

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B

(Direktor Prof. Dr. med. Stephan B. Felix)

der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Regulation von Statineffekten durch den Apelinrezeptor in vaskulären Endothelzellen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

der Universitätsmedizin

der Universität Greifswald

Greifswald 2024

Vorgelegt von:

Ilka Materzok

geb. am 13.01.1994

in Hamburg

Fakultät: Universitätsmedizin Greifswald

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

Gutachterinnen: PD Dr. med. Raila Busch

Prof. Dr. med. Verena Stangl

Datum der Disputation: 19.02.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie der Herz-Kreislauf-Erkrankungen	1
1.2 Arteriosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen	2
1.2.1 Kardiovaskuläre Risikofaktoren	2
1.2.2 Arteriosklerose	4
1.2.3 Fettstoffwechselstörungen	5
1.2.4 Koronare Herzkrankheit (KHK) und akutes Koronarsyndrom	6
1.2.5 Statine	7
1.3 Die Rolle des Endothels	10
1.3.1 Aufbau und Funktion	10
1.3.2 Migration von Endothelzellen	11
1.4 Hämodynamische Kräfte	12
1.4.1 Wandschubspannung	13
1.5 Das Apelin/APLNR-System als Regulator der Statineffekte	14
1.5.1 Das Apelin/APLNR-System	14
1.5.2 Der Apelin-Rezeptor	14
1.6 Zielstellung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Zelllinien	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	18

2.1.4	Assays und Kits	19
2.1.5	Lösungen	19
2.1.6	Geräte und Software	20
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Gewinnung der Zellen	22
2.2.2	Zellkultivierung.....	22
2.2.3	Flussversuche	23
2.2.4	Genexpressionsanalyse.....	26
2.2.5	Statistik.....	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Einfluss des APLNR-Rezeptors auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen 30	
3.1.1	Einfluss des APLNR-Rezeptors auf das Migrationsverhalten von HUVEC	30
3.1.2	Einfluss des APLNR-Rezeptors auf das Migrationsverhalten von HCAEC.....	33
3.1.3	Zusammenfassung	36
3.2	Einfluss von Statinen auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen	36
3.2.1	Einfluss von Statinen auf das Migrationsverhalten von HCAEC	36
3.2.2	Zusammenfassung	38
3.3	Einfluss des APLNR auf die flussinduzierte Migration von mit Statinen behandelten Endothelzellen	39
3.3.1	Einfluss des APLNR und der Statine auf das Migrationsverhalten von HUVEC	39
3.3.2	Einfluss des APLNR und der Statine auf das Migrationsverhalten von HCAEC	44
3.3.3	Zusammenfassung	46
4	Diskussion.....	48
4.1	Welchen Einfluss hat der APLNR auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen?	49
4.2	Welchen Einfluss haben Statine auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen?	55

4.3	Welche Rolle spielt der APLNR für die Wirkung der Statine auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen?	62
4.4	Klinische Relevanz.....	66
5	Zusammenfassung.....	68
	Anhang	2
	Literatur	11
	Publikationen und Manuskripte	29
	Eidesstattliche Erklärung.....	31
	Danksagung	32
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - SCORE Risikotabelle für Deutschland.....	3
Abbildung 2 - Einfluss der Statine auf die Cholesterolsynthese.....	8
Abbildung 3- Übersicht der pleiotropen Effekte der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf das kardiovaskuläre System.....	9
Abbildung 4 - Veränderung der Zellmorphologie unter hämodynamischen Flussbedingungen.	10
Abbildung 5 - Ablauf der Zellmigration.	12
Abbildung 6 -Flussverhältnisse an einer Gefäßverzweigung.....	13
Abbildung 7 - Wanderung der HUVEC bei hämodynamischen Flussbedingungen (10dyne/cm ²) unter APLNR-Inhibition mittels ML221.	15
Abbildung 8 - Ablauf der Flussversuche.....	23
Abbildung 9 - Aufbau der Flusskammerversuche.....	24
Abbildung 10 - Einfluss der APLNR-Inhibition auf die endotheliale Migration von HUVEC (1,5 dyne/cm ²).	31
Abbildung 11 - Einfluss der APLNR-Inhibition auf die endotheliale Migration von HUVEC (10 dyne/cm ²).	32
Abbildung 12 - Einfluss der APLNR-Inhibition auf die endotheliale Migration von HCAEC (10 dyne/cm ²), Spender 1.....	33
Abbildung 13 - Einfluss der APLNR-Inhibition auf die endotheliale Migration von HCAEC (10 dyne/cm ²), Spender 2.....	35
Abbildung 14 - Genexpression von eNOS und VCAM-1 in HCAEC (10 dyne/cm ²).	35
Abbildung 15 - Einfluss der Statine auf die endotheliale Migration von HCAEC (10 dyne/cm ²).	36
Abbildung 16 – Genexpression von eNOS, VCAM-1 und Rac1 in HCAEC (10 dyne/cm ²). ..	38
Abbildung 17 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Atorvastatin behandelten HUVEC (1,5 dyne/cm ²).	40
Abbildung 18 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Atorvastatin behandelten HUVEC (10 dyne/cm ²).	41
Abbildung 19 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Pravastatin behandelten HUVEC (1,5 dyne/cm ²).	42
Abbildung 20 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Pravastatin behandelten HUVEC (10 dyne/cm ²).	43

Abbildung 21 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Atorvastatin behandelten HCAEC (10 dyne/cm ²).....	44
Abbildung 22 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Pravastatin behandelten HCAEC (10 dyne/cm ²).....	45
Abbildung 23 - Genexpression von eNOS, VCAM-1 und Rac1 in HCAEC (Atorvastatin, 10 dyne/cm ²)	46
Abbildung 24 - Genexpression von eNOS, VCAM-1 und Rac1 in HCAEC (Pravastatin, 10 dyne/cm ²).	46
Abbildung 25 - Einfluss der Statine auf die endotheliale Migration bei 1,5 dyne/cm ²	57
Abbildung 26 - Einfluss der Statine auf die endotheliale Migration bei 10 dyne/cm ²	58
Abbildung 27 - Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Migration von HUVEC unter Schubspannungen von 10 dyne/cm ² bei Behandlung mit ML221 im Vergleich zur Kontrolle.....	59
Abbildung 28 – Mögliche Wirkung der Statine auf die endotheliale Migration	63
Abbildung 29 – Spektrophotometrische Bestimmung des RNS-Gehalts von HUVEC aus Flussversuchen (1/2).	2
Abbildung 30 - Spektrophotometrische Bestimmung des RNS-Gehalts von HUVEC aus Flussversuchen (2/2).	3
Abbildung 31 - Spektrophotometrische Bestimmung des RNS-Gehalts von HCAEC aus Flussversuchen (1/4).	4
Abbildung 32 - Spektrophotometrische Bestimmung des RNS-Gehalts von HCAEC aus Flussversuchen (2/4).	5
Abbildung 33 - Spektrophotometrische Bestimmung des RNS-Gehalts von HCAEC aus Flussversuchen (3/4).	6
Abbildung 34 - Spektrophotometrische Bestimmung des RNS-Gehalts von HCAEC aus Flussversuchen (4/4).	7
Abbildung 35 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Atorvastatin behandelten HCAEC (10 dyne/cm ²), zweiter Spender.....	8
Abbildung 36 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Pravastatin behandelten HCAEC (10 dyne/cm ²), zweiter Spender.....	9
.....	
Abbildung 37 - Genexpression von eNOS und Rac1 in HUVEC (10 dyne/cm ²).....	10

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Tabelle 2 - Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 3 - Chemikalien und Reagenzien.....	18
Tabelle 4 - Assays und Kits.....	19
Tabelle 5 - Lösungen.....	19
Tabelle 6 - Geräte und Software.....	20
Tabelle 7 -Ansatz für die cDNS-Synthese	26
Tabelle 8 - Reagenzien für die qPCR.....	27
Tabelle 9 - Schritte der qPCR	28

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1 - Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACS	<i>Acute coronary syndrom</i> ; Akutes Koronarsyndrom
AP	Angina pectoris
APLNR	Apelin-Rezeptor
Arp2/3-Komplex	<i>Aktin related protein 2/3-Komplex</i> ; Aktin assoziierter Protein 2/3-Komplex
ASS	Acetylsalicylsäure
AUC	<i>area under the curve</i> , Fläche unter der Kurve
bFGF	<i>Bovine fibroblast growth factor</i> ; Boviner Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BMS	<i>Bare-metal-stent</i> ; unbeschichteter Metallstent
Cdc42	<i>Cell division control protein 42</i> ; Zellteilungskontrollprotein 42
DES	<i>Drug-eluting-stent</i> ; Medikamentenfreisetzender Stent
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECGS	<i>Endothelial cell growth supplement</i> ; Endothelialer Wachstumszusatz
EGF	<i>endothelial growth factor</i> ; Endothelialer Wachstumsfaktor
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAM	6-Carboxyfluorescin

FKS	Fetales Kälberserum
FPP	Farnesylpyrophosphat
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
GGPP	Garnesylgarnesylpyrophosphat
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCAEC	<i>Human coronary artery endothelial cell</i> ; Humane koronare arterielle Endothelzelle
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> ; Lipoprotein hoher Dichte
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HMVEC	<i>Human microvascular endothelial cells</i> , humane mikrovaskuläre Endothelzellen
Hs-CRP	Hochsensitives C-reaktives Protein
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i> ; Humane umbilikal venöse Endothelzelle
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> ; Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
KHK	Koronare Herzkrankheit
KLF2	<i>Krüppel like Factor 2</i> ; Krüppel-ähnlicher Faktor 2
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> ; Lipoprotein niedriger Dichte
ML221	4-oxo-6-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4H-pyran-3-yl-4-nitrobenzoat
MMP	Matrximetalloproteinase
NO	Stickstoffmonoxid

NSTEMI	<i>Non-ST-segment elevation myocardial infarction</i> ; Nicht-ST-Hebungsinfarkt
oxLDL	<i>Oxidized Low Density Lipoprotein</i> ; Oxidiertes Lipoprotein niedriger Dichte
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCI	<i>Percutaneous coronary intervention</i> ; Perkutane koronare Intervention
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i> ; Plättchen Endotheladhäsionsmolekül 1
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PTCA	<i>Percutaneous transluminal coronary angiography</i> ; Perkutane transluminale Koronarangiographie
qPCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i> ; Quantitative Polymerase Kettenreaktion
RKI	Robert Koch Institut
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkriptase
SCORE	<i>Systematic Coronary Risk Evaluation</i>
STEMI	<i>ST-segment elevation myocardial infarction</i> ; ST-Hebungsinfarkt
TJ	Tight junction
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VCAM-1	<i>Vascular adhesion molecule 1</i> ; Gefäß-Adhäsionsmolekül 1

VE-Cadherin	<i>Vascular endothelial Cadherin</i> ; Cadherin der Gefäßendothelien
VEGFR2	<i>Vascular endothelial growth factor 2</i> ; Gefäßwachstumsfaktor 2
VIC	<i>Yakima Yellow</i> ®
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i> ; Lipoprotein sehr niedriger Dichte
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cell</i> ; Glatte Gefäßmuskelzelle
WHO	<i>World Health Organisation</i> ; Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind seit Jahrzehnten die führende Todesursache in Deutschland. Im Jahr 2018 konnten 37 % der Sterbefälle auf Erkrankungen des Herzens und der Gefäße zurückgeführt werden. (1) Auch weltweit bleiben Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache. Im Jahr 2020 waren laut Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) 16 % der Sterbefälle auf die koronare Herzkrankung (KHK) zurückzuführen. (2–5)

In Bezug auf Alter, Geschlecht, Sozialstatus und Region gibt es große Unterschiede in der Prävalenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. In einer Studie des Robert Koch Instituts (RKI) aus dem Jahre 2013 zeigte sich mit einer Lebenszeitprävalenz der KHK bei Frauen von 6,4 % ein Abwärtstrend im Vergleich zu 8,9 % im Jahr 1998. Einer Studie aus 2017 zufolge betrug in Deutschland die 12-Monate-Prävalenz einer koronaren Herzkrankheit bei 3,7 % der Frauen und 6,0 % der Männer. (6) In der Altersklasse 40 – 49 Jahre lag die Lebenszeitprävalenz dabei nur bei 1,6 %, während sie bei den 70 – 79-jährigen 15,5 % erreichte. Bei Männern ist die Lebenszeitprävalenz seit 1998 relativ konstant bei 12,3 % geblieben, dabei wird bei den 30,5 % der 70 – 79-jährigen Männer mindestens einmal im Leben eine KHK diagnostiziert. Neben Alter und Geschlecht spielt auch der sozioökonomische Status eine Rolle. Bei Menschen mit niedrigem Sozialstatus ist die Prävalenz der KHK doppelt so hoch (13,7 %) im Vergleich zu Menschen mit hohem Sozialstatus (6,5 %). (7) Auch Fettstoffwechselstörungen, die einen großen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen, sind in Deutschland weit verbreitet. So liegt die Prävalenz einer Hypercholesterinämie (Serum-Gesamtcholesterin über 190 mg/dL bzw. 5 mmol/L) in der Altersklasse der 18- bis 79-Jährigen unter deutschen Frauen bei 60,5 %, unter deutschen Männern bei 56,6 %. Ein erniedrigtes HDL-Cholesterin lässt sich bei etwa jedem zehnten Deutschen in dieser Alterskategorie nachweisen. (8)

Bei Betrachtung der Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen zeigt sich hingegen ein Abwärtstrend. Im Herzbericht 2018 wurde die Mortalität mehrerer Herz-Kreislauf-Erkrankungen der Jahre 2014 und 2016 verglichen. Es zeigte sich besonders bei der Herzinsuffizienz ein Abfall der Mortalität um 10,9 %. Während sich beim ACS kaum eine Veränderung zeigte, stieg bei anderen Erkrankungen sogar die Sterblichkeit an. So zeigte sich bei Herzklappenerkrankungen ein Anstieg der Mortalität um 5,7 %. Zusammengefasst ergab

Einleitung

sich jedoch eine Verminderung der Mortalität von Herz-Kreislauf-erkrankungen um 2,1 %. (3) Die verringerte Mortalität lässt sich sowohl durch die verbesserten Therapiemöglichkeiten als auch den Rückgang von Risikofaktoren, wie hohe Serumcholesterinlevel, das Rauchen oder hoher Blutdruck erklären. (9–11) Die Verbesserung der therapeutischen Versorgung zeigt sich auch in einer Verringerung der Krankenhaussterblichkeit zum Beispiel beim akuten Koronarsyndrom. Dabei spielt auch die verbesserte Umsetzung der Sekundärprävention mittels Pharmaka eine wichtige Rolle. (12) Trotz Reduktion der Mortalität sind die kardiovaskulären Erkrankungen weiterhin die Haupttodesursache in Deutschland. Dass die aus den Herz-Kreislauf-erkrankungen entstehende Morbidität ein großes gesellschaftliches Problem darstellt, zeigen die Gesundheitsausgaben des Bundes. Die Gesamtkosten für das Gesundheitssystem, die durch Herz-Kreislauf-erkrankungen entstanden sind, setzen sich aus der ambulanten und stationären Versorgung, sowie Kosten für die Medikation zusammen und betragen 2015 in Deutschland 28 Milliarden Euro. Dies entspricht Pro-Kopf-Kosten von ungefähr 350.000 Euro. Damit liegt Deutschland über dem europäischen Schnitt von 218.000 Euro pro Kopf. (13)

1.2 Arteriosklerotisch bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen

Viele kardiovaskuläre Erkrankungen entstehen auf dem Boden von arteriosklerotischen Veränderungen der Gefäße. Zur Entwicklung dieser Pathologien tragen eine Reihe kardiovaskulärer Risikofaktoren bei.

1.2.1 Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Die kardiovaskulären Risikofaktoren lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Einerseits gibt es die nicht beeinflussbaren Faktoren, wie das Geschlecht (männliches Geschlecht als Risikofaktor), genetische Prädisposition (positive Familienanamnese bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen, Erhöhung von Lipoprotein (a), familiäre Hypercholesterinämie) und das Alter (hohes Alter als Risikofaktor). Andere Risikofaktoren, wie Arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, Hyperlipidämie und das Rauchen hingegen lassen sich durch verschiedene Therapiestrategien beeinflussen. In der deutschen Leitlinie zur Prävention von Herz-Kreislauf-erkrankungen (Version 2016) werden die Ziele für die Einstellung der Risikofaktoren angegeben. Hierzu zählen beispielsweise die Einstellung einer Arteriellen Hypertonie auf $< 140/90$ mmHg und Bewegungsempfehlungen von mindestens 150 Minuten gemäßigttem aerobem oder 75 Minuten intensivem aerobem Training pro Woche. (14)

Einleitung

Zur Beurteilung des kardiovaskulären Risikos eines Patienten können verschiedene Werkzeuge verwendet werden. Die höchste Empfehlung hat die Nutzung des SCORE-Charts (Systemic Coronary Risk Estimation). Dieser eignet sich für undiagnostizierte „scheinbar gesunde“ (14) Patienten und ermittelt das Risiko einer tödlichen kardiovaskulären Erkrankung innerhalb der nächsten zehn Jahre. Die Bewertung des Risikos basiert auf den Einflüssen der Faktoren Alter, Geschlecht, Rauchen, systolischer Blutdruck und Gesamtcholesterin (siehe **Abbildung 1**). (14–17)

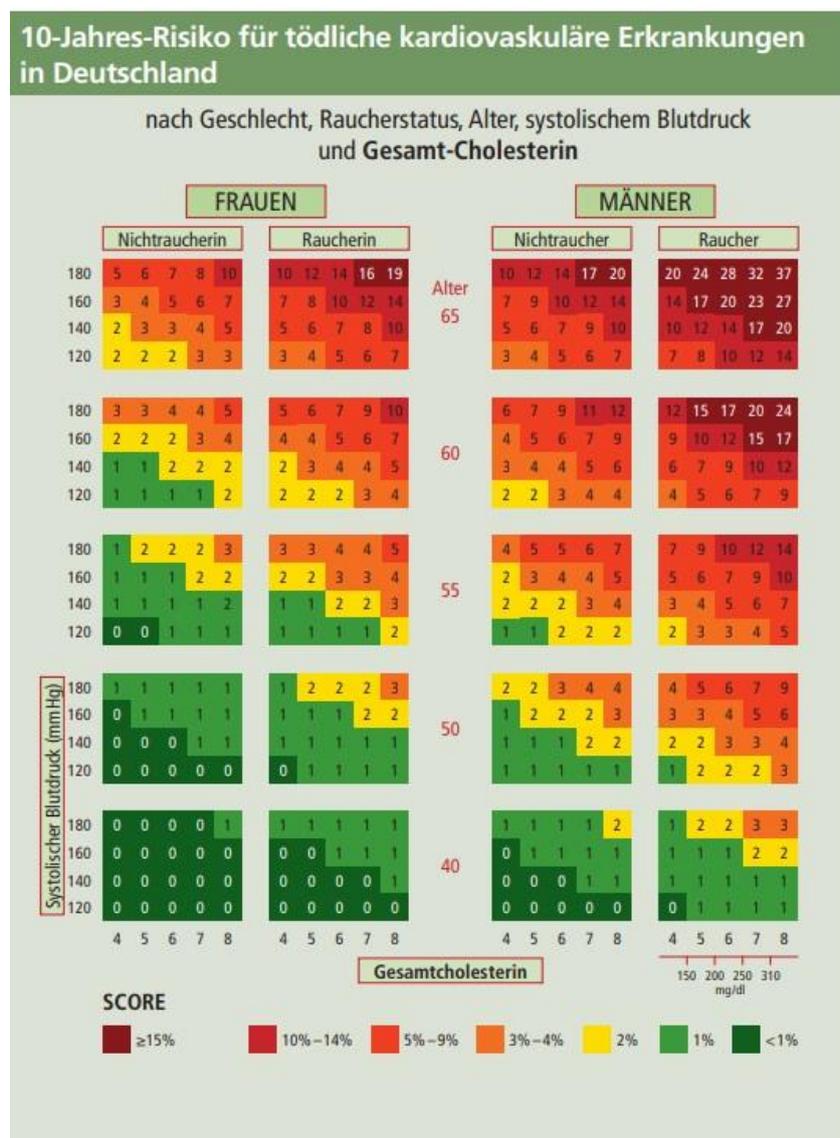


Abbildung 1 - SCORE Risikotabelle für Deutschland. Anhand dieser Tabellen kann die Wahrscheinlichkeit für eine tödliche kardiovaskuläre Erkrankung innerhalb der nächsten 10 Jahre in Abhängigkeit des Cholesterin-Spiegels, des systolischen Blutdrucks, des Geschlechts und des Raucherstatus für verschiedene Altersgruppen ermittelt werden. Quelle: Perk, Backer et al. (17)

Einleitung

1.2.2 Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist eine immunologisch-entzündliche Erkrankung der mittleren und großen Arterien. Hierbei kommt es zum multifokalen Auftreten von Plaques der Gefäßwand, die von Lipiden und Immunzellen unterhalten werden. (18)

Die Plaquentstehung basiert auf einer chronischen Inflammation der Gefäßwand. Insbesondere an Gefäßwänden, die turbulenten, oszillierenden Schubspannungen ausgesetzt sind, resultiert eine zunehmende endotheliale Dysfunktion. (19, 20)

Dazu gehören die abdominelle Aorta, die Koronararterien und die Karotisbifurkation. (21). Der Funktionsverlust des Endothels führt zu einer gesteigerten Permeabilität der Gefäßwand für Lipoproteine. Diese können dann in die Intima der Gefäße einwandern. Hohe Spiegel des Lipoproteins niedriger Dichte (*low density lipoprotein*, LDL) im Serum führen dabei auch zu einer vermehrten Endozytose des LDL in die Intima. (22, 23) Hier kommt es zu einer Modifikation des LDL durch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), Myeloperoxidasen oder Lipoxygenasen. Es wird oxidiertes LDL (oxLDL) gebildet. Die Infiltration der Gefäßwand und Bildung des oxLDL geht mit einer Aktivierung der Endothelzellen einher. Es kommt zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen. Neutrophile Granulozyten adhären an den Endothelzellen und transmigrieren in die Gefäßwand. Dort fördern sie die Einwanderung und Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen. Bei Phagozytose des oxLDL durch die Makrophagen bilden sich dann Schaumzellen. Der gesamte Prozess führt zur Bildung der sogenannten *fatty streaks*. Damit wird die Ansammlung von Schaumzellen und T-Zellen in der Gefäßwand bezeichnet (20, 24, 25) Die Zusammensetzung des Plaques ist dabei ein wichtiger Indikator für seine Stabilität. Plaques, die reich an Makrophagen und Lymphozyten sind, haben ein höheres Risiko für eine Plaqueruptur. Dies wird unter anderem durch ihre Bildung von Matrixmetalloproteinase (MMP) erklärt. (26, 27) Im weiteren Prozess werden die aktivierten Endothelzellen und die glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) zur Bildung von Zytokinen angeregt. (28) Dies fördert den Wanderungsprozess der VSMC Richtung luminaler Seite des Gefäßes. Die VSMC bilden hier vermehrt extrazelluläre Matrix und begünstigen damit die Bildung einer fibrösen Kappe auf der Läsion. (22, 29) Eine weitere Entwicklung der arteriosklerotischen Plaques mit Ausbildung eines nekrotischen Kerns ist möglich. Mit zunehmendem Alter der Patienten finden sich hier vermehrt Kalzifikationen. (23, 30)

Einleitung

In vielen aktuellen wissenschaftlichen Arbeiten zeigt sich zunehmend, dass neben der Hyperlipoproteinämie vor allem die chronische Inflammation Verursacher der Arteriosklerose ist. Leukozyten und andere Zellen des Immunsystems tragen zur Plaqueformation und -ruptur bei und bilden somit einen guten Angriffspunkt für Therapeutika. In der CANTOS-Studie konnte durch den Einsatz eines Antikörpers gegen das Zytokin Interleukin-1 β die Rate an kardiovaskulären Events reduziert werden. (26, 31)

1.2.3 Fettstoffwechselstörungen

Ein großer kardiovaskulärer Risikofaktor sind Fettstoffwechselstörungen, bei denen es zu erhöhten Werten von Serumcholesterinen oder Triglyzeriden kommt. Hier lässt sich zwischen primären und sekundären Dyslipidämien unterscheiden. Die primären Fettstoffwechselstörungen sind meist genetisch bedingt. So liegt zum Beispiel der familiären Hypercholesterinämie ein Defekt im LDL-Rezeptor-Gen zugrunde. Bei diesen Erkrankungen ist das kardiovaskuläre Risiko schon in jüngerem Alter oft erhöht. (32–34)

Sekundäre Dyslipidämien hingegen resultieren aus Grunderkrankungen, dem Lebensstil oder der Einnahme von Medikamenten. Zugrundeliegende Erkrankungen können Diabetes mellitus Typ II oder Adipositas sein. Medikamente, die die Serumcholesterinlevel anheben können sind zum Beispiel Hormonpräparate. Bezüglich des Lebensstils können eine Fehlernährung mit vermehrter Aufnahme von gesättigten Fettsäuren sowie vermehrter Alkoholkonsum als Risikofaktor aufgezählt werden. Therapeutisch steht bei den sekundären Fettstoffwechselstörungen die Behandlung der zugrundeliegenden Erkrankung im Vordergrund. (35)

Zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos kommt die primärprophylaktische Therapie mit einem Statin hinzu. Hier bildet das LDL-Cholesterin den wichtigsten Parameter. Die Zielwerte hängen vom Risikoprofil des Patienten ab. So beträgt bei einem stark erhöhten kardiovaskulären Risiko der Zielwert des Serum-LDL-Cholesterins weniger als 1,8 mmol/L. (36)

In der Sekundärprophylaxe nach akutem Koronarsyndrom wird bei jedem Patienten, unabhängig vom Ausgangs-LDL-Serumcholesterin-Wert eine hochdosierte Statintherapie empfohlen. (37) Hierunter konnte eine Senkung der Gesamtmortalität erzielt werden. (38)

Einleitung

1.2.4 Koronare Herzkrankheit (KHK) und akutes Koronarsyndrom

Die „KHK ist die Manifestation der Arteriosklerose (=Atherosklerose) in den Herzkranzarterien.“ (39) Dabei kommt es durch eine zunehmende Stenosierung der Koronararterien zu einer Minderperfusion der Kardiomyozyten. Das Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot der Herzmuskelzellen wird als Koronarinsuffizienz bezeichnet.

Klinisch manifestiert sich diese Erkrankung durch das Leitsymptom Angina pectoris (AP), die sich als retrosternales Druckgefühl oder Schmerz mit einer Ausstrahlung in den linken Arm, Hals, Kiefer oder Oberbauch präsentiert. Die Schmerzen treten vor allem bei körperlicher Belastung auf und können von Angst und vegetativen Symptomen begleitet werden. Wenn diese Symptome zunehmend schwerer werden, bei Ruhe persistieren oder länger als 20 Minuten anhalten spricht man von einer instabilen AP. Auch jede erstmals aufgetretene AP wird zu dieser Kategorie gezählt. Die instabile AP gehört zum akuten Koronarsyndrom (siehe unten). (39–41)

Zur Diagnostik der KHK gehört neben der Auswertung des persönlichen Risikoprofils nicht-invasive Verfahren, wie das Belastungs-EKG, die Stress-Echokardiographie oder nuklearmedizinische Perfusionsdiagnostik. An invasiven Verfahren wird die Herzkatheteruntersuchung (Koronarangiographie mit Laevokardiographie) genutzt.

Die multimodale Therapie der KHK besteht aus Lifestyle-Interventionen (diätetische Maßnahmen, Gewichtsreduktion, körperliches Training und Nikotinabstinenz), sowie medikamentöser Therapie. Diese setzt sich zusammen aus der Thrombozytenaggregationshemmung mittels ASS und der Behandlung der Risikofaktoren und Komorbiditäten. Je nach Risikoprofil wird eine LDL-Cholesterineinstellung mittels Statinen empfohlen. Die Zielwerte sind bei sehr hohem Risiko: ein LDL < 1,8 mmol/L, bei hohem Risiko von < 2,6 mmol/L und bei mittlerem bis niedrigem Risiko ein LDL < 3,0 mmol/L. (14)

Die akute Manifestation der KHK ist das akute Koronarsyndrom. Hierbei kommt meist durch Ruptur eines atherosklerotischen Plaques der nekrotische lipid-reiche Kern des Plaques mit den Komponenten des arteriellen Bluts ins Kontakt. Prädestiniert dafür sind Plaques mit einem großen nekrotischen Kern und dünner fibröser Kappe. (42, 43) Neben der Plaqueruptur sind seltenere Auslöser für ein ACS die Thrombusbildung aufgrund einer Plaqueeosion oder kalzifizierter Knoten. (44)

Einleitung

Klinisch zeigt sich die Ischämie im Herzmuskelgewebe durch eine instabile AP mit vegetativen Symptomen wie Kaltschweißigkeit, Übelkeit oder Angst. Außerdem können Symptome einer Herzrhythmusstörung (Palpitationen) oder einer akuten Herzinsuffizienz (Atemnot, Schwindel) auftreten. Besonders bei Diabetikern und Frauen kann die Symptomatik untypisch ausfallen. Zur Diagnostik kommen primär das 12-Kanal-EKG und die Messung des Troponins zum Einsatz.

Neben der medikamentösen Akuttherapie eines Myokardinfarkts ist ein wichtiger Pfeiler der Behandlung des ACS die Reperfusionstherapie. Unter dem Leitspruch „*time is muscle*“ sollte insbesondere beim STEMI diese so schnell wie möglich eingeleitet werden. Unter Reperfusionstherapie versteht man vor allem die perkutane Koronarintervention (*percutaneous coronary intervention*, PCI). (45) Hier werden die Koronargefäße mittels Koronarangiographie dargestellt. Stenosierte Bereiche können dann gegebenenfalls mittels Ballonkatheter dilatiert und mit Stents versorgt werden. (46) (47, 48) Zur Verhinderung von Stent-Stenosen ist nach der PCI eine duale Plättchenaggregationshemmung aus ASS und einem ADP-Rezeptor-Hemmer indiziert. (49) Heutzutage werden vorwiegend sogenannte Medikamentenfreisetzende Stents (*Drug-eluting-Stents*, DES) eingesetzt. Diese sind mit Zytostatika oder Immunsuppressiva beschichtet. (50–52) Die Beschichtungen wirken antiproliferativ und dienen der Verhinderung einer übermäßigen Intimahyperplasie. (48, 52–54) Neben der Thrombozytenaggregationshemmung bildet die lipidsenkende Therapie mittels Statinen eine wichtige Rolle in der medikamentösen Sekundärprävention des akuten Koronarsyndroms.

1.2.5 Statine

In den 1990er Jahren wurden die ersten Studien zur Wirksamkeit der Statine veröffentlicht. Nachdem das erste Statin, Lovastatin, 1989 in Deutschland zugelassen wurde, kamen im Verlauf weitere Statine, wie Atorvastatin, Simvastatin oder Pravastatin dazu. (55) Statine sind eine heterogene Wirkstoffgruppe. Alle haben den gleichen Wirkmechanismus, aber unterscheiden sich in verschiedenen Eigenschaften. So zeigen sich Unterschiede in der Wirksamkeit der Statine. In Studien konnte gezeigt werden, dass z.B. Rosuvastatin den LDL-Spiegel um 8,2 % mehr als Atorvastatin und 26 % mehr als Pravastatin senken kann. (56) Physikochemisch lassen sich die Statine in eine hydrophile und eine lipophile Gruppe unterscheiden. Zu den hydrophilen Statinen zählen Prava-, Rosuva- und Fluvastatin. Atorva- und Simvastatin besitzen lipophile Eigenschaften. Die lipophilen Statine können durch direkte Interaktion mit der Plasmamembran in die Zelle aufgenommen werden, während für hydrophile Statine Carrier-Proteine notwendig sind. (57) Neben den LDL-senkenden Eigenschaften,

Einleitung

besitzen Statine noch zusätzliche, sogenannte pleiotrope Effekte. Diese werden weiter unten genauer erläutert. Die wichtigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen der Statine sind Kopfschmerzen, gastrointestinale Beschwerden, eine Erhöhung der Transaminasen und Muskelbeschwerden. (57, 58) Die Muskelbeschwerden reichen von leichten Muskelschmerzen (Myalgien) bis hin zur Statin-Myopathie mit einem Anstieg der Kreatinkinase. (59) Statine werden in der Primärprävention von Herz-Kreislauf-erkrankungen eingesetzt. Sie werden also zum Erhalt der Gesundheit vor dem möglichen Auftreten einer kardiovaskulären Erkrankung genutzt. Die Indikation wird nach Abschätzung des individuellen Risikoprofils anhand der SCORE-Tabelle gestellt (siehe **Abbildung 1**). (15) Primärprophylaktisch werden Statine zur Behandlung von Fettstoffwechselstörungen eingesetzt. Hierbei werden sie als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen, wie dem Cholesterinresorptionshemmer Ezetimib, verwendet. (36) Sekundärpräventiv spielen Statine eine wichtige Rolle bei der KHK, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) oder dem ischämischen Schlaganfall. (60, 61, 62)

Statine greifen in die Cholesterolsynthese ein. Sie hemmen kompetitiv die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) und damit den geschwindigkeitsbestimmenden Cholesterolsyntheseschritt (siehe **Abbildung 2**). (57)

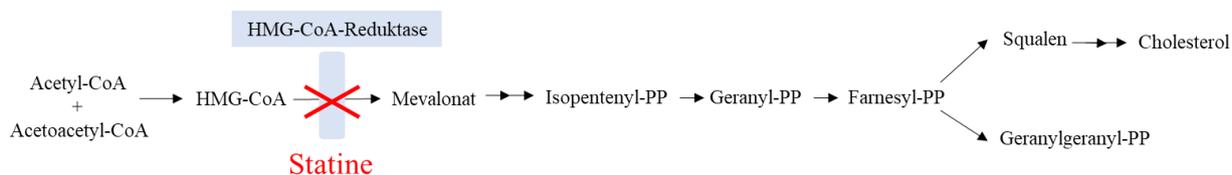


Abbildung 2 - Einfluss der Statine auf die Cholesterolsynthese. Dargestellt ist der Ablauf der Cholesterolsynthese. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Synthese ist die Umwandlung von HMG-CoA in Mevalonat. Das hierfür notwendige Enzym (HMG-CoA-Reduktase) kann durch Statine gehemmt werden.

Quelle: angelehnt an Sirtori et al. (57)

Die Cholesterolsynthese findet vor allem in der Leber statt. Die Reduktion des intrazellulären Cholesterolgehalts führt zu einer erhöhten Expression des LDL-Rezeptors an der Zelloberfläche. So wird mehr LDL-Cholesterin aus dem Blut in die Zellen aufgenommen und der Plasma-LDL-Spiegel gesenkt. Statine erhöhen zusätzlich LDL-unabhängig den Spiegel des Lipoprotein hoher Dichte (*High Density Lipoprotein*, HDL). Die zugrundeliegenden Mechanismen dafür sind noch nicht vollständig erforscht. (63) Auch der Triglyzerid-Spiegel

Einleitung

wird durch Statine gesenkt. Die Stärke des Effekts auf den Triglycerid-Spiegel scheint mit der Verringerung des Lipoprotein sehr niedriger Dichte (*Very Low Density Lipoprotein*, VLDL) Spiegels zusammenzuhängen. (64)

Neben den Effekten der Statine, die abhängig von der Senkung des LDL-Spiegels sind, gibt es noch zusätzliche, sogenannte pleiotrope LDL-unabhängige Effekte. Zwischenprodukte der Cholesterolsynthese beeinflussen auch die Aktivität anderer Moleküle. (65) So sind das Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und das Farnesylpyrophosphat (FPP) für die posttranslationale Modifikation verschiedener G-Proteine zuständig. Dazu zählen unter anderem Ras und Rho, welche Einfluss auf eine Vielzahl an Zellfunktionen haben. (66) In Zellkultur -und Tierversuchen konnten diverse dieser Effekte nachgewiesen werden. Die wichtigsten Effekte auf das kardiovaskuläre System sind in **Abbildung 3** dargestellt. (67–69)

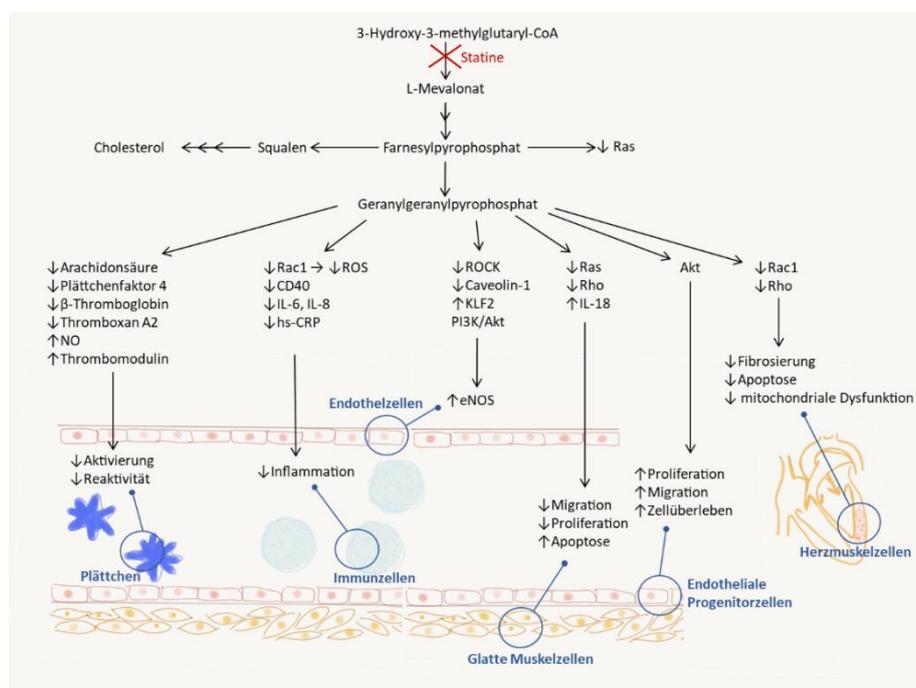


Abbildung 3- Übersicht der pleiotropen Effekte der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren auf das kardiovaskuläre System: Dargestellt ist die Cholesterinbiosynthese und die Effekte einer Inhibition der HMG-CoA-Reduktase auf zellulärer Ebene.

