonmethylierung in Atherosklerose	54
5.2	KDM2B und Inflammation	56
5.3	KDM2B und die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase	56
6	Zusammenfassung und Ausblick	57
7	Literaturverzeichnis	58
8	Anhang	68
	Eidesstattliche Versicherung	68
	Lebenslauf	69
	Publikationsliste	70
	Danksagung	71
	Bescheinigung des akkreditierten Statistikers	72

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

3T3-L1	Mauszellen des Fettgewebes
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ATP	Adenosintriphosphat
Bit	Binary digit
c-Myc	MYC Proto-Oncogene
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CpG	Desoxycytidin–Phosphorsäure–Desoxyguanosin (in 5'–3'-Richtung)
Cre	Cyclization recombinase
Cre-ER ^T	Cre-Rekombinase
CxxC	CxxC-Zink-Finger-Domäne
DCM	diabetic cardiomyopathy
DNA	Desoxyribonucleic acid
E3-Ligase	Ubiquitin-Protein-Ligasen E3
EC	Endothelzellen
eNOS	Endothelial nitric-oxide synthase
EtOH	Ethanol
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
F-box	F-box-Domäne
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAK	Focal Adhesion Kinase
fl	floxed (= flanked by loxP)
G1-Phase	Gap-1-Phase
H2A	Histon H2A
H2B	Histon H2B
H3	Histon H3
H3K4	Histon H3K4
H3K4me3	Dreifach methyliertes Histon H3K4
H3K9	Histon H3K9
H3K27	Histon H3K27
H3K36	Histon H3K36
H3K36me2	Zweifach methyliertes Histon H3K36

H4	Histon H4
HGNC	HUGO Gene Nomenclature Committee
HSCs	Hematopoietic stem cells
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IL-1	Interleukin-1
IL-12	Interleukin-12
INF- γ	Interferon γ
JmjC	Jumonji C
KDM2B	Lysine Demethylase 2B (Synonyme: FBXL10, CXXC2, Fbl10, JHDM1B, PCCX2)
KG	Körpergewicht
Klf4	Kruppel Like Factor 4
LDL	Low Density-Lipoproteinen
let-7b	Tumor-Supressor lethal 7b
loxP	Locus of X-over P
LSD1	Lysin-spezifische Histon-Demethylase 1A
M.	Musculus
MCP-1	Monocyte Chemotractant Protein-1
me	Methylrest
MEFs	Mouse embryonic fibroblasts
mESCs	Mouse embryonic stem cells
MOB1	Mps One Binder 1
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
Nsg2	Neuronal Vesicle Trafficking Associated 2
Oct4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
p	P-Wert (p für lateinisch probabilitas = Wahrscheinlichkeit)
p15 ^{Ink4b}	Cyclin Dependent Kinase 4 Inhibitor B
p16 ^{Ink4a}	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
p19 ^{Arf}	Alternate reading frame tumor
p53	p53-Protein
PBS	Phosphate-buffered saline
PHD	Plant homeodomain
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen

PKC-β2	Protein Kinase C β2
Pparg	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Pr	Protein
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1
RGB	RGB-Farbraum (R = red; G = green; B = blue)
RNA	Ribonucleic acid
SCF	SKP1-cullin-F-box
Sox2	SRY-Box transcription factor 2
Tie2	Tamoxifen-induzierte cre (= cyclization recombinase)-Recombinase
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Ub	Ubiquitin
V.	Vena
X'	Zweiter Abzissenwert
X''	Erster Abzissenwert
Y'	Erster Ordinatenwert
Y''	Zweiter Ordinatenwert

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1:	Die Struktur von KDM2B	11
Abbildung 3.1:	Schematische Zeichnung der Ligatur-Operation	23
Abbildung 3.2:	Skizze zur Berechnung des Plaquevolumens aus der Länge des Gefäßabschnittes und der Intimafläche	40
Abbildung 3.3:	Plauefläche in Abhängigkeit zur Länge des Gefäßabschnittes für das Versuchstier TAL-007849	41
Abbildung 3.4:	Berechnung des Plaquevolumens	42
Abbildung 4.1:	Summierte Plauefläche aller Versuchstiere der KDM2B-Wildtyp- und KDM2B-Knockdown-Versuchsgruppe über die Länge des jeweiligen Gefäßabschnittes	46
Abbildung 4.2:	Plauefläche der unterschiedlichen Versuchsgruppen inklusive der Einzelwerte	47
Abbildung 4.3:	Durchschnittliches Plaquevolumen über alle Gefäßabschnitte der unterschiedlichen Versuchsgruppen in μm^3	48
Abbildung 4.4:	Repräsentative histologische Schnitte	50
Abbildung 4.5:	Unterschiede der Summierten Plauefläche und des summierten Plaquevolumens nach Geschlecht	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Operierte Versuchstiere	18
Tabelle 3.1:	Operierte Versuchstiere Fortsetzung	19
Tabelle 3.2:	Primer für Genotypisierung der Mäuse	19
Tabelle 3.3:	Verwendete Materialien für den Knockdown	20
Tabelle 3.4:	Verwendete Materialien für die Ligatur-Operation	21
Tabelle 3.5:	Zusammensetzung der verwendeten Narkoselösung	22
Tabelle 3.6:	Verwendete Materialien für die Perfusionsfixation und Dissektion	25
Tabelle 3.7:	Verwendete Materialien für die Paraffineinbettung und Schnittpräparation	31
Tabelle 3.8:	Protokoll für die Einbettung der Gewebeproben	32
Tabelle 3.9:	Organisation der histologischen Schnitte	34
Tabelle 3.9:	Organisation der histologischen Schnitte (Fortsetzung)	35
Tabelle 3.10:	Verwendetes Material für die histologische Färbung	36
Tabelle 3.11:	Färbeprotokoll	37
Tabelle 3.12:	Verwendete Materialien für die Digitalisierung der histologischen Präparate	38
Tabelle 3.13:	Primärdaten der Planimetrierung für die legierte linke A. carotis communis beispielhaft dargestellt für das Versuchstier Nr. 15, TAL-007849 (vgl. Tabelle 3.1)	39
Tabelle 3.14:	Mit Gleichung (1) berechnete Werte der Intima- bzw. Plauefläche für den jeweiligen Gefäßabschnitt beispielhaft für das Versuchstier TAL-007849.	41
Tabelle 4.1:	Verteilung der Genotypen und des Geschlechts der Versuchstiere	44
Tabelle 4.2:	Gewichtsverlauf aufgeteilt nach Versuchsgruppe und nach Geschlecht innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe	45

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Weltweit sind die Folgen atherosklerotischer Erkrankungen die häufigste Todesursache. Bisweilen liegt der Schwerpunkt der medizinischen Behandlung auf der Vermeidung eines Fortschreitens der Erkrankung basierend auf Erkenntnissen bezüglich der bekannten Risikofaktoren wie beispielsweise der arteriellen Hypertonie, Rauchen, Adipositas, Diabetes oder verschiedene Dyslipidämien. In den letzten zwei Jahrzehnten erlangte das Forschungsgebiet rund um ein dysfunktionales Endothel als eine mögliche Ursache für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen an wissenschaftlichem Interesse. Atherosklerotische Plaques entstehen gehäuft an Prädilektionsstellen des kardiovaskulären Systems, an denen ein gestörtes Blutflussprofil Scherkräfte auf die Endothelzellen ausübt. Präliminäre *in vitro*-Versuche der Arbeitsgruppe Althoff, Charité – Universitätsmedizin Berlin zeigten, dass unter proatherogenem Fluss die Histondemethylase KDM2B in Endothelzellen signifikant geringer exprimiert ist als unter Anwendung eines physiologischen Flussprofils. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Einfluss der Histondemethylase KDM2B auf die Entstehung von Atherosklerose mittels partieller Ligatur der Arteria carotis communis und Tamoxifen-induziertem Endothel-spezifischen Knockdown im *in vivo*-Mausversuch zu untersuchen.

Ergebnisse: In der vorliegenden Arbeit konnte im *in vivo*-Mausversuch gezeigt werden, dass ein Tamoxifen-induzierter Endothel-spezifischer Knockdown von KDM2B zu einer erhöhten Bildung von atherosklerotischen Plaques führt.

Methoden: Hierfür wurden Mäuse mit einem Apolipoprotein E-Knockout und einem KDM2B-Gen, das mit einem Cre-/loxP-System modifiziert wurde, verwendet. Mittels partieller Ligatur der linken A. carotis communis konnte innerhalb von drei Wochen eine ausgeprägte Atherosklerose induziert werden. Anschließend erfolgte die histologische Aufarbeitung und Elastica-Färbung repräsentativer histologischer Präparate. Nach entsprechender Digitalisierung erfolgte die Auswertung und Quantifizierung der Plaqueflächen und die Berechnung des Plaquevolumens als maßgeblicher Vergleichswert.

Schlussfolgerung: Dem Protein KDM2B ist im Rahmen der komplexen molekularen Mechanismen der Entstehung atherosklerotischer Plaques eine signifikante Rolle zuzuschreiben. Fehlt KDM2B in Endothelzellen von Mäusen, kommt es geschlechtsunabhängig zu einer erhöhten Plaquebildung. Hier könnte sich in zukünftigen

Untersuchungen durchaus ein Ansatz für mögliche pharmakologische Zielstrukturen und gegebenenfalls Therapien zeigen.

1.1 Abstract

Background: Worldwide the consequences of atherosclerotic diseases remain the leading cause of death. At times, the focus of medical treatment of these diseases is on preventing the progression of the disease based known risk factors such as arterial hypertension, smoking, obesity, diabetes, or various dyslipidemias. However especially in the last two decades, the field of research about a dysfunctional endothelium as a possible cause for the development of atherosclerotic lesions gained scientific interest. Atherosclerotic plaques develop more frequently at predilective sites of the cardiovascular system where a disturbed blood flow profile exerts low shear stress upon the endothelial cells. Preliminary *in vitro* experiments of our research group have shown that under proatherogenic flow the histone demethylase KDM2B is significantly less expressed in endothelial cells than under application of a physiological flow profile.

The objective of the present work was to investigate the influence of the histone demethylase KDM2B on the development of atherosclerosis by partial ligation of the common carotid artery in an *in vivo* mouse experiment with a tamoxifen-induced endothelium-specific knockdown.

Results: In the present work it is demonstrated in an *in vivo* mouse model that a tamoxifen-induced endothelial-specific knockdown of KDM2B leads to an increased formation of atherosclerotic plaques.

Methods: For this purpose mice with an apolipoprotein E knockout and a Cre-/loxP system-modified KDM2B gene were used. By partial ligation of the left common carotid artery atherosclerosis was induced within three weeks. Subsequently, histological processing and elastica-staining of representative histological slides was performed. After digitalising the probes a quantification of the plaque areas and calculation of the area under the curve as the comparative value was accomplished.

Conclusion: The protein KDM2B holds a significant part in the complex molecular mechanisms of the development of atherosclerotic plaques. In mice the absence of KDM2B in endothelial cells, increases plaque formation irrespective of gender. Future investigations may reveal an approach for possible pharmacological targets and therapies.

2 Einleitung

2.1 Erkrankungen des kardiovaskulären Systems als Todesursache

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellten in 2019 weltweit die häufigste Todesursache mit ca. 18,6 Millionen Todesfällen und rund einem Drittel der Gesamtzahl der Todesfälle dar. Hierunter sind ca. 9 Millionen Todesfälle mit ca. 16 % der Gesamtzahl an weltweiten Todesfällen auf ischämische Herzerkrankungen zurückzuführen. Seit dem Jahre 2000 stieg die Anzahl der Todesfälle in Folge ischämischer Herzerkrankungen um über zwei Millionen (Global Burden of Disease Collaborative Network 2019, Roth et al. 2020).

Eine einkommensabhängigen Analyse der Weltgesundheitsorganisation zeigte auf, dass Länder mit einem hohen Bruttoeinkommen pro Kopf, wie u. a. Deutschland oder die USA, ein Rückgang der Todesfälle aufgrund ischämischer Herzerkrankungen in 2019 im Vergleich zu 2000 um 16% (327.000 Todesfälle) verzeichneten. In den Ländern mit einem mittlerem oder niedrigen Bruttoeinkommen pro Kopf nahm die Anzahl an Todesfällen aufgrund ischämischer Herzerkrankungen hingegen zu (World Health Organization 2020).

Das statistische Bundesamt gab für das Jahr 2015 an, dass Erkrankungen des Herzkreislaufsystems einen Anteil von 38,5% der Gesamttodesfälle von 925.000 ausmachten. Dabei entfielen 13,3% der Gesamttodesfälle auf Folgen der ischämischen Herzkrankheit (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2017).

2.2 Atherosklerose

Ursächlich für die Entstehung ischämischer Herzerkrankungen ist im Wesentlichen die Atherosklerose, ein chronisch fortschreitender pathologischer Zustand der Gefäßwand. Die Genese atherosklerotischer Plaques ist hierbei multifaktoriell. Das komplexe Zusammenwirken von Low Density-Lipoproteinen (LDL), Triglyceriden sowie die inflammatorische Aktivierung des Endothels und das Einwandern von Leukozyten in die Gefäßwand kann zu einer Verengung des Gefäßlumens und somit zu einer Beeinträchtigung des Blutflusses führen (Mahmoudi et al. 2021). Die Inflammation der Gefäßwand wird durch eine endotheliale Dysfunktion initiiert. Anschließend kommt es durch das Einwandern von Immunzellen zu einem Remodeling der extrazellulären Matrix (Lusis 2012, Conway et al. 2013, Peng et al. 2019). Bei einer Ruptur des entstandenen

Thrombus kann ein arterielles Stromgebiet verschließen, so wie es bei einem Myokardinfarkt durch einen Verschluss der Koronararterien der Fall ist.

Eine erhöhte LDL-Konzentration im Blut erhöht das Risiko zur Entwicklung atherosklerotischer Plaques. Diese beginnt mit dem Übertritt von LDL in die Gefäßwand. Das in der Intima befindliche LDL wird durch freie Radikale oxidiert und führt u. a. zu einer Sekretion des Chemokins Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) der Endothelzellen (EC) (Peng et al. 2019). Monozyten und T-Zellen, die daraufhin in die Gefäßwand einwandern, differenzieren sich weiter zu Makrophagen, die u. a. oxidiertes LDL phagozytieren und sich zu sogenannten Schaumzellen weiterentwickeln (Baratchi et al. 2017). Die Schaumzellen aktivieren mittels Interleukin 12 (IL-12) T-Zellen, die wiederum durch die Sekretion von Interferon γ (INF- γ) eine zusätzliche Einwanderung von Monozyten hervorrufen (Johnson et al. 2009). Darüber hinaus kommt es durch die Einwanderung glatter Muskelzellen aus der Media zur Bildung einer fibromuskulären Kappe, die den Plaqueinhalt zum Lumen hin abgrenzt (Paulson et al. 2000). Inwieweit ein Plaque letztendlich die Gesundheit des Menschen gefährdet, hängt maßgeblich von seiner Vulnerabilität ab und damit von dem Risiko, dass die fibromuskuläre Kappe einreißt und der Plaque rupturiert (Naghavi et al. 2003). Der Prozess der Bildung atherosklerotischer Plaques wird insbesondere durch verschiedene Risikofaktoren wie Geschlecht, Alter, systolischer Blutdruck, Gesamt-Cholesterol- und LDL-Cholesterol-Gehalt im Blut, Rauchverhalten sowie Diabetes mellitus erheblich beeinflusst (D'Agostino et al. 2013). Obgleich diese Risikofaktoren das kardiovaskuläre System gleichermaßen belasten, entstehen atherosklerotische Plaques jedoch überwiegend an spezifischen Prädilektionsstellen (Chatzizisis et al. 2007). Bereits Caro et al. konnten 1969 in ersten Studien an humanem Gefäßen zeigen, dass atherosklerotische Läsionen häufig nach Gefäßgabelungen auftreten, wo die Scherspannung auf die Gefäßwand niedrig sein muss (Caro et al. 1969). Dieser Hypothese folgend, folgten weitere Veröffentlichungen, die diese Hypothese stützten und zeigten, dass an Gefäßabgängen und innerer Kurvarturen eine niedrige Scherspannung (Caro et al. 1971, Glagov et al. 1988, Schwartz et al. 1991) und statt eines laminaren Flussprofils ein gestörter Fluss an der Endothelwand anliegt (Conway et al. 2013).

2.2.1 Einfluss von Fluss und endothelialen Scherkräften auf die Entstehung von Atherosklerose

Endotheliale Scherkräfte sind mit die wichtigsten biomechanischen Kräfte, die auf das Endothel einwirken und dieses in seiner Funktion beeinflussen können. Endotheliale Scherkräfte sind Reibungskräfte, die der Blutfluss auf die endotheliale Gefäßwand-Fläche ausübt. Die Scherspannung besitzt somit die Dimension Kraft pro Fläche. Die Einheit der Scherspannung ist definiert als das Pascal (Pa) = N /m² = 10 dyn / cm². Ein gestörter Fluss wird definiert als Flussprofil, das durch eine stetige Änderung in Flussgeschwindigkeit und -richtung zur Bildung von Wirbeln führt und somit eine niedrige Wandscherspannung auf das Endothel ausübt (Brown et al. 2016).

Gimbrone et al. beschrieben den Einfluss endothelialer Dysfunktion auf den Entstehungsprozess von Artherosklerose. Allein ein definierter laminarer oder gestörter Fluss des Blutes durch die mechanische Krafteinwirkung auf die Endothelzellen reicht aus, um ihre Form und funktionellen Eigenschaften zu verändern (Gimbrone et al. 1995, Gimbrone und García-Cardena 2013, Gimbrone und García-Cardena 2016).

Bussolari et al. führten *in vitro*-Versuche mit bovinen Endothelzellen der Aorta unter definierten Scherbedingungen in einem Strömungskanal durch, um den Scherstress-Effekt auf die Zellen zu untersuchen (Bussolari et al. 1982). Vorausgegangene Versuche zeigten, dass Endothelzellen, die in einer dichten Schicht von Einzelzellen kultiviert wurden, ihre polygonale Zellform zu einer ellipsoiden Morphologie in Flussrichtung des Fluids änderten, wenn diese einer laminaren Strömung und Scherspannungen von 5–10 dyn/cm² ausgesetzt waren (Dewey et al. 1981).

So führt eine durch einen laminaren Fluss induzierte Scherspannung auf kultivierte Endothelzellen dazu, dass diese die Form, Anordnung zueinander, sowie die Struktur der Glykokalyx bzw. des Zytoskeletts annehmen, wie es sonst von Endothelzellen des arteriellen Systems bekannt ist, an denen sich keine Atherosklerose bildet (Wong et al. 1983, Remuzzi et al. 1984, Levesque et al. 1985, Zand et al. 1988, Weinbaum et al. 2007, Koo et al. 2013).

Die endothelialen Scherspannungen betragen physiologisch 1 bis 6 dyn / cm² im venösen System und über 10 bis 70 dyn / cm² im arteriellen System. Werte eines gestörten Flusses mit niedrigen Scherspannungen im arteriellen System betragen in der Regel Werte von 0 bis 4 dyn / cm² (Malek et al. 1999). Setzt man Endothelzellen jedoch einem

gestörten Flussprofil aus, führt dies u. a. zu einer erhöhten Seneszenz der Zellen. Ebenfalls kommt es zu einem erhöhten oxidativen Stress, zu Veränderungen der Zellform und Struktur sowie darüber hinaus zur Bildung interzellulärer Verbindungen, wie beispielsweise Veränderungen im Expressionslevel von Connexin 43, die sonst nur in Regionen gebildet werden, an denen sich atherosklerotische Läsionen häufig bilden. Dies unterstreicht, dass die hämodynamischen lokalen Strömungsverhältnisse an Prädilektionsstellen des arteriellen Systems ein eigener Risikofaktor für die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion im Rahmen der Bildung atherosklerotischer Gefäßveränderung darstellen (Davies et al. 1986, DePaola et al. 1992, Gimbrone et al. 1995, Gabriels and Paul 1998, DePaola et al. 1999, Wang et al. 2013, Warboys et al. 2014). Eine hohe Scherspannung auf das Endothel fördert die Produktion und den Transport von atheroprotektiven Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) oder Adenosintriphosphat (ATP), hingegen führt eine niedrige Scherspannung zu einer erhöhten Aufnahme von proatherogenen Molekülen wie LDL-Cholesterol (Mahmoudi et al. 2021). In der klinischen Forschung ist die gezielte Einflussnahme auf einen gestörten Blutfluss jedoch aktuell kaum berücksichtigt (vergleiche hierzu Sitia et al. 2010, Souilhol et al. 2019, Mahmoudi et al, 2021).

Althoff et al. hat 2012 gezeigt, dass endotheliale G-Proteine der Gq/11-Familie an der Wahrnehmung und/oder Weiterleitung von atherogenem Scherstress beteiligt sind. Ein endothelspezifischer Gq/11-Mangel schützte Mäuse mit gestörtem Blutfluss und Atherosklerose vor atherosklerotischer Plaquebildung (Althoff et al. 2012). Während dieser Signalweg ein vielversprechendes Ziel zu sein scheint, kommen G-Proteine selbst aufgrund ihrer zentralen Beteiligung an vielen wichtigen zellulären Prozessen kaum als pharmakologische Zielstruktur in Frage. Daher wurden nachfolgend in der Arbeitsgruppe Althoff, Charité – Universitätsmedizin Berlin chromatinmodifizierende Enzyme als mögliche Zielstruktur und als möglicherweise arzneimittelwirksame nachgeschaltete Effektoren von Gq/11 identifiziert. Mit Hilfe spezieller Strömungskammern, die es ermöglichten, kultivierte Endothelzellen (HUVECs) verschiedenen physiologischen sowie atherogenen Strömungsmustern auszusetzen, wurden in einem genomweiten Microarray Gene identifiziert, die bei atherogenem Scherstress in einer Gq/11-abhängigen Weise transkriptionell reguliert werden. In der Tat wurden mehrere Chromatinmodifikatoren, die bei atherogener Strömung dynamisch und Gq/11-abhängig reguliert werden, gefunden. Von diesen wurde die Histondemethylase KDM2B unter atherogenen

Strömungsbedingungen am stärksten herunterreguliert. Anschließende *in-vitro-Versuche mit inhibitorischer RNA* (siRNA) zum Funktionsverlust zeigten, dass KDM2B den Wechsel des Endothels zu atherogenen Phänotypen kontrolliert: Die Hochregulierung von Entzündungsgenen wie Ccl2 oder Endothelin-1 (Edn1) unter atherogenem Fluss war in Endothelzellen, die mit KDM2B siRNA transfiziert waren, im Vergleich zur Kontrolle stark verstärkt.

2.3 Epigenetik und Histonmodifikation

Die Epigenetik ist ein biologisches Fachgebiet, das sich anders als die Genetik, nicht mit dem Genom und dessen Veränderungen in der Abfolge der Desoxyribonukleinsäure (aus dem Englischen deoxyribonucleic acid = DNA), sondern mit Veränderungen in der DNA-Methylierung, der Histone sowie u. a. mit post-translationalen Veränderungen befasst (Yan und Marsden 2015).

Histone sind Proteine, die aus jeweils zwei H3-H4- und zwei H2A-H2B-Heterodimeren bestehen und den Zweck erfüllen, als solches Oktamer die DNA zu kondensieren (Kornberg 1977, McGhee und Felsenfest 1980). Dabei gruppieren sich um jedes Histon 145-147 Nukleotide der DNA, um ein sogenanntes Nukleosom zu formen. Jedes Nukleosom ist wiederum über eine Linker-DNA miteinander verbunden (Luger et al. 1997). Die entstandene Struktur beschreibt das Euchromatin und wird aufgrund seiner Erscheinung auch als „*beads-on-a-string*“ (eine Perlenschnur) bezeichnet (Olins und Olins 2003).

Die Möglichkeit und Häufigkeit der Transkription von bestimmten DNA-Segmenten ist maßgeblich davon bestimmt, wie stark die DNA an das entsprechende Histon bindet. Dies wird im Wesentlichen durch post-translationale Modifikationen reguliert (Yan et al. 2010).

Insgesamt wurden bislang 9 verschiedene Arten der post-translationalen Modifikation an verschiedenen Regionen der Histone nachgewiesen, die u. a. die Chromatinstruktur aber auch die Transkription der DNA beeinflussen. Zu den Modifikationen zählen hierbei die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung, ADP-Ribosylierung, Desaminierung, Propionylierung sowie die Butyrylierung durch die entsprechenden Enzyme, auf die hier im Detail nicht weiter eingegangen werden soll. Erwähnt werden soll an dieser Stelle jedoch, dass ähnlich der Regulation der

Acetylierung durch Acetyltransferasen für Lysin und Arginin entsprechend die Methylierung und Demethylierung durch Methyltransferasen bzw. Demethylasen erfolgt (Kouzarides 2007, Lawrence et al. 2015). Nachfolgend soll detaillierter auf die Lysin-Demethylase KDM2B eingegangen werden.

2.4 Das humane KDM2B-Gen

Das HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) weist dem Enzym KDM2B als offiziellen Namen „lysine demethylase 2B“ zu. Laut der National Center for Biotechnology Information (NCBI) Reference Sequence Database wird KDM2B in der wissenschaftlichen Literatur auch häufig mit den Synonymen CXXC2, Fbl10, FBXL10, JHDM1B oder PCCX2 beschrieben. Für die Literaturrecherche zu KDM2B wurden im Zeitraum von Dezember 2020 bis Januar 2022 in der Pubmed-Datenbank zu dem Begriff KDM2B sowie den oben aufgelisteten Synonymen die entsprechenden Publikationen recherchiert. Insgesamt wurden zum Stichtag (14.01.2022) über 190 veröffentlichte Publikationen über das Enzym gefunden.

KDM2B kodiert für ein ca. 40 Aminosäuren langes F-box-Protein auf Chromosom 12. Das F-box-Protein ist eines der vier Untereinheiten des Ubiquitin-Protein-Ligase-Komplex SCF (SKP1-cullin-F-box), der wiederum für die Phosphorylierungs-abhängige Ubiquitinylierung mitverantwortlich ist. F-box-Proteine können in drei Untergruppen eingeteilt werden, wobei das durch KDM2B kodierte F-box-Protein zu derjenigen Untergruppe gehört, dessen Leucin-reiche Wiederholungen charakteristisch für das Enzym ist (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84678>, Stand 09.01.2022).

Histonmethylierung ist eine der häufigsten Histonmodifizierungen und wird in der Regel mit Hilfe von Methyltransferasen oder Demethylasen vollzogen. Hierbei kommt es letztendlich zu einer Mono-, Di- oder auch Trimethylierung der entsprechenden Histone. Die Methylierung von Histonen führt wiederum je nach Ort der Methylierung zu einer Aktivierung oder zu einem Silencing von Genen (Fraga et al. 2005, Bhaumik et al. 2007, Copeland et al. 2009, Seligson et al. 2009).

Die erste Demethylase, die 2004 beschrieben wurde, ist die Lysin-spezifische Demethylase 1 (Lysine-specific demethylase 1, LSD1) (Shi et al. 2004). Seitdem sind mehr als 20 verschiedene Demethylasen beschrieben worden, die in zwei Gruppen

eingeteilt werden können: zum einen in die LSD-Familie und zum anderen in die JmjC-Familie. KDM2B gehört der letzteren der beiden Gruppen an (Shi und Tsukada 2013). Beide Familien unterscheiden sich im Mechanismus der Demethylierung. Die Demethylasen der LSD-Familie katalysieren die Reaktion mit Hilfe von Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-abhängiger Monoamin-Oxidasen, wohingegen die Demethylasen der JmjC-Familie mit Hilfe von Eisen-II- und alpha-Ketoglutarat-abhängigen Dioxidasen die Reaktion katalysieren (Hou und Yu 2010, Williams et al. 2014, Dimitrova et al. 2015, Kaniskan et al. 2017).

2.4.1 Die Struktur von KDM2B

Das Protein KDM2B besitzt mehrere funktionale Abschnitte (vgl. **Abb. 2.1**):

1. Eine N-terminale JmjC-Domäne (JmjC), die für die Demethylierung insbesondere von H3K36me2 notwendig ist (Wong et al. 2016),
2. eine CxxC-Zink-Finger-Domäne (CxxC), um an die DNA zu binden (Farcas et al. 2012, Wong et al. 2016),
3. eine PHD-Domäne, die als E3-Ligase oder als Histon-modifizierender-Reader fungiert (Musselman und Kutateladze 2009, Wong et al. 2016) sowie
4. eine F-box-Domäne (F-box), die als Linker zwischen dem Zielprotein (Pr) und der E3-Ligase fungiert mit Leucin-reichen repeats (Wong et al. 2016).

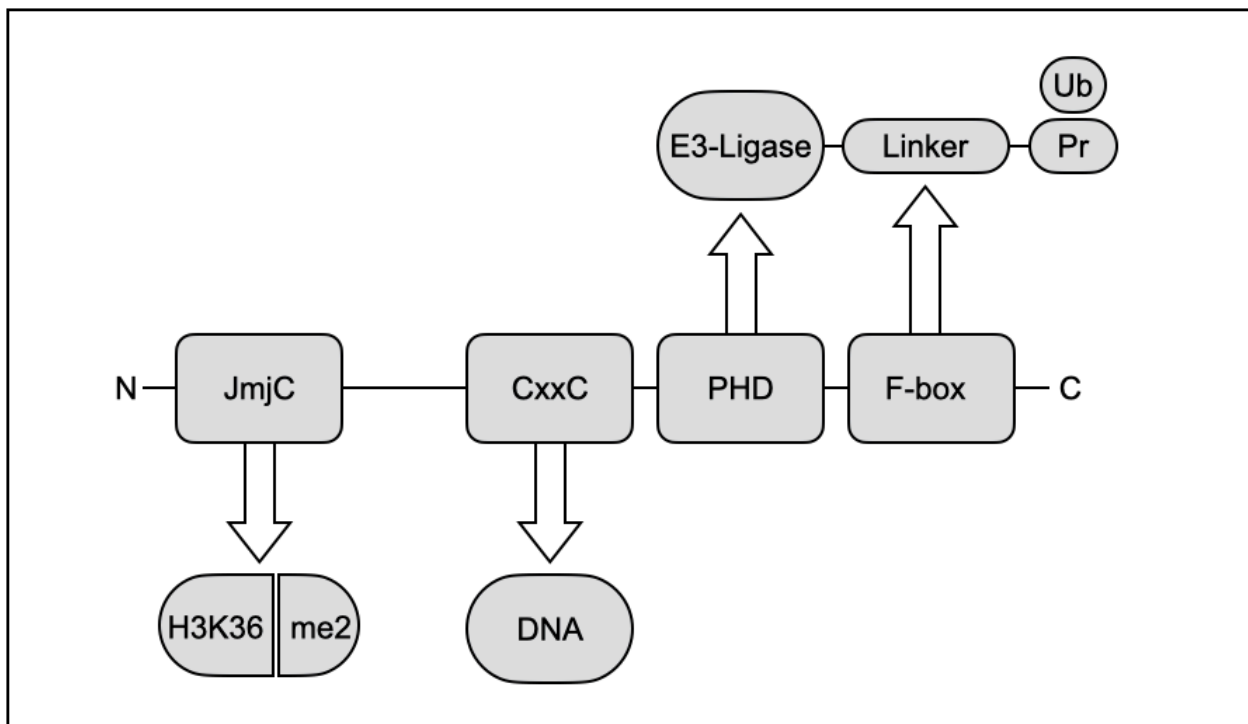


Abbildung 2.1: Die Struktur von KDM2B. Abkürzungen: JmjC: Jumonji C, H3K36me2: Dimethyliertes (me2) Histon H3K36, me: Methylrest, CxxC: CxxC-Zink-Finger-Domäne, DNA: Deoxyribonucleic acid, PHD: Plant homeo-Domäne, E3-Ligase: Ubiquitin-Protein-Ligasen E3, F-box: F-box-Domäne, Pr: Protein, Ub: Ubiquitin (abgeändert nach Yan et al. 2018).

2.4.2 Die biologische Bedeutung von KDM2B

Ein erster Nachweis von KDM2B gelang in embryonalen Maus-Fibroblasten, wobei festgestellt wurde, dass ein Knockdown von KDM2B zu einer verzögerten Zellproliferation und einer Seneszenz der Zellen führte (Tzatsos et al. 2009). Weitergehende Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)-Assays zeigten, dass KDM2B die Funktion von p15^{Ink4b} als Tumorsuppressor im Rahmen einer Regulation von Zellwachstum und Zellzyklus den Eintritt in die G1-Phase inhibierte (He et al 2008). Weitere Untersuchungen ergaben, dass eine Überexpression von KDM2B ebenfalls in Maus-embryonalen Fibroblasten zu einer Hochregulierung des Proteins Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) führte. Weitere nachgeschaltete Prozesse trugen letztendlich zu einem Silencing der Tumorsuppressoren p16^{Ink4a} und p19^{Arf} bei. Dieser Vorgang ist direkt an die Demethylierung von H3K36me2 geknüpft (Tzatsos et al. 2011).

Darüber hinaus zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass KDM2B dazu beiträgt, den Polycomb repressive complex an den im Genom befindlichen CpG-Inseln zu rekrutieren, was zu einer schlechteren Ablesbarkeit des Genoms führt (Blackledge et al. 2010, Farcas et al. 2011, Wu et al. 2013, Riising et al. 2014, Yu et al. 2017). He et al. (2013) zeigten, dass eine Verringerung von KDM2B in embryonalen Maus-Stammzellen (mESCs) zu einer frühen Differenzierung der Zellen führt. Auch in hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) konnte eine Verhinderung der Zelldifferenzierung durch KDM2B nachgewiesen werden (Konuma et al. 2011). Über die F-box-Domäne ist KDM2B ebenfalls in der Lage, in 3T3-L1-Zellen des Fettgewebes der Maus über die Rekrutierung eines nicht-kanonischen PRC1-Proteins die Differenzierung in Adipozyten zu verhindern (Inagaki et al. 2015).

Weiterhin ist KDM2B in regulatorischer Funktion am Reprogrammierungsprozess von pluripotenten embryonalen Stammzellen über Transkriptionsfaktoren wie Oct4, Sox2, Klf4 und c-Myc involviert. Über den Weg einer Aktivierung von Oct4 als wichtigen Transkriptionsfaktor der embryonalen Entwicklung kann eine Seneszenz der Zelle überwunden werden. Zusätzlich kann die Expression von microRNA-cluster 302/367, das eine wesentliche Rolle in biologischen Prozessen wie der Entwicklung der Pluripotenz, der Reprogrammierung sowie der Selbsterneuerung von Zellen spielt, induziert werden (Takahashi et al. 2007, Wang et al. 2011, Zhao et al. 2013, Gao et al. 2015).

2.4.3 Die Rolle von KDM2B2 in der Onkologie

Bisher wurde KDM2B insbesondere im Zusammenhang mit onkologischen oder neurologischen Erkrankungen erforscht. Erst 2020 wurde darüber berichtet, dass KDM2B über eine Aktivierung des FAK- und PI3K-Signalweges zur Motilität von Tumorzellen beiträgt. In DU-145-Prostatakrebs-Zellen beeinflusst KDM2B möglicherweise über verschiedenste Signalwege die zelluläre Migration von Tumorzellen, jedoch scheinbar nicht die Proliferation der untersuchten Prostatakrebs-Zellen (Zacharopoulou et al. 2020).

Über einen ähnlichen Effekt in verschiedenen Zelllinien des duktales Adenokarzinoms des Pankreas *in vitro* berichteten jüngst Quan et al. (2020). Auch hier war die Motilität - im Speziellen die Migration und Invasion von Krebszellen - durch die Aktivierung des Hippo-Signalweges über KDM2B erhöht. Die Arbeitsgruppe zeigte weiterhin, dass es über die Bindung von KDM2B an die Promoter-Region von MOB1 zu einer Suppression des MOB1-Gens kommt und die Tumorpheriferation dadurch erhöht wird (Quan et al. 2020).

KDM2B scheint auch in der Entwicklung und im Fortschreiten maligner gynäkologischer Erkrankungen eine wesentliche Rolle zu spielen. *In vitro* zeigt sich in Ovarialkrebs-Zellen, dass KDM2B die Expression des Tumor-Suppressors *let-7b* über eine Demethylierung von H3K36me2 unterdrückt. So kommt es zu einer Hochregulation der Expression von EZH2, das wiederum verschiedene Tumor-Suppressorgene supprimiert und dadurch zu einem Tumorzustand *in vitro* und *in vivo* beiträgt (Kuang et al. 2017 und 2020). Auch die Eigenschaft der erhöhten Zellmigration durch die Gegenwart von KDM2B konnte für Ovarialkrebs-Zellen aufgezeigt werden (Yan et al. 2018).

Die Arbeitsgruppe von Tschlis zeigte 2014, dass auch in primärem humanen Brustkrebs-Zellen die Expression von KDM2B im Basal-Zell-Typ (Triple-negativ-Typ) höher ist, als in anderen Brustkrebs-Subtypen (Kottakis et al. 2014). Es scheint auch eine Korrelation einer erhöhten KDM2B-Expression mit einem früher auftretenden Rezidiv nach abgeschlossener Therapie und Remission zu existieren, wobei hier aufgrund der geringen Probenanzahl nur von einem möglichen Effekt der Unterschiede in der Rezidivrate gesprochen werden kann (P-Wert = 0,13) (Kottakis et al. 2014).

Penzo et al. (2015) zeigten, dass eine KDM2B-Suppression in Gegenwart des Tumorsuppressors p53 zum Innehalten des Tumorzustands führen kann, während es

im Falle von fehlendem p53 zum gegenteiligen Effekt eines erhöhten Tumorwachstums kommt. KDM2B scheint ebenfalls, insbesondere bei einer Reduktion, durch seine regulatorischen Eigenschaften auf ribosomale Gene zu der Entwicklung eines aggressiveren malignen Phenotyps in epithelialen Brustdrüsen-Zellen beizutragen (Galbiati et al. 2017) und somit auch das klinische Outcome bei Brustkrebs beeinflusst (De Nicola et al. 2020).

Auch im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems wird KDM2B als relevantes Protein im Sinne der Entstehung, der Aufrechterhaltung und dem Fortschreiten maligner Erkrankungen beschrieben. Es wird angenommen, dass KDM2B bei leukämischen Erkrankungen als Onkogen fungiert, indem es über die Demethylierung des Histonabschnittes H3K36me2 die Expression von p15^{Ink4b} über Silencing des entsprechenden Gens verringert (He et al. 2011) oder aber auch *in vitro* die Nsg2-gesteuerte Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen beeinträchtigt (Ueda et al. 2015). Andricovich et al. (2016) beschrieben die Rolle von KDM2B bei hämatologischen malignen Erkrankungen eher mit einer regulatorischen Funktion und nicht als ein typisches Onkogen, da KDM2B lymphatische Leukämien eher durch seine Funktion aufrechtzuerhalten scheint, während eine Überexpression zu einer Differenzierung lymphatischer Zellen führt.

Zusammenfassend wird aktuell davon ausgegangen, dass KDM2B in seiner Funktion die zelluläre Seneszenz, Proliferation und Migration beeinflusst und seine Überexpression dazu beiträgt, Signalwege der Proliferation in malignen Zellen zu aktivieren. Eine weitere Eigenschaft von KDM2B besteht darin, die Zelldifferenzierung zu beeinflussen bzw. zu verhindern. Eine Dysregulierung von KDM2B wurde bislang nicht nur in malignen hämatopoetischen Erkrankungen wie der akuten lymphatischen oder myeloischen Leukämie gefunden, sondern u. a. auch bei Brust-, Ovarial-, Pankreas-, Magen-, Lungen- sowie Harnblasen-Krebs (Yan et al. 2018).

2.4.4 Die Rolle von KDM2B in kardiovaskulären Erkrankungen

Im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen ist die Rolle von KDM2B noch weitestgehend ungeklärt. 2019 wurde erstmals die mögliche Funktion von KDM2B (hier FBXL10) im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie (*diabetic cardiomyopathy* (DCM)) *in vivo* an Ratten in einem Streptozotocin-induzierten DCM-Modell beschrieben (Yin et al. 2019). Hier zeigte sich, dass die Expression von KDM2B im Herzgewebe der betroffenen Ratten deutlich reduziert war. *In vitro*-Ergebnisse an Kardiomyozyten zeigten einen protektiven Effekt durch KDM2B hinsichtlich Inflammation, hier induziert durch eine hohe Glucosekonzentration, aber auch hinsichtlich oxidativem Stress oder Apoptose über die Aktivierung des PKC- β 2-Weges (Yin et al. 2019). Auch *in vivo* konnten die o. g. *in vitro*-Effekte bestätigt werden, so dass eine selektive Überexpression von KDM2B in den Kardiomyocyten der Ratten nach 12 Wochen zu einer erhaltenen kardialen Funktion führte. Hier konnte gezeigt werden, dass Ratten mit einem induzierten Diabetes signifikant reduzierte Mengen an phosphoryliertem PKC- β 2 im kardialen Gewebe aufwiesen und KDM2B die Phosphorylierung signifikant steigerte (Yin et al. 2019).

Obwohl eine gesteigerte PKC-Expression bisher in kardialem Gewebe in Zusammenhang mit der Expression von Protoonkogenen, Transkriptionsfaktoren und myokardialer Schädigung sowie interstitieller Fibrose und einer erhöhten Kollagenproduktion beschrieben wurde (Connelly et al. 2009, Song et al. 2015), konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung von PKC- β 2 die protektiven Eigenschaften von KDM2B hinsichtlich einer Reduktion von oxidativem Stress, Inflammation und Zelltod kompensiert (Yin et al. 2019).

Ebenfalls beschrieben Inagaki et al. (2015), dass KDM2B *in vitro* über das Protein Protein Regulator of Cytokinesis 1 (PRC1) Gene wie beispielsweise *Pparg* reguliert und somit eine Differenzierung pluripotenter Zellen in die Adipogenese verhindert. Welche Rolle KDM2B in weiteren kardiovaskulären Erkrankungen wie beispielsweise der Atherosklerose spielt, wurde zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht beschrieben und soll Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

2.5 Zielsetzung

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit besteht darin, zu eruieren, inwieweit ein selektiver Tamoxifen-induzierter Knockdown des Proteins KDM2B in Endothelzellen eines *in vivo* Atherosklerose-Modells in Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen die Bildung atherosklerotischer Plaques in der Arteria carotis communis beeinflusst.

Hierfür wird eine Versuchsgruppe mit Wildtyp-Mäusen mit einer Versuchsgruppe von Mäusen verglichen, die eine Cre-/loxP-Modifikation des KDM2B-Gens in Endothelzellen (KDM2B-Knockdown) aufweisen. Die atherosklerotischen Veränderungen werden in einem chirurgischen Verfahren, der partiellen Ligatur, an der linken A. carotis communis der Versuchstiere induziert. Nach einem postoperativen Zeitraum von 3 Wochen werden die A. carotis communis histologisch aufgearbeitet und nach histologischer Färbung digital charakterisiert.

3 Material und Methoden

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden von der Firma B. Braun SE, (Melsungen, Deutschland), Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland), Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland), Corning Incorporated (Corning, New York, USA), bzw. möglichen Tochtergesellschaften bezogen. Sämtliche Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), oder Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), bzw. deren Tochtergesellschaften bezogen.