Quellen: eigene Abbildung, angelehnt an *Oesterle, Laufs et al.* (67), *Oesterle, Liao et al.* (68) und *Sadowitz, Maier et al.* (69)

Im Hinblick auf kardiovaskuläre Erkrankungen und die Arteriosklerose lassen sich einige pleiotrope Effekte der Statine zusammenfassen. Statine haben antiinflammatorische Eigenschaften. Sie reduzieren die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie das IL-6 und das IL-8. (70) Auch eine Senkung des hochsensitiven C-reaktiven Proteins (hs-CRP),

Einleitung

einem Akute-Phase-Protein der Entzündungsreaktion werden atheroprotektive Effekte zugeschrieben. (71) Statine verhindern außerdem die Adhäsion von Leukozyten am Endothel und reduzieren somit die Transmigration dieser Zellen in die Intima. Der zugrundeliegende Mechanismus ist vor allem eine verminderte Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (*Intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) und Gefäß-Adhäsionsmolekül 1 (*Vascular adhesion molecule 1*, VCAM-1). (72) Neben der Entstehung der Arteriosklerose wird auch die Aggravation der Arteriosklerose durch Statine beeinflusst. Statine fördern die Stabilität arteriosklerotischer Plaques. Ein Signalweg scheint die Beeinflussung der T-Zell-Differenzierung zu sein. (67) Außerdem hemmen Statine die Bildung von MMP in glatten Gefäßmuskelzellen. (73) In unserer Arbeitsgruppe konnte auch ein Einfluss der Statine auf die Proliferation und Migration von venösen Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) gezeigt werden. (74)

1.3 Die Rolle des Endothels

1.3.1 Aufbau und Funktion

Die Gefäßwand besteht aus drei Schichten: der *Tunica intima*, der *Tunica media*, und der *Tunica adventitia*. Die etwa zehn Trillionen (10^{13}) Endothelzellen der *Tunica intima* sind jeweils ca. $50\ \mu\text{m}$ mal $20\ \mu\text{m}$ groß und haben meist eine flache, polygonale Form. (75, 76) Diese Form kann sich durch verschieden Stimuli verändern. So richten sich Endothelzellen unter hämodynamischen Kräften entlang der Flussrichtung aus und gehen in eine langgestreckte Form über (siehe **Abbildung 4**, rechtes Bild).

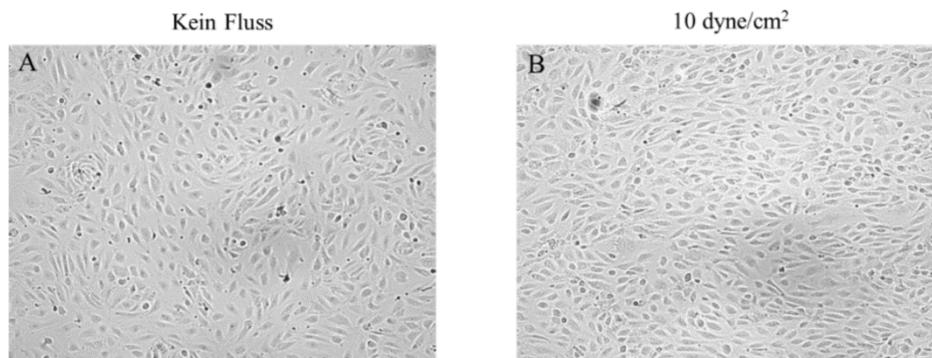


Abbildung 4 - Veränderung der Zellmorphologie unter hämodynamischen Flussbedingungen. HUVEC unter statischen Bedingungen (linkes Bild) und unter Schubspannung ($10\ \text{dyne/cm}^2$, rechtes Bild)

Quelle: Materzok (109)

Einleitung

Zu den Aufgaben des Endothels zählen Barriere -und Transportfunktionen sowie die Regulation des Gefäßtonus und metabolische Funktionen. Über spezifische Transporter, transendothelialen Transport durch Vesikel oder über einen parazellulären Transport werden Moleküle verschiedener Größe aus dem Blut aufgenommen. Für Zucker oder Aminosäuren gibt es spezifische Transporter, ebenso gelangen einige Statine über Organo-Anionen-Transporter in die Zelle. (76) Die Rolle des Endothels bei der Regulation des Gefäßtonus liegt besonders im Bereich der parakrinen Mechanismen. Hierbei synthetisiert das Endothel verschiedene Moleküle, die vasodilatatorisch (Stickstoffmonoxid, NO) oder vasokonstriktiv (Endothelin) auf das Gefäß wirken. (76, 77)

Das Endothel hat auch verschiedene metabolische Funktionen. Durch Expression des Rezeptors für LDL und Bindung der Lipoproteinlipase greifen die Endothelzellen in den Fettstoffwechsel ein. (75, 76) Außerdem besitzen Endothelzellen Insulin-Rezeptoren und agieren somit auch im Kohlenhydratstoffwechsel. (78, 79)

1.3.2 Migration von Endothelzellen

Endothelzellen verbleiben nicht dauerhaft an einem Ort, sondern werden durch verschiedene Stimuli zur Migration angeregt. Die Proliferation und Migration von Endothelzellen sind eine Voraussetzung für die Angiogenese und Vaskulogenese. (80) Zu den Treibern der Migration gehören unter anderem chemotaktische oder mechanische Stimuli. (81, 82) Die Migration lässt sich in mehrere Schritte einteilen, die in **Abbildung 5** illustriert sind. (83)

1. Polarisierung der Zelle: Wichtige Akteure dieses Vorgangs sind *Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat* (PIP3), Rac und Zellteilungskontrollprotein 42 (*Cell division control protein 42*, Cdc42). Diese führen zur Polymerisation von Aktinfilamenten und Ausbildung von kleinen ungerichteten Zellfortsätzen, den Lamellipodien, an der Zellvorderseite. (82)
2. Formierung von Protrusionen: In diesem Schritt werden dann mithilfe des Aktin assoziierten Protein 2/3-Komplex (*Aktin related protein 2/3-Komplex*, Arp2/3-Komplex) aus den Fortsätzen gerichtete Protrusionen. (82, 84)
3. Ausbildung fokaler Adhäsionskontakte an der Vorderseite: Für die Migration der EC ist eine Verankerung der Zelle an der Vorderseite notwendig. Dafür bilden sich fokale Adhäsionskontakte aus, die die Zellmembran mit der EZM verbinden. (85)
4. Zellkontraktion und Auflösung fokaler Adhäsionskontakte an der Rückseite: Zur endgültigen Vorwärtsbewegung werden die Adhäsionskontakte an der Hinterseite mittels

Einleitung

verschiedener Kinasen und Proteasen aufgelöst. Durch ein Zusammenspiel von Aktin- und Myosinfilamenten kann sich die Zelle aktiv kontrahieren. (86)

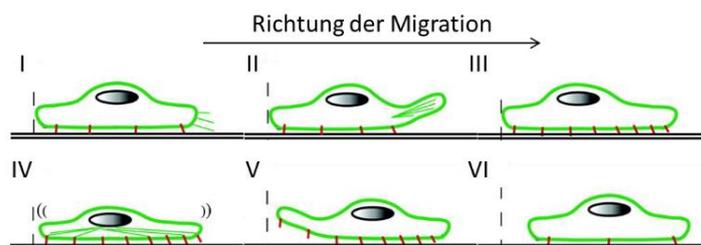


Abbildung 5 - Ablauf der Zellmigration. In Schritt (i) reagiert die Zelle auf einen Stimulus und bildet erste ungerichtete Vorwölbungen der Zellmembran. In Schritt (ii) bilden sich die gerichteten Lamellipodien aus. Das Anheften der Zellvorderseite an die EZM wird in (iii) dargestellt. Es kommt zu einer Kontraktion der Endothelzelle (iv). Erst das Ablösen der Zellhinterseite von der EZM erlaubt das endgültige Vorwärtswandern der Zelle (v). Im Anschluss an diesen Zyklus werden die Proteine, die für diesen Vorgang gebraucht wurden, recycelt (vi). Durch Wiederholung dieser Schritte kommt es zu einer stetigen Vorwärtsbewegung der Zelle.

Quelle: verändert nach *Lamalice, Le Boeuf et al.* (83)

Zellen, die im Verbund migrieren, wandern geordneter und schneller als einzelne Zellen. Dabei entwickeln Zellen in den vorderen Reihen Zugkräfte und erleichtern die Migration für die folgenden Zellen. Die Zellen der Gruppe sind über sogenannte Cadherin-Finger miteinander verbunden. (87, 88)

1.4 Hämodynamische Kräfte

Das Endothel ist ständig dem Blutfluss ausgesetzt. Diese mechanische Einwirkung auf die Endothelzellen ist nicht überall im Körper gleich. Im Gefäßsystem finden sich Regionen, in denen der Blutfluss vor allem laminar und gleichförmig ist. In **Abbildung 6** sind diese Regionen blau dargestellt. (89) Hier folgt der Blutfluss einer definierten Richtung. Diese Regionen werden als atherosensibel bezeichnet, da die Endothelzellen hier vorwiegend Stoffe produzieren, die eine Initiation und Progression von Arteriosklerose verhindern. Dazu zählen Produkte, die das Zellüberleben fördern und solche, die eine Koagulation, erhöhte Permeabilität und Leukozytenadhäsion verhindern. An anderen Stellen, vor allem Verzweigungen der Arterien, kann es zum Auftreten turbulenter, nicht-laminarer Flussverhältnisse kommen. Die Endothelzellen erfahren einen arhythmischen Blutstrom, der seine Richtung wechseln kann.

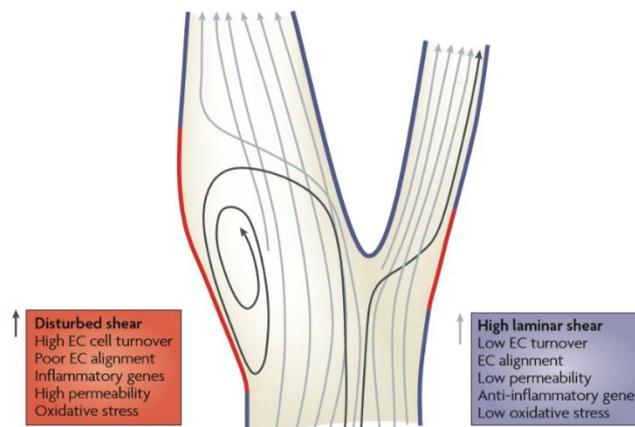


Abbildung 6 -Flussverhältnisse an einer Gefäßverzweigung. In Rot sind Regionen dargestellt, in denen turbulente Flussverhältnisse herrschen. Blaue Regionen sind einem laminarem Blutfluss ausgesetzt.

Quelle: *Hahn, Schwartz et al.* (89)

Solche atheropronen Regionen werden häufig auch durch turbulente Flussverhältnisse charakterisiert. Diese Flussverhältnisse können zu einer Veränderung des endothelialen Phänotyps führen. Hier wird die Permeabilität erhöht, es kommt zu einem vermehrten Zellumsatz und die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel wird erleichtert. Das aktivierte Endothel reagiert in diesen Regionen anders auf kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Bluthochdruck und erhöhter Cholesterolspiegel. (90)

1.4.1 Wandschubspannung

Die bedarfsgerechte Perfusion verschiedener Gewebe, wird durch eine komplexe Regulation des Gefäßsystems sichergestellt. Der Durchmesser eines Gefäßes wird durch drei mechanische Kräfte bestimmt: hydrostatischer Druck, zirkumferentieller Stress und die Schubspannung. Der hydrostatische Druck wird durch den Blutdruck erzeugt; zirkumferentieller Stress beschreibt eine Dehnung des Gefäßes durch die Blutdruckamplitude; die Schubspannung wird durch den Blutfluss bedingt. (89, 91, 92) Die hier beschriebene Schubspannung τ , wird im Englischen als *shear stress* bezeichnet und ergibt sich aus der Reibungskraft F (durch den Blutfluss) an einer Fläche A (dem Endothel) und wird häufig in der Einheit dyne/cm^2 angegeben.

$$\tau = \frac{F}{A}$$

Im venösen System herrschen Schubspannungen zwischen einem und sechs dyne/cm^2 . In arteriellen Gefäßen finden sich Werte zwischen zehn und 70 dyne/cm^2 . An Gefäßaufzweigungen kann es durch turbulenten Fluss wiederum zu lokalen Veränderungen der Schubspannung kommen. (91, 93)

Einleitung

1.5 Das Apelin/APLNR-System als Regulator der Statineffekte

1.5.1 Das Apelin/APLNR-System

Im Jahr 1993 wurde ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen identifiziert, der strukturelle Ähnlichkeiten zum Angiotensin-Rezeptor aufwies, aber kein Angiotensin II binden konnte. Dieser Rezeptor wurde zunächst APJ getauft, bis Apelin als APJ-Ligand entdeckt und der Rezeptor zunehmend als Apelin-Rezeptor (APLNR) bezeichnet wurde. (94) Apelin kommt in diversen Isoformen vor. Diese werden aus einem 77 Aminosäuren langen Propeptid gebildet und bestehen aus 12 bis 36 Aminosäuren. Im kardiovaskulären System kommt vor allem die Isoform [Pyr¹]Apelin-13 vor. (95, 96) Seit 2013 wurden weitere endogene Liganden des APLNR identifiziert. Das APELA Gen kodiert für ein 54 Aminosäuren langes Vorläuferpeptid aus dem das Peptidhormon ELABELA (ELA-32) sowie kleinere Isoformen (ELA-21 und ELA-11) erzeugt werden. (97, 98)

Das Apelin/APLNR-System ist in vielen Geweben exprimiert, eine besonders hohe Expression findet sich in Endothelzellen und VSMC. (99, 100) Das Apelin/APLNR-System hat einen blutdrucksenkenden Effekt, der sich auf einen NO-abhängigen Mechanismus zurückführen lässt. (101) Es wirkt mitogen und fördert die Proliferation von Endothelzellen. (102) Außerdem greift das Apelin/APLNR-System in die Polarisierung und konsekutive Migration von Endothelzellen ein. (103, 104)

1.5.2 Der Apelin-Rezeptor (APLNR)

Mehrere Arbeiten verweisen jedoch auch auf Apelin-unabhängige Funktionen des APLNR. So konnte der APLNR in Kardiomyozyten als Mechanosensor identifiziert werden, der bei Dehnung zu einer Vergrößerung der Kardiomyozyten und Erhöhung von Hypertrophiemarkern führte. (105) Busch et al. charakterisierten den APLNR als flusssensitiven Mechanorezeptor. In Endothelzellen, die mit laminarem Fluss behandelt wurden, zeigte sich eine vermehrte Gen- und Proteinexpression von Apelin und APLNR. Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte zudem, dass auch in Zellen mit Apelin-*Knockdown* der Fluss eine Steigerung der APLNR-Expression bewirkte. Der APLNR wird also auch in Abwesenheit seines Liganden durch Fluss aktiviert. Diese Aktivierung war abhängig von der Stärke der Schubspannung (106). Bei Inhibition des APLNR mittels siRNA zeigte sich eine veränderte Reaktion von HUVEC auf laminaren Fluss. So beeinflusste die APLNR-Inhibition das Remodelling des Zytoskeletts, die zelluläre Elastizität, die Zellbewegung und die Verteilung fokaler Adhäsionskomplexe in HUVEC (107).

Einleitung

Lorenz et al. konnten eine Wirkung der Statine auf die endotheliale Proliferation und flussinduzierte Migration beschreiben. Dabei ergaben sich Hinweise auf einen Einfluss der Lipophilie des Statins auf seine Wirkeffekte. (74) Der genaue Wirkmechanismus bleibt unterdessen weiterhin offen. McLean et al. konnten das Apelin/APLNR-System als Mediator der Statinwirkung auf Endothelzellen zeigen. So waren die Effekte der Statine, wie zum Beispiel die Genregulation von KLF2 und eNOS, auf ein intaktes Apelin/APLNR-System angewiesen. Statine induzierten außerdem die Expression des Rezeptors APLNR via KLF2 in venösen Endothelzellen. (108) In diesem Kontext konnte unsere Arbeitsgruppe ein vermindertes Migrarionsverhalten venöser Endothelzellen unter APLNR-Blockierung mit dem elektiven APLNR-Antagonisten ML221 (4-oxo-6-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4H-pyran-3-yl 4-nitrobenzoat zeigen (**Abbildung 7**). (109)

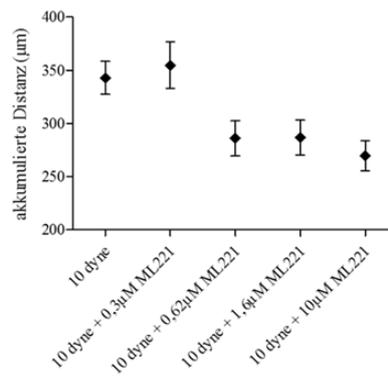


Abbildung 7 - Wanderung der HUVEC bei hämodynamischen Flussbedingungen (10dyne/cm²) unter APLNR-Inhibition mittels ML221. Aufgetragen ist die Gesamtstrecke, die HUVEC in 15 Stunden bei einer Schubspannung von 10 dyne/cm² zurücklegten. Dabei wurden die Zellen mit ML221 in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Verkürzung der Migrationsstrecke unter ML221-Einfluss.

Quelle: *Materzok* (109)

1.6 Zielstellung

Die lipidsenkende Wirkung der Statine ist gut untersucht. Die pleiotropen Effekte und ihre klinische Relevanz hingegen sind weiterhin wichtiger Gegenstand der Forschung. Dabei sind neben der Art der Effekte auch die Unterschiede zwischen den verschiedenen Statinen zu ergründen. Die Frage, ob die physikochemischen Eigenschaften der Statine einen Einfluss auf ihre pleiotropen Effekte haben, steht immer noch weitestgehend unbeantwortet im Raum.

Es fehlen zum Beispiel bisher konkrete Untersuchungen zum Einfluss der Statine auf die Endothelzellmigration. Dafür sollen die Ergebnisse dieser Arbeit sowie die oben erwähnten Forschungsergebnisse in einen Zusammenhang gebracht werden. Hier wird ein besonderes Augenmerk auf den möglichen Vermittlereffekt des APLNR gelegt.

Es ergeben sich drei Fragestellungen, die bezüglich des Phänotyps und des Genotyps der Endothelzellen bewertet werden sollen.

- Welchen Einfluss hat der APLNR auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen?
- Welchen Einfluss haben Statine auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen?
- Welche Rolle spielt der APLNR für die Wirkung der Statine auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen?

Diese Fragen sollen unter verschiedenen Aspekten betrachtet werden:

- Zeigen sich Unterschiede zwischen einem lipophilen und einem hydrophilen Statin?
- Zeigen sich Unterschiede zwischen venösen und arteriellen Endothelzellen?
- Zeigen sich Unterschiede zwischen physiologischen und nicht-physiologischen Schubspannungen?

Diese Arbeit soll dazu dienen, den Zusammenhang zwischen Statinen, dem APLNR und der endothelialen Migration darzustellen, um damit Ansatzpunkte für gezieltere mechanistische Fragestellungen zu schaffen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Für die Versuche wurden humane umbilikal venöse Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) und humane koronararterielle Endothelzellen (*human coronary artery endothelial cells*, HCAEC) verwendet. Deren Gewinnung, Isolation und Anzucht sind im **Abschnitt 2.2.1** beschrieben.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 - Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
BD Discardid II Spritze (10 mL)	BD Biosciences, Heidelberg
BD Discardid II Spritze (2 mL)	BD Biosciences, Heidelberg
BD Discardid II Spritze (20 mL)	BD Biosciences, Heidelberg
C-Chip™ disposable haemocytometer	Nano EnTek Inc., Seoul, Korea
Cellstar®Zellkultur Flaschen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Falcon™Röhrchen (50 mL)	BD Biosciences, Heidelberg
Filtropur S / V Sterifilter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Heparin-Spritze (1 mL)	Dispomed®Witt oHG, Gelnhausen
Ibidi µ-Slides I ^{0.8} Luer (ibiTreat)	ibidi GmbH, Martinsried
BD Microlance 3 Kanüle	BD Biosciences, Heidelberg
MacroTips Premium 1000 µL, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Micro Tips Premium, 10 µL, farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Perfusion Set (yellow/green, white)	ibidi GmbH, Martinsried
Pipettenspitze, 10-200µL	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße (2 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serial Connector	ibidi GmbH, Martinsried
serologische Pipetten (10 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
serologische Pipetten (25 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Material und Methoden

serologische Pipetten (5 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 mL)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PCR-Soft Tube 0,2 mL farblos	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Zellkulturflasche 25/75 cm ²	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturplatte 96-well, transparent	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3 - Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Accutase®	PAA, Paschingen, Österreich
Atorvastatin	Sigma-Aldrich, München
bFGF	Biomol GmbH, Hamburg
DMSO	Sigma-Aldrich, München
ECGS	PromoCell GmbH, Heidelberg
EGF	Biomol GmbH, Hamburg
FKS	Biochrom GmbH, Berlin
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen, Karlsruhe
Hydrocortison	Sigma-Aldrich GmbH, München
L-Glutamin	Biochrom GmbH, Berlin
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Medium 199 (M199)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Massachusetts, Vereinigte Staaten
MCDB 131 Medium w/o L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Nuklease-freies Wasser	Roboklon GmbH, Berlin
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
ML221	Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien
Phosphat Buffered Saline	PAA, Paschingen, Österreich
Pravastatin	Sigma-Aldrich, München
SG qPCR Master Mix (2x)	Roboklon GmbH, Berlin

bFGF = *Bovine fibroblast growth factor*; Boviner Fibroblastenwachstumsfaktor, DMSO = Dimethylsulfoxid, ECGS = *Endothelial cell growth supplement*; Endothelzellwachstumszusatz, EGF = *Endothelial growth factor*, Endothelialer Wachstumsfaktor, FKS = Fetales Kälberserum, ML221 = 4-oxo-6-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4H-pyran-3-yl 4-nitrobenzoat, qPCR = *Quantitative real-time polymerase chain reaction*; Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Material und Methoden

2.1.4 Assays und Kits

Tabelle 4 - Assays und Kits

Bezeichnung	Inhalt	Hersteller
RNeasy® Mini Kit		Qiagen GmbH, Hilden
TaqMan™ Reverse Transcription Reagents	<ul style="list-style-type: none"> • RT-Puffer • MgCl₂ • dNTP • Random Hexamer Primer • RNase-Inhibitor 	Thermo Fisher Scientific GmbH, Massachusetts, Vereinigte Staaten
<small>RT-Puffer = Reverse Transkriptase Puffer, dNTP = Desoxynukleosidtriphosphate, RNase = Ribonukleinase</small>		

2.1.5 Lösungen

Tabelle 5 - Lösungen

Lösung, Reagenz, Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium HCAEC	<ul style="list-style-type: none"> • Medium 199: 500 mL
Kulturmedium HUVEC	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MCDB 131</i> Medium w/o L-Glutamin: 500 mL • EGF: 550 µL • bFGF: 100 µL • Hydrocortison: 1 mL • Glutamin: 5 mL • ECGS: 2 mL • FKS nach Bedarf •
<small>bFGF = Bovine fibroblast growth factor; Boviner Fibroblastenwachstumsfaktor, ECGS = Endothelial cell growth supplement; Endothelzellwachstumszusatz, EGF = Endothelial growth factor, Endothelialer Wachstumsfaktor, FKS = Fetales Kälberserum</small>	

Material und Methoden

2.1.6 Geräte und Software

Tabelle 6 - Geräte und Software

Bezeichnung	Hersteller
Axio Vert.A1	Carl Zeiss AG, Hamburg
C1000 Touch Thermal Cycler mit CFX96 Real-Time System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Vereinigte Staaten
Chemotaxis and Migration Tool	Ibidi GmbH, Martinsried
CO ₂ -Inkubator Heraeus® BBD 6220	Thermo Fisher Scientific GmbH, Massachusetts, Vereinigte Staaten
CPA324S Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluidic Unit	Ibidi GmbH, Martinsried
Graph Pad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, Vereinigte Staaten
Heraeus™ Fresco™ 17 Microcentrifuge	Thermo Fisher Scientific GmbH, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Ibidi Pump System	Ibidi GmbH, Martinsried
ImageJ 1.52a	National Institutes of Health, Vereinigte Staaten
JuLI™ FL	Nano EnTek Inc., Seoul, Korea
Laminar Flow Box Hera Safe	Heraeus GmbH, Hanau
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten
NanoDrop 2000 Spectrometer	Thermo Fisher Scientific GmbH, Massachusetts, Vereinigte Staaten
Pipette (2 µL)	Eppendorf, Hamburg
Pipette (20 µL)	Eppendorf, Hamburg
Pipette (100 µL)	Eppendorf, Hamburg
Pipette (200 µL)	Eppendorf, Hamburg
Pipette (1000 µL)	Eppendorf, Hamburg
Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Rotina 46R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
SAS	SAS Institute, Cary, Vereinigte Staaten

Material und Methoden

ThermoMixer® C	Eppendorf AG, Hamburg
Wasserbad SW22	Julabo GmbH, Seelbach

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung der Zellen

2.2.1.1 HUVEC

Die Endothelzellen aus der Nabelschnurvene wurden in unserem Forschungslabor gewonnen. Hierfür wurden menschliche Nabelschnüre direkt aus dem Kreißaal genutzt. Weder das Geschlecht des Kindes noch die Art der Schwangerschaft oder Geburt hatten dabei Einfluss auf die Auswahl der Nabelschnur. Die frische Nabelschnur wurde in warmen HBSS transportiert und unter der Sterilwerkbank aufgearbeitet. Hierzu wurden zweimal je 50 mL HBSS in die Nabelschnurvene gespritzt. Nach dem Spülen wurden 10 mL einer 0,1-prozentigen Kollagenase-Lösung in die Vene infundiert, die Enden der Nabelschnur mit Klemmen verschlossen und die Nabelschnur für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Klemmen wurden entfernt und die Vene mit 30 mL HBSS gespült. Hierbei wurde die Spüllösung aufgefangen und 5 Minuten bei 350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in MCDB mit 20 % FKS resuspendiert. Die Lösung wurde in T25-Zellkulturflaschen überführt und nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.1.2 HCAEC

Die Endothelzellen aus den Koronararterien wurden bei Provitro und Cellsystems gekauft. Die Lieferung der Zellen erfolgte in einem Umfang von 500.000 Zellen pro Kryoröhrchen. Hierbei handelte es sich um die isolierten Zellen der rechten und linken Koronararterie eines einzigen Spenders. In diesem Falle wurden Zellen eines männlichen Spenders genutzt.

Die Kryoröhrchen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert und zur Nutzung aufgetaut. Hierzu wurde das Röhrchen im Wasserbad erwärmt und dann die Zellsuspension in M199 mit 20 % FKS aufgenommen und in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.2 Zellkultivierung

Zur Zellkultivierung wurde MCDB + 10 % FKS für HUVEC, sowie M199 + 10 % FKS für HCAEC verwendet. Die adhärennten Zellen in der Kulturflasche wurden zweimal mit je 5 mL PBS gespült. Im Anschluss wurden 750 µL Accutase zugesetzt und die Zellen für 10 Minuten inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen mithilfe von 5 mL Medium, wurde die Zellsuspension in ein Röhrchen überführt und 5 Minuten bei 350 g zentrifugiert. Das Zellpellet konnte dann

Material und Methoden

nach Verwerfen des Überstands in frischem Medium resuspendiert und auf neue Kulturflaschen aufgeteilt werden. Dabei wurden ungefähr 600.000 Zellen pro Flasche ausgesät.

Die HUVEC befanden sich zum Zeitpunkt der Isolation in Passage null und wurden bis Passage drei für Versuche genutzt. Die HCAEC wurden in Passage drei geliefert und bis Passage sieben verwendet.

2.2.3 Flussversuche

2.2.3.1 Versuchsablauf

Die Flussversuche wurden nach dem in *Abbildung 8* dargestellten Protokoll durchgeführt. Je nach Fragestellungen wurden der Zelltyp, die Behandlung und die eingestellte Schubspannung verändert.

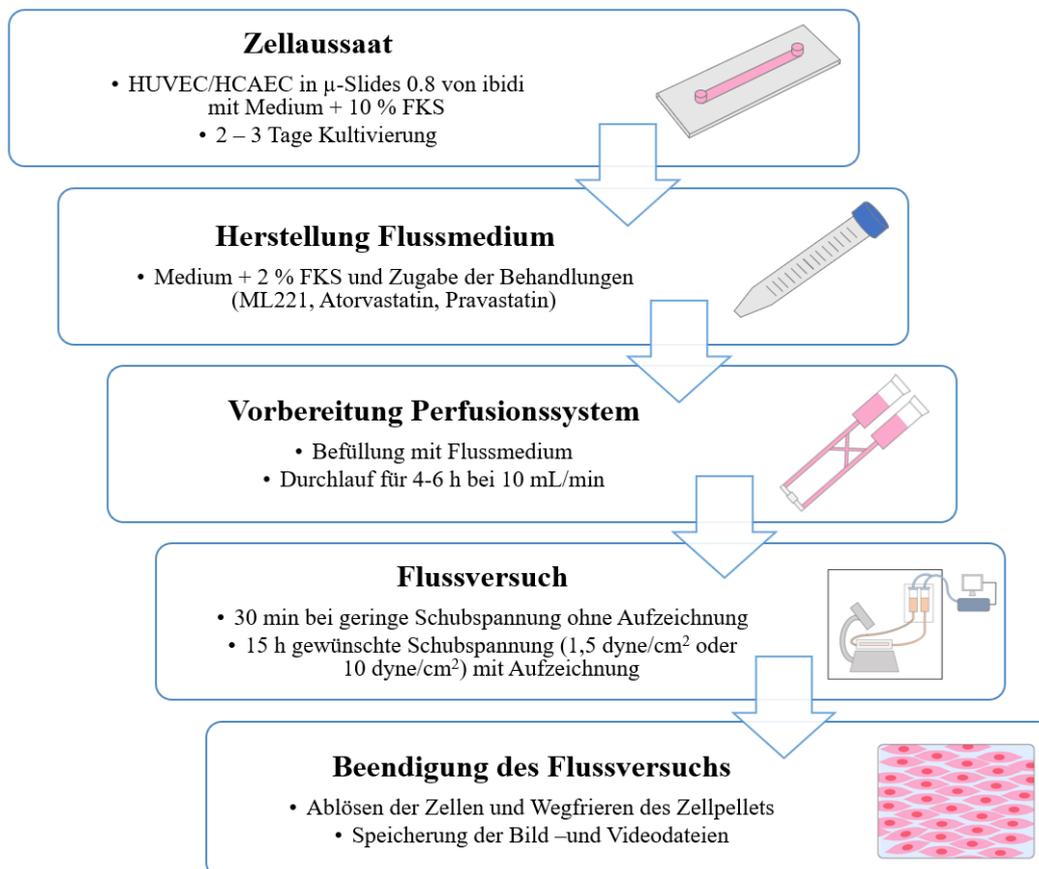


Abbildung 8 - Ablauf der Flussversuche. Nach der Zellaussaat wurden diese 2-3 Tage kultiviert. Zu Beginn des Flussversuches wurde das Flussmedium mit 2 %FKS und der jeweiligen Behandlung hergestellt und ins Perfusionssystem gegeben. Der Flussversuch erstreckte sich über 15 h. Zur Beendigung des Flussversuches wurden die Zellen abgelöst und das Bildmaterial gespeichert.

Für die Flussversuche wurden die Zellen mit Accutase aus der Zellkulturflasche gelöst, zentrifugiert und in Medium auf eine Zellzahl von 200.000 Zellen pro Mikroliter eingestellt.

Material und Methoden

Die Zellen wurden in Flusskammern (0.8 μ -Slide von ibidi) ausgesät und für zwei bis drei Tage kultiviert. Eine ausreichende Zelldichte von ca. 80 % wurde lichtmikroskopisch überprüft.

Die Flussversuche wurden mit dem Pump- und Perfusionssystem der Firma ibidi durchgeführt. In **Abbildung 9** wird der Aufbau des Flusssystems schematisch dargestellt.

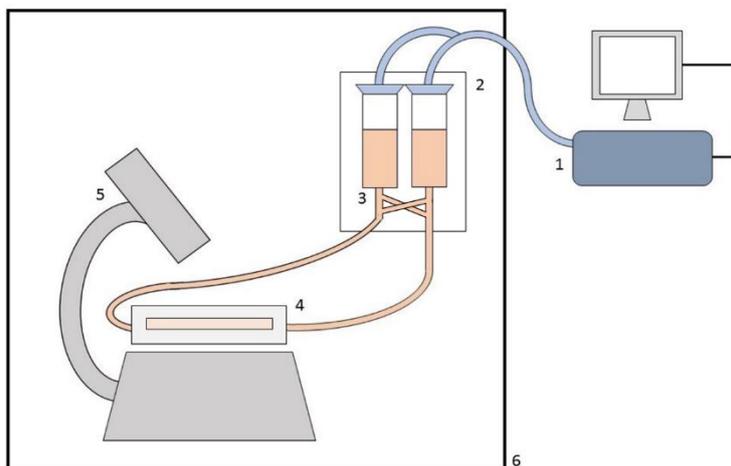


Abbildung 9 - Aufbau der Flusskammerversuche Mit 1: Pumpe, 2: Fluidic Unit, 3: Reservoirs mit Schlauchsystem, 4: μ -Slide mit Endothelzellen, 5: JuLi Mikroskop, 6: CO₂-Inkubator

Zur Vorbereitung der Flussversuche wurden die Reservoirs des Perfusionssystems mit Medium befüllt. Das Perfusionssystem konnte dann in die *Fluidic Unit* eingesetzt und an ein Luftdruck-Pump-System angeschlossen werden. Die *Fluidic Unit* mit dem Schlauchsystem befand sich dabei in einem CO₂-Inkubator, während die Pumpe und der Computer zur Steuerung außerhalb des Inkubators standen. Zur Kalibrierung des Geräts und Vermeidung von Luftbläschen im System wurde das Medium zuerst für 4-6 Stunden durch das Schlauchsystem gepumpt. Erst dann wurde die Flusskammer mit den dicht gewachsenen Endothelzellen in den Aufbau eingespannt.

Zu Beginn des Versuches wurde die Flusskammer unter dem Live Zellanalysator JuLI™ FL positioniert. Dann wurden die Zellen für 15 Stunden über Nacht der jeweils gewünschten Flussrate ausgesetzt. Über die 15 Stunden wurden in einem 15-minütigen Intervall Bilder aufgenommen. Nach Ende der Flussbehandlung wurden die Zellen mit Accutase abgelöst und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Material und Methoden

2.2.3.2 Auswertung

Die Auswertung der aufgenommenen Bilder erfolgte mit dem Manual Tracking Plugin von ImageJ (National Institutes of Health, Vereinigte Staaten). Dafür wurde der Bildausschnitt in vier Quadranten geteilt, in denen jeweils fünf zufällig ausgewählte Zellen über 60 Bilder getrackt wurden. Das heißt die Wanderung dieser 20 Zellen wurde über den Zeitraum von 15 h per Mausklicks verfolgt. Mithilfe dieser Daten konnte im Chemotaxis und Migration Tool von ibidi die akkumulierte Distanz (Gesamt-Strecke), Geschwindigkeit, euklidische Distanz (Luftlinien-Strecke) und Direktionalität (Richtung der Wanderung) bestimmt werden.

2.2.3.3 Durchführung der Flussversuche

Die Versuche dieser Arbeit wurden mit HUVEC und HCAEC durchgeführt. Das jeweilige Medium wurde für die Flussversuche mit 2 % FKS versetzt und mit verschiedenen Substanzen behandelt. Neben den Statinen Atorva -und Pravastatin in den Konzentrationen 0,1 μM und 1,0 μM kam auch der APLNR-Antagonist ML221 zum Einsatz. Atorvastatin ist dabei ein Vertreter der lipophilen Statine, während Pravastatin hydrophile Eigenschaften besitzt. In vorherigen Arbeiten konnte die vollständig antagonisierende Wirkung von ML221 bei einer Konzentration von 10 μM bestätigt werden (109, 110).