Sämtliche Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), oder Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), bzw. deren Tochtergesellschaften bezogen.

Die Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren mit der Genehmigungsnummer G0259/16 erfolgte am 17.01.2017. Die Versuchstiere wurden nach gültigen Richtlinien fach- und artgerecht gehalten und behandelt.

3.1 Tamoxifen-induzierter Knockdown

In **Tab. 3.1** sind die Versuchstiere aufgeführt, die im Rahmen der Versuche operiert wurden. Dies schließt die intra- und postoperativ verstorbenen Versuchstiere ein.

Tabelle 3.1: Operierte Versuchstiere. Grün hinterlegt sind alle Tiere, die in die weitergehende Analyse eingeschlossen wurden. Grau hinterlegt sind alle Tiere, die aufgrund eines intra- oder postoperativen Versterbens vor Ablauf der Versuchszeit aus der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden. Abkürzungen und Legende: KDM2B: Lysin-(K)-spezifische Demethylase 2B, ApoE: Apolipoprotein E, Tie2: Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase, fl: floxed = von loxP-Stellen flankiertes Gen, fl/fl: homozygotes Vorliegen des Gens, -/-: homozygoter Knockout, +/+ : homozygoter Wildtyp, +: vorhandenes Gen).

Nummer	Versuchstiernummer	Genotypen			Geschlecht	Ursprung
		KDM2B	ApoE	Tie2		
1	TAL-007665	fl/fl	-/-	+	männlich	
2	TAL-007666	fl/fl	-/-	+	männlich	
3	TAL-007667	fl/fl	-/-	+	männlich	
4	TAL-007678	+/+	-/-	+	männlich	
5	TAL-007679	+/+	-/-	+	männlich	
6	TAL-007680	+/+	-/-	+	männlich	
7	TAL-007681	+/+	-/-	+	männlich	
8	TAL-007736	+/+	-/-	+	weiblich	
9	TAL-007737	+/+	-/-	+	weiblich	
10	TAL-007738	+/+	-/-	+	weiblich	
11	TAL-007750	fl/fl	-/-	+	weiblich	
12	TAL-007752	fl/fl	-/-	+	weiblich	RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan
13	TAL-007753	fl/fl	-/-	+	männlich	
14	TAL-007848	fl/fl	-/-	+	männlich	
15	TAL-007849	+/+	-/-	+	männlich	
16	TAL-007851	+/+	-/-	+	weiblich	
17	TAL-007863	+/+	-/-	+	männlich	
18	TAL-007864	+/+	-/-	+	männlich	
19	TAL-007865	+/+	-/-	+	männlich	
20	TAL-10134	fl/fl	-/-	+	männlich	
21	TAL-10140	fl/fl	-/-	+	weiblich	
22	TAL-10149	fl/fl	-/-	+	männlich	
23	TAL-10150	fl/fl	-/-	+	männlich	
24	TAL-10151	fl/fl	-/-	+	männlich	

Tabelle 3.1: Operierte Versuchstiere (Fortsetzung).

Nummer	Versuchstiernummer	Genotypen			Geschlecht	Ursprung
		KDM2B	ApoE	Tie2		
25	TAL-10155	fl/fl	-/-	+	weiblich	RIKEN BioResource Center, Tsukuba, Japan
26	TAL-10160	fl/fl	-/-	+	weiblich	
27	TAL-10161	fl/fl	-/-	+	weiblich	
28	TAL-10252	+/+	-/-	+	weiblich	
29	TAL-10254	+/+	-/-	+	weiblich	
30	TAL-10313	fl/fl	-/-	+	männlich	
31	TAL-10314	fl/fl	-/-	+	männlich	
32	TAL-10318	fl/fl	-/-	+	weiblich	

Zur Genanalyse der Mäuse wurden die in **Tab. 3.2** aufgeführten Primer für die entsprechende Gensequenzierung verwendet.

Tabelle 3.2: Primer für Genotypisierung der Mäuse (alphabetisch geordnet).

Material	Primer-Sequenzen	Firma
ApoE	gCC gCC CCg ACT gCA TCT TgT gAC TTg ggA gCT CTg CAg C gCCTAgCCgAgg gAgAgCCg	TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland
KDM2B	gga CCA ggg gCT TCT TCA CAg gTA Tgg CTA ggg Agg AAg TCA ACC CAC TTg ATT CCA gAT	TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland
Tie2	gAg AAT ggC gAg AAg TCA CTg Tgg CTT gCA ggT ACA ggA gAA gTC gCA AAg TTg TgA gTT g	TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland

In **Tab. 3.3** sind die verwendeten Materialien für den Knockdown aufgeführt.

Tabelle 3.3: Verwendete Materialien für den Knockdown (alphabetisch geordnet).

Material	Firma	Produkt	Artikel- / Bestell-Nummer
Mygliol 812	Caesar & Loretz GmbH, Deutschland	-	3274
Tamoxifen	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	-	T5648

Die Tamoxifen-induzierte Cre ist ein Modell der Genetik, um gewebespezifisch zu einem definierten Zeitpunkt bestimmte Gene auszuschalten, sodass das gewünschte Protein nicht mehr produziert wird. Das Cre-Protein gehört zur Enzymfamilie der Rekombinasen, die die genetische Rekombination, d. h. die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA-Abschnitten, katalysieren. Um gezielt Gene in einem bestimmten Gewebe aus der DNA zu exzidieren, muss dem entsprechende Gen ein zell- bzw. gewebespezifischer Promotor vorgeschaltet sein. Zusätzlich muss das Gen mit einer loxP-DNA-Sequenz flankiert werden und eine entsprechende modifizierte Cre-Rekombinase vorliegen.

Die als Transgen eingeführte Cre-Rekombinase wird derart modifiziert, dass diese an einen mutierten Estrogen-Rezeptor mit einer Ligandenbindungsdomäne fusioniert ist. Diese Bindungsstelle ist nicht zugänglich für humanes Estrogen, sondern lediglich für synthetisches 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT). Durch die vorliegende Tamoxifen-abhängige Cre-Rekombinase (Cre-ER^T) wird gewährleistet, dass es zu einer gewebe- und zeitspezifischen somatischen Mutagenese im Erbgut des Lebewesens kommt (Feil et al. 1996, Feil et al. 1997, Schwenk et al. 1998, Sauer 1998, Indra et al. 1999).

In der hier durchgeführten Versuchsreihe, wurde entsprechend das KDM2B-Gen der Mäuse vom Zulieferer präpariert.

3.2 Modell der partiellen Ligatur der Arteria carotis

Die nachfolgende Ligatur-Operation erfolgte in ihrer Durchführung basierend auf den Beschreibungen von Nam et al. (2009), Korshunov and Berk (2003) sowie Nam et al. (2010). Die verwendeten Materialien sind in der **Tab. 3.4** aufgelistet.

Tabelle 3.4: Verwendete Materialien für die Ligatur-Operation (alphabetisch geordnet).

Material	Firma	Produkt	Artikel- / Bestell- Nummer
Augensalbe	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	
Chirurgischer Faden	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland	-	-
Desinfektionsmittel	Ecolab Deutschland GmbH, Monheim am Rhein, Deutschland	Sekusept™ PLUS	30 309 10 PZN 046 777 97
Durchlichtmikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland	Leica MZ125	-
Ketamin 10%	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland	Ketamin Inresa 50mg/mL	-
NaCl 0,9%	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland	Ecotainer®	3570160
Operationsbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland	-	-
Xylazin 2%	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland	Xylavet 20mg/mL	-

Für die partielle Ligatur wurden Mäuse im Alter von ca. 8 Wochen verwendet. Das Gewicht der Mäuse zum Zeitpunkt der Ligatur betrug mindestens 18 g. Es wurden sowohl Weibchen als auch Männchen verwendet. Das für die partielle Ligatur erforderliche Operationsbesteck wurde vor der Operation für 24 h in eine Lösung von ca. 1% Glucoprotamin-haltigem Reinigungs- und Desinfektionsmittel eingelegt und vor Verwendung mit Flächendesinfektionsmittel sterilisiert und an der Luft getrocknet.

Die Narkose der Mäuse erfolgte mittels Ketamin 10% (0,1µL / g Körpergewicht (KG)) und Xylazin 2% (0,05µL / g KG) (**Tab. 3.5**). Hierfür wurden beide Substanzen mit einer physiologischen NaCl-Lösung 0,9% aufgezo-gen (**Tab. 3.5**). Hieraus ergab sich aus der Lösung die notwendige Konzentration der Narkose-Medikation von 10 µL / g KG. Die Injektion erfolgte intraperitoneal beispielsweise in den linken unteren Quadranten des Abdomens. Um eine Überdosierung bei der Narkose zu vermeiden, wurde initial eine Dosis von 150 µL entsprechend Ketamin 10% (1,5 µL / Maus) und Xylazin 2% (0,3 µL / Maus) appliziert und je nach Narkosetiefe entsprechend nachtitriert bis eine ausreichend tiefe Narkose erreicht wurde.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung der verwendeten Narkoselösung (alphabetisch geordnet).

Lösung	Volumen in µL
NaCl 0,9%	850
Ketamin 10%	100
Xylazin 2%	50

Nach Applikation der Narkose wurde die Maus bis zum Erreichen einer adäquaten Narkosetiefe in einen separaten Käfig unter Rotlicht platziert. Die Narkosetiefe wurde mittels Zwischenzehenreflex überprüft. Eine geringe Menge einer fettbasierten und eine nicht-Schleimhaut-reizenden Augensalbe wurde auf die Augen der Maus aufgetragen, da während der Narkose der Lidschlussreflex unterdrückt ist. Die Maus wurde anschließend mit dem Rücken auf eine desinfizierbare Wärmeplatte gelegt. Die vorderen Extremitäten und die rechte hintere Extremität wurden mit hautschonendem Klebeband befestigt. Die hintere linke Extremität wurde zur intraoperativen Beurteilung der Narkosetiefe nicht fixiert. Der Kopf wurde im Nacken überstreckt und mittels an den Schneidezähnen befestigtem Faden und Klebeband fixiert, sodass der Halsbereich für die Operation ausreichend gut zugänglich war. Anschließend wurde zur Enthaarung mit einem Wattestäbchen ca. 1 mL handelsüblicher Enthaarungscreme zwischen Mandibula und Sternum aufgetragen und einmassiert. Nach einer Minute konnten die Haare mittels Wattestäbchen entfernt werden. Die Haut wurde nun mit Wasser gereinigt und mit Hautdesinfektionsmittel desinfiziert. Für die Ligaturen wurden zwei Fäden der Stärke 6-0 und einer Länge von 2,5 cm verwendet. Mit einer spitzen Schere wurde nun ca. 2 mm

kranial vom Manubrium sterni ein ca. 5 – 10 mm langer medianer Schnitt im Halsbereich durchgeführt. Dabei ist es wichtig, sowohl die Haut als auch die darunter liegenden Faszien zu durchtrennen. Die linken Glandulae sublingualis und G. submandibularis wurden vorsichtig nach lateral verschoben. Im Anschluss wurde mit Pinzetten vorsichtig linksseitig der Trachea entlang das Gewebe präpariert. Sobald die linke A. carotis communis identifiziert war, wurde ihr Verlauf bis zur Bifurcatio carotis verfolgt. Um eine bessere Sicht auf das Operationsgebiet zu erlangen, wurde mit Hilfe eines Hakens der M. sternocleidomastoideus und das umliegende Gewebe lateral zur Seite gehalten. Hier erfolgte nun die vorsichtige Präparation folgender vier Gefäßabgänge der linken A. carotis communis: a) A. carotis externa, b) A. carotis interna, c) A. occipitalis sowie d) A. thyroidea superior. Hier war es insbesondere wichtig, den Nervus vagus und Nervus phrenicus zu schonen. Eine schematische Darstellung der relevanten Gefäßstrukturen zeigt **Abb. 3.1**.

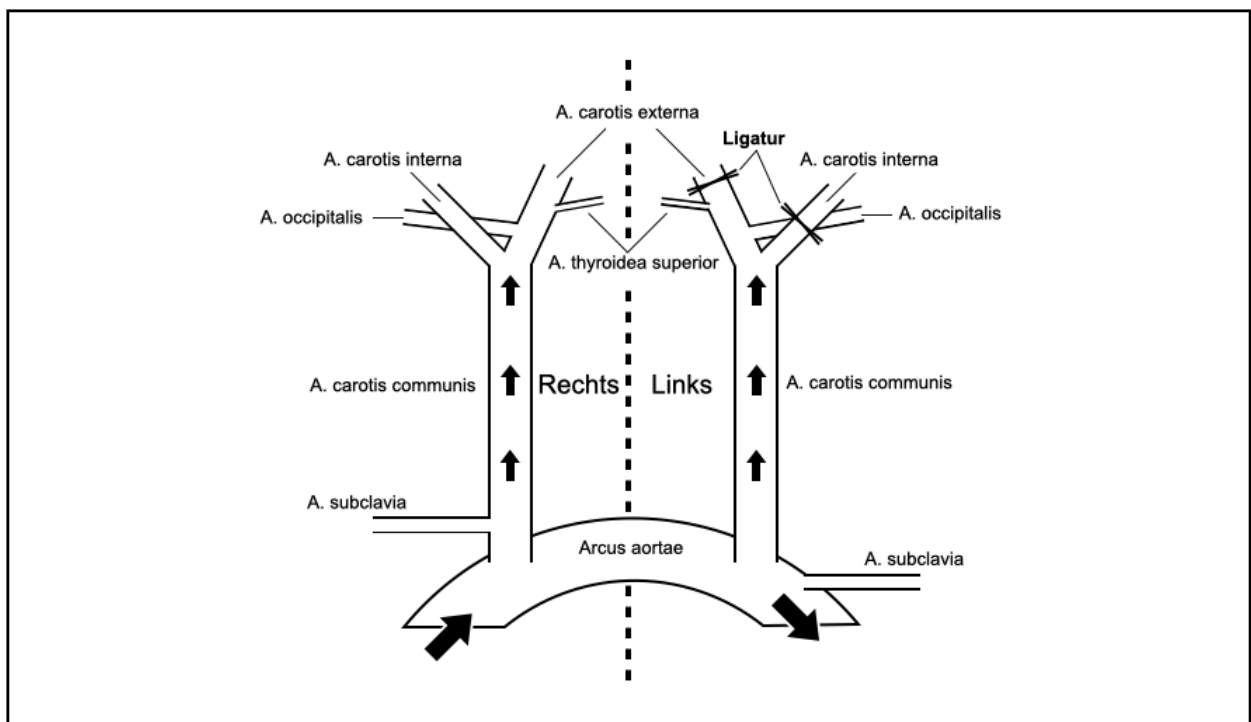


Abbildung 3.1: Schematische Zeichnung der Ligatur-Operation. Gezeigt ist der Aortenbogen mit seinen arteriellen Gefäßabgängen in Aufsicht. Die Pfeile indizieren den Blutfluss. Angepasst nach Nam et al. (2009).

Anschließend erfolgte die Ligation der A. carotis externa oberhalb des Abgangs der A. thyroidea superior mit dem zuvor bereitgelegten 6-0-Faden. Hierfür wurde der Faden mit Hilfe einer Pinzette unter der Arterie hindurchgeführt und mit der anderen Pinzette angenommen und weiter durchgezogen, bis ausreichend Faden an beiden Seiten der Arterie vorhanden war, um einen ausreichend festen Knoten anzubringen. Mit dem zweiten Faden wurde nun die A. carotis interna und A. occipitalis abgebunden. Im Anschluss wurde die Festigkeit der Knoten sowie die A. thyroidea superior auf ihre Durchlässigkeit hin überprüft.

Abschließend wurden die Haken entfernt und die Strukturen vorsichtig in ihre physiologische Position zurückgeschoben. Die Haut wurde mittels 5-0-Faden in Einzelknopfnahnt verschlossen und erneut desinfiziert. Die Maus wurde bis zur Erholung aus der Narkose unter Rotlicht in einen separaten Käfig gelegt. Es wurde zusätzlich Feuchtfutter bereitgestellt, um der Maus die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme postoperativ zu erleichtern.

3.3 Perfusionsfixation und Dissektion der rechten und linken Arteria carotis

In **Tab. 3.6** sind die verwendeten Materialien zur Perfusionsfixation und Dissektion aufgeführt.

Tabelle 3.6: Verwendete Materialien für die Perfusionsfixation und Dissektion (alphabetisch geordnet).

Material	Firma	Produkt	Artikel- / Bestell-Nummer
Chirurgischer Faden	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland	-	-
Einbettkassetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Einbettkassetten Macrosette™	EE16.1
Einmalkanülen	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland	Sterican® Gr. 2, G 21 x 1 1/2''' / ø 0,80 x 40 mm, grün	4657527
Formaldehyd 4 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	ROTI® Histofix 4 %	P087.3
Ketamin 10%	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland	Ketamin Inresa 50 mg/mL	-
NaCl 0,9%	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland	Ecotainer®	3570160
Operationsbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland	-	-
Pufferlösung	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA	Gibco™- DPBS (Dubecco's phosphate buffered saline)	14190250
Xylazin 2%	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland	Xylavet 20 mg/mL	-

Die Explantation der A. carotis erfolgte bei den Versuchstieren 3 Wochen nach partieller Ligatur der linksseitigen A. carotis. Das Narkosemittel wurde wie oben beschrieben zubereitet. Initial erfolgte die Narkose gewichtsadaptiert mittels Ketamin 10% (0,1µL / g KG) und Xylazin 2% (0,05 µL / g KG). Nach erfolgreicher Narkose wurde eine letale Dosis von Ketamin 10% (0,2 µL / g KG) und Xylazin 2% (0,1 µL / g KG) appliziert. Für die

Perfusionsfixation des Versuchstiers wurde ein adaptiertes Protokoll des Vorgehens nach Gage et al. (2012) verwendet.

Der Zweck der Perfusionsfixation besteht darin, dass durch die Verwendung des vaskulären Systems zur Fixation, jegliche Gewebe mehr oder weniger zeitgleich fixiert werden können, noch bevor es zu einer durch Hypoxie bedingten Schädigung des Gewebes kommt. Die beschriebene Methode wurde im Wesentlichen für die Fixation von nervalen Gewebe, wie beispielsweise dem Hirn entwickelt, da dieses Organ besonders anfällig für Hypoxie ist. Es ist jedoch ebenso für alle anderen Gewebe anwendbar, wenn die Hypoxiezeit so kurz wie möglich gehalten wird.

3.3.1 Vorbereitung der Perfusionsspritzen und des Operationsplatzes

Zu Beginn wird die Perfusionspufferlösung in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Anschließend werden jeweils eine 20 mL-Spritze mit Perfusionspufferlösung und Formaldehyd 4% (Fixationslösung) befüllt und an ein Dreiweghahn-System angeschlossen. Hieran wird wiederum eine 21 Gauge-Flügelkanüle angeschlossen und mit der Pufferlösung luftleer gespült. Dieser Vorgang ist besonders wichtig, um das Injizieren von Luftblasen in das vaskuläre System des Versuchstieres und somit eine unzureichende Fixation durch ein mögliches Blockieren der Blutgefäße durch Luftblasen zu verhindern. Für die Operation und Explantation wird das Versuchstier auf eine abwischbare Unterlage platziert. Zellstofftücher sind unter dem Versuchstier zu auslegen und es sollten ausreichend Tupfer bereitgelegt werden, um das durch die Perfusion aus dem Gefäßsystem geschwemmte Blut und die entsprechenden Lösungen adäquat aufzufangen. Das desinfizierte Operationsbesteck ist in einer sinnvollen Reihenfolge am Operationsplatz bereitzulegen, um den Eingriff zügig und sicher durchzuführen.

3.3.2 Präparation des Tieres für die Perfusionsfixation

Sobald das Versuchstier eine ausreichende Narkosetiefe erreicht hat, kann es auf der Operationsfläche gelegt werden. Hier ist insbesondere der Zwischenzehenreflex zur

Beurteilung einer adäquaten Narkosetiefe zu überprüfen. Dieser sollte vor der Operation nicht mehr auslösbar sein.

Zur Fixierung der Extremitäten und der Überstreckung des Kopfes sind Nadeln oder Einmalkanülen zu verwenden, da nach der Fixation eine anderweitige Positionierung des Versuchstieres nicht mehr möglich ist. Anschließend wird ein ca. 2 - 4 cm langer Oberbauchquerschnitt mit der spitzen Schere direkt unterhalb des Rippenbogens durch das Integument und sämtliche abdominellen Gewebeschichten durchgeführt und das Abdomen eröffnet. Vorsichtig wird die Leber vom Diaphragma gelöst. Dann wird das Diaphragma mit der Präzisionsschere eröffnet und vorsichtig vom Rippenbogen abgetrennt.

Als nächstes werden die Rippen seriell lateral bis zur Clavicula beidseits mit der Schere durchtrennt und der Brustkorb am Sternum nach cranial aufgeklappt, sodass die intrathorakalen Organe einsehbar sind. Vorsichtig kann nun das epikardiale Fettgewebe mit einer Pinzette entfernt werden. Mit einer Pinzette wird das Herz für die Punktion temporär fixiert. Vorsichtig wird die Nadel der Flügelkanüle vorsichtig apikal in den linken Ventrikel bzw. in den linksventrikulären Ausflusstrakt eingeführt und dort platziert.

Eine korrekte Platzierung wird durch vorsichtige Applikation von Pufferlösung und dem Aufdehnen des linken Ventrikels überprüft. Unter Umständen ist die Nadel auch durch die Wand der Aorta oder des aufgedehnten Herzens sichtbar. Die Nadel darf nicht bis in den Aortenbogen reichen. Damit soll eine Applikation der Perfusionslösungen nach dem Abzweigen der A. brachialis oder der A. carotis sinistra vermieden werden.

Danach werden Tupfer lateral des Thoraxes platziert, um das bei der folgenden Perfusion ausgeschwemmte Blut aufzufangen. Zuletzt wird vor Beginn der Perfusion die V. cava inferior mit einer Präzisionsschere durchtrennt, um ein Abfließen des Blutes und der Perfusionslösungen zu gewährleisten.

3.3.3 Perfusionsfixation

Vor der Perfusionsfixation wird der Kopf des Versuchstieres in Reklination fixiert. Dies kann mit Hilfe einer Spitzennadel durchgeführt werden. Dabei ist darauf zu achten, dass das Versuchstier zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben ist.

Die Perfusion erfolgt kontinuierlich über eine 20 mL-Spritze. Die Perfusion selbst erfolgt langsam und gleichmäßig mit einer Geschwindigkeit von ca. 1 mL / min. Zunächst wird die Perfusionspufferlösung appliziert. Die Aufhellung der Leber ist hier ein Indiz für eine ausreichend gute Perfusion. Sobald die Perfusionslösung appliziert ist, kann der Dreiwegehahn so positioniert werden, dass die Fixationslösung mit der gleichen Fließgeschwindigkeit wie die Perfusionslösung appliziert wird. Hier kommt es in der Regel zu einem Fixationstremor innerhalb der ersten Sekunden nach Beginn der Perfusion mit der Fixationslösung. Sobald die Fixationslösung vollständig appliziert worden ist, ist das Versuchstier steif und kann für die folgende Dissektion auf die Operationsfläche gelegt werden. Sämtliche mit Formaldehydlösung getränkten Verbrauchsmaterialien müssen im Anschluss der Perfusionsfixation nach Arbeitsvorschrift des Labors ordnungsgemäß gesammelt und entsorgt werden.

3.3.4 Dissektion

Die Dissektion wird mikroskopisch durchgeführt. Hierbei ist eine ausreichende Vergrößerung auszuwählen. Um die wesentlichen anatomischen Strukturen ausreichend gut erkennen zu können wurde hier eine zehnfache Vergrößerung gewählt. Das Integument wird vom Sternum aus nach cranial bis zum Kiefer medial eröffnet und die Haut jeweils links und rechts nach lateral aufgeworfen und fixiert - auch hier beispielsweise mit Einmalkanülen.

Als nächstes werden die beiden Aa. carotis communis vorsichtig präpariert. Hierbei dient die distal vorhandene Ligatur linksseitig als Orientierungshilfe. Rechts wird die Bifurkation der A. carotis communis in die A. carotis interna und A. carotis externa aufgesucht. Nun wird an beiden Aa. carotis distal der genannten anatomischen Leitstrukturen jeweils ein ca. 4 cm langer Faden der Fadenstärke 1 mm mit einem Knoten angebracht. Die beiden Enden der Fäden sollten hier möglichst gleich lang sein. Sie markieren das distale

Gefäßende des Explantats. Anschließend wird der Thymus mit den Pinzetten vorsichtig entfernt und das Sternum freigelegt.

Nachfolgend wird vorsichtig das Sternum längs durchtrennt und der Thorax nach lateral aufgeklappt. Hierbei ist ein tiefer Gewebeschnitt lateral des Herzens hilfreich. Es ist von außerordentlicher Wichtigkeit, dass die Gefäße nicht verletzt werden. Nun wird das Herz apikal mit einer Nadel fixiert. Es werden die Abgänge der A. brachiocephalica und der A. carotis communis sinistra präpariert. Die proximale Ligation zur Explantation geschieht an der Aorta. Für die A. brachiocephalica und somit A. carotis communis dextra wird proximal des Gefäßabganges aus der Aorta der Faden entsprechend angebracht. Für die A. carotis communis sinistra wird der Faden distal des entsprechenden Gefäßabganges, jedoch vor dem Abgang der A. subclavia sinistra, platziert. Hierbei wird ebenfalls mit einem 4 cm langen Faden der Fadenstärke 1 mm legiert. Es ist darauf zu achten, dass die Fadenenden möglichst unterschiedlich lang sind. Diese markieren somit das proximale Ende des Explantates.

Zunächst erfolgt die Explantation der A. communis sinistra. Hierfür wird die Aorta zwischen dem Abgang der A. brachiocephalica und der A. carotis communis sinistra durchtrennt. Anschließend erfolgt die Durchtrennung distal der proximalen Gefäßligatur unmittelbar vor dem Abgang der A. subclavia sinistra, um die A. carotis communis sinistra proximal abzusetzen. Das Gefäß kann nun vorsichtig bis zur distalen Ligatur freipräpariert und schließlich auch distal nach der Ligatur abgesetzt werden. Unmittelbar im Anschluss der Explantation wird der Gefäßabschnitt in Formaldehyd 4% (Fixationslösung) eingelegt.

Die Dissektion der A. carotis communis dextra erfolgt auf ähnliche Weise. Zuerst ist jedoch die A. subclavia dextra abzusetzen. Anschließend wird auch hier die Durchtrennung der Aorta ascendens proximal der proximalen Gefäßligatur vollzogen. Anschließend wird das Gefäß freigelegt und ebenfalls distal zur distalen Gefäßligatur abgesetzt und unmittelbar in Formaldehyd 4% (Fixationslösung) gelegt.

3.3.5 Aufbewahrung der Gewebeproben

Die Einbettkassette wird entsprechend des Versuchstieres und der Gewebeprobe beschriftet und das Gefäß längs in die Kassette gelegt, sodass es nicht mit der Kassette in Berührung kommt. Hierzu werden die Ligaturfäden zur Hilfe genommen, die im Deckel der Einbettkassette eingeklemmt werden. Hierbei dienen die unterschiedlich langen Fadenenden der proximalen Ligatur als Orientierung. Das proximale Gefäßende wird stets gleich in jeder Kassette ausgerichtet, um später die Einbettung korrekt ausgerichtet durchzuführen.

Die Einbettkassetten werden anschließend für mindestens 24 Stunden in Formaldehyd 4% eingelegt. Erst im Anschluss erfolgt eine Überführung in Ethanol 70% bis zur weiteren Prozessierung.

3.4 Paraffineinbettung der Gewebeproben

Die verwendeten Materialien für die Paraffineinbettung und Schnittpräparation sind in **Tab. 3.7** aufgeführt.

Tabelle 3.7: Verwendete Materialien für die Paraffineinbettung und Schnittpräparation (alphabetisch geordnet).

Material	Firma	Produkt	Artikel- / Bestell-Nummer
Adhäsionsobjektträger	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	Epredia™ SuperFrost Plus™	J1830AMNZ
Deckgläser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Deckgläser Stärke 1, 24 x 60 mm	H878.2
Durchlichtmikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland	Leica DMIL	-
Eindeckmittel	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Neo-Mount™	109016
Einweg-Mikrotomklinge	FEATHER Safety Razor Co., Ltd, Japan	Mikrotomklinge „Fine“	S-35
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Ethanol absolut zur Analyse EMSURE®	1009832500
Gewebeeinbettssystem	Especialidades Médicas MYR, S.L., Llorenç del Penedès, Spanien	Modular Tissue Embedding Center EC 350	-
Gewebeinfiltrations-automat	Thermo Electron Corp., Waltham, Massachusetts, USA	Shandon Citadel 1000	-
Neo-Clear	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Xylolersatz	109843
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG	Objektträger Stärke ca. 1 mm	1000200
Paraffin Typ 6	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	Epredia™ Paraffin Typ 9	12066669
Paraffin Typ 9	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland	Epredia™ Paraffin Typ 9	12066669
Rotationsmikrotom	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Deutschland	HistoCore BIOCUT - Manuelles Rotationsmikrotom	149BIO000C1
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Xylol zur Analyse EMPARTA® ACS	1086332500

Die Gewebeeinfiltration wurde nach folgendem Protokoll (**Tab. 3.8**) und unter Verwendung von Paraffin Typ 9 durchgeführt. Dieses ermöglicht ebenfalls eine Schnittdicke von bis zu 2 µm, wobei hier standardmäßig für die weitere Aufarbeitung eine Schnittdicke von 5 µm verwendet wurde.

Tabelle 3.8: Protokoll für die Einbettung der Gewebeproben. Abkürzungen: EtOH: Ethanol, PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung.

Schritt	Zeit (h = Stunde, min = Minute)
STEP 1 mit PBS	Überspringen
STEP 2 mit 70% EtOH	1h
STEP 3 mit 80% EtOH	1h
STEP 4 mit 96% EtOH	1h
STEP 5 mit 100% EtOH	1h
STEP 6 mit 100% EtOH	1h
STEP 7 mit 100% EtOH	Überspringen
STEP 8 mit Aceton	Überspringen
STEP 9 = Neoclear (1)	40 min
STEP 10 = Neoclear (2)	40 min
STEP 11 = Paraffin 60	1h
STEP 12 = Paraffin 90	1 - 24h

Alle Lösungen wurden nach Verwendung des Gewebeeinfiltrationsautomaten sachgerecht wieder in die entsprechenden Aufbewahrungsflaschen überführt und mögliche Verunreinigungen durch Paraffin entfernt.

Im Anschluss an die Gewebeeinfiltration wurde die jeweilige Carotide eingebettet. Hierfür wurde das in **Tab. 3.7** aufgeführte Gewebeeinbettssystem verwendet. Es ist von außerordentlicher Wichtigkeit, die Gewebe korrekt einzubetten, um später die Schnittpräparation adäquat durchführen zu können. Dazu muss das proximale Gefäßende mit den Anteilen der Aorta auf dem Boden der Einbettkassette platziert werden, da die ersten 4000 µm des Gefäßes ab dem Abgang aus der Aorta von besonderem Interesse für die spätere Auswertung sind. Hierfür wird sich an der Befestigung innerhalb der Gewebekassette sowie ebenfalls an den unterschiedlich

langen Fäden zur Befestigung des Präparates orientiert. Die unterschiedlich langen Enden wurden am proximalen Gefäßabschnitt befestigt. Nun wird der kürzere Faden so nah wie möglich am Knoten abgeschnitten und der verbleibende Faden ebenfalls so kurz abgeschnitten, dass er mit der Pinzette noch gut greifbar ist, um auf dem Boden der Einbettkassette platziert werden zu können. Die Carotiden werden dann senkrecht eingebettet und auf die Kühlplatte zum Aushärten gestellt.

Nach ca. 20 Minuten ist der Paraffinblock mit dem Gewebe ausreichend ausgehärtet und kann aus der Einbettkassette vorsichtig gelöst werden. Anschließend wird überschüssiges Paraffin bis auf eine Nähe von ca. 1 cm um das eingebettete Gewebe herum entfernt. Einerseits können damit kleinere Schnitte realisiert werden, sodass auf einen Objektträger ca. 5 Schnitte passen, andererseits wird dadurch auch das Schneiden *per se* erleichtert, da durch Proben mit einem geringen Anteil an Paraffin geschnitten wird, das für die weitere Auswertung in der Färbung ohnehin ausgewaschen würde.

3.5 Schnittpräparation der Gewebeproben mit dem Mikrotom

Für die Schnittpräparation wurde sich an dem Manual zur „*Paraffineinbettung und Schnittpräparation mit dem Mikrotom*“ aus der Fortbildungsreihe Scientia von Leica Microsystems von Rolls et al. (2010) orientiert. Für die Schnittpräparation wurde ein manuelles Rotationsmikrotom (**vgl. Tab. 3.7**) verwendet.

Der Klingenfrenkwinkel wurde entsprechend zwischen 1-5 Grad eingestellt, um ein optimales Schnittergebnis zu erzeugen. Um die Klingenlebensdauer zu maximieren, ist es sinnvoll, die Klinge so einzuspannen, dass man je nach Abnutzungsgrad, die Klinge verschiebt, um alle Abschnitte zu nutzen, ehe man eine neue Klinge verwendet. Die Klinge wird standardmäßig nach dem initialen Trimmen durch den Faden verschoben, um mit einem ausreichend scharfen Teil der Klinge das Gefäß weiter zu schneiden. Der Faden stumpft die Klinge sehr schnell ab und führt unter Umständen zu einem suboptimalen Schnittergebnis. Ebenfalls können während der Schnittpräparation Verkalkungen durch atherosklerotische Plaques die Klinge soweit abnutzen, dass ein Verschieben der Klinge im weiteren Verlauf der Präparation nötig wird, was größtenteils zu einer Verbesserung des Schnittergebnisses führt. Die Ausrichtung der Probe sollte, sofern es die Schnittqualität zulässt, im weiteren Verlauf nicht mehr verändert werden.

Die Schnitte einer A. carotis communis wurden wie folgt angefertigt: Begonnen wurde mit dem Abgang aus der Aorta. Der Abgang aus der Aorta und somit der Beginn bei 0 μm wird als erster Gewebsschnitt definiert, auf dem sich die A. carotis communis geschlossen mit allen Gewebeabschnitten vom Endothel bis zur Adventitia abbildet. Zur Kontrolle werden, sofern möglich, die unmittelbar vorherigen Gewebeschnitte ebenfalls aufbewahrt. Bei der Schnittpräparation werden wie in **Tab. 3.9** beschrieben abwechselnd herkömmliche, unbeschichtete Objektträger aus Natron-Kalk-Glas der 3. hydrolytischen Klasse sowie Adhäsionsobjektträger für mögliche immunhistologische Färbungen verwendet.

Tabelle 3.9: Organisation der histologischen Schnitte.

Gefäßabschnitt in μm	Objektträger
0-1000	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1000-1025	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1025-1050	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1050-1075	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1075-1100	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1100-250	Trimmen
1250-1275	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1275-1300	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1300-1325	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1325-1350	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1350-1500	Trimmen
1500-1525	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1525-1550	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1550-1575	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1575-1600	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1600-1750	Trimmen
1750-1775	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1775-1800	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1800-1825	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd

Tabelle 3.9: Organisation der histologischen Schnitte (Fortsetzung).

Gefäßabschnitt in μm	Objektträger
1825-1850	unbeschichteter und Adhäsionsobjektträger abwechselnd
1850-2000	Trimmen
ab 2000-4000	Vorgehen wie von 1000 - 2000 μm .

Die ersten 1000 μm der A. carotis communis werden vollständig auf Objektträger aufgenommen. Anschließend werden nach 100 μm , die auf Objektträger aufgenommen werden, die folgenden 150 μm verworfen und dann erneut 100 μm aufgenommen. Bei allen verwendeten Schnitten werden jeweils 5 Präparate à 5 μm Dicke gemeinsam auf einen Objektträger platziert. Hierfür wird ein Schnittband erzeugt und anschließend vorsichtig in ein kaltes Wasserbad gelegt. Anschließend werden die Schnittpräparate mit einem Pinsel angehoben und vorsichtig mit der glänzenden Seite nach unten möglichst blasenfrei in ein warmes Wasserbad gelegt. Das Wasserbad sollte möglichst eine Temperatur von 5 - 9 °C unterhalb des Schmelzpunktes des Wachses aufweisen.

Nun können die Schnitte mit dem Objektträger vertikal aus dem Wasser gehoben werden, um ein optimales Abfließen des Wassers zu gewährleisten und ein Verrutschen der Schnitte zu vermeiden.

Da für die weitere Verarbeitung nicht alle Schnitte verwendet werden, ist eine Trocknung bei 65 °C nicht zu empfehlen, da diese im Trockenschrank in der Regel dazu führt, dass die Präparatstruktur verändert wird und bis zur Färbung nicht mehr adäquat zu beurteilen ist, da der durch das Paraffin erzeugte Kontrast der einzelnen Gewebeschnitte im Durchlichtmikroskop vermindert wird. Die Schnitte sollten lediglich kurz auf Zellstoff gelegt werden, um im weiteren Verlauf trocken und kühl im Objektträgerkasten aufbewahrt zu werden. So können vor der Färbung die entsprechenden Referenzschnitte des jeweiligen Gefäßabschnittes ausgewählt werden.

3.6 Auswahl der Referenzschnitte

Um eine entsprechende Vergleichbarkeit der Aa. carotis communis der Versuchstiere zu ermöglichen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Zuerst wurde die zu untersuchende

Länge des Gefäßes ausgewählt. Diese wurde auf eine Länge von 4000 µm beginnend beim Abgang aus der Aorta definiert.

Der Gefäßabschnitt von 4000 µm wurde anschließend in 8 Teilabschnitte mit je einer Länge von 500 µm unterteilt. Aus jedem der Teilabschnitte wurde dann der Schnitt, der am meisten Plaque abbildete als Referenz des Abschnitts ausgewählt.

In der Regel wurden keine großen Schwankungen der Plaques oder Gefäßgröße innerhalb eines 500 µm langen Abschnittes beobachtet. Für jeden Teilabschnitt lagen acht Objektträger mit jeweils fünf aufeinander folgenden Schnitten und damit insgesamt 40 histologische Schnittpräparate pro Versuchstier zur Auswahl vor. Zur Bestimmung des Referenzschnittes eines Teilabschnitts wurde stets das Schnittpräparat, das auf einem herkömmlichen, unbeschichteten Objektträger platziert wurde, bevorzugt ausgewählt. Dies allerdings unter der Voraussetzung, dass die Schnitte der Präparate auf dem jeweiligen Objektträger nicht merkbare Unterschiede in der Plaque- und/oder Gefäßgröße aufwiesen.

3.7 Histologische Färbung

Das verwendete Material für die histologische Färbung ist in **Tab. 3.10** aufgeführt.

Tabelle 3.10: Verwendetes Material für die histologische Färbung (alphabetisch geordnet).

Material	Firma	Produkt	Artikel- / Bestell- Nummer
Destilliertes Wasser	-	-	-
Elastica-Färbungs-Kit	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Elastica-Färbungs-Kit	HT25A-1KT
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Ethanol absolut zur Analyse EMSURE®	1009832500
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	Xylol zur Analyse EMPARTA® ACS	1086332500

Zur histologischen Färbung wurde das Elastica-Färbungs-Kit (Merck KgaA Darmstadt, Deutschland) genutzt. Das mitgelieferte Protokoll zur Anwendung wurde entsprechend angepasst, sodass wie folgt vorgegangen wurde (**vgl. Tab. 3.11**).

Tabelle 3.11: Färbeprotokoll.

Schritt	Zeitdauer des Schritts (min:sek)		Beschreibung
1	05:00	Xylol 100%	Den Objektträgerhalter vorsichtig und langsam in die Lösung führen und stehen lassen. Beim Herausnehmen überschüssige Flüssigkeit abtropfen lassen.
2	05:00	Xylol 100%	
3	00:10	Ethanol 95%	Dreimal in die Ethanol-Lösung eintauchen und herausnehmen. Die überschüssige Flüssigkeit gut abtropfen lassen.
4	00:10	Ethanol 80%	
5	00:10	Ethanol 70%	
6	00:10	Ethanol 60%	
7	02:00	Destilliertes Wasser	Den Objektträgerhalter in destilliertes Wasser stellen. Nach der Verwendung, muss das destillierte Wasser für eine weitere Färbung ausgetauscht werden.
8	10:00	Elastic-Stain-Solution	Den Objektträgerhalter vorsichtig in die Elstica-Färbungs-Emulsion eintauchen.
9	ca. 01:00	Destilliertes Wasser	Dreimaliges Auswaschen mit destilliertem Wasser. Hierfür wird ein Objektträgerbehälter mit destilliertem Wasser gefüllt und der Objektträgerhalter vorsichtig eingetaucht und auf und ab bewegt. Anschließend wird der Objektträgerhalter herausgenommen und das destillierte Wasser durch frisches ausgetauscht. Dieser Schritt wird dreimal durchgeführt.
10	01:30	Eisenchlorid	Der Objektträgerhalter wird vorsichtig in die im Kit enthaltene Eisenchlorid-Lösung eingetaucht. Beim Herausnehmen überschüssige Flüssigkeit gut abtropfen lassen.
11	02:00	Leitungswasser	Der Objektträgerhalter wird in einen entsprechenden Behälter gestellt und für 2 min unter laufendem Leitungswasser gespült. Hier ist darauf zu achten, dass das Wasser nicht direkt auf die Objektträger gegeben wird, um ein Ablösen der histologischen Schnitte von diesem zu verhindern.
12		Kontrolle	Begutachtung und Bewertung der Kontrastierung der Elastica-Färbung: <ul style="list-style-type: none"> - Falls die Elastica zu stark angefärbt ist, sollte zu Schritt 9 zurückgegangen werden. - Falls die Elastica zu schwach angefärbt ist, sollte zu Schritt 7 zurückgegangen werden und die Zeit in der Eisenchlorid-Lösung entsprechend verkürzt werden.
13	00:10	Ethanol 95%	Dreimal in die Ethanol-Lösung eintauchen und herausnehmen. Die überschüssige Flüssigkeit gut abtropfen lassen.
18	01:00	Xylol 100%	Den Objektträgerhalter vorsichtig und langsam in die Lösung führen und stehen lassen. Beim Herausnehmen überschüssige Flüssigkeit abtropfen lassen.
19	00:10	Xylol 100%	Dreimal in die Xylol-Lösung eintauchen und herausnehmen. Die überschüssige Flüssigkeit gut abtropfen lassen.

Anschließend wurden die Objektträger auf Zellfaserpapier zum Trocknen gelegt. Hier ist darauf zu achten, dass die Trocknung aufgrund des Xylols unter einem entsprechenden Abzug durchzuführen ist. Nach kurzer Trocknungszeit wurden auf jeden Objektträger die entsprechenden Deckgläser aufgebracht. Nach ca. 24-stündiger Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Objektträger bis zur weiteren Prozessierung lichtundurchlässig gelagert.

3.8 Digitalisierung der Gewebeschnitte

In **Tab. 3.12** sind die verwendeten Geräte für die Digitalisierung der histologischen Präparate aufgeführt.

Tabelle 3.12: Verwendete Materialien der Digitalisierung der histologischen Präparate.