Die venösen Endothelzellen (HUVEC) wurden nach Standardbedingungen aus Nabelschnüren isoliert. Sie wurden zwei verschiedenen Schubspannungen ausgesetzt (1,5 dyne/cm^2 und 10 dyne/cm^2). Dabei stellt 1,5 dyne/cm^2 den physiologischen Fluss dar, während 10 dyne/cm^2 eine unphysiologisch hohe Schubspannung ist. In bereits abgeschlossenen Arbeiten konnte ein Einfluss von Statinen auf die Migrationseigenschaften der HUVEC gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde dann der Einfluss des APLNR-Antagonisten getestet. Die Daten der HUVEC wurden teilweise in Zusammenarbeit mit Dr. rer. med. Florian Lorenz erhoben. In dieser Arbeit sind sie in den Abbildungen grau markiert.

Die arteriellen Endothelzellen (HCAEC) sind kommerziell erhältlich und stammen von einem Spender. Um die Vergleichbarkeit zu den aus verschiedenen Spendern isolierten HUVEC zu gewährleisten wurden HCAEC von zwei Anbietern und somit zwei verschiedenen Spendern genutzt und miteinander verglichen. Die arteriellen Endothelzellen wurden mit physiologischen Schubspannungen von 10 dyne/cm^2 behandelt. Hier wurden zwei Durchläufe ausgeführt. Da es für die HCAEC noch keine Vorarbeiten gab, wurde neben dem Einfluss des APLNR auch die Wirkung der Statine auf ebendiese Zellen untersucht.

Material und Methoden

Für die Einstellung von 10 dyne/cm^2 wurde eine 30-minütige Aufbauphase genutzt. Die Schubspannung wurde langsam erhöht, von $1,5 \text{ dyne/cm}^2$ für 10 min, auf $2,5 \text{ dyne/cm}^2$ für 10 min, dann 5 dyne/cm^2 für 5 min und $7,5 \text{ dyne/cm}^2$ für 5 min. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die mit $1,5 \text{ dyne/cm}^2$ behandelten Zellen auch erst nach einer halben Stunde vom Mikroskop aufgezeichnet.

2.2.4 Genexpressionsanalyse

2.2.4.1 RNS-Isolation

Die RNS-Isolation aus den Zellen erfolgte mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit. Zur Lyse wurde der Qiagen RLT Puffer mit 1 % β -Mercaptoethanol versetzt. Dies dient der Inaktivierung von RNSsen im Lysat. Die Homogenisierung der Probe erfolgte mit einer 1 mL Spritze und einer 22 G Kanüle. Nach Zugabe von Ethanol wurde die Probe auf die im Set vorhandene Säule gegeben und zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen wurde die auf der Membran anhaftende RNS herausgelöst und aufgefangen.

Zur Bestimmung der RNS-Konzentration in der Probe wurde der Nano Drop (NanoDrop 2000 UV/VIS Spektrophotometer der Firma Thermo Scientific) verwendet. Hierbei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Um die Reinheit der Probe darzustellen wurde der Quotient von 260 nm zu 280 nm genutzt. Dabei wurden nur Proben verwendet, die einen Quotienten über 1,8 erfüllten (siehe Anhang, Abbildung 29). (111)

2.2.4.2 Umschreiben von RNS in cDNS

Für die Genexpressionsanalysen wurden zuerst mithilfe des TaqMan® Reverse Transcription Reagent von Applied Biosystems komplementäre DNS-Stränge (cDNS) aus der RNS umgeschrieben. Dazu wurden je Flussversuch 600 ng RNS eingesetzt. Diese wurde mit sterilem Wasser auf ein Gesamtvolumen von $15,4 \mu\text{L}$ aufgefüllt. Für die Reaktion im Thermocycler wurde ein Mastermix mit den Komponenten in **Tabelle 7** angefertigt:

Tabelle 7 -Ansatz für die cDNS-Synthese

Reagenz	Volumen (μL)
10x RT-Puffer	4
MgCl ₂ (25 mM)	8,8
dNTP (2,5 mM)	8
Random Hexamer Primer (50 μM)	2
RNase-Inhibitor (20 U/ μL)	0,8
Reverse Transkriptase (50 U/ μL)	1

Material und Methoden

Die RNS und der Mastermix wurden in ein gemeinsames Röhrchen überführt, vermengt und zentrifugiert. Somit ergab sich je Probe ein Gesamtvolumen von 40 μL .

Die Arbeitsschritte des ThermoCycler erstreckten sich über 45 Minuten. Zur Anbindung des Primers wurde die Probe für 10 Minuten auf 25 °C erwärmt. Danach erfolgte die reverse Transkription für 30 Minuten bei 48 °C. Den letzten Schritt bildete die fünfminütige Inaktivierung bei 95 °C.

Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.4.3 qPCR

Zur Analyse der Genexpression wurde eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) durchgeführt.

Für jede Probe wurden 2 μL cDNS verwendet. Hinzu kamen 8 μL des Reaktionsansatzs (Siehe *Tabelle 8*). Der Master Mix enthält die TaqPolymerase, die Nukleotide (dNTPs) und angepasste Reaktionspuffer.

Tabelle 8 - Reagenzien für die qPCR

Reagenz	Volumen (μL)
SG qPCR Master Mix (2x)	5
Primer	0,5
cDNS	2
H ₂ O	2,5

Für die Quantifizierung wurde eine TaqMan-Sonde verwendet. Diese Sonde hat an ihrem 5'-Ende eine Farbstoffmarkierung, den sogenannten Reporter. Gängige Farbstoffe sind FAM oder VIC. Am 3'-Ende befindet sich ein Minor Groove Binder mit einem nicht fluoreszierenden Quencher. Die Sonden besitzen spezifische Sequenzen für die zu bestimmenden Gene. Da der Sonde die 3'-OH-Gruppe fehlt, kann sie nicht durch die TaqPolymerase verlängert werden (112).

Zum Einsatz kamen die in *Tabelle 9* aufgelisteten TaqMan-Sonden:

Tabelle 9 - TaqMan Sonden

Gen	Assay-Nummer	Firma
eNOS	Hs01574665_m1	ThermoFisher Applied
VCAM-1	Hs00365485_m1	ThermoFisher Applied
Rac1	Hs01025984_m1	ThermoFisher Applied

Material und Methoden

Die Durchführung der qPCR erfolgte mithilfe des CFX96 TouchTMRReal Time PCR Systems der Firma BioRad. In **Tabelle 10** ist das Protokoll für den Durchlauf der qPCR dargestellt.

Tabelle 10 - Schritte der qPCR

Schritt	Temperatur in °C	Dauer	Zyklen
Carry-Over-Verdau	50	2 min	1
Aktivierung Taq-Polymerase	95	10 min	1
Denaturierung	95	15 s	40
Annealing und Elongation	60	60 s	40

Die qPCR beginnt mit dem Denaturierungsschritt. Durch Erhöhung der Temperatur wird die doppelsträngige DNS denaturiert und liegt danach in Einzelstrangform vor. Im nächsten Schritt können durch Reduktion der Temperatur der Primer und die TaqMan Sonde an die entstandenen Einzelstränge binden. Sowohl in der freien als auch in der gebundenen Form wird das Signal des Reporters der TaqMan-Sonde durch den Quencher unterdrückt. Durch die räumliche Nähe des Reportes zum Quencher kommt es zum sogenannten Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET). Dabei bildet der Reporter den Donor und der Quencher den Akzeptor des Energietransfers. Die vom angeregten Donor emittierte Energie wird ohne Verlust von Strahlung auf den Akzeptor übertragen und nicht als Fluoreszenz abgegeben. Kommt nun die TaqPolymerase zum Einsatz, synthetisiert diese aus den freien Nukleotiden den komplementären DNS-Strang. Beim Auftreffen der Polymerase auf die TaqMan-Sonde, wird die Sonde durch die endogene 5'-Nukleaseaktivität der TaqPolymerase aufgelöst. Dadurch verliert der Reporter die Nähe zum Quencher und kann sein fluoreszierendes Signal abgeben. (113, 114) Die gemessene Fluoreszenz korreliert dann mit der Anzahl der synthetisierten DNS-Stränge. Zur Auswertung der Fluoreszenzmessungen muss ein Schwellenwert (*Threshold*) festgelegt werden. Dieser beschreibt einen gemessenen Fluoreszenzwert, der in der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion erreicht wird. Er sollte niedrig gewählt werden, um die Phase der PCR abzubilden, in der weder fehlende Substrate die Reaktion limitieren noch synthetisierte Produkte bereits wieder degradiert sind. Für die Auswertung wird dann die Zykluszahl gewählt, bei der die Fluoreszenz des Ansatzes den Schwellenwert erreicht. Man bezeichnet diesen Wert als Ct-Wert (*Cycle of threshold*). Bei einem hohen RNS-Gehalt der Probe wird dieser Schwellenwert schon nach wenigen Reaktionszyklen erreicht und ist somit niedriger. (115) Die Ergebnisse der Doppelbestimmungen wurden gemittelt und auf das Housekeeping-Gen normalisiert. Housekeeping-Gene sind konstitutiv exprimierte Gene, deren

Material und Methoden

Expression möglichst unabhängig von äußeren Einflüssen ist und die zum Grunderhalt der Zelle notwendig sind (116). In dieser Arbeit wurde Beta-2-Mikroglobulin (B2M) verwendet. Es zeigte sich in Vorarbeiten vor allem unter dynamischen Flussbedingungen als stabil exprimiert (74)

2.2.5 Statistik

Die Daten der Flussversuche wurden aus dem Chemotaxis und Migration Tool in Excel übertragen. Die statistische Auswertung wurde mit SAS 14.1 (SAS Institute, SAS Institute, Cary, Vereinigte Staaten) durchgeführt. In einer One-way ANOVA wurden die 20 Zellen pro Versuch genested und Flussrate als unabhängige Variable untersucht. Die Gruppenvergleiche wurden mit dem Tukey Post-hoc-Test adjustiert und auf multiples Testen korrigiert.

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Daten, die in Zusammenarbeit mit Dr. rer. med. Florian Lorenz erhoben wurden, sind in den Abbildungen in grau dargestellt.

Für die Genexpressionsanalysen wurden die Ct-Werte der Doppelbestimmungen in Excel übertragen, gemittelt und auf das Housekeeping-Gen normalisiert. Über die Berechnung des $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werts und dem einhergehenden Fold Change erfolgte die statistische Auswertung mittels T-Test und ANOVA mit SAS 14.1.

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Flussversuche und der zugehörigen Genexpressionsanalysen dargestellt. Zunächst wurden in unserer Arbeitsgruppe die Daten für die flussinduzierte statinvermittelte Migration von HUVEC erhoben (grau dargestellt). Im Anschluss komplettierten wir die Untersuchungen und ergänzten ein zweites Zellmodell (HCAEC) und den APLNR als weiteren Einflussfaktor.

3.1 Einfluss des APLNR-Rezeptors auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen

3.1.1 Einfluss des APLNR-Rezeptors auf das Migrationsverhalten von HUVEC

Mithilfe der Flussversuche wurde das Migrationsverhalten von HUVEC unter Flussbedingungen getestet. Hierbei wurden zwei verschiedene Schubspannungen ($1,5 \text{ dyne/cm}^2$ und 10 dyne/cm^2) über einen Zeitraum von 15 Stunden angelegt und anschließend gegenübergestellt. Hierbei entsprechen $1,5 \text{ dyne/cm}^2$ einer physiologischen Schubspannung in venösen Gefäßbetten, während 10 dyne/cm^2 eine unphysiologisch hohe Schubspannung für die HUVEC darstellt. (76)

In der **Abbildung 10** wird die von den Zellen zurückgelegte Strecke über einen Zeitraum von 15 Stunden dargestellt. Bei einer Schubspannung von $1,5 \text{ dyne/cm}^2$ legten unbehandelte HUVEC eine Gesamtstrecke von $250,75 \pm 60,51 \mu\text{m}$ zurück. Die Zugabe von ML221 führte unter gleichen Flussbedingungen zu einer größeren akkumulierten Distanz ($295,42 \pm 77,98 \mu\text{m}$; $p < 0,001$; **Abbildung 10A**). Gleiches zeigte sich hinsichtlich der Geschwindigkeit ($0,28 \pm 0,06 \mu\text{m/min}$ vs. $0,33 \pm 0,08 \mu\text{m/min}$; $p < 0,05$; **Abbildung 10B**) und der euklidischen Distanz ($124,43 \pm 59,75 \mu\text{m}$ vs. $162,97 \pm 58,0 \mu\text{m}$; $p < 0,001$; **Abbildung 10C**) der Endothelzellbewegung. Auch die Direktionalität als Quotient aus euklidischer und akkumulierter Distanz wird durch die Behandlung mit ML221 von $0,48 \pm 0,17$ auf $0,55 \pm 0,12$ erhöht ($p < 0,05$; **Abbildung 10D**).

Nach Applikation von $1,5 \text{ dyne/cm}^2$ für 15 Stunden migrierten HUVEC, die mit dem APLNR-Antagonisten ML221 behandelt wurden also schneller und gerichteter als unbehandelte HUVEC.

Ergebnisse

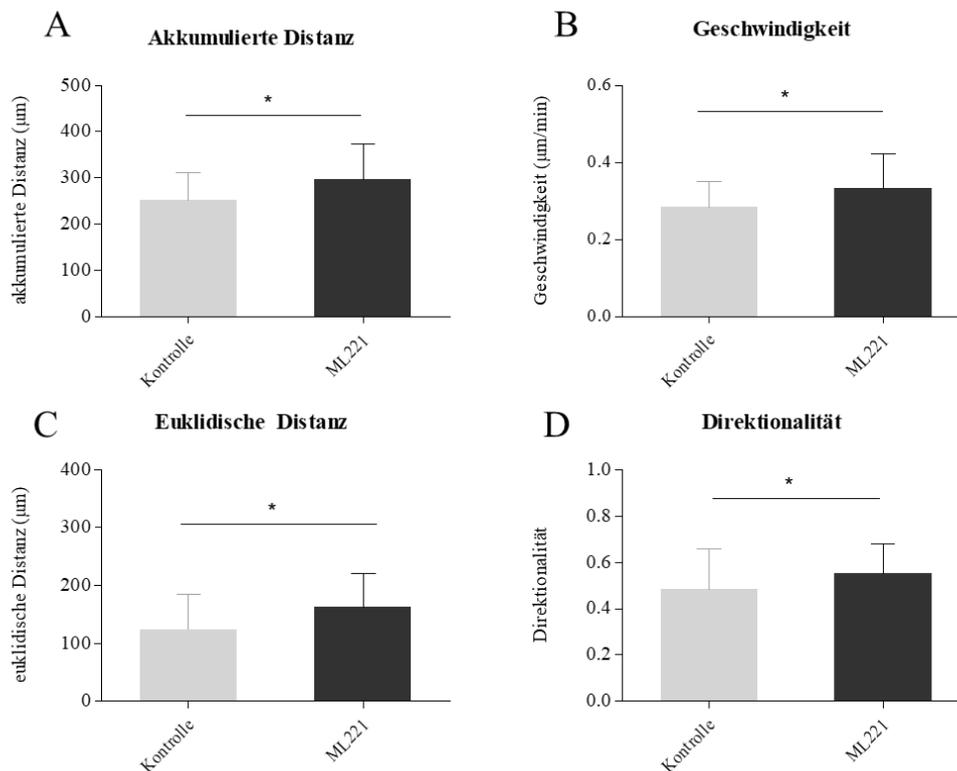


Abbildung 10 - Einfluss der APLNR-Inhibition auf die endotheliale Migration von HUVEC (1,5 dyne/cm²). HUVEC wurden 15 h mit einer Schubspannung von 1,5 dyne/cm² behandelt. Die Inhibition des APLNR mittels ML221 führte zu einer Erhöhung der Akkumulierten Distanz (A) und der Geschwindigkeit (B). Auch die Euklidische Distanz (C) und die Direktionalität (D) der Migration wurden durch ML221 erhöht. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD aus jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n = 5). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05). voneinander unabhängigen Versuchen (n = 5). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

Bei Erhöhung der Schubspannung auf 10 dyne/cm² zeigten sich die Migrationseigenschaften der HUVEC verändert (**Abbildung 11**). Die zurückgelegte Gesamtdistanz unbehandelter HUVEC über 15 Stunden lag bei $344,82 \pm 99,05 \mu\text{m}$, also $94,07 \mu\text{m}$ mehr als bei $1,5 \text{ dyne/cm}^2$ (**Abbildung 11A**). Durch Blockierung des APLNR verringerte sich diese Strecke auf $269,67 \pm 71,09 \mu\text{m}$ (p < 0,001). Die Wanderungsgeschwindigkeit sank um 0,085 auf $0,3 \pm 0,08 \mu\text{m/min}$ (p < 0,001; **Abbildung 11B**). Auch die euklidische Distanz reduzierte sich ($229,15 \pm 89,72 \mu\text{m}$ vs. $173,27 \pm 63,91 \mu\text{m}$, p < 0,001; **Abbildung 11C**). Nur in der Direktionalität der HUVEC zeigte sich kein Unterschied zwischen unbehandelten und behandelten Zellen. In der Kontrolle lag die Direktionalität bei $0,65 \pm 0,12$ bei ML221-behandelten Zellen bei $0,63 \pm 0,12$ (p = 1,00; **Abbildung 11D**).

Ergebnisse

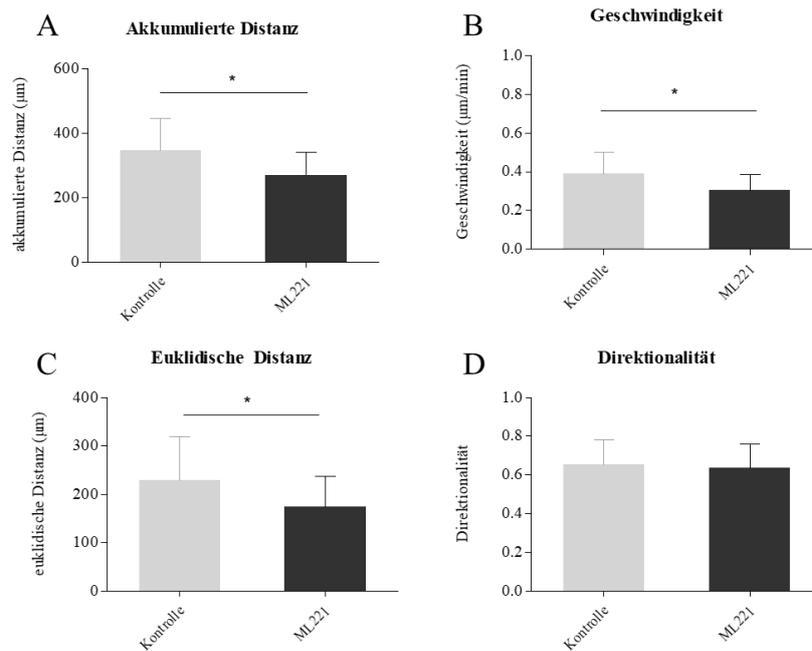


Abbildung 11 - Einfluss der APLNR-Inhibition auf die endotheliale Migration von HUVEC (10 dyne/cm²). HUVEC wurden 15 h mit einer Schubspannung von 10 dyne/cm² behandelt. Die Inhibition des APLNR mittels ML221 führte zu einer Verminderung der Akkumulierten Distanz (A), der Geschwindigkeit (B) und der Euklidischen Distanz (C). ML221 hatte keinen Einfluss auf die Direktionalität (D). Abgebildet sind die Mittelwerte und SD aus jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n = 5). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

Unter Flussbedingungen von 10 dyne/cm² migrierten HUVEC, die mit dem APLNR-Antagonisten behandelt wurden, also langsamer und somit weniger weit. Die Blockierung des APLNR beeinflusste jedoch nicht, wie gerichtet die Zellen wanderten.

Zur Etablierung der Genexpressionsanalysen wurden die Migrationsversuche für HUVEC unter Flussbedingungen von 10 dyne/cm² verwendet. Die Ergebnisse sind im Anhang zu finden (siehe Anhang, **Abbildung 37**).

Ergebnisse

3.1.2 Einfluss des APLNR-Rezeptors auf das Migrationsverhalten von HCAEC

Auch in HCAEC wurde der Einfluss des APLNR auf die Migration getestet. Hierbei wurde eine Schubspannung von 10 dyne/cm^2 eingestellt, was im Bereich der physiologischen Schubspannung in menschlichen Arterien liegt (91). Wie in **Abbildung 12** dargestellt, wanderten HCAEC bei einer Schubspannung von 10 dyne/cm^2 $360,53 \pm 123,82 \mu\text{m}$ weit. Mit ML221 behandelte HCAEC legten eine Gesamtstrecke von $384,19 \pm 100,43 \mu\text{m}$ zurück (**Abbildung 12A**). Hier zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Migration durch Inhibierung des APLNR ($p = 0,112$). Gleiches gilt für die Geschwindigkeit der Zellbewegung ($0,4 \pm 0,13 \mu\text{m/min}$ vs. $0,43 \pm 0,11 \mu\text{m/min}$; $p = 0,114$); **Abbildung 12B**). Auch die euklidische Distanz (**Abbildung 12C**) und Direktionalität wurden durch die Behandlung mit ML221 nicht beeinflusst (**Abbildung 12D**).

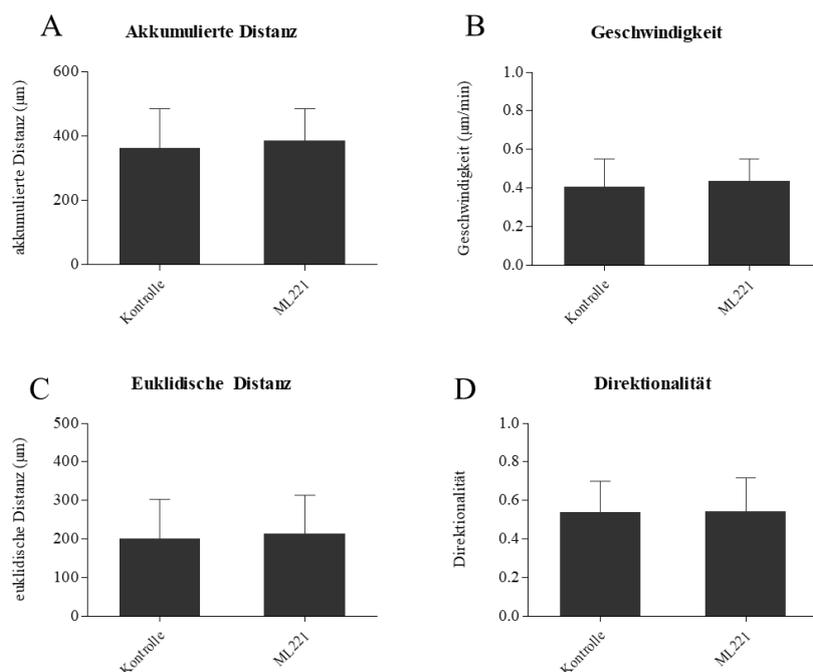


Abbildung 12 - Einfluss der APLNR-Inhibition auf die endotheliale Migration von HCAEC (10 dyne/cm^2), Spender 1. HCAEC wurden 15 h mit einer Schubspannung von 10 dyne/cm^2 behandelt. Die Inhibition des APLNR mittels ML221 führte zu keiner Veränderung der Akkumulierten Distanz (A), der Geschwindigkeit (B), der Euklidischen Distanz (C) und der Direktionalität (D). Abgebildet sind die Mittelwerte und SD aus jeweils voneinander unabhängigen Versuchen ($n = 5$). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$).

HCAEC eines zweiten Spenders zeigten ähnliche Effekte (**Abbildung 13**). Auch hier lassen sich keine Unterschiede in der Migration durch die Behandlung mit ML221 feststellen. Die APLNR-Inhibition hatte keinen Einfluss auf die akkumulierte Distanz ($360,53 \pm 123,82 \mu\text{m}$ vs. $384,19 \pm 100,43 \mu\text{m}$ (**Abbildung 13A**)) und die Geschwindigkeit ($0,40 \pm 0,13 \mu\text{m/min}$ vs. $0,43$

Ergebnisse

$\pm 0,11 \mu\text{m}/\text{min}$ (**Abbildung 13B**). Auch die euklidische Distanz ($199,947 \pm 103,2 \mu\text{m}$ vs. $212,76 \pm 100, \mu\text{m}$ (**Abbildung 13C**)) und Direktionalität ($0,53 \pm 0,16$ vs. $0,54 \pm 0,17$ (**Abbildung 13D**)) blieben in den behandelten Zellen unverändert.

Ergebnisse

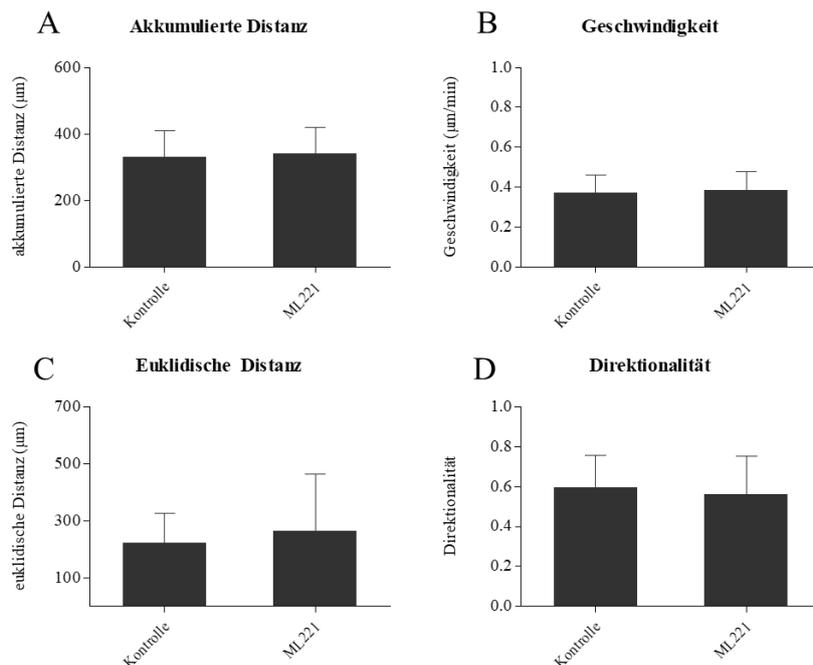


Abbildung 13 - Einfluss der APLNR-Inhibition auf die endotheliale Migration von HCAEC (10 dyne/cm²), Spender 2. HCAEC wurden 15 h mit einer Schubspannung von 10 dyne/cm² behandelt. Die Inhibition des APLNR mittels ML221 führte zu keiner Veränderung der Akkumulierten Distanz (A), der Geschwindigkeit (B), der Euklidischen Distanz (C) und der Direktionalität (D). Abgebildet sind die Mittelwerte und SD aus jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n = 5). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

In der Genexpressionanalyse wurden die Gene eNOS, VCAM-1 und Rac1 untersucht. Dabei wurde der Einfluss des APLNR auf die Genexpression der arteriellen Endothelzellen untersucht. Hier zeigte sich keine signifikante Veränderung der eNOS-Expression in HCAEC, deren APLNR durch ML221 inhibiert wurde. Während zum Beispiel unbehandelte Zellen eine VCAM-1-Expression mit einem Fold Change von 1,08 im Vergleich zum Housekeeping-Gen B2M aufwiesen, lag dieser Wert durch Behandlung mit ML221 bei 0,88 (p > 0,15, siehe **Abbildung 14A**).

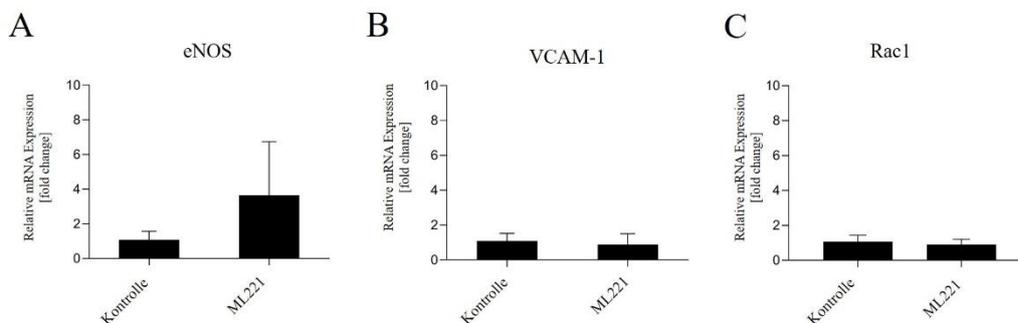


Abbildung 14 - Genexpression von eNOS und VCAM-1 in HCAEC (10 dyne/cm²). HCAEC wurden 15 h einer Schubspannung von 10 dyne/cm² ausgesetzt. Nach dem Versuch wurden die abgelösten Zellen mittels qPCR untersucht. Dabei zeigte sich keine Veränderung der Expression von eNOS, VCAM-1 oder Rac1 bei Blockierung des APLNR mittels ML221. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD von auf das Housekeeping-Gen B2M normalisierten, jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n ≥ 3). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

3.1.3 Zusammenfassung

Die Inhibition des APLNR zeigte unterschiedliche Wirkung auf die Migration von HUVEC und HCAEC. In HUVEC, die einer Schubspannung von $1,5 \text{ dyne/cm}^2$ ausgesetzt waren, bewirkte die APLNR-Blockierung eine Verminderung der Migrationsparameter. Bei 10 dyne/cm^2 führt die APLNR-Inhibierung hingegen zu einer Erhöhung der Migrationsparameter. Eine veränderte Expression von relevanten Genen konnte hier nicht nachgewiesen werden. In HCAEC zeigte die Blockierung mittels ML221 wiederum keinen Effekt auf die Migration oder Genexpression.

3.2 Einfluss von Statinen auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen

3.2.1 Einfluss von Statinen auf das Migrationsverhalten von HCAEC

Nach Untersuchung der Effekte von Statinen auf die Migration von HUVEC (74) ergänzten wir hier den Einfluss von Statinen auf die flussinduzierte Migration von HCAEC. Die Statine Atorva- und Pravastatin wurden in den Konzentrationen $0,1 \mu\text{M}$ und $1,0 \mu\text{M}$ getestet.

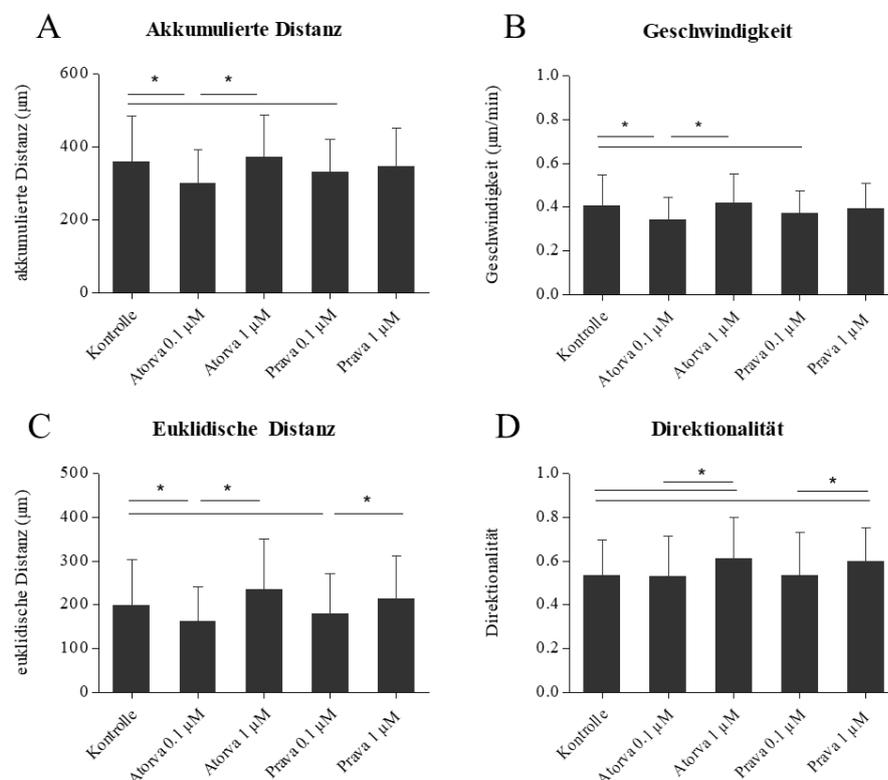


Abbildung 15 - Einfluss der Statine auf die endotheliale Migration von HCAEC (10 dyne/cm^2). HCAEC wurden 15 h mit einer Schubspannung von 10 dyne/cm^2 behandelt. Die Behandlung mit Atorvastatin $0,1 \mu\text{M}$ und Pravastatin $0,1 \mu\text{M}$ führte zu einer Verringerung der Akkumulierten Distanz (A) und Geschwindigkeit (B). Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Einfluss von Atorvastatin auf die Migration. Bei der Euklidischen Distanz (C) und der Direktionalität (D) ist zusätzlich ein konzentrationsabhängiger Effekt in mit Pravastatin behandelten Zellen zu sehen. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD aus jeweils voneinander unabhängigen Versuchen ($n = 5$). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Ergebnisse

In **Abbildung 15A** ist die Gesamtdistanz der Endothelzellmigration unter 10 dyne/cm^2 dargestellt. Hier konnte ein signifikanter Effekt für die Interaktion von Statinen und deren Konzentration gezeigt werden. Sowohl bei Atorva-, als auch bei Pravastatin bewirkte eine Erhöhung der Konzentration einen Anstieg der Migrationsparameter.

Die Behandlung mit Atorvastatin $0,1 \text{ }\mu\text{M}$ führte zu einer Verringerung der Migrationsstrecke ($301,88 \pm 89,33 \text{ }\mu\text{m}$) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($360,53 \pm 123,82 \text{ }\mu\text{m}$, $p < 0,001$; **Abbildung 15A**). Bei der Behandlung mit Atorvastatin in seiner höheren Konzentration wanderten die HCAEC mit $372,88 \pm 115,65 \text{ }\mu\text{m}$ so weit wie unter Kontrollbedingungen ($p = 0,407$; **Abbildung 15A**). Auch bei der Behandlung mit Pravastatin in niedriger Konzentration verringerte sich die zurückgelegte Distanz der Endothelzellen im Vergleich zur Kontrolle um $29,93 \text{ }\mu\text{m}$ auf $330,58 \pm 90,85 \text{ }\mu\text{m}$ ($p < 0,05$, **Abbildung 15A**). Die Behandlung mit Pravastatin in der Konzentration $1,0 \text{ }\mu\text{M}$ konnte hier jedoch nicht zu einer signifikanten Anhebung der Migration führen. Dies zeigte sich auch in der Geschwindigkeit (**Abbildung 15B**) und der euklidischen Distanz (**Abbildung 15C**). Beim zweiten Spender wurden die gleichen Versuche durchgeführt (siehe Anhang, **Abbildung**)

Anders verhielt es sich bei der Direktionalität der Migration (**Abbildung 15D**). Sowohl Atorvastatin $1,0 \text{ }\mu\text{M}$ ($0,611 \pm 0,18$), als auch Pravastatin $1,0 \text{ }\mu\text{M}$ ($0,601 \pm 0,15$) erhöhten die Direktionalität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($0,536 \pm 0,16$, jeweils $p < 0,05$). Bei den Zellen, die mit den Statinen in niedrigeren Konzentrationen behandelt wurden, blieb die Direktionalität ihrer Wanderung auf Kontrollniveau. Bei dem zweiten Spender schien allerdings der Einfluss der Statine auf die Direktionalität der HCAEC-Wanderung größer zu sein (siehe Anhang, **Abbildung 35-36**).

In den Genexpressionsanalysen ergab sich, dass bei den HCAEC, die mit $1 \text{ }\mu\text{M}$ Pravastatin behandelt wurden die Expression von VCAM-1 signifikant reduziert werden konnte ($1,08$ vs. $0,53$; $p = 0,04$). Weitere signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Statin-Behandlungen ergaben sich nicht (**Abbildung 16**).