Material	Firma	Produkt	Artikel- / Bestell-Nummer
Fluoreszenz-Mikroskop	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland	BZ-X810	HT25A-1KT
		BZ-9000	1009832500

Die Digitalisierung erfolgte mit den oben genannten Fluoreszenz-Mikroskopen (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland). Zur Digitalisierung der Gewebeschnitte wurde die Hellfeld-Mikroskopie verwendet. Die Bilder wurden bei dem Modell BZ-X810 in 10-facher und bei dem Modell BZ-9000 in 20-facher Auflösung durchgeführt. Die Belichtungszeit betrug in der Regel 1/600 Sekunde, der Weißabgleich erfolgte automatisch. Die Farbausgabe erfolgte in RGB und die Bit-Tiefe betrug bei dem Modell BZ-X810 8 Bit, bei dem Modell BZ-9000 28 Bit. Es wurde stets auf einen ausreichend guten Kontrast der Farben und eine adäquate Belichtung geachtet, um eine Überbelichtung und dadurch eine falsche Abbildung von Teilbereichen des Gefäßschnittes zu vermeiden

3.9 Planimetrie

Die Planimetrie erfolgte mit dem open source-Programm ImageJ Version 1.53 (National Institute of Health, Bethesda, USA) für das Betriebssystem macOS. Hierzu wurde das

entsprechende Bild mit ImageJ geöffnet. Die Maßeinheit wurde entsprechend der Skalierung auf μm eingestellt. Anschließend wurden für jedes Gefäß folgende Grenzbereiche für die auszumessenden Flächen festgelegt:

1. Endothel
2. Elastica Interna
3. Elastica Externa

Somit ergaben sich drei Flächen, aus denen anschließend weiterhin die Media- oder auch die Intima-Werte berechnet wurden. Jede Fläche wurde separat gespeichert, um die Flächenbestimmungen gegebenenfalls entsprechend rückwirkend nachvollziehen zu können. Hieraus ergibt sich für jede linke A. carotis communis des jeweiligen Versuchstiers die entsprechenden Flächen in den Abschnitten für das Lumen, die Gesamtfläche bis zur Elastica interna und die Gesamtfläche bis zur Elastica externa. Beispielhaft sind die Primärdaten der Planimetrierung für die legierte linke A. carotis communis des Versuchstiers Nr. 15, TAL-007849 in **Tab. 3.13** dargestellt.

Tabelle 3.13: Primärdaten der Planimetrierung für die legierte linke A. carotis communis beispielhaft dargestellt für das Versuchstier Nr. 15, TAL-007849 (vgl. Tab, 3.1). Abschnitt: Definiert den Bereich innerhalb des Gefäßes. Zu beachten ist, dass lediglich einer der fünf auf dem Objektträger befindlichen histologischen Schnitte als Referenzschnitt ausgewählt wurde. Aus diesem Grund kann die tatsächliche μm -Angabe bis zu 25 μm über dem angegebenen Wert liegen. Lumen: Definiert die Lumenfläche. Elastica interna: Definiert die Gesamtfläche bis zur Elastica interna, Elastica externa definiert die Gesamtfläche bis zur Elastica externa. Alle Flächenangaben sind in μm^2 angegeben.

Abschnitt in μm	Lumen in μm^2	Elastica interna in μm^2	Elastica externa in μm^2
250	58.769	60.218	82.433
950	50.677	70.135	112.395
1.250	40.319	85.369	130.261
1.750	48.768	93.836	140.019
2.250	42.725	84.676	143.778
2.750	29.097	112.448	159.124
3.300	44.493	76.885	158.570
3.750	28.237	52.641	83.715

3.10 Berechnung des Plaquevolumens

Die Berechnung des Plaquevolumens erfolgt aus der Länge des Gefäßabschnittes sowie der jeweiligen Intimfläche (vgl. **Abb. 3.2**).

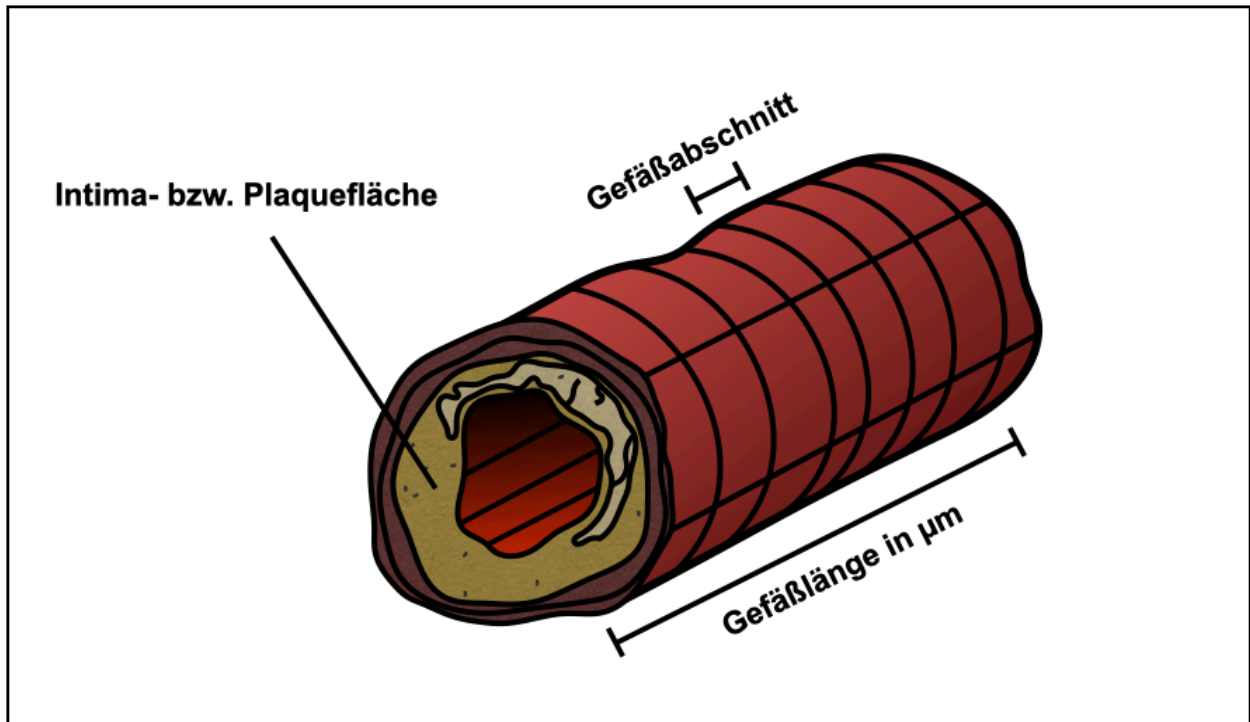


Abbildung 3.2: Skizze zur Berechnung des Plaquevolumens aus der Länge des Gefäßabschnittes und der Intimafläche.

Auf Grundlage der aus **Tab. 3.13** erstellten Primärdaten der Planimetrie kann für jeden Gefäßabschnitt (jeweils 500 µm Länge) die Intimafläche wie folgt berechnet werden:

$$\text{Intimafläche (in } \mu\text{m}^2) = \text{Fläche Elastica interna (} \mu\text{m}^2) - \text{Lumenfläche (} \mu\text{m}^2). \quad (1)$$

Die Intimafläche ist normalerweise, sofern kein Plaque vorliegt sehr gering ($\rightarrow 0$), da die Endothelzellen direkt der Elastica interna aufliegen. Da sich Atherosklerose zu Beginn makroskopisch in Veränderungen der Gefäßintima im Rahmen einer Verdickung der Intima zeigen, wird nachfolgend die Plaquefläche synonym für die Intimafläche verwendet. Diese Fläche wurde entsprechend der acht Gefäßabschnitte (von 0 bis 4000 µm) für jedes Versuchstier aus der Wildtypgruppe und der KDM2B-Knockdown-Gruppe nach Gleichung (1) berechnet. In **Tab. 3.14** sind die Flächen für das Versuchstier TAL-007849 beispielhaft dargestellt.

Tabelle 3.14: Mit Gleichung (1) berechnete Werte der Intima- bzw. Plaquefläche für den jeweiligen Gefäßabschnitt beispielhaft für das Versuchstier TAL-007849.

Abschnitt in μm	Lumen in μm^2	Elastica interna in μm^2	Intimafläche in μm^2
250	58.768,8	60.218,3	1.449,6
950	50.677,3	70.134,8	19.457,5
1.250	40.318,5	85.368,6	45.050,1
1.750	48.767,9	93.835,5	45.067,6
2.250	42.724,9	84.675,6	41.950,7
2.750	29.096,7	112.448,2	83.351,5
3.300	44.492,7	76.884,6	32.391,8
3.750	28.237,1	52.641,0	24.403,9
SUMME	343.084,1	636.206,6	293.122,5

In **Abb. 3.3** sind die berechneten Werte der Intima- bzw. Plaquefläche für den jeweiligen Gefäßabschnitt in einem Liniendiagramm für das Versuchstier TAL-007849 aufgetragen. Jeder Gefäßabschnitt, für den ein Referenzschnitt und ein Referenzwert der Plaquefläche berechnet wurde, weist eine Länge von 500 μm auf.

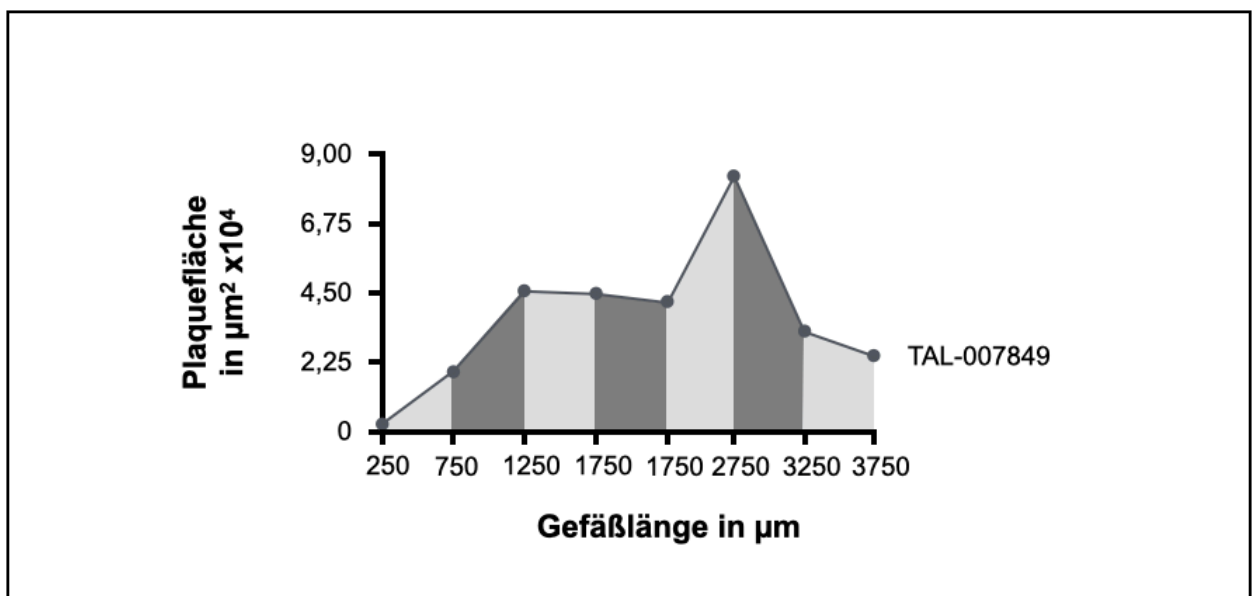


Abbildung 3.3: Plaquefläche in Abhängigkeit zur Länge des Gefäßabschnittes für das Versuchstier TAL-007849.

Da der Referenzschnitt für den jeweiligen Gefäßabschnitten zwischen seinem Anfang und Ende liegt, wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Werte stets die Mitte des

jeweiligen Gefäßabschnittes ausgewählt. So wurde für den Gefäßabschnitt 0 bis ≤ 500 μm der Wert 250 μm , für den Abschnitt 500 bis ≤ 1000 μm der Wert 750 usw. für den Abzissenwert gewählt. Entsprechend dieser Vorgehensweise wird die Bezeichnung auch für die nachfolgenden Gefäßabschnitte gewählt. Die mikroskopische Begutachtung sämtlicher histologischer Schnitte zeigte, dass die Veränderungen der Plauefläche diese gleichmäßig zu bzw. abnimmt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass von einem Referenzschnitt zum nächsten die Plauefläche ebenfalls gleichmäßig zu- bzw. abnimmt, weshalb die einzelnen Datenpunkte miteinander verbunden werden können. Mit dieser Annahme kann nun näherungsweise mit den Werten der Länge des Gefäßabschnittes (jeweils 500 μm) und der berechneten Plauefläche (μm^2) das jeweilige Plauevolumen (μm^3). Das Plauevolumen P lässt sich nunmehr wie folgt berechnen.

$$P = \frac{a \cdot b}{2} = \frac{(X'' - X') \cdot (Y' + Y'')}{2} \quad (2)$$

$(X'' - X')$ stellt die entsprechende Länge des Gefäßabschnittes (a) dar. $(Y' + Y'')$ stellt die entsprechende Plauefläche (b) dar (vgl. **Abb. 3.4**).

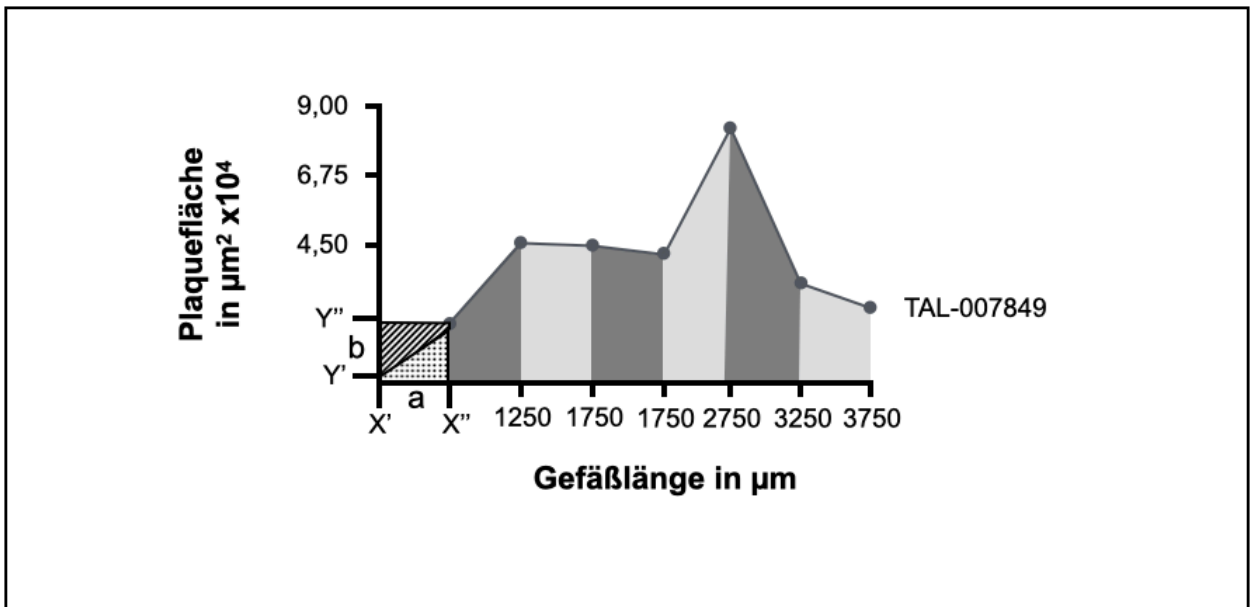


Abbildung 3.4: Berechnung des Plauevolumens (hier gepunktete Fläche). Diese berechnet sich für den ersten Gefäßabschnitt als die Hälfte des Rechtecks mit den Kantenlängen (a) und (b). $X' = 250$ μm . $X'' = 750$ μm . $Y' = 0,14$ μm^2 . $Y'' = 1,95$ μm^2 .

Dadurch dass die Werte auf der Ordinate bereits eine Fläche darstellen, erhält man durch diese Berechnung und Hinzuziehen der Abzissenwerte als dritte Dimension ein Volumen: das Plaquevolumen. Die Fläche unterhalb eines jeden Gefäßabschnitts stellt letztendlich die Hälfte eines Rechtecks dar, sodass zur Berechnung des Plaquevolumens die Rechteckfläche halbiert wird. Beispielhaft wird für den ersten Gefäßabschnitt des

$$P = \frac{(750 - 250)\mu\text{m} \cdot (1449,554 + 19457,464)\mu\text{m}^2}{2} = 5.226.754,5 \mu\text{m}^3 \quad (3)$$

Versuchstieres TAL-007849 das Plaquevolumen berechnet.

Über Summation aller Plaquevolumina über alle Gefäßabschnitte wird das gesamte Plaquevolumen eines jeden Versuchstier bestimmt. Die Primärdaten aller Versuchstiere können im Anhang eingesehen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Operierte Tiere

Insgesamt wurden während des Versuchszeitraums 32 Tiere operiert, von denen 24 (75%) die postoperative Phase von 21 Tagen abgeschlossen haben. 8 (25%) Tiere verstarben im postoperativen Verlauf meist innerhalb weniger Tage nach der Ligatur-Operation und wurden somit nicht zur Ergebnisanalyse herangezogen. Von den verstorbenen Tieren waren sieben männlich (2 KDM2B-Wildtyp; 5 KDM2B-Knockdown) und eines weiblich (KDM2B-Knockdown). Die frühzeitige Todesursache war meist auf eine intraoperative Komplikation wie eine leichte Blutung, eine verlängerte Dauer der Operation oder auf einen Narkoseüberhang zurückzuführen, der bei den Tieren zu einem schlechten Operationsergebnis führte. Die Ergebnisanalyse und Berechnungen erfolgten mit Microsoft Excel. Die finale Auswertung basiert auf insgesamt 24 Versuchstieren (12 männliche und 12 weibliche Tiere). In beiden Versuchsgruppen war die Verteilung des Geschlechtes sowie die Verteilung des Genotyps (KDM2B-Wildtyp, KDM2B-Knockdown) jeweils gleich verteilt (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Verteilung der Genotypen und des Geschlechts der Versuchstiere.

	Männliche Versuchstiere	Weibliche Versuchstiere	Gesamt
KDM2B-Wildtyp	6	6	12
KDM2B-Knockdown	6	6	12
Gesamt	12	12	24

4.2 Gewichtsverlauf

Während der Versuchszeit von 21 Tagen kam es in den Versuchsgruppen KDM2B-Wildtyp und KDM2B-Knockdown im Durchschnitt zu einer Gewichtszunahme der Versuchstiere. Die absolute Gewichtszunahme in der Versuchsgruppe mit dem KDM2B-Wildtypgen betrug um Durchschnitt 2,3 g, was einer relativen Gewichtszunahme von 9,7% entspricht. Demgegenüber verzeichnete die Versuchsgruppe des KDM2B-Knockdown-Genotyps eine absolute Gewichtszunahme von durchschnittlich 1,9 g, was einer relativen Gewichtszunahme von 7,8% entspricht. Die größte Gewichtszunahme

verzeichnete ein männliches Versuchstier der KDM2B-Wildtyp-Gruppe mit einer absoluten Gewichtszunahme von 5,2 g (24,1%). Lediglich ein Versuchstier, ebenfalls männlich, jedoch aus der Versuchsgruppe mit dem KDM2B-Knockdown-Genotyp wies während der Versuchszeit einen Gewichtsverlust von 0,9 g (-3,2%) auf. Ebenfalls wurde beobachtet, dass die geschlechterspezifische Gewichtszunahme in beiden Versuchsgruppen jeweils bei den männlichen Versuchstieren höher war. In der KDM2B-Wildtyp-Gruppe lag die durchschnittliche Gewichtszunahme der Weibchen bei 1,1 g (5,5%) und die der Männchen bei 3,50 g (12,6%). In der KDM2B-Knockdown-Gruppe zeigte sich ein ähnliches Bild mit einer durchschnittlichen Gewichtszunahme der Weibchen um 1,3 g (6,3%) und der Männchen um 2,4 g (9,0%) (Tab. 4.2).

Tabelle 4.2: Gewichtsverlauf aufgeteilt nach Versuchsgruppe und nach Geschlecht innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe.

	Tag 1	Tag 21	Zunahme absolut in g	Zunahme relativ in %
KDM2B-Wildtyp - Gesamt	23,8	26,1	2,3	9,7
KDM2B-Wildtyp - weiblich	20,0	21,1	1,1	5,5
KDM2B-Wildtyp - männlich	27,7	31,2	3,5	12,6
KDM2B-Knockdown - Gesamt	24,0	25,9	1,9	7,8
KDM2B-Knockdown - weiblich	21,1	22,4	1,3	6,3
KDM2B-Knockdown - männlich	27,0	29,5	2,4	9,0

4.3 Intima- bzw. Plauefläche

Als maßgebliches Ziel und wichtigster Versuchsparameter dieser Arbeit gilt der Vergleich der Fläche der obersten Schichten der Tunica interna (Intima) der KDM2B-Wildtyp- und KDM2B-Knockdown-Versuchsgruppe. Die Intima ist letztendlich die innerste luminale Schicht jeglicher Blutgefäße bestehend aus einem einschichtigen Plattenepithel, dem sich darunter anschließenden Stratum subendotheliale und der Membrana elastica interna. In **Abb. 4.1** wird die Summe der Intima- bzw. Plauefläche (in μm^2) aller Versuchstiere der KDM2B-Wildtyp- und KDM2B-Knockdown-Versuchsgruppe über die Gefäßlänge für den jeweiligen Gefäßabschnitt dargestellt. Erkennbar ist das die Plauefläche der KDM2B-Knockdown-Versuchstiere in Summe für jeden Gefäßabschnitt größer ist, als für die Wildtyp-Gruppe.

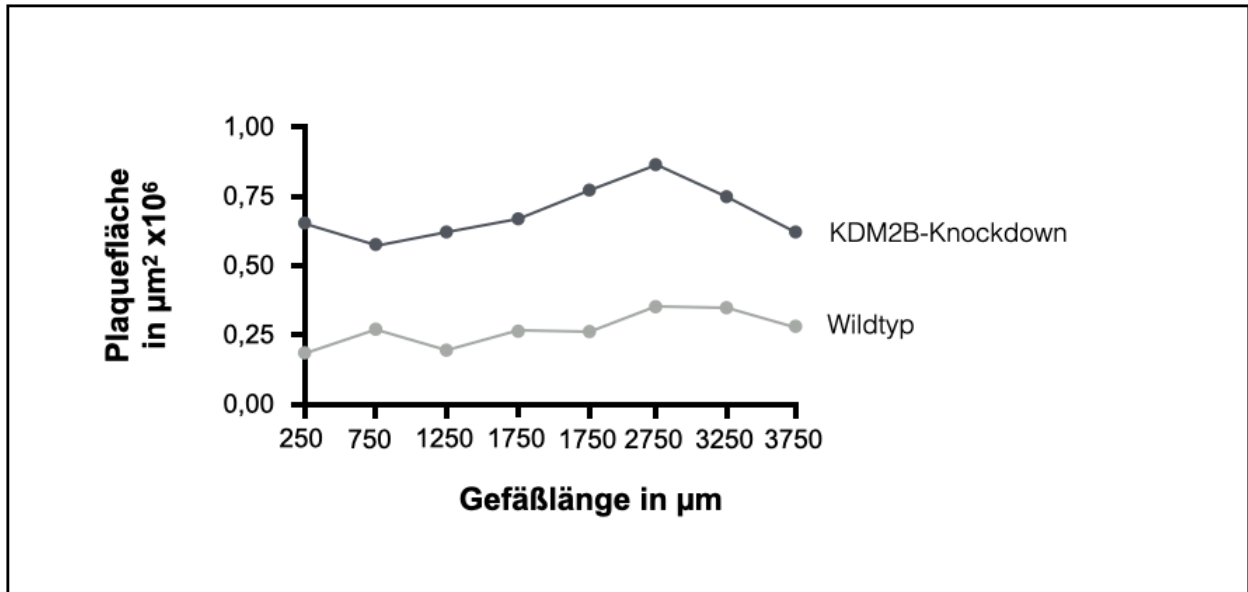


Abbildung 4.1: Summierte Plaquefläche aller Versuchstiere der KDM2B-Wildtyp- und KDM2B-Knockdown-Versuchsgruppe über die Länge des jeweiligen Gefäßabschnittes.

Weitergehend erfolgte die Darstellung mittels Kastengrafik für jeden Gefäßabschnitt in **Abb. 4.2**. Gezeigt sind pro Gefäßabschnitt zwei Kastengrafiken. Rot repräsentiert die KDM2B-Knockdown- und blau repräsentiert die Wildtyp-Versuchsgruppe. Die Enden der Antennen stehen für die Minima und Maxima der jeweiligen Kastengrafik. Das repräsentiert den berechneten Mittelwert. Die Kurve verknüpft den Mittelwert der Plaquefläche jedes Abschnittes der jeweiligen Versuchsgruppe. Zur besseren Übersicht wurden die Mittelwerte zusätzlich zwischen die beiden Kastengrafiken des jeweiligen Gefäßabschnittes platziert. Insbesondere aus der Kurvendarstellung ist erkennbar, dass in jedem Gefäßabschnitt die durchschnittliche Plaquefläche aller Versuchstiere in der KDM2B-Knockdown-Versuchsgruppe deutlich größer ist, als in der Kontrollgruppe der Wildtypen.

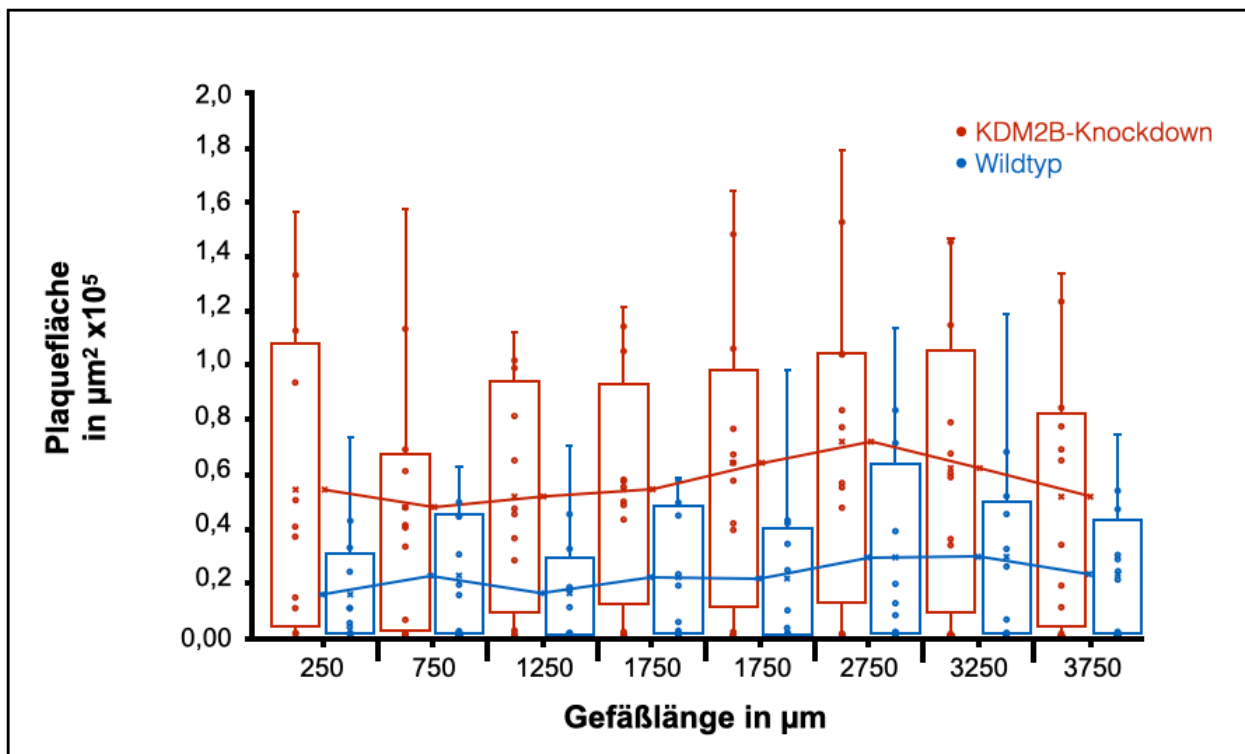


Abbildung 4.2: Plaquefläche der unterschiedlichen Versuchsgruppen inklusive der Einzelwerte. Die Kastengrafik zeigt die Einzelwerte (Kreise) und Mittelwerte (X) der jeweiligen Versuchsgruppe für den jeweiligen Gefäßabschnitt in μm^2 als Kastengrafik. Die Antennen beschreiben Minima und Maxima der jeweiligen Kastengrafik. Die Kurve stellt die Mittelwerte aus der jeweiligen Versuchsgruppe dar. In blau ist die KDM2B-Wildtypgruppe abgebildet. In rot ist die KDM2B-Knockdowngruppe abgebildet.

4.4 Fläche unter der Kurve als Plaquevolumen

Für die weitergehende Datenanalyse wurde nicht die Summe der Plaquefläche aus den ausgewählten Gefäßabschnitten verwendet, sondern aus der Fläche eines zylindrischen Gewebeabschnittes das Plaquevolumen näherungsweise berechnet, da davon ausgegangen wird, dass der Plaque vom einen Referenzschnitt zum nächsten gleichmäßig ab- bzw. zunimmt (vgl. Abb. 3.3). Somit kann die Bestimmung des gesamten Plaquevolumens näherungsweise erstellt werden. Zudem handelt es sich bei dem Wert der Gesamtflächen unter der Kurve aller Gefäßabschnitte um einen exakteren Wert, da er das gesamte Gefäß näherungsweise adäquater beschreibt, als die punktuellen Werte der Referenzschnitte. Es erfolgte eine Berechnung des durchschnittlichen Plaquevolumens der jeweiligen Versuchsgruppe aus jeweils 12 Versuchstieren.

Als primärer Endpunkt wurde das Plaquevolumen festgelegt. Sekundäre Endpunkte, die in Kapitel 4.6 näher beschrieben werden, besitzen einen explorativem Charakter, sodass die p-Werte bezüglich dieser sekundären Endpunkte entsprechend keinen confirmatorischen Charakter aufweisen und somit für diese keine Adjustierung bezüglich multiplen Testens (z.B. Bonferroni-Korrektur) vorgenommen wurde.

Für den primären Endpunkt, das Plaquevolumen, konnte mittels F-Test für unabhängige Stichproben gezeigt werden, dass es keinen Unterschied in der Varianz der beiden Versuchsgruppen gibt. Ein für den Gruppenvergleich nachfolgend durchgeführter zweiseitiger T-Test zur Prüfung des Signifikanzniveaus von 5% ergab als Wert für den Primären Endpunkt einen p-Wert von $p \approx 0,026$. Für die Versuchsgruppe der KDM2B-Knockdown-Tiere ergab sich ein durchschnittliches Plaquevolumen von $202.993.494 \mu\text{m}^3$, während sich für die Versuchsgruppe der Wildtyp-Tiere ein Plaquevolumen von $81.229.185 \mu\text{m}^3$ ergab (vgl. Abb. 4.3). Demnach ist das Plaquevolumen in der Versuchsgruppe der KDM2B-Knockdown-Versuchstiere im Vergleich zu den KDM2B-Wildtyp-Versuchstieren signifikant erhöht. Die Fehlerbalken beschreiben die jeweilige Standardabweichung vom Mittelwert innerhalb der Versuchsgruppe.

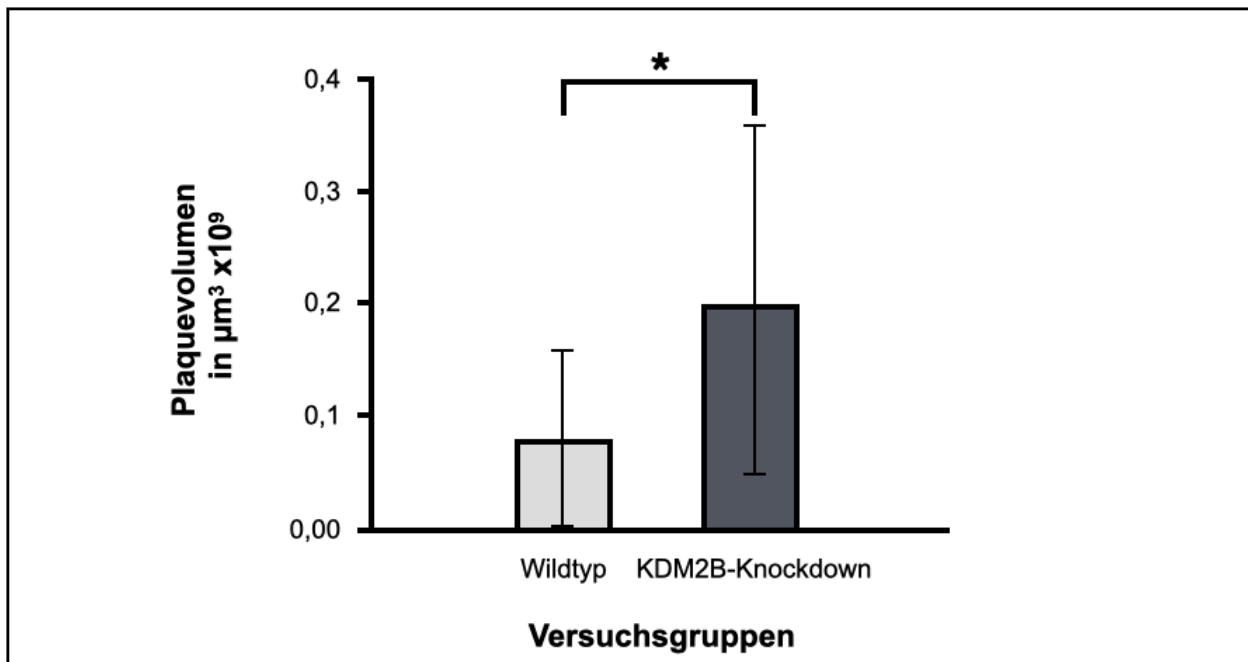


Abbildung 4.3: Durchschnittliches Plaquevolumen über alle Gefäßabschnitte der unterschiedlichen Versuchsgruppen in μm^3 . Dargestellt ist das durchschnittliche Plaquevolumen für die Versuchsgruppe der Wildtyp-Tiere ($81.229.185 \mu\text{m}^3$) sowie für die Versuchsgruppe der KDM2B-Knockdown-Tiere ($202.993.494 \mu\text{m}^3$), $* = p \approx 0,026$ im zweiseitigen T-Test. Die Fehlerbalken beschreiben die jeweilige Standardabweichung vom Mittelwert innerhalb der Versuchsgruppe.

4.5 Repräsentative histologische Gewebeschnitte

Nachfolgend wird für die jeweilige Versuchsgruppe ein repräsentatives Gefäß abgebildet. (vgl. **Abb. 4.4**). Hierfür wurde für den jeweiligen Gefäßabschnitt der histologische Schnitt des Versuchstieres der entsprechenden Versuchsgruppe ausgewählt, der dem Mittelwert der Intimafläche am nächsten ist.

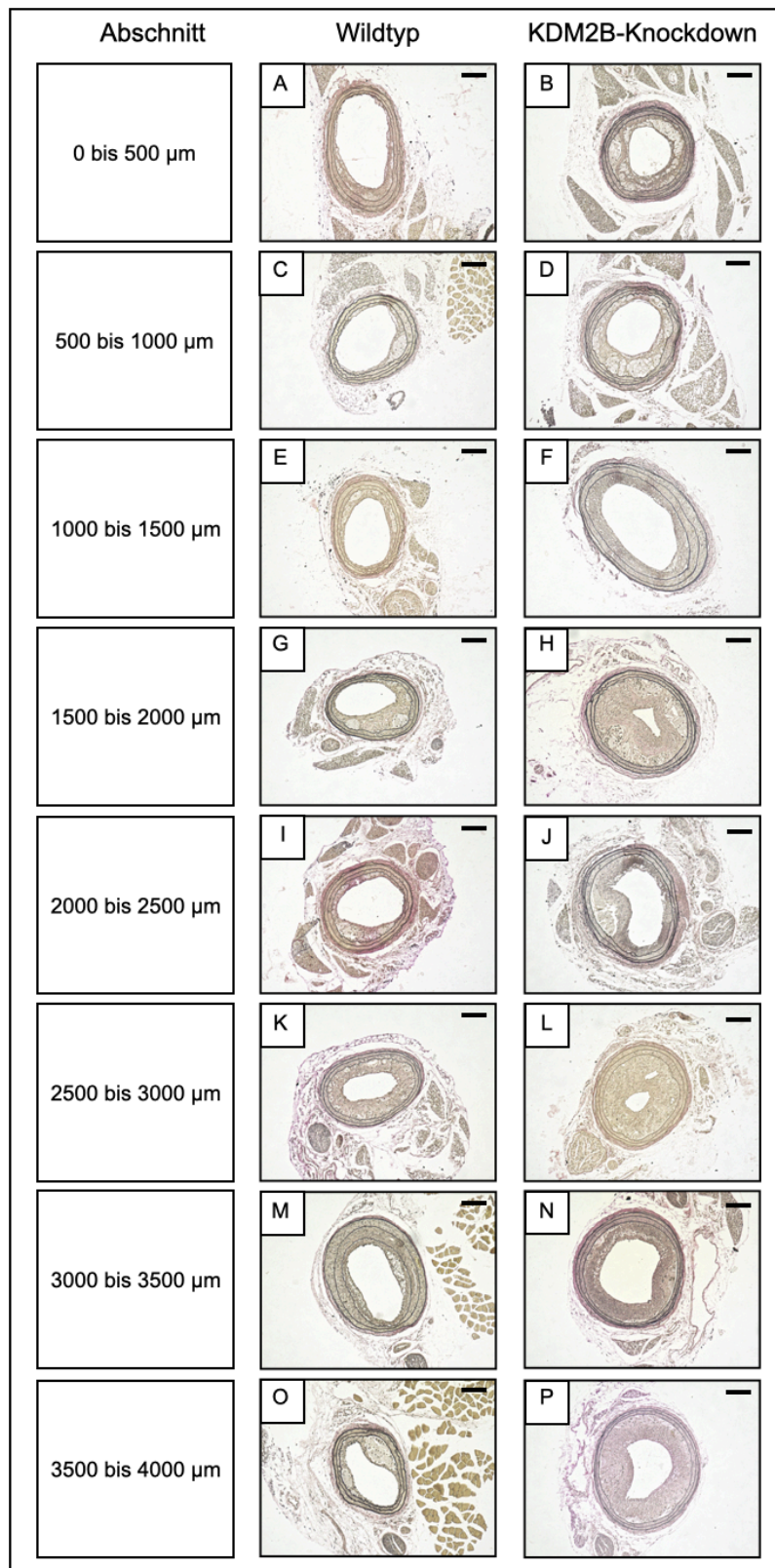


Abbildung 4.4: Repräsentative histologische Schnitte. Dargestellt sind histologisch repräsentative Schnitte für den ausgewiesenen Bereich der Aa. carotis communis. Färbungen Elastica-Färbung. A-P Versuchstiere: A: TAL-007738, B: TAL-10150, C: TAL-007849, D: TAL-10149, E: TAL-007736, F: TAL-10160, G: TAL 007864, H: TAL-10155, I: TAL-007737, J: 10149, K: TAL-007864, L: TAL-007752, M: TAL-007849, N: TAL-10150, O: TAL-007849, P: TAL-10150 (vgl. **Tab. 3.1**). Maßstabbalken = 100 μm .

4.6 Männliche und weibliche Unterscheidung

Betrachtet man die jeweiligen Versuchsgruppen spezifisch nach Geschlecht ist zu erkennen, dass sowohl unter den männlichen als auch unter den weiblichen Versuchstieren ein größeres Plaquevolumen in der KDM2B-Knockdown-Versuchsgruppe beobachtet werden konnte (vgl. **Abb. 4.5A** und **Abb. 4.5C**). So zeigte sich bei den weiblichen Versuchstieren in der KDM2B-Knockdown-Versuchsgruppe ein summiertes Plaquevolumen von $1.134.153.829 \mu\text{m}^3$, während in der weiblichen Wildtyp-Gruppe ein summiertes Plaquevolumen von lediglich $480.395.663 \mu\text{m}^3$ bestimmt wurde (vgl. **Abb. 4.5A** und **Abb. 4.5B**). In der Gruppe der männlichen Versuchstiere war ein ähnlicher Effekt zu beobachten. Hier betrug das summierte Plaquevolumen aller KDM2B-Knockdown-Versuchstiere $1.301.768.110 \mu\text{m}^3$ und das der männlichen Wildtypen $494.354.556 \mu\text{m}^3$ (vgl. **Abb. 4.5C** und **Abb. 4.5D**). Über das gesamte Gefäß ist das summierte Plaquevolumen bei der weiblichen KDM2B-Knockdown-Gruppe um den Faktor 2,36 höher als in der weiblichen Wildtyp-Kontrollgruppe (vgl. **Abb. 4.5B**). Die gleiche Tendenz zeigt sich ebenfalls in der Gruppe der männlichen Versuchstiergruppe. Hier ist das summierte Plaquevolumen in der KDM2B-Knockdown-Gruppe sogar um Faktor 2,6 gegenüber der männlichen Wildtyp-Kontrollgruppe erhöht (vgl. **Abb. 4.5C** und **Abb. 4.5D**). Die jeweiligen Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