Ergebnisse

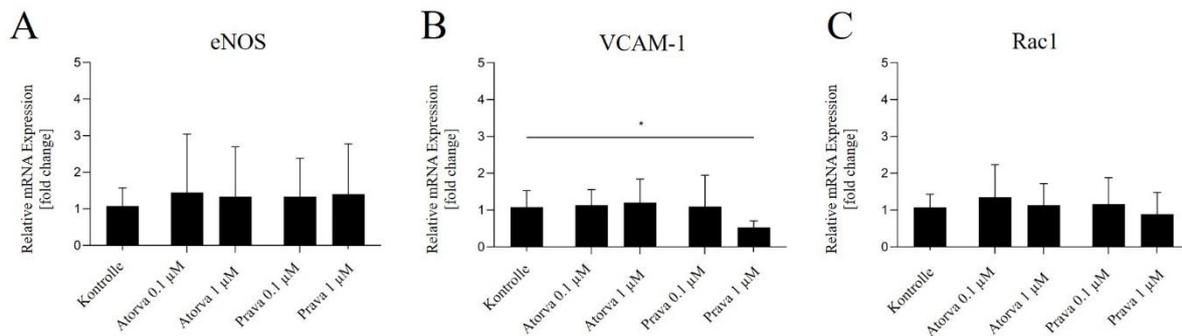


Abbildung 16 – Genexpression von eNOS, VCAM-1 und Rac1 in HCAEC (10 dyne/cm²). HCAEC wurden 15 h einer Schubspannung von 10 dyne/cm² ausgesetzt. Nach dem Versuch wurden die abgelösten Zellen mittels qPCR untersucht. Dabei zeigte sich keine Veränderung der eNOS-Expression (A) oder der Rac1-Expression (C) durch Zugabe der Statine in niedrigen und in hohen Konzentrationen. Einzig die VCAM-1-Expression konnte unter Zugabe von Pravastatin 1µM signifikant verändert werden. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD von auf das Housekeeping-Gen B2M normalisierten, jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n ≥ 3). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

3.2.2 Zusammenfassung

Die Behandlung von HCAEC mit Pravastatin und Atorvastatin 0,1,0 µM führte zu einer Verringerung der Distanz und Geschwindigkeit der Zellwanderung. In höheren Dosen (1,0 µM) wurde dieser Effekt nicht mehr gesehen. Bezüglich der Direktionalität der HCAEC-Migration zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung durch die Statinbehandlung. In der Genexpression relevanter Gene konnte festgestellt werden, dass unter Behandlung der HCAEC mit 1 µM Pravastatin die Expression von VCAM-1 signifikant reduziert werden konnte. Weitere Einflüsse auf die Genexpression von eNOS, VCAM-1 oder Rac1 konnten unter Behandlung mit Statinen in den verschiedenen Konzentrationen nicht gemessen werden.

3.3 Einfluss des APLNR auf die flussinduzierte Migration von mit Statinen behandelten Endothelzellen

3.3.1 Einfluss des APLNR und der Statine auf das Migrationsverhalten von HUVEC

Um einen möglicherweise bestehenden Zusammenhang zwischen dem APLNR und der Wirkweise von Statinen nachzuweisen, wurden alle Statinbehandlungen noch mit der Zugabe des APLNR-Inhibitors ML221 kombiniert. HUVEC wurden dann 15 h einer Schubspannung von 1,5 dyne/cm² oder 10 dyne/cm² ausgesetzt. Der unter **3.1.1** beschriebene Effekt, bei dem die Behandlung der HUVEC mit ML221 unter 1,5 dyne/cm² zu einer Verstärkung der Migration führt, konnte auch in mit Atorvastatin behandelten Zellen festgestellt werden. **Abbildung 17A** zeigt, dass die Gesamtwanderungstrecke auch in diesen Zellen durch ML221 länger wird. So wanderten zum Beispiel HUVEC, die mit Atorvastatin 0,1 µM behandelt wurden $242,336 \pm 56,8$ µm. Wurde jedoch zusätzlich noch ML221 hinzugegeben, verlängerte sich die zurückgelegte Distanz auf $289,64 \pm 84,63$ µm ($p < 0,05$). Diese Veränderung spiegelt sich nur teilweise in der euklidischen Distanz und Direktionalität der Endothelwanderung wider (**Abbildung 17C/D**). Hier führt die Blockierung des APLNR nur in der Kontrolle und in mit Atorvastatin 1,0 µM behandelten HUVEC zu einer gesteigerten Migration.

Ergebnisse

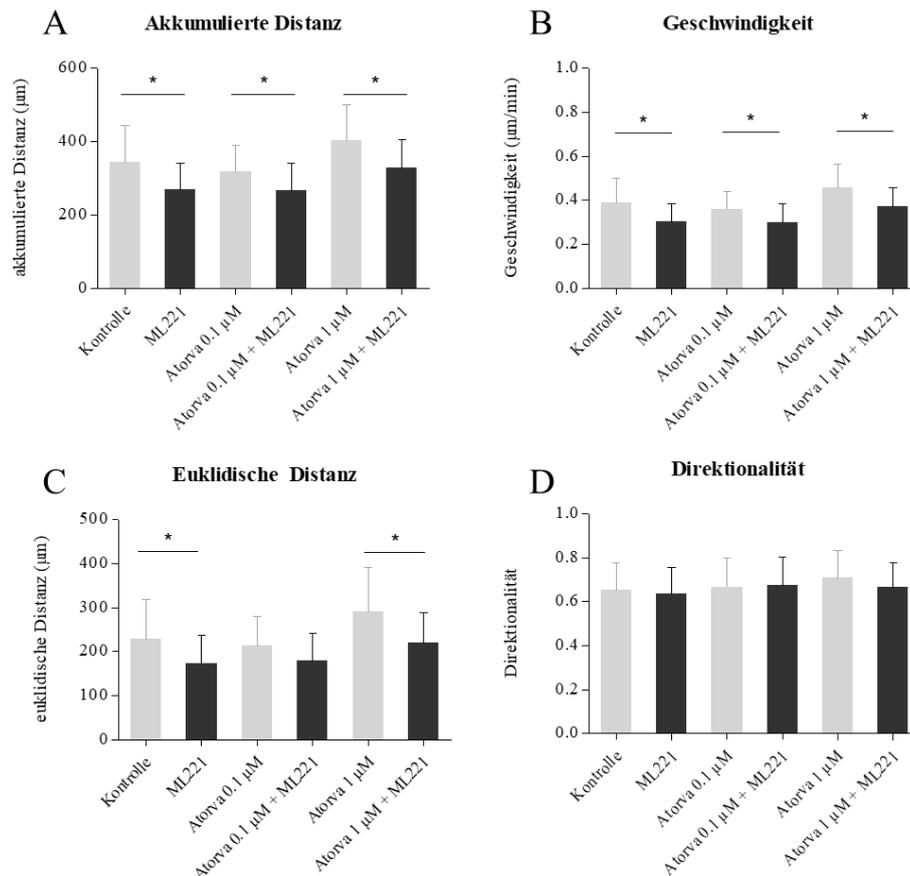


Abbildung 17 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Atorvastatin behandelten HUVEC ($1,5 \text{ dyne}/\text{cm}^2$). HUVEC wurden 15 h mit einer Schubspannung von $1,5 \text{ dyne}/\text{cm}^2$ behandelt. Die Behandlung mit ML221 führt zu einer Steigerung der akkumulierten Distanz (A) und Geschwindigkeit (B) in mit Atorvastatin behandelten Zellen. Bei der euklidischen Distanz (C) und der Direktionalität (D) konnte dieser Effekt nur in Zellen gesehen werden, die mit Atorvastatin $1 \mu\text{M}$ behandelt wurden. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD aus jeweils voneinander unabhängigen Versuchen ($n = 5$). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Bei HUVEC, die mit $10 \text{ dyne}/\text{cm}^2$ behandelt wurden, zeigte sich in der Kontrolle eine Verringerung der Migrationsparameter durch APLNR-Inhibierung. Auch hier konnte der gleiche Effekt in mit Atorvastatin behandelten Zellen gesehen werden. Die Zugabe von ML221 senkte die akkumulierte Distanz und Geschwindigkeit in Zellen, die mit Atorvastatin $0,1 \mu\text{M}$ und $1,0 \mu\text{M}$ behandelt wurden (siehe **Abbildung 18A/B**). Einzig die Direktionalität der HCAEC blieb sowohl von der Behandlung mit APLNR, also auch der Kombination aus Statin und APLNR unbeeinflusst. Auffällig ist, dass Atorvastatin $1,0 \mu\text{M}$ die Migration der HUVEC bei $10 \text{ dyne}/\text{cm}^2$ erhöht und dieser Effekt bei Zugabe des APLNR-Inhibitors aufgehoben wird.

Ergebnisse

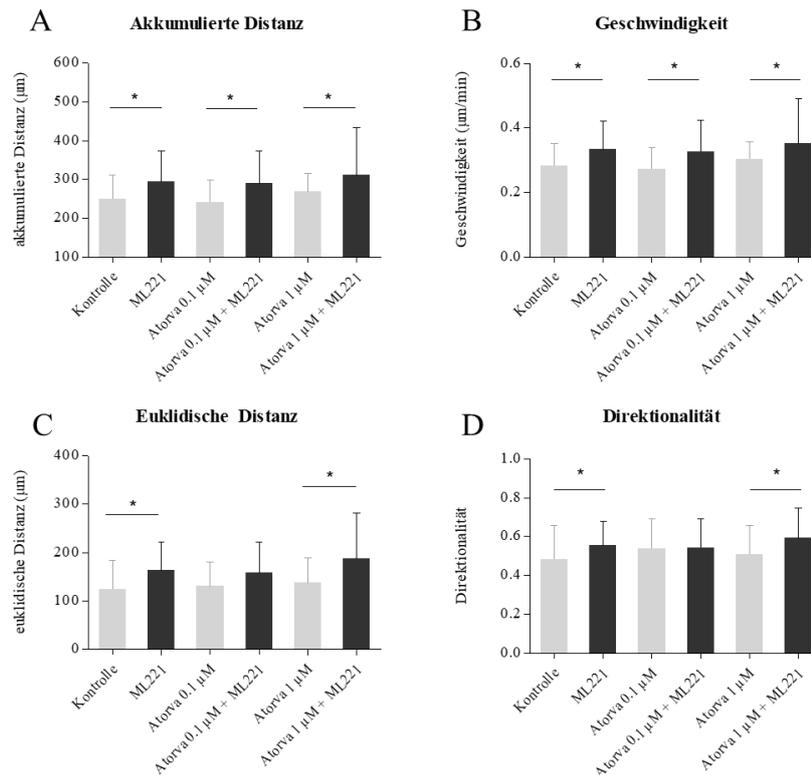


Abbildung 18 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Atorvastatin behandelten HUVEC (10 dyne/cm²). HUVEC wurden 15 h mit einer Schubspannung von 10 dyne/cm² behandelt. Die Behandlung mit ML221 führt zu einer Reduktion der akkumulierten Distanz (A) und Geschwindigkeit (B) in mit Atorvastatin behandelten Zellen. Bei der euklidischen Distanz (C) und der Direktionalität (D) konnte dieser Effekt nur in Zellen gesehen werden, die mit Atorvastatin 1µM behandelt wurden. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD aus jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n = 5). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

In HUVEC, die mit Pravastatin behandelt wurden wurde der Einfluss des APLNR auf die Migration hingegen aufgehoben. Die in der Kontrolle beobachtete Steigerung der Migrationsparameter durch Behandlung mit ML221 (**3.1.1**), konnte in mit Pravastatin behandelten Zellen nicht gesehen werden. HUVEC, die mit Pravastatin 0,1 µM behandelt wurden, wanderten $259,40 \mu\text{m} \pm 44,79 \mu\text{m}$. Wurde zusätzlich mittels ML221 der APLNR inhibiert, legten die Zellen eine Gesamtdistanz von $298,14 \pm 81,25 \mu\text{m}$ zurück (p = 0,56; **Abbildung 19A**). Das gleiche zeigte sich für die höhere Statinkonzentration. Auch in der Geschwindigkeit, euklidischen Distanz und Direktionalität bewirkte der ML221 keine Änderung der Migration in HUVEC, die mit Pravastatin inkubiert wurden (**Abbildung 19B-D**).

Ergebnisse

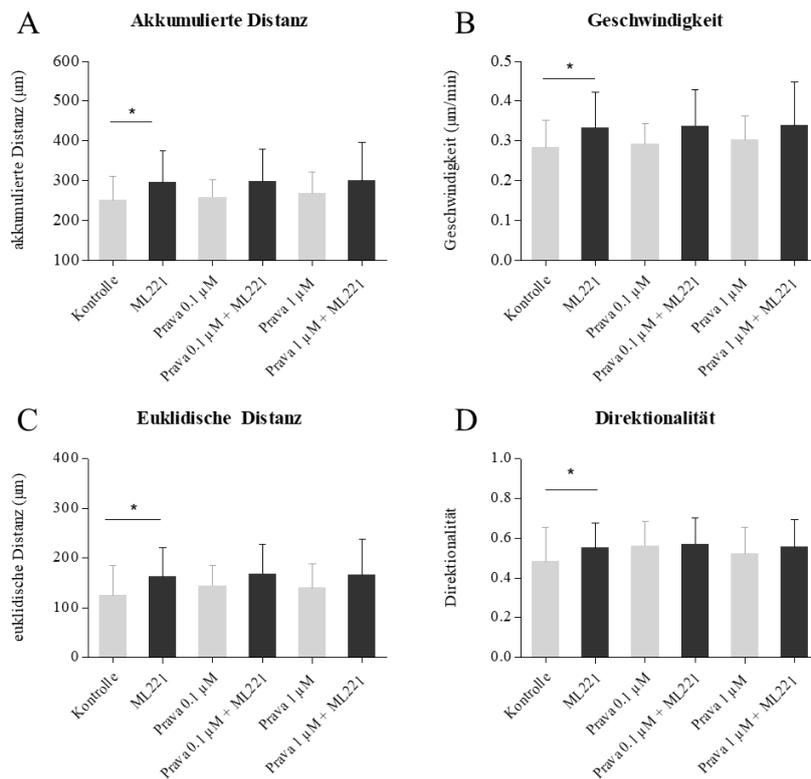


Abbildung 19 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Pravastatin behandelten HUVEC (1,5 dyne/cm²). HUVEC wurden 15 h mit einer Schubspannung von 1,5 dyne/cm² behandelt. Die Behandlung mit ML221 führt zu keiner Veränderung der akkumulierten Distanz (A) und Geschwindigkeit (B) in mit Pravastatin behandelten Zellen. Bei der euklidischen Distanz (C) und der Direktionalität (D) zeigte sich der gleiche Effekt. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD aus jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n = 5). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

Bei Durchführung der Versuche unter 10 dyne/cm² zeigte sich ein ähnliches Bild. Der unter 3.1.1 beschriebene Effekt von ML221 auf die Migration von HUVEC konnte nur bei einer Inkubation der Zellen mit Atorvastatin, aber nicht Pravastatin gezeigt werden. Bei Behandlung mit Atorvastatin reduzierten sich die akkumulierte Distanz und die Geschwindigkeit durch die Zugabe von ML221. Die Behandlung der HUVEC mit ML221 und Pravastatin induzierte keine Veränderung der akkumulierten Distanz, Geschwindigkeit, euklidischen Distanz oder Direktionalität im Vergleich zur Behandlung mit Pravastatin allein (siehe *Abbildung 20*).

Ergebnisse

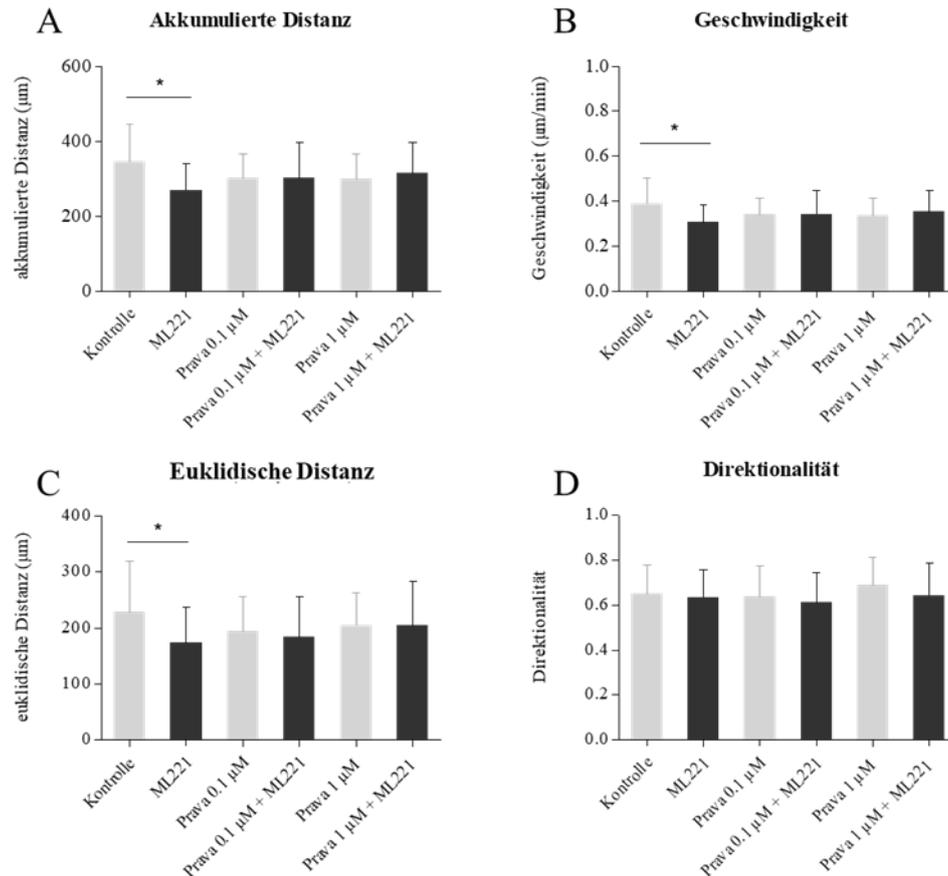


Abbildung 20 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Pravastatin behandelten HUVEC (10 dyne/cm²). HUVEC wurden 15 h mit einer Schubspannung von 10 dyne/cm² behandelt. Die Behandlung mit ML221 führt zu keiner Veränderung der akkumulierten Distanz (A) und Geschwindigkeit (B) in mit Pravastatin behandelten Zellen. Bei der euklidischen Distanz (C) und der Direktionalität (D) zeigte sich der gleiche Effekt. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD aus jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n = 5). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

Die Ergebnisse der Genexpression der HUVEC sind im Anhang (**Abbildung 37**) dargestellt. Hier zeigt sich kein Effekt der APLNR-Inhibition in mit Statinen behandelten Zellen.

Ergebnisse

3.3.2 Einfluss des APLNR und der Statine auf das Migrationsverhalten von HCAEC

Bei HCAEC zeigte sich in der Kontrolle kein Effekt des APLNR-Inhibitors auf die Migration. Dies gilt auch für Zellen, die den Statinen ausgesetzt waren.

Zellen, die mit Atorvastatin 0,1 μM behandelt wurden, wanderten $301,88 \pm 89,33 \mu\text{m}$. Wurde zusätzlich ML221 ins Flussmedium gegeben, ergab sich eine akkumulierte Distanz von $298,21 \pm 78,18 \mu\text{m}$ (**Abbildung 21A**).

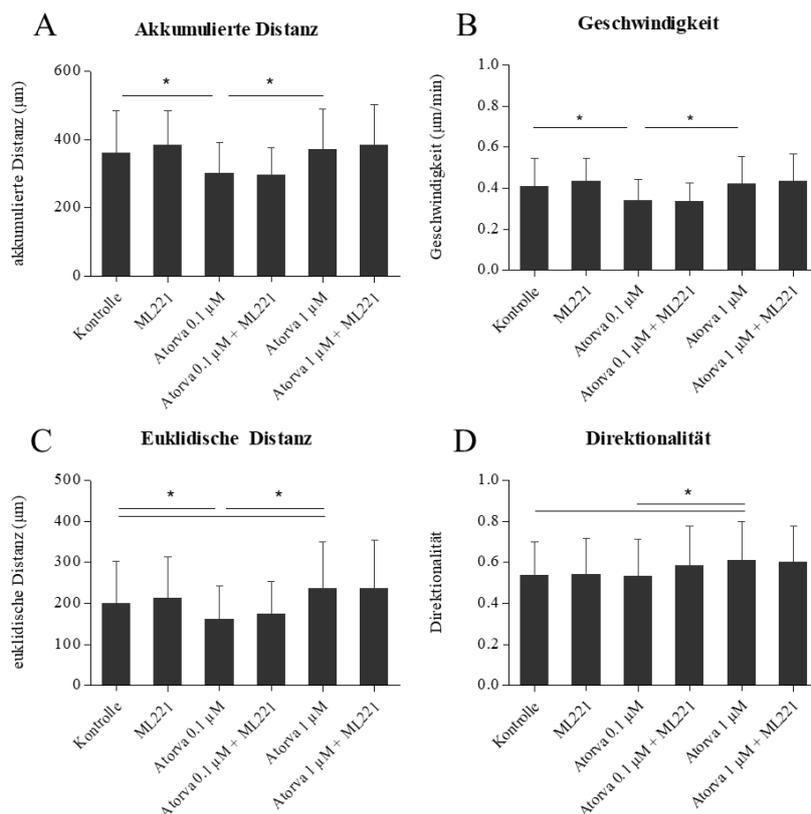


Abbildung 21 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Atorvastatin behandelten HCAEC (10 dyne/cm²). HCAEC wurden 15 h mit einer Schubspannung von 10 dyne/cm² behandelt. Die Behandlung mit ML221 führt zu keiner Veränderung der akkumulierten Distanz (A) und Geschwindigkeit (B) in mit Atorvastatin behandelten Zellen. Bei der euklidischen Distanz (C) und der Direktionalität (D) zeigte sich der gleiche Effekt. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD aus jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n = 5). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

Bei HCAEC die mit Pravastatin und solchen, die mit Atorvastatin behandelt wurden, konnte nur in einer Gruppe ein signifikanter Effekt festgestellt werden. Wie in **Abbildung 22** dargestellt, führte die Blockierung des APLNR in mit Pravastatin behandelten Zellen zu einer Steigerung der akkumulierten Distanz und Geschwindigkeit in der supraphysiologischen Statinkonzentration. bei Veränderung der Migrationsparameter.

Ergebnisse

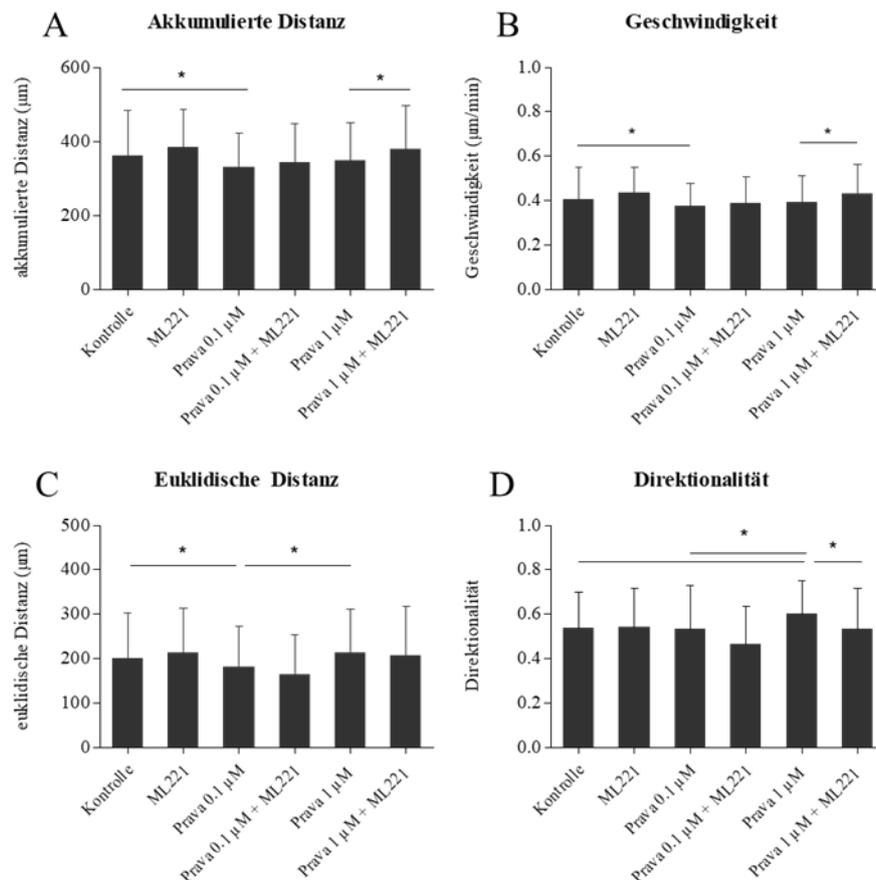


Abbildung 22 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Pravastatin behandelten HCAEC (10 dyne/cm²). HCAEC wurden 15 h mit einer Schubspannung von 10 dyne/cm² behandelt. Die Behandlung mit ML221 führt zu einer Veränderung der akkumulierten Distanz (A) und Geschwindigkeit (B) in mit Pravastatin (1µM) behandelten Zellen. In den weiteren Dosierungen, sowie in der euklidischen Distanz (C) und der Direktionalität (D) zeigte sich keine sign. Effekt. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD aus jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n = 5). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

Der fehlende Einfluss der APLNR-Inhibition auf die Migration von HCAEC zeigt sich auf vergleichbare Weise auch in den Zellen des zweiten Spenders (siehe Anhang Abbildung 35 – 36). Auch in der Genexpression hatte der APLNR keinen Einfluss auf die Migration von mit Statinen behandelten Zellen. Einzig in HCAEC, die mit Atorvastatin 1,0µM behandelt wurden, führte die APLNR-Inhibition zu einer gesteigerten eNOS-Expression und einer verringerten VCAM-1 Expression (**Abbildung 23 A/B**). In mit Pravastatin behandelten Zellen konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden (**Abbildung 24**).

Ergebnisse

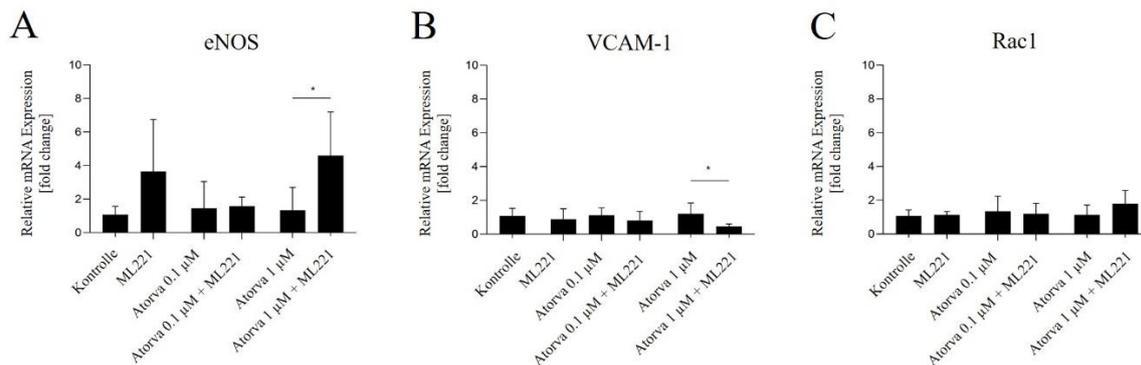


Abbildung 23 - Genexpression von eNOS, VCAM-1 und Rac1 in HCAEC (Atorvastatin, 10 dyne/cm²). HCAEC wurden 15 h einer Schubspannung von 10 dyne/cm² ausgesetzt. Nach dem Versuch wurden die abgelösten Zellen mittels qPCR untersucht. Dabei zeigte sich in Zellen, die mit Atorvastatin 1µM behandelt wurden, eine Erhöhung der eNOS-Expression bei APLNR-Inhibition (A). In dieser Gruppe wurde die Expression von VCAM-1 hingegen vermindert (B). Keine Veränderung zeigte sich bei Rac1 (C) Abgebildet sind die Mittelwerte und SD von auf das Housekeeping-Gen B2M normalisierten, jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n ≥ 3). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

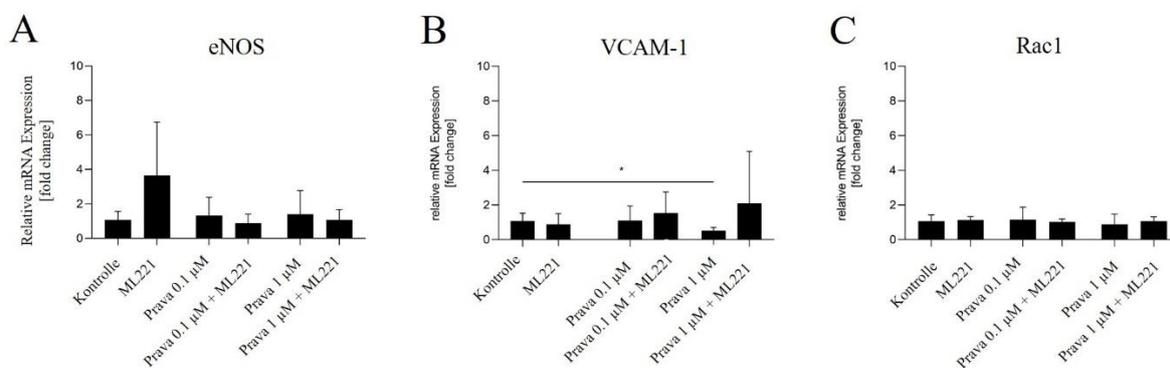


Abbildung 24 - Genexpression von eNOS, VCAM-1 und Rac1 in HCAEC (Pravastatin, 10 dyne/cm²). HCAEC wurden 15 h einer Schubspannung von 10 dyne/cm² ausgesetzt. Nach dem Versuch wurden die abgelösten Zellen mittels qPCR untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Verringerung der VCAM-1-Expression bei Behandlung mit Pravastatin 1µM im Vergleich zur Kontrolle. Daneben ergaben sich keine weitere Veränderung der Genexpression von eNOS, VCAM-1 und Rac1 durch Behandlung von Pravastatin und ML221. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD von auf das Housekeeping-Gen B2M normalisierten, jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n ≥ 3). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

3.3.3 Zusammenfassung

In diesem Abschnitt werden komplexe Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Einflussfaktoren der Endothelzellmigration dargestellt. Einige Kernaussagen lassen sich wie folgt zusammenfassen. In HUVEC zeigte die APLNR-Inhibierung den gleichen Effekt in unbehandelten Zellen, wie in mit Atorvastatin behandelten Zellen. Dies gilt für beide Schubspannungen (1,5 und 10 dyne/cm²). In Zellen, die mit Pravastatin behandelt waren, wurde dieser Effekt jedoch aufgehoben. In der Genexpressionsanalyse ließ sich wiederum kaum eine Veränderung zwischen den Gruppen erkennen. In HCAEC zeigte der APLNR-Inhibitor in unbehandelten Zellen keinen Effekt auf die Migration und dies konnte auch für mit Atorvastatin-behandelte Zellen bestätigt werden. Einzig bei Zellen die mit hohen Pravastatin-

Ergebnisse

Dosierungen behandelt wurden konnte ein inhibitorischer Effekt des APLNR dargestellt werden.

In den Genexpressionsanalysen konnte ein Einfluss der APLNR-Inhibition auf die Expression von VCAM-1 und eNOS in Zellen, die mit Atorvastatin (1 μ M) behandelt wurden, festgestellt werden.

4 Diskussion

Ein 69-jähriger Patient stellt sich mit Brustschmerz in der Notaufnahme vor. Im EKG zeigt sich ein ST-Hebungsinfarkt. Neben der medikamentösen Therapie erfolgt eine PCI mit Implantation zweier Stents. Die Nachsorge erfolgt mittels dualer Plättchenaggregationshemmung und einem Statin. Fünf Wochen später stellt sich der Patient erneut mit den gleichen Symptomen vor. Diagnose: Stentthrombose am ehesten durch verzögerte Endothelialisierung des Stents.

Im Jahre 2018 wurden im Rahmen von PCIs deutschlandweit über 300.000-mal Stents in Koronargefäße eingesetzt. (117) Bei all diesen Patienten ist leitliniengerecht neben einer Thrombozytenaggregationshemmung meist eine lebenslange Statin- Therapie indiziert. (118, 119) Statine gehören mit über 20 Millionen Verordnungen jährlich zu den meistverschriebenen Wirkstoffen in Deutschland. (120) Trotz der medikamentösen Therapie kommt es nach PCI immer wieder zur gefürchteten Komplikation der Stentthrombosen. Ein auslösender Faktor ist dabei die fehlende Endothelialisierung der Stents. Statine scheinen über ihre pleiotropen Effekt Einfluss auf die Migration von Endothelzellen zu haben und könnten ein wichtiger therapeutischer Angriffspunkt sein, um die Rate der Stentthrombosen zu verringern. Es ist bekannt, dass die pleiotropen Effekte der Statine die Migration der Endothelzellen beeinflussen und damit möglicherweise auch die Endothelialisierung der Stentoberfläche, eine wichtige Voraussetzung zur Einheilung des Implantats. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Statine unterschiedliche Effekte auf die Migration und damit auf die Endothelialisierung haben. (74)

Diese Arbeit zeigt den differentiellen Effekt von Statinen auf die Migration von Endothelzellen in zwei verschiedenen Gefäßbetten mit unterschiedlichen hämodynamischen Verhältnissen/Schubspannungen. Zur Aufklärung des Mechanismus der Statinwirkung wurde insbesondere die Rolle des APLNR betrachtet. Diesem wurde bereits zugeschrieben, die Wirkung von Statinen auf die Expression von Signalmolekülen in EC zu vermitteln. (108) Bisher ungeklärt bleibt die Frage, welchen Einfluss der APLNR auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen hat und welche Rolle er in der Vermittlung der Statinwirkung auf die Migration der EC spielt.

4.1 Welchen Einfluss hat der APLNR auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen?

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des APLNR auf die flussinduzierte endotheliale Migration von Endothelzellen untersucht. Dazu wurde der Rezeptor mittels ML221 blockiert und die Migration arterieller und venöser Endothelzellen bei physiologisch angepassten Schubspannungen von 1,5 dyne/cm² oder 10 dyne/cm² ausgewertet. Bei HUVEC, die einer physiologischen Schubspannung von 1,5 dyne/cm² ausgesetzt waren, führte die APLNR-Inhibition zu einer Erhöhung der Migration. Unter nicht physiologischen 10 dyne/cm² verringerte die Rezeptorblockierung die Migration der Endothelzellen. In arteriellen Zellen zeigte die Inhibierung des APLNR unter physiologischer Schubspannung keinen Effekt auf die Migration.

Die genaue Funktionsweise des Apelin/APLNR-Systems ist seit langem Gegenstand der wissenschaftlichen Forschung. Während die Kombination aus APLNR und seinem Liganden Apelin schon weiter erforscht ist, gibt es nur wenige Arbeiten, die die Wirkung anderer Liganden/Aktivatoren auf den APLNR untersuchen. Immer wieder taucht dabei die Hypothese auf, dass der APLNR mechanosensorische Eigenschaften besitzt, die unabhängig von seinem Liganden Apelin sind. So wurde der APLNR als Rezeptor für mechanische Dehnung in Kardiomyozyten beschrieben, der in Bezug auf die kardiale Hypertrophie eine Rolle spielt. (105) Bereits veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen eine ähnliche Funktionsweise des APLNR in Endothelzellen. Hier wurde die Expression des APLNR durch die Applikation einer Schubspannung (1,5 dyne/cm² und 20 dyne/cm²) induziert. Dabei spielte Apelin keine Rolle. Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Inhibition des APLNR die Ausrichtung des Zytoskeletts als Antwort auf Schubspannung negativ beeinflusst. (106, 107)

In der hier vorliegenden Arbeit führte eine APLNR-Blockierung in HUVEC zur Veränderung der Migration. In HUVEC, die einer physiologischen Schubspannung von 1,5 dyne/cm² ausgesetzt waren, führte die Inhibition des APLNR zu einer Steigerung der Migrationsparameter. Der APLNR scheint also die Migration zu inhibieren. In den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe führte die Applikation von Fluss zu einer Erhöhung der APLNR-Expression in HUVEC, worunter eine Induktion der Endothelzellmigration zu erwarten wäre. Diese Induktion konnte in dieser Arbeit unter nicht physiologischen Schubspannungen (10 dyne/cm²) gezeigt werden, hier vermittelt der APLNR die flussinduzierte Migration von HUVEC. Hier zeigte sich durch Blockade des APLNR eine Verringerung der akkumulierten Distanz,

Diskussion

Geschwindigkeit, euklidischen Distanz und Direktionalität der Endothelzellwanderung. Diese Ergebnisse bekräftigen den in unseren Vorarbeiten gezeigten Effekt des APLNR auf HUVEC, bei dem die Expression des APLNR durch eine Schubspannung von 10 dyne/cm^2 aktiviert wird. Unter diesen nicht physiologischen Verhältnissen scheint der APLNR auch die Endothelzellmigration zu vermitteln. Durch APLNR-Blockade wird dieser migratorische Effekt vermindert.

Auch in anderen endothelialen Zellarten konnte eine Reduktion der Migration durch Blockierung des APLNR festgestellt werden. In HUVEC, die durch Apelin als Chemoattractant zur Migration angeregt wurden, führte eine siRNS-medierte Herunterregulation des APLNR zu einer verminderten Migration. (104) Auch lymphatische Endothelzellen und endotheliale Vorgängerzellen (Angioblasten) migrieren unter APLNR-Inhibierung weniger weit. (121, 122) Die endotheliale Zellmigration in diesen drei Arbeiten lässt sich dabei am ehesten in die Kategorie Chemotaxis einordnen. Die Zellen wurden durch Apelin oder ELABELA, den zwei bekannten Liganden des APLNR, zur Migration angeregt. Die Wanderung der Endothelzellen erfolgte also unter statischen Bedingungen. In der hier vorliegenden Arbeit wird jedoch vielmehr die Mechanotaxis untersucht, in der hämodynamische Flussbedingungen die Wanderung der Endothelzelle stimulieren. In einer anderen Studie wurde der Effekt von Fluss auf die Polarisation von HUVEC untersucht, deren APLNR blockiert wurde. Bei Versuchen, die unter Flussbedingungen von 20 dyne/cm^2 durchgeführt wurden, konnten Defekte der Zellpolarisation in APLNR-blockierten Zellen gezeigt werden. Dieser Effekt war Apelin-unabhängig. (103) Die Polarisation der Endothelzelle ist wie in **1.3.2** beschrieben, ein initialer Schritt der Zellbewegung. Es lässt sich also durch die schlechtere Polarisation auch eine erschwerte Migration der APLNR-blockierten Zellen erwarten.

In venösen Stromgebieten des menschlichen Gefäßsystems herrschen Schubspannungen von einem bis sechs dyne/cm^2 . (91) Höhere Schubspannungen bilden pathologische Flussverhältnisse, wie sie beispielsweise an arteriosklerotischen Gefäßen oder Stenosen zu finden sind, ab. In der aktuellen Literatur werden Endothelzellen häufig nur unter statischen Bedingungen untersucht. Unter physiologischen Bedingungen bzw. im menschlichen Gefäßbett sind Endothelzellen jedoch dauerhaft Flussbedingungen ausgesetzt und diese haben auch nachweislich Einfluss auf die Endothelfunktion. In dieser Arbeit wurde nicht nur Fluss appliziert, sondern auch physiologische mit pathologisch hohen Schubspannungen verglichen. Im menschlichen Körper kommen unidirektionale laminare niedrige Schubspannungen vor

Diskussion

allem an der Innenseite von Gefäßkrümmungen vor. Gefäßwandläsionen entwickeln sich meist initial unter niedriger Schubspannung.

In den Ergebnissen dieser Arbeit wird deutlich, dass die Migration der Endothelzellen bei unterschiedlichen Schubspannungen auch von anderen Regulationsmechanismen beeinflusst wird. So scheint der APLNR eine migrationshemmende Wirkung zu haben, wenn geringe Schubspannungen auf die Endothelzellen wirken. Bei hohen Schubspannungen wirkt der APLNR eher migrationsfördernd. Zusammenfassend scheint der APLNR als Mechanorezeptor also vor allem in pathologischen Flussverhältnissen, die zum Beispiel durch Stenosen zustande kommen können, eine Rolle zu spielen. Im physiologischen Schubspannungsbereich scheinen möglicherweise kompensatorische Mechanismen zu greifen, die die Rolle des APLNR in der Migration verändern. Bei der methodischen Auswahl von Flussbedingungen sind neben der Höhe der Schubspannung auch andere Parameter zu beachten. Man unterscheidet zwischen laminaem und oszillatorischem Fluss. Der Blutfluss kann pulsatil oder im gleichförmigen sogenannten *steady state* auf das Endothel wirken. (123, 124) Werden diese Flusseigenschaften in ein experimentelles Modell integriert, können Erkrankungen wie die Arteriosklerose noch spezifischer abgebildet werden. Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse geben verschiedene Hinweise darauf, dass Flussbedingungen die endotheliale Funktion maßgeblich variieren können. Für die Übertragung dieser *in vitro* Ergebnisse in klinische Hypothesen müssen noch weitere Aspekte der hämodynamischen Flussbedingungen im menschlichen Körper in Experimenten betrachtet werden, wie zum Beispiel die pulsatilen Eigenschaften des Blutflusses oder die Strömungsveränderung an Stenosen. Diese Arbeit unterstreicht die These, dass der APLNR in gesunden Gefäßen anders wirkt als in kranken Gefäßen. Die Ergebnisse dieser Arbeit eröffnen daher diverse Fragestellungen für weitere experimentelle Untersuchungen.

Neben dem phänotypischen Effekt der APLNR-Inhibition auf die venösen Endothelzellen wurde außerdem die Beeinflussung der Genexpression, u.a. der eNOS, durch die APLNR-Inhibition unter nicht-physiologischen Schubspannungen von 10 dyne/cm^2 untersucht. Die eNOS unterliegt einer Reihe regulatorischer Mechanismen auf transkriptioneller und post-translationaler Ebene, kann aber auch direkt durch Agonisten (z.B. Acetylcholin) oder veränderte Flusseigenschaften des Blutes induziert werden (77) (125, 126) Das durch die eNOS produzierte NO bewirkt eine Aktivierung der Guanylatcyclase in diversen Zellen und reduziert so die Aktivierung von Thrombozyten, die Adhäsion von Leukozyten und die Kontraktilität in VSMC. In dieser Arbeit zeigte sich keine signifikante Veränderung der eNOS-Expression, wenn der APLNR blockiert war. Hier kann diskutiert werden, dass dies auf die große Streuung

Diskussion

der Werte zurückzuführen ist. In Ergebnissen von Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe führte ein siRNS-*Knockdown* des APLNR in HUVEC zu einer Reduktion von eNOS, PI3K, Akt und NO. (106) Die Expression der eNOS wird durch Schubspannung aktiviert und geht mit einer verbesserten Migration der Endothelzellen einher. (125, 127) Dies passiert vor allem durch die Aktivierung von Rac1. Rac1 vermittelt die Organisation von Aktinfilamenten und reguliert die Integrität von Zellverbindungen zwischen Endothelzellen. (128) Somit hat Rac1 Einfluss auf die Zelladhäsion und -mobilität und spielt eine essenzielle Rolle in der Migration von Endothelzellen. (129) Bei der Behandlung von bovinen aortalen Endothelzellen mit einer Schubspannung von 12 dyne/cm² konnte außerdem eine Rac1-vermittelte Ausrichtung der Endothelzellen gezeigt werden. (130) Die Inhibition der NO-medierte Aktivierung von Rac1 führte in aortalen Endothelzellen der Ratte zu einer Inhibition der Endothelzellmigration. (127) Auch der APLNR scheint diese Zellausrichtung zu beeinflussen, da anhand von siRNS-APLNR *Knockdown* die Formation von aktinbindendem Vinculin in HUVEC vermindert ist. (107)

In den hier vorliegenden Daten wurde zwar die HUVEC-Migration durch die APLNR-Inhibition bei 10 dyne/cm² gesenkt; die Expression der eNOS hingegen war nicht verändert. Ebenso wenig die Expression von VCAM-1, dem auch eine Rolle in der Endothelzellmigration zugesagt wird. VCAM-1 ist ein Glykoprotein, das auf endothelialen Zelloberflächen zu finden ist und eine wichtige Rolle im Rahmen immunologischer Prozesse spielt. Es wird durch seinen Liganden Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) aktiviert und vermittelt über Rac1 die endotheliale Adhäsion von Leukozyten und deren konsekutive transendotheliale Migration. (131–133) Neben TNF- α gibt es noch weitere Faktoren, die die VCAM-1-Expression beeinflussen. Das Apelin/APLNR-System konnte über die Regulation von NF κ B eine konzentrationsabhängige Erhöhung von VCAM-1 induzieren. (134) In einer Arbeit zum Einfluss von VCAM-1 auf die Angiogenese im Rahmen von Tumorerkrankungen wurde gezeigt, dass ein VCAM-1-*Knockdown* die Migration von HUVEC reduziert und das Zytoskelett desorganisiert. (135) Das Fehlen einer Veränderung der VCAM-1 und eNOS-Expression in dieser Arbeit könnte dadurch erklärt werden, dass die Zellen hier lange Zeit (15 h) unter Flussbedingungen standen. Es lässt vermuten, dass VCAM-1 und eNOS besonders in der initialen Phase verändert und nach 15 Stunden wieder herunterreguliert werden.

Zusammenfassend scheint der APLNR in venösen Endothelzellen also eine wichtige Rolle in der Umsetzung des mechanischen Reizes (Schubspannung) in eine biologische Antwort (Migration) zu spielen, und zwar abhängig von den anliegenden Flussbedingungen.

Diskussion

Bei HCAEC hingegen konnte in dieser Arbeit kein Einfluss des APLNR auf die flussinduzierten Zellmigration gezeigt werden. Auch die Expression der migrationsrelevanten Gene eNOS, VCAM-1 und Rac1 blieb durch die Zugabe des APLNR-Antagonisten unbeeinflusst. Die HCAEC wurden nur bei Schubspannungen von 10 dyne/cm^2 untersucht. Da in arteriellen Gefäßen Schubspannungen zwischen 10 und 70 dyne/cm^2 herrschen, liegen die in dieser Arbeit getesteten Flussbedingungen im niedrig-physiologischen Bereich. Hier zeigt sich kein Einfluss des APLNR auf die Migration; die Ergebnisse der Migration und Genexpression in HCAEC unterscheiden sich also von denen in HUVEC. In HCAEC wurden jedoch bisher keine sehr niedrigen oder sehr hohen Schubspannungen getestet. Da in venösen Zellen bereits Unterschiede zwischen physiologischen und nicht physiologischen Schubspannungen gezeigt werden konnten, sollte dieser Unterschied auch in HCAEC untersucht werden. Für eine abschließende Beurteilung muss der Einfluss des APLNR also unter unphysiologischen hohen und/oder niedrigen Schubspannungen in arteriellen Zellen zusätzlich getestet werden.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Auswahl des Zellmodells essentiell wichtig für die Übertragbarkeit der Ergebnisse ist. So ist das Migrationsverhalten der HUVEC, die einer niedrigen Schubspannung ausgesetzt waren, teils gegenteilig zu dem Migrationsverhalten der HUVEC unter hoher Schubspannung. Dabei entspricht für HUVEC die niedrigere Schubspannung dem physiologischen Verhalten. Hinzu kommt die Diskussion, ob das venöse Zellmodell der HUVEC für Fragestellungen der arteriellen Zellmigration anwendbar ist, da Arteriosklerose und koronare Stentimplantationen in diesem Fall im arteriellen Gefäßsystem stattfinden. In dieser Arbeit konnten grundlegende Unterschiede zwischen dem Verhalten von HUVEC und HCAEC unter den jeweils physiologischen Schubspannungen gezeigt werden. Wir konnten hier und in vorhergehenden Arbeiten zeigen, dass die Reaktion auf mechanische Stimuli abhängig vom Gefäßbett, also vom Herkunftsort der Endothelzellen ist. (99) Endothelzellen sind eine heterogene Gruppe von Zellen. Sie kleiden Blut- und Lymphgefäße von innen aus und haben Barriere-, Transport-, Hämostase-, immunologische und metabolische Funktionen. Bei allen Gemeinsamkeiten haben Endothelzellen aber auch viele Unterschiede. Diese kommen durch das Umgebungsmilieu, die Stimuli und der zellulären Antwort zustande. (136, 137) Dass sich HUVEC und HCAEC in ihrem jeweiligen physiologischen Flussbereich unterschiedlich verhalten, ist zu erwarten. So wurde das Verhalten von HUVEC und HCAEC bereits in Hinblick auf verschiedene Funktionen und Reaktionen untersucht. Dabei zeigten die beiden Zelllinien zum Beispiel unterschiedliche Reaktionen auf apoptotische Signale. (138) Auch im Rahmen der Immunantwort verhielten sich HCAEC anders als HUVEC. Wurden diese Zellen mit Zytokinen und proinflammatorischen Substanzen behandelt, zeigten HCAEC

Diskussion

eine höhere Anfälligkeit für eine inflammatorische Reaktion. (139, 140) Dies könnte auch eine größere Anfälligkeit für die Atherogenese bedeuten. Auch die Leukozytenrekrutierung im Rahmen der Entzündungsreaktion läuft in HUVEC und HCAEC unterschiedlich ab. So konnte eine unterschiedliche Expression von Chemokinen auf Gen- und Proteinebene festgestellt werden. (141) Bei einer Untersuchung von Genen, die durch Behandlung von Endothelzellen mit Schubspannungen beeinflusst werden, zeigten HUVEC und HCAEC ein unterschiedliches Expressionsmuster in Reaktion auf Fluss. Dabei wurden sowohl laminare als auch turbulente Flussverhältnisse betrachtet. (142) Auch die Migration der beiden Endothelzelllinien wurde bereits untersucht. In Wundheilungsassays wurde das Verhalten von HUVEC und HCAEC bewertet, die Schubspannungen ausgesetzt waren. Einem dichten Zellschicht dieser Zelllinien wurde eine Wunde zugefügt und die Wundheilung unter verschiedenen Flussbedingungen ausgewertet. Zu einer besonders effektiven Wundheilung kam es in den gemessenen sechs Stunden bei HUVEC vor allem unter niedrigen Schubspannungen (3 dyne/cm^2) im Vergleich zu hohen Schubspannungen oder statischen Bedingungen. Bei HCAEC erfolgte eine schnelle Wundheilung bei niedrigen (3 dyne/cm^2) und sehr hohen (20 dyne/cm^2) Schubspannungen. Mittlere Flussbedingungen (12 dyne/cm^2) konnten diesen Effekt nicht bewirken. (143) Die Höhe der Schubspannung scheint also einen Einfluss auf die Zellfunktion zu haben, der bei HUVEC anders ausgeprägt ist als bei HCAEC. In diesem Falle wurde bei 12 dyne/cm^2 kein Einfluss des Flusses auf die Migration der Endothelzellen gemessen- dies entspricht auch in etwa den 10 dyne/cm^2 in den Experimenten dieser Arbeit. Es ergibt sich der Hinweis, dass sehr niedrige oder sehr hohe Schubspannungen auch in diesem Versuchsaufbau andere Ergebnisse erbracht hätten.

Bei Betrachtung der Unterschiede zwischen den Zelllinien ist auch interessant, woher diese kommen könnten. Einige Arbeiten zeigen, dass die spezifischen Eigenschaften von arteriellen und venösen Zellen genetisch verankert sind und somit die Endothelzellfunktion schon unabhängig des Umgebungsmilieus beeinflussen. (144) Hinzu kommt aber auch eine gewisse Plastizität der Endothelzellen. Bei Applikation verschiedener Flussmuster *in vitro* entwickelten Endothelzellen phänotypische Eigenschaften, die den regionalen Unterschieden *in vivo* entsprechen. (145) Eine Form der venös-arteriellen Umdifferenzierung scheint also nicht ausgeschlossen und lässt sich zum Beispiel auch bei venösen Bypässen im arteriellen System beobachten. (137, 146) Für die hier vorliegende Arbeit lässt sich also eine beginnende Anpassung der venösen Endothelzellen an die hohe Schubspannung (10 dyne/cm^2) nicht ausschließen, die möglicherweise denen der arteriellen Zellen ähnelt.

Diskussion

Neben der Gefäßart, kann auch das Geschlecht des Zellspenders einen Einfluss auf die Funktion der Endothelzellen haben. In dieser Arbeit wurden HUVEC aus Nabelschnüren isoliert, die von Jungen und Mädchen stammten. Die HCAEC hingegen stammten von einem einzigen männlichen Spender. Im Rahmen einer Genexpressionsanalyse von HUVEC konnten Unterschiede zwischen den Expressionsprofilen von männlichen und weiblichen HUVEC gesehen werden. (147) Unter statischen Bedingungen zeigte sich nach 24 Stunden eine vermehrte Migration und eNOS-Expression in HUVEC weiblicher Spender, im Vergleich zu HUVEC männlicher Spender. (148) Dieser Effekt könnte sich in der hier vorliegenden Arbeit bei den venösen Endothelzellen herausgemittelt haben. Hier wäre ein Vergleich der Migration von Endothelzellen von männlichen und weiblichen Spendern interessant. Bei den hier verwendeten HCAEC hingegen könnten geschlechtsspezifische Reaktionen auf die Behandlungen im Rahmen der Flussversuche das Ergebnis beeinflusst haben. Hinzu kommt, dass bei den HCAEC ein homogeneres Zellbild zu erwarten ist, da alle Zellen von einer einzigen männlichen Person abstammen. Der Mix aus Zellen verschiedener Personen, könnte bei den HUVEC Effekte überdeckt, oder aber möglicherweise auch deutlicher gemacht haben.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wird der Unterschied zwischen HCAEC und HUVEC noch einmal deutlicher. HUVEC sind unter anderem wegen ihrer Verfügbarkeit und Handhabung ein beliebtes Zellmodell in der Arteriosklerose-Forschung. Hier wird allerdings gezeigt, dass sie anders auf Flussverhältnisse reagieren als arterielle Zellen. Auch das Geschlecht der Endothelzellspenders scheint Einfluss auf Phäno- und Genotyp der Zellen zu haben. Gerade hinsichtlich eines individualmedizinischen Ansatzes darf dies nicht unbeachtet bleiben.

4.2 Welchen Einfluss haben Statine auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen?

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Atorvastatin und Pravastatin in den Konzentrationen 0,1 μM und 1,0 μM auf die Migration von HCAEC bei 10 dyne/cm^2 über 15 h untersucht. Dabei senkten sowohl Atorva- als auch Pravastatin die Migrationsparameter im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt konnte jedoch nur bei einer Konzentration von 0,1 μM , nicht aber bei 1,0 μM gesehen werden. Die höhere Statinkonzentration führte im Vergleich zur niedrigeren bei Atorvastatin zu einer Erhöhung der Migration auf Kontrollniveau. Diese konzentrationsabhängige Steigerung der Migration durch Atorvastatin konnte bei Pravastatin nicht so deutlich gezeigt werden. In der Untersuchung der Expression der migrationsrelevanten

Diskussion

Gene zeigte sich eine verminderte VCAM-1-Expression durch Behandlung mit Pravastatin in supraphysiologischen Konzentrationen. Diese Veränderung konnte durch Atorvastatin nicht bewirkt werden. Die weiteren untersuchten Gene unterlagen diesem Einfluss nicht.

Die pleiotropen Effekte von Statinen wurden bereits in diversen Arbeiten untersucht. Dabei konnten mehrere Forschungsgruppen einen Einfluss der Statine auf die Migration verschiedener Zellarten feststellen. Besonders gut untersucht ist die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen. Hierbei wurde vor allem die Chemotaxis der VSMC bei Behandlung mit verschiedenen Statinen getestet. In einem Großteil der Arbeiten zeigte sich eine Verringerung der Migration der VSMC durch Statinbehandlung. Zwischen den einzelnen Statinen wurden kaum Unterschiede entdeckt. (149–151) Bei Untersuchung der Migration von VSMC durch eine Polycarbonatmembran wurde bei sechs verschiedenen Statinen von einer reduzierten Zellwanderung berichtet. Dabei wurde die Migration durch Lovastatin um 43 % und durch Pravastatin um 57 % verringert. (152) Auch die Wanderung anderer Zellarten ließ sich durch Statine beeinflussen. Dazu gehören auch entarteten Zellen im Rahmen von Krebserkrankungen. So konnte die Behandlung mit Statinen die Migration von Osteosarkom -und Melanomzellen verringern. (153, 154) Auch Endothelzellen wurden bezüglich der Wirkung von Statinen auf ihre Migration betrachtet. Die Migration von mikrovaskulären Endothelzellen (*human microvascular endothelial cells*, HMVEC) wurde in Wundheilungsassays untersucht. Dabei wurde die Wundheilung über 36 h und 60 h aufgenommen und die zurückgelegte Wanderung der Zellen ausgewertet. Unter niedrigen Statinkonzentrationen (0,005 $\mu\text{mol/L}$) wurde die Migration der HMVEC nach 60 h um 54 % durch Atorvastatin und um 75 % durch Cerivastatin erhöht. In mittleren und hohen Statinkonzentrationen (0,05 $\mu\text{mol/L}$ beziehungsweise 0,5 $\mu\text{mol/L}$) wurde die Wanderungstrecke der HMVEC hingegen verringert. Diese Statinkonzentrationen entsprechen am ehesten den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen. Die Wanderung der Endothelzellen erfolgte hierbei unter statischen Bedingungen. (155)

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich für Atorva -und Pravastatin in HCAEC eine Verringerung der Migrationsparameter, wenn diese in der niedrigeren Konzentration (0,1 μM) eingesetzt wurden. In diesem Konzentrationsbereich verringern die Statine also sowohl die Migration von HMVEC, als auch die Migration von HCAEC. Hierbei ist zu beachten, dass in den Experimenten mit den HCAEC zusätzlich hämodynamische Flussbedingungen herrschten und die Zellen nur über 15 h beobachtet wurden. Neben Endothelzellen aus dem kapillären Stromgebiet wurden auch bereits venöse Endothelzellen auf ihr Migrationsverhalten unter

Diskussion

Statinbehandlung untersucht. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden HUVEC den gleichen Flussversuchen und Bedingungen wie in dieser Arbeit ausgesetzt. Auch hier wurde das Migrationsverhalten unter Behandlung mit Atorva -oder Pravastatin getestet. Es zeigte sich anders als bei den bisher aufgeführten Arbeiten eine Verstärkung der Migration durch die Statine. Dabei hing das Ausmaß der Erhöhung der Migrationsparameter vom Statin und von der Schubspannung ab. Bei 1,5 dyne/cm² führte nur die Behandlung mit Pravastatin 1,0 µM zu einer Erhöhung der akkumulierten Distanz im Vergleich zur Kontrolle. Für beide Statine zeigte sich jedoch ein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die akkumulierte Distanz und Geschwindigkeit der Endothelzellwanderung bei 1,5 dyne/cm² (siehe **Abbildung 25**). (74)

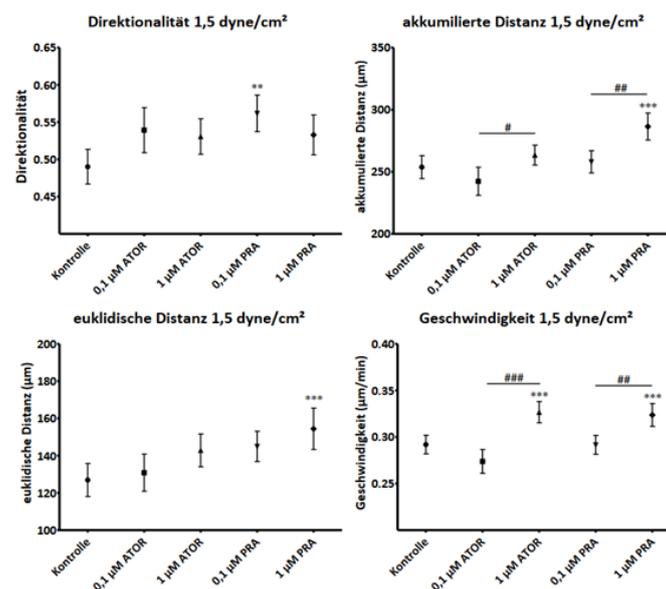


Abbildung 25 - Einfluss der Statine auf die endotheliale Migration bei 1,5 dyne/cm². HUVEC wurden 15 h mit Atorva- beziehungsweise Pravastatin behandelt und einer Schubspannung von 1,5 dyne/cm² ausgesetzt. Dargestellt sind die Direktionalität, akkumulierte Distanz, euklidische Distanz und Geschwindigkeit der HUVEC.

Quelle: Lorenz (74)

Ähnliche Effekte zeigten sich bei 10 dyne/cm², wobei hier nur Atorvastatin 1,0 µM zu einer Erhöhung der akkumulierten Distanz und Geschwindigkeit im Vergleich zu unbehandelten Zellen führte. Pravastatin 0,1 µM hingegen senkte sogar die Migrationsparameter der Endothelzellen. Bei 10 dyne/cm² zeigte sich der konzentrationsabhängige Effekt der Statine auf die Migration in allen vier Kategorien (siehe **Abbildung 26**). (74)

Diskussion

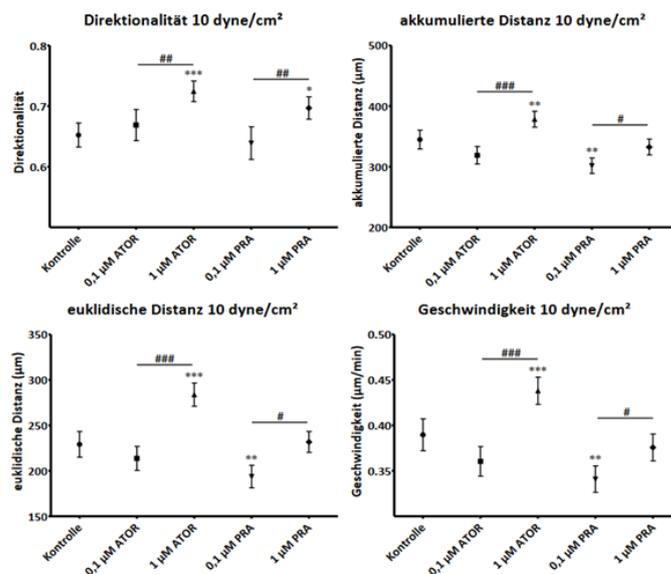


Abbildung 26 - Einfluss der Statine auf die endotheliale Migration bei 10 dyne/cm². HUVEC wurden 15 h mit Atorva - beziehungsweise Pravastatin behandelt und einer Schubspannung von 10 dyne/cm² ausgesetzt. Dargestellt sind die Direktionalität, akkumulierte Distanz, euklidische Distanz und Geschwindigkeit der HUVEC.

Quelle: Lorenz (74)

Anders als bei HCAEC, haben die Statine bei HUVEC anscheinend einen migrationsfördernden Effekt. Durch den Vergleich dieser zwei Arbeiten lässt sich erkennen, dass selbst bei gleichem Versuchsaufbau und gleichen Bedingungen HUVEC und HCAEC unterschiedlich auf die Behandlung mit den Statinen reagieren.

Die phänotypischen Veränderungen ließen sich in den Genexpressions-Analysen nicht reproduzieren. Hier ergab sich einzig, dass eine Behandlung mit Pravastatin in hoher Dosierung zu einer verminderten VCAM-1-Expression führte. Für die geringere Dosierung oder für Atorvastatin konnte dies nicht gezeigt werden. Den nicht-signifikanten Ergebnissen könnten verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Einerseits ist hier mit einem n=5 eine relativ geringe Stichprobe untersucht worden. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass posttranslationale Effekte eine größere Rolle spielen. So ist bekannt, dass zum Beispiel RhoA durch GDP/GTP-Umsatz aktiviert wird. (156) Andererseits wurden Zellen untersucht, die der Behandlung einem langen Zeitraum von 15h ausgesetzt wurden. Es könnte also bereits zum Abklingen von Genexpressionseffekten gekommen sein. Dazu passt eine Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe, bei der der zeitliche Verlauf der Migration in dreistündigen Abschnitten betrachtet wurde.

Diskussion

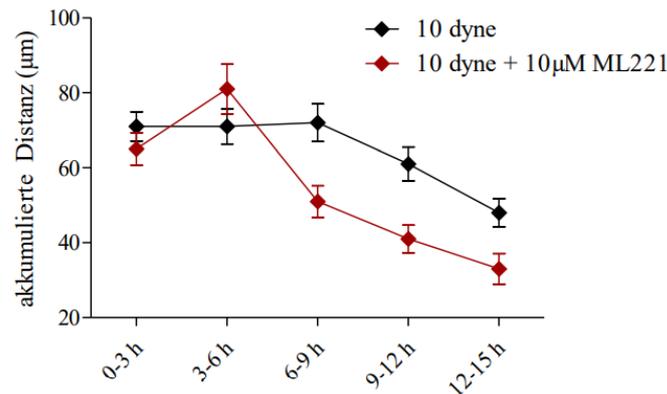


Abbildung 27 - Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Migration von HUVEC unter Schubspannungen von 10 dyne/cm² bei Behandlung mit ML221 im Vergleich zur Kontrolle.

Quelle: Materzok (109)

In der **Abbildung 27** wird die Migration von HUVEC bei Schubspannungen von 10 dyne/cm² über 15 h dargestellt. Dabei werden mit ML221 behandelte Zellen einer Kontrolle gegenübergestellt. Im Gesamtergebnis zeigte sich bei der ML221-Gruppe eine verminderte Migration. In der Abbildung wird deutlich, dass die Unterschiede im Wanderungsverhalten besonders um die sechste Stunde zu sehen waren. Hier könnte also der Großteil der Effekte stattfinden, und somit auch die Alteration von migrationsrelevanten Genen besonders ausgeprägt. Ein Abklingen des Effekts auf die Genexpression einiger Moleküle nach 15 h scheint also nicht ausgeschlossen.

Um die verschiedenen Arbeiten zum Einfluss der Statine auf die unterschiedlichen Endothelzellen zu vergleichen und deren klinische Relevanz zu erörtern, ist insbesondere die Auswahl der Statinkonzentration zu betrachten. Im klinischen Setting wird Atorvastatin mit einer Initialdosis von 10 mg und einer Maximaldosis von 80 mg eingesetzt. (157) Nach dem Aufnahmeprozess und der Verteilung des Wirkstoffes lassen sich verschiedene pharmakokinetische Parameter im Blut bestimmen. Dazu zählt die maximale Konzentration des Wirkstoffes im Blutserum (C_{max}) oder die Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC). Durch Messung der Konzentration des Wirkstoffes im Blut zu verschiedenen Zeitpunkten entsteht eine Verlaufskurve. Die AUC gibt die Konzentration des Wirkstoffes im Blut über den zeitlichen Verlauf an. Für die Auswahl einer geeigneten Statinkonzentration bei *in vitro* Experimenten muss entschieden werden, nach welchem Wert diese berechnet werden soll. Eine höhere Konzentration des Wirkstoffes im Experiment bewirkt vermeintlich die eindeutigeren Ergebnisse. So zeigten Statine in einer 1.000-fach erhöhten Konzentration sogar einen antibiotischen Effekt auf das Wachstum von Pneumokokken. (158)

Diskussion

Um realistische Verhältnisse abzubilden, sollte jedoch vom C_{\max} oder der durchschnittlichen Konzentration im Blut ausgegangen werden. Atorvastatin erreicht eine C_{\max} von 4,34 ng/mL bei einer täglichen Dosis von 5 mg bis 187 ng/mL bei einer täglichen Dosis von 80 mg. (159) Das entspricht einer Stoffmengenkonzentration von etwa 0,007 μM beziehungsweise 0,3 μM im Blut. Geht man von der mittleren Wirkstoffkonzentration im Blut aus, die man aus der AUC ableitet, errechnet sich eine Stoffmengenkonzentration von etwa 0,004 μM beziehungsweise 0,08 μM . Auch für Pravastatin ergeben sich vergleichbare Ergebnisse. (160)

In dieser Arbeit wurde Atorvastatin in den Konzentrationen 0,1 μM und 1,0 μM verwendet. Dabei bildet die niedrigere Konzentration von 0,1 μM die Verhältnisse im menschlichen Körper realistisch ab. Hier werden also am ehesten die Effekte von Atorvastatin bei einer oralen Tagesdosis von 80 mg untersucht. Der Einsatz der Statinkonzentrationen von 1,0 μM stellt keine Konzentration einer systemischen Statineinnahme dar. Vielmehr wurde diese Konzentration in den Versuchen eingesetzt, um Hinweise auf einen möglichen Effekt lokaler intraarterieller Statinapplikation auf die Migration der Endothelzellen zu bekommen. Beim Einsatz medikamentenbeschichteter Stents werden hohe Dosen des aufgetragenen Medikaments in die Koronararterien freigesetzt. Hier werden vor allem antiproliferative Wirkstoffe wie Sirolimus oder Tacrolimus genutzt. (161, 162) Es gibt jedoch bereits auch Studien, die einen Effekt von Statin-freisetzenden Stents beschreiben. So konnten eine Arbeitsgruppe zeigen, dass eine lokale Statinapplikation über DES die Formierung einer Neointima verringert. Hierbei schienen jedoch vor allem die Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen eine Rolle zu spielen. Ein Einfluss des in der Arbeit verwendeten Cerivastatins auf die endotheliale Migration war nicht zu sehen. Zur Untersuchung der Migration wurden jedoch nur Konzentrationen von 50 nM und 100 nM genutzt, welche wie oben beschrieben eher die systemische Einnahme von Statinen widerspiegeln. (163) Eine weitere Arbeit konnte bei Schweinen, denen Statin-freisetzende Stents eingesetzt wurden, eine signifikante Reduktion neointimaler Hyperplasie sehen. Hier führten die DES mit Cerivastatin außerdem zu einer reduzierten frühen inflammatorischen Antwort. Eingesetzt wurden Stents, die mit 300 μg Cerivastatin überzogen waren. Diese gaben 50 % der vorhandenen Wirkstoffmenge in den ersten 24 h ab. Man kann also eine höhere lokale Dosis des Statins erwarten, als bei oraler Einnahme. (164) Björkhem-Bergman et al. diskutieren die in der Forschung eingesetzten Konzentrationen verschiedener Statine in einer Übersichtsarbeit. Auch hier wird die tendenziell zu hohe Statinkonzentration für *in vitro* Versuche kritisiert, die eine systemische orale Statineinnahme modellieren wollen. Zusätzlich wird auf die hohe Eiweißbindung der Statine (> 98 % bei Atorvastatin) hingewiesen und als weiterer Grund für

Diskussion

die Empfehlung von sehr niedrigen Konzentrationen im Experiment angegeben. (158) Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei zunehmender Aufnahme des Wirkstoffs an seinem Wirkort auch wieder neuer Wirkstoff aus der Eiweißbindung frei wird, der dann erneut wirken kann. Daher sollte neben der einmalig eingesetzten Wirkstoffkonzentration auch der Konzentrationsverlauf als limitierender Faktor für in vitro Studien betrachtet werden.

Die in dieser Arbeit gewählten Statinkonzentrationen haben also sowohl physiologische als auch supraphysiologische Werte. Die Ergebnisse für Atorva -und Pravastatin in der Konzentration 0,1 μM haben dabei die höhere klinische Übertragbarkeit und Relevanz, wenn es um den Einfluss der oralen Statineinnahme in der Sekundärprophylaxe geht. In den Flussversuchen zeigten sich gerade für diese Konzentration die interessanteren und ausgeprägteren Effekte. Die Ergebnisse geben Anhalt für pleiotrope Effekte auf die Wanderung von Endothelzellen, die sich bei den im menschlichen Körper vorhandenen Konzentration des Statins zeigen ließen. Für die höheren Konzentrationen, wie sie zum Beispiel im Rahmen von Statin-freisetzenden Stents vorkommen, konnten die meisten Ergebnisse nicht reproduziert werden. Hier zeigte sich keine schnellere, jedoch eine deutlich gerichtete HCAEC-Migration. Auch dieser Aspekt der Migration könnte für die Endothelialisierung von klinischer Bedeutung sein.

Neben der Konzentration der applizierten Statine hat auch die Art des Statins Einfluss auf die flussinduzierte Migration der Endothelzellen. In dieser Arbeit wurde Atorvastatin, ein lipophiles Statin, mit dem hydrophilen Pravastatin in Bezug auf die flussinduzierte endotheliale Migration und eine mögliche Rolle des APLNR verglichen. Dabei zeigte sich für beide Statine in ihrem physiologischen Wirkungsbereich eine Senkung der Migrationsparameter in HCAEC. Jedoch konnte nur bei Atorvastatin ein signifikanter konzentrationsabhängiger Effekt auf die Migration gesehen werden, während sich bei Pravastatin nur ein Trend abzeichnete. Die Frage nach der Heterogenität unter den Statinen wurde schon in vielerlei Hinsicht untersucht. Dabei ging es vor allem um die lipidsenkende Wirkung der Statine. Anhand der Statinkonzentration, bei der 50 % des Enzyms HMG-CoA-Reduktase gehemmt werden (IC_{50}), kann die Wirkstärke der Statine bewertet werden. Bei Atorvastatin liegt die IC_{50} bei 8,2 nM, während sie bei Pravastatin mit 44,1 nM deutlich höher liegt. Pravastatin muss also in einer deutlich höheren Konzentration vorliegen, um den gleichen Effekt auf die LDL-Spiegel zu haben. Diese Effekte lassen sich unter anderem durch die Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Atorvastatin und der HMG-CoA-Reduktase erklären. (165) Bei der Wirkweise der verschiedenen Statine ist auch zu beachten, wie die einzelnen Statine an den Wirkort gelangen. Lipophile Statine, wie das Atorvastatin, können die Zellmembran über passive Diffusion

Diskussion

passieren. Das hydrophile Pravastatin ist hingegen auf Organo-Anion-Transporter angewiesen. Da diese vermehrt in der Leber vorkommen, sind hydrophile Statine auch selektiver für Lebergewebe. (67, 166) Die Unterschiede in der Wirkung verschiedener Statine zeigten sich jedoch nicht nur in Hinsicht auf ihre Potenz LDL zu senken, sondern auch bei der Untersuchung ihrer pleiotropen Effekte. So konnte in Probanden mit metabolischem Syndrom die Höhe der Belastung durch freie Radikale durch Atorvastatin gesenkt werden. Isopotentes Pravastatin konnte diese Effekte nicht in gleicher Weise hervorrufen. (167) Auch die endotheliale Funktion wird durch Statine unterschiedlich beeinflusst. So förderte Atorvastatin die Apoptose von pulmonalvenösen Endothelzellen, Pravastatin hingegen nicht. Bei dieser Studie wurden jedoch auch sehr hohe Statinkonzentration (50 μM) eingesetzt. (168) Bei der Betrachtung der Vitalität, Proliferation und Migration von HUVEC zeigten sich Unterschiede zwischen Atorva -und Pravastatin. Atorvastatin verbesserte die Proliferation und Endothelfunktion und förderte die Migration unter pathologischen Schubspannungen. Pravastatin hingegen konnte diese Effekte nicht hervorrufen. (74)

Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen in Zusammenschau mit den Ergebnissen der aktuellen Arbeiten und Literatur, dass die Statine nicht als homogene Wirkstoffklasse bewertet werden können. Die einzelnen Effekte auf die verschiedenen Zellfunktionen sollten weiter weiterhin Gegenstand experimenteller Untersuchungen bleiben. Zukünftig könnten verschiedene Statine im klinischen Bereich daher individueller oder gezielt für bestimmte Patientengruppen ausgewählt werden.

4.3 Welche Rolle spielt der APLNR für die Wirkung der Statine auf die flussinduzierte Migration von Endothelzellen?

Zur Untersuchung der Hypothese, dass der APLNR eine Rolle in der Wirkung der Statine auf Endothelzellen spielt, wurden die Flussversuche in HUVEC und HCAEC zusätzlich mit der Kombination von Statin und ML221 als Behandlung durchgeführt. In HUVEC führte die alleinige APLNR-Inhibition bei niedrigen Schubspannungen zu einer Verstärkung der Migration, bei hohen Schubspannungen zu einer Verminderung. Dieser Effekt zeigte sich auch in Zellen, die zusätzlich mit Atorvastatin behandelt wurden. Wurden die HUVEC allerdings mit Pravastatin behandelt, konnte der Effekt des APLNR-Inhibitors nicht mehr nachgewiesen werden. In der Genexpressionsanalyse ließ sich wiederum kaum eine Veränderung zwischen den Gruppen erkennen. In HCAEC zeigte der APLNR-Inhibitor in unbehandelten Zellen keinen Effekt auf die Migration und dies konnte auch für mit Atorva -und Pravastatin in physiologischen Konzentration behandelte Zellen bestätigt werden.

Diskussion

Bisher gibt es nur wenige Forschungsarbeiten, die den Zusammenhang zwischen dem Apelin/APLNR-System und Statinen untersuchten. In einer Studie mit Typ-2-Diabetes-Patienten wurden 87 Probanden für 12 Monate mit Atorvastatin behandelt. Die Dosis des Statins lag zwischen 10 und 80 mg und richtete sich nach dem Ausgangswert des LDL-Plasmaspiegels. Nach einem Jahr konnten erhöhte Serumlevel von Apelin bei den Probanden gemessen werden. Dabei korrelierte dieser Effekt mit der LDL-Senkung. (169) Dieses Ergebnis lässt sich also nicht unbedingt den pleiotropen Effekten des Statins zuordnen, sondern scheint vielmehr ein LDL-abhängiger Effekt zu sein. In einer anderen Studie wurden Probanden untersucht, die sich 12 Wochen therapeutischen lebensstilverändernden Interventionen unterzogen. Diese wurden mit Probanden verglichen, die Statine einnahmen. Hier führten beide Behandlungen zu einer Steigerung des Serum-Apelins, unabhängig davon auf welche Weise der LDL-Spiegel gesenkt wurde. In Probanden, bei denen keine LDL-Senkung erreicht werden konnte, änderte sich auch der Apelin-Spiegel nicht. (170) Neben diesen in vivo Studien, wurden auch in vitro Untersuchungen durchgeführt. McLean et al. untersuchten die Auswirkungen eines Apelin-Knockdowns auf die Expression von Krüppel Like Faktor 2 (KLF2), eNOS und Thrombomodulin (THBD). Statine induzierten die Expression dieser Proteine. Dieser Effekt wurde durch den Apelin-Knockdown aufgehoben, was für eine Vermittlerrolle des Apelin/APLNR-Systems in der Wirkung der Statine auf die Endothelzellen spricht. (108)

Die bisherige Literatur gibt also Hinweise, dass klinisch eine Senkung des LDL mit einem Anstieg des Apelins einhergeht. Dies würde zugleich eine Aktivierung des APLNR bedeuten. Ob dies auch Folge der pleiotropen Statineffekte sein kann, ist bisher nicht genau geklärt. Wir untersuchten daher, ob die Statinwirkung auf die endotheliale Migration durch den APLNR vermittelt wird. Wirken die Statine migrationsfördernd, wäre durch die APLNR-Inhibition eine verminderte Migration zu erwarten. Diese Möglichkeit wird in **Abbildung 28** skizziert.

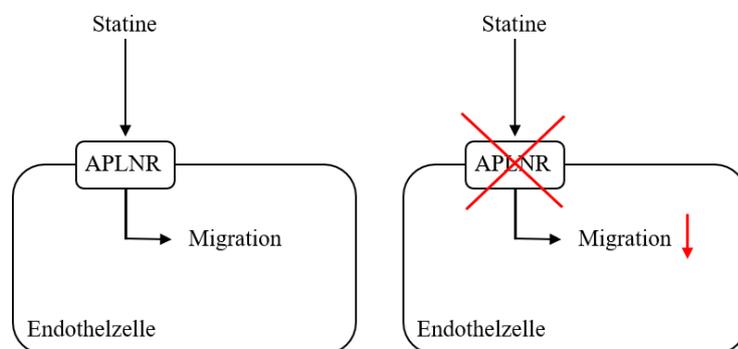


Abbildung 28 – Mögliche Wirkung der Statine auf die endotheliale Migration

Andersherum würde bei einer statinvermittelten Senkung der endothelialen Migration, eine APLNR-Inhibition die Migration wieder verstärken.

Diskussion

In HUVEC führt die Behandlung mit Atorvastatin $1,0 \mu\text{M}$ bei 10 dyne/cm^2 zu einer Erhöhung der Migrationsparameter. Durch Gabe des APLNR-Inhibitors ML221 konnte dieser Effekt aufgehoben werden. Dies würde dem oben dargestellten Schema gleichen und dafürsprechen, dass die Statinwirkung auf die Endothelzellmigration tatsächlich zumindest anteilig über den APLNR vermittelt wird. Ähnliche Effekte zeigten sich allerdings weder für die andere Schubspannung noch in der niedrigeren Statinkonzentration oder bei Pravastatin. Hier führte die APLNR-Blockierung zu keiner Veränderung der Migration in statinbehandelten Zellen.

In HCAEC zeigte sich hingegen sogar ein gegenteiliges Bild. Hier führten die Statine in physiologischer Konzentration zu einer Verminderung der. Einen signifikanten Einfluss der APLNR-Inhibition auf die Expression migrationsrelevanter Gene konnte nur in HCAEC, die mit Pravastatin $1 \mu\text{M}$ behandelt wurden, festgestellt werden. Hier konnte durch den APLNR-Inhibitor die eNOS-Expression erhöht und gegenteilig die VCAM-1-Expression vermindert werden. In den physiologischen Statinkonzentrationen war dieser Einfluss nicht festzustellen. Die Erhöhung der eNOS-Expression durch ML221 in Pravastatin-behandelten HCAEC korreliert nicht mit den Migrationsergebnissen, da hier kein signifikanten Unterschied in den Migrationsparametern der beiden Gruppen festgestellt werden konnte.

Der APLNR scheint insgesamt, wie von McLean et al. vermutet, einen Einfluss auf die Wirkung der Statine zu haben, dieser Einfluss ist aber anders ausgeprägt als bei den HUVEC. Eine Verstärkung des Statineffekts auf die Endothelzellen bei Blockierung des APLNR (wie hier in Pravastatin-behandelten HCAEC), spricht hier also eher für einen inhibitorischen Einfluss des APLNR auf die Statinwirkung. Beim Vergleich mit der Arbeit von McLean et al. muss jedoch auch beachtet werden, dass diese Arbeitsgruppe unphysiologisch hohe Statinkonzentration von $10 \mu\text{M}$ für 24 h gewählt hat. Dies könnte die Unterschiede zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten bei Statinkonzentrationen von $0,1 \mu\text{M}$ und $1,0 \mu\text{M}$ erklären. Als Vertreter der Statine wurden bei McLean et al. Rosuva-, Simva-, und Fluvastatin eingesetzt. Rosuvastatin ist dabei wie Pravastatin eher den hydrophilen Statinen zuzuordnen, während Simva -und Fluvastatin ähnlich wie Atrovastatin lipophile Eigenschaften haben. (166) Zwischen den drei verwendeten Statinen gab es bei McLean et al. jedoch keine signifikanten Unterschiede. Anders in der hier vorliegenden Arbeit, wo die Auswirkungen der APLNR-Inhibition von der Art des Statins abhängen. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre die Struktur der Statine und die Ähnlichkeit zum APLNR-Liganden Apelin. Der APLNR interagiert über hydrophobe Wechselwirkungen mit seinen Liganden. (171) Bei Apelin spielen hier vor allem die stickstoffreichen Enden der

Diskussion

Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure eine Rolle. (172) Auch das C-terminale Phenylalanin des Apelinmoleküls führt über eine Einbettung in die hydrophobe Tasche des APLNR zu einer Bindungsverstärkung. (173) Aufgrund seiner ähnlich hydrophoben Struktur lässt sich vermuten, dass Atorvastatin hier eine stärkere Wechselwirkung zum APLNR ausbilden kann als Pravastatin. Bisher sind solche direkten bindungsähnlichen Wechselwirkungen noch nicht beschrieben. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Atorvastatin über Anionentransporter (z.B. OAT1B1) in die Zelle gelangt. Dieser Transporter könnte möglicherweise über den G-Protein gekoppelten APLNR reguliert sein. In beiden Fällen könnte Atorvastatin stärker über den APLNR wirken und dessen migratorische Wirkung verstärken und dann würde die Atorvastatin-vermittelte Migration durch eine APLNR-Inhibition unterbunden. Eben dieser Effekt konnte für Atorvastatin unter nichtphysiologischen Konzentrationen und Schubspannungen gesehen werden. Bei Pravastatin blieb dieser Effekt aus. Auch unter physiologischen Bedingungen konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden. In dieser strukturellen Unterschiedlichkeit zwischen Atorva -und Pravastatin könnte jedoch ein Grund für die abweichenden Ergebnisse in dieser Arbeit sein.

4.4 Klinische Relevanz

Über 5 Millionen Patienten weltweit werden jährlich einer PCI unterzogen. Damit ist sie eine der wichtigsten und häufigsten interventionellen Prozeduren. (174) Trotz einer geringen Komplikationsrate, ist die absolute Zahl des Auftretens von Komplikationen sehr hoch, weil die PCI so häufig durchgeführt wird. Dabei ist die Stentthrombose die relevanteste Komplikation, da sie eine Mortalität zwischen 5-45 % aufweist und eine 5-Jahres-Rezidivrate von 15-20 %. (175) Die Stentthrombose kann akut, subakut, spät oder sehr spät auftreten und folgt dabei jeweils unterschiedlichen Pathomechanismen. (176) Die frühen Formen der Stentthrombose (< 30 Tage) sind vor allem auf prozedurale Komplikationen wie die falsche Positionierung oder das falsche Auffalten des Stents zurückzuführen. Auch eine ineffektive Plättchenaggregationshemmung spielt hier eine Rolle. Die späten Formen der Stentthrombose (> 30 Tage) sind vor allem mit einer verzögerten Endothelialisierung des Stents und somit mit einem verlängertem Heilungsprozess assoziiert. (177) Die Fähigkeit von Endothelzellen zu einer zügigen und gerichteten Endothelialisierung hängt unter anderem von ihrem Migrationsverhalten ab.

In dieser Arbeit ergab sich u.a. die wesentliche Frage, ob sich der Einsatz der Statine in der Sekundärprophylaxe nach PCI in Hinblick auf ihre pleiotropen Effekte optimieren lässt.

Statine sind im klinischen Setting wichtige Medikamente der Sekundärprophylaxe und kommen deshalb bei den Patienten mit PCI fast immer zum Einsatz. Daher ist die Prüfung, inwiefern die pleiotropen Effekte der Statine die Endothelialisierung beeinflussen können, durchaus relevant. Der Nachweis der pleiotropen Effekte in klinischen Studien unterliegt vielen Schwierigkeiten. So lässt sich oft nicht genau zuordnen, ob die beobachteten Effekte LDL-unabhängig sind. In der JUPITER-Studie wurden Patienten mit erhöhten CRP-Werten mit Rosuvastatin beziehungsweise einem Placebo behandelt. Statine senkten den LDL-Spiegel, den CRP-Spiegel und die Anzahl kardiovaskulärer Events. Dabei war der positive Einfluss auf den primären Endpunkt höher, als durch die alleinige LDL-Senkung erwartet. (178) Eine andere Herangehensweise an die Frage nach klinisch relevanten pleiotropen Effekten ist der Vergleich von zwei Gruppen, in der eine Gruppe Statine erhält und die andere Gruppe ein Nicht-Statin-Cholesterolsenker wie den Cholesterinresorptionshemmer Ezetimib. In solcher Art Studien zeigten sich verschiedene teils widersprüchliche Ergebnisse. Dabei wurden vor allem Surrogatparameter, wie z.B. die Vasodilatation der Radialarterie, untersucht. Einige Studien konnten pleiotrope Effekte erkennen, in anderen Studien gab es keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Die Studienlage ist bisher vor allem von kleinen Populationen, heterogenen

Diskussion

Patientengruppen und unterschiedlichen Therapiedauern gekennzeichnet und kann deshalb noch kein klares Bild über die klinische Relevanz der pleiotropen Effekte geben. (67) Die klinische Relevanz der pleiotropen Effekte bleibt also weiterhin wichtiger Gegenstand der Forschung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind im Vergleich rein experimenteller Art, die Frage nach einer perspektivischen klinischen Relevanz stellt sich dabei aber trotzdem. Wir konnten zeigen, dass Statine einen Einfluss auf die Wanderung der Endothelzelle haben. Bei Untersuchungen der arteriellen Zellen zeigte sich eine verminderte Migration bei Gabe von Atorva -und Pravastatin. Hinsichtlich dieser Ergebnisse, scheint also die Wahl zwischen den beiden Statinen keinen Einfluss auf die Entwicklung von Stentthrombosen durch mangelnde Endothelialisierung zu haben. Geht man davon aus, dass eine schnellere Migration auch zu einer besseren Stentendothelialisierung führt, könnten Statine diesen Prozess durch ihre pleiotropen Effekte sogar verzögern. Dieser Effekt scheint aber neben der wichtigen lipidsenkenden Wirkung der Statine nur wenig klinisch relevant. Anders verhielt sich die Endothelzellmigration unter hohen Statinkonzentrationen ($1 \mu\text{M}$), die bei lokaler Freisetzung durch DES erreicht werden. Hier konnte ein migrationssenkender Effekt der Statine, insbesondere bei Atorvastatin nicht nachgewiesen werden. In diesem Falle stehen allerdings vor allem der Einfluss des lokal freigesetzten Statins auf die Intimahyperplasie im Vordergrund. (179)

Interessant ist daher vor allem das Ergebnis, dass es im Hinblick auf das Migrationsverhalten arterieller Endothelzellen unwesentlich ist, ob die Sekundärprophylaxe nach PCI mit einem lipophilen oder hydrophilen Statin durchgeführt wird. Unterschiede zeigen sich jedoch auf zellulärer Ebene im Wirkmechanismus der Pleiotropie von Atorva -und Pravastatin. So scheint in venösen Zellen Atorvastatin über das Apelin/APLNR-System zu wirken, während Pravastatin davon unabhängig auf die Endothelzellen wirkt. In arteriellen Zellen hingegen konnte dieser Unterschied nicht gezeigt werden.

In Hinblick auf die o.g. Frage nach der Optimierung der Statintherapie zeigte sich besonders, dass die Modelle zur Erörterung dieser Fragestellung genau abgewogen werden müssen, da sich in dieser Arbeit große Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gefäßbetten und Schubspannungen zeigen ließen. Diese weisen darauf hin, dass zur Untersuchung der pleiotropen Effekte der Statine auf die Endothelzellen zum Beispiel die gerne verwendeten HUVEC nicht unbedingt eine gute Übertragbarkeit zu in vivo Verhältnissen haben, wenn diese schon im in vitro Modell anders reagieren als arterielle Endothelzellen.

5 Zusammenfassung

Die Migration von Endothelzellen unter hämodynamischen Flussbedingungen ist ein komplex regulierter Vorgang. In dieser Arbeit konnten die Aktivierung des Apelin-Rezeptors und die Zugabe von Statinen als Einflussfaktoren auf die Migration der Endothelzellen unter verschiedener Schubspannung identifiziert werden. Dabei wurden folgende Kernaussagen herausgearbeitet:

1. Der Apelin-Rezeptor reguliert die Endothelzellen-Migration in Abhängigkeit von der Schubspannung und dem Gefäßbett. In HUVEC wirkt der APLNR migrationsfördernd unter physiologischen Schubspannungen und migrationshemmend unter höheren Schubspannungen. Keinen Einfluss zeigt der APLNR auf die Migration von HCAEC.
2. Physiologische Statinkonzentrationen reduzieren die EC-Migration in HCAEC. Dies steht im Gegensatz zu der beschriebenen migrationsfördernden Wirkung von statinbehandelten HUVEC. In supraphysiologischen Konzentrationen zeigten sich Unterschiede zwischen dem lipophilen Atorvastatin und dem hydrophilen Pravastatin.
3. Die Wirkung der Statine auf die EC-Migration scheint teilweise über den APLNR zu erfolgen. Dies könnte möglicherweise abhängig von ihrer Lipophilie geschehen.

Hinsichtlich der klinischen Relevanz scheint insbesondere der Einfluss des APLNR auf die endotheliale Migration, sowie sein Zusammenspiel mit Atorvastatin von Bedeutung zu sein. In diesem experimentellen Setting konnte bei Betrachtung von arteriellen EC kein Vorteil eines der Statine bezüglich ihrer Migration herausgearbeitet werden. Inwieweit sich diese jedoch klinisch unterscheiden, müsste in *in vivo* Studien untersucht werden.

In Zusammenschau mit den Studien der aktuellen Literatur zeigte die hier vorliegende Arbeit besonders, wie stark zum Beispiel die Auswahl des Zellmodells die Ergebnisse beeinflusst. So lassen sich Arbeiten mit dem für Arteriosklerose oft gewählten HUVEC-Zellmodell kaum mit Experimenten an HCAEC vergleichen, obgleich es sich bei beiden um vaskuläre Endothelzellen handelt. Außerdem zeigte sich, dass die Wirkung der Statine oder der APLNR-Blockierung unter physiologischen Schubspannungen teilweise gegenteilig zu ihrer Wirkung unter höheren Schubspannungen ist.

In der individualisierten Medizin wird angestrebt für jeden einzelnen Patienten entsprechend seiner Erkrankungen, die optimalste Therapie zu finden. Wo Atorvastatin für den einen Patienten von Vorteil ist, sorgt bei einer anderen Patientin Pravastatin für mehr Sicherheit. Dass diese Wirkstoffgruppe nicht so homogen ist, zeigen die hier erhobenen Ergebnisse. Um den

Zusammenfassung

modernen Therapieansatz zu verfolgen, sollten auch die wissenschaftlichen Fragestellungen bezüglich der Wirkstoffgruppe der Statine konkreter abgestimmt beantwortet werden.

Anhang

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	HUVEC_29.04.16_1	Kardiologie Labor	09.06.2016 14:19:36	63,9	ng/µl	1,598	0,772	2,07	1,61	RNA	40,00
2	HUVEC_02.05.16_1	Kardiologie Labor	09.06.2016 14:21:47	41,8	ng/µl	1,046	0,493	2,12	0,11	RNA	40,00
3	HUVEC_03.05.16_1	Kardiologie Labor	09.06.2016 14:24:03	56,8	ng/µl	1,420	0,681	2,08	1,59	RNA	40,00
4	HUVEC_03.05.16_2	Kardiologie Labor	09.06.2016 14:24:44	57,3	ng/µl	1,433	0,696	2,06	1,56	RNA	40,00
5	HUVEC_27.05.16_1	Kardiologie Labor	09.06.2016 14:25:27	53,8	ng/µl	1,346	0,652	2,06	0,23	RNA	40,00
#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	HUVEC_18.05.16_1	Kardiologie Labor	10.06.2016 10:35:29	91,1	ng/µl	2,277	1,082	2,11	1,41	RNA	40,00
2	HUVEC_18.05.16_2	Kardiologie Labor	10.06.2016 10:36:12	91,3	ng/µl	2,282	1,084	2,11	1,43	RNA	40,00
3	HUVEC_19.05.16_1	Kardiologie Labor	10.06.2016 10:36:58	95,1	ng/µl	2,378	1,123	2,12	1,41	RNA	40,00
4	HUVEC_19.05.16_2	Kardiologie Labor	10.06.2016 10:37:29	94,0	ng/µl	2,349	1,123	2,09	1,39	RNA	40,00
5	HUVEC_20.05.16_1	Kardiologie Labor	10.06.2016 10:38:03	52,3	ng/µl	1,307	0,611	2,14	0,48	RNA	40,00
6	HUVEC_20.05.16_2	Kardiologie Labor	10.06.2016 10:38:40	53,1	ng/µl	1,326	0,640	2,07	0,48	RNA	40,00
7	HUVEC_23.05.16_1	Kardiologie Labor	10.06.2016 10:39:25	95,6	ng/µl	2,389	1,137	2,10	1,01	RNA	40,00
8	HUVEC_23.05.16_2	Kardiologie Labor	10.06.2016 10:39:52	95,9	ng/µl	2,397	1,143	2,10	1,00	RNA	40,00
#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	HUVEC_24.05.15_1	Kardiologie Labor	14.06.2016 15:03:53	50,8	ng/µl	1,269	0,591	2,15	0,12	RNA	40,00
2	HUVEC_24.05.15_2	Kardiologie Labor	14.06.2016 15:04:41	51,3	ng/µl	1,283	0,588	2,18	0,12	RNA	40,00
3	HUVEC_26.05.15_1	Kardiologie Labor	14.06.2016 15:05:20	79,4	ng/µl	1,986	0,921	2,16	0,15	RNA	40,00
4	HUVEC_26.05.15_2	Kardiologie Labor	14.06.2016 15:05:49	78,6	ng/µl	1,966	0,912	2,16	0,15	RNA	40,00
5	HUVEC_30.05.15_1	Kardiologie Labor	14.06.2016 15:06:22	37,3	ng/µl	0,932	0,426	2,19	0,07	RNA	40,00
6	HUVEC_30.05.15_2	Kardiologie Labor	14.06.2016 15:06:54	38,1	ng/µl	0,953	0,432	2,20	0,07	RNA	40,00
7	HUVEC_31.05.15_1	Kardiologie Labor	14.06.2016 15:07:26	26,7	ng/µl	0,668	0,304	2,20	0,07	RNA	40,00
8	HUVEC_31.05.15_2	Kardiologie Labor	14.06.2016 15:07:44	27,3	ng/µl	0,683	0,313	2,18	0,08	RNA	40,00
#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	HUVEC_01.06.16_1	Kardiologie Labor	20.06.2016 15:06:27	45,7	ng/µl	1,142	0,545	2,09	0,70	RNA	40,00
2	HUVEC_01.06.16_2	Kardiologie Labor	20.06.2016 15:07:00	45,7	ng/µl	1,142	0,546	2,09	0,72	RNA	40,00
3	HUVEC_02.06.16_1	Kardiologie Labor	20.06.2016 15:07:32	63,4	ng/µl	1,585	0,761	2,08	1,36	RNA	40,00
4	HUVEC_02.06.16_2	Kardiologie Labor	20.06.2016 15:07:58	65,6	ng/µl	1,640	0,782	2,10	1,41	RNA	40,00
5	HUVEC_10.06.16_1	Kardiologie Labor	20.06.2016 15:08:33	61,0	ng/µl	1,525	0,732	2,08	1,38	RNA	40,00
6	HUVEC_10.06.16_2	Kardiologie Labor	20.06.2016 15:09:15	60,8	ng/µl	1,521	0,733	2,07	1,33	RNA	40,00
7	HUVEC_11.06.16_1	Kardiologie Labor	20.06.2016 15:10:06	59,8	ng/µl	1,495	0,705	2,12	0,55	RNA	40,00
8	HUVEC_11.06.16_2	Kardiologie Labor	20.06.2016 15:10:49	60,8	ng/µl	1,521	0,724	2,10	0,55	RNA	40,00
#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	HUVEC_12.06.16_1	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:05:00	76,9	ng/µl	1,923	0,939	2,05	1,15	RNA	40,00
2	HUVEC_12.06.16_2	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:05:58	81,1	ng/µl	2,026	0,997	2,03	1,16	RNA	40,00
3	HUVEC_13.06.16_1	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:06:45	69,8	ng/µl	1,744	0,841	2,07	0,35	RNA	40,00
4	HUVEC_13.06.16_2	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:07:23	70,2	ng/µl	1,756	0,848	2,07	0,35	RNA	40,00
5	HUVEC_14.06.16_1	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:08:17	78,6	ng/µl	1,965	0,954	2,06	0,88	RNA	40,00
6	HUVEC_14.06.16_2	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:09:08	78,5	ng/µl	1,962	0,951	2,06	0,86	RNA	40,00
7	HUVEC_15.06.16_1	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:10:01	105,8	ng/µl	2,646	1,288	2,06	1,25	RNA	40,00
8	HUVEC_15.06.16_2	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:10:34	102,1	ng/µl	2,554	1,245	2,05	1,21	RNA	40,00
9	HUVEC_23.06.16_1	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:11:13	118,4	ng/µl	2,961	1,445	2,05	1,74	RNA	40,00
10	HUVEC_23.06.16_2	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:11:42	117,6	ng/µl	2,940	1,439	2,04	1,75	RNA	40,00
11	HUVEC_24.06.16_1	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:12:39	97,1	ng/µl	2,428	1,172	2,07	1,03	RNA	40,00
12	HUVEC_24.06.16_2	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:13:09	96,0	ng/µl	2,399	1,157	2,07	1,02	RNA	40,00
13	HUVEC_25.06.16_1	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:13:44	99,8	ng/µl	2,495	1,219	2,05	1,22	RNA	40,00
14	HUVEC_25.06.16_2	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:14:07	96,3	ng/µl	2,408	1,155	2,08	1,21	RNA	40,00
15	HUVEC_26.06.16_1	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:14:41	79,3	ng/µl	1,983	0,969	2,05	1,63	RNA	40,00
16	HUVEC_26.06.16_2	Kardiologie Labor	28.06.2016 16:15:22	81,2	ng/µl	2,031	0,994	2,04	1,60	RNA	40,00

Abbildung 29 – Spektrophotometrische Bestimmung des RNS-Gehalts von HUVEC aus Flussversuchen (1/2). Dargestellt sind die verschiedenen Proben aus den Flussversuchen. Diese sind nach Datum des Versuchs gelistet. Nach Isolation der RNS aus den Zellpellets erfolgte die Bestimmung des RNS Gehalts (hier *Nucleic Acid Conc.*) und des 260/280-Quotienten.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	HUVEC_13.07.16_1	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:13:03	61,0	ng/µl	1,524	0,736	2,07	0,50	RNA	40,00
2	HUVEC_13.07.16_2	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:13:53	63,4	ng/µl	1,584	0,761	2,08	0,51	RNA	40,00
3	HUVEC_14.07.16_1	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:14:23	106,8	ng/µl	2,670	1,301	2,05	1,71	RNA	40,00
4	HUVEC_14.07.16_2	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:15:15	102,6	ng/µl	2,565	1,260	2,04	1,67	RNA	40,00
5	HUVEC_15.07.16_1	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:15:43	86,1	ng/µl	2,153	1,042	2,07	1,46	RNA	40,00
6	HUVEC_15.07.16_2	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:16:06	86,3	ng/µl	2,159	1,049	2,06	1,40	RNA	40,00
7	HUVEC_16.07.16_1	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:16:40	98,7	ng/µl	2,466	1,202	2,05	1,71	RNA	40,00
8	HUVEC_16.07.16_2	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:17:32	98,7	ng/µl	2,466	1,206	2,05	1,79	RNA	40,00
9	HUVEC_17.07.16_1	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:18:01	101,7	ng/µl	2,542	1,228	2,07	0,40	RNA	40,00
10	HUVEC_17.07.16_2	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:18:23	102,7	ng/µl	2,567	1,247	2,06	0,41	RNA	40,00
11	HUVEC_18.07.16_1	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:18:50	135,3	ng/µl	3,382	1,669	2,03	1,55	RNA	40,00
12	HUVEC_18.07.16_2	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:19:17	134,0	ng/µl	3,350	1,648	2,03	1,55	RNA	40,00
13	HUVEC_19.07.16_1	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:19:42	35,8	ng/µl	0,895	0,456	1,96	1,30	RNA	40,00
14	HUVEC_19.07.16_2	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:20:09	34,5	ng/µl	0,863	0,427	2,02	1,32	RNA	40,00
15	HUVEC_20.07.16_1	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:20:47	128,5	ng/µl	3,212	1,555	2,07	1,52	RNA	40,00
16	HUVEC_20.07.16_2	Kardiologie Labor	02.08.2016 14:21:13	150,8	ng/µl	3,770	1,853	2,03	1,44	RNA	40,00
17	HUVEC_21.07.16_1	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:18:19	82,2	ng/µl	2,055	0,989	2,08	0,66	RNA	40,00
18	HUVEC_21.07.16_2	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:18:42	81,3	ng/µl	2,032	0,968	2,10	0,66	RNA	40,00
19	HUVEC_22.07.16_1	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:19:15	102,5	ng/µl	2,563	1,242	2,06	0,61	RNA	40,00
20	HUVEC_22.07.16_2	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:19:35	102,3	ng/µl	2,558	1,235	2,07	0,61	RNA	40,00
21	HUVEC_24.07.16_1	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:20:06	85,0	ng/µl	2,126	1,002	2,12	0,27	RNA	40,00
22	HUVEC_24.07.16_2	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:20:29	85,3	ng/µl	2,132	1,000	2,13	0,28	RNA	40,00
23	HUVEC_25.07.16_1	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:21:01	79,2	ng/µl	1,980	0,938	2,11	0,46	RNA	40,00
24	HUVEC_25.07.16_2	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:21:25	79,0	ng/µl	1,975	0,948	2,08	0,46	RNA	40,00
25	HUVEC_27.07.16_1	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:21:56	82,0	ng/µl	2,050	0,967	2,12	0,33	RNA	40,00
26	HUVEC_27.07.16_2	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:22:19	81,4	ng/µl	2,035	0,960	2,12	0,32	RNA	40,00
27	HUVEC_28.07.16_1	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:22:55	94,0	ng/µl	2,351	1,124	2,09	0,47	RNA	40,00
28	HUVEC_28.07.16_2	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:23:17	97,0	ng/µl	2,426	1,159	2,09	0,47	RNA	40,00
29	HUVEC_29.07.16_1	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:23:47	86,3	ng/µl	2,157	1,028	2,10	0,74	RNA	40,00
30	HUVEC_29.07.16_2	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:24:11	86,9	ng/µl	2,171	1,037	2,09	0,96	RNA	40,00
31	HUVEC_31.07.16_1	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:24:50	107,9	ng/µl	2,697	1,302	2,07	0,65	RNA	40,00
32	HUVEC_31.07.16_2	Kardiologie Labor	03.08.2016 16:25:14	106,4	ng/µl	2,660	1,280	2,08	0,59	RNA	40,00
40	HUVEC_01.08.16_1	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:23:49	107,7	ng/µl	2,694	1,283	2,10	0,41	RNA	40,00
41	HUVEC_01.08.16_2	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:24:22	107,8	ng/µl	2,696	1,296	2,08	0,39	RNA	40,00
42	HUVEC_02.08.16_1	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:24:54	148,8	ng/µl	3,719	1,793	2,07	0,78	RNA	40,00
43	HUVEC_02.08.16_2	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:25:30	151,9	ng/µl	3,797	1,844	2,06	1,01	RNA	40,00
44	HUVEC_03.08.16_1	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:26:09	151,2	ng/µl	3,780	1,822	2,07	0,97	RNA	40,00
45	HUVEC_03.08.16_2	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:26:42	127,1	ng/µl	3,178	1,536	2,07	0,92	RNA	40,00
46	HUVEC_05.08.16_1	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:27:19	113,7	ng/µl	2,843	1,528	1,86	0,97	RNA	40,00
47	HUVEC_05.08.16_2	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:27:52	131,4	ng/µl	3,284	1,784	1,84	1,07	RNA	40,00
48	HUVEC_07.08.16_1	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:28:55	125,7	ng/µl	3,142	1,689	1,86	1,09	RNA	40,00
49	HUVEC_07.08.16_2	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:29:15	117,0	ng/µl	2,926	1,563	1,87	1,13	RNA	40,00
50	HUVEC_08.08.16_1	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:29:39	139,7	ng/µl	3,493	1,722	2,03	1,06	RNA	40,00
51	HUVEC_08.08.16_2	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:30:00	135,3	ng/µl	3,384	1,645	2,06	0,98	RNA	40,00
52	HUVEC_09.08.16_1	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:30:24	114,1	ng/µl	2,852	1,389	2,05	1,34	RNA	40,00
53	HUVEC_09.08.16_2	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:30:51	111,3	ng/µl	2,783	1,364	2,04	1,37	RNA	40,00
54	HUVEC_10.08.16_1	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:31:19	119,1	ng/µl	2,976	1,431	2,08	0,65	RNA	40,00
55	HUVEC_10.08.16_2	Kardiologie Labor	11.08.2016 16:31:55	113,8	ng/µl	2,844	1,358	2,09	0,54	RNA	40,00
1	HUVEC_11.08.16_1	Kardiologie Labor	01.09.2016 11:23:42	17,2	ng/µl	0,430	0,197	2,19	1,40	RNA	40,00
2	HUVEC_11.08.16_2	Kardiologie Labor	01.09.2016 11:24:27	58,8	ng/µl	1,470	0,687	2,14	1,60	RNA	40,00
3	HUVEC_11.08.16_3	Kardiologie Labor	01.09.2016 11:24:54	86,1	ng/µl	2,153	1,033	2,08	1,65	RNA	40,00
4	HUVEC_17.08.16_1	Kardiologie Labor	01.09.2016 11:25:53	110,4	ng/µl	2,761	1,347	2,05	1,40	RNA	40,00
5	HUVEC_17.08.16_2	Kardiologie Labor	01.09.2016 11:26:14	108,7	ng/µl	2,718	1,302	2,09	1,41	RNA	40,00
6	HUVEC_18.08.16_1	Kardiologie Labor	01.09.2016 11:26:43	116,5	ng/µl	2,912	1,402	2,08	1,57	RNA	40,00
7	HUVEC_18.08.16_2	Kardiologie Labor	01.09.2016 11:27:06	115,5	ng/µl	2,887	1,381	2,09	1,56	RNA	40,00
8	HUVEC_22.08.16_1	Kardiologie Labor	01.09.2016 11:27:38	105,5	ng/µl	2,637	1,257	2,10	1,50	RNA	40,00
9	HUVEC_22.08.16_2	Kardiologie Labor	01.09.2016 11:28:00	104,9	ng/µl	2,623	1,248	2,10	1,53	RNA	40,00
10	HUVEC_23.08.16_1	Kardiologie Labor	01.09.2016 11:28:29	106,0	ng/µl	2,649	1,271	2,08	1,09	RNA	40,00
11	HUVEC_23.08.16_2	Kardiologie Labor	01.09.2016 11:29:16	105,3	ng/µl	2,634	1,258	2,09	1,09	RNA	40,00

Abbildung 30 - Spektrophotometrische Bestimmung des RNS-Gehalts von HUVEC aus Flussversuchen (2/2). Dargestellt sind die verschiedenen Proben aus den Flussversuchen. Diese sind nach Datum des Versuchs gelistet. Nach Isolation der RNS aus den Zellpellets erfolgte die Bestimmung des RNS Gehalts (hier *Nucleic Acid Conc.*) und des 260/280-Quotienten.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type
1	HCAEC_09.11.16_1	Admin	2/27/2017 1:02:20 PM	40.4	ng/µl	1.010	0.486	2.08	1.15	RNA
2	HCAEC_09.11.16_2	Admin	2/27/2017 1:02:58 PM	42.9	ng/µl	1.072	0.514	2.09	1.04	RNA
3	HCAEC_10.11.16_2	Admin	2/27/2017 1:03:26 PM	40.1	ng/µl	1.004	0.482	2.08	0.80	RNA
4	HCAEC_10.11.16_2	Admin	2/27/2017 1:03:56 PM	41.2	ng/µl	1.030	0.494	2.08	0.74	RNA
5	HCAEC_13.11.16_1	Admin	2/27/2017 1:04:39 PM	49.7	ng/µl	1.242	0.610	2.04	0.91	RNA
6	HCAEC_13.11.16_2	Admin	2/27/2017 1:05:01 PM	53.3	ng/µl	1.331	0.643	2.07	1.00	RNA
7	HCAEC_15.11.16_1	Admin	2/27/2017 1:05:30 PM	46.9	ng/µl	1.172	0.556	2.11	0.49	RNA
8	HCAEC_15.11.16_2	Admin	2/27/2017 1:05:53 PM	41.7	ng/µl	1.044	0.510	2.05	0.34	RNA
9	HCAEC_17.11.16_1	Admin	2/27/2017 1:06:21 PM	43.1	ng/µl	1.078	0.515	2.09	0.46	RNA
10	HCAEC_17.11.16_2	Admin	2/27/2017 1:06:58 PM	43.7	ng/µl	1.092	0.522	2.09	0.54	RNA
11	HCAEC_18.11.16_1	Admin	2/27/2017 1:07:35 PM	44.9	ng/µl	1.122	0.557	2.01	0.69	RNA
12	HCAEC_18.11.16_2	Admin	2/27/2017 1:08:11 PM	42.6	ng/µl	1.065	0.505	2.11	0.76	RNA
13	HCAEC_21.11.16_1	Admin	2/27/2017 1:08:35 PM	48.9	ng/µl	1.221	0.589	2.07	0.26	RNA
14	HCAEC_21.11.16_2	Admin	2/27/2017 1:08:56 PM	49.4	ng/µl	1.234	0.585	2.11	0.25	RNA
15	HCAEC_22.11.16_1	Admin	2/27/2017 1:09:24 PM	65.3	ng/µl	1.632	0.785	2.08	0.48	RNA
16	HCAEC_22.11.16_2	Admin	2/27/2017 1:09:44 PM	76.1	ng/µl	1.902	0.932	2.04	1.13	RNA
17	HCAEC_23.11.16_1	Admin	2/27/2017 1:10:42 PM	47.7	ng/µl	1.193	0.572	2.08	0.35	RNA
18	HCAEC_23.11.16_2	Admin	2/27/2017 1:11:01 PM	47.6	ng/µl	1.190	0.596	2.00	0.34	RNA
19	HCAEC_29.11.16_1	Admin	2/27/2017 1:11:28 PM	39.8	ng/µl	0.996	0.493	2.02	0.36	RNA
20	HCAEC_29.11.16_2	Admin	2/27/2017 1:12:10 PM	39.6	ng/µl	0.991	0.478	2.07	0.36	RNA
21	HCAEC_30.11.16_1	Admin	2/27/2017 1:12:37 PM	52.0	ng/µl	1.301	0.639	2.04	0.50	RNA
22	HCAEC_30.11.16_2	Admin	2/27/2017 1:12:56 PM	51.7	ng/µl	1.292	0.625	2.07	0.49	RNA
23	HCAEC_01.12.16_1	Admin	2/27/2017 1:13:27 PM	90.7	ng/µl	2.267	1.089	2.08	0.35	RNA
24	HCAEC_01.12.16_1	Admin	2/27/2017 1:13:43 PM	92.2	ng/µl	2.305	1.119	2.06	0.36	RNA

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type
1	HCAEC_03.10.16_1	Admin	11/21/2016 12:12:43 PM	45.5	ng/µl	1.138	0.537	2.12	0.76	RNA
2	HCAEC_03.10.16_2	Admin	11/21/2016 12:13:26 PM	60.6	ng/µl	1.515	0.734	2.06	0.26	RNA
3	HCAEC_04.10.16_1	Admin	11/21/2016 12:14:07 PM	62.3	ng/µl	1.556	0.702	2.22	0.44	RNA
4	HCAEC_04.10.16_2	Admin	11/21/2016 12:14:42 PM	69.7	ng/µl	1.742	0.777	2.24	0.52	RNA
5	HCAEC_06.10.16_1	Admin	11/21/2016 12:15:17 PM	65.8	ng/µl	1.646	0.781	2.11	0.28	RNA
6	HCAEC_06.10.16_2	Admin	11/21/2016 12:15:35 PM	51.5	ng/µl	1.288	0.629	2.05	0.18	RNA
7	HCAEC_08.10.16_1	Admin	11/21/2016 12:16:00 PM	58.5	ng/µl	1.464	0.620	2.36	0.35	RNA
8	HCAEC_08.10.16_2	Admin	11/21/2016 12:16:17 PM	55.8	ng/µl	1.396	0.639	2.19	0.41	RNA
9	HCAEC_09.10.16_1	Admin	11/21/2016 12:16:38 PM	66.9	ng/µl	1.673	0.689	2.43	0.30	RNA
10	HCAEC_09.10.16_2	Admin	11/21/2016 12:16:54 PM	59.3	ng/µl	1.482	0.662	2.24	0.25	RNA
11	HCAEC_11.10.16_1	Admin	11/21/2016 12:17:17 PM	70.6	ng/µl	1.766	0.714	2.47	0.25	RNA
12	HCAEC_11.10.16_2	Admin	11/21/2016 12:17:35 PM	65.6	ng/µl	1.641	0.698	2.35	0.22	RNA
13	HCAEC_12.10.16_1	Admin	11/21/2016 12:17:59 PM	55.2	ng/µl	1.381	0.617	2.24	0.21	RNA
14	HCAEC_12.10.16_2	Admin	11/21/2016 12:18:15 PM	46.0	ng/µl	1.151	0.544	2.12	0.19	RNA
15	HCAEC_13.10.16_1	Admin	11/21/2016 12:18:37 PM	51.9	ng/µl	1.297	0.617	2.10	0.26	RNA
16	HCAEC_13.10.16_2	Admin	11/21/2016 12:18:55 PM	55.0	ng/µl	1.376	0.667	2.06	0.26	RNA

Abbildung 31 - Spektrophotometrische Bestimmung des RNS-Gehalts von HCAEC aus Flussversuchen (1/4). Dargestellt sind die verschiedenen Proben aus den Flussversuchen. Diese sind nach Datum des Versuchs gelistet. Nach Isolation der RNS aus den Zellpellets erfolgte die Bestimmung des RNS Gehalts (hier *Nucleic Acid Conc.*) und des 260/280-Quotienten.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type
1	HCAEC_02.12.16_1	Admin	3/6/2017 11:25:12 AM	45.8	ng/µl	1.145	0.532	2.15	0.84	RNA
2	HCAEC_02.12.16_2	Admin	3/6/2017 11:25:42 AM	45.5	ng/µl	1.138	0.525	2.17	0.84	RNA
3	HCAEC_04.12.16_1	Admin	3/6/2017 11:26:07 AM	57.9	ng/µl	1.447	0.665	2.18	0.29	RNA
4	HCAEC_04.12.16_2	Admin	3/6/2017 11:26:55 AM	56.3	ng/µl	1.408	0.648	2.17	0.28	RNA
5	HCAEC_08.12.16_1	Admin	3/6/2017 11:27:26 AM	34.4	ng/µl	0.859	0.387	2.22	0.08	RNA
6	HCAEC_08.12.16_2	Admin	3/6/2017 11:27:50 AM	34.6	ng/µl	0.866	0.397	2.18	0.08	RNA
7	HCAEC_09.12.16_1	Admin	3/6/2017 11:28:20 AM	55.5	ng/µl	1.387	0.654	2.12	1.49	RNA
8	HCAEC_09.12.16_2	Admin	3/6/2017 11:28:40 AM	54.3	ng/µl	1.358	0.634	2.14	1.50	RNA
9	HCAEC_10.12.16_1	Admin	3/6/2017 11:29:24 AM	38.2	ng/µl	0.954	0.436	2.19	0.16	RNA
10	HCAEC_10.12.16_2	Admin	3/6/2017 11:29:44 AM	38.3	ng/µl	0.957	0.434	2.20	0.16	RNA
11	HCAEC_11.12.16_1	Admin	3/6/2017 11:30:06 AM	35.7	ng/µl	0.892	0.386	2.31	0.06	RNA
12	HCAEC_11.12.16_2	Admin	3/6/2017 11:30:55 AM	35.1	ng/µl	0.877	0.387	2.27	0.06	RNA
13	HCAEC_12.12.16_1	Admin	3/6/2017 11:31:37 AM	18.2	ng/µl	0.454	0.205	2.22	0.21	RNA
14	HCAEC_12.12.16_2	Admin	3/6/2017 11:31:53 AM	18.5	ng/µl	0.463	0.206	2.25	0.22	RNA
15	HCAEC_13.12.16_1	Admin	3/6/2017 11:32:42 AM	51.3	ng/µl	1.283	0.600	2.14	0.99	RNA
16	HCAEC_13.12.16_2	Admin	3/6/2017 11:33:18 AM	51.8	ng/µl	1.295	0.615	2.11	0.99	RNA
17	HCAEC_14.12.16_1	Admin	3/6/2017 11:34:30 AM	74.5	ng/µl	1.862	0.877	2.12	0.31	RNA
18	HCAEC_14.12.16_2	Admin	3/6/2017 11:34:49 AM	75.6	ng/µl	1.891	0.887	2.13	0.31	RNA
19	HCAEC_15.12.16_1	Admin	3/6/2017 11:35:12 AM	43.2	ng/µl	1.081	0.508	2.13	0.56	RNA
20	HCAEC_15.12.16_1	Admin	3/6/2017 11:35:29 AM	43.5	ng/µl	1.087	0.499	2.18	0.56	RNA
#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type
1	HCAEC_15.03.17_1	Admin	5/4/2017 12:47:11 PM	33.2	ng/µl	0.829	0.367	2.26	0.29	RNA
2	HCAEC_15.03.17_2	Admin	5/4/2017 12:47:53 PM	33.3	ng/µl	0.832	0.365	2.28	0.28	RNA
3	HCAEC_19.12.17_1	Admin	5/4/2017 12:48:25 PM	39.8	ng/µl	0.996	0.440	2.26	0.34	RNA
4	HCAEC_19.12.17_2	Admin	5/4/2017 12:48:45 PM	39.5	ng/µl	0.987	0.426	2.32	0.34	RNA
5	HCAEC_20.12.17_1	Admin	5/4/2017 12:49:10 PM	28.7	ng/µl	0.717	0.297	2.41	0.19	RNA
6	HCAEC_20.12.17_2	Admin	5/4/2017 12:49:30 PM	28.6	ng/µl	0.716	0.289	2.48	0.19	RNA
7	HCAEC_11.01.17_2	Admin	5/4/2017 12:49:58 PM	17.5	ng/µl	0.437	0.157	2.79	0.15	RNA
8	HCAEC_11.01.17_1	Admin	5/4/2017 12:50:24 PM	17.8	ng/µl	0.446	0.176	2.54	0.15	RNA
9	HCAEC_16.01.17_1	Admin	5/4/2017 12:50:54 PM	36.6	ng/µl	0.914	0.401	2.28	0.18	RNA
10	HCAEC_16.01.17_2	Admin	5/4/2017 12:51:12 PM	36.6	ng/µl	0.915	0.387	2.36	0.18	RNA
11	HCAEC_19.01.17_1	Admin	5/4/2017 12:51:38 PM	46.0	ng/µl	1.149	0.508	2.26	0.11	RNA
12	HCAEC_19.01.17_2	Admin	5/4/2017 12:51:56 PM	45.5	ng/µl	1.137	0.497	2.29	0.11	RNA
13	HCAEC_20.01.17_1	Admin	5/4/2017 12:52:25 PM	31.8	ng/µl	0.795	0.339	2.35	0.13	RNA
14	HCAEC_20.01.17_2	Admin	5/4/2017 12:52:44 PM	32.4	ng/µl	0.810	0.344	2.35	0.13	RNA
15	HCAEC_22.01.17_1	Admin	5/4/2017 12:53:12 PM	53.3	ng/µl	1.333	0.595	2.24	1.35	RNA
16	HCAEC_22.01.17_1	Admin	5/4/2017 12:53:29 PM	54.0	ng/µl	1.349	0.618	2.18	1.37	RNA
17	HCAEC_23.01.17_1	Admin	5/4/2017 12:53:59 PM	30.0	ng/µl	0.751	0.333	2.25	0.83	RNA
18	HCAEC_23.01.17_2	Admin	5/4/2017 12:54:19 PM	30.3	ng/µl	0.759	0.329	2.31	0.84	RNA
19	HCAEC_24.01.17_1	Admin	5/4/2017 12:54:45 PM	44.6	ng/µl	1.116	0.506	2.20	0.37	RNA
20	HCAEC_24.01.17_2	Admin	5/4/2017 12:55:06 PM	44.4	ng/µl	1.110	0.498	2.23	0.38	RNA
21	HCAEC_25.01.17_1	Admin	5/4/2017 12:56:24 PM	59.5	ng/µl	1.488	0.690	2.16	2.12	RNA
22	HCAEC_25.01.17_2	Admin	5/4/2017 12:56:45 PM	59.7	ng/µl	1.492	0.699	2.14	2.08	RNA
23	HCAEC_26.01.17_1	Admin	5/4/2017 12:57:27 PM	65.9	ng/µl	1.647	0.763	2.16	1.44	RNA
24	HCAEC_26.01.17_2	Admin	5/4/2017 12:57:47 PM	63.7	ng/µl	1.593	0.738	2.16	1.43	RNA
25	HCAEC_17.01.17_1	Admin	5/4/2017 12:58:45 PM	37.6	ng/µl	0.940	0.416	2.26	2.90	RNA
26	HCAEC_17.01.17_2	Admin	5/4/2017 12:59:05 PM	37.4	ng/µl	0.934	0.412	2.27	3.01	RNA
27	HCAEC_18.01.17_1	Admin	5/4/2017 12:59:31 PM	33.1	ng/µl	0.828	0.370	2.24	1.83	RNA
28	HCAEC_18.01.17_2	Admin	5/4/2017 12:59:49 PM	32.1	ng/µl	0.801	0.350	2.29	2.78	RNA

Abbildung 32 - Spektrophotometrische Bestimmung des RNS-Gehalts von HCAEC aus Flussversuchen (2/4). Dargestellt sind die verschiedenen Proben aus den Flussversuchen. Diese sind nach Datum des Versuchs gelistet. Nach Isolation der RNS aus den Zellpellets erfolgte die Bestimmung des RNS Gehalts (hier *Nucleic Acid Conc.*) und des 260/280-Quotienten.

Sample Results		HCAEC			RNA Iso 22.7.2019							
Sample Read#	Location	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/ μ L		600ng	bis 15,4 μ l	
n=1												
10dyn	1	0.137	0.093	0.052	0.08	0.038	2.093	64.028	61,5525	9,75	5,65	
		0.13	0.09	0.051	0.074	0.036	2.069	59,077				
10dyn+ML	2	0.095	0.078	0.057	0.034	0.018	1.844	27.116	25,6445	23,40		
		0.079	0.062	0.044	0.03	0.015	1.987	24.173				
10dyn+0,1 μ M Ator.	3	0.114	0.083	0.052	0.057	0.028	2.036	45.603	43,9275	13,66	1,74	
		0.128	0.103	0.071	0.053	0.029	1.822	42.252				
10dyn+1 μ M Ator.	4	0.109	0.075	0.043	0.061	0.029	2.099	49.042	49,611	12,09	3,31	
		0.112	0.079	0.046	0.063	0.031	2.049	50.18				
10dyn+ML221 +0,1 μ M Ator.	5	0.141	0.098	0.056	0.082	0.04	2.058	65.27	65,4165	9,17	6,23	
		0.137	0.093	0.051	0.082	0.04	2.052	65.563				
10dyn+ML221 +1 μ M Ator.	6	0.147	0.098	0.048	0.095	0.047	2.019	75.971	75,889	7,91	7,49	
		0.152	0.099	0.053	0.095	0.044	2.154	75.807				
10dyn+0,1 μ M Prava.	7	0.124	0.082	0.043	0.077	0.036	2.106	61.246	62,263	9,64	5,76	
		0.141	0.098	0.058	0.079	0.038	2.092	63.28				
10dyn+1 μ M Prava.	8	0.119	0.08	0.044	0.07	0.033	2.1	56.239	56,295	10,66	4,74	
		0.122	0.084	0.047	0.07	0.034	2.043	56.351				
10dyn+ML221 +0,1 μ M Prava	9	0.109	0.078	0.051	0.054	0.024	2.208	42.897	41,999	14,29	1,11	
		0.099	0.071	0.044	0.051	0.024	2.105	41.101				
10dyn+ML221 +1 μ M Prava	10	0.122	0.089	0.056	0.061	0.031	1.997	48.84	47,285	12,69	2,71	
		0.108	0.076	0.046	0.057	0.027	2.087	45.73				
n=2												
10dyn	11	0.12	0.082	0.046	0.07	0.033	2.089	55.949	57,336	10,46	4,94	
		0.194	0.158	0.116	0.073	0.039	1.861	58.723				
10dyn+ML	12	0.162	0.103	0.05	0.108	0.051	2.115	86.422	85,1205	7,05	8,35	
		0.157	0.1	0.048	0.105	0.049	2.126	83.819				
10dyn+0,1 μ M Ator.	13	0.103	0.077	0.052	0.048	0.023	2.043	38.061	37,256	16,10		
		0.095	0.069	0.045	0.046	0.021	2.141	36.451				
10dyn+1 μ M Ator.	14	0.108	0.075	0.046	0.058	0.027	2.16	46.188	47,526	12,62	2,78	
		0.112	0.079	0.047	0.061	0.03	2.033	48.864				
10dyn+ML221 +0,1 μ M Ator.	15	0.114	0.077	0.042	0.068	0.032	2.108	54.106	55,425	10,83	4,57	
		0.131	0.093	0.056	0.071	0.035	2.037	56.744				
10dyn+ML221 +1 μ M Ator.	16	0.107	0.075	0.044	0.058	0.028	2.071	46.272	44,9405	13,35	2,05	
		0.111	0.081	0.052	0.055	0.026	2.099	43.609				
10dyn+0,1 μ M Prava.	17	0.133	0.09	0.052	0.076	0.035	2.163	60.863	62,425	9,61	5,79	
		0.133	0.087	0.048	0.08	0.037	2.187	63.987				
10dyn+1 μ M Prava.	18	0.138	0.101	0.059	0.075	0.039	1.911	59.623	56,6395	10,59	4,81	
		0.123	0.084	0.051	0.067	0.03	2.231	53.656				
10dyn+ML221 +0,1 μ M Prava	19	0.139	0.092	0.052	0.083	0.038	2.192	66.216	66,5275	9,02	6,38	
		0.14	0.094	0.052	0.084	0.039	2.124	66.839				
10dyn+ML221 +1 μ M Prava	20	0.137	0.094	0.053	0.079	0.038	2.065	63.259	62,2725	9,64	5,76	
		0.13	0.089	0.049	0.077	0.037	2.065	61.286				

Abbildung 33 - Spektrophotometrische Bestimmung des RNS-Gehalts von HCAEC aus Flussversuchen (3/4). Dargestellt sind die verschiedenen Proben aus den Flussversuchen. Diese sind nach Datum des Versuchs gelistet. Nach Isolation der RNS aus den Zellpellets erfolgte die Bestimmung des RNS Gehalts (hier *Nucleic Acid Conc.*) und des 260/280-Quotienten. Ausgabe in Excel.

Sample Results		RNA Iso am 23.7.2019									
n=3											
Sample Read#	Location	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/ μ L	500mg	bis 15.4	
10dyne	21	0,143	0,103	0,063	0,076	0,038	2,017	60,663	59,956	8,34	7,06
		0,123	0,082	0,045	0,074	0,035	2,122	59,249			
10dyne + ML	22	0,149	0,105	0,062	0,083	0,04	2,038	66,006	63,972	7,82	7,58
		0,134	0,09	0,051	0,077	0,037	2,115	61,938			
10dyne + 0,1 μ M Atorva	23	0,096	0,071	0,046	0,045	0,022	2,02	36,251	35,81	13,96	1,44
		0,093	0,068	0,045	0,044	0,021	2,132	35,369			
10dyne + 1 μ M Atorva	24	0,089	0,067	0,044	0,041	0,02	2,007	32,788	32,795	15,25	0,15
		0,095	0,072	0,05	0,041	0,02	2,078	32,801			
10dyne + ML221 + 0,1 μ M Atorva	25	0,164	0,149	0,129	0,031	0,018	1,747	25,015	26,885	18,60	
		0,091	0,073	0,051	0,036	0,019	1,883	28,754			
10dyne + ML221 + 1 μ M Atorva	26	0,095	0,07	0,047	0,043	0,021	2,08	34,362	34,778	14,38	1,02
		0,098	0,075	0,05	0,044	0,022	1,975	35,193			
10dyne + 0,1 μ M Prava	27	0,089	0,07	0,052	0,033	0,016	2,028	26,239	26,252	19,05	
		0,082	0,063	0,045	0,033	0,016	2,092	26,265			
10dyne + 1 μ M Prava	28	0,092	0,076	0,058	0,03	0,016	1,895	24,298	23,988	20,84	
		0,079	0,063	0,046	0,03	0,015	1,993	23,678			
10dyne + ML221 + 0,1 μ M Prava	29	0,137	0,098	0,061	0,071	0,034	2,086	56,708	55,933	8,94	6,46
		0,127	0,089	0,053	0,069	0,033	2,064	55,157			
10dyne + ML221 + 1 μ M Prava	30	0,144	0,106	0,063	0,076	0,04	1,888	61,011	59,652	8,38	7,02
		0,123	0,084	0,045	0,073	0,036	2,052	58,292			

Sample Results		RNA Iso am 5.8.2019									
n=4											
Sample Read#	Location	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/ μ L	500ng	bis 15,4 μ l	
10dyn	31	0,089	0,072	0,054	0,028	0,013	2,044	22,002	24,1865	20,67269	
		0,091	0,071	0,051	0,033	0,015	2,191	26,371			
10dyn+ML	32	0,157	0,111	0,062	0,086	0,043	1,986	68,979	65,6365	7,617713	7,782287
		0,13	0,086	0,044	0,078	0,037	2,13	62,294			
10dyn+0,1 μ M Ator.	33	0,08	0,063	0,047	0,026	0,012	2,284	21,09	21,088	23,71017	-8,310167
		0,078	0,06	0,044	0,026	0,011	2,387	21,086			
10dyn+1 μ M Ator.	34	0,102	0,076	0,052	0,043	0,02	2,172	34,345	33,273	15,0272	0,372801
		0,097	0,073	0,05	0,04	0,018	2,178	32,201			
10dyn+ML221 + 0,1 μ M Ator.	35	0,124	0,093	0,062	0,055	0,027	2,033	43,966	41,325	12,09921	3,300786
		0,104	0,075	0,048	0,048	0,022	2,185	38,684			
10dyn+0,1 μ M Prava.	37	0,104	0,075	0,048	0,049	0,023	2,149	39,021	40,196	12,43905	2,960951
		0,104	0,073	0,044	0,052	0,024	2,145	41,371			
10dyn+1 μ M Prava.	38	0,102	0,072	0,043	0,051	0,024	2,128	41,015	40,87	12,23391	3,166088
		0,106	0,075	0,047	0,051	0,023	2,203	40,725			
10dyn+ML221 + 0,1 μ M Prava	39	0,108	0,077	0,051	0,05	0,021	2,323	39,866	40,194	12,43967	2,960332
		0,134	0,103	0,076	0,051	0,022	2,265	40,522			
10dyn+ML221 + 1 μ M Prava	40	0,14	0,099	0,058	0,074	0,035	2,095	59,201	59,4165	8,415171	6,984829
		0,127	0,085	0,044	0,075	0,036	2,08	59,632			
bei n=4fehlt Nr.36											
n=5											
10dyn	41	0,093	0,069	0,046	0,039	0,018	2,196	31,277	34,7465	14,38994	1,010061
		0,116	0,09	0,06	0,048	0,024	1,951	38,216			
10dyn+ML	42	0,111	0,076	0,043	0,061	0,028	2,175	48,642	47,014	10,63513	4,76487
		0,11	0,076	0,046	0,057	0,025	2,263	45,386			
10dyn+0,1 μ M Ator.	43	0,127	0,087	0,051	0,068	0,031	2,199	54,738	54,4875	9,176417	6,223583
		0,122	0,083	0,047	0,068	0,031	2,179	54,237			
10dyn+ML221 + 0,1 μ M Ator.	45	0,101	0,074	0,048	0,046	0,021	2,196	36,552	37,128	13,46693	1,933075
		0,099	0,071	0,044	0,047	0,022	2,14	37,704			
10dyn+0,1 μ M Prava.	47	0,143	0,091	0,043	0,092	0,043	2,152	73,939	74,3875	6,721559	8,678441
		0,151	0,098	0,05	0,094	0,044	2,139	74,836			
10dyn+1 μ M Prava.	48	0,112	0,079	0,045	0,059	0,028	2,085	46,826	45,8505	10,90501	4,494994
		0,108	0,075	0,044	0,056	0,026	2,148	44,875			
10dyn+ML221 + 0,1 μ M Prava	49	0,108	0,083	0,058	0,042	0,02	2,126	33,32	32,511	15,37941	0,02059
		0,097	0,073	0,05	0,04	0,018	2,162	31,702			
10dyn+ML221 + 1 μ M Prava	50	0,126	0,103	0,07	0,048	0,028	1,728	38,771	36,465	13,71178	1,688222
		0,099	0,073	0,049	0,043	0,019	2,222	34,159			

Abbildung 34 - Spektrophotometrische Bestimmung des RNS-Gehalts von HCAEC aus Flussversuchen (4/4). Dargestellt sind die verschiedenen Proben aus den Flussversuchen. Diese sind nach Datum des Versuchs gelistet. Nach Isolation der RNS aus den Zellpellets erfolgte die Bestimmung des RNS Gehalts (hier *Nucleic Acid Conc.*) und des 260/280-Quotienten. Ausgabe in Excel.

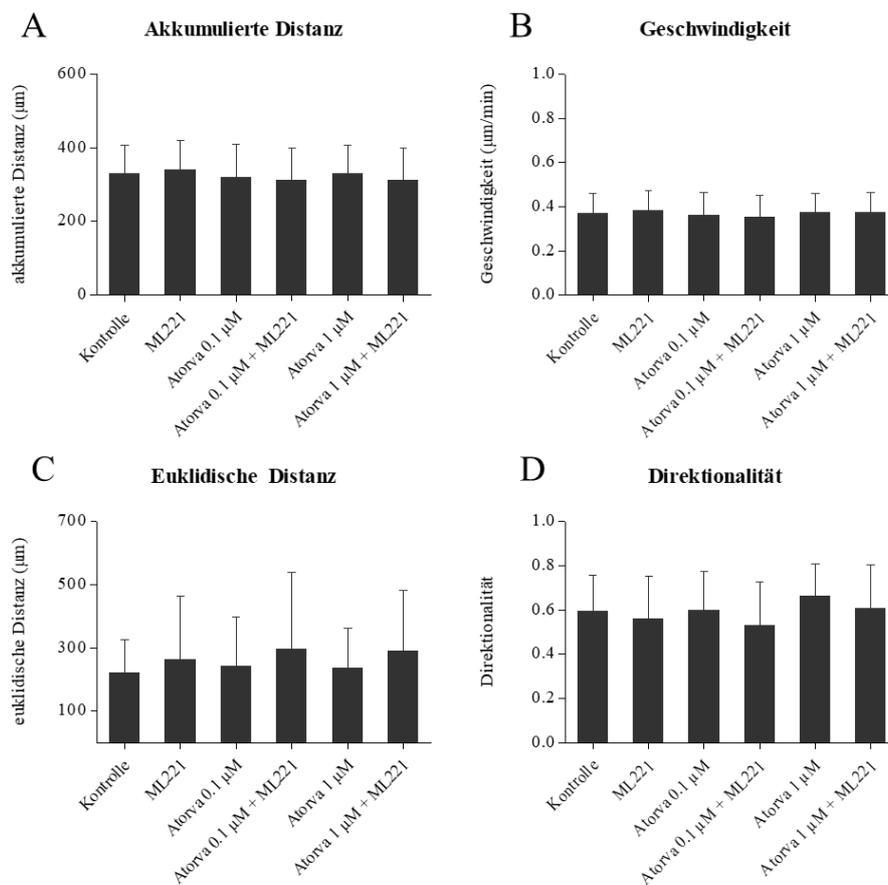


Abbildung 35 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Atorvastatin behandelten HCAEC (10 dyne/cm²), zweiter Spender. HCAEC wurden 15 h mit einer Schubspannung von 10 dyne/cm² behandelt. Die Behandlung mit ML221 führt zu keiner Veränderung der akkumulierten Distanz (Abb. 9A) und Geschwindigkeit (Abb. 9B) in mit Atorvastatin behandelten Zellen. Bei der euklidischen Distanz (Abb. 9C) und der Direktionalität (Abb. 9D) zeigte sich der gleiche Effekt. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD aus jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n = 5). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

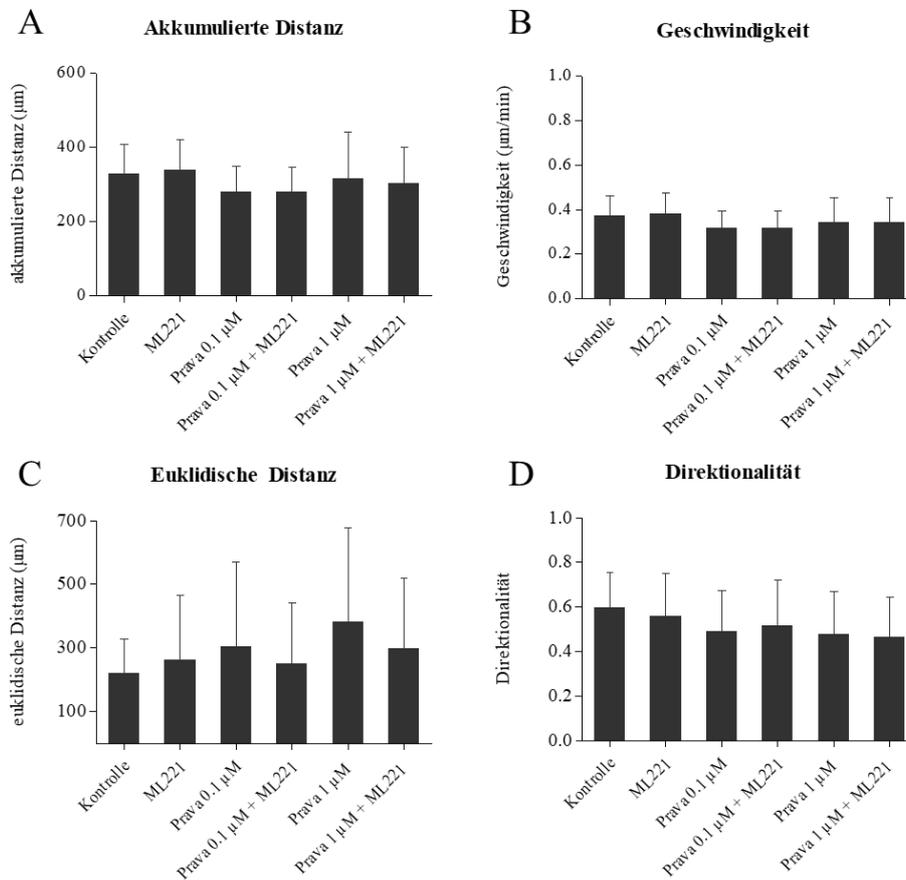


Abbildung 36 - Einfluss des APLNR auf die Migration von mit Pravastatin behandelten HCAEC (10 dyne/cm²), zweiter Spender. HCAEC wurden 15 h mit einer Schubspannung von 10 dyne/cm² behandelt. Die Behandlung mit ML221 führt zu keiner Veränderung der akkumulierten Distanz (Abb. 9A) und Geschwindigkeit (Abb. 9B) in mit Pravastatin behandelten Zellen. Bei der euklidischen Distanz (Abb. 9C) und der Direktionalität (Abb. 9D) zeigte sich der gleiche Effekt. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD aus jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n = 5). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet (p < 0,05).

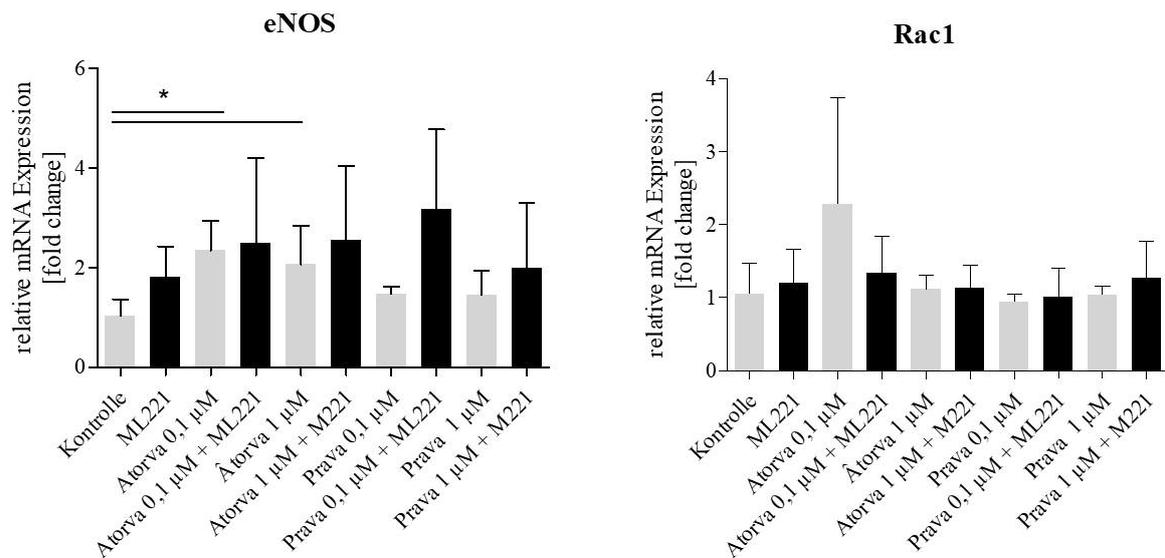


Abbildung 37 - Genexpression von eNOS und Rac1 in HUVEC (10 dyne/cm²). HUVEC wurden 15 h einer Schubspannung von 10 dyne/cm² ausgesetzt. Nach dem Versuch wurden die abgelösten Zellen mittels qPCR untersucht. Hier zeigte sich einzig eine signifikante Änderung der Genexpression der eNOS zwischen der Kontrolle und den mit Atorvastatin behandelten Zellen. Abgebildet sind die Mittelwerte und SD von auf das Housekeeping-Gen B2M normalisierten, jeweils voneinander unabhängigen Versuchen (n ≥ 3).

Literatur

1. © Statistisches Bundesamt (Destatis). Statistisches Bundesamt Deutschland - GENESIS-Online: © Statistisches Bundesamt (Destatis),; 2020 [Stand: 12.02.2020]. Verfügbar unter: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23211-0002>.
2. World health statistics 2018: Monitoring health for the SDGs. Geneva: World Health Organization; 2018.
3. Deutsche Herzstiftung e.V. Deutscher Herzbericht 2018: 30. Bericht/Sektorenübergreifende Versorgungsanalyse zur Kardiologie, Herzchirurgie und Kinderherzmedizin in Deutschland. Frankfurt: Deutsche Herzstiftung; 2018.
4. Kaptoge S, Pennells L, Bacquer D de, Cooney MT, Kavousi M, Stevens G et al. World Health Organization cardiovascular disease risk charts: Revised models to estimate risk in 21 global regions. *The Lancet Global Health* 2019; 7(10):e1332-e1345. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30318-3.
5. World Health Organisation. The Top 10 Causes Of Death: Fact Sheet; 2020. Verfügbar unter: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
6. Robert Koch-Institut. 12-Monats-Prävalenz einer koronaren Herzkrankheit in Deutschland; 2017.
7. Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2013; 56(5-6):650–5. doi: 10.1007/s00103-013-1666-9.
8. Scheidt-Nave C, Du Y, Knopf H, Schienkiewitz A, Ziese T, Nowossadeck E et al. Verbreitung von Fettstoffwechselstörungen bei Erwachsenen in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2013; 56(5-6):661–7. doi: 10.1007/s00103-013-1670-0.
9. Ford ES, Ajani UA, Croft JB, Critchley JA, Labarthe DR, Kottke TE et al. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000. *N Engl J Med* 2007; 356(23):2388–98. doi: 10.1056/NEJMsa053935.

Literaturverzeichnis

10. Laatikainen T, Critchley J, Vartiainen E, Salomaa V, Ketonen M, Capewell S. Explaining the decline in coronary heart disease mortality in Finland between 1982 and 1997. *Am J Epidemiol* 2005; 162(8):764–73. doi: 10.1093/aje/kwi274.
11. Kuulasmaa K, Tunstall-Pedoe H, Dobson A, Fortmann S, Sans S, Tolonen H et al. Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *The Lancet* 2000; 355(9205):675–87. doi: 10.1016/s0140-6736(99)11180-2.
12. Tebbe U, Messer C, Stammwitz E, The GS, Dietl J, Bischoff K-O et al. Rückgang der Krankenhaus-Sterblichkeit und verbesserte Sekundärprävention nach akutem Myokardinfarkt. Erste Ergebnisse des SAMI-Registers. *Dtsch Med Wochenschr* 2007; 132(30):1559–66. doi: 10.1055/s-2007-984934.
13. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, Burns R, Rayner M, Townsend. *European Cardiovascular Disease Statistics 2017*. Brussels: European Heart Network; 2017.
14. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz-und Kreislau fforschung e.V. *ESC Pocket Guidelines. Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Version 2016*. Grünwald: Börm Bruckmeier Verlag GmbH; 2017.
15. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL et al. 2016 *European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)* Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J* 2016; 37(29):2315–81. doi: 10.1093/eurheartj/ehw106.
16. Keil U, Fitzgerald AP, Gohlke H, Wellmann J, Hense H-W. Risikoabschätzung tödlicher Herz-Kreislauf-Erkrankungen: Die neuen SCORE-Deutschland-Tabellen für die Primärprävention. *Deutsches Ärzteblatt* 2005; 102(25):1808–12.
17. Perk J, Backer G de, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M et al. *European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012)*. The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of

Literaturverzeichnis

- nine societies and by invited experts). *Eur Heart J* 2012; 33(13):1635–701. doi: 10.1093/eurheartj/ehs092.
18. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47(8 Suppl):C7-12. doi: 10.1016/j.jacc.2005.09.068.
19. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow. *Acta Physiol (Oxf)* 2017; 219(2):382–408. doi: 10.1111/apha.12725.
20. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011; 17(11):1410–22. doi: 10.1038/nm.2538.
21. Wentzel JJ, Chatzizisis YS, Gijzen FJH, Giannoglou GD, Feldman CL, Stone PH. Endothelial shear stress in the evolution of coronary atherosclerotic plaque and vascular remodelling: Current understanding and remaining questions. *Cardiovasc Res* 2012; 96(2):234–43. doi: 10.1093/cvr/cvs217.
22. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420(6917):868–74. doi: 10.1038/nature01323.
23. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Douudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: Process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* 2014; 5(8):927–46.
24. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta* 2010; 411(23-24):1875–82. doi: 10.1016/j.cca.2010.08.038.
25. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(6):427–39. doi: 10.1038/nri2779.
26. Aday AW, Ridker PM. Antiinflammatory Therapy in Clinical Care: The CANTOS Trial and Beyond. *Front Cardiovasc Med* 2018; 5:62. doi: 10.3389/fcvm.2018.00062.
27. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med* 2013; 368(21):2004–13. doi: 10.1056/NEJMra1216063.
28. Zimmer S, Grebe A, Latz E. Danger Signaling in Atherosclerosis. *Circ Res* 2015; 116(2):323–40. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.301135.
29. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973; 180(4093):1332–9. doi: 10.1126/science.180.4093.1332.
30. Kolodgie FD, Burke AP, Nakazawa G, Virmani R. Is pathologic intimal thickening the key to understanding early plaque progression in human atherosclerotic disease?

Literaturverzeichnis

- Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 27(5):986–9. doi: 10.1161/ATVBAHA.0000258865.44774.41.
31. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 2017; 377(12):1119–31. doi: 10.1056/NEJMoa1707914.
 32. Klose G, Laufs U, März W, Windler E. Familial Hypercholesterolemia. *Deutsches Ärzteblatt international* 2014. doi: 10.3238/arztebl.2014.0523.
 33. Helkin A, Stein JJ, Lin S, Siddiqui S, Maier KG, Gahtan V. Dyslipidemia Part 1--Review of Lipid Metabolism and Vascular Cell Physiology. *Vasc Endovascular Surg* 2016; 50(2):107–18. doi: 10.1177/1538574416628654.
 34. Pirillo A, Casula M, Olmastroni E, Norata GD, Catapano AL. Global epidemiology of dyslipidaemias. *Nat Rev Cardiol* 2021; 18(10):689–700. doi: 10.1038/s41569-021-00541-4.
 35. Lehnert H. Rationelle Diagnostik und Therapie in Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2015.
 36. Catapano AL, Graham I, Backer G de, Wiklund O, Chapman MJ, Drexel H et al. 2016 ESC/EAS Guidelines for the Management of Dyslipidaemias. *Eur Heart J* 2016; 37(39):2999–3058. doi: 10.1093/eurheartj/ehw272.
 37. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* 2020; 41(1):111–88. doi: 10.1093/eurheartj/ehz455.
 38. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, Rader DJ, Rouleau JL, Belder R et al. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2004; 350(15):1495–504. doi: 10.1056/NEJMoa040583.
 39. Herold G, Hrsg. Innere Medizin 2018: Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold; 2018.
 40. Harrison TR, Kasper DL, Suttrop N. *Harrisons Innere Medizin*. 20., überarbeitete Auflage; 2020.

Literaturverzeichnis

41. Arastéh K, Baenkler H-W, Bieber C, Brandt R, Chatterjee T, Dill T et al. Innere Medizin. 4., überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018. (Duale Reihe).
42. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92(3):657–71. doi: 10.1161/01.cir.92.3.657.
43. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: The pathologists' view. *Eur Heart J* 2013; 34(10):719–28. doi: 10.1093/eurheartj/ehs411.
44. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ* 2013; 22(6):399–411. doi: 10.1016/j.hlc.2013.03.001.
45. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz-und Kreislaufforschung e.V. (2018) ESC Pocket Guidelines. Therapie des akuten Herzinfarktes bei Patienten mit ST-Streckenhebung (STEMI), Version 2017; 2017 [Stand: 17.03.2020]. Verfügbar unter: https://leitlinien.dgk.org/files/2018_pocket_leitlinie_stemi_2.auflage_internetversion.pdf.
46. Hamon M, Pristipino C, Di Mario C, Nolan J, Ludwig J, Tubaro M et al. Consensus document on the radial approach in percutaneous cardiovascular interventions: Position paper by the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions and Working Groups on Acute Cardiac Care** and Thrombosis of the European Society of Cardiology. *EuroIntervention* 2013; 8(11):1242–51. doi: 10.4244/EIJV8I11A192.
47. Erbel R, Baars T. Herzkatheter-Manual: Diagnostik und interventionelle Therapie ; mit 211 Tabellen ; Patientenbroschüren und das Handbuch des Herzinfarktverbundes Essen auf CD-ROM ; [mit CD-ROM]. Köln: Dt. Ärzte-Verl.; 2012.
48. Bonzel T, Erbel R, Hamm CW, Levenson B, Neumann F-J, Rupprecht H-J et al. Perkutane Koronarinterventionen (PCI). *Clin Res Cardiol* 2008; 97(8):513–47. doi: 10.1007/s00392-008-0697-y.
49. Neumann F-J, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J* 2019; 40(2):87–165. doi: 10.1093/eurheartj/ehy394.
50. Htay T, Liu MW. Drug-eluting stent: A review and update. *Vasc Health Risk Manag* 2005; 1(4):263–76. doi: 10.2147/vhrm.2005.1.4.263.

Literaturverzeichnis

51. Stone GW, Ellis SG, Cannon L, Mann JT, Greenberg JD, Spriggs D et al. Comparison of a polymer-based paclitaxel-eluting stent with a bare metal stent in patients with complex coronary artery disease: A randomized controlled trial. *JAMA* 2005; 294(10):1215–23. doi: 10.1001/jama.294.10.1215.
52. Marks AR. Sirolimus for the prevention of in-stent restenosis in a coronary artery. *N Engl J Med* 2003; 349(14):1307–9. doi: 10.1056/NEJMp038141.
53. Kang S-H, Park KW, Kang D-Y, Lim W-H, Park KT, Han J-K et al. Biodegradable-polymer drug-eluting stents vs. bare metal stents vs. durable-polymer drug-eluting stents: A systematic review and Bayesian approach network meta-analysis. *Eur Heart J* 2014; 35(17):1147–58. doi: 10.1093/eurheartj/ehf570.
54. Kerkmeijer LS, Tenekecioglu E, Wykrzykowska JJ. Stent thrombosis in patients with drug--eluting stents and bioresorbable vascular scaffolds: The feared complication. *Polish archives of internal medicine* 2018; 128(1):52–9. doi: 10.20452/pamw.4180.
55. Harrington RA. Statins-Almost 30 Years of Use in the United States and Still Not Quite There. *JAMA Cardiol* 2017; 2(1):66. doi: 10.1001/jamacardio.2016.4709.
56. Jones PH, Davidson MH, Stein EA, Bays HE, McKenney JM, Miller E et al. Comparison of the efficacy and safety of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin across doses (STELLAR**STELLAR = Statin Therapies for Elevated Lipid Levels compared Across doses to Rosuvastatin. Trial). *The American Journal of Cardiology* 2003; 92(2):152–60. doi: 10.1016/S0002-9149(03)00530-7.
57. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacol Res* 2014; 88:3–11. doi: 10.1016/j.phrs.2014.03.002.
58. Björnsson ES. Hepatotoxicity of statins and other lipid-lowering agents. *Liver Int* 2017; 37(2):173–8. doi: 10.1111/liv.13308.
59. Selva-O’Callaghan A, Alvarado-Cardenas M, Pinal-Fernández I, Trallero-Araguás E, Milisenda JC, Martínez MÁ et al. Statin-induced myalgia and myositis: An update on pathogenesis and clinical recommendations. *Expert Review of Clinical Immunology* 2018; 14(3):215–24. doi: 10.1080/1744666X.2018.1440206.
60. Heart Protection Study Collaborative Group. Randomized trial of the effects of cholesterol-lowering with simvastatin on peripheral vascular and other major vascular outcomes in 20,536 people with peripheral arterial disease and other high-risk conditions. *J Vasc Surg* 2007; 45(4):645-654; discussion 653-4. doi: 10.1016/j.jvs.2006.12.054.

Literaturverzeichnis

61. Aboyans V, Ricco J-B, Bartelink M-LEL, Björck M, Brodmann M, Cohnert T et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur Heart J* 2018; 39(9):763–816. doi: 10.1093/eurheartj/ehx095.
62. Deutsche Schlaganfall-Gesellschaft, Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN). Sekundärprophylaxe ischämischer Schlaganfall und transitorische ischämische Attacke: S3-Leitlinie – Teil 1 (Langversion):1–60.
63. Barter PJ, Brandrup-Wognsen G, Palmer MK, Nicholls SJ. Effect of statins on HDL-C: A complex process unrelated to changes in LDL-C: analysis of the VOYAGER Database. *J Lipid Res* 2010; 51(6):1546–53. doi: 10.1194/jlr.P002816.
64. Sharma A, Joshi PH, Rinehart S, Thakker KM, Lele A, Voros S. Baseline very low-density lipoprotein cholesterol is associated with the magnitude of triglyceride lowering on statins, fenofibric acid, or their combination in patients with mixed dyslipidemia. *J Cardiovasc Transl Res* 2014; 7(4):465–74. doi: 10.1007/s12265-014-9559-3.
65. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343(6257):425–30. doi: 10.1038/343425a0.
66. van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997; 11(18):2295–322. doi: 10.1101/gad.11.18.2295.
67. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res* 2017; 120(1):229–43. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308537.
68. Oesterle A, Liao JK. The Pleiotropic Effects of Statins - From Coronary Artery Disease and Stroke to Atrial Fibrillation and Ventricular Tachyarrhythmia. *Curr Vasc Pharmacol* 2019; 17(3):222–32. doi: 10.2174/1570161116666180817155058.
69. Sadowitz B, Maier KG, Gahtan V. Basic science review: Statin therapy--Part I: The pleiotropic effects of statins in cardiovascular disease. *Vasc Endovascular Surg* 2010; 44(4):241–51. doi: 10.1177/1538574410362922.
70. Rezaie-Majd A, Maca T, Bucek RA, Valent P, Müller MR, Husslein P et al. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin-6, interleukin-8, and monocyte

Literaturverzeichnis

- chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(7):1194–9. doi: 10.1161/01.atv.0000022694.16328.cc.
71. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000; 102(18):2165–8. doi: 10.1161/01.cir.102.18.2165.
72. Kim MH, Kim C-E, Kim S-W. Rosuvastatin inhibits high glucose-stimulated upregulation of VCAM-1 via the MAPK-signalling pathway in endothelial cells. *Acta Cardiol* 2018; 73(1):13–8. doi: 10.1080/00015385.2017.1321908.
73. Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(5):769–75. doi: 10.1161/01.ATV.0000068646.76823.AE.
74. Florian Lorenz. Der Einfluss von Statinen auf die endotheliale Proliferation und flussinduzierte Migration [Dissertation]. Greifswald: Universität Greifswald; 2018.
75. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 1987; 18(3):234–9.
76. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* 2004; 93(1):105–13. doi: 10.1093/bja/ae163.
77. Gimbrone MA, JR, Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* 2016; 118(4):620–36. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
78. Bar RS, Boes M. Distinct receptors for IGF-I, IGF-II, and insulin are present on bovine capillary endothelial cells and large vessel endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 124(1):203–9. doi: 10.1016/0006-291x(84)90937-9.
79. Rensing KL, Thüsen JH von der, Weijers EM, Houttuijn Bloemendaal FM, van Lammeren GW, Vink A et al. Endothelial insulin receptor expression in human atherosclerotic plaques: Linking micro- and macrovascular disease in diabetes? *Atherosclerosis* 2012; 222(1):208–15. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.035.
80. Thomas H. Adair and Jean-Pierre Montani, Hrsg. *Angiogenesis*. San Rafael (CA) 2010.
81. Li S, Butler P, Wang Y, Hu Y, Han DC, Usami S et al. The role of the dynamics of focal adhesion kinase in the mechanotaxis of endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(6):3546–51. doi: 10.1073/pnas.052018099.

Literaturverzeichnis

82. Michaelis UR. Mechanisms of endothelial cell migration. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71(21):4131–48. doi: 10.1007/s00018-014-1678-0.
83. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 2007; 100(6):782–94. doi: 10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e.
84. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996; 84(3):359–69.
85. Nobes CD, Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995; 81(1):53–62. doi: 10.1016/0092-8674(95)90370-4.
86. Treppe X, Chen Z, Jacobson K. Cell migration. *Compr Physiol* 2012; 2(4):2369–92. doi: 10.1002/cphy.c110012.
87. Hayer A, Shao L, Chung M, Joubert L-M, Yang HW, Tsai F-C et al. Engulfed cadherin fingers are polarized junctional structures between collectively migrating endothelial cells. *Nat Cell Biol* 2016; 18(12):1311–23. doi: 10.1038/ncb3438.
88. Mayor R, Etienne-Manneville S. The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17(2):97–109. doi: 10.1038/nrm.2015.14.
89. Hahn C, Schwartz MA. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(1):53–62. doi: 10.1038/nrm2596.
90. Zhou J, Li Y-S, Chien S. Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34(10):2191–8. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303422.
91. Papaioannou TG, Stefanadis C. Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hellenic J Cardiol* 2005; 46(1):9–15.
92. Fernandes DC, Araujo TL, Laurindo FR, Tanaka LY. Hemodynamic Forces in the Endothelium: From Mechanotransduction to Implications on Development of Atherosclerosis. In: *Endothelium and Cardiovascular Diseases: Chapter 7: Hemodynamic Forces in the Endothelium: From Mechanotransduction to Implications on Development of Atherosclerosis*: Elsevier; 2018. S. 85–95.
93. Nigro P, Abe J-I, Berk BC. Flow shear stress and atherosclerosis: A matter of site specificity. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(5):1405–14. doi: 10.1089/ars.2010.3679.

Literaturverzeichnis

94. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251(2):471–6. doi: 10.1006/bbrc.1998.9489.
95. Arnold M. Katz. *Physiology of the Heart*. Fifth Edition: Lippincott Williams and Wilkins; 2010.
96. Maguire JJ, Kleinz MJ, Pitkin SL, Davenport AP. Pylapelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension* 2009; 54(3):598–604. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134619.
97. Chng SC, Ho L, Tian J, Reversade B. ELABELA: A hormone essential for heart development signals via the apelin receptor. *Dev Cell* 2013; 27(6):672–80. doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.002.
98. Pauli A, Norris ML, Valen E, Chew G-L, Gagnon JA, Zimmerman S et al. Toddler: An embryonic signal that promotes cell movement via Apelin receptors. *Science* 2014; 343(6172):1248636. doi: 10.1126/science.1248636.
99. Kleinz MJ, Davenport AP. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul Pept* 2004; 118(3):119–25. doi: 10.1016/j.regpep.2003.11.002.
100. O'Carroll A-M, Lolait SJ, Harris LE, Pope GR. The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. *J Endocrinol* 2013; 219(1):R13-35. doi: 10.1530/JOE-13-0227.
101. Tatemoto K, Takayama K, Zou M-X, Kumaki I, Zhang W, Kumano K et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 2001; 99(2-3):87–92. doi: 10.1016/S0167-0115(01)00236-1.
102. Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J* 2004; 18(15):1909–11. doi: 10.1096/fj.04-1930fje.
103. Kwon H-B, Wang S, Helker CSM, Rasouli SJ, Maischein H-M, Offermanns S et al. In vivo modulation of endothelial polarization by Apelin receptor signalling. *Nat Commun* 2016; 7:11805. doi: 10.1038/ncomms11805.

Literaturverzeichnis

104. Kunduzova O, Alet N, Delesque-Touchard N, Millet L, Castan-Laurell I, Muller C et al. Apelin/APJ signaling system: A potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes. *FASEB J* 2008; 22(12):4146–53. doi: 10.1096/fj.07-104018.
105. Scimia MC, Hurtado C, Ray S, Metzler S, Wei K, Wang J et al. APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy. *Nature* 2012; 488(7411):394–8. doi: 10.1038/nature11263.
106. Busch R, Strohbach A, Pennewitz M, Lorenz F, Bahls M, Busch MC et al. Regulation of the endothelial apelin/APJ system by hemodynamic fluid flow. *Cell Signal* 2015; 27(7):1286–96. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.03.011.
107. Strohbach A, Pennewitz M, Glaubitz M, Palankar R, Groß S, Lorenz F et al. The apelin receptor influences biomechanical and morphological properties of endothelial cells. *J Cell Physiol* 2018; 233(8):6250–61. doi: 10.1002/jcp.26496.
108. McLean DL, Kim J, Kang Y, Shi H, Atkins GB, Jain MK et al. Apelin/APJ signaling is a critical regulator of statin effects in vascular endothelial cells--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(11):2640–3. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300317.
109. Materzok I. Der Einfluss des APJ auf die flussinduzierte Migration von humanen venös-umbilikalischen Endothelzellen [Bachelor-Thesis]. Greifswald: Universität Greifswald; 2018.
110. Maloney PR, Khan P, Hedrick M, Gosalia P, Milewski M, Li L et al. Functional antagonists of the Apelin (APJ) receptor. In: *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program*. Bethesda (MD); 2010.
111. Glasel JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques* 1995; 18(1):62–3.
112. So funktionieren TaqMan Assays | Thermo Fisher Scientific - DE; 2020 [Stand: 10.03.2020]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>.
113. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 2006; 437(1-2):55–75. doi: 10.1002/andp.19484370105.

Literaturverzeichnis

114. Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* 2015; 439:231–50. doi: 10.1016/j.cca.2014.10.017.
115. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 2008; 44(5):619–26. doi: 10.2144/000112776.
116. Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. 7., aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 2013. (Der Experimentator). Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-34636-1>.
117. Deutsche Herzstiftung e.V. *Deutscher Herzbericht 2019*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2020.
118. Roffi M, Patrono C, Collet J-P, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016; 37(3):267–315. doi: 10.1093/eurheartj/ehv320.
119. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2018; 39(2):119–77. doi: 10.1093/eurheartj/ehx393.
120. Schwabe U, Paffrath D, Hrsg. *Arzneiverordnungs-Report 2016: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 2016. Verfügbar unter: <http://site.ebrary.com/lib/tubraunschweig/docDetail.action?docID=11278205>.
121. Berta J, Hoda MA, Laszlo V, Rozsas A, Garay T, Torok S et al. Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget* 2014; 5(12). doi: 10.18632/oncotarget.2032.
122. Helker CSM, Schuermann A, Pollmann C, Chng SC, Kiefer F, Reversade B et al. The hormonal peptide Elabela guides angioblasts to the midline during vasculogenesis. *eLife* 2015; 4:2653. doi: 10.7554/eLife.06726.

Literaturverzeichnis

123. Green DJ, Hopman MTE, Padilla J, Laughlin MH, Thijssen DHJ. Vascular Adaptation to Exercise in Humans: Role of Hemodynamic Stimuli. *Physiol Rev* 2017; 97(2):495–528. doi: 10.1152/physrev.00014.2016.
124. Guo D, Chien S, Shyy JY-J. Regulation of endothelial cell cycle by laminar versus oscillatory flow: distinct modes of interactions of AMP-activated protein kinase and Akt pathways. *Circ Res* 2007; 100(4):564–71. doi: 10.1161/01.RES.0000259561.23876.c5.
125. Balligand J-L, Feron O, Dessy C. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev* 2009; 89(2):481–534. doi: 10.1152/physrev.00042.2007.
126. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res* 1996; 79(5):984–91.
127. Eller-Borges R, Batista WL, da Costa PE, Tokikawa R, Curcio MF, Strumillo ST et al. Ras, Rac1, and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling in nitric oxide induced endothelial cell migration. *Nitric Oxide* 2015; 47:40–51. doi: 10.1016/j.niox.2015.03.004.
128. Hoang MV, Nagy JA, Senger DR. Active Rac1 improves pathologic VEGF neovessel architecture and reduces vascular leak: Mechanistic similarities with angiopoietin-1. *Blood* 2011; 117(5):1751–60. doi: 10.1182/blood-2010-05-286831.
129. Tan W. An Essential Role for Rac1 in Endothelial Cell Function and Vascular Development. *FASEB journal* 2008; (22):1829–38.
130. Tzima E. Activation of Rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. *The EMBO Journal* 2002; (21):6791–800.
131. Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: Regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15(6):1607–38. doi: 10.1089/ars.2010.3522.
132. Boesten LSM, Zadelaar ASM, van Nieuwkoop A, Gijbels MJJ, Winther MPJ de, Havekes LM et al. Tumor necrosis factor-alpha promotes atherosclerotic lesion progression in APOE*3-Leiden transgenic mice. *Cardiovasc Res* 2005; 66(1):179–85. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.01.001.

Literaturverzeichnis

133. van Wetering S, van den Berk N, van Buul JD, Mul FPJ, Lommerse I, Mous R et al. VCAM-1-mediated Rac signaling controls endothelial cell-cell contacts and leukocyte transmigration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285(2):C343-52. doi: 10.1152/ajpcell.00048.2003.
134. Lu Y, Zhu X, Liang G-X, Cui R-R, Liu Y, Wu S-S et al. Apelin-APJ induces ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1 expression via NF-kappaB/JNK signal pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Amino Acids* 2012; 43(5):2125–36. doi: 10.1007/s00726-012-1298-7.
135. Kim T-K, Park CS, Na H-J, Lee K, Yoon A, Chung J et al. Ig-like domain 6 of VCAM-1 is a potential therapeutic target in TNF α -induced angiogenesis. *Exp Mol Med* 2017; 49(2):e294. doi: 10.1038/emm.2016.147.
136. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 2007; 100(2):158–73. doi: 10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a.
137. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 2007; 100(2):174–90. doi: 10.1161/01.RES.0000255690.03436.ae.
138. Staercke C de, Phillips DJ, Hooper WC. Differential responses of human umbilical and coronary artery endothelial cells to apoptosis. *Endothelium* 2003; 10(2):71–8. doi: 10.1080/10623320303369.
139. Lakota K, Mrak-Poljsak K, Rozman B, Sodin-Semrl S. Increased responsiveness of human coronary artery endothelial cells in inflammation and coagulation. *Mediators Inflamm* 2009; 2009:146872. doi: 10.1155/2009/146872.
140. Lakota K, Mrak-Poljsak K, Bozman B, Kveder T. Serum Amyloid A Activation of Inflammatory and Adhesion Molecules in Human Coronary Artery and Umbilical Vein Endothelial Cells. *European journal of inflammation* 2007; (Vol. 5, no. 2):73–81.
141. Briones MA, Phillips DJ, Renshaw MA, Hooper WC. Expression of chemokine by human coronary-artery and umbilical-vein endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines. *Coron Artery Dis* 2001; 12(3):179–86. doi: 10.1097/00019501-200105000-00004.
142. Ohura N, Yamamoto K, Ichioka S, Sokabe T, Nakatsuka H, Baba A et al. Global analysis of shear stress-responsive genes in vascular endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10(5):304–13. doi: 10.5551/jat.10.304.

Literaturverzeichnis

143. Albuquerque MLC, Waters CM, Savla U, Schnaper HW, Flozak AS. Shear stress enhances human endothelial cell wound closure in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(1):H293-H302. doi: 10.1152/ajpheart.2000.279.1.H293.
144. Torres-Vázquez J, Kamei M, Weinstein BM. Molecular distinction between arteries and veins. *Cell Tissue Res* 2003; 314(1):43–59. doi: 10.1007/s00441-003-0771-8.
145. Dai G, Kaazempur-Mofrad MR, Natarajan S, Zhang Y, Vaughn S, Blackman BR et al. Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(41):14871–6. doi: 10.1073/pnas.0406073101.
146. Kwei S, Stavrakis G, Takahas M, Taylor G, Folkman MJ, Gimbrone MA et al. Early Adaptive Responses of the Vascular Wall during Venous Arterialization in Mice. *The American Journal of Pathology* 2004; 164(1):81–9. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63099-4.
147. Lorenz M, Koschate J, Kaufmann K, Kreye C, Mertens M, Kuebler WM et al. Does cellular sex matter? Dimorphic transcriptional differences between female and male endothelial cells. *Atherosclerosis* 2015; 240(1):61–72. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.018.
148. Addis R, Campesi I, Fois M, Capobianco G, Dessole S, Fenu G et al. Human umbilical endothelial cells (HUVECs) have a sex: Characterisation of the phenotype of male and female cells. *Biol Sex Differ* 2014; 5(1):18. doi: 10.1186/s13293-014-0018-2.
149. Seymour K, Stein J, Han X, Maier KG, Gahtan V. Statins and Nitric Oxide Donors Affect Thrombospondin 1-Induced Chemotaxis. *Vasc Endovascular Surg* 2014; 48(7-8):470–5. doi: 10.1177/1538574414554718.
150. Hwang A-R, Han J-H, Lim JH, Kang YJ, Woo C-H, Ahmad A. Fluvastatin inhibits AGE-induced cell proliferation and migration via an ERK5-dependent Nrf2 pathway in vascular smooth muscle cells. *PLoS ONE* 2017; 12(5):e0178278. doi: 10.1371/journal.pone.0178278.
151. Chandrasekar B, Mummidi S, Mahimainathan L, Patel DN, Bailey SR, Imam SZ et al. Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-kappaB- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin. *J Biol Chem* 2006; 281(22):15099–109. doi: 10.1074/jbc.M600200200.

Literaturverzeichnis

152. Corpataux J-M, Naik J, Porter KE, London N. The Effect of Six Different Statins on the Proliferation, Migration, and Invasion of Human Smooth Muscle Cells. *Journal of Surgical Research* 2005; 129(1):52–6. doi: 10.1016/j.jss.2005.05.016.
153. Evangelisti C, Paganelli F, Giuntini G, Mattioli E, Cappellini A, Ramazzotti G et al. Lamin A and Prelamin A Counteract Migration of Osteosarcoma Cells. *Cells* 2020; 9(3). doi: 10.3390/cells9030774.
154. Rauca V-F, Licarete E, Luput L, Sesarman A, Patras L, Bulzu P et al. Combination therapy of simvastatin and 5, 6-dimethylxanthenone-4-acetic acid synergistically suppresses the aggressiveness of B16.F10 melanoma cells. *PLoS ONE* 2018; 13(8):e0202827. doi: 10.1371/journal.pone.0202827.
155. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP. Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002; 105(6):739–45. doi: 10.1161/hc0602.103393.
156. Jordan SN, Canman JC. Rho GTPases in animal cell cytokinesis: An occupation by the one percent. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2012; 69(11):919–30. doi: 10.1002/cm.21071.
157. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2019; 73(24):e285-e350. doi: 10.1016/j.jacc.2018.11.003.
158. Björkhem-Bergman L, Lindh JD, Bergman P. What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects? *Br J Clin Pharmacol* 2011; 72(1):164–5. doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.03907.x.
159. Stern RH, Yang BB, Hounslow NJ, MacMahon M, Abel RB, Olson SC. Pharmacodynamics and pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of atorvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor. *J Clin Pharmacol* 2000; 40(6):616–23.
160. Pan HY, DeVault AR, Swites BJ, Whigan D, Ivashkiv E, Willard DA et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of pravastatin alone and with cholestyramine in hypercholesterolemia. *Clin Pharmacol Ther* 1990; 48(2):201–7. doi: 10.1038/clpt.1990.136.
161. Rykowska I, Nowak I, Nowak R. Drug-Eluting Stents and Balloons-Materials, Structure Designs, and Coating Techniques: A Review. *Molecules* 2020; 25(20). doi: 10.3390/molecules25204624.

Literaturverzeichnis

162. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med* 2003; 349(14):1315–23. doi: 10.1056/NEJMoa035071.
163. Jaschke B, Michaelis C, Milz S, Vogeser M, Mund T, Hengst L et al. Local statin therapy differentially interferes with smooth muscle and endothelial cell proliferation and reduces neointima on a drug-eluting stent platform. *Cardiovasc Res* 2005; 68(3):483–92. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.06.029.
164. Miyauchi K, Kasai T, Yokayama T, Aihara K, Kurata T, Kajimoto K et al. Effectiveness of statin-eluting stent on early inflammatory response and neointimal thickness in a porcine coronary model. *Circ J* 2008; 72(5):832–8. doi: 10.1253/circj.72.832.
165. McKenney JM. Pharmacologic characteristics of statins. *Clin Cardiol* 2003; 26(4 Suppl 3):III32-8. doi: 10.1002/clc.4960261507.
166. Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: An update. *Fundam Clin Pharmacol* 2005; 19(1):117–25. doi: 10.1111/j.1472-8206.2004.00299.x.
167. Murrow JR, Sher S, Ali S, Uphoff I, Patel R, Porkert M et al. The differential effect of statins on oxidative stress and endothelial function: Atorvastatin versus pravastatin. *J Clin Lipidol* 2012; 6(1):42–9. doi: 10.1016/j.jacl.2011.08.006.
168. Kaneta S, Satoh K, Kano S, Kanda M, Ichihara K. All hydrophobic HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptotic death in rat pulmonary vein endothelial cells. *Atherosclerosis* 2003; 170(2):237–43. doi: 10.1016/S0021-9150(03)00301-0.
169. Kadoglou NPE, Sailer N, Kapelouzou A, Lampropoulos S, Vitta I, Kostakis A et al. Effects of atorvastatin on apelin, visfatin (nampt), ghrelin and early carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 2012; 49(4):269–76. doi: 10.1007/s00592-011-0310-0.
170. Tasci I, Erdem G, Ozgur G, Tapan S, Dogru T, Genc H et al. LDL-cholesterol lowering increases plasma apelin in isolated hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2009; 204(1):222–8. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.08.030.
171. Ban T, Li X, Ma X, Yang H, Song Y, Sun Y et al. GPCR structure and function relationship: Identification of a biased apelin receptor mutant. *Biochem J* 2018; 475(23):3813–26. doi: 10.1042/BCJ20180740.

Literaturverzeichnis

172. Zhou N, Zhang X, Fan X, Argyris E, Fang J, Acheampong E et al. The N-terminal domain of APJ, a CNS-based coreceptor for HIV-1, is essential for its receptor function and coreceptor activity. *Virology* 2003; 317(1):84–94. doi: 10.1016/j.virol.2003.08.026.
173. Gerbier R, Leroux V, Couvineau P, Alvear-Perez R, Maigret B, Llorens-Cortes C et al. New structural insights into the apelin receptor: Identification of key residues for apelin binding. *FASEB J* 2015; 29(1):314–22. doi: 10.1096/fj.14-256339.
174. MedMarket Diligence. Global dynamics of surgical and interventional cardiovascular procedures, 2015–2022; 2016.
175. Gori T, Polimeni A, Indolfi C, Räber L, Adriaenssens T, Münzel T. Predictors of stent thrombosis and their implications for clinical practice. *Nat Rev Cardiol* 2019; 16(4):243–56. doi: 10.1038/s41569-018-0118-5.
176. Cutlip DE, Windecker S, Mehran R, Boam A, Cohen DJ, van Es G-A et al. Clinical end points in coronary stent trials: A case for standardized definitions. *Circulation* 2007; 115(17):2344–51. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.685313.
177. Claessen BE, Henriques JPS, Jaffer FA, Mehran R, Piek JJ, Dangas GD. Stent thrombosis: A clinical perspective. *JACC Cardiovasc Interv* 2014; 7(10):1081–92. doi: 10.1016/j.jcin.2014.05.016.
178. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med* 2008; 359(21):2195–207. doi: 10.1056/NEJMoa0807646.
179. Strohbach A, Begunk R, Petersen S, Felix SB, Sternberg K, Busch R. Biodegradable Polymers Influence the Effect of Atorvastatin on Human Coronary Artery Cells. *Int J Mol Sci* 2016; 17(2). doi: 10.3390/ijms17020148.

Publikationen und Manuskripte

Publikationen

Strohbach A, Pennewitz M, Glaubitz M, Palankar R, Groß S, Lorenz F, **Materzok I**, Rong A, Busch MC, Felix SB, Delcea M, Busch R.

The apelin receptor influences biomechanical and morphological properties of endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2018;233(8):6250–6261. doi:10.1002/jcp.26496

Abschlussarbeiten

Materzok I. Der Einfluss des APJ auf die flussinduzierte Migration von humanen umbilikal-venösen Endothelzellen. Bachelorarbeit, 2018, Note: sehr gut (1,5))

Poster/Abstracts

Materzok I, Lorenz F, Bahls M, Strohbach A, Dörr M, Felix SB, Busch R.

APJ inhibition reduces flow-induced endothelial cell migration with atorvastatin but not pravastatin treatment. (83rd Annual Meeting of DGK April 2017 in Mannheim, Germany).

Materzok I, Lorenz F, Bahls M, Strohbach A, Dörr M, Felix SB, Busch R.

APJ inhibition reduces flow-induced endothelial cell migration with atorvastatin but not pravastatin treatment. (Experimental Biology 2017 Meeting in Chicago, USA).

Materzok I, Lorenz F, Bahls M, Strohbach A, Dörr M, Felix SB, Busch R.

Pravastatin but not atorvastatin influences endothelial cell mechanotaxis via APJ signaling. (ESC Congress 2017 in Barcelona, Spain)

Urbaneck I, Lorenz F, **Materzok I**, Maletzki L, Dörr M, Felix SB, Busch R, Bahls M.

Exercise, but not statins improve vasodilation in obesity-induced endothelial dysfunction in Wistar rats. (Experimental Biology 2018 Meeting in San Diego, USA)

Urbaneck I, Lorenz F, **Materzok I**, Maletzki L, Dörr M, Felix SB, Busch R, Bahls M.

Exercise, but not statins improve endothelial function in obese rats (Experimental Biology 2019 Meeting in Orlando, USA)

Urbaneck I, Lorenz F, **Materzok I**, Maletzki L, Pietzner M, Budde K, Nauck M, Felix SB, Dörr M, Bahls M.

The impact of exercise training in combination with statin use on skeletal muscle mitochondrial oxidative phosphorylation and metabolomics in obese rats.

Kummer, L, **Materzok, I**, Schaack, D, Weigand, MA, Immenschuh, S, Larmann, J

A key role for heme oxygenase-1 in anti-HLA antibody triggered monocyte adhesion and transmigration. (ESC Congress 2018 in München, Germany)

Stipendien

Gerhard Domagk-Stipendium, Bachelorstipendium, Förderungszeitraum 04/2016 – 09/2017

Förderung der Erlangung des Bachelor of Science in Biomedical Sciences 07/2018,
Note: gut (1,8)

Deutschlandstipendium, Stipendium für begabte und leistungsstarke Studierende,
Förderungszeitraum 10/2017 – 10/2018

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Zuerst möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. Raila Busch als Leiterin der Arbeitsgruppe bedanken. Vielen Dank für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in dieser Abteilung durchführen zu können. Sie gab mir immer die Möglichkeit eigene Ideen einzubringen, war dabei aber stets eine erfahrene und hilfreiche Mentorin.

Ein weiterer großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. S. Felix, als Chefarzt der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin B dafür, dass ich die Forschungslabore der Klinik für die Durchführung und Auswertung der Experimente nutzen konnte.

Ohne meine beiden direkten Ansprechpartner, Dr. Anne Strohbach und Dr. Martin Bahls, wäre aus dieser Fülle an Experimenten und Ideen wohl niemals eine zusammenhängende wissenschaftliche Arbeit geworden. Danke Martin, dass du mir auch sonntags noch erklärt hast, wie die Statistik funktioniert und danke Anne für deine unglaubliche praktische Expertise und Detailwissen.

Auch den anderen Mitarbeitenden des Forschungslabors möchte ich für ihre Unterstützung danken. Dabei sind insbesondere Frau Dressler und Dr. Florian Lorenz zu nennen, ohne die ich die vielen kleinen Rückschläge dieses Promotionsvorhabens wohl nicht so gut durchgestanden hätte und die immer jedes Experiment retten konnte.

Dass ich nicht nur meine Promotion, sondern auch den Abschluss meines Bachelor of Science während des Medizinstudiums durchführen konnte, verdanke ich dem Domagk-Bachelorstipendium.

Ein großer Dank geht natürlich auch an alle meine Freunde und meine Familie für ihre Rücksicht und Motivation.