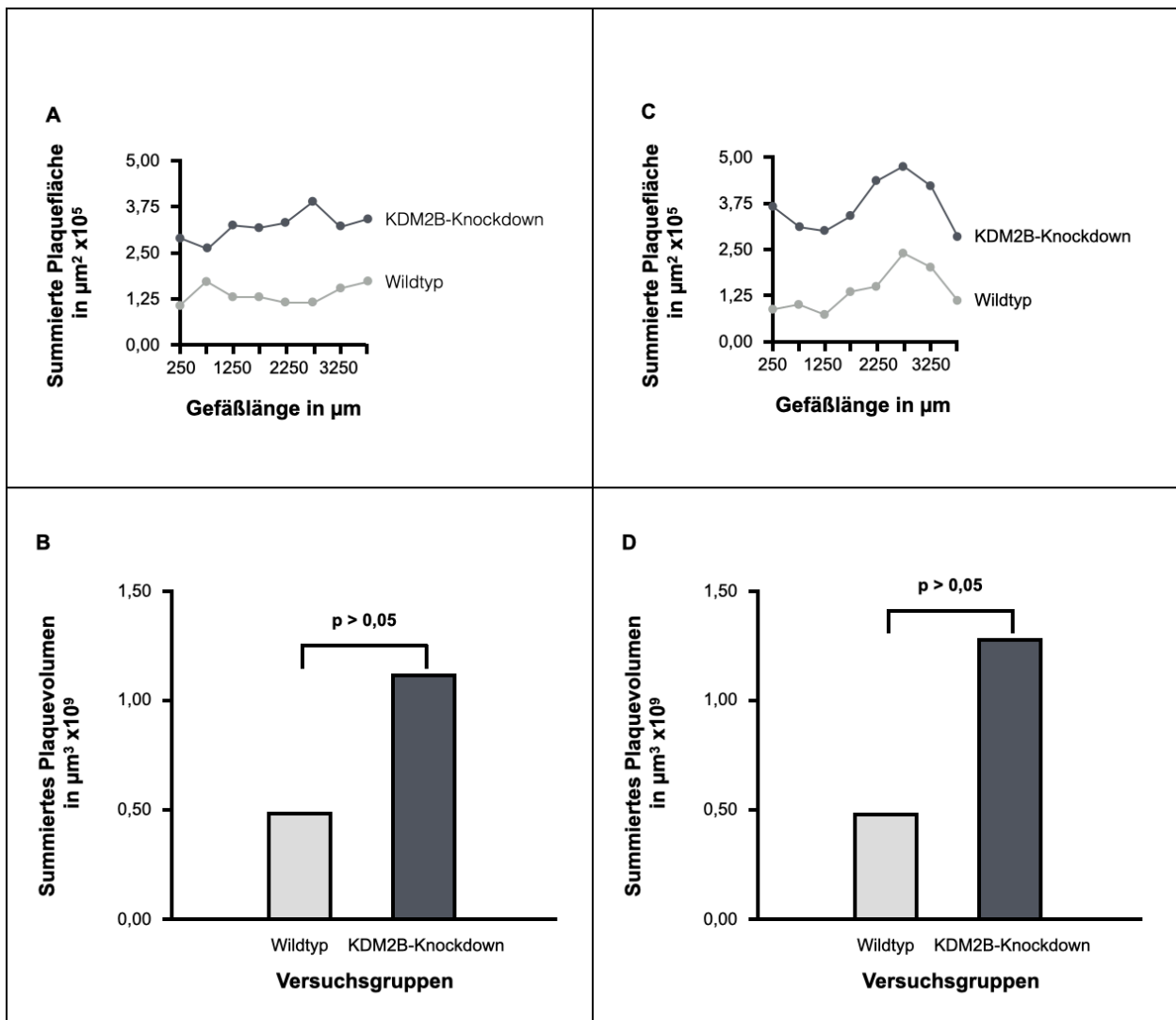


Abbildung 4.5: Unterschiede der Summierten Plauefläche und des summierten Plaquevolumens nach Geschlecht. A: Plauefläche der weiblichen Versuchstiere für beide Versuchsgruppen, B: Summiertes Plaquevolumen der weiblichen Versuchstiere, $p > 0,05$, C: Plauefläche der männlichen Versuchstiere für beide Versuchsgruppen, D: Summiertes Plaquevolumen der männlichen Versuchstiere, $p > 0,05$.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von KDM2B im Krankheitsbild der Atherosklerose näher untersucht. Aufgrund der Tatsache, dass im verwendeten *in vivo*-Modell KDM2B gezielt in Endothelzellen unterdrückt wurden, konnte der spezifische Effekt des Histon-modifizierenden Enzyms KDM2B auf die Bildung von Atherosklerose untersucht werden. Durch das Verfahren der partiellen Ligatur mit Ligatur der A. carotis interna, der A. occipitalis sowie der A. carotis externa erfolgte die Induktion eines gestörten Flussprofils in der A. carotis communis, wodurch die Bildung von Atherosklerose und die Plaque-Entwicklung im Mausmodell induziert werden konnte. Die histologische Aufarbeitung und Planimetrierung der entsprechenden Schnittpräparate zeigte, dass die KDM2B-Knockdown-Versuchsgruppe im Gegensatz zu der Gruppe der Wildtypiere signifikant mehr Atherosklerose aufweist ($p < 0,05$).

Das Histon-modifizierende Enzym KDM2B wurde bislang in verschiedensten Krankheitsbildern untersucht. Hier wurde in der bisherigen Forschung ein Schwerpunkt vor allem auf die Erforschung onkologischer Erkrankungen gelegt (Yan et al. 2018). Im Rahmen kardiovaskulärer Krankheitsmodelle wurde KDM2B bislang kaum erforscht. Wegweisend in diesem Forschungsfeld war hier die Arbeit von Yin et al. (Yin et al. 2019), in der erstmals die Rolle von KDM2B im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie näher untersucht wurde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass dem Protein KDM2B in Endothelzellen im Rahmen der Bildung von Atherosklerose eine protektive Wirkung zugesagt werden kann. Fehlt das entsprechende Protein in den Endothelzellen kommt es geschlechtsunabhängig zur Bildung von mehr atherosklerotischen Plaques.

Diese Ergebnisse sind kongruent zu präliminären und bisher unveröffentlichten *in vitro*-Resultaten der Arbeitsgruppe Althoff, Charité – Universitätsmedizin Berlin, die zeigte, dass unter proatherogenem Fluss das Protein KDM2B in Endothelzellen weniger stark exprimiert ist, als unter Anwendung eines physiologischen Flussprofils. Hier war eine Aussage über die Kausalität, inwieweit eine verminderte Expressionsmenge an KDM2B zur Bildung von mehr oder weniger Atherosklerose führt und KDM2B einen protektiven oder schädigenden Effekt aufweist, bislang nicht eindeutig möglich. Diese Aussage ist jedoch in der vorliegenden Arbeit durch die durchgeführten *in vivo*-Versuche ausreichend

belegt, da ersichtlich wird, dass ohne KDM2B in den Endothelzellen eine erhöhte Plaquebildung stattfindet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die konkrete Plaquezusammensetzung nicht weitergehend untersucht. Hier wäre sicherlich interessant, unterschiedliche Charakteristika der Plaquebeschaffenheit bezüglich ihrer Instabilität zu untersuchen. Zielführend wären u. a. hier weitergehende immunohistologische Untersuchungen hinsichtlich der Zellzusammensetzung durchzuführen.

5.1 Histonmethylierung in Atherosklerose

Bereits 2015 wurde gezeigt, dass in humanen atherosklerotischen Carotisplaques unabhängig vom Stadium der Atherosklerose im Gegensatz zu gesunden Carotiden ein signifikant geringerer Grad der Dimethylierung des Histons H3 an den untersuchten Positionen H3K9 und H3K27 vorliegt. Bezüglich der Position H3K4 zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Greißel et al. 2015). In der Arbeit wurden darüber hinaus weitergehende Analysen bezüglich der Expression möglicher involvierter Methyltransferasen durchgeführt. Hier wurde lediglich die für H3K9 und H3K27 spezifische Methyltransferase G9a nachgewiesen, deren Expression in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose, insbesondere in den vorherrschenden Leukozyten und in frühen Stadien der Atherosklerose, stark in Makrophagen erhöht war. Die Autoren geben jedoch an, die am Prozess der Methylierung beteiligte Demethylasen, zu denen ebenfalls KDM2B gehört, nicht analysiert zu haben. Ebenfalls muss erwähnt werden, dass lediglich die Dimethylierung untersucht wurde, nicht jedoch höhere Methylierungsgrade wie beispielsweise die Trimethylierung der oben genannten Positionen.

Im Rahmen eines *gain of function*-Modells zeigten Rohde et al. (2016) durch die Etablierung einer KDM2B-Überexpression in mausembryonalen Fibroblasten (MEFs), dass hier durchaus eine Reduktion der Mengen der Methylierung an Position H3K4me3 und H3K36me2 stattfindet. Kein Unterschied war hingegen bei den Expressionsmengen von H3K4me2 nachzuweisen (Rohde et al. 2016).

Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, dass in den epigenetischen Prozessen der Atherosklerose neben den initial untersuchten Methyltransferasen durchaus auch

Demethylasen wie KDM2B eine wichtige Rolle bei der Atherosklerose-Entstehung und -Entwicklung eingeräumt werden muss.

Von Interesse wäre daher die Untersuchung der Expressionsmenge von KDM2B und auch entsprechender Zielstrukturen im Histon sowie mögliche dadurch beeinflusste Gene und deren Produkte in atherosklerotischen Plaques im Vergleich zu gesundem Gewebe. Hierdurch könnten weitere Zielstrukturen und nachgeschaltete Signalketten als mögliche pharmakologische Ansatzpunkte ermittelt werden.

Zu den Zielstrukturen von KDM2B gehören die Histone H3K4 sowie H3K36, an denen jeweils Demethylierungen erfolgen. In einer Publikation von Wierda et al. (2014), die im Wesentlichen den Zusammenhang reduzierter Mengen an Trimethylierungen von H3K27, das nicht zu den Zielstrukturen von KDM2B gehört, in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques untersuchten, wurde ebenfalls aufgezeigt, dass es Hinweise auf Unterschiede in der Menge von H3K4-Methylierungen in atherosklerotischen Plaques im Gegensatz zur Tunica media gesunder Gefäße bestehen. Greissel et al. (2016) wiesen nach, dass Methylierungen an der Position H3K4 tatsächlich mit dem Schweregrad der Atherosklerose korreliert werden können.

Movassagh et al. (2011) untersuchten im Rahmen der Herzinsuffizienz humane Herzen und führten ein genomweites Mapping u. a. bezüglich einer H3K36-Trimethylierung (H3K36me3) durch. Hier zeigte sich insbesondere in Herzen mit hochgradiger Herzinsuffizienz im Vergleich zur Kontroll-Gruppe eine höhere Anreicherung an H3K36me3 (Movassagh et al. 2011). Auch H3K4-Trimethylierungen weisen einen signifikanten Zusammenhang im Rahmen der Herzinsuffizienz auf, wie es bisher im Rattenmodell gezeigt wurde (Kaneda et al. 2009). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivität von KDM2B als Demethylase von H3K36 und H3K4 möglicherweise auch in weiteren kardiovaskulären Erkrankungen, wie der Herzinsuffizienz, einen Einfluss auf die Pathogenese und den Verlauf der Erkrankungen haben. Eine tiefergehende Untersuchung bezüglich weiterer Methylierungsgrade von H3K36 und auch des Expressionslevels von KDM2B wäre zur weiteren Charakterisierung der Rolle von KDM2B in diesem speziellen Krankheitsmodell sehr sinnvoll.

5.2 KDM2B und Inflammation

Im Entstehungsprozess der Artherosklerose spielt die Inflammation des Gewebes eine wesentliche Rolle. NF- κ B ist hierbei ein Hauptakteur im Rahmen inflammatorischer Ereignisse auf molekularer Ebene, der üblicherweise durch IL-1 oder aber auch TNF- α vermehrt aktiviert wird (Tak und Firestein 2001, Lawrence 2009). Hierbei muss erwähnt werden, dass NF- κ B nicht allein eine proinflammatorische Eigenschaft besitzt, sondern auch eine antiapoptotische Wirkung aufweist, die die inflammatorischen und nachgeschalteten apoptotischen Pathways von TNF- α zu hemmen vermag (Wang et al. 1998). NF- κ B scheint ebenfalls KDM2B zu aktivieren, das wiederum in Krebszellen durch die Bindung an c-Fos-Promotoren diese inaktiviert und die Krebszellen der Apoptose durch Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) entzieht (Ge et al. 2011). Möglicherweise spielen auch im Rahmen der Atherosklerose antiapoptotische Wirkmechanismen im Zusammenspiel von NF- κ B und KDM2B eine entscheidende Rolle für einen möglicherweise antiinflammatorischen Effekt auf das Gefäßendothel und die sich im Prozess der Atherosklerose bildende Neointima.

5.3 KDM2B und die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase

In vitro-Versuche mit humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) zeigten, dass die Expression endothelialer Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS) durch zellspezifische Histonmodifikation kontrolliert wird (Fish et al. 2005). Hierbei wurde auch nachgewiesen, dass eine Inhibierung der Methylierung von H3K4 durch 5'-Methylthioadenosin zu einer Reduzierung von eNOS RNA führt. Da KDM2B letztendlich eine Demethylierung an H3K4 erzeugen kann, ist es durchaus möglich, dass durch erhöhte KDM2B-Aktivität ebenfalls eine reduzierte Expression von eNOS herbeigeführt wird. Dies würde dann für einen negativen Einfluss durch KDM2B im Rahmen inflammatorischer Prozesse stehen. Die Ambivalenz von KDM2B in seiner protektiven bzw. möglicherweise pathogenen Wirkungsweise wurde jedoch bereits vorher auch im Rahmen onkologischer Erkrankungen beobachtet und schließt sich demnach hier nicht aus (Yan et al. 2018).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Protein KDM2B ist eine Histondemethylase, die als Akteur in verschiedenen zellbiologischen und molekularen Abläufen durch epigenetische posttranslationale Modifikation der Histone einen protektiven aber auch schädigenden Effekt im Rahmen unterschiedlicher Erkrankungen aufzeigt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, zu untersuchen, welcher Effekt KDM2B auf die Entstehung von Atherosklerose in einem *in vivo*-Mausmodell zugeschrieben werden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnten diese Zielsetzungen wie folgt beantwortet werden:

1. KDM2B besitzt einen signifikanten Effekt auf die Entstehung atherosklerotischer Plaques. Die Versuchsreihe auf Grundlage von 24 Versuchstieren zeigte, dass ohne das Protein KDM2B in Endothelzellen über einen 21-tägigen Versuchszeitraum, deutlich mehr Atherosklerose entsteht, als in der Kontrollgruppe der Wildtypiere.
2. Dieser Effekt betraf die weiblichen und männlichen Versuchstiere gleichermaßen, sodass der Einfluss von KDM2B auf die Entstehung von Atherosklerose geschlechtsunabhängig ist.

Aktuell wird in der klinischen Forschung der Atherosklerose der Fokus meist auf die einschlägigen Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Übergewicht, Diabetes mellitus, Rauchen und Dyslipidämien gerichtet und damit versucht, vor allem Cholesterinspiegel und hypertensive Blutdruckwerte in einen bestimmten Zielbereich einzustellen. Die gezielte Beeinflussung eines gestörten Blutflusses auf ein dysfunktionales Endothel hat bisher jedoch nur in sehr begrenztem Maße Berücksichtigung in der klinischen Anwendung gefunden. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgezeigt, dass das Histon-modifizierende Enzym KDM2B eine wesentliche Rolle in der Entstehung und Entwicklung von atherosklerotischen Plaques durch ein auf das Endothel wirkendes gestörtes Blutflussprofil einnimmt. Weitere Forschungsergebnisse aus unabhängigen Studien werden zeigen müssen, inwiefern sich KDM2B möglicherweise im Rahmen einer medikamentösen Therapie als Zielstruktur zur Prävention oder auch Therapie der Atherosklerose eignet.

7 Literaturverzeichnis

Althoff TF, Albarrán Juárez J, Troidl K, Tang C, Wang S, Wirth A, Takefuji M, Wettschureck N, Offermanns S (2012). Procontractile G protein-mediated signaling pathways antagonistically regulate smooth muscle differentiation in vascular remodeling. *J Exp Med*. 19;209(12):2277-90. doi: 10.1084/jem.20120350.

Andricovich J, Kai Y, Peng W, Foudi A, Tzatsos A (2016). Histone demethylase KDM2B regulates lineage commitment in normal and malignant hematopoiesis. *J Clin Invest* 126(3): 905-920. doi: 10.1172/JCI84014.

Baratchi S, Khoshmanesh K, Woodman OL, Potocnik S, Peter K, McIntyre P (2017). Molecular sensors of blood flow in endothelial cells. *Trends Mol Med* 23(9): 850-868. doi: 10.1016/j.molmed.2017.07.007.

Becher T, Riascos-Bernal DF, Kramer DJ, Almonte VM, Chi J, Tong T, Oliveira-Paula GH, Koleilat I, Chen W, Cohen P, Sibinga NES (2020). Three-dimensional imaging provides detailed atherosclerotic plaque morphology and reveals angiogenesis after carotid artery ligation. *Circ Res* 126(5): 619-632. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315804.

Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A (2007). Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 14: 1008-1016. doi: 10.1038/nsmb1337.

Blackledge NP, Zhou JC, Tolstorukov MY, Farcas AM, Park PJ, Klose RJ (2010). CpG islands recruit a histone H3 lysine 36 demethylase. *Mol Cell* 38: 179-190. doi: 10.1016/j.molcel.2010.04.009.

Brown AJ, Teng Z, Evans PC, Gillard JH, Samady H, Bennett MR (2016). Role of biomechanical forces in the natural history of coronary atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol*. 13(4): 210-220. doi: 10.1038/nrcardio.2015.203.

Bussolari SR, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr (1982). Apparatus for subjecting living cells to fluid shear stress. *Rev Sci Instrum* 53(12): 1851-1854. doi: 10.1063/1.1136909.

Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC (1969). Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man. *Nature* 223(5211): 1159-1160. doi: 10.1038/2231159a0.

Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC (1971). Atheroma and arterial wall shear. Observation, correlation and proposal of a shear dependent mass transfer mechanism for atherogenesis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 177(1046): 109-159. doi: 10.1098/rspb.1971.0019.

Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH (2007). Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol*. 26;49(25): 2379-2393. doi: 10.1016/j.jacc.2007.02.059.

Copeland RA, Solomon ME and Richon VM (2009). Protein methyltransferases as a target class for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 8: 724-732. doi: 10.1038/nrd2974.

Conway DE, Schwartz MA (2013). Flow-dependent cellular mechanotransduction in atherosclerosis. *J Cell Sci* 126(Pt 22): 5101-5109. doi: 10.1242/jcs.138313.

D'Agostino RB Sr, Pencina MJ, Massaro JM, Coady S (2013). Cardiovascular disease risk assessment: Insights from Framingham. *Glob Heart* 8(1): 11-23. doi: 10.1016/j.gheart.2013.01.001.

Davies PF, Remuzzi A, Gordon EJ, Dewey CF, Jr, Gimbrone MA, Jr (1986). Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2114-2117. doi: 10.1073/pnas.83.7.2114.

De Nicola I, Guerrieri AN, Penzo M, Ceccarelli C, De Leo A, Trerè D, Montanaro L (2020). Combined expression levels of KDM2A and KDM2B correlate with nucleolar size and prognosis in primary breast carcinomas. *Histol Histopathol* 35(10): 1181-1187. doi: 10.14670/HH-18-248.

DePaola N, Davies PF, Pritchard WF, Jr, Florez L, Harbeck N, Polacek DC (1999). Spatial and temporal regulation of gap junction connexin43 in vascular endothelial cells exposed to controlled disturbed flows *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3154-3159. doi: 10.1073/pnas.96.6.3154.

DePaola N, Gimbrone MA, Jr, Davies PF, Dewey CF., Jr (1992). Vascular endothelium responds to fluid shear stress gradients. *Arterioscler Thromb* 12: 1254-1257. doi: 10.1161/01.atv.12.11.1254.

Dewey CF Jr, Bussolari SR, Gimbrone MA Jr, Davies PF (1981). The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* 103(3): 177-185. doi: 10.1115/1.3138276.

Dimitrova E, Turberfield AH and Klose RJ (2015). His- tone demethylases in chromatin biology and beyond. *EMBO Rep* 16: 1620-1639. doi: 10.15252/embr.201541113.

Farcas AM, Blackledge NP, Sudbery I, Long HK, McGouran JF, Rose NR, Lee S, Sims D, Cerase A, Sheahan TW, Koseki H, Brockdorff N, Ponting CP, Kessler BM, Klose RJ (2012). KDM2B links the polycomb repressive complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. *Elife* 1:e00205. doi: 10.7554/eLife.00205.

Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P (1996). Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(20): 10887-10890. doi: 10.1073/pnas.93.20.10887.

Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P (1997). Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237(3): 752-757. doi: 10.1006/bbrc.1997.7124.

Fish JE, Matouk CC, Rachlis A, Lin S, Tai SC, D'Abreo C, Marsden PA (2005). The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. *J Biol Chem* 280(26): 24824-24838. doi: 10.1074/jbc.M502115200.

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Roper S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M

(2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37: 391-400. doi: 10.1038/ng1531.

Gabriels JE, Paul DL (1998). Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed. *Circulation research* 83: 636-643. doi: 10.1161/01.res.83.6.636.

Gage GJ, Kipke DR, Shain W (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp* 65: 3564. doi: 10.3791/3564.

Galbiati A, Penzo M, Bacalini MG, Onofrillo C, Guerrieri AN, Garagnani P, Franceschi C, Treré D, Montanaro L (2017). Epigenetic up-regulation of ribosome biogenesis and more aggressive phenotype triggered by the lack of the histone demethylase JHDM1B in mammary epithelial cells. *Oncotarget* 8(23): 37091-37103. doi: 10.18632/oncotarget.16181.

Gao Z, Zhu X, Dou Y (2015). The miR-302/367 cluster: a comprehensive update on its evolution and functions. *Open Biol* 5(12): 150138. doi: 10.1098/rsob.150138.

Ge R, Wang Z, Zeng Q, Xu X, Olumi AF (2011). F-box protein 10, an NF- κ B-dependent anti-apoptotic protein, regulates TRAIL-induced apoptosis through modulating c-Fos/c-FLIP pathway. *Cell Death Differ* 18(7): 1184-1195. doi: 10.1038/cdd.2010.185.

Gimbrone MA, Jr, Cybulsky MI, Kume N, Collins T, Resnick N (1995). Vascular endothelium. An integrator of pathophysiological stimuli in atherogenesis. *Ann NY Acad Sci* 748: 122-131. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb17312.x>.

Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G (2013). Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 22(1): 9-15. doi: 10.1016/j.carpath.2012.06.006.

Gimbrone MA Jr, García-Cardeña G (2016). Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res* 118(4): 620-636. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.

Glagov S, Zarins C, Giddens DP, Ku DN (1988). Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 112(10): 1018-1031. PMID: 3052352.

Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019) Reference Life Table. Seattle, United States of America: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME), 2021.

Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. Geneva, World Health Organization, 2020.

Greißel A, Culmes M, Burgkart R, Zimmermann A, Eckstein HH, Zerneck A, Pelisek J (2016). Histone acetylation and methylation significantly change with severity of atherosclerosis in human carotid plaques. *Cardiovasc Pathol* 25(2): 79-86. doi: 10.1016/j.carpath.2015.11.001.

Greißel A, Culmes M, Napieralski R, Wagner E, Gebhard H, Schmitt M, Zimmermann A, Eckstein HH, Zerneck A, Pelisek J (2015). Alternation of histone and DNA methylation in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb Haemost* 114(2): 390-402. doi: 10.1160/TH14-10-0852.

He J, Kallin EM, Tsukada Y and Zhang Y (2008). The H3K36 demethylase Jhdm1b/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15(Ink4b). *Nat Struct Mol Biol* 15: 1169-1175. doi: 10.1038/nsmb.1499.

He J, Nguyen AT, Zhang Y (2011). KDM2b/JHDM1b, an H3K36me2-specific demethylase, is required for initiation and maintenance of acute myeloid leukemia. *Blood* 117(14): 3869-3880. doi: 10.1182/blood-2010-10-312736.

He J, Shen L, Wan M, Taranova O, Wu H and Zhang Y (2013). Kdm2b maintains murine embryonic stem cell status by recruiting PRC1 complex to CpG islands of developmental genes. *Nat Cell Biol* 15: 373-384. doi: 10.1038/ncb2702.

Hou H, Yu H (2010). Structural insights into histone lysine demethylation. *Curr Opin Struct Biol* 20: 739-748. doi: 10.1016/j.sbi.2010.09.006.

Inagaki T, Iwasaki S, Matsumura Y, Kawamura T, Tanaka T, Abe Y, Yamasaki A, Tsurutani Y, Yoshida A, Chikaoka Y, Nakamura K, Magoori K, Nakaki R, Osborne TF, Fukami K, Aburatani H, Kodama T, Sakai J (2015). The FBXL10/KDM2B scaffolding protein associates with novel polycomb repressive complex-1 to regulate adipogenesis. *J Biol Chem* 290(7): 4163-4177. doi: 10.1074/jbc.M114.626929.

Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, Metzger D (1999). 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 Res* 27(22): 4324-4327. doi: 10.1093/nar/27.22.4324.

Johnson JL, Newby AC (2009). Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol* 20(5): 370-378. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283309848.

Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, Choi YL, Nonaka-Sarukawa M, Soda M, Misawa Y, Isomura T, Shimada K, Mano H (2009). Genome-wide histone methylation profile for heart failure. *Genes Cells* 14(1): 69-77. doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01252.x.

Kaniskan HU, Martini ML, Jin J (2018). Inhibitors of protein methyltransferases and demethylases. *Chem Rev* 118(3): 989-1068. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00801.

Koo A, Dewey CF, Jr, Garcia-Cardena G (2013). Hemodynamic shear stress characteristic of atherosclerosis-resistant regions promotes glycocalyx formation in cultured endothelial cells. *Am J Cell Physiol* 304: C137-C146. doi: 10.1152/ajpcell.00187.2012.

Kornberg RD (1977). Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem* 46: 931-954. doi: 10.1146/annurev.bi.46.070177.004435.

Konuma T, Nakamura S, Miyagi S, Negishi M, Chiba T, Oguro H, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Miyoshi H, Vidal M, Iwama A (2011). Forced expression of the

histone demethylase Fbxl10 maintains self-renewing hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* 39: 697-709. doi: 10.1016/j.exphem.2011.03.008.

Korshunov VA, Berk BC (2003). Flow-induced vascular remodeling in the mouse: a model for carotid intima-media thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(12): 2185-2191. doi: 10.1161/01.ATV.0000103120.06092.14.

Kottakis F, Foltopoulou P, Sanidas I, Keller P, Wronski A, Dake BT, Ezell SA, Shen Z, Naber SP, Hinds PW, McNiel E, Kuperwasser C, Tschlis PN (2014). NDY1/KDM2B functions as a master regulator of polycomb complexes and controls self-renewal of breast cancer stem cells. *Cancer Res* 74(14): 3935-3946. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2733.

Kouzarides T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128(4): 693-705. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.005.

Kuang Y, Lu F, Guo J, Xu H, Wang Q, Xu C, Zeng L, Yi S (2017). Histone demethylase KDM2B upregulates histone methyltransferase EZH2 expression and contributes to the progression of ovarian cancer *in vitro* and *in vivo*. *Onco Targets Ther* 10: 3131-3144. doi: 10.2147/OTT.S134784.

Kuang Y, Xu H, Lu F, Meng J, Yi Y, Yang H, Hou H, Wei H, Su S (2021). Inhibition of microRNA let-7b expression by KDM2B promotes cancer progression by targeting EZH2 in ovarian cancer. *Cancer Sci* 112(1): 231-242. doi: 10.1111/cas.14708.

Lawrence T (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(6): a001651. doi: 10.1101/cshperspect.a001651.

Lawrence M, Daujat S, Schneider R (2016). Lateral thinking: How histone modifications regulate gene expression. *Trends Genet* 32(1): 42-56. doi: 10.1016/j.tig.2015.10.007.

Lee SM, Lee J, Noh KM, Choi WY, Jeon S, Oh GT, Kim-Ha J, Jin Y, Cho SW, Kim YJ (2017). Intragenic CpG islands play important roles in bivalent chromatin assembly of developmental genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: E1885-E1894. doi: 10.1073/pnas.1613300114.

Levesque MJ, Nerem RM (1985). The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress. *J Biomech Eng* 107: 341-347. doi: 10.1115/1.3138567.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648): 251-260. doi: 10.1038/38444.

Lusis AJ (2012). Genetics of atherosclerosis. *Trends Genet* 28(6): 267-275. doi: 10.1016/j.tig.2012.03.001.

Mahmoudi M, Farghadan A, McConnell DR, Barker AJ, Wentzel JJ, Budoff MJ, Arzani A (2021). The story of wall shear stress in coronary artery atherosclerosis: biochemical transport and mechanotransduction. *J Biomech Eng* 143(4): 041002. doi: 10.1115/1.4049026.

Malek AM, Alper SL, Izumo S (1999). Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 282(21): 2035-2042. doi: 10.1001/jama.282.21.2035.

McGhee JD, Felsenfeld G (1980). Nucleosome structure. *Annu Rev Biochem* 49: 1115-1156. doi: 10.1146/annurev.bi.49.070180.005343.

Movassagh M, Choy MK, Knowles DA, Cordeddu L, Haider S, Down T, Siggins L, Vujic A, Simeoni I, Penkett C, Goddard M, Lio P, Bennett MR, Foo RS (2011). Distinct epigenomic features in end-stage failing human hearts. *Circulation* 124(22): 2411-2422. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.040071.

Musselman CA, Kutateladze TG (2009). PHD fingers: epigenetic effectors and potential drug targets. *Mol Interv* 2009; 9: 314-323. doi: 10.1124/mi.9.6.7.

Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demirovic J, Navab M, Piro S, Polak JF, Rajavardhanan S, Russo JK, Sane D, Schoneveld AH, Shmida H, Steinberg M, Takahashi M, Tsimikas S, Van der Wal AC, Vengrenyev V, Wang TY, Wilensky RL, Willerson JT (2003). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 108(14): 1664-1672. doi: 10.1161/01.CIR.0000087480.94275.97.

Nam D, Ni CW, Rezvan A, Suo J, Budzyn K, Llanos A, Harrison D, Giddens D, Jo H (2009). Partial carotid ligation is a model of acutely induced disturbed flow, leading to rapid endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Oct;297(4):H1535-H1543. doi: 10.1152/ajpheart.00510.2009.

Nam D, Ni CW, Rezvan A, Suo J, Budzyn K, Llanos A, Harrison DG, Giddens DP, Jo H (2010). A model of disturbed flow-induced atherosclerosis in mouse carotid artery by partial ligation and a simple method of RNA isolation from carotid endothelium. *J Vis Exp* 40: 1861. doi: 10.3791/1861.

Olins DE, Olins AL (2003). Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(10): 809-814. doi: 10.1038/nrm1225.

Paulsson G, Zhou X, Törnquist E, Hansson GK (2000). Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(1): 10-17. doi: 10.1161/01.atv.20.1.10.

Peng Z, Shu B, Zhang Y, Wang M (2019). Endothelial response to pathophysiological stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39(11): e233-e243. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.312580.

Penzo M, Casoli L, Pollutri D, Sicuro L, Ceccarelli C, Santini D, Taffurelli M, Govoni M, Brina D, Trerè D, Montanaro L (2015). JHDM1B expression regulates ribosome biogenesis and cancer cell growth in a p53 dependent manner. *Int J Cancer* 136(5): E272-E281. doi: 10.1002/ijc.29240.

Quan M, Chen Z, Jiao F, Xiao X, Xia Q, Chen J, Chao Q, Li Y, Gao Y, Yang H, Wang L, Cui J (2020). Lysine demethylase 2 (KDM2B) regulates hippo pathway via MOB1 to promote pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) progression. *J Exp Clin Cancer Res* 39(1): 13. doi: 10.1186/s13046-019-1489-0.

Remuzzi A, Dewey CF, Jr, Davies PF, Gimbrone MA., Jr (1984). Orientation of endothelial cells in shear fields *in vitro*. *Biorheology* 21: 617-630. doi: 10.3233/bir-1984-21419.

Riising EM, Comet I, Leblanc B, Wu X, Johansen JV, Helin K (2014). Gene silencing triggers polycomb repressive complex 2 recruitment to CpG islands genome wide. *Mol Cell* 55: 347-360. doi: 10.1016/j.molcel.2014.06.005.

Rohde M, Sievers E, Janzer A, Willmann D, Egert A, Schorle H, Schüle R, Kirfel J (2016). Overexpression of histone demethylase Fbxl10 leads to enhanced migration in mouse embryonic fibroblasts. *Exp Cell Res* 348(2): 123-131. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.08.026.

Rolls G, Dorenkamp C, Farmer N, Minshew J, Scott-Dowell K, Tarbet F (2010). Paraffineinbettung und Schnittpräparation mit dem Mikrotom. Scientia. Die Fortbildungsserie von Leica Microsystems. Artikelnummer: Deutsch 11924211. https://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img_uploads/histology_systems/2010/Microtomy_booklet_german_online.pdf.

Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, Barengo NC, Beaton AZ, Benjamin EJ, Benziger CP, Bonny A, Brauer M, Brodmann M, Cahill TJ, Carapetis J, Catapano AL, Chugh SS, Cooper LT, Coresh J, Criqui M, DeCleene N, Eagle KA, Emmons-Bell S, Feigin VL, Fernández-Solà J, Fowkes G, Gakidou E, Grundy SM, He FJ, Howard G, Hu F, Inker L, Karthikeyan G, Kassebaum N, Koroshetz W, Lavie C, Lloyd-Jones D, Lu HS, Mirijello A, Temesgen AM, Mokdad A, Moran AE, Muntner P, Narula J, Neal B, Ntsekhe M, Moraes de Oliveira G, Otto C, Owolabi M, Pratt M, Rajagopalan S, Reitsma M, Ribeiro ALP, Rigotti N, Rodgers A, Sable C, Shakil S, Sliwa-Hahnle K, Stark B, Sundström J, Timpel P, Tleyjeh IM, Valgimigli M, Vos T, Whelton PK, Yacoub M, Zuhlke L, Murray C, Fuster V (2020). GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol* 76(25): 2982-3021. doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010. Erratum in: *J Am Coll Cardiol* 77(15) (2021): 1958-1959.

Sauer B (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 14(4): 381-392. doi: 10.1006/meth.1998.0593.

Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Nerem RM (1991). The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. *Clin Cardiol* 14(2 Suppl 1): I1-I16. doi: 10.1002/clc.4960141302.

Schwenk F, Kuhn R, Angrand PO, Rajewsky K, Stewart AF (1998). Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 26(6): 1427-1432. doi: 10.1093/nar/26.6.1427.

Seligson DB, Horvath S, McBrien MA, Mah V, Yu H, Tze S, Wang Q, Chia D, Goodglick L, Kurdستاني SK (2009). Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers. *Am J Pathol* 174: 1619-1628. doi: 10.2353/ajpath.2009.080874.

Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119(7): 941-953. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.012.

Shi YG, Tsukada Y (2013). The discovery of histone demethylases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(9): a017947. doi: 10.1101/cshperspect.a017947.

Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, Tramontana S, Perticone F, Naccarato P, Camici P, Picano E, Cortigiani L, Bevilacqua M, Milazzo L, Cusi D, Barlassina C, Sarzi-Puttini P, Turiel M (2010). From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 9(12): 830-834. doi: 10.1016/j.autrev.2010.07.016.

Souilhol C, Serbanovic-Canic J, Fragiadaki M, Chico TJ, Ridger V, Roddie H, Evans PC (2020). Endothelial responses to shear stress in atherosclerosis: a novel role for developmental genes. *Nat Rev Cardiol* 17(1): 52-63. doi: 10.1038/s41569-019-0239-5.

Statistisches Bundesamt (2017), Fachserie 12, Reihe 4, Statistisches Bundesamt (Destatis), Artikelnummer: 2120400157004.

Tak PP, Firestein GS (2001). NF- κ B: A key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107: 7-11. doi: 10.1172/JCI11830.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K and Yamanaka S (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.

Tzatsos A, Paskaleva P, Lympieri S, Contino G, Stoykova S, Chen Z, Wong KK and Bardeesy N (2011). Lysine-specific demethylase 2B (KDM2B)-let-7-enhancer of zester homolog 2 (EZH2) pathway regulates cell cycle progression and senescence in primary cells. *J Biol Chem* 286: 33061-33069. doi: 10.1074/jbc.M111.257667.

Tzatsos A, Pfau R, Kampranis SC, Tschlis PN (2009). Ndy1/KDM2B immortalizes mouse embryonic fibroblasts by repressing the *Ink4a/Arf* locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 2641-2646. doi: 10.1073/pnas.0813139106.

Ueda T, Nagamachi A, Takubo K, Yamasaki N, Matsui H, Kanai A, Nakata Y, Ikeda K, Konuma T, Oda H, Wolff L, Honda Z, Wu X, Helin K, Iwama A, Suda T, Inaba T, Honda H (2015). *Fbxl10* overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of *Nsg2*. *Blood* 125(22): 3437-3446. doi: 10.1182/blood-2014-03-562694.

Wang C, Baker BM, Chen CS, Schwartz MA (2013). Endothelial cell sensing of flow direction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 2130-2136. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301826.

Warboys CM, de Luca A, Amini N, Luong L, Duckles H, Hsiao S, White A, Biswas S, Khamis R, Chong CK, Cheung WM, Sherwin SJ, Bennett MR, Gil J, Mason JC, Haskard DO, Evans PC (2014). Disturbed flow promotes endothelial senescence via a p53-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34: 985-995. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303415.

Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER (2007). The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Ann Rev Biomed Eng* 9: 121-167. doi: 10.1146/annurev.bioeng.9.060906.151959.

Wierda RJ, Rietveld IM, van Eggermond MC, Belien JA, van Zwet EW, Lindeman JH, van den Elsen PJ (2015). Global histone H3 lysine 27 triple methylation levels are reduced in vessels with advanced atherosclerotic plaques. *Life Sci* 129: 3-9. doi: 10.1016/j.lfs.2014.10.010.

Williams ST, Walport LJ, Hopkinson RJ, Madden SK, Chowdhury R, Schofield CJ, Kawamura A (2014). Studies on the catalytic domains of multiple JmjC oxygenases using peptide substrates. *Epigenetics* 9: 1596-1603. doi: 10.4161/15592294.2014.983381.

Wang T, Chen K, Zeng X, Yang J, Wu Y, Shi X, Qin B, Zeng L, Esteban MA, Pan G, Pei D (2011). The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vita- min-C-dependent manner. *Cell Stem Cell* 9: 575-587. doi: 10.1016/j.stem.2011.10.005.

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281(5383): 1680-1683. doi: 10.1126/science.281.5383.1680.

Wong AJ, Pollard TD, Herman IM (1983). Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells *in vivo*. *Science* 219: 867-869. doi: 10.1126/science.6681677.

Wong SJ, Gearhart MD, Taylor AB, Nanyes DR, Ha DJ, Robinson AK, Artigas JA, Lee OJ, Demeler B, Hart PJ, Bardwell VJ, Kim CA (2016). KDM2B recruitment of the polycomb group complex, PRC1.1, requires cooperation between PCGF1 and BCORL1. *Structure* 24(10): 1795-1801. doi: 10.1016/j.str.2016.07.011.

Wu X, Johansen JV, Helin K (2013). Fbxl10/Kdm2b recruits polycomb repressive complex 1 to CpG islands and regulates H2A ubiquitylation. *Mol Cell* 49: 1134-1146. doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.016.

Yan M, Yang X, Shen R, Wu C, Wang H, Ye Q, Yang P, Zhang L, Chen M, Wan B, Zhang Q, Xia S, Lu X, Shao G, Zhou X, Yu J, Shao Q (2018). miR-146b promotes cell proliferation and increases chemosensitivity, but attenuates cell migration and invasion via FBXL10 in ovarian cancer. *Cell Death Dis* 9(11): 1123. doi: 10.1038/s41419-018-1093-9.

Yan M, Yang X, Wang H, Shao Q (2018). The critical role of histone lysine demethylase KDM2B in cancer. *Am J Transl Res* 10(8): 2222-2233.

Yan MS, Marsden PA (2015). Epigenetics in the vascular endothelium: Looking from a different perspective in the epigenomics era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35(11): 2297-2306. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305043.

Yan MS, Matouk CC, Marsden PA (2010). Epigenetics of the vascular endothelium. *J Appl Physiol* 109(3): 916-926. doi: 10.1152/jappphysiol.00131.2010.

Yu F, Shen H, Deng HW (2017). Systemic analysis of osteoblast-specific DNA methylation marks reveals novel epigenetic basis of osteoblast differentiation. *Bone Rep* 6: 109-119. doi: 10.1016/j.bonr.2017.04.001.

Zacharopoulou N, Kallergi G, Alkahtani S, Tsapara A, Alarifi S, Schmid E, Sukkar B, Kampranis S, Lang F, Stournaras C (2020). The histone demethylase KDM2B activates FAK and PI3K that control tumor cell motility. *Cancer Biol Ther* 21(6): 533-540. doi: 10.1080/15384047.2020.1736481.

Zand T, Nunnari JJ, Hoffman AH, Savilonis BJ, MacWilliams B, Majno G, Joris I (1988). Endothelial adaptations in aortic stenosis. Correlation with flow parameters. *American J Pathology* 133: 407-418. PMID: PMC1880795.

Zhao W, Li Q, Ayers S, Gu Y, Shi Z, Zhu Q, Chen Y, Wang HY, Wang RF (2013). Jmjd3 inhibits reprogramming by upregulating expression of INK4a/Arf and targeting PHF20 for ubiquitination. *Cell* 2013; 152: 1037-1050. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.006.

Internetseiten:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84678> (Stand 09.01.2022).

8 Anhang

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alexandros Krull, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Der Einfluss der Histondemethylase KDM2B auf die Entstehung von Atherosklerose im *in vivo*-Mausversuch (Englisch: The influence of the histone demethylase KDM2B on the development of atherosclerosis in an *in vivo* mouse experiment) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

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

Publikationsliste

Zhang KS, Schecker J, Krull A, Riechert E, Jürgensen L, Kamuf-Schenk V, Burghaus J, Kiper L, Cao Ho T, Wöltje K, Stangl V, Katus HA, Stangl K, Völkers M, Althoff TF (2019). PRAS40 suppresses atherogenesis through inhibition of mTORC1-dependent pro-inflammatory signaling in endothelial cells. *Sci Rep.* 14;9(1):16787. doi: 10.1038/s41598-019-53098-1.

Danksagung

Mein Dank gilt

Frau Prof. Dr. Verena Stangl,
Herrn Priv.-Doz. Dr. Till Althoff,
Frau Kerstin Wöltje,
Frau Andrea Weller,
Herrn Johannes Schecker,
Frau Antje Ludwig

sowie allen weiteren Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe Stangl und Althoff,
die mir in jeder Phase meiner Dissertation helfend zur Seite gestanden haben.

Insbesondere möchte ich mich bei meinen Eltern für die Unterstützung und die
Möglichkeit danken, den Weg einer Promotion eingeschlagen zu haben.

Alexandros Krull

Berlin, im Januar 2024



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Name, Vorname: Krull, Alexandros
Emailadresse: alexandros.krull@charite.de
Matrikelnummer: 217847

Promotionsbetreuer: Privat-Dozent Dr. med. Till Althoff
Promotionsinstitution / Klinik: Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)
Direktor: Prof. Dr. Frank Konietzschke

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
frank.konietzschke@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Krull innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu seinem Promotionsvorhaben „**Der Einfluss der Histondemethylase KDM2B auf die Entstehung von Atherosklerose im *in vivo*-Mausversuch**“ wahrgenommen hat.

Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 24.01.2022
- Termin 2: 02.08.2023

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Empfehlung zur adäquaten Deskription der Versuchsgruppen je nach Art und Verteilung der erhobenen Variablen
- Empfehlungen zur korrekten Anwendung geeigneter statistischer Tests in Abhängigkeit von den Fragestellungen (t-Test bzw. Mann-Whitney-U-Test, ggf. faktorielles Modell zur simultanen Modellierung mehrerer Faktoren)
- Hinweise zur Interpretation der Ergebnisse
- Bitte explizit erwähnen, dass diese Studie mit teilweise explorativem Charakter ist, die p-Werte bzgl. sekundärer Endpunkte entsprechend keinen confirmatorischen Charakter haben und somit für diese keine Adjustierung bzgl. multiplen Testens (z.B. Bonferroni-Korrektur) vorgenommen wird.
- Bitte in der Diskussion aufgreifen, dass die in dieser Grundlagenarbeit gefundenen Resultate durch weitere unabhängige Studien bestätigt werden müssen.

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 08.08.2023

Name der Beraterin: A. Stroux



Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

CHARITÉ
UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie
Campus Charité Mitte
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin