



***Untersuchung der Expression von SET7 und anderer epigenetischer  
Enzyme in vitro und vivo im Modell der Atherosklerose***

*Analysis of the expression of SET7 and other epigenetic enzymes in vitro  
and vivo in a model of atherosclerosis*

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades

der Graduate School of Life Sciences,

Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

**Nicole Schneider**

aus

Würzburg

**Würzburg, 2022**



**Eingereicht am:** .....

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzender:** Prof. Dr. Wolfgang Kastenmüller

**1. Betreuer:** Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen

**2. Betreuer:** Dr. Erik Henke

**3. Betreuer:** Prof. Dr. Thomas Haaf

**Tag des Promotionskolloquiums:** .....

**Doktorurkunden ausgehändigt am:** .....

# Inhaltsverzeichnis

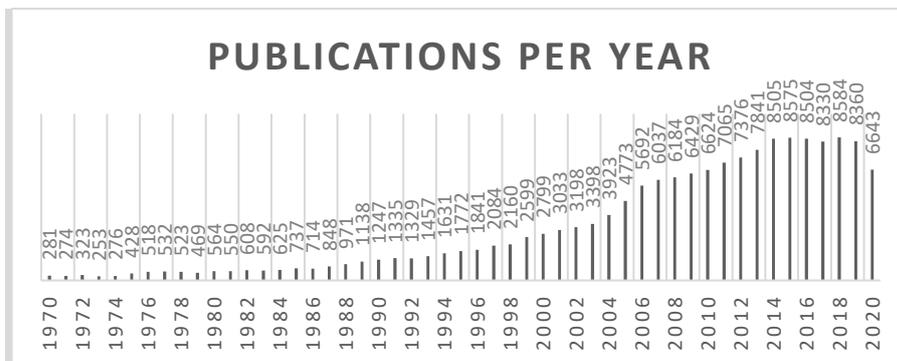
<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Atherosklerose .....	1
1.2	Epigenetik.....	5
1.2.1	DNA-Methylierung .....	6
1.2.2	DNA-Demethylierung .....	7
1.2.3	Histon-Modifikationen .....	8
1.2.4	SET7.....	9
1.3	Matrix-Metalloproteasen .....	14
1.4	Epigenetik und Atherosklerose.....	15
1.5	Ziel der Arbeit .....	17
<b>2.</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1	Materialien.....	19
2.1.1	Zell- und Bakterienkultur .....	19
2.1.2	Zelllinien.....	20
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Puffer .....	21
2.1.4	Substanzen zur Stimulation .....	22
2.1.5	Plasmide .....	22
2.1.6	Primer .....	23
2.1.7	Kits .....	24
2.1.8	Instrumente und Gerätschaften .....	25
2.1.9	Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.10	Verwendete Software .....	26
2.1.11	Tiere.....	26
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Zellbiologische Methoden .....	27
2.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	31
2.2.3	CRISPR/Cas9 knock-out.....	38
2.2.4	Statistische Auswertung .....	47
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
3.1	Stimulationsversuche Zellkultur .....	48
3.1.1	Expression epigenetischer Enzyme in Makrophagen nach Stimulation .....	48
3.1.2	Effekt der TNF $\alpha$ -Stimulation auf die Expression von SET7 und DNMT1 im zeitlichen Verlauf .....	51

3.1.3	Expression der Matrixmetalloproteasen und TIMP-Inhibitoren in Makrophagen nach Stimulation .....	54
3.1.4	Expression ausgewählter Atherosklerose-relevanter Zytokine und Transkriptionsfaktoren in Makrophagen nach Stimulation .....	57
3.1.5	Expression epigenetischer Enzyme in glatten Muskelzellen nach Stimulation .....	59
3.2	Epigenetische Expressionsmuster im Atherosklerose-Modellorganismus .....	60
3.2.1	Expression epigenetischer Enzyme in der Aorta von Ldlr <sup>-/-</sup> -Mäusen .....	60
3.2.2	Expression epigenetischer Enzyme in der Aortenwurzel von Ldlr <sup>-/-</sup> Mäusen.....	62
3.2.3	Expression epigenetischer Enzyme in der Milz von Ldlr <sup>-/-</sup> Mäusen .....	63
3.3	Durchführung eines SET7 knock-outs mittels CRISPR/Cas9 in glatten Muskelzellen .....	65
3.3.1	Nachweis und Untersuchung generierter Mutationen im SET7-Gen glatter Muskelzellen.....	66
3.3.2	SET7 mRNA-Expression in mit CRISPR/Cas9 manipulierten glatten Muskelzellen.....	70
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>72</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>84</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
	<b>Appendix.....</b>	<b>104</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre Manifestationsformen wie der ischämische Herzinfarkt oder der Schlaganfall sind nun seit über 15 Jahren Haupttodesursache in den Industrienationen, und auch in Schwellenländern belegen sie zunehmend Platz eins und zwei in den Statistiken (2). Die Bestrebungen der Wissenschaft, deren gemeinsame zugrundeliegende pathogenetische Ursache, die Atherosklerose, weiter zu erforschen und Zusammenhänge aufzuklären, haben in den letzten 30 Jahren zu einer stetig steigenden Anzahl an Publikationen geführt (Abbildung 1). Trotz zahlreicher Erfolge hinsichtlich der Therapiemöglichkeiten und Früherkennung, die teilweise zu einem Rückgang der Mortalität geführt haben, bleibt die Dominanz als Todesursache jedoch weiterhin bestehen (3). Unter Berücksichtigung der hohen Brisanz, der Aktualität und des offensichtlich noch unzureichenden Wissenstandes ist es daher von zentralem Interesse, weitere mögliche Entstehungsursachen und Einflussfaktoren auf die Entwicklung der Atherosklerose in die Betrachtung miteinzubeziehen, um dieses Krankheitsbild so noch besser verstehen zu können.



**Abbildung 1: Anzahl veröffentlichter Publikationen zur Suchanfrage ' atherosclerosis ' auf pubmed pro Jahr, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=atherosclerosis>, Stand: Oktober 2020**

Der Begriff Atherosklerose wird im deutschsprachigen Raum zu dem der Arteriosklerose teils synonym gebraucht. Genau genommen bezeichnet die Arteriosklerose lediglich die Verhärtung einer Arterienwand unabhängig von genauer Lokalisation und Ursache, während die Atherosklerose die eigentliche multifaktorielle Krankheitsentität mit

charakteristischer Intimaveränderung darstellt (4, 5) . In dieser Arbeit wird daher folgend allein der Begriff der Atherosklerose verwendet.

Bei der Atherosklerose handelt es sich um einen chronisch-entzündlichen Prozess, der sich in der Wand großer und mittelgroßer Arterien abspielt, und für den Störungen im Lipid-Stoffwechsel sowie eine inadäquate Immunantwort mit ursächlich sind (1, 6, 7).

Grundlage für die Entstehung ist auf der einen Seite eine zunehmende Belastung des Endothels, bedingt durch die klassischen Risikofaktoren der Atherosklerose wie Rauchen, Diabetes mellitus und Hypertonus (8). Diese tritt gehäuft an ganz bestimmten Abschnitten der Gefäßwand, wie Gefäßgabelungen, auf, an denen der sonst laminare Blutfluss architekturbedingt gestört ist (9). Chemisch ist eine Dyslipidämie im Sinne erhöhter Cholesterol-Blutspiegel maßgeblich beteiligt, denn das hierbei charakteristisch erhöhte LDL wirkt, vom Körper oxidiert zu oxLDL, direkt zytotoxisch (7, 10). Fortbestehende Haupt-Risikofaktoren, aber auch psychische Erkrankungen wie die Depression oder Infektionen erhöhen den Stress der Gefäßwand weiter (11-13). Auf der anderen Seite führen strukturelle Veränderungen des Endothels und die damit einhergehende verstärkte Expression von Proteoglykanen an der Gefäßinnenwand zu einer chronischen Endotheldysfunktion: Die Folge sind eine gesteigerte Permeabilität und die Adhäsion von Leukozyten, die erleichtert durch die Gefäßwand migrieren können (Abbildung 2A) (1, 6).

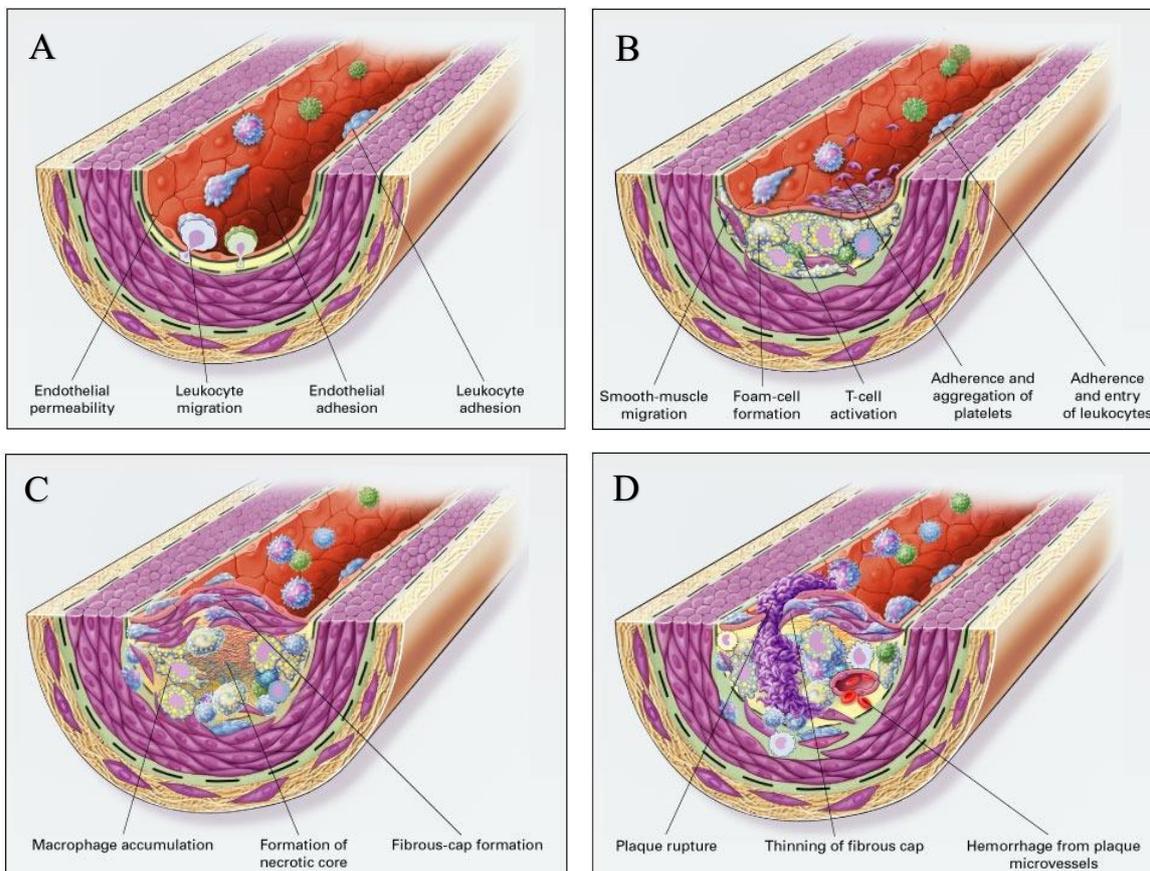
LDL, das über Apolipoprotein B-100 an die extrazellulär exponierten, negativ geladenen Proteoglykane bindet, wird im Verlauf in die Gefäß-Innenschicht, die sogenannte Intima, eingelagert (7). Dort unterläuft LDL Modifikationen, wie der bereits genannten Oxidation, was wiederum eine weitere Aktivierung des Endothels und des Immunsystems nach sich zieht (14, 15). Sämtliche Schädigungen führen letztendlich zu einem Kompensationsversuch, der die Endothelbeschaffenheit im Sinne einer veränderten Zusammensetzung an Adhäsionsmolekülen, eines prokoagulatorischen Milieus und einer noch stärkeren Permeabilität beeinflusst, und außerdem eine gesteigerte Sezernierung vasoreaktiver und proinflammatorischer Substanzen sowie verschiedener Chemokine bewirkt (1, 14). Dies ist ein entscheidender Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose, da so das Immigrieren von weiteren Immunzellen in die Intima sowie deren Verdickung

gefördert wird (1, 16). Persistieren diese Veränderungen, führen sie zur Ausbildung eines sogenannten '*Fatty Streak*': Es kommt zur subendothelialen Lipidanreicherung (17). Außerdem migrieren verschiedene Immunzellen wie T-Zellen, insbesondere aber Monozyten in die Intima, die sich zu Makrophagen differenzieren und die größte Fraktion der Immunzellen im Plaque bilden (1, 18). Über die Aufnahme von oxLDL bilden sich aus Makrophagen dort sog. Schaumzellen mit intrazellulärer Lipid-Anhäufung. Weiterhin kommt es neben der immer weiter zunehmenden Immunsystem-Aktivierung zu einer Migration glatter Muskelzellen (SMCs) aus der Media-Schicht in die Intima (1). Ab diesem Zwischenstadium handelt es sich um eine chronisch progressive Erkrankung, während im Gegensatz dazu die frühen Schritte der Atherosklerose teilweise noch spontan in Regression treten können (Abbildung 2 B) (15).

Unter dem persistierenden Reiz der verschiedenen Chemokine, Cytokine und Wachstumsfaktoren wird die Inflammation aufrecht erhalten und es kommt zum weiteren Einwandern von Immunzellen (1). Es bildet sich eine subendotheliale fibrotische Kappe durch die glatten Muskelzellen aus, die nun myofibroblastische Eigenschaften aufweisen, um die Läsion protektiv vom Gefäßlumen abzugrenzen und zu stabilisieren. Vermehrter Zelltod sowie die Ansammlung von Zell-Debris und Lipiden führen zur Entstehung eines nekrotischen Kerns (1, 17, 19). Das Spätstadium der Atherosklerose ist erreicht (Abbildung 2 C). Vor allem in den Schulterregionen der Läsion häufen sich weiter Immunzellen, hauptsächlich T-Lymphozyten, an (20). Der Plaque kann, unter Versagen kompensatorischer Mechanismen, zunehmend das Gefäßlumen einengen und einen störenden Einfluss auf den Blutfluss ausüben (1, 15).

Unter fortbestehender Einwanderung von Lipiden und Immunzellen sowie steigender Thrombogenität kommt es zur Bildung von Mikrogefäßen, zur Adventitia-Inflammation und zu einer Ausdünnung der fibrösen Kappe (1, 19). Kalzium-Ablagerungen, die bereits früh in der Entwicklung der Atherosklerose beginnen, können sich zu größeren Komplexen zusammenschließen (15). Die Sekretion proteolytischer Enzyme wie der Matrix-Metalloproteasen, die zur Matrixdegeneration und Instabilität führen, sowie vermehrte Zellnekrose und Apoptose tragen dazu bei, dass schließlich eine Erosion oder Ruptur des nun vulnerablen Plaques droht (Abbildung 2 D) (1, 19).

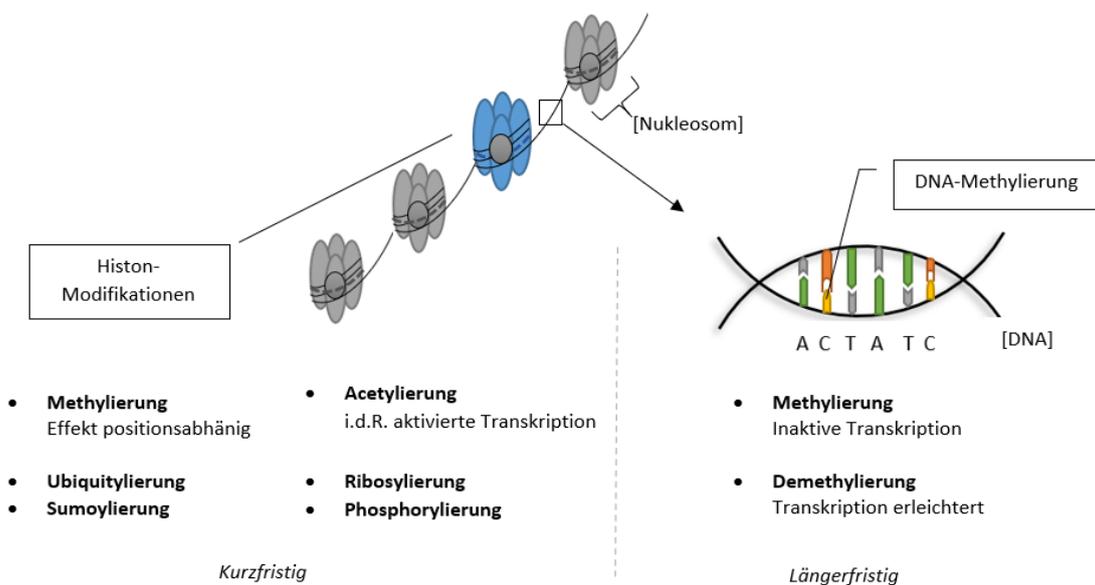
Die hierbei dem Blutfluss exponierten subendothelialen Plauebestandteile bedingen eine Gerinnungsaktivierung mit Formation eines Thrombus, dessen mögliche gefährliche Folge eine vollständige Lumenverlegung oder Embolie ist (1, 19). Die Manifestationsformen der atherosklerotisch bedingten kardiovaskulären Erkrankungen (*ASCVD*) reichen, ob durch chronisch progrediente Stenose oder akutes Geschehen via thrombotischem Verschluss oder Embolus verursacht, vom ischämischen Schlaganfall, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, dem akuten Koronarsyndrom oder der Angina Pectoris bis zur Herzinsuffizienz, wobei die koronare Herzkrankheit (KHK) und die zerebrovaskulären Erkrankungen die beiden häufigsten Folgen darstellen (21, 22).



**Abbildung 2:** **A** Anfangsstadium der Atherosklerose: Erhöhte Endothel-Permeabilität, Leukozytenmigration und -adhäsion. **B** Zwischenstadium der Atherosklerose: Migration der glatten Muskelzellen, Formation von Schaumzellen, T-Zell-Aktivierung, Adhärenz sowie Aggregation der Blutplättchen und Leukozyten. **C** Spätstadium der Atherosklerose: Makrophagenakkumulation, Formierung der fibrösen Kappe und des nekrotischen Kerns. **D** Vulnerabler Plaque: Ausdünnung der fibrösen Kappe, Hämorrhagie aus Plaque-Mikrogefäßen und Plaque-Ruptur. **Reproduced with permission from (1) Copyright Massachusetts Medical Society.**

## 1.2 Epigenetik

Auch wenn sich einzelne Definitionen unterscheiden, so meint der Begriff der Epigenetik generell potentiell stabile und im Idealfall vererbare Veränderungen des zellulären Phänotyps oder der Genexpression, die ohne Änderungen der Basenfolge der DNA selbst stattfinden (23). Demnach handelt es sich bei epigenetischen Mechanismen um Prozesse, die klassisch folgenden großen Oberbegriffen zugeordnet werden können: Histon-Modifikationen, DNA-Methylierung und DNA-Demethylierung (Abbildung 3). Sie können die Transkription von Genen beeinflussen, indem sie die Zugänglichkeit eines bestimmten DNA-Abschnittes verändern (23-26).



**Abbildung 3: Vereinfachte Übersicht über die wichtigsten chromatinverändernden epigenetischen Mechanismen.** Modifikationen können entweder an der DNA selbst oder an den Histonproteinen stattfinden. A= Adenin, C= Cytosin, T= Thymin, G= Guanin. Eigene Anfertigung.

Epigenetische Mechanismen sind entscheidend, um den Organismus ergänzend zu der durch die charakteristische Basenfolge starr vorgegebene genetischen Information flexibel zu halten, um den zellspezifischen Phänotyp festzulegen und um adäquat auf Umweltreize reagieren zu können. Andererseits müssen sie auch den stabilen Erhalt des Genoms garantieren (27, 28). Diese Diversität kann nur durch eine enge Interaktion und gegenseitige Kontrolle der verschiedenen Modifikationen ermöglicht werden (29, 30).

Gerade dieses Zusammenspiel der verschiedenen epigenetischen Mechanismen ist von entscheidender Bedeutung: Allein die Summe der spezifischen Modifikationen an und um einen bestimmten Genort, die miteinander im Wechselspiel stehen, kann, wenn in ihrer Bedeutung entschlüsselt, eine Prognose über die tatsächliche Transkription des entsprechenden Gens geben (30-32).

### **1.2.1 DNA-Methylierung**

Der Mechanismus der DNA-Methylierung beinhaltet die enzymatische Übertragung einer Methylgruppe auf das fünfte Kohlenstoff-Atom des Pyrimidinrings der Cytosinbase der DNA durch eine DNA-Methyltransferase (DNMT) (33-35). Der Großteil aller CpC (Cytosin-phosphatidyl-Guanin) Dinukleotide des menschlichen Genoms ist methyliert. Eine Ausnahme bilden die sogenannten '*GpC islands*', charakteristische hochfrequente Ansammlungen von aufeinanderfolgenden Guanin- und Cytosinbasen innerhalb vieler Promoterregionen, deren Hypomethylierung die Wahrscheinlichkeit der Transkription des entsprechenden Gens erhöht, während die Methylierung dieser Bereiche mit einem '*silencing*' des entsprechenden Gens assoziiert ist (29, 36-38). Im Sinne einer De-Novo-Methylierung wird ein kleiner Teil dieser Bereiche während der Embryogenese methyliert. Auch spielt die DNA-Methylierung u.a. eine Rolle im genetischen Imprinting und bei der Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms im weiblichen Organismus (39-41). Außerdem besteht ein Mechanismus zur Aufrechterhaltung vorhandener Methylierungsmuster, vor allem der CpG-islands, im Anschluss an die DNA-Replikation, sodass diese weitestgehend stabil an die nächste Zellgeneration weitergegeben werden können (42-44). Es wird angenommen, dass die Methylgruppe die Bindung der meisten Transkriptionsfaktoren, die häufig Bindestellen zu unmethylierten CpG-Dinukleotiden aufweisen, verhindert. Zusätzlich gibt es speziell Proteine mit Methyl-CpG-bindender Domäne, die eine Unterdrückung der Transkription verursachen können (36). Eine entscheidende Rolle kommt der DNA-Methylierung auch bei der Abwehr von Fremdorganismen zu: Das Immunsystem erkennt ein vermehrtes Auftreten nicht-methylierter CG-Dinukleotide als fremd an, wie sie unter anderem bei Bakterien zu finden sind. Somit ist der Mechanismus der DNA-Methylierung nicht nur im Sinne einer Hemmung der Transkription verschiedener Gene von Bedeutung, sondern ist gleichzeitig

ein Schutzmechanismus durch chemische Ungleichheit zu möglicher pathogener Fremd-DNA (45, 46).

Die DNA-Methylierung ist zudem eng mit verschiedenen Prozessen der Histon-Modifizierung verknüpft: Eine DNA-Methylierung kann direkt enzymatische Veränderungen an den Histon-Proteinen nach sich ziehen, während verschiedene Histon-Modifikationen wiederum Einfluss auf die Rekrutierung und Aktivität der DNA-Methyltransferasen haben (29, 45, 47). Insgesamt handelt es sich bei der DNA-Methylierung generell um eine längerfristige Modifikation, die in einer verringerten Gentranskription resultiert (36, 48).

### **1.2.2 DNA-Demethylierung**

Der Verlust von DNA-Methylierungsmustern kann sowohl aktiv als auch passiv erfolgen. Der Begriff der passiven DNA-Demethylierung meint den Verlust der Methylgruppe über mehrere Replikationsschritte der DNA bei gleichzeitig nicht stattfindender Re-Methylierung, was durch eine insuffiziente oder fehlerhafte DNA-Methyltransferasenaktivität gefördert wird (siehe 1.2.1) (27). Ein Nachweis aktiver Demethylierung erfolgte in Bezug auf das väterliche Genom in der Maus, das bereits direkt nach der Befruchtung rasch demethyliert wird (49). Der generelle Mechanismus der aktiven Demethylierung ist komplex und noch unzureichend aufgeklärt. Die Entdeckung der TET (*ten-eleven translocation family*) Enzyme markiert jedoch einen entscheidenden Schritt in dessen Verständnis (50, 51). Diese Enzymfamilie, zu der TET 1, 2 und 3 gehören, kann die Oxidationen von 5-Methyl-Cytosin zu 5-Hydroxymethyl-Cytosin, von 5-Hydroxymethyl-Cytosin zu 5-Formyl-Cytosin und von diesem zu 5-Carboxyl-Cytosin bewirken (50). Diese chemischen Modifikationen können nun wiederum von anderen Proteinen erkannt und gebunden werden. Zusätzlich schafft der Oxidationsschritt ein Intermediat mit niedrigerer energetischer Barriere (27). Für 5-Hydroxymethyl-Cytosin, die wohl wichtigste da häufigste Veränderung, kann die oxidierte Base nun entweder passiv oder direkt entfernt werden. Auch kann sie durch die DNA-Reparaturmaschinerie, insbesondere durch die Basenexzisionsreparatur, herausgeschnitten werden, was, nach anschließender Strangreparatur, letztendlich zu einem Verlust der Methylierung führt (27, 52, 53).

### 1.2.3 Histon-Modifikationen

147 Basenpaare der DNA-Superhelix sind zweifach um einen Histon-Oktamer, bestehend aus jeweils zwei der Histon-Proteine H2A, H2B, H3 und H4, gewickelt, wodurch sich das Nukleosom, die kleinste strukturelle Untereinheit des Chromatins, bildet. Die einzelnen Nukleosome sind über die linker-DNA, stabilisiert durch das Histon H1, verbunden (vgl. Abbildung 3). Dicht gewunden um die Histonproteine ist die Basensequenz der DNA so in ihrer Zugänglichkeit für Proteine behindert, wobei der Grad dieser Verpackung dynamisch variiert werden kann (31, 54). Epigenetische Modifikationen der Histone beruhen auf der posttranslationalen Veränderung der Histon-Proteine und damit einhergehend der Chromatinkonformation, die direkt die Zugänglichkeit der DNA beeinflusst und so Konsequenzen für deren Transkription haben kann (32, 55). Transkriptionsfaktoren, Polymerasen und Co-Faktoren können so entweder erleichtert oder erschwert binden, was wiederum unmittelbar Auswirkungen auf die Expression der codierten Gene hat (56, 57). Die Modifikationen finden insbesondere an den N-terminalen Aminosäuren der Histone statt, welche zur Nukleosom-Außenseite gerichtet sind (32, 58, 59). Folgende Veränderungen sind besonders häufig: Mono- Di- oder Trimethylierung und -Acetylierung von Lysinresten (abgekürzt als K) sowie die Mono- oder Dimethylierung von Argininresten (A). Außerdem sind unter anderem die Ubiquitylierung, Ribosylierung und Sumoylierung von Lysinresten (K) sowie die Phosphorylierung von Serinresten (S) beschrieben (31, 58, 59). Es hat sich gezeigt, dass verschiedene Modifikationen und Kombinationen dieser mit bestimmten biologischen Funktionen verknüpft sind. So können sie einerseits Auswirkungen auf die Transkription der benachbarten Gene haben, andererseits aber auch Einfluss auf die verschiedenen Zellzyklusphasen nehmen oder spezifisch in der Mitose auftreten (31, 60-62). Eine Acetylierung findet meist an bestimmten Lysinresten, vor allem von Histon 3, statt. So kann eine Acetylierung von H3K4 (Histon 3 Lysin Nr. 4), H3K9, H3K14 und H3K27 eine Aktivierung der Transkription bewirken (31, 63). Komplexer ist hingegen der Effekt einer Methylierung, da hier das Histon, die exakte Position, wie beispielsweise die Nummer des Lysinrestes, und sogar die Zahl der addierten Methylgruppen von Relevanz ist (62). Abermals ist Histon 3 ein häufiges Ziel der Modifikationen: Eine H3K4 Methylierung ist mit einer Aktivierung der Transkription, eine H3K9 und H3K27 Methylierung mit einer Unterdrückung der Transkription assoziiert (31). Dazu passend zeigt sich im

Heterochromatin H3K9 verstärkt methyliert, wohingegen eine ausgeprägtere Methylierung an H3K4 bei gerade transkribierten DNA-Bereichen zu beobachten ist (64, 65). Auch können Histon-Methyltransferasen (HMT) die Methylierung verschiedener Nicht-Histon-Proteine wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren bedingen, was unterschiedliche zelluläre Effekte verursacht (66). Von besonderem Interesse ist hier die Familie der SET-Methyltransferasen, wobei SET für die drei Genregulatoren SU(VAR)3-9, E(Z) (Enhancer-of-zeste) und TRX (Trithorax) von *Drosophila* steht und ein gemeinsames katalytisch wirkendes Motiv beschreibt (67-69). Drei Vertreter dieser Gruppe zählen zu den wichtigsten epigenetischen Enzymen, die H3K4 methylieren: SET1, das Lysin 4 mono-, di- oder trimethylieren kann, solange das benachbarte Lysin 9 unmethyliert ist, außerdem SET2, auch bekannt unter dem Namen SMYD1, das insbesondere für die Kardiomyozyten-Differenzierung von Bedeutung ist, und SET7 (70, 71). Speziell SET7 nimmt in dieser Enzymfamilie mit einer weniger strengen Substratspezifität eine Sonderrolle ein (32, 72, 73). Relevante H3K4-Demethylasen sind insbesondere LSD1 (*Lysine-specific histone demethylase 1A*, auch Kdm1a, im Folgenden LSD bezeichnet) und Kdm5 (auch LSD5, RBBP2 (*Retinoblastoma binding protein 2*)). LSD kann neben di- und trimethyliertem H3K4 zusätzlich H3K9 demethylieren und stabilisiert DNMT1 (74-76).

#### 1.2.4 SET7

SET7 (oder auch SETD7; SET7/9; KMT7; SET9; SET7/9), ist eine Lysin-Methyltransferase, deren Substrate neben Histonen auch mehrere nicht-Histon-Proteine sind, die insbesondere bei der Transkription, Proliferation, Zell-Differenzierung und im Zell-Zyklus eine Rolle spielen (77-86). Ursprünglich wurde die Hauptfunktion aber als Monomethylierung des vierten Lysinrestes von Histon drei des Nukleosoms beschrieben (87-91). Diese H3K4 Methylierung von Genpromotern führt generell zu einer erhöhten Transkription des entsprechenden Gens (91-93). Hierunter fallen vor allem Gene, welche die, mitunter myogene, Differenzierung betreffen wie MCK, MYOD und MYOGENIN, oder Regionen, die im Rahmen des NFκB und p53-Signalweges relevant sind (89, 94, 95). Entsprechend waren nach SET7 knock-out in Endothelzellen über 8.000 Gene in ihrer Expression verändert, davon viele beteiligt an Entwicklung und Inflammation, und für ein Viertel von ihnen konnte eine direkt verminderte H3K4 Mono-Methylierung am

Genpromoter nachgewiesen werden (96). Aber auch andere Histonpositionen wie H2A, H2B oder das H1 linker Histon können seltener Wirkungsort von SET7 sein (97, 98). Zusätzlich kann vereinzelt auch eine Di- und sogar Trimethylierung durch SET7 erfolgen. Hier liegt im Vergleich zur Monomethylierung jedoch eine höhere energetische Barriere für SET7 vor, weshalb generell von dessen Hauptaufgabe als Monomethyltransferase auszugehen ist (97, 99).

Als epigenetisches Enzym ist SET7 charakteristischerweise in ein breites Netzwerk sich gegenseitig modulierender und kontrollierender Enzyme eingebettet. So ist die Durchführung einer Methylierung allein schon dadurch beeinflusst, ob sich bereits Methylgruppen an benachbarten Histonen befinden oder nicht. Eine Di- und auch Trimethylierung von H9 verringert z.B. die Neigung von SET7, H3 zu methylieren (92). Die für diese Trimethylierung verantwortliche Histon-Methyltransferase SUV39H1 selbst wird durch SET7 direkt methyliert, hierdurch herunterreguliert, so die H3K9 Trimethylierung verringert und es kommt zu einer Relaxation des Chromatins (80, 89). Ebenso können unterschiedliche Lysinpositionen von Proteinen als Ziel einer direkten Methylierung durch SET7 verschiedene, teils gegensätzliche Auswirkungen haben (78, 100, 101).

Eine besondere Rolle spielt SET7 im NF $\kappa$ B Signalweg, der maßgeblich beteiligt ist an Inflammation, Immunantwort, Zellproliferation und Apoptose, und dessen Dysregulation in einer chronischen Inflammation mit erhöhtem Tumorrisiko resultieren kann (102-104). SET7 fördert eine Lokalisation der p65-Untereinheit im Nukleus, wo eine verbesserte Bindung von p65 an den NF $\kappa$ B-Genpromoter erfolgen kann, was insgesamt in einer gesteigerten Transkription NF $\kappa$ B-induzierter Gene resultiert (94, 95). Auch bei dieser direkten Proteinmethylierung ist die spezifische Methylierungsstelle entscheidend: Die Methylierung von Lysin Nr. 37 des p65 bewirkt, als Reaktion auf TNF $\alpha$ - oder IL-1 $\beta$ -Stimulation, die Induktion verschiedener assoziierter Gene, und strukturelle Analysen führten zu der Annahme, dass dies die von SET7 präferierte Position darstellt (105). Eine Methylierung von Lysin Nr. 314 beziehungsweise 315 fördert als Reaktion auf TNF $\alpha$  jedoch die Degradation von p65 (106). Insgesamt findet eine Methylierung durch SET7 aber nur dann statt, wenn sich NF $\kappa$ B bereits im Nukleus befindet und mit seinen spezifischen Promotern assoziiert ist, worauf dann dessen Funktion direkt am Promoter

verändert wird und so Dauer bzw. Stärke der Genexpression variiert werden können, möglicherweise auch charakteristisch für verschiedene Zelltypen (107).

Auch eine andauernde Hyperglykämie, wie sie besonders bei Patienten und Patientinnen mit Diabetes mellitus Typ 2 auftritt, kann zu einer Hochregulierung von SET7 mit Folge einer Steigerung der Gen-Expression NF $\kappa$ B-assoziiierter Gene führen (88, 108). Über die resultierende verstärkte Inflammation werden mit diesem Krankheitsbild vergesellschaftete vaskuläre Schäden und Fehlfunktionen erklärt. SET7 könnte somit ein möglicher Sensor für über einen längeren Zeitraum erhöhte Glucosespiegel sein. Im Gegensatz zur Reaktion auf TNF $\alpha$ -Stimulation bewirken erhöhte Glukosespiegel eine Steigerung der p65-Transkription zumindest teilweise über eine H3K4-Methylierung (88, 108, 109). Dies erklärt man sich insofern, dass unterschiedliche Stimuli auch unterschiedliche Funktionsweisen von SET7 im Sinne einer direkten oder aber H3K4-vermittelten Methylierung bewirken können, was eine noch höhere Zahl möglicher Wechselwirkungen dieser HMT impliziert (110).

Auch entscheidend ist SET7 in der Reaktion auf oxidativen Stress, speziell in Form reaktiver Sauerstoffspezies (ROS): Sowohl die hemmende Wirkung von SET7 auf NFE2L2 (*nuclear factor erythroid 2-like 2*), einen Transkriptionsfaktor, der zu einer verstärkten antioxidativen Zellantwort führt, als auch auf PPARGC1A (*peroxisome proliferator activated Receptor  $\gamma$  Coactivator 1A*), einen für mitochondriale Funktionen entscheidender Co-Aktivatoren, der über Superoxiddismutase 2 und Katalase zum Erhalt der mitochondrialen Integrität insbesondere bei oxidativem Stress beiträgt, ist beschrieben (94). Die Expression von HIF1 $\alpha$  (*Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ), der bei Hypoxie die zelluläre Reaktion u.a. im Sinne einer vermehrten Glukoseaufnahme steuert, wird von SET7 negativ reguliert (84).

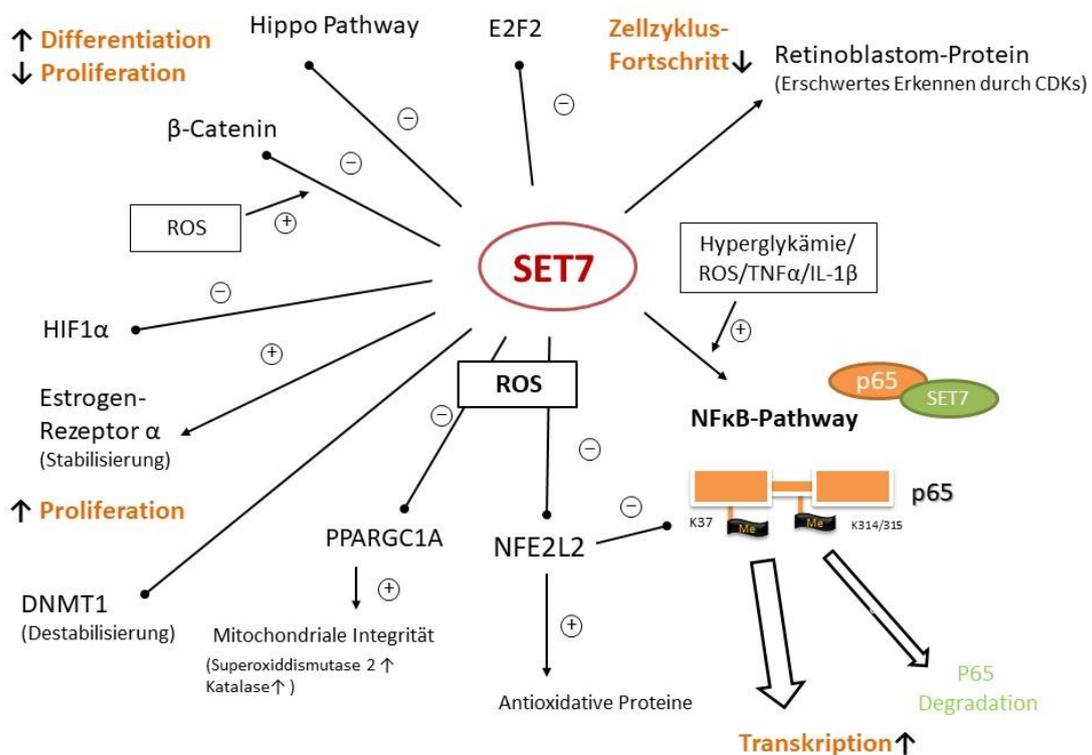
Außerdem beeinflusst SET7 Wachstum und Entwicklung. So besitzt SET7 eine Kontrollfunktion im Hippo-Pathway, die insgesamt fördernd auf die Differenzierung und hemmend auf die Zellproliferation wirkt (111, 112). Dieser wiederum hat Querverbindungen zum Wnt/ $\beta$ -Catenin-Pathway, der bedeutend für Zellwachstum und speziell Tumorgenese ist. Dessen Schlüsselprotein  $\beta$ -Catenin wird unter SET7 vermehrt abgebaut, interessanterweise verstärkten ROS diesen Effekt zusätzlich (113, 114).

Unterstrichen wird die Relevanz von SET7 für die Zelldifferenzierung durch Beobachtungen in humanen embryonalen Stammzellen. Für diese stieg die Expression von SET7 entsprechend dem Grad der Differenzierung an, ein shRNA (*small hairpin RNA*) knock-down führte entsprechend zu einer signifikant verspäteten Differenzierung der Zellen (98). Weiter reguliert SET7 pRB, das Retinoblastom-Tumorsuppressor-Protein, das von den Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDK) nach Methylierung erschwert erkannt wird (81). Ebenso kann durch Methylierung des Transkriptionsfaktors E2F1 Einfluss auf den Zellzyklus genommen werden, und SET7 in diesem Kontext die Rolle eines Tumorsuppressors einnehmen (115). Der gegenteilige Effekt im Sinne einer gesteigerten Proliferation ist vor allem verursacht durch ER $\alpha$  (*Estrogen receptor  $\alpha$* ), der von SET7 direkt methyliert und so stabilisiert wird (116).

Im Gegensatz dazu führt eine Methylierung der DNMT1 an Lysin 142 zu deren Destabilisierung, wobei sich dieser Prozess im Wechselspiel mit der Phosphorylierung von Serin 143 durch die Protein-Kinase B befindet, was wiederum zu einer erhöhten Stabilität führt. Die Beeinflussung der DNMT1-Aktivität durch SET7 ist besonders interessant, da DNMT1 in vielen Tumorentitäten überexprimiert ist (79). Ähnliche Beobachtungen zu SET7 zeigten sich im Zusammenhang mit Krebs und der Tumorgenese: Bei den meisten Arbeiten hierzu ging eine Alteration von SET7 mit einer schlechteren Prognose einher, je nach Zelltyp nahm SET7 die Rolle eines Tumorsuppressors oder, insbesondere bei Brustkrebs aufgrund der Stabilisierung des Estrogenrezeptors  $\alpha$ , die eines Protoonkogens ein (113, 117-120). Trotzdem wiesen SET7 knock-out Mäuse keine erkennbaren phänotypischen Besonderheiten auf (121).

Für verschiedene Zellpopulationen ist die Relevanz von SET7 detaillierter nachgewiesen. So spielt SET7 eine Rolle bei der Differenzierung glatter Muskelzellen und braunen Fettgewebes (122, 123). In Bezug auf Monozyten und Makrophagen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass ein knock-down durch eine shRNA maßgebliche Veränderungen der Zellfunktionen verursacht: Die Adhäsion der Monozyten an endotheliale Zellen wird vermindert, während die Integration TNF $\alpha$ -vermittelter Signale und folglich die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine abgeschwächt wird (95). Bestätigt wird dieses Ergebnis durch die Beobachtung, dass in von Diabetes mellitus Typ 2 - Erkrankten aus dem Blut isolierten Monozyten eine erhöhte Expression von SET7 festzustellen war, die

mit einer Hochregulation von NFκB, inflammatorischen Genen sowie ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) einherging (108). Es konnte kürzlich auch eine direkte Beteiligung von SET7 an der Regulierung von S100A12 (*S100 calcium-binding protein A12*), das in Makrophagen als schnelle Antwort auf erhöhte Glukoselevel vermehrt exprimiert wird, und Zytokinproduktion, oxidativen Stress sowie Inflammation fördert, nachgewiesen werden (124). Wie genau SET7 aber diese vielfältigen Veränderungen verursacht und auf welche Weise die verschiedenen Signale integriert werden, ist weiterhin unklar.



**Abbildung 4: Auswahl relevanter SET7 Mechanismen – zusammenfassende Grafik.** SET7 steigert (+), verstärkt durch Hyperglykämie, oxidativen Stress (ROS), TNFα oder IL-1β, die NFκB-vermittelte Antwort durch spezifische Lysin- (K) Methylierung (Me) von p65, kann seltener aber auch zu dessen Degradation führen. V.a. unter oxidativem Stress hemmt (-) SET7 eine antioxidative Reaktion durch PPARGC1A und NFE2L2. Es destabilisiert DNMT1 und reguliert HIFα negativ. Es bestehen proliferationsfördernde bzw. -hindernde Effekte durch Stabilisierung von Estrogenrezeptor α und negativer Regulation des Hippo- und β-Catenin-Pathways. Auch kann ein Voranschreiten des Zellzyklus über Hemmung von E2F2 oder pRB (das nach Methylierung durch SET7 von den CDKs (*cyclin-dependent kinases*) schlechter erkannt wird) erschwert werden. Eigene Anfertigung.

### 1.3 Matrix-Metalloproteasen

Matrix-Metalloproteasen (MMPs) werden von verschiedenen Zelltypen synthetisiert und dienen als Proteasen primär dem Entfernen von Extrazellulärmatrix und dem Gewebeumbau. Ihre Inaktivierung erfolgt durch die TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) Enzyme (125). Über Proteolyse können einzelne MMPs außerdem zur Aktivierung verschiedener Proteine und zur Freisetzung von Chemokinen oder Wachstumsfaktoren führen. Sie sind auf diese Weise an der Vermittlung unterschiedlicher Umweltbedingungen wie Inflammation oder im Rahmen der Gewebeverletzung beteiligt (126). Insbesondere die Gelatinasen MMP2 und MMP9 scheinen so speziell für die Freisetzung von biologisch aktivem TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  relevant zu sein und können Einfluss auf die Aktivität anderer MMPs nehmen, indem sie deren Vorläuferformen als Substrat nutzen (127-129). Neben kontinuierlich freigesetzten MMPs, deren Expression variiert werden kann, ist die Induktion einzelner MMPs auch kurzfristig, vermittelt über verschiedene proinflammatorische Mediatoren, möglich (129, 130). So macht diese variable Änderung der eigenen Expression die MMPs zusätzlich zu ihrer potenziellen regulatorischen Rolle bei der Reaktion auf Reize (z.B. durch Chemokinausschüttung) als Substrat für eine epigenetischen Modifikation generell verdächtig.

Außerdem sind sie maßgeblich am atherosklerotischen Krankheitsgeschehen beteiligt. So ist besonders für spätere Stadien der Atherosklerose eine erhöhte Aktivität spezieller MMPs charakteristisch, die unter anderem die Zell-Migration, wie die der SMCs in die Intima, erleichtern (129). Auch tragen sie entscheidend zu Degradation von Extrazellulärmatrix und infolgedessen zur Instabilität des atherosklerotischen Herdes bei (131, 132). Vor allem die u.a. von Makrophagen sezernierten Gelatinasen MMP2, 9 sowie die membrangebundene Protease MMP14 werden während der Entwicklung der Atherosklerose verstärkt exprimiert (133, 134). Demgegenüber kann speziell TIMP2 in deren Pathogenese einen protektiven Effekt aufweisen, indem es besonders die MMP14-vermittelte Invasion von Monozyten in den atherosklerotischen Herd vermindert. TIMP1 wiederum zeigt eine verringerte Expression in instabilen atherosklerotischen Plaques der Carotis (135, 136).

## 1.4 Epigenetik und Atherosklerose

Die Rolle epigenetischer Mechanismen bei der Entstehung von Krebs wird seit vielen Jahren ausführlich untersucht. So treten häufig charakteristische Veränderungen der DNA Methylierungsmuster, wie eine verstärkte Hypomethylierung, auf und Mutationen epigenetischer Enzyme fördern das Voranschreiten oder gelten als Risikofaktoren (55, 137, 138). Im Gegensatz dazu wird der Zusammenhang zwischen Atherosklerose und Epigenetik erst seit kurzem gezielt erforscht. Eine der ersten Arbeiten, die sich hiermit beschäftigte, untersuchte die Methylierung von Estrogenrezeptor-Promotoren in atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zu gesunden Gefäßabschnitten. Nicht nur war die Methylierung signifikant erhöht, auch konnte die Expression des Estrogenrezeptors durch Inhibition der DNA-Methyltransferasen deutlich gesteigert werden (139). Weiter wurde ein Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und dem kardiovaskulären Risiko postuliert, und Unterschiede hinsichtlich der Methylierung zwischen atherosklerotischem und gesundem Gewebe festgestellt (140-142). Passend dazu zeigten atherosklerotische Proben in über 10% der Gene aberrante CpG-Methylierungsmuster (143). An Läsionen der Carotis konnten konkret erstmals relevante Veränderungen der Histon-Methylierung nachgewiesen werden: So ist die H3K4 Methylierung im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose generell eher erhöht, besonders in glatten Muskelzellen, die aus der Läsion isoliert wurden. Ein relevanter Einfluss dieser Histonposition bei der Atherosklerose scheint somit möglich. Auch wurden Alterationen der Histon-Methyltransferasen MLL2 (H3K4) und G9a (H3K9) sowie von DNMT1 und TET1 nachgewiesen (142). Bei Makrophagen, die in der Pathogenese der Atherosklerose entscheidend beteiligt sind (18), führte eine Verhinderung der DNA-Methylierung durch 5-Aza-2'-Deoxycytidin zu einer verminderten Expression der mRNA proinflammatorischer Zytokine, zu abgeschwächter Migration, Adhäsion und Infiltration (144). Demgegenüber konnte in DNMT1-überexprimierenden Makrophagen eine gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden, was im Atherosklerose-Mausmodell ein rascheres Fortschreiten der Erkrankung bewirkte (145). Generell scheint eine epigenetische Regulation eine entscheidende Rolle als Kontrollfunktion von Monozyten und Makrophagen, besonders bei deren Aktivität in inflammatorischen Prozessen, zu spielen, und ist eng mit der Aktivität einzelner

epigenetischer Enzyme verknüpft (145, 146). Auch könnten diese zum Teil verantwortlich für die charakteristische Hochregulierung inflammatorischer Gene im atherosklerotischen Krankheitsprogress sein (147).

Besonders für MMPs sind, wie bereits angedeutet, regulatorische epigenetische Mechanismen anzunehmen. So sind Alterationen der Methylierung in den Promoterregionen einzelner MMPs abhängig von deren Aktivität, speziell für MMP2 und 9, beschrieben, und auch die Möglichkeit einer Regulation der TIMPs durch Methylierung scheint wahrscheinlich (148-150). In atherosklerotischen Plaques zeigte sich außerdem die CpG-Methylierung von MMP3 verändert, während dessen Expression in der DNMT1 und DNMT3b knock-out Maus gesteigert war (143, 151).

Vor allem die hohe Relevanz epigenetischer Veränderungen als Reaktion auf Umwelteinflüsse wie Rauchen, Ernährung und im Prozess des Alterns legen in Hinblick auf die atherosklerotischen Risikofaktoren eine Beteiligung an der Pathogenese nahe (28, 152-155). Insbesondere Makrophagen zeigen eine hohe Plastizität ihres Chromatin-Konformationsstatus, der gewebeabhängig in einer neuen Umgebung re-programmiert wird, und werden durch epigenetische Prozesse reguliert (146, 156). Zudem hat sich herausgestellt, dass auch Teile des angeborenen Immunsystems eine Art Gedächtnis, die sogenannte *'trained immunity'*, entwickeln können, was mithilfe epigenetischer Veränderungen gespeichert werden kann, und diese Zellen schneller auf bereits bekannte pathogene Erreger reagieren lässt (157). Dass Veränderungen des Blutflusses, ein Charakteristikum der Atherosklerose, epigenetische Alterationen der Endothelzellen bedingen und dadurch Einfluss auf deren Funktionsstatus nehmen, spielt hier ebenfalls eine entscheidende Rolle, ebenso das Auftreten epigenetisch alternierter NO-Synthasen-Promoter bei verdickter Intima-Media der Karotiden (158, 159).

Speziell SET7, das insbesondere bei einigen atherosklerotischen Risikofaktoren wie Hyperglykämie und ROS eine Schlüsselrolle zu spielen scheint, in Monozyten aus dem peripheren Blut von Diabetes-Erkrankten erhöht ist und via NFκB an einer inflammatorischen Reaktion beteiligt ist, ist in diesem Zusammenhang besonders interessant (94, 95, 108, 109).

Zu den TET-Enzymen sind bereits deutliche Veränderungen in Bezug auf Inflammation und speziell Atherosklerose beschrieben. Untersuchungen bei Blutkrebs zeigten, dass somatische Mutationen, die vermehrt im Alter auftreten, vor allem in den Genen von DNMT3a und TET2 stattfinden und mit einem erhöhten Krebsrisiko, aber auch mit einem verstärkten Auftreten von KHK assoziiert sind (160). TET2 reguliert und fördert den Zellverdau, was u.a. durch oxLDL oder niedrige Scherkräfte gebremst werden kann, außerdem wird es zur Eindämmung von inflammatorischen Prozessen benötigt und beeinflusst den Phänotyp glatter Muskelzellen (161-165). Dazu passend zeigen TET2-mutierte LDL-Rezeptor knock-out ( $Ldlr^{-/-}$ ) Mäuse einen Anstieg der Plaque-Größe und Sekretion von inflammatorischen Faktoren wie IL-1 $\beta$  (166).

All diese Ergebnisse verdeutlichen die möglicherweise hohe Relevanz epigenetischer Mechanismen für die Atherosklerose und legen einen Einfluss dieser auf deren Pathogenese nahe. So könnten sie die Brücke zwischen Umwelteinflüssen und Inflammation als Atherosklerose-Risikofaktoren und den molekularbiologischen Charakteristika der Krankheit bilden (157, 167). Es fehlt aber im Konkreten die Demaskierung der für die vereinzelt bereits nachgewiesenen Veränderungen der DNA- und Histon-Methylierung verantwortlichen epigenetischen Enzyme und die Abschätzung ihrer Anteilnahme an den einzelnen Schritten der Pathogenese. Dies könnte zukünftig nicht nur zu neuen diagnostischen Biomarkern, sondern zu weiteren dringend benötigten therapeutischen Ansätzen verhelfen.

## **1.5 Ziel der Arbeit**

Das Ziel der Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen epigenetischen Mechanismen und Atherosklerose näher zu untersuchen. Dies erfolgt zunächst *in vitro* anhand zweier im Rahmen der Atherosklerose sehr relevanten Zellpopulationen, den Makrophagen sowie den glatten Muskelzellen. Bezüglich der Histone liegt hier der Fokus auf der Untersuchung von Enzymen, die an H3K4 wirken, da die Literatur eine relevante Beteiligung dieser Position am atherosklerotischen Geschehen vermuten lässt. Es geht insbesondere um die Frage, ob in diesen Zellen verschiedene Reize, genauer eine Stimulation mit verschiedenen pro-atherosklerotischen Substanzen, einen Einfluss auf die

Expression epigenetischer Enzyme haben. Für SET7 und DNMT1 soll im Speziellen geklärt werden, welche zeitliche Dynamik hinter dieser epigenetischen Reaktion liegt.

Ergänzend sollen unter vergleichbaren Versuchsbedingungen Alterationen der Genexpression von verschiedenen MMPs sowie deren Inhibitoren in Makrophagen überprüft werden. Diese spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Krankheit und aufgrund bereits nachgewiesener möglicher epigenetischer Einflussnahme soll untersucht werden, ob die Wahrscheinlichkeit einer Kontrolle durch epigenetische Mechanismen besteht.

**Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Enzyme und Zytokine**

<b>Epigenetische Enzyme</b>	
○ <b>DNA-Methylierung:</b>	DNMT1, DNMT3a
○ <b>DNA-Demethylierung:</b>	TET2, TET3
○ <b>Histon-Methylierung (H3K4):</b>	SET1 (= <i>Ash2l</i> ), SET2 (= <i>SMYD1</i> ), SET7
○ <b>Histon-Demethylierung (H3K4):</b>	LSD, Kdm5a
<b>Matrixmetalloproteasen</b>	MMP2, MMP9, MMP14
<b>Inhibitoren der MMPs</b>	TIMP1, TIMP2
<b>Zytokine und Transkriptionsfaktoren</b>	TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NF $\kappa$ B

Am Mausmodell kann die Rolle der ausgewählten epigenetischen Enzyme im atherosklerotischen Geschehen näher beurteilt werden. Hierfür wurde eine LDL-Rezeptor-knock-out (*Ldlr*<sup>-/-</sup>) Maus unter achtwöchiger fettreicher Diät (*high-fat diet*, HFD) als Modell gewählt, da diese insbesondere ein dem Menschen ähnliches Lipidprofil aufweist (168). Anhand von Gewebeproben dieser Tiere und der daraus gewonnenen Zellsuspensionen können krankheitsspezifisch Alterationen im pathologischen Organismus untersucht werden. Schließlich sollte die Methode eines stabilen knock-outs von SET7 durch das CRISPR/Cas9 System etabliert werden, um so in Zukunft den Einfluss von SET7 in unterschiedlichen Zelllinien unter verschiedenen Bedingungen näher beurteilen zu können.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

Alle hier aufgeführten Materialien wurden mir von dem Institut für Experimentelle Biomedizin, Lehrstuhl II, der Universitätsklinik Würzburg zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.1 Zell- und Bakterienkultur

Ampicillin	Thermo Fisher Scientific
EDTA-Trypsin	Sigma Aldrich
FCS ( <i>fetal calf serum</i> )	Sigma Aldrich
D-PBS ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )	Thermo Fisher Scientific
Kollagenase	Sigma Aldrich
Penicillin	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific
Stbl3 E. coli	Thermo Fisher Scientific
StemPro Accutase	Thermo Fisher Scientific
$\beta$ -Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific
RPMI-Medium 1640 (mit 2 mM L-Glutamin)	Thermo Fisher Scientific
OptiMEM-Medium	Thermo Fisher Scientific
DMEM-Medium	Thermo Fisher Scientific
DMEM-GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific
LB-Medium	Carl-Roth

#### Konditioniertes Medium:

cDMEM-Medium	DMEM-Medium
	10 % FCS
	100 U/ml Penicillin/Streptomycin
	0,1 % $\beta$ -Mercaptoethanol

DMEM-Glu	DMEM-Medium 10 % FCS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 1 g Glukose/ 500ml
cDMEM-Hungermedium	DMEM-Medium 0,5 % FCS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 0,1 % $\beta$ -Mercaptoethanol
cDMEM-GlutaMAX	DMEM-GlutaMax 10 % FCS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
cRPMI-Medium	RPMI-Medium (1640) 10 % FCS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 0,1 % $\beta$ -Mercaptoethanol
RPMI-HEPES.Medium	RPMI-Medium (1640) 10 % FCS 100 U/ml Penicillin/Streptomycin 25 mM HEPES
cRPMI-L929-Medium	cRPMI-Medium 15 % L929-Medium

### 2.1.2 Zelllinien

Zellreihe	Herkunft	Verwendungszweck
L929 Adhärenzte Zelllinie aus Mausfibroblasten	ATCC	Gewinn von L929-konditioniertem Medium für Zellkulturen
Primäre Mausmakrophagen	Isoliert aus C57BL/6J Mäusen (siehe 2.2.1.5)	Zellkulturversuche
Glatte Muskelzellen (SMCs)	Isoliert aus C57BL/6J Mäusen (siehe 2.2.1.7)	Zellkulturversuche

HEK 293  Mit AAV-5 transformierte humane embryonale Nierenendothelzelllinie	ATCC	CRISPR/Cas9 AAV-System: Viren-Assembly
Cas9 SMCs  Glatte Muskelzellen, die bereits die Endonuklease Cas9 exprimieren	Isoliert aus B6.Rosa26-Cas9 knock-in Mäusen (siehe 2.2.1.7)	CRISPR/Cas9 System: SET7 KO

### 2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Agarose	Carl-Roth
ATP (Adenosin-5'-triphosphat) Solution	Thermo Fisher Scientific
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich
EDTA 0,5 M	Thermo Fisher Scientific
Ethanol 100 %	Carl-Roth
FastAP: Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific
FastDigest 10X buffer	Thermo Fisher Scientific
FastDigest SapI (Lgul)	Thermo Fisher Scientific
FUGENE HD Reagent	Promega
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 50 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
Glycerin	Carl-Roth
HEPES (4-(2-hydroxyethyl) -1-piperanzineethanesufonic acid)	Thermo Fisher Scientific
Isofluran	CP Pharma
Isopropanol	Sigma Aldrich
MassRuler DNA Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific
Midori Green Advance	Nippon Genetics
Na <sub>2</sub> EDTA	Sigma Aldrich
Natriumacetat	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Sigma Aldrich

Nuklease-free water	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	Carl-Roth
PCR MasterMix 2X Taq Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Polynukleotidkinase PNK	Thermo Fisher Scientific
PowerUp SYBR Green Mastermix	Thermo Fisher Scientific
Proteinkinase K	Fermentas
Rapid Ligation Buffer 2X	Enzymatics
SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate)	Carl-Roth
T4 Ligase	Enzymatics
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Pharmacia Biotech
10X TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)	10 % Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8.0) 5,7 % Acetat Tris 242 mM

#### 2.1.4 Substanzen zur Stimulation

IL-1 $\beta$ (Interleukin 1 $\beta$ ) (10 $\mu$ g/ml)	Peprtech
LPS (Lipopolysaccharid) (100 $\mu$ g/ml)	Sigma Aldrich
TNF $\alpha$ (Tumornekrosefaktor $\alpha$ ) (10 $\mu$ g/ml)	Peprtech
OxLDL (oxidiertes LDL) (2 mg/ml)	Hycultec /BTI Inc

#### 2.1.5 Plasmide

Plasmid	Herkunft	Verwendungszweck
<b>PX552</b>	Geschenk von Feng Zhang (Addgene plasmid #60958; <a href="http://n2t.net/addgene:60958">http://n2t.net/addgene:60958</a> ; RRID: Addgene 60958)	AAV-Plasmid (sgRNA)
<b>pAAV-DJ</b>	AAV-DJ Helper free Packaging System, Cell Biolabs	AAV-Plasmid, Hybrid-Capsid
<b>pHelper</b>	AAV-DJ Helper free Packaging System, Cell Biolabs	AAV-Plasmid

## 2.1.6 Primer

Name	Sequenz (5'→ 3')	Primer	Zielgen
NS01.qmASH21.F	GTGGAGTTGCAGTGTGGGAT	Forward	SET1
NS02.qmASH21.R	TCGAGACTGCCACGTCAAAT	Reverse	SET1
NS37.qmSETD2.F	CCGACCCCTGAAGAAGAAGAA	Forward	SET2
NS38.qmSETD2.R	ATGACACCTTTTGCCGTCCC	Reverse	SET2
NS05.qmSETD7.F	CAGAGGACTGCGCTCTATGG	Forward	SET7
NS06.qmSETD7.R	TGGAGATGAGAGAGTCGGCA	Reverse	SET7
NS07.qmKdm1a.F	AAGCCAGGGATCGAGTAGGT	Forward	LSD
NS08.qmKdm1a.R	GGAACAGCTTGTCCATTGGC	Reverse	LSD
NS09.qmKdm5a.F	TCTCCGTGTGTCATCAGCC	Forward	Kdm5
NS10.qmKdm5a.R	CTCTTGCTTTAGTCGGGGCA	Reverse	Kdm5
NS25qmDNMT1.F	TTGAAACTTCACCTAGTTCCGT	Forward	DNMT1
NS26qmDNMT1.R	GGTTCGCGCTGTTACCTCTT	Reverse	DNMT1
NS27qmDNMT3a.F	GAACAGGAGGAGAACCGTGG	Forward	DNMT3a
NS28qmDNMT3a.R	CTCCTCAGGTTGGGGTTCAC	Reverse	DNMT3a
NS33qmTET2.F	GCCGAGCCTAGAGAACAGAC	Forward	TET2
NS24.qmTET2.R	CCGTAGCGGAACAGGAACAA	Reverse	TET2
NS35.qmTET3.F	CTCCCTCGGCGGGGATAATG	Forward	TET3
NS36.qmTET3R	CGGGCTCTCTAGCACCATTG	Reverse	TET3
NS13.qmMMP2.F	CCCCATGTGTCTTCCCCTTC	Forward	MMP2
NS14.qmMMP2.R	GTGTAGATCGGGGCCATCAG	Reverse	MMP2
NS19.qmMMP9.F	CGCTCATGTACCCGCTGTAT	Forward	MMP9
NS20.qmMMP9.R	CCGTGGGAGGTATAGTGGGA	Reverse	MMP9
NS11qm.MMP14.F	CCCACTTTGATTCTGCCGAG	Forward	MMP14
NS12.qmMMP14.R	CTTTGTGGGTGACCCTGACTT	Reverse	MMP14
NS21.qmTIMP1.F	GGCATCTGGCATCCTCTTGT	Forward	TIMP1
NS22.qmTIMP1.R	CGCTGGTATAAGGTGGTCTCG	Reverse	TIMP1
NS23.qmTIMP2.F	AAAGCAGTGAGCGAGAAGGA	Forward	TIMP2

NS24.qmTIMP2.R	GGGGGCCGTGTAGATAAACT	Reverse	TIMP2
GAPDH F	AGCTTGTCATCAACGGGAAG	Forward	GAPDH
GAPDH R	CGGAGATGATGACCCTTTTG	Reverse	GAPDH
HPRT F	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	Forward	HPRT
HPRT R	CCTGGTTCATCATCGCTAATC	Reverse	HPRT
IL-1 $\beta$ F	TGAGCACCTTCTTTTCCTTCA	Forward	IL-1 $\beta$
IL-1 $\beta$ R	TTGTCTAATGGGAACGTCACAC	Reverse	IL-1 $\beta$
NF $\kappa$ B F	GAACTTCTCGACAGCTTCG	Forward	NF $\kappa$ B
NF $\kappa$ B R	CGTAGTTCGAGTAGCCATACCC	Reverse	NF $\kappa$ B
TNF $\alpha$ F	CTGTAGCCCACGTCGTAGC	Forward	TNF $\alpha$
TNF $\alpha$ R	GGTTGTCTTTGAGATCCATGC	Reverse	TNF $\alpha$
SV468.U6_gRNAsSeq.F	GGACTATCATATGCTTACCG	Forward	U6 Promoter
SV723AAV11.cleav.F	TATGTGGATGGAGAGCTGAATG	Forward	SET7 sgRNA 1
SV724AAV11.cleav.R	CACGTTCCCTTCTTTGTTTCTC	Reverse	SET7 sgRNA 1
SV725AAV12/13.cleav.F	GGAAGTATAGCACCCGTTTCATC	Forward	SET7 sgRNA 3
SV726AAV12/13.cleav.R	CATTCAGCTCTCCATCCACATA	Reverse	SET7 sgRNA 3

### 2.1.7 Kits

<b>AAV-DJ Helper free Packaging System</b>	Cell Biolabs	#VPK-400-DJ
<b>First Strand cDNA Synthesis Kit</b>	Thermo Fisher Scientific	#K1612
<b>NucleoSpin RNA Kit</b>	Macherey-Nagel	#740 955.250
<b>QIAprep® Spin Miniprep Kit</b>	Quiagen	#27104
<b>QIAquick® Gel Extraktion Kit</b>	Quiagen	#28704
<b>QuickTiter AAV Quantification Kit</b>	Cell Biolabs	#VPK-145
<b>TOPO TA Cloning Kit</b>	Thermo Fisher Scientific	#450071

## 2.1.8 Instrumente und Gerätschaften

CellGard ES Biosafety Cabinet class 2 Sicherheitswerkbank	NuAire
Cool Cell Freezing Container	BioCision
Infinite 200 PRO Fluorometer	Tecan
Heracell CO <sub>2</sub> Inkubator 160i	Thermo Fisher Scientific
Imager AI600	Amersham
Leica DM 4000B Fluorescence Microscope	Leica Biosystems
Nanodrop 2000C	Thermo Fisher Scientific
PCR Cycler	Eppendorf
QuantStudio 6 flex RealTime PCR	Applied Biosystems
Thermocycler peqSTAR	VWR
Vakuum-Pumpe Aspir8 Mini	Cell Media
Vortexer	VWR
Zentrifugen, insbesondere: Ministar Mikrozentifuge, Heraeus Multifuge, Heraeus Fresco 21 Mikrozentifuge, Megafuge 40 R	VWR, Thermo Fisher Scientific

## 2.1.9 Verbrauchsmaterialien

384-Well-qPCR-Platte	Biozym
6-, 24-Well Platte	Sarstedt
Cellstar™ Zellkulturkolben	Greiner Bio-One
Combitip advanced Pipettenspitze	Eppendorf
Costar 96-Well Black Polystyrene Plate	ImmunoChemistry

Falcon© 70µm Zellfilter	Corning
Pipette filter tips	Sarstedt
Spritze (BD PlastipakTM)	BD Biosciences
Zentrifugenröhrchen	Thermo Fisher Scientific

### 2.1.10 Verwendete Software

Graph Pad Prism (v7)	GraphPad
Real-Time PCR Software v1.2	QuantStudio
Endnote X 8/9	Clarivate Analytics
SnapGene Software	Insightful Science (snapgene.com)

### 2.1.11 Tiere

Für diese Arbeit wurden Mäuse des Typs C57BL/6J zur Kultivierung von Makrophagen und glatten Muskelzellen, *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäuse (B6.129S7-*Ldlr*<sup>tm1Her</sup>/J) für die Entnahme von Milz und Aorta, sowie B6.Rosa26-Cas9 knock-in Mäuse (B6J.129(Cg)-*Gt(ROSA)26Sor*<sup>tm1.1(CAG-cas9\*,-EGFP)Fezh</sup>/J) zur Kultivierung glatter Muskelzellen für die Durchführung des CRISPR/Cas9 knock-outs verwendet. Diese wurden bereitgestellt durch das Jackson Laboratory. Die Haltung erfolgte am Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin, Würzburg.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellbiologische Methoden**

Sämtliche Arbeiten an den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen in einer Zellkultur-Hood unter laminarem Flow durchgeführt. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 %-iger CO<sub>2</sub> Umgebung inkubiert.

#### **2.2.1.1 Zellkultur**

Die unterschiedlichen Zellreihen wurden je nach Verwendungszweck und Zelldichte in verschieden großen Zellkulturflaschen (T25, T75, T175) kultiviert und im Hinblick auf Wachstum und Konfluenz vor jedem weiteren Schritt unter dem Mikroskop beurteilt. Ein Splitten der Zellkulturen erfolgte bei eingetretener Konfluenz von circa 80-90 % der Zellkulturflasche. Als Standard-Kulturmedium wurden cDMEM (SMCs), cDMEM-GlutaMAX (HEK293) und cRPMI (Makrophagen, L929-Zellen) verwendet und dieses alle zwei bis drei Tage gewechselt. Bei allen Zellen wurde zum Splitten zuerst das alte Medium abgesaugt und die Zellkulturflaschen mit PBS-Puffer gespült. Da alle hier verwendeten Zellreihen in der Zellkultur adhärent wachsen, wurde zusätzlich Trypsin-EDTA bzw. Accutase (für HEK293-Zellen und spätere Makrophagenkulturen) verwendet, bei Bedarf ergänzt mit einem Zellschaber, um die Zellen vorsichtig von der Oberfläche zu lösen. Darauf wurden die Zellen nach Medium-Zugabe zur Inaktivierung des Trypsins erneut zentrifugiert (5 min, 400 xg), der Überstand abgesaugt und die Zellen anschließend nach Resuspension in Medium in eine neue Zellkulturflasche transferiert. Die genaue Ermittlung der zu transferierenden Menge konnte über Kenntnis der Zellzahl pro ml erfolgen, die mithilfe der Neubauerkammer bestimmt wurde.

#### **2.2.1.2 Einfrieren von Zelllinien**

Um einzelne Zellkulturen in flüssigem Stickstoff zu lagern, erfolgten zuerst die gleichen Arbeitsschritte wie unter 2.2.1.1. Nach Resuspension der von der Zellkulturflasche abgelösten und zentrifugierten Zellen in Medium wurden 90 µl Zell-Medium-Gemisch in

Kryo-Tubes pipettiert und diesen im Sinne einer 1:10 Verhältnisses 10 µl DMSO hinzugegeben, welches die Bildung von Eiskristallen verhindert. Ein langsamer Abkühlprozess wurde durch einen für diesen Zweck bestimmten Freezing Container sichergestellt, der ein zellschonendes Abkühlen um -1 °C/Stunde gewährleistet, in welchen die Tubes verpackt in dem -80 °C-Freezer zwischengelagert wurden.

### **2.2.1.3 Auftauen von Zelllinien**

Die zuvor in den Kryo-Tubes bei -80 °C zwischengelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Ihr Inhalt wurde, sobald sich der Aggregatzustand in flüssig änderte, sofort in eine mit 10 ml eines zuvor ebenfalls im Wasserbad angewärmten, konditionierten zellspezifischen Mediums gefüllte Zellkulturflasche mittlerer Größe ausgesetzt und anschließend im Brutschrank inkubiert.

### **2.2.1.4 L929-Zellkultur und L929-Medium-Gewinn**

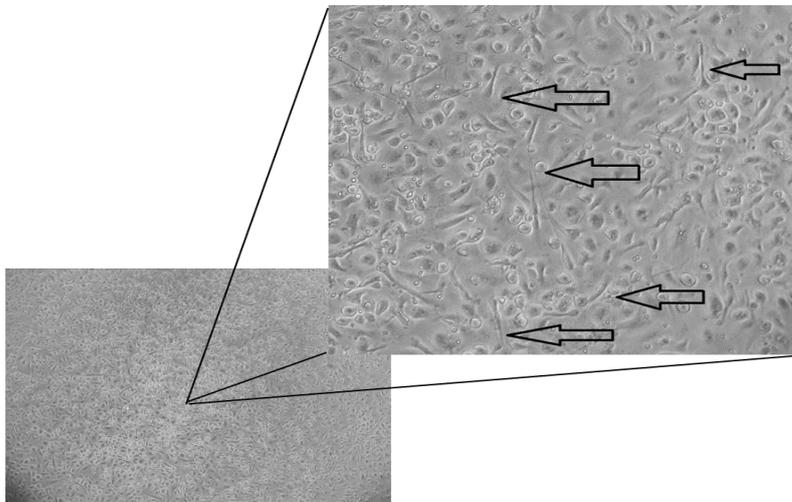
L929-Zellen dienten als Produzenten des Wachstumsfaktors M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), der zur Makrophagenkultur (siehe 2.2.1.5) benötigt wurde. Nach dem Auftauen der L929-Aliquots wurde den Zellen RPMI-HEPES-Medium zugegeben und der Überstand nach Zentrifugation (5 min., 400 xg) verworfen. Darauf wurde das Pellet mit 5 ml Medium gelöst und die Zellen in der Zellkulturflasche (T25) inkubiert, bis sie ab ausreichender Konfluenz in T175-Flaschen gesplittet werden konnten. Eine T175-Flasche konnte nach erneutem hinreichenden Wachstum in fünf Flaschen gleicher Größe unter Zugabe von 55 ml frischem Medium gesplittet werden. Mediumwechsel erfolgten an jedem Wachstums-Tag der Zellen. Nach insgesamt zehn Tagen wurde das Zell-Medium entnommen, zentrifugiert (5 min, 400 xg), der Überstand über einen Stericup-Filter filtriert und das neugewonnene L929-Medium daraufhin in 50 ml Aliquots bei -80 °C gelagert.

### **2.2.1.5 Gewinn und Kultivierung von Maus-Makrophagen aus dem Knochenmark**

Zum Makrophagengewinn aus dem Knochenmark (*bone marrow derived*, BMD) wurden die Femur- und Tibiaknochen 8-12 Wochen alter C57BL/6J Wildtyp-Mäuse verwendet.

Die Tiere wurden von dafür qualifizierten Labormitarbeiterinnen und Mitarbeitern nach der Tötung durch Isofluran und zervikale Dislokation mit Ethanol desinfiziert und die Knochen, ohne das Knochenmark zu eröffnen, herauspräpariert, weiterhin Muskeln und umliegendes Gewebe entfernt. Anschließend wurden die Knochen unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur-Werkbank in 70 %-igem Ethanol gereinigt, mit cRPMI-Medium gewaschen, dann das Knochenmark eröffnet und dieses mit Medium über einem 70 µm Zellfilter in einen 50 ml Falcon ausgespült. Für jedes Tier wurde ein neuer Falcon verwendet. Nach anschließender Zentrifugation (5 Minuten, 400 xg) wurde das gewonnene Zellpellet mit 10 ml cRPMI-L929-Medium (cRPMI-Medium + 15 % L929-Medium) gelöst und die Zellzahlen unter Zuhilfenahme einer Neubauerkammer bestimmt.

Das Zell-Medium-Gemisch wurde in (48- oder) 24-Well-Platten ausgesetzt, bei denen jedes Well circa  $2 \times 10^6$  Zellen und 200 µl cRPMI-L929-Medium enthielt, und anschließend im Brutschrank kultiviert.



**Abbildung 5: Makrophagenkultur Tag 7: Die Differenzierung der Zellen ist u.a. an ihren Pseudopodien (Pfeile) zu erkennen.** Mit Digitalkamera angefertigtes Lichtmikroskopbild bei 200-facher Vergrößerung.

Mediumwechsel wurden jeweils an Tag drei, fünf und sieben ebenfalls mit cRPMI-L929-Medium, am Vormittag des achten Tages mit speziellem cRPMI-Hungermedium, das nur 0,5 % FCS enthielt, um die Makrophagen für die folgende Stimulation empfänglicher zu machen, durchgeführt.

### **2.2.1.6 Makrophagenstimulation**

Die Stimulation erfolgte am Abend des achten Tages der Zellkultur nach einer vorausgegangenen zehnstündigen Hungerperiode mit cRPMI-Hungermedium. Die Zellen wurden in den Versuchsreihen mindestens in Form von Triplikaten jeweils über zwölf Stunden einer Konzentration von 50 µg/ml oxLDL, 50 ng/ml TNF $\alpha$ , 20 ng/ml IL1- $\beta$  und 50 ng/ml LPS ausgesetzt oder blieben unbehandelt. Die Reagenzien waren zuvor in Medium gelöst worden, so dass den Zellen pro Well nach Absaugen des alten Mediums jeweils 200 µl Stimulus-Medium-Gemisch zugegeben wurde. Die unbehandelten Kontrollen erhielten entsprechend 200 µl Medium. Um die zeitliche Dynamik der Expression verschiedener Enzyme unter Stimulation genauer zu überprüfen, wurde die Stimulation kultivierter BMDM (*bone marrow-derived macrophages*) im Sinne einer Zeitkurve erneut für TNF $\alpha$  durchgeführt. Nach vorausgegangenem Mediumwechsel mit cRPMI-Hungermedium wurden am frühen Morgen des nächsten Tages, nach insgesamt zehnstündiger Hungerperiode, je drei Well Makrophagen pro Stimulationsdauer mit 50 ng/ml TNF $\alpha$  stimuliert oder zur Kontrolle bestimmt. Die Lyse der Zellen erfolgte dann nach jeweils 3, 7, 9 und 23 Stunden andauernder Stimulationsbehandlung.

### **2.2.1.7 Stimulation glatter Muskelzellen**

Die Isolation und Kultivierung glatter Muskelzellen aus der Aorta 8-12 Wochen alter C57BL/6J Wildtyp-Mäuse (sowie aus B6.Rosa26-Cas9 knock-in Mäusen für den SET7 CRISPR/Cas9 KO, siehe 2.2.3.4) wurde durch in dieser Technik erfahrene Labormitarbeiterinnen und Mitarbeiter durchgeführt, die mir die isolierten SMCs bereits in Kultur (24 well-Platten) zur Verfügung stellten. Die Stimulation der Zellen erfolgte über neun Stunden nach einer vorausgegangenen zehnstündigen Hungerperiode mit cDMEM-Hungermedium. Dabei wurden je 5 well SMCs, ausplattiert in  $1 \times 10^4$  Zellen/well, jeweils mit einer Konzentration von 10 µg/ml oxLDL, 50ng/ml TNF $\alpha$  oder 50ng/ml LPS (entsprechend 2.2.1.6) stimuliert oder blieben als Kontrolle unbehandelt.

### **2.2.1.8 Zellsuspension von Milz, Aorta und Aortenwurzel**

Für die Entnahme der Milz sowie Aorta wurden  $Ldlr^{-/-}$ -Mäuse, an die über acht Wochen eine fettreiche Diät, im Folgenden HFD (*high-fat diet*), aus 15 % Milchfett und 1.25 % Cholesterol verfüttert worden war, um die Entwicklung von Atherosklerose zu induzieren, sowie  $Ldlr^{-/-}$ -Mäuse, die als Kontrolle keine spezielle Diät erhielten, verwendet (169-171). Bereits durch qualifiziertes Laborpersonal entnommene Organproben dieser entsprechend behandelten Mäuse wurden mir dankenswerterweise durch das Institut überlassen. Die Milzproben wurden mit einer Mischung aus 40 ml PBS-Puffer und 2 mg/ml Kollagenase über eine Kanüle (27G) und Spritze gespült, bis die Organfärbung abblasste, die Aorten wurden ebenfalls gespült, ventral vertikal eröffnet und in der Enzymmischung für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Milz konnte mithilfe eines Skalpells in drei bis fünf kleine, gleich große Stückchen geschnitten, die Aorta ebenfalls gestückelt werden. Mithilfe eines Spritzen-Stempels und PBS wurden die Gewebestücke jeweils über einem 70 µm Zellfilter ausgedrückt und die Zellen darunter in einem sterilen Falcon aufgefangen. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für fünf Minuten bei 4 °C und 400 xg. Das Pellet wurde folgend mit 10 ml cRPMI gelöst und daraufhin direkt mit der RNA-Isolation begonnen.

## **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

Sofern nicht weiter angegeben, erfolgten alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen und der Verwendung von Einmal-Pipettenspitzen mit Filtertip. Die Proben wurden zwischen den einzelnen Arbeitsschritten immer auf Eis gelagert.

### **2.2.2.1 RNA Isolation**

Zur RNA-Isolation wurde das '*NucleoSpin RNA Kit*' der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Lyse der Zellen erfolgte nach Absaugen des Mediums durch Zugabe von 350 µl des im Kit enthaltenen RNA-Lysis-Puffers RA1 und 3,5 µl Mercaptoethanol je Well Zellen. Daraufhin wurden die lysierten Zellen entweder nach einer Einwirkzeit von circa drei Minuten in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt, oder direkt entsprechend dem Hersteller-Protokoll

weiterverarbeitet. Anschließend wurde das Lysat auf einen Nucleospin Filter pipettiert und folgend zentrifugiert (11000 ×g für eine Minute bei Raumtemperatur (RT)), der Durchfluss nach Mischen mit 350 µl Ethanol auf eine NucleoSpin RNA Säule übertragen, abermals zentrifugiert (11000 ×g, 30 Sekunden, RT) und schließlich wurden 350 µl des im Kit enthaltenen Puffers MDB auf die RNA Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation (11000 ×g, 1 Minute, RT) folgte der DNase-Verdau mit 95 µl DNase Reaktionsmix, der direkt auf die Säulenmembran appliziert wurde. Die darauffolgende Inkubationszeit (RT) betrug mindestens 15 Minuten. Im Anschluss folgten verschiedene Waschschrte, zuerst mit 200 µl RAW2 Puffer, dann mit 600 µl RA3 Puffer, und schließlich erneut, um die Membran komplett zu trocknen, mit 250 µl Puffer RA3. An jeden Waschschrte schloss sich eine Zentrifugation mit 11000 ×g, RT, für eine halbe Minute (Waschschrte 1 und 2) bzw. für zwei Minuten (Waschschrte 3) an, der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Um eine noch höhere Konzentration an RNA zu erhalten, wurden im letzten Schritt nur 40 statt der im Protokoll angegebenen 60 µl RNase-freies Wasser zugegeben und abschließend bei 11000 ×g, RT für eine Minute zentrifugiert, um so die RNA herauszulösen und in einem sterilen Tube aufzufangen. Konzentration und Qualität der neu synthetisierten RNA wurden direkt nach der Synthese photometrisch mithilfe des NanoDrop-Spektrophotometers geprüft.

#### **2.2.2.2 cDNA Synthese**

Die verwendeten RNA-Proben wurden, entsprechend ihrer NanoDrop-Messung, mit Nuklease-freiem Wasser auf gleiche Konzentrationen verdünnt, um eine Vergleichbarkeit zu erreichen. Zur cDNA-Synthese wurde das '*cDNA first strand synthesis kit*' von Thermo Fisher Scientific verwendet. Pro Probe wurden in ein steriles Nuklease-freies PCR-Tube 1 µl oligo(dT) Primer, die berechnete Menge der RNA-Probe und eine entsprechende Menge Nuklease-freies Wasser gegeben. Das für jede Probe andere Verhältnis von RNA zu Wasser beruht auf dem oben genannten Prinzip der RNA-Konzentrationsverdünnung auf gleiche Ausgangswerte. So konnten anschließend insgesamt 11 µl Primer-RNA-Wasser-Mix nach kurzem Vortexen und Zentrifugation für fünf Minuten bei 65 °C inkubiert werden (Tabelle 2 Schritt 1). Dies wird vom Hersteller unter anderem bei Verwendung GC-reicher RNA empfohlen. In der Zwischenzeit wurde

ein Mastermix aus 4 µl des im Kit enthaltenen 5X Reaction Buffer, 1µl RiboLock Rnase Inhibitor, 2 µl 10 mM dNTP Mix und 2 µl der M-MuLV Reverse Transkriptase pro Probe hergestellt, dieser gevortext und zentrifugiert, davon jeweils 9 µl auf jedes PCR-Tube pipettiert und die Tubes nach sanftem Vortexen und kurzer Zentrifugation in den Thermocycler gegeben (Schritt 3 und 4): Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei 37 °C, daraufhin wurde die Synthese für fünf Minuten bei 70 °C terminiert. Die neu synthetisierte cDNA, die durch reverse Transkription komplementär aus RNA synthetisiert wurde und nur codierende Genabschnitte und keine Introns enthält, wurde umgehend bei -20 °C gelagert und im Anschluss direkt weiterverarbeitet.

**Tabelle 2: cDNA Synthese: Schritte Thermocycler**

SCHRITT	TEMPERATUR	ZEIT
1	65°C	5 min.
2	4°C	∞
3	37°C	60 min.
4	70°C	5 min.
5	4°C	∞

### 2.2.2.3 Isolation genomischer DNA

Zur Isolation der genomischen DNA (*gDNA*) wurden die Zellen (hier infizierte Cas9 knock-in SMCs, siehe 2.2.3.4) in 24-well-Platten mit 190 µl Lysepuffer (10 mM Tris pH 8, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8, 10 mM NaCl, 0.5 % SDS) und 10 µl Proteinase K lysiert und daraufhin vier Stunden bei 56 °C und 1.400 rpm inkubiert. Anschließend wurden sie bei 20.000 xg für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand zusammen mit einem MasterMix aus 300 µl Lysepuffer, 50 µl 3M Natriumacetat sowie 450 µl Isopropanol in ein neues Reaktions-Gefäß pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation für 30 Minuten und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach zwei weiteren Zentrifugationen, einmal für 20, dann für fünf Minuten, und jeweils

Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet schließlich in 30 µl 10 mM Tris (pH 8) resuspendiert.

#### 2.2.2.4 Polymerasekettenreaktion

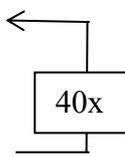
Insbesondere zum Nachweis der Expression verschiedener Enzyme in Makrophagen sowie der Funktionalität designer Primer-Paare, aber auch im Rahmen der Überprüfung des SET7 CRISPR/Cas9 knock-outs in der gDNA glatter Muskelzellen wurden mehrere Polymerasekettenreaktionen (PCR) unter Verwendung des PCR Master Mix (2X) von Thermo Scientific mit Primern einer Konzentration von 10 pmol/µl durchgeführt. Die einzelnen verwendeten Substanzen mit Mengenangaben und die Schritte des Thermocyclers sind Tabelle 3 zu entnehmen. Zum Ausschluss etwaiger Kontaminationen wurde zu jeder PCR stets eine Wasserprobe angesetzt.

**Tabelle 3: Polymerasekettenreaktion – Mengenangaben und Schritte Thermocycler**

<i>Reagenz</i>	<i>Menge in µl</i>
PCR Master Mix	12,5
Primer forward	1,25
Primer reverse	1,25
H <sub>2</sub> O	8
Template DNA	2
Insg.	25 µl

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
1 Denaturierung	95°C	5 min
2 Denaturierung	95°C	30 sec.
3 Annealing	60°C	10 sec.
4 Elongation	72°C	30 sec.
5	72°C	5 min
6	4°C	∞



#### 2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um die PCR-Produkte nach ihrer Synthese größentechnisch aufzutrennen, fand die Methode der Gelelektrophorese Anwendung, bei der DNA-Produkte entsprechend ihrer Größe und Ladung unter Strom durch ein feinporiges Agarosegel wandern und anschließend sichtbar gemacht werden können. Grundsätzlich wurden für diese Arbeit 3 %-ige Agarosegele hergestellt, da aufgrund der berechneten Produktgröße der verwendeten Primer von verhältnismäßig kurzen Syntheseprodukten im Bereich von 100

bis 500 Basenpaaren auszugehen war. Diese sind durch etwas höherprozentige Gele besser zu detektieren, da deren Porengröße etwas kleiner ist und sie weniger schnell wandern können (172). Dazu wurde 1xTAE-Puffer mit Agarose versetzt (1,5 g Agarose-Pulver pro 50 ml 1xTAE-Puffer) und in der Mikrowelle erhitzt. Durch Zusatz von 4-6 µl Midori Green pro 100 ml konnte die UV-Visualisierung der PCR-Produkte ermöglicht werden. Das erwärmte Gel wurde in den Gelträger, der bereits in der mit 1xTAE Puffer gefüllten Gelelektrophoresekammer saß, gegossen, wobei durch einen Kamm Taschen geschaffen wurden, und verfestigte sich nach Abkühlen. Die PCR-Produkte wurden mit je 4 µl MassRuler DNA Loading Dye (6X) versetzt und die Taschen daraufhin jeweils mit 20 µl cDNA-MassRuler-Mix beladen. Als Referenz dienten 10 µl GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder bzw. GeneRuler 50 bp DNA Ladder, mit dem die erste Tasche befüllt wurde. Anschließend wurden die Gele an Gleichstrom angeschlossen, die Spannung variierte je nach Größe des Gels zwischen 110 bis 140 Volt bei einer Laufzeit über circa 90 Minuten. Schließlich wurden die Banden unter Verwendung des AI600 Imagers unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

#### **2.2.2.6 Gelextraktion**

Die Extraktion von DNA aus einem Agarosegel erfolgte entsprechend des Protokolls des 'QIAquick® Gel Extraktion' Kits. Mithilfe eines Skalpells konnte die gewünschte Bande unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten werden. Anschließend wurde der im Kit enthaltene QG Puffer entsprechend dem jeweiligen Gewicht des Agarosegelstücks in einem Volumen-Verhältnis von 6:1 (100 mg Gel entsprechen dabei ungefähr 100 µl Puffer) zugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation bei 50 °C unter regelmäßigem Durchmischen konnte die gleiche Menge Isopropanol in µl, ebenfalls entsprechend des Gelgewichts in mg, hinzugefügt werden. Anschließend wurde die Probe auf eine QIAquick Säule geladen, für eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 500 µl QG Puffer wurde erneut für eine Minute zentrifugiert und der Überstand abermals verworfen. Dies wurde als Waschschrift mit 750 µl PE Puffer wiederholt und die Säule nach fünf Minuten Ruhezeit für eine Minute zentrifugiert. Um die DNA zu lösen, wurden daraufhin 30 µl EB Puffer auf das Membranzentrum der

QIAquick Säule gegeben, diese nach vier Minuten Einwirkzeit für eine Minute zentrifugiert und die DNA anschließend bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.2.7 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung eingeschickter DNA in Form eines Plasmids bzw. genomischer DNA erfolgte durch die Firma *Eurofin Genomics*. Für die Auswertung wurde u.a. Clustal Omega verwendet (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

#### **2.2.2.8 Primer design**

Die Primer für DNMT1, DNMT3a, TET2, TET3, SET1, SET2, SET7, LSD, Kdm5, MMP2, MMP9, MMP14, TIMP1 und TIMP2 (aus 2.1.6) wurden unter Verwendung des Primer BLAST Programmes des *National Center for Biotechnology Information* für den Organismus ‚mus musculus‘ designt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Hierfür wurden folgende Parameter zur Erstellung der Primer festgelegt: Die Länge des PCR-Produkts soll zwischen 70 und 250 Basenpaaren und der Gehalt an Guanin und Cytosin bestmöglich bei 50 % liegen, immer aber zwischen 40 und 60 %, da so die Anlagerung an den komplementären DNA-Abschnitt verbessert, jedoch die Bildung von stabilen Hybriden nicht zu sehr begünstigt wird. Durch einen erhöhten GC-Gehalt steigt zugleich die Schmelz-Temperatur der Primer an, nahe beieinander liegende Werte der Primer-Paare zwischen 55 °C und 62 °C wurden für gut befunden. Die Selbst-Komplementarität des Primer-Paares hingegen soll möglichst gering sein, um unspezifische Primer-Dimerisierung zu vermeiden. Außerdem wurden nur Primer-Paare ausgewählt, die mindestens ein Intron überspannen, um so die Amplifikation von etwaiger genomischer DNA zu verhindern (173). Synthetisiert wurden die Primer von *Eurofins Genomics*. Es wurden Verdünnungen von 10 pmol/µl verwendet.

#### **2.2.2.9 Quantitative Real-time PCR**

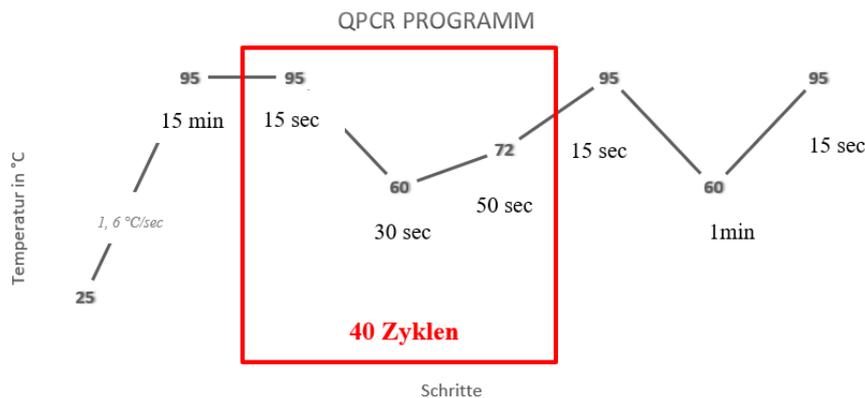
Die quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion (qPCR) beruht auf dem Verfahren einer herkömmlichen PCR, bei der jedoch durch Zuhilfenahme eines Fluoreszenzfarbstoffs, hier SYBR GREEN, die gewonnene DNA Replikatmenge einer

Probe im Vergleich zu einem Referenzgen, dem sogenannten *housekeeping* (HK), quantitativ ermittelt werden kann (174). Während der Amplifikation durch die Polymerase lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff zwischen sämtliche doppelsträngige DNA und emittiert im gebundenen Zustand ein Fluoreszenzsignal. Im zeitlichen Verlauf steigt mit der Zahl an DNA-Kopien proportional zur PCR Produktmenge die Intensität des Fluoreszenzsignals exponentiell an. Bei der qPCR wird nach jedem Amplifikationszyklus die Fluoreszenz gemessen und somit indirekt die Menge an DNA-Kopien unter Vergleich des jeweiligen CT-Wertes (*cycle threshold*), also dem Wert, ab dem das Fluoreszenzsignal erstmals den Schwellenwert übersteigt, ermittelt. Der CT wird umso schneller erreicht, je mehr DNA bereits zu Beginn in der Probe enthalten ist. Durch mathematische Berechnung ergibt sich der *fold change*, also die vielfache Abweichung der Menge an DNA (bzw. näherungsweise bei Verwendung von cDNA der Genexpression) von behandelten im Vergleich zu unbehandelten Zellen, was eine quantitative Auswertung ermöglicht (175, 176). Alle Arbeiten fanden bei sterilen Bedingungen unter einer UV-Hood nach vorangegangener UV-Bestrahlung des Arbeitsfeldes für mindestens 30 Minuten statt. Folgende Mengen wurden pro Reaktionsansatz in jedes Well der verwendeten 384-Well-Platten pipettiert (Tabelle 4):

**Tabelle 4: qPCR: Substanzen und Mengenangaben**

	<i>Menge in <math>\mu</math>l pro Well</i>
Primer forward 10 $\mu$ M	0,5
Primer reverse 10 $\mu$ M	0,5
cDNA	2
SYBR Green	5
H <sub>2</sub> O, Nuklease-frei	2
<hr/>	
Insg.	10

Anschließend wurde die Platte mit einer Folie verschlossen, um sie vor dem Austrocknen zu schützen, und kurz zentrifugiert. Abbildung 6 zeigt die einzelnen Schritte des verwendeten qPCR-Programms. Eine Wasserprobe diente zum Ausschluss etwaiger DNA-Verunreinigung der Primer-Verdünnungen.



**Abbildung 6: Schritte qPCR Programm**

Zum Vergleich der Genexpressionslevel zwischen den verschiedenen Zellen wurde die  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode angewandt. Dabei dient der CT-Wert des HK-Genes als interne Kontrolle und wird vom CT des zu untersuchenden Gens abgezogen, was den  $\Delta CT$ -Wert ergibt (177). In dieser Arbeit wurden GAPDH und HPRT als HK-Gene verwendet. Durch den Vergleich mit unstimulierten Zellen konnte der  $\Delta\Delta CT$  ( $\Delta CT_{\text{behandelt}} - \Delta CT_{\text{unbehandelt}}$ ) ermittelt und anschließend der Einfluss einer Stimulation im Sinne einer Änderung des CT-Wertes als x-fache Expressionserhöhung bzw. Erniedrigung eines Gens durch die Berechnung des *fold changes* mit  $2^{-\Delta\Delta CT}$  dargestellt werden (174, 178).

### 2.2.3 CRISPR/Cas9 knock-out

Das CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) / Cas9 (*CRISPR associated proteins 9*) System, ursprünglich ein bakterielles Abwehrsystem zur Entfernung von Bakteriophagen-Fremd-DNA aus dem bakteriellen Genom, ist seit kurzem ein bedeutendes Tool zum gezielten Genom-Editing, mit dem u.a. stabile Gen-knock-outs ermöglicht werden können (179-181). Der große Vorteil gegenüber anderen Methoden wie dem Funktionsverlust bzw. der Funktionsverminderung eines Gens durch kleine interferierende RNA-Moleküle, konstruierte Zink-Finger Endonukleasen oder dem Cre/loxP-System besteht in der relativ flexiblen und technisch einfachen Handhabung bei gleichzeitiger Stabilität, da die Methode, wenn erfolgreich, zu einem verlässlichen Genverlust führt, sowie insbesondere in der vergleichsweise hohen Erfolgsquote (182-186). Daher wurde sie im Rahmen dieser Arbeit erstmals für den knock-out von SET7

etabliert. Das System besteht aus Cas9, einer Endonuklease, die zu Doppelstrangbrüchen führt, sowie der einsträngigen 'single guide RNA' (sgRNA), die eine künstliche Kombination aus der ursprünglichen bakteriellen crRNA (*CRISPR-RNA*) und der tracrRNA (*trans-activating crRNA*) ist (187-189). Die sgRNA kann spezifisch designt werden und bindet mit ihrem crRNA-Anteil entsprechend ihrer Sequenz einen komplementären Gen-Abschnitt (189, 190). Die als RNA-DNA-Komplex basengepaarte sgRNA bindet außerdem Cas9 durch ihren tracrRNA-Anteil und führt die Endonuklease dadurch gezielt zu ihrem Gen-Target (179, 191, 192). Nach zusätzlichem Erkennen der sogenannten PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) Sequenz, die bei von *Streptococcus pyogenes* abgeleiteten Cas9 Endonukleasen aus der Basenfolge 5'-NGG-3' besteht und auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang zur Zielsequenz liegt, kann Cas9 die DNA kurz vor der PAM Sequenz durch einen Doppelstrangbruch schneiden (179, 192, 193). Die Reparatur des Strangbruchs erfolgt im Anschluss über das zelleigene Reparatursystem, u.a. durch die direkte Verknüpfung nicht-homologer Enden (NHEJ, *non-homologous end-joining*) (192). Dieser Reparaturmechanismus ist jedoch besonders anfällig für Fehler und es kommt zu Insertionen und Deletionen (sog. Indels), die zu einem verschobenen Leseraster, neuem Stopp-Codon und damit zu dem gewünschten Verlust der Genfunktion führen (194).

### **2.2.3.1 SgRNA-Design, -Insertion und -Klonierung**

Um einen SET7 knock-out über das CRISPR/Cas9 System zu ermöglichen, benötigt es neben der Cas9 Endonuklease die zum Gtarget passende sgRNA in den Zielzellen. In dieser Arbeit wurden hierzu glatte Muskelzellen verwendet, die zuvor aus B6.Rosa26-Cas9 knock-in Mäusen isoliert wurden. Diese Zellen exprimieren bereits Cas9. Die Transduktion der sgRNA in die Cas9 knock-in Zellen erfolgte via Viren über ein adeno-assoziiertes virales System (AAV-System).

#### sgRNA Design

Als erster Schritt wurden drei verschiedene sgRNAs mit jeweils unterschiedlichem crRNA-Anteil designt, die am Ende der Versuchsreihe hinsichtlich eines wirksamen SET7 knock-outs untereinander verglichen werden können. Eine erfolgreiche

Genmodifikation kann über in der Sequenzierung des SET7-Genabschnittes auftretende Indels abgeschätzt, ein funktioneller KO über eine deutlich verringerte SET7 mRNA-Expression der behandelten Zellen quantifiziert werden (siehe 3.3.1, 3.3.2). Die sgRNA beinhaltet einen 20 Nukleotide langen Teil der Basenfolge des Zielgens, in diesem Fall SET7, welcher in 5' Richtung direkt vor einer PAM-Sequenz liegen muss, und sich innerhalb eines 5' Exons des Gens befinden sollte, da eine hier auftretende Mutation mit höherer Wahrscheinlichkeit zu einer Inaktivierung des Gens führt (190, 192). Weiter sollte sie einen hohen Anteil an GC Basen besitzen, da so eine stabilere Bindung an die Ziel-DNA ermöglicht wird (195).

Es wurden entsprechende crRNA-Abschnitte für insgesamt drei verschiedene sgRNAs unter Verwendung von *ChopChop* (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) designt. Dabei ist es nötig, die Einmaligkeit der sgRNA-Zielsequenz, die neben einer PAM-Sequenz liegen muss, im gesamten Genom zu garantieren und mögliche sgRNAs bezüglich ihrer, bestenfalls geringen, off-target-Aktivität zu vergleichen. Die crRNA-Anteile der drei final ausgewählten sgRNAs binden alle an jeweils unterschiedlicher Stelle komplementär zu ihrer eigenen Basenfolge, die selbst Teil des SET7 Gens ist, im dritten Exon (ENSMUSE00000264686) von SET7 (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Zugehöriger Abschnitt der SET7-Gensequenz für sgRNA 1, 2 und 3:** Gezeigt wird die dem crRNA-Anteil der sgRNA 1 (Kreis), 2 (Rahmen gestrichelt) und 3 (Rahmen durchgehend) entsprechende Basenfolge des SET7 Gens (MGI:1920501, NCBI Gene: 73251) im Bereich des 3. Exons zwischen der 18.000 und 18.300-ten Genbase. Die jeweilige PAM-Sequenz ist unterstrichen. Darstellung via SnapGene Viewer.

Nach Auswahl der drei verschiedenen sgRNAs wurden entsprechende zueinander revers komplementäre Oligonukleotid-Paare als deren Vorlage synthetisiert, welche die Sequenz des Ziel-DNA-bindenden crRNA-Anteils beinhalten. Die Oligonukleotide weisen zusätzlich an ihrem 5' Ende einen Überhang der Basenfolge ACC bzw. AAC auf, um den Einbau in das als Vektor verwendete PX552 Plasmid (*Addgene*) zu ermöglichen. Die Synthese erfolgte durch *Eurofins Genomics*.

**Tabelle 5: Sequenzen der designten sgRNA Oligonukleotide**

Vorlage	Name	Sequenz (5'- 3')	
sgRNA 1	mSetd7_ko#1	accACAATCGACACGGAGTGTGT	Forward
	mSetd7_ko#1	aacACACACTCCGTGTCGATTGT	Reverse
sgRNA2	mSetd7_ko#2	accCGTCCACGTAATATCCCTCC	Forward
	mSetd7_ko#2	aacGGAGGGATATTACGTGGACG	Reverse
sgRNA 3	mSetd7_ko#3	accTTACGTGGACGATGCCCTGC	Forward
	mSetd7_ko#3	aacGCAGGGCATCGTCCACGTAA	Reverse

#### Insertion der sgRNA in das PX552-Plasmid

Das AAV-System ermöglicht die Transduktion der sgRNA im Rahmen des CRISPR/Cas9 Systems über einen viralen Vektor in die Zielzellen. Hierbei werden sich Abkömmlinge defekter Parvoviren, die nur abhängig von anderen, koinfizierenden Viren zur Replikation fähig sind, zunutze gemacht, was zur hohen Sicherheit dieses Systems beiträgt (196). Im Labor kann dies durch die Verwendung von drei verschiedenen Plasmiden mit unterschiedlicher Geninformation imitiert werden, ohne dass ein Hilfsvirus benötigt wird: Bei dem hier verwendeten ‘*AAV-DJ Helper Free Packaging System*‘ Kit sind dies AAV-DJ, AAV-Helper sowie ein rekombinantes Plasmid. AAV-DJ ist eine synthetische Vektorvariante, die durch sein Hybrid-Kapsid aus verschiedenen AAV-2 Serotypen weniger spezifisch für einen bestimmten Zelltyp ist und so eine Reihe verschiedener Zellen infizieren kann (197). Das AAV-DJ Plasmid enthält Gene für Replikations- und Kapsid-Proteine (die sog. Rep und Cap-Gene), während die restlichen benötigten Gene für den korrekten Zusammenbau eines infektiösen Virus auf dem AAV-Helper Plasmid liegen. Die mit den drei Plasmiden transfizierten HEK293-Zellen (2.2.3.2) wiederum

exprimieren endogen das AAV Gen E1 (198). Nur die Ko-Transfektion aller drei Plasmide in HEK293-Zellen ermöglicht die Produktion infektiöser Viren.

Das PX552 Plasmid (*Addgene*, <https://www.addgene.org/60958/>) dient zur Transfektion der sgRNA-Vorlage in die HEK293-Zellen. Das Plasmid besitzt neben einem Gen zur Ampicillin-Resistenz zwei Sequenzen der AAV ‘*inverted terminal repeats*’ (ITR), die als *cis* Element u.a. zur Replikation benötigt werden und eine T-förmige Sekundärstruktur ausbilden können. Des Weiteren weist es eine sgRNA-Expressions-Kassette mit U6 Promoter auf, in die die designten Oligonukleotide ligiert werden können. Hierzu wird ein Restriktionsverdau mit dem Enzym SapI durchgeführt, das sticky ends passend zum 5‘ ACC und 5‘ AAC Überhang der Oligonukleotide generiert (199-201).

Die Insertion der sgRNA-Oligonukleotide in das PX552-Plasmidgerüst sowie dessen Klonierung in *E. coli* erfolgte entsprechend des PX552 ‘*Cloning Protocol*’ von *Addgene* für alle drei sgRNAs sowie Negativkontrolle (Tabelle 6). Hierbei konnten die Oligonukleotide mithilfe des Restriktionsenzym SapI direkt hinter dem U6 Promoter in das PX552-Plasmid integriert werden. Die rekombinanten PX552-Plasmide wurden entsprechend ihrer sgRNA als pSet7sg1, pSet7sg2 und pSet7sg3 bezeichnet.

**Tabelle 6: Einbau der Vorlage für sgRNA 1, 2 und 3 in das PX552 Plasmid**

Teilschritt	Substanzen+Mengenangaben (MasterMix)	Einzelne Arbeitsschritte
Schritt 1  Verdau des Plasmidgerüsts	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 40 µl Plasmid PX552 DNA-Verdünnung (H<sub>2</sub>O + insg. 1 µg DNA)</li> <li>○ 4 µl SapI Fast Digest</li> <li>○ 5 µl FastDigest 10x Puffer</li> <li>○ 1 µl FastAP</li> </ul>	<b>1h Inkubation bei 37 °C,</b> Anschließend Vektoraufreinigung mithilfe des <i>QIAquick Gel Extraction</i> Kits (siehe 2.2.2.6)
Schritt 2  Phosphorylierung der sgRNA Oligonukleotide	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 1 µl Top Oligos (Forward) (100 µM)</li> <li>○ 1 µl Bottom Oligos (Reverse) (100 µM)</li> <li>○ 2 µl FastDigest 10x Puffer</li> <li>○ 1µ Polynukleotidkinase</li> <li>○ 1 µl ATP (25mM)</li> <li>○ 14 µl H<sub>2</sub>O</li> </ul>	

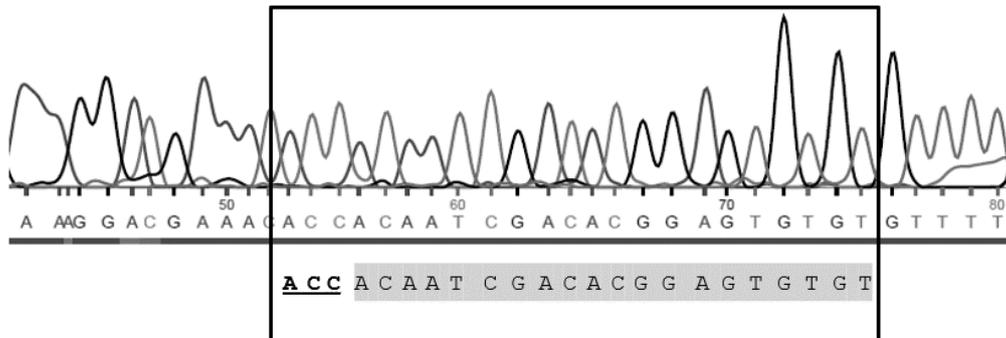
Schritt 3	○ Verdauter Plasmidvektor (25 ng) ( aus 1)	} <b>10 min Inkubation bei RT</b>
Ligation	○ 1 µl phosphorylierte Oligos ( aus 2)	
	(Verdünnung 1:50 )	
	○ 0,75 µl T4 Ligase	
	○ 5,55 µl H <sub>2</sub> O	
	○ 1 µl Rapid Ligation Buffer 2x	

Anschließend wurden die jeweiligen Ligations-Reaktionsansätze in Stbl3 E. coli transformiert: Je 3 µl der Plasmid-Proben wurden direkt nach der Ligation zu 50 µl E. coli Bakterien gegeben. 20 Minuten Kühlung auf Eis folgten 42 Sekunden Inkubation bei 42 °C im Thermocycler. Nach erneuter zweiminütiger Kühlung der Proben konnten 300 µl reines LB-Medium zugegeben werden. Im Anschluss wurden die Proben bei 37 °C für eine Stunde im Thermocycler unter leichtem Schütteln inkubiert. Die E. coli Kulturen konnten daraufhin auf LB Agarplatten mit 0,1 % Ampicillin ausplattiert und über Nacht erneut inkubiert werden. Am nächsten Morgen wurden 3-4 Kolonien E. coli pro Transformationsansatz gepickt und mit 3 ml LB-Medium sowie Ampicillin (Endkonzentration 0,1 %) in einen luftdurchlässigen Zellkulturkolben übertragen. Diese wurden erneut über Nacht im Thermocycler (37 °C, 120 rpm) inkubiert.

#### Plasmidaufreinigung: Mini DNA-Präparation der Plasmide

Die Aufreinigung der Plasmide pSet7sg1, pSet7sg2 und pSet7sg3 erfolgte nach dem 'QIAprep Spin Miniprep' Kit Protokoll. Dabei wurden 2,5 ml der inkubierten Bakterienkulturen für acht Minuten (4800 xg, RT) zentrifugiert und das Pellet im Anschluss in 250 µl des im Kit enthaltenen P1 Puffers resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl P2 Puffer, vorsichtigem Mixen und Aufklaren der Probe wurden 350 µl N3 Puffer zugegeben, dann wurde erneut gemischt und für zehn Minuten (13.000 rpm) zentrifugiert. 800 µl des Überstandes wurden auf eine QIAprep 2.0 Säule geladen und für 60 Sekunden (13.000 rpm) zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Ein Waschschriff mit 0,5 ml PB Puffer (Zentrifugation für 60 Sekunden bei 13.000 rpm, Verwerfen des Durchflusses) folgte. Der Waschschriff wurde mit 0,75 ml PE Puffer wiederholt. Nach erneuter einminütiger Zentrifugation konnten 50 µl EB Puffer auf die QIAprep 2.0 Säule gegeben und nach einer Minute die DNA durch erneute Zentrifugation gelöst werden. Die

aufgereinigten Plasmide wurden durch *Eurofins Genomics* unter Verwendung eines Primers, der am U6-Promoter bindet, sequenziert (SV468.U6\_gRNAsSeq.F, siehe 2.1.6 und 2.2.2.7). Für alle drei sgRNA-Vorlagen konnte der erfolgreiche Einbau der sgRNA in das Plasmidgerüst nachgewiesen werden.



**Abbildung 8: Zwischenschritt Plasmidsequenzierung**, exemplarisch dargestellt für sgRNA 1. Zu sehen ist ein Ausschnitt der Nukleotid-Sequenz des mit dem U6-Promoter-Primer sequenzierten Plasmids pSet7sg1 (Chromatogramm). Der Rahmen zeigt die erfolgreiche Insertion der sgRNA 1. Grau hinterlegt ist die Basenfolge des crRNA-Anteils von sgRNA 1, die dem verwendeten forward Oligonukleotid mSet7\_ko# 1 entspricht. Der ACC-Überhang (nicht Teil der Basenfolge des SET7-Zielgens) ist unterstrichen.

### 2.2.3.2 AAV-System: Transfektion der HEK-Zellen und Virusproduktion

Da sgRNA 2 und 3 an sich überlappender Stelle im SET7 Gen binden (Abbildung 7) und sgRNA 2 außerdem die, gemäß des sgRNA-Design Tools, schlechteste prognostizierte Effizienz aller drei sgRNAs aufweist, wurden für den knock-out Versuch nur sgRNA 1 und 3 verwendet. Folglich diente sgRNA 2 als Reserve, die erst bei fehlender Wirksamkeit der beiden erfolgversprechenderen sgRNAs zur Anwendung kommen sollte.

So wurden im Anschluss die aufgereinigten PX552-Plasmide mit eingebauter sgRNA 1 bzw. 3 aus 2.2.3.1 (pSet7sg1 und pSet7sg3) zusammen mit den zwei weiteren Plasmiden aus dem „AAV-DJ Helper Free Packaging System“ Kit, dem AAV-DJ Plasmid und dem AAV-Helper Plasmid, in einer molaren Ratio von 1:1:1 in HEK293-Zellen transfiziert (202). Die HEK293-Zellen wurden hierzu in insgesamt zwei 6-well-Platten in einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/Well ausplattiert. Für jede Platte wurde jeweils eins der zwei

verschiedenen sgRNA-PX552-Plasmide verwendet. Die Ko-Transfektion selbst erfolgte spezifisch für HEK293-Zellen bei 80 %-iger Konfluenz nach dem 'FuGENE® HD Protocol' (<https://www.promega.de/techserv/tools/FugeneHdTool/>) zur Transfektion von HEK-Zellen in 3 ml Medium mit einer 3.0:1 Fugene:DNA Ratio. Zu 122 µl Opti-MEM Medium wurden jeweils 7,3 µl sgRNA-PX552 Plasmid, 9,9 µl DJ-Plasmid sowie 15,8 µl Helper-Plasmid im Sinne einer totalen DNA-Menge von 3,3 µg in 155 µl Gesamtvolumen gegeben, mit 9,9 µl FuGene Reagent vermischt und je 150 µl dieses Master-Mixes auf die Zellen gegeben. Die Virenproduktion in den HEK293-Zellen konnte über 70 Stunden im Brutschrank unter regelmäßiger optischer Kontrolle der Zellen stattfinden, die sich mit fortschreitender Virusproduktion zunehmend abrunden und von der Platte lösen. Darauf wurden die Zellen mit 0.5 M EDTA für drei Minuten inkubiert und mit dem Medium in sterile Tubes pipettiert. Nach Zentrifugation (5 min., 1.000 rpm), Entfernen und Einfrieren des Überstandes, wurde das Zell-Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zell-Suspension wurde insgesamt viermal alternierend in Trockeneis mit Ethanol gefroren und im Zellbad bei 37 °C wieder aufgetaut, zentrifugiert (10 min., 10.000 xg), so dass sich der Zell-Debris absetzte, und schließlich wurde der Überstand als AAV-Zell-Lysat mit 1,5 ml PBS gesammelt.

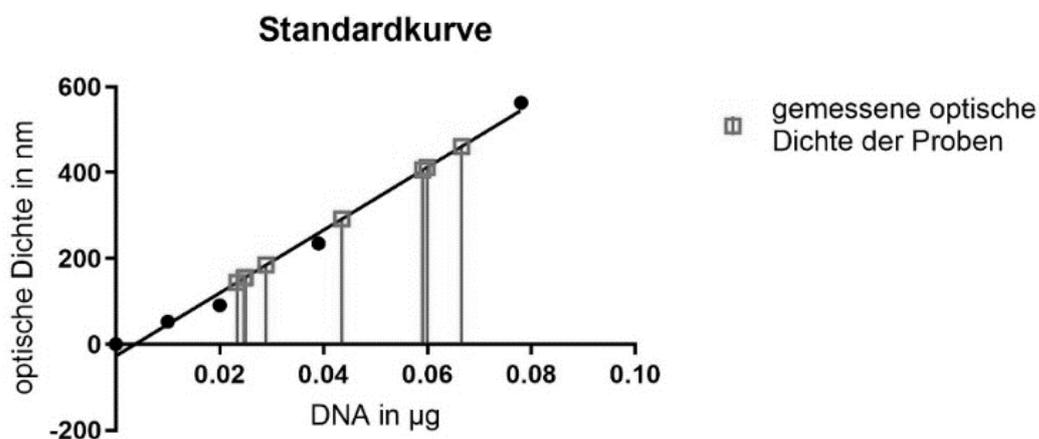
### **2.2.3.3 AAV-Titer-Bestimmung**

Unter Verwendung des 'Cell Biolabs QuickTiter AAV Quantitation' Kits und eines Fluorometers konnte der AAV-Titer der jeweiligen Probe (AAV-Zell-Lysat sgRNA 1 und 3; jeweils in Triplikaten) aus 2.2.3.2 anhand seiner Fluoreszenz bestimmt werden. Hierzu wurden je 1 ml einer Mischung aus AAV-Zell-Lysat und serumfreiem DMEM-Medium mit 10 µl des im Kit enthaltenen ViralBind AAV Reagent A gemischt. Nach Inkubation (30 min., 37 °C), Zugabe von 50 µl des über die gleiche Zeit vorinkubierten ViralBind AAV Reagent B und erneuter Inkubation des Mixes für 30 Minuten bei 37 °C wurden 50 µl gevortexter Capture Matrix, in der AAV2-spezifische Mikrobeads enthalten sind, die die Viren binden, zugegeben. Die Suspension blieb darauf für 30 min. auf einem Laborschüttler. Nach Zentrifugation bei 1.000 rpm für zehn Minuten und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 1 ml 1X AAV Wash Solution gewaschen, erneut über

fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Darauf wurde der Waschschrift wiederholt.

Die Proben wurden zentrifugiert (30 Sek., 2.000 rpm) und letzter Überstand vorsichtig abpipettiert. Schließlich wurde das Pellet aus Viren-bindenden Beads mit 20 µl 1X Solution C 30 Sekunden gevortext, eine Stunde inkubiert (75 °C) und zentrifugiert (30 Sek., 12.000 rpm), damit sich die Beads absetzen konnten. Je 10 µl Überstand pro Probe wurde zuletzt zusammen mit 90 µl GR Dye zur Fluoreszenzmessung mit einem 480 / 520 nm Filter auf eine Costar Platte gegeben. Durch Erstellung einer Standardkurve (Abbildung 9) aus verschiedenen AAV-DNA-Konzentrationen von 10 µg/ml bis 0 µg/ml in 1:2 Verdünnungs-Schritten unter Zugabe von mitgelieferter Solution C, AAV Standard DNA und CR Dye konnte entsprechend der Fluoreszenzmessung direkt auf die in der Probe enthaltenen Menge an AAV-DNA geschlossen werden. Anschließend konnte der AAV-Titer im Sinne einer Anzahl an Genom-Kopien pro Milliliter für jede einzelne Probe

über die Formel  $\frac{\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{AAV-DNA (ng)} \times \left(3.6 \times 10^8 \frac{\text{GC}}{\text{ng}}\right) \times (20 \mu\text{l} / 10 \mu\text{l})}{1.0 \text{ ml}}$  berechnet werden.



**Abbildung 9: Standardkurve zur AAV Titer Berechnung.** Durch Messung der optischen Dichte einer Probe mittels Fluorometer kann so die enthaltene Menge DNA direkt abgelesen werden.

Alle Werte der Triplikate der zwei verschiedenen sgRNA-AAV-Proben lagen im Zielbereich zwischen  $6,4 \times 10^{10}$  ng und  $13,9 \times 10^{10}$  ng pro 1 ml.

#### **2.2.3.4 Infektion glatter Muskelzellen: Transduktion der sgRNA**

In 24-well Platten zu einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/well ausplattierte B6.Rosa26-Cas9 knock-in glatte Muskelzellen, die bereits die Endonuklease Cas9 exprimierten, wurden mit 30  $\mu$ l viralem Zellüberstand (Virus-Titer von  $10 \times 10^{10}$  Genomkopien/ml) je Well infiziert, was einem zahlenmäßigen Verhältnis von Viren zu Zielzellen (MOI) von 300.000 entspricht. Die Zellen wurden regelmäßig optisch kontrolliert und das Medium nach zwei Tagen mit DMEM-Glu gewechselt. Nach vier Tagen wurden die Zellen lysiert und anschließend die jeweilige genomische DNA der Zellen nach 2.2.2.3 isoliert. Ebenso wurde entsprechend der beiden verschiedenen sgRNAs die RNA der Zellen nach 2.2.2.1 in Form von Triplikaten isoliert und die cDNA synthetisiert.

#### **2.2.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte, nach Rücksprache mit dem *Institut für Klinische Epidemiologie und Biometrie* (IKE-B) der Universität Würzburg, mithilfe des Graph Pad Prism Programmes. Nach Überprüfung des Vorliegens einer Normalverteilung durch den Shapiro-Wilk-Test sowie graphisch wurde hierzu der Student's T-Test bei parametrischer beziehungsweise des Mann-Whitney-Test bei nicht-parametrischer Datenlage verwendet. Dabei wurde ein P-Wert kleiner als 0.05 als statistisch signifikant erachtet (\*), des Weiteren entspricht in dieser Arbeit  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) und  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*). Dargestellt werden jeweils die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, die Anzahl der Replikate  $n$  betrug, sofern nicht anders angegeben, immer mindestens 3.

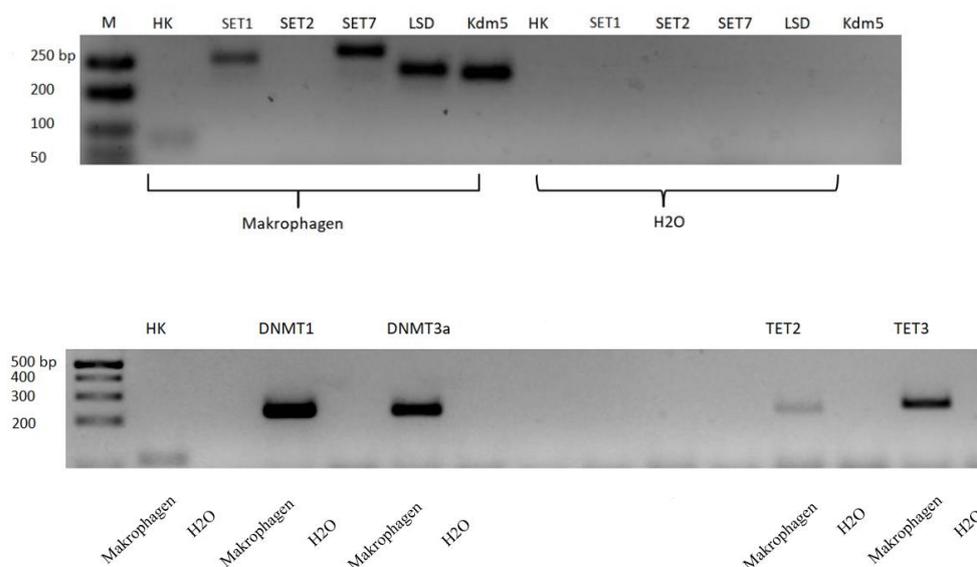
### 3. Ergebnisse

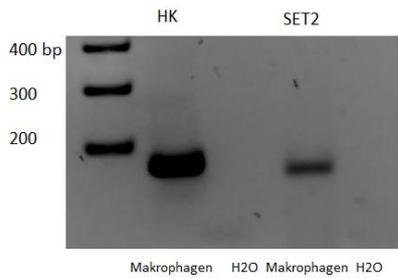
#### 3.1 Stimulationsversuche Zellkultur

##### 3.1.1 Expression epigenetischer Enzyme in Makrophagen nach Stimulation

Um näher beurteilen zu können, ob epigenetische Mechanismen im Kontext der Atherosklerose eine Rolle spielen, und konkreter, ob die pro-atherogenen Stimuli oxLDL, TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$  und LPS bereits zu Veränderungen der Expression epigenetischer Enzyme in atherosklerotisch relevanten Zellen führen, wurden Stimationsversuche mit Zellkulturen muriner BMDM durchgeführt. Die Zellen wurden im Anschluss an die Stimulation via qPCR auf Veränderungen ihrer Enzymexpression untersucht und mit unbehandelten Kontrollen verglichen.

Hierzu wurde zunächst die generelle Expression der H3K4 Histon-Methyltransferasen (HMT) SET1, SET2 und SET7, der H3K4 Histon-Demethyhasen (HDM) LSD und Kdm5, der DNA-Methyltransferasen DNMT1 und 3a sowie der DNA-Demethylasen TET2 und 3 in BMDM über eine klassische PCR (siehe 2.2.2.4) nachgewiesen und gleichzeitig die Funktionalität der Primer-Paare überprüft (Abbildung 10). In der entsprechenden Gelelektrophorese zeigten sich, korrelierend mit der errechneten Basenpaarlänge des Primer-Paar-Amplifikats, einzelne Banden mit der erwarteten Größe.



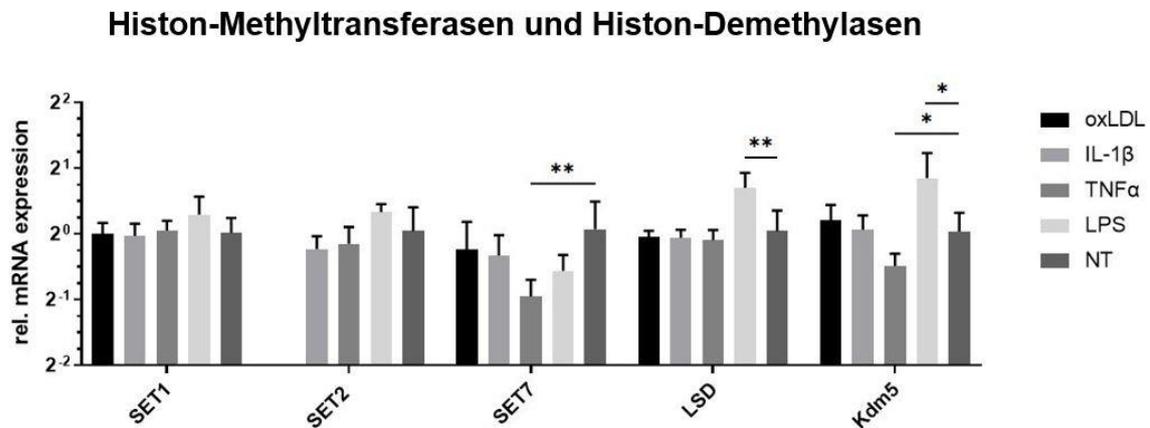


**Abbildung 10: Gelelektrophorese der PCR Produkte zu den verwendeten epigenetischen Primern in BMDM:** Test der Funktionalität der Primer-Paare. Die erste Geltasche wurde jeweils mit GeneRuler 50 bp bzw. 1 kb Plus DNA Ladder (M) beladen, um die PCR-Produkte anhand ihrer Basenpaar (bp)-Länge vergleichen zu könnten; diese wurden durch ein 3 %-iges Agarosegel getrennt. Housekeeping GAPDH (HK) sowie Wasserprobe (H<sub>2</sub>O) dienten als Kontrolle.

Da für SET2 mit dem ersten Primer-Paar kein PCR-Produkt detektiert werden konnte, wurde ein neues Primerpaar designt und dessen korrekte Funktion ebenfalls nachgewiesen (Abbildung 10). Die validierten Primer wurden im Anschluss zur qPCR-Analyse verwendet, anhand der die mRNA-Expression der epigenetischen Enzyme nach Zellstimulation mit unstimulierten Kontrollen verglichen und quantifiziert werden konnte. Hierzu wurden BMDM nach zehnstündiger Hungerperiode über zwölf Stunden mit 50 µg/ml oxLDL, 50 ng/ml TNF $\alpha$ , 20 ng/ml IL1- $\beta$  oder 50 ng/ml LPS stimuliert oder blieben unbehandelt. Die daraufhin isolierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben und schließlich mittels qPCR unter Verwendung der entsprechenden Primer analysiert.

Die Stimulation mit LPS bzw. TNF $\alpha$  führte zu deutlichen Veränderungen bei der Expression von SET7, LSD und Kdm5. Abbildung 11 zeigt vergleichend die Ergebnisse der mRNA-Expression untersuchter HMT und HDM in stimulierten und unstimulierten BMDM. Während keine der Stimulationen einen relevanten Effekt auf die Genexpression von SET1 und SET2 hatte, war SET7 unter TNF $\alpha$ -Stimulation in seiner Expression signifikant vermindert. Diese Beobachtung erwies sich in mehreren Wiederholungen des Versuchs (hier nicht dargestellt) als reproduzierbar. Die Stimulation mit LPS wiederum führte zu einer leichten Verminderung der SET7 Expression im Vergleich zu den Kontrollen, ohne dass jedoch statistische Signifikanz erreicht wurde. Die Expression von LSD und Kdm5 war unter LPS-Stimulation dem gegenüber gesteigert, Kdm5 unter TNF $\alpha$  in der Expression vermindert. Unter Stimulation mit IL-1 $\beta$  kam es für kein getestetes

Enzym zu einer signifikanten Expressionssteigerung beziehungsweise -Verminderung, ebenso wenig für oxLDL.

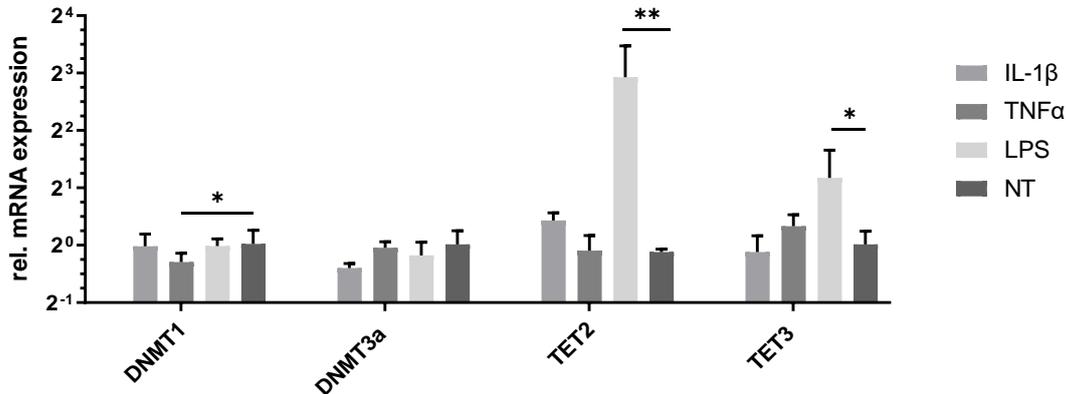


**Abbildung 11: Veränderte mRNA-Expression der Histon-Methyltransferasen und Histon-Demethylasen nach Stimulation – Zusammenfassende Grafik.** Der Vergleich zwischen stimulierten und unstimulierten BMDM erfolgte durch qPCR. Es wurden abhängig vom untersuchten Enzym Proben von 3 bis zu 6 Replikaten miteinander verglichen (n=3-6, außer für SET7 unter oxLDL: n=2). Die Ergebnisse wurden mit HPRT bzw. GAPDH als HK normiert. Die Zellen blieben nach einer Hungerperiode entweder unbehandelt (NT) oder waren über 12 h einer Konzentration von 50 µg/ml oxLDL, 50 ng/ml TNFα, 20 ng/ml IL1-β oder 50 ng/ml LPS ausgesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) dargestellt; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001.

Hinsichtlich der DNA-Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3a war die mRNA-Expression von DNMT1 nach TNFα-Gabe leicht vermindert, ansonsten führte hier keine weitere Stimulation zu einer relevanten Änderung der mRNA-Expression. Demgegenüber zeigten die TET-Enzyme 2 und 3 stärkere Abweichungen ihrer Expression zwischen den einzelnen Proben: Eine Stimulation mit LPS brachte hier für beide Enzyme jeweils signifikante Resultate im Sinne einer Steigerung der mRNA-Expression nach Stimulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, besonders deutlich für TET2 (Abbildung 12). Die Stimulation mit IL-1β hatte auch hier für keins der vier Enzyme einen Effekt auf die mRNA-Expression.

Insgesamt zeigte sich, dass BMDM nach pro-atherogener Stimulation Unterschiede hinsichtlich der mRNA-Expression epigenetischer Enzyme zu unstimulierten Kontrollen aufweisen.

## DNA-Methyltransferasen und DNA-Demethylasen



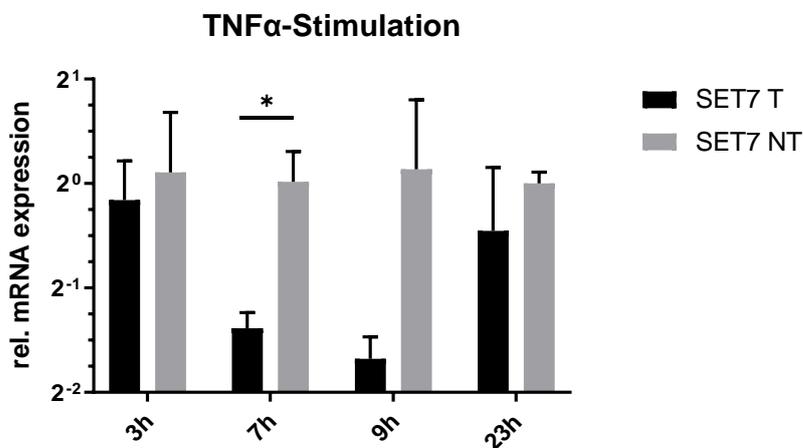
**Abbildung 12: Veränderte mRNA-Expression der DNA-Methyltransferasen und DNA-Demethylasen nach Stimulation. Der Vergleich zwischen stimulierten und unstimulierten BMDM erfolgte via qPCR.** Es wurden abhängig vom untersuchten Enzym Proben von 3 bis zu 6 Replikaten miteinander verglichen (n=3-6). Die Ergebnisse wurden mit HPRT als HK normiert. Die Zellen blieben nach einer Hungerperiode entweder unbehandelt (NT) oder waren über 12 h einer Konzentration von 50 ng/ml TNF $\alpha$ , 20 ng/ml IL1- $\beta$  oder 50 ng/ml LPS ausgesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001.

### 3.1.2 Effekt der TNF $\alpha$ -Stimulation auf die Expression von SET7 und DNMT1 im zeitlichen Verlauf

Ergänzend zu den in 3.1.1 gezeigten Daten wurde eine gezielte Analyse der Stimulation mit TNF $\alpha$  für SET7 und DNMT1 im zeitlichen Verlauf angestrebt. Mithilfe erneuter TNF $\alpha$ -Stimulationen von BMDM über eine jeweils unterschiedliche Zeit sollte sich dabei auch derjenigen Dauer einer kurzfristigen Stimulation genähert werden, für die die mRNA-Expression der Enzyme am stärksten von der unbehandelten Kontrollen abweicht. Diese sollte dann als Standard für anschließende Stimulationsversuche in glatten Muskelzellen (siehe 3.1.5) verwendet werden, da die Dauer der vorausgegangenen Stimulationsversuche, bei der die Zellen über zwölf Stunden den verschiedenen Substanzen ausgesetzt waren, allein von empirischen Erfahrungswerten abhing. SET7 und DNMT1 waren hierbei von besonderem Interesse, da einerseits ein Effekt der TNF $\alpha$ -Stimulation auf beide Enzymexpressionen nachzuweisen war (siehe 3.1.1), dieser aber insbesondere für DNMT1 weniger deutlich ausfiel, und andererseits leichte

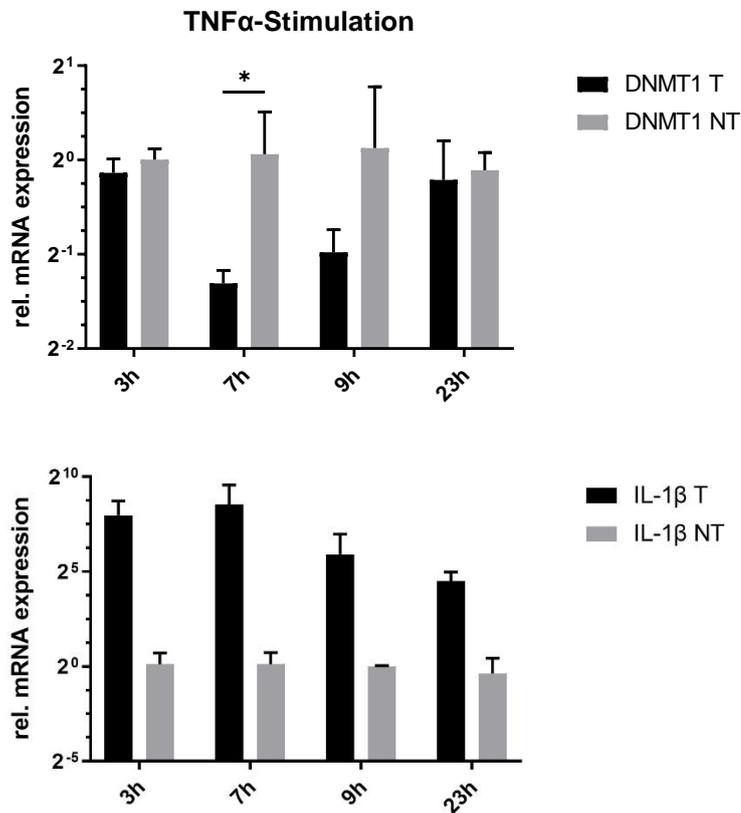
Veränderungen der Expression dieser beiden Enzyme das Potential haben, starke Effekte nach sich zu ziehen: SET7 ist in verschiedene zelluläre Stoffwechselprozesse, wie den NFκB- oder Hippo-Pathway, involviert und kann viele Proteine zusätzlich zur HMT-Aktivität direkt methylieren (80, 95, 101, 111, 116). Ein Verlust der DNMT1, die bestehende Methylierungsmuster erhält, kann wiederum zell-spezifisch zu teils schweren Alterationen in der Genexpression und im Zell-Stoffwechsel führen (203, 204).

Um die Expression von SET7 und DNMT1 unter TNFα-Stimulation in einer Zeitkurve darstellen zu können, wurden BMDM mit 50 ng/ml TNFα über jeweils 3, 7, 9 und 23 Stunden stimuliert, eine entsprechende Kontrolle blieb unbehandelt. Nach Isolation der RNA und Synthese der cDNA konnte anhand der entsprechenden qPCR-Daten die Expression von SET7 und DNMT1 im zeitlichen Verlauf betrachtet werden. Abbildung 13 zeigt dies für SET7: Bei der Stimulation mit TNFα liegt der maximale Effekt auf die SET7-Expression, eine fast vierfache Herunterregulierung, zwischen sieben und neun Stunden Stimulationsdauer, wobei sich ein Wiederanstieg bei 23 Stunden zeigte.



**Abbildung 13: Zeitkurve der mRNA-Expression von SET7 nach Stimulation mit TNFα: Die SET7 Expression zeigt im Bereich von 7-9 h ihr Minimum.** Der Vergleich zwischen stimulierten (n=3) und unstimulierten (n=3 für 3 h; sonst n=2) BMDM erfolgte via qPCR. Die Ergebnisse wurden mit HPRT als HK normiert. Die Zellen blieben entweder unbehandelt (NT) oder waren über 3, 9, 7 oder 23 Stunden einer Konzentration von 50 ng/ml TNFα ausgesetzt (T). Die Daten sind als Mittelwerte ±Standardabweichung (SD) dargestellt; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001.

Ähnliches zeigt die Auswertung für DNMT1 (Abbildung 14). Die Expression von DNMT1 erreicht nach circa 7 Stunden unter TNF $\alpha$ -Stimulation ihr Minimum, steigt darauf aber wieder auf mit unbehandelten Kontrollen vergleichbare Ausgangswerte.



**Abbildung 14: Zeitkurve der mRNA-Expression von DNMT1 sowie der Positivkontrolle IL-1 $\beta$  nach Stimulation mit TNF $\alpha$ .** Der Vergleich zwischen stimulierten (n=3) und unstimulierten (n=2 für 9 h, sonst n=3) BMDM erfolgte via qPCR. Die Ergebnisse wurden mit HPRT als HK normiert. Die Zellen blieben entweder unbehandelt (NT) oder waren über 3, 7, 9 oder 23 h einer Konzentration von 50 ng/ml TNF $\alpha$  ausgesetzt (T). Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001. Für die Positivkontrolle IL-1 $\beta$  erfolgte keine statistische Auswertung.

IL- $\beta$  als Positivkontrolle des Versuches (Abbildung 14) zeigte wiederum keine vergleichbare Kurve, vielmehr lag das Maximum der IL-1 $\beta$  mRNA-Expression, die unter Stimulation immer deutlich erhöht war, bei circa 7 Stunden Stimulationsdauer.

Somit hat die TNF $\alpha$ -Stimulation mit einer Dauer zwischen 7 und 9 Stunden den stärksten Effekt auf die Expression von SET7 und DNMT1 in BMDM.

### 3.1.3 Expression der Matrixmetalloproteasen und TIMP-Inhibitoren in Makrophagen nach Stimulation

Speziell für die Matrixmetalloproteasen und ihre Inhibitoren scheint, wie zu Beginn dieser Arbeit dargestellt, eine epigenetische Regulation wahrscheinlich (133, 134). Aufgrund dieser Vermutung wurden drei MMPs, die im Verlauf des atherosklerotischen Geschehens vermehrt exprimiert werden, sowie ihre regulatorischen TIMP-Inhibitoren als in diesem Kontext primär zu untersuchende, potenziell epigenetisch beeinflussbare Enzymgruppe ausgewählt. Als erster Schritt sollten daher die Expressionen von MMP2, 9, 14, TIMP1 und 2 unter gleichen Versuchsbedingungen wie 3.1.1 zwischen stimulierten BMDM und nichtbehandelten Kontrollen mittels qPCR verglichen werden, um dann im späteren Verlauf (unter Zusammenschau mit den Ergebnissen aus 3.1.1) Vermutungen bezüglich der für diese Veränderungen verantwortlichen oder beteiligten epigenetischen Enzyme äußern zu können.

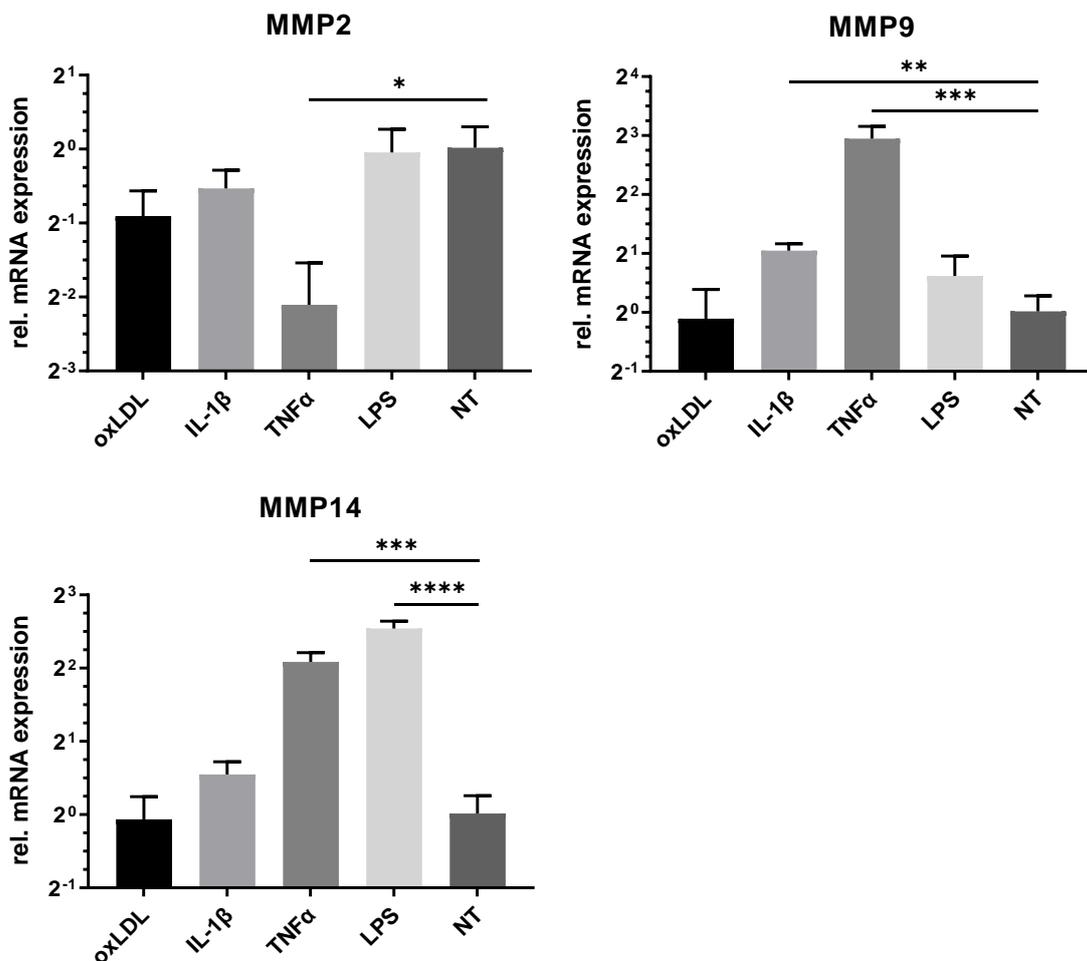
Die korrekte Funktion der zu verwendenden Primer wurde mittels klassischer PCR in BMDM überprüft (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Gelelektrophorese der PCR-Produkte zu den verwendeten MMP- und TIMP-Primern in BMDM:** Test der Funktionalität der Primer-Paare. Die erste Geltasche wurde mit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (M) beladen, um so die Größe der Amplifikate anhand der Basenpaare (bp) zu vergleichen. Die PCR Produkte wurden durch ein 3 %-iges Agarosegel getrennt. Die Wasserprobe (H<sub>2</sub>O) diente als Kontrolle.

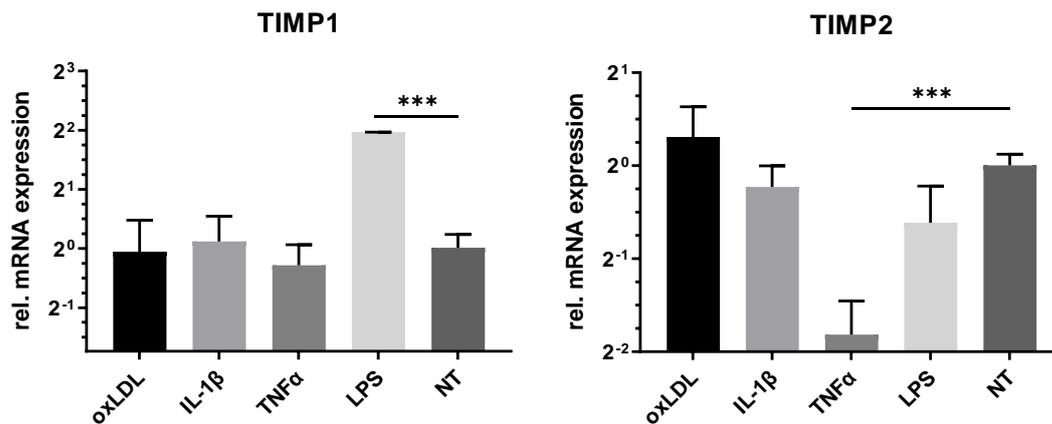
BMDM wurden über zwölf Stunden mit einer Konzentration von 50µg/ml oxLDL, 50ng/ml TNF $\alpha$ , 20ng/ml IL1- $\beta$  oder 50ng/ml LPS stimuliert oder sie blieben unbehandelt. Es folgte entsprechend die RNA-Isolation und cDNA Synthese. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der anschließenden qPCR für MMP2, MMP9 und MMP14. Unter TNF $\alpha$  ist die mRNA-Expression von MMP2 reduziert. Besonders nach Stimulation mit TNF $\alpha$ , aber

auch mit IL-1 $\beta$ , zeigt demgegenüber MMP9 eine deutliche Überexpression. Die mRNA-Expression von MMP14 wiederum stieg im Vergleich zu nichtstimulierten Zellen vor allem unter TNF $\alpha$  sowie LPS an. IL-1 $\beta$  scheint hier keinen relevanten Einfluss auf die Enzymexpression zu haben.



**Abbildung 16: Veränderte mRNA-Expression von MMP2, MMP9 und MMP14 nach Stimulation.** Vergleich zwischen stimulierten und unstimulierten BMDM mittels qPCR (n=3). Für MMP2 konnten bei den unbehandelten Kontrollen nur 2 der 3 technischen Triplikate in der Auswertung eingehen (MMP2: NT n=2). Die Ergebnisse wurden mit HPRT als HK normiert. Die Zellen blieben entweder unbehandelt (NT) oder waren über Nacht einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml oxLDL, 50 ng/ml TNF $\alpha$ , 20 ng/ml IL1- $\beta$  oder 50 ng/ml LPS ausgesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001.

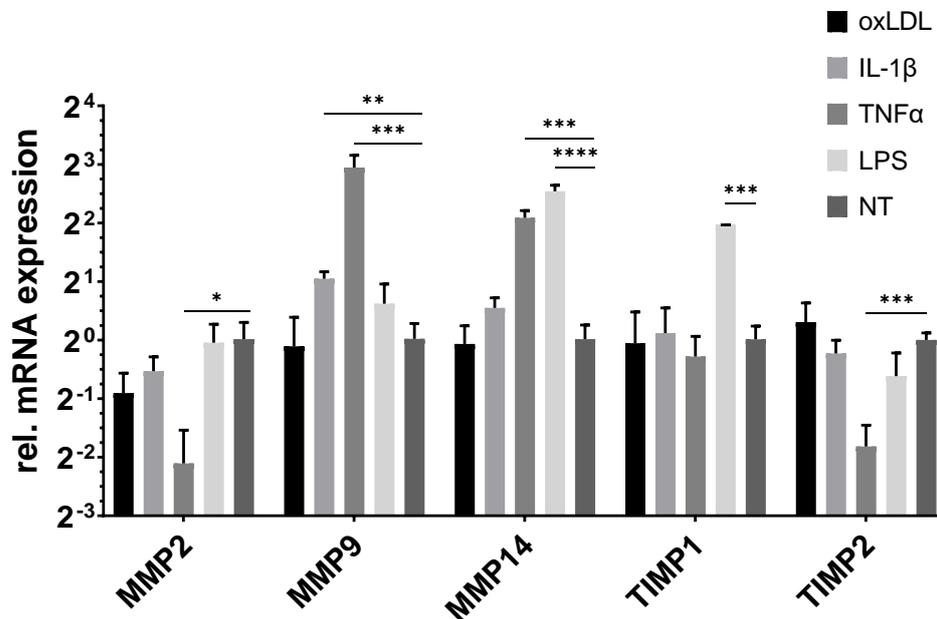
Deutliche Unterschiede waren auch im Hinblick auf die beiden getesteten TIMP-Enzyme, die entsprechenden Inhibitoren der Matrixmetalloproteasen, zu erkennen: Nach LPS-Stimulation konnte ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression von TIMP1 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen demonstriert werden. TNF $\alpha$  hingegen führte zu keiner relevanten Veränderung der Expression. Für TIMP2 zeigte sich unter TNF $\alpha$ -Stimulation ein Abfall der Enzymexpression, eine Stimulation mit LPS blieb wiederum ohne signifikanten Effekt (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Veränderte mRNA-Expression von TIMP1 und TIMP2 nach Stimulation.** Vergleich zwischen stimulierten und unstimulierten BMDM mittels qPCR (n=3). Bei TIMP1 konnten für die mit TNF $\alpha$  und LPS stimulierte Zellen nur 2 der 3 technischen Triplikate in der Auswertung eingehen (TIMP1 TNF $\alpha$ , LPS n=2). Die Ergebnisse wurden mit HPRT als HK normiert. Die Zellen blieben entweder unbehandelt (NT) oder waren über Nacht einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml oxLDL, 50 ng/ml TNF $\alpha$ , 20 ng/ml IL1- $\beta$  oder 50 ng/ml LPS ausgesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001.

MMP2 wird von TIMP1 und TIMP2 negativ reguliert, MMP14 nur und MMP9 vor allem durch TIMP2 (129, 205). In diesem Zusammenhang ist daher insbesondere eine unter gleichen Versuchsbedingungen festzustellende Diskrepanz zwischen der Expression der Matrixmetalloprotease und der ihres regulatorischen TIMP Enzyms interessant. Ist unter einer Stimulation z.B. eine Steigerung der MMP-Expression, aber gleichzeitig eine Verringerung der TIMP-Expression zu beobachten, ist von einem potenziell stärkeren Effekt auszugehen als bei einer gleichzeitig gesteigerten TIMP-Expression. Eine Gegenüberstellung der einzeln bereits gezeigten Effekte der Stimulationen mit oxLDL, TNF $\alpha$ , IL1- $\beta$  oder LPS auf die MMP- und TIMP-Enzymexpression zeigt Abbildung 18.

Während bei einer  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation so gleichermaßen die Expression von MMP2 und TIMP2 sinkt, steigt demgegenüber die mRNA-Expression von MMP9 und MMP14.



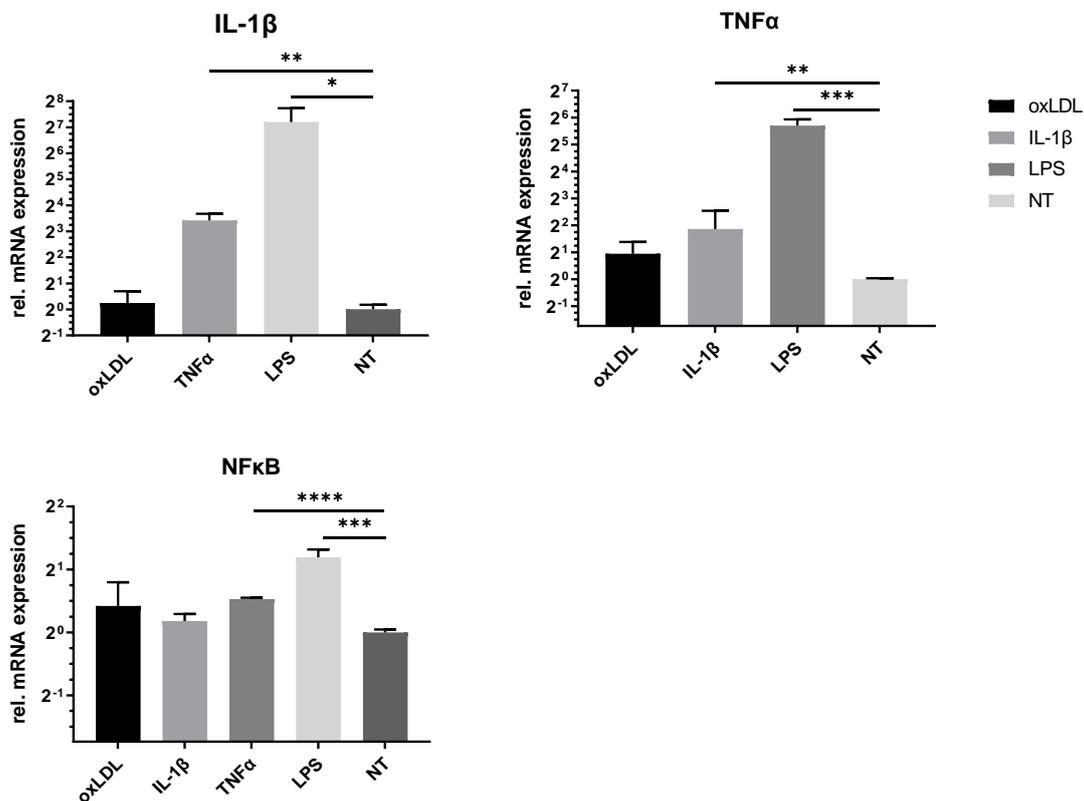
**Abbildung 18: Übersicht: Vergleich der mRNA-Expression der MMPs und TIMPs zwischen stimulierten und unstimulierten BMDM mittels qPCR (n=3).** Bei TIMP1 konnten für die mit  $\text{TNF}\alpha$  und LPS stimulierte Zellen nur 2 der 3 technischen Triplikate in der Auswertung eingehen, ebenso bei den unbehandelten MMP2 Kontrollen (TIMP1  $\text{TNF}\alpha$ , LPS n=2, MMP2 NT n=2). Die Ergebnisse wurden mit HPRT als HK normiert. Die Zellen blieben entweder unbehandelt (NT) oder waren über Nacht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  oxLDL, 50  $\text{ng}/\text{ml}$   $\text{TNF}\alpha$ , 20  $\text{ng}/\text{ml}$  IL1- $\beta$  oder 50  $\text{ng}/\text{ml}$  LPS ausgesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Insgesamt lässt sich zeigen, dass BMDM unter pro-atherogener Stimulation zum Teil deutlich veränderte mRNA-Expressionen der Matrixmetalloproteasen und ihrer Inhibitoren im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen aufweisen.

### 3.1.4 Expression ausgewählter Atherosklerose-relevanter Zytokine und Transkriptionsfaktoren in Makrophagen nach Stimulation

Die Reaktion von Makrophagen auf Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS oder oxLDL im Sinne einer Freisetzung verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine und

Transkriptionsfaktoren ist in der Literatur bereits ausführlich beschrieben. Der Mechanismus dieser Antwort auf Umweltreize ist aber im Detail, insbesondere für die Atherosklerose, noch teilweise unklar. Da auch hier epigenetische Enzyme beteiligt an oder ursächlich für Veränderungen der Expression verschiedener Gene sein könnten, wurden die mRNA-Expressionen von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  sowie NF $\kappa$ B nach erneuter 12-stündiger Stimulation von BMDM mit 50  $\mu$ g/ml oxLDL, 50 ng/ml TNF $\alpha$ , 20 ng/ml IL1  $\beta$  oder 50 ng/ml LPS mit unbehandelten Kontrollen über qPCR verglichen. Die Ergebnisse können anschließend den Effekten gleicher Stimulation auf epigenetische Enzymexpressionen (3.1.1) gegenübergestellt werden, um so in einem späteren Schritt Annahmen zu evtl. regulatorisch beteiligten, epigenetischen Enzymen treffen zu können.

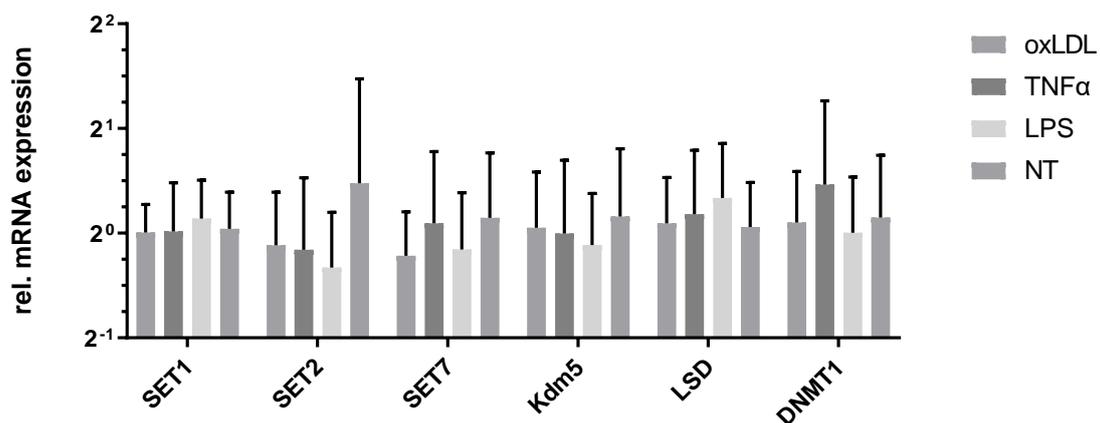


**Abbildung 19: Veränderte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  sowie NF $\kappa$ B nach Stimulation.** Vergleich zwischen stimulierten und unstimulierten BMDM mittels qPCR (n=3). Die Ergebnisse wurden mit HPRT als HK normiert. Die Zellen blieben entweder unbehandelt (NT) oder waren über 12 h einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml oxLDL, 50 ng/ml TNF $\alpha$ , 20 ng/ml IL1- $\beta$  oder 50 ng/ml LPS ausgesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001.

Die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  sowie NF $\kappa$ B stieg jeweils signifikant unter TNF $\alpha$  und LPS Stimulation, die Expression von TNF $\alpha$  war sich wiederum gesteigert unter LPS und IL-1 $\beta$  (Abbildung 19). OxLDL verursachte in diesem Versuch lediglich einen leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der TNF $\alpha$ -Expression, auf NF $\kappa$ B und IL1- $\beta$  hatte es hier keinen relevanten Effekt.

### 3.1.5 Expression epigenetischer Enzyme in glatten Muskelzellen nach Stimulation

Da die Stimulation von BMDM mit pro-atherogenen Stimuli nachweislich einen Effekt auf die mRNA-Expression mehrerer epigenetischer Enzyme hatte (3.1.1), waren ähnliche Beobachtungen für andere atherosklerotisch relevante Zellpopulationen zu vermuten. So folgte die Ausweitung des Experiments auf glatte Muskelzellen, da auch diese eine wichtige Rolle in atherosklerotischen Läsionen spielen (206). Entsprechend wurden glatte Muskelzellen nach 10-stündiger Hungerperiode über 9 h mit 10  $\mu$ g/ml oxLDL, 50 ng/ml TNF $\alpha$  oder 50 ng/ml LPS stimuliert. Auf eine IL-1 $\beta$ -Stimulation wurde verzichtet, da sie in den Vorversuchen ohne Effekt geblieben war.



**Abbildung 20: mRNA-Expression epigenetischer Enzyme nach Stimulation in SMCs.** Der Vergleich zwischen stimulierten und unstimulierten glatten Muskelzellen (SMCs) erfolgte via qPCR ( $n \geq 4$ ). Die Zellen blieben entweder unbehandelt (NT) oder waren über 9 Stunden einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml oxLDL, 50 ng/ml TNF $\alpha$  oder 50 ng/ml LPS ausgesetzt. Die Ergebnisse wurden mit HPRT als HK normiert. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Mittels qPCR konnte nach Isolation der RNA und Synthese der cDNA darauf die Expression der epigenetischen Enzyme analysiert werden. Abbildung 20 zeigt hierzu die Resultate in der Übersicht. Für keines der getesteten Enzyme SET1, SET2, SET7, Kdm5, LSD sowie DNMT1 konnte eine relevante Änderung der Enzymexpression durch Stimulation beobachtet werden. Die Stimulation über die entsprechend den Ergebnissen der Zeitkurve (siehe 3.1.2) für SET7 und TNF $\alpha$  optimierte Dauer von 9 Stunden hatte insbesondere keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von SET7. Von einer Ausweitung der Versuchsreihe in SMCs wurde daher abgesehen.

Erhöhte Konzentrationen von oxLDL, LPS oder TNF $\alpha$  induzierten somit keine direkte Expressionsänderung hier untersuchter epigenetischer Enzyme in glatten Muskelzellen.

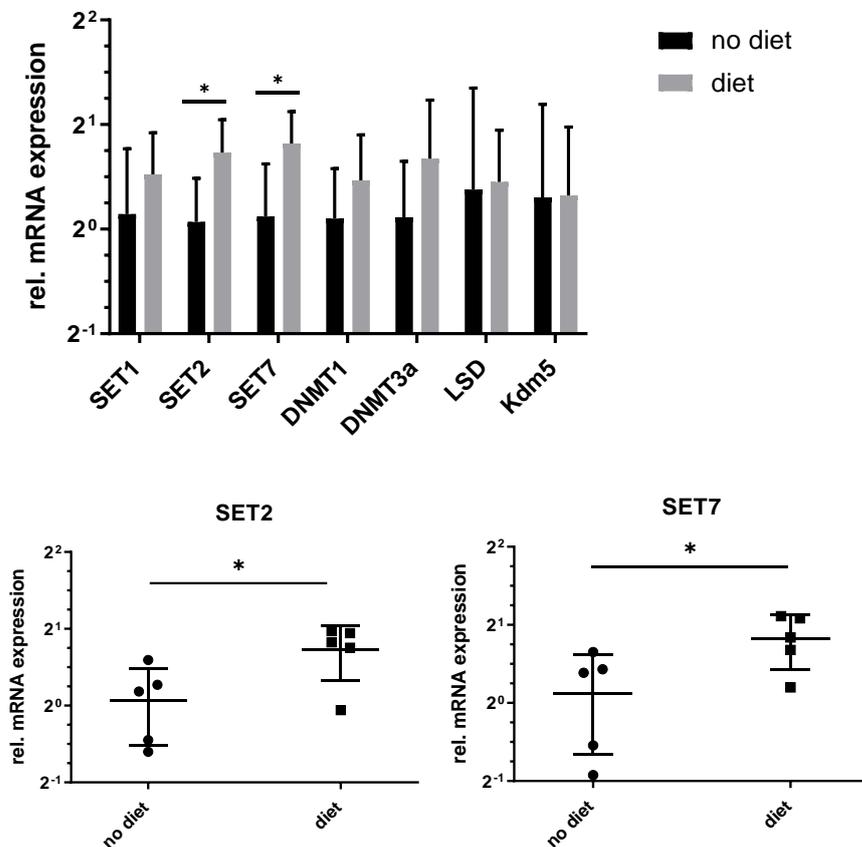
## **3.2 Epigenetische Expressionsmuster im Atherosklerose-Modellorganismus**

Zusätzlich zu den Zellkulturversuchen wurden ausgewählte epigenetische Enzyme am Atherosklerose-Mausmodell untersucht. Dazu wurden Veränderungen ihrer mRNA-Expression in Zellsuspensionen aus Aorta, Aortenwurzel sowie Milz zwischen *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach achtwöchiger HFD als Atherosklerose-Modellorganismus und *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne spezielle Diät, die als Kontrolle dienten, verglichen. Unter Diät neigen diese Mäuse besonders zur Entwicklung von Atherosklerose, wohingegen dies unter normaler Ernährung mit niedrigem Fettgehalt in der Regel nicht der Fall ist.

### **3.2.1 Expression epigenetischer Enzyme in der Aorta von *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen**

Da die *in vitro* Versuche Hinweise auf eine mögliche Beteiligung einiger der untersuchten epigenetischen Enzyme an der Genese der Atherosklerose lieferten, wurde eine Untersuchung der kranken, atherosklerotisch veränderten Aorta als nächster Schritt gewählt, um so zusätzlich Erkenntnisse über Unterschiede der Expression epigenetischer Enzyme zwischen gesundem und pathologischem Zustand *in vivo* zu erhalten.

Hierzu wurden die zerkleinerten Aorten der Mäuse nach HFD und ohne Diät über einem Zellfilter filtriert und daraufhin die RNA der Zellsuspension isoliert. Die komplementäre cDNA konnte nach ihrer Synthese für die qPCR Analyse verwendet werden.

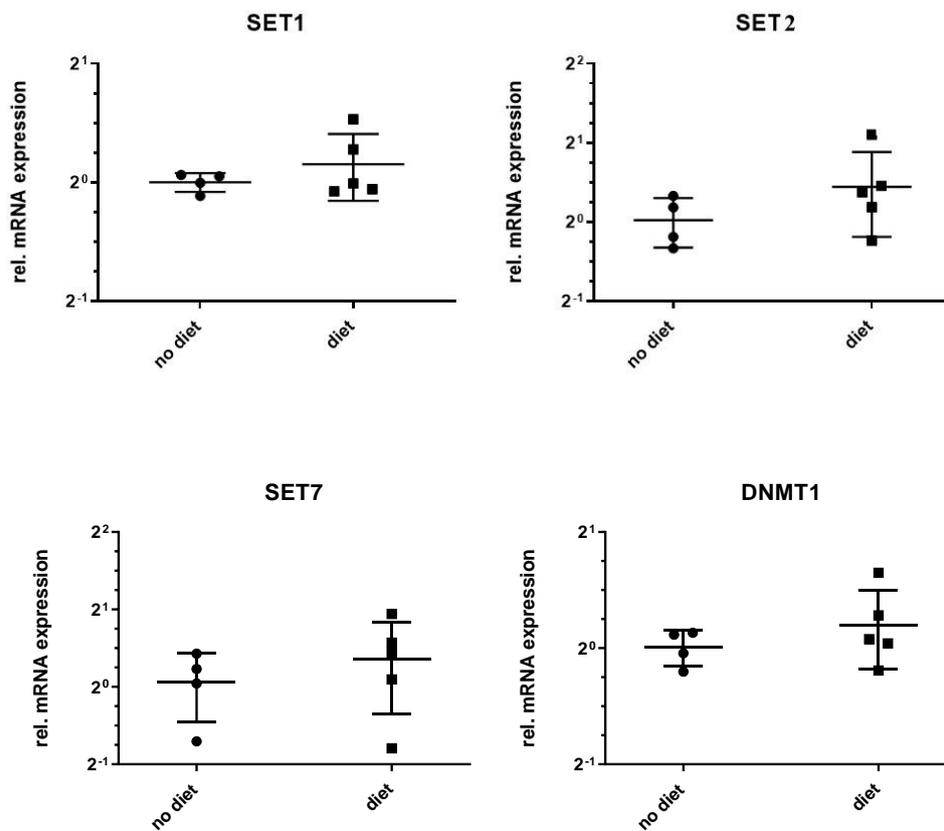


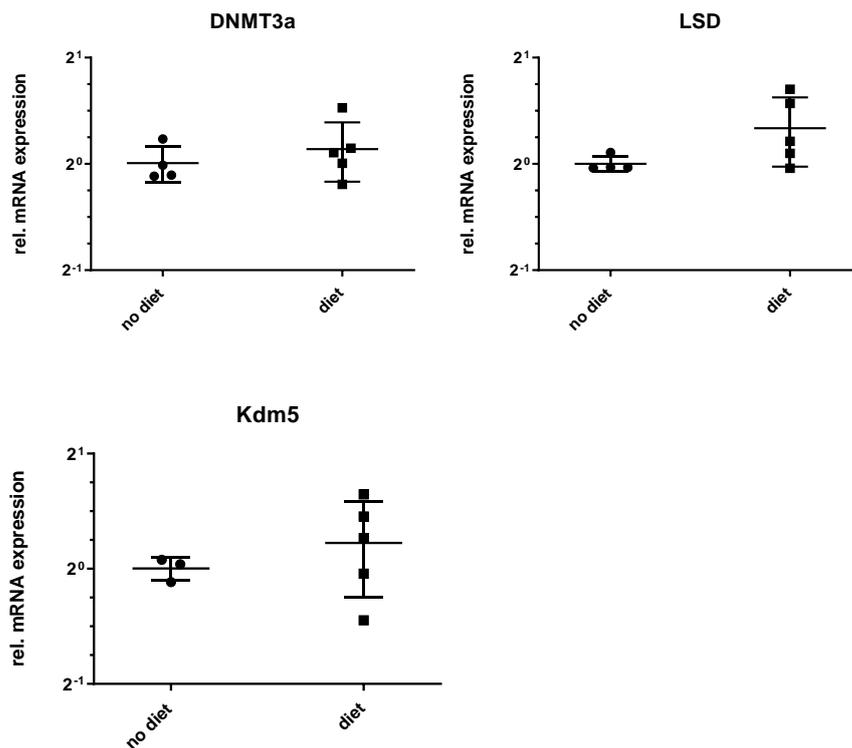
**Abbildung 21: Vergleich der mRNA-Expression epigenetischer Enzyme zwischen Zellsuspensionen aus der Aorta von 8 Wochen alten *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit (diet) und ohne 8-wöchiger HFD (no diet) mittels qPCR (n=5) (Übersicht sowie detaillierte Darstellung der Einzelwerte für SET2 und SET7).** Die Ergebnisse wurden mit GAPDH als HK normiert. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Es zeigten sich für SET1, LSD, KDM5, DNMT1 und DNMT3a keine relevanten Unterschiede der mRNA-Expression zwischen den Mäusen mit und ohne Diät (Abbildung 21). Für SET2 konnte eine minimale Erhöhung der mRNA-Expression nach 8-wöchiger HFD festgestellt werden, bei SET7 zeigte sich hier ebenfalls eine schwach, jedoch signifikant erhöhte Enzymexpression nach Diät. Es handelt sich hier trotz statistischer Signifikanz allerdings am ehesten um ein experimentelles Artefakt, da die nachgewiesene Expressionsänderung sehr gering ist.

### 3.2.2 Expression epigenetischer Enzyme in der Aortenwurzel von *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen

Da atherosklerotische Veränderungen bevorzugt an Gefäßgabelungen und Engstellen aufgrund der dortigen Störung des laminären Blutflusses auftreten (9), wurde die Aortenwurzel noch einmal gezielt untersucht, da diese Stelle in der Regel zuerst von atherosklerotischen Veränderungen im Mausmodell betroffen ist (207). Entgegen der Erwartung, dass an diesem speziellen Gefäßabschnitt bei *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach achtwöchiger HFD deutlich veränderte Expressionslevel einzelner epigenetischer Enzyme nachweisbar sind, konnten hier keine eindrucklichen Unterschiede zu den Kontrollen beobachtet werden. Vielmehr zeigten sich in den Aortenwurzeln von *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach achtwöchiger HFD im Vergleich zu *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Diät, wie in Abbildung 22 zu sehen, keine signifikant veränderten Enzymexpressionen von SET1, SET2, SET7, DNMT1, DNMT3a, LSD und Kdm5.





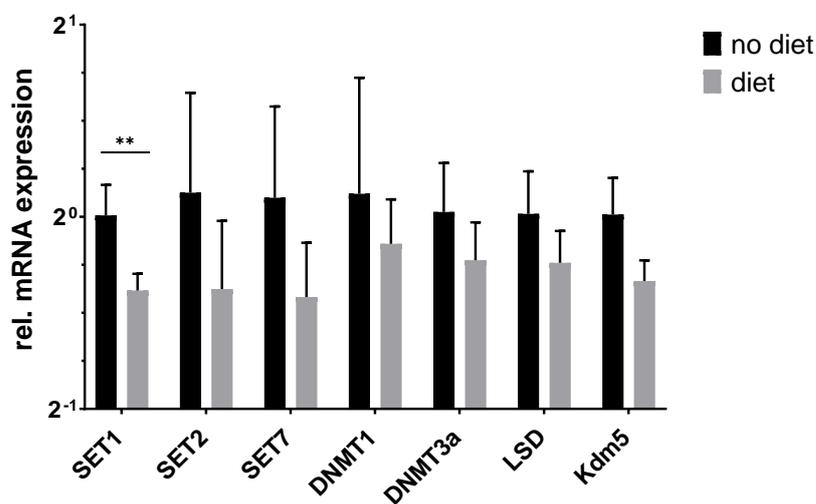
**Abbildung 22: Vergleich der mRNA-Expression epigenetischer Enzyme zwischen Zellsuspensionen aus der Aortenwurzel 8 Wochen alter *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit (diet) (n=5) und ohne 8-wöchiger HFD (no diet) (n=4) mittels qPCR (Darstellung der Einzelwerte).** Für *Kdm5* konnten hier nur 3 unbehandelte Kontrollen (no diet; n=3) ausgewertet werden. Die Ergebnisse wurden mit GAPDH als HK normiert. Obwohl sich die Enzymexpressionslevel gemittelt nicht wesentlich unterscheiden, zeigen die einzelnen Werte der HFD-Mäuse eine höhere Divergenz. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Zellsuspensionen aus der Aortenwurzel von *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach HFD zeigten demnach keine relevanten Unterschiede in der Expression hier untersuchter epigenetischer Enzyme gegenüber Kontrollen ohne Diät.

### 3.2.3 Expression epigenetischer Enzyme in der Milz von *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen

Bei verschiedenen Krankheiten wie der Atherosklerose, die mit einer erhöhten Hämatopoese assoziiert sind, kann die Milz als Organ der extramedullären Blutbildung zirkulierende inflammatorische Zellen wie Lymphozyten und insbesondere Monozyten

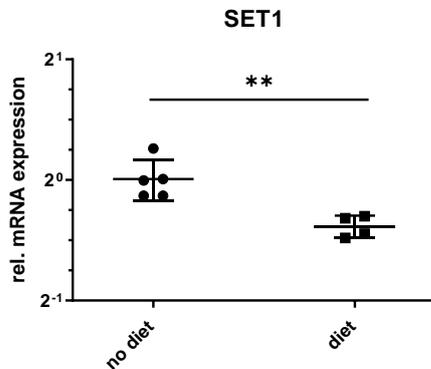
produzieren, die u.a. das Atherom infiltrieren können (208-210). Neben ihrer Rolle als lymphatisches Organ dient sie so speziell als Reservoir für Monozyten, den nicht-gewebeständigen Vorläuferzellen der Makrophagen (211). Da epigenetische Mechanismen für solch eine Umstellung der zellulären Produktion als inflammatorische Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen verantwortlich sein könnten, wurden auch Zellsuspensionen aus Milzen von *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit und ohne achtwöchiger HFD in den Versuch miteinbezogen und anhand ihrer Enzymexpressionsmuster verglichen. Die gestückelten Milzen der Mäuse wurden über einem Zellfilter filtriert, darauf die RNA der Zellsuspension isoliert sowie die cDNA synthetisiert. Durch qPCR konnten die epigenetischen Enzyme in ihrer Expression analysiert werden.



**Abbildung 23: Vergleich der mRNA-Expression epigenetischer Enzyme zwischen Zellsuspensionen aus der Milz 8 Wochen alter *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit (diet) (n=5) und ohne 8-wöchiger HFD (no diet) (n=4) mittels qPCR (Übersicht).** Für Kdm5 konnten nur 3 unbehandelte Kontrollen (no diet; n=3) ausgewertet werden. Die Ergebnisse wurden mit GAPDH als HK normiert. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse aller untersuchten epigenetischen Enzyme dargestellt. SET2, SET7, DNMT1, DMT3a, LSD und Kdm5 zeigten hinsichtlich ihrer mRNA-Expression keinen wesentlichen Unterschied zwischen *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit und ohne Diät. Demgegenüber ist für SET1 unter Diät jedoch eine leichte, aber signifikante Verringerung der mRNA-Expression erkennbar. Noch einmal verdeutlicht wird dies in

Abbildung 24 unter Darstellung der einzelnen Werte. Demnach ist die Expression von SET1 in Milz-Zellsuspensionen von  $Ldlr^{-/-}$ -Mäusen nach HFD im Vergleich zur Kontrolle leicht vermindert.



**Abbildung 24: Verringerte SET1-Expression in Milz-Zellsuspensionen von  $Ldlr^{-/-}$ -Mäusen nach 8-wöchiger HFD (diet) (n=5) im Vergleich zu diätfreien Kontrollen (no diet) (n=4) (Darstellung der Einzelwerte).** Die Ergebnisse wurden mit GAPDH als HK normiert. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

### 3.3 Durchführung eines SET7 knock-outs mittels CRISPR/Cas9 in glatten Muskelzellen

Die Wahl von SET7 als epigenetisches Enzym von zentralem Interesse und der Entschluss zu einem funktionellen knock-out des SET7 Gens erfolgte aus mehreren Gründen: Zum einen ist SET7 beteiligt an der NF $\kappa$ B-vermittelten inflammatorischen Antwort sowie der Reaktion auf Hyperglykämie und oxidativen Stress (84, 94, 95). Des Weiteren war im Zellkultur-Stimulationsversuch unter TNF $\alpha$  eine verringerte mRNA-Expression von SET7 in BMDM nachweisbar (Abbildung 11), welche bei circa neun Stunden Stimulationsdauer ihr Minimum zeigte (Abbildung 13). Somit spielt dieses Enzym möglicherweise eine Rolle in der Entwicklung der Atherosklerose. Daher war das Ziel, Zellen, die kein bzw. kaum SET7 exprimieren, zukünftig gezielt untersuchen zu können. Um diesen Funktionsverlust flexibel in gewünschten Zellen induzieren zu können, mit der Möglichkeit, auf SET7-exprimierende Kontrollen zuzugreifen, die unter genau gleichen Bedingungen kultiviert wurden, wurde hierfür die Methode des CRISPR/Cas9

Systems gewählt. Als erste Zellpopulation wurden B6.Rosa26-Cas9 knock-in glatte Muskelzellen verwendet, die bereits konstitutiv Cas9 exprimieren, da hier nur die sgRNA und nicht noch zusätzlich Cas9 in die Zellen eingebracht werden muss, und die im Labor bereits für die Testung von sgRNAs etabliert worden waren.

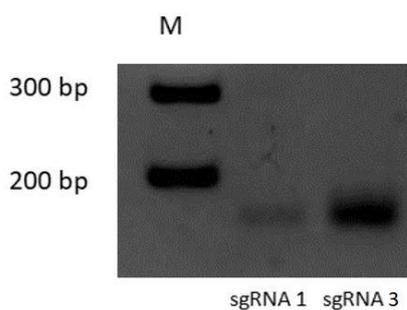
### 3.3.1 Nachweis und Untersuchung generierter Mutationen im SET7-Gen glatter Muskelzellen

Über virale Transduktion, ermöglicht durch Verwendung eines AAV-Systems, wurde jeweils eine der beiden SET7 sgRNAs (entsprechend pSet7sg1 und pSet7sg3) in die glatten Muskelzellen zu der dort bereits exprimierten Cas9 Endonuklease gebracht. Durch dieses Zusammentreffen können Indels im SET7 Gen der Zelle generiert werden, indem die sgRNA mit ihrem crRNA-Anteil an die genomische Sequenz von SET7 bindet und Cas9, von der sgRNA geleitet, dort spezifisch Doppelstrangbrüche verursacht. Fehler in der zelleigenen DNA-Reparatur bedingen schließlich den gewünschten funktionellen Verlust des Gens. Um diesen Erfolg und damit auch die korrekte Funktion der Methode nachzuweisen, wurden zunächst aufgetretene Mutationen im SET7 Gen der infizierten SMCs anhand der genomischen DNA der Zellen charakterisiert. Hierzu erfolgte die Lyse der Zellen vier Tage nach viraler Transduktion einer der zwei sgRNAs. Daraufhin wurde die genomische DNA der infizierten SMCs isoliert. Aus dieser konnte derjenige SET7 Genabschnitt mithilfe einer klassischen PCR amplifiziert werden, in dem sich die Bindestelle der jeweiligen sgRNA befindet und Indels zu erwarten wären (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Schema zur Sequenzierung der sgRNA-transduzierten Zellen:** Die sgRNA (1 und 3) bindet komplementär im SET7 Gen (Exon 3, siehe Abbildung 7) direkt neben einer PAM-Sequenz (5' NGG 3'). Die dem crRNA-Anteil der sgRNA entsprechende Basenfolge ist grün markiert, blau entspricht hier der Bindestelle der sgRNA. Rot umkreist ist der Bereich mit zu erwartenden Indels ab Doppelstrangbruch, der durch das zugehörige Primerpaar (orange Boxen, P) eingeschlossen wird. Eigene Anfertigung.

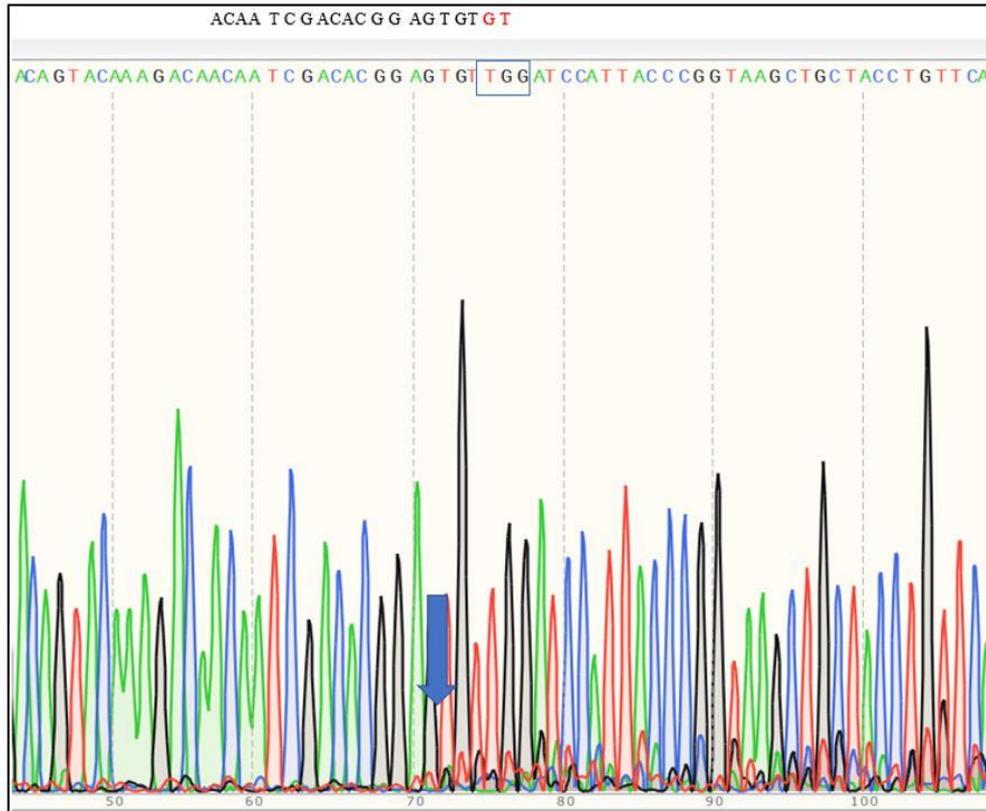
Die Primer wurden folglich so gewählt, dass der durch sie vervielfältigte Abschnitt von SET7 die jeweilige SET7 sgRNA-Zielsequenz sowie denjenigen Genbereich enthält, an dem bei erfolgreichem DNA-Doppelstrangbruch Veränderungen in Form von Indels auftreten (Abbildung 25). Für sgRNA 1 wurden dementsprechend SV723.AAV11.cleav.F und SV724.AAV11.cleav.R, für sgRNA 3 SV725.AAV12/13.cleav.F und SV726.AAV12/13.cleav.R als Primer verwendet (2.1.6). Im Anschluss konnten die PCR-Produkte mithilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Banden lagen im erwarteten Bereich von 160 Basenpaaren Amplifikatlänge (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Gelelektrophorese der PCR-Produkte für SET7 aus der genomischen DNA transduzierter Cas9 SMCs:** Als Template wurde die isolierte genomische DNA glatter Muskelzellen 4 Tage nach Transduktion der sgRNA 1 oder 3 (entsprechend pSet7sg1, pSet7sg3) durch AAV-Viren verwendet. Als Primer dienten SV723.AAV11.cleav.F und SV724.AAV11.cleav.R (sgRNA 1) bzw. SV725.AAV12/13.cleav.F und SV726.AAV12/13.cleav.R (sgRNA 3). Die erste Geltasche wurde mit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (M) beladen, um so die Größe der Amplifikate anhand der Basenpaare (bp) zu vergleichen, die PCR Produkte wurden durch ein 3 %-iges Agarosegel getrennt. Eine Wasserprobe diente als Kontrolle.

Nach anschließender Gelextraktion der beiden amplifizierten PCR-Produkte wurde die genomische DNA sequenziert (*Eurofins Genomics*) (siehe 2.2.2.6, 2.2.2.7). Unter Vergleich der sequenzierten DNA zur Referenzsequenz (MGI:1920501, NCBI Gene: 73251 ) können so durch die sgRNA induzierte Veränderungen detektiert werden.

Für sgRNA 1 (pSET7sg1) zeigt die Sequenzierung, dass von einem erfolgreichen Binden der transduzierten sgRNA 1 in den SMCs und weiter von einem erfolgreichen Schneiden der DNA durch Cas9 auszugehen ist (Abbildung 27):



**Abbildung 27: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung genomischer DNA von mit sgRNA 1 transduzierten Cas9 SMCs:** Über der Basenfolge der SET7 Sequenzierung (5' → 3') ist ergänzend die DNA-bindende Sequenz der sgRNA 1 eingefügt. Der blaue Pfeil markiert die anzunehmende Schnittstelle von Cas9 (3 bp vor der PAM-Sequenz, die im blauen Kasten liegt, in 5' Richtung). Rot markiert sind die 2 Basen der sgRNA, die hier nicht Teil der sequenzierten Basenfolge sind.

Ab der anzunehmenden Schnittstelle von Cas9, die in Abbildung 27 mit einem blauen Pfeil markiert ist, zeigt sich im Chromatogramm eine Überlagerung von mehreren Peaks. Diese repräsentieren andere, an gleicher Stelle detektierte Basen. Es ist anzunehmen, dass neu auftretende Indels für diese zunehmend heterogene Sequenzierung verantwortlich sind, da die Reparatur der DNA ab dem erzeugten Doppelstrangbruch in jeder Zelle anders abläuft und folglich auch in jeder Zelle ab der Schnittstelle andere Basenfolgen auftreten können. Die Effektivität des durch die sgRNA induzierten Doppelstrangbruchs und der nachfolgenden Indelbildung kann hier allerdings nicht abgeschätzt werden. Es ist anzumerken, dass die Sequenzierung eine Deletion zweier Basen im SET7 Gen (nämlich 5' GT) unmittelbar vor der PAM-Sequenz zeigt. Ob diese Deletion im zeitlichen Zusammenhang mit dem benachbarten Doppelstrangbruch der DNA durch Cas9

stattgefunden hat, oder eventuell durch ihn verursacht wurde, kann rückblickend nicht genau festgestellt werden.

Für sgRNA 3 (pSET7sg3) ist ebenfalls anzunehmen, dass ein erfolgreiches Binden der sgRNA und konsekutiv ein erfolgreicher DNA-Doppelstrangbruch im SET7 Gen der SMCs stattgefunden hat. So zeigt die Sequenzierung auch hier eine Überlagerung der Peaks ab der erwarteten Cas9 Schnittstelle (blauer Pfeil Abbildung 28), die am ehesten durch Indel-Formation verursacht ist. Eine Aussage über die Effektivität des SET7 Gen-KO in den sequenzierten Cas9 SMCs lässt sich auch an dieser Stelle nicht treffen.



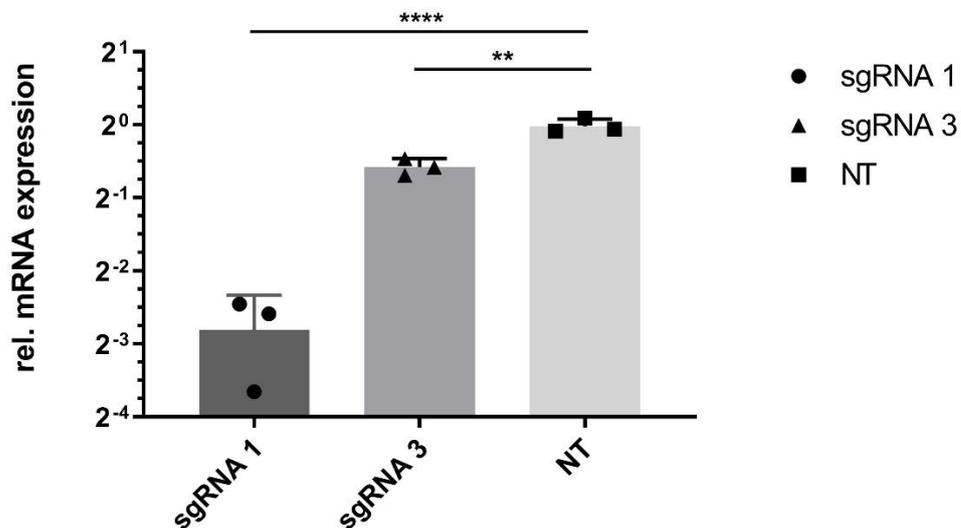
**Abbildung 28:** Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung genomischer DNA von mit sgRNA 3 transduzierten Cas9 SMCs: Über der Basenfolge der Sequenzierung (5' → 3') ist die DNA-bindende Sequenz der sgRNA 3 eingefügt. Der blaue Pfeil markiert die anzunehmende Schnittstelle von Cas9 (3 bp vor der PAM-Sequenz in 5' Richtung).

Der Anteil alternativ detektierter Basen ab der Cas9 Schnittstelle fiel für sgRNA 3 allerdings weniger eindrücklich aus als für sgRNA 1. Womöglich bindet sgRNA3 ineffizienter, wodurch die DNA als Konsequenz auch weniger effizient geschnitten wurde.

### 3.3.2 SET7 mRNA-Expression in mit CRISPR/Cas9 manipulierten glatten Muskelzellen

Neben dem Nachweis der erfolgreichen Modifikation der genomischen SET7 DNA-Sequenz durch die CRISPR/Cas9 Methode für jede der beiden verwendeten sgRNAs (pSet7sg1, pSet7sg3) war die Überprüfung ihres Effekts auf die Expression von SET7 in den Cas9 SMCs selbst nötig. Ein erfolgreicher Funktionsverlust des Gens sollte in einer deutlich verringerten bzw. nicht mehr nachweisbaren mRNA-Expression von SET7 resultieren. Für die Expressionsanalyse wurde vier Tage nach der Transduktion und anschließender Lyse der Zellen die RNA der infizierten SMCs isoliert und daraus die cDNA synthetisiert. Über eine qPCR konnte daraufhin die mRNA-Expression von SET7 der infizierten mit nicht infizierten Cas9 SMCs verglichen und so auch die Erfolgsrate der zwei sgRNAs geprüft werden.

Dabei konnte für beide sgRNAs eine Verringerung der SET7 mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gezeigt werden (Abbildung 29).



**Abbildung 29: SET7 wird nach mit sgRNA 1 oder sgRNA 3 vermitteltem CRISPR/Cas9 Gen-KO in SMCs im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (NT) vermindert exprimiert.** Ergänzend sind die entsprechenden Einzelwerte für jede sgRNA (entsprechend pSet7sg1, pSet7sg3) sowie für die Kontrolle abgebildet (n=3). Die Ergebnisse wurden mit HPRT als HK normiert. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001; \*\*\*\* p<0.0001.

So führt ein mit sgRNA 1 (pSET7sg1) induzierter CRISPR/Cas9 SET7 knock-down in den SMCs zu einer starken Reduktion der SET7 Expression, was einem erfolgreichen funktionellen Genverlust entspricht. Demgegenüber unterscheiden sich mit sgRNA 3 infizierte Zellen in ihrer SET7 Expression zwar signifikant von nicht-infizierten Kontrollen, der Effekt des CRISPR/Cas9 knock-downs ist bei lediglich leichter Reduktion der SET7 Expression aber nur gering. Entsprechend ist sgRNA 3 (pSET7sg3) hinsichtlich einer Verringerung der SET7 mRNA-Expression kaum effektiv. Im Gegensatz zu sgRNA 1 ist sgRNA 3 (pSET7sg3) daher eher nicht geeignet, einen effektiven funktionalen SET7 knock-down zu induzieren.

Mit sgRNA 1 konnte somit eine sgRNA entwickelt werden, die einen wirkungsvollen knock-down von SET7 verursacht und folglich ein effektives Werkzeug für weitere Untersuchungen des Enzyms darstellt.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter Stimulation signifikante Änderungen der mRNA-Expression untersuchter epigenetischer Enzyme auftreten und somit eine epigenetische Beteiligung am Krankheitsgeschehen Atherosklerose zu vermuten ist. So zeigt sich, dass eine pro-atherosklerotische Stimulation, insbesondere mit TNF $\alpha$  und LPS, einen direkten Einfluss auf epigenetische Mechanismen in Makrophagen hat, und bereits einzelne Stimuli eine relevante Änderung epigenetischer Enzymexpressionen verursachen. Für DNMT1 und SET7 scheint es sich bei diesem Effekt um eine verhältnismäßig kurzfristige Reaktion zu handeln, die innerhalb der ersten zehn Stunden nach Stimulationsreiz auftritt, um nach 23 Stunden wieder abzuklingen. Vereinzelt nachgewiesene Alterationen epigenetischer Enzyme in Zellsuspensionen von Ldlr<sup>-/-</sup>-Mäusen nach HFD im Vergleich zu Kontrollen ohne Diät betonen außerdem, dass diese direkt an der Krankheitspathogenese beteiligt sein könnten. Insbesondere SET7 könnte hierbei eine entscheidende Rolle spielen. Schließlich konnte ein effizienter Weg eines SET7 Gen knock-outs über das CRISPR/Cas9 System demonstriert werden, der neue Möglichkeiten für Studien dieses Enzyms eröffnet.

Veränderungen der DNA- und Histon-Methylierung in atherosklerotischem Gewebe sowie bei verschiedenen Genen, die mit der Entwicklung der Krankheit in Zusammenhang stehen, sind vereinzelt bereits nachgewiesen (107, 139, 142, 143, 145). Insbesondere zeigen humane atherosklerotische Plaques der Carotis und daraus isolierte Zellen Unterschiede in ihrer DNA- und Histon-Methylierung, und speziell für H3K4 finden sich an mehreren Stellen Abweichungen zu gesunden Kontrollen. Alterationen betreffen auch die Expression verschiedener epigenetischer Enzyme wie einiger Histon- und DNA-Methyltransferasen (142). Die an H3K4 wirkenden HMT SET1, 2 und 7 sowie die entsprechenden HDM LSD und Kdm5 konnten im Rahmen dieser Arbeit in Hinblick auf das Krankheitsbild Atherosklerose zum ersten Mal erfolgreich untersucht werden. So lässt sich hier belegen, dass verschiedene pro-atherosklerotische Stimuli einen direkten Einfluss auf die Expression epigenetischer Enzyme in Makrophagen haben können. Insbesondere TNF $\alpha$  führte so direkt zu einer Verringerung der mRNA-Expression von SET7, DNMT1 und Kdm5. Passend dazu ist eine reduzierte generelle DNMT1-Expression im atherosklerotischen Carotis-Plaque beschrieben (142).

Die beiden Histon-Demethylasen LSD und Kdm5 wurden, ebenso wie die DNA-Demethylasen TET2 und 3, durch LPS-Stimulation in ihrer mRNA-Expression verstärkt. Der von Cull et al. beobachtete Effekt einer LPS-Stimulation auf TET2 im Sinne einer Steigerung der mRNA-Expression konnte hier somit bestätigt werden (212). Demgegenüber zeigten sich für TET3 dort gegensätzliche Ergebnisse, bei einer vergleichbaren Stimulationsdauer war dessen mRNA-Expression nach Stimulation vermindert. Anzumerken ist, dass statt der hier verwendeten 50 ng/ml LPS 100 ng/ml LPS eingesetzt wurden (212).

Speziell SET7 und DNMT1 zeigen im zeitlichen Verlauf, dass eine circa neunstündige TNF $\alpha$ -Stimulation den stärksten Effekt auf ihre mRNA-Expression hat und somit die optimale Stimulationsdauer darstellt. Unter Berücksichtigung des Wiederanstieges der mRNA-Expression nach 23 Stunden Stimulation liegt der Schluss nahe, dass es sich dabei um eine kurzfristige Regulation der Zelle handelt, die besonders innerhalb der ersten Stunden nach Stimulation auftritt. Eine ähnliche Beobachtung konnte bereits für TET2 unter LPS-Stimulation in BMDM gemacht werden, dessen mRNA-Expression sich nach 24 Stunden Stimulation ebenfalls wieder normalisiert hatte (212). Die Enzyme scheinen also auf diese Bedingungen mit einer relativ kurzen Reaktionsdauer zu reagieren. Inwieweit diese Beobachtungen auch für andere epigenetische Enzyme gelten, und ob sie auf andere Stimuli übertragbar sind, ist noch nicht ausreichend geklärt. Hier bietet sich ein neuer Ansatz zur Untersuchung genereller Reaktions-Mechanismen dieser Enzymklasse.

Besonders interessant ist auch die hier gezeigte mRNA-Expressionsänderung verschiedener MMPs und TIMP-Enzyme unter zu den epigenetischen Enzymen vergleichbaren Versuchsbedingungen in BMDM. Für einige MMPs ist bereits die Möglichkeit einer Regulation durch epigenetische Mechanismen nachgewiesen, und es wurden vereinzelt Unterschiede ihrer Methylierung in atherosklerotischen Läsionen gefunden (143, 149-151). Daher sind diese als direktes Ziel epigenetischer Einflussnahme in der Atherosklerose möglich, und die charakteristischen Veränderungen ihrer Expression im Krankheitsprogress möglicherweise der Aktivität einzelner epigenetischer Enzyme geschuldet. So zeigte sich nach TNF $\alpha$ -Stimulation für MMP2 und TIMP2 eine Verringerung, für MMP9 und MMP14 eine Erhöhung der mRNA-Expression. Diese war

für MMP9 außerdem nach IL-1 $\beta$  Gabe erhöht, für MMP14 und TIMP1 wiederum nach LPS-Stimulation.

Ähnliche Resultate für MMP9 und MMP14 erhielten Hayes et al. nach einer 18-stündigen Stimulation mit 10 ng/ml TNF $\alpha$ , und Rajavashisth et al. wiesen einen MMP14-Expressionsanstieg nach sechsstündiger TNF $\alpha$ -Stimulation in Makrophagen, allerdings über Flow-Zytometrie, nach (130, 213).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zusätzlich die teils konträren Effekte einer Stimulation auf die Matrixmetalloproteasen und auf ihre korrespondierenden TIMP-Enzyme gegenübergestellt werden. MMP2 und dessen Inhibitor TIMP2 verhielten sich dabei ähnlich, eine Stimulation mit TNF $\alpha$  bedingte bei beiden eine verringerte mRNA-Expression. Insbesondere die Steigerung der Enzymexpression von MMP9 und 14 unter TNF $\alpha$  stand jedoch im Gegensatz zur gleichzeitig verringerten Enzymexpression ihres Inhibitors TIMP2. Ohne ausreichende negative Regulation durch TIMP2 müsste sich dementsprechend der Effekt von MMP9 und 14 unter ähnlichen Bedingungen in vivo potenzieren, was insbesondere im pathologisch veränderten Organismus schwerwiegende Folgen nach sich ziehen könnte.

Für TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und NF $\kappa$ B ebenso wie für die MMP- und TIMP-Enzyme ist es unter gleichen Versuchsbedingungen möglich, Parallelen zu eventuell an ihrer Regulation beteiligten epigenetischen Enzymen zu ziehen. Zu diesem Zweck zeigt Tabelle 7 die Effekte einer Stimulation mit IL1- $\beta$ , TNF $\alpha$  und LPS auf untersuchte epigenetische Enzyme, MMPs, TIMP-Enzyme, den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B sowie auf die Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  im Vergleich. Für TNF $\alpha$  lassen sich die Ergebnisse beispielsweise wie folgt interpretieren: Da die mRNA-Expression von SET7 nach Stimulation reduziert ist, dieses Enzym aber eine Methylierung von H3K4 verursacht, was mit einer gesteigerten Transkription assoziiert ist, könnte die nach Stimulation verringerte mRNA-Expression von MMP2 oder TIMP2 möglicherweise direkt mit SET7 in Zusammenhang stehen. Es wäre wichtig zu klären, ob es sich hier nur um eine Korrelation oder eine Kausalität handelt.

**Tabelle 7: Zusammenfassung der Effekte einzelner relevanter Stimulationen (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , LPS) auf die mRNA-Expression untersuchter epigenetischer Enzyme, MMPs, TIMPs, für IL1- $\beta$ , TNF $\alpha$  und NF $\kappa$ B in BMDM ( $\downarrow$ =verringerte,  $\uparrow$ =erhöhte relative mRNA-Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen)**

	IL-1 $\beta$	TNF $\alpha$	LPS
SET1			
SET2			
SET7		$\downarrow$	
LSD			$\uparrow$
Kdm5		$\downarrow$	$\uparrow$
DNMT1		$\downarrow$	
DNMT3a			
TET2			$\uparrow$
TET3			$\uparrow$
MMP2		$\downarrow$	
MMP9	$\uparrow$	$\uparrow$	
MMP14		$\uparrow$	$\uparrow$
TIMP1			$\uparrow$
TIMP2		$\downarrow$	
IL-1 $\beta$		$\uparrow$	$\uparrow$
TNF $\alpha$	$\uparrow$		$\uparrow$
NF $\kappa$ B		$\uparrow$	$\uparrow$

Ebenso interessant für weitere Versuche wäre ein potenzieller Zusammenhang zwischen Kdm5 oder DNMT1 und MMP 9 und 14. Auch könnten die beiden epigenetischen Enzyme in IL1- $\beta$  und NF $\kappa$ B Signalwege involviert sein. Da Kdm5 H3K4 demethyliert, würde man unter dessen Verringerung eine gesteigerte mRNA-Expression zugehöriger Gene erwarten. Eine verringerte DNA-Methylierung verursacht in der Regel eine verstärkte Transkription betroffener Genabschnitte, weshalb für eine reduzierte DNMT1-Aktivität ebenfalls eine Steigerung der Expression DNMT1-kontrollierter Gene als Folge anzunehmen wäre. Die für diese Auslegung getroffenen Annahmen sind jedoch stark vereinfacht, sie sollen lediglich als Grundlage zukünftiger Versuche herangezogen

werden können und bei der Aufstellung von Hypothesen zu möglichen Zielstrukturen der hier untersuchten epigenetischen Enzyme hilfreich sein.

Als nächster Schritt und aufbauend auf den hier gezeigten Ergebnissen wäre insbesondere eine Analyse der entsprechenden DNA- sowie Histon-Methylierung der MMPs, TIMPs sowie der nachweislich alternierten Zytokine und Transkriptionsfaktoren unter Wiederholung der Stimulationsversuche von Interesse, um so von einem speziellen, charakteristischen Muster auf ein möglicherweise verantwortliches, konkretes epigenetisches Enzym schließen zu können. Da es aber eine Vielzahl an epigenetischen Enzymen gibt, von denen hier nur ein kleiner Anteil untersucht wurde, kann von einzelnen Veränderungen am Chromatin ursächlich nicht direkt auf ein verantwortliches Enzym geschlossen werden. Ergänzend könnten durch ein ChIP- (*Chromatin Immunoprecipitation*) DNA-*Sequencing* weitere mögliche Zielgene der epigenetischen Enzyme anhand ihrer spezifischen Histon-Methylierung, wie beispielsweise einer H3K4-Monomethylierung, gefunden werden. Dabei werden Quervernetzungen zwischen Histon-Protein und seinem assoziierten DNA-Abschnitt erzeugt, das Chromatin fragmentiert, die zu untersuchende Histon-Modifikation durch spezifische Antikörper detektiert und abschließend die dort gebundene DNA sequenziert (214). Jedoch muss hierbei mindestens für SET7 berücksichtigt werden, dass nur ein Teil der von SET7 beeinflussten Gene an ihrem Promoter direkt über H3K4 methyliert werden. Eine posttranslationale Methylierung sowie methylierte regulatorische Elemente sind ebenfalls mögliche Modifikationen, die über diese Methode nicht nachgewiesen werden (96).

Eine weitere Limitation dieser Arbeit ergibt sich aus dem Herkunftsorganismus der Zellen. So sind Unterschiede in der Reaktion auf eine Stimulation zwischen humanen und murinen Zellen, u.a. für die Expression verschiedener MMPs, beschrieben, weshalb ein einfaches Übertragen der Befunde auf Pathomechanismen im Menschen nicht möglich ist (215). Eine Wiederholung der Versuche in humanen Zelllinien könnte hier ergänzend hilfreich sein.

Im Gegensatz zu den Zellkulturversuchen mit Makrophagen konnten in glatten Muskelzellen, einer wichtigen Zellpopulation im atherosklerotischen Herd (206), für SET1, SET2, SET7, LSD, Kdm5 und DNMT1 unter keiner der getesteten Stimulationen

eine relevante Veränderung der mRNA-Expression nachgewiesen werden, obwohl hier eine für TNF $\alpha$  optimierte Stimulationsdauer von neun Stunden verwendet wurde. Dies unterstreicht die Vermutung, dass sich epigenetische Mechanismen und Effekte auch unter gleichen Bedingungen stark zwischen einzelnen Zellpopulationen unterscheiden können. Interessant wäre es hier, den Versuch mit einer Kultur primärer glatter Muskelzellen, die direkt aus dem Plaquetgewebe stammen, zu wiederholen, da für SMCs aus atherosklerotischen Läsionen sowohl Änderungen der Histon-Methylierung als auch eine veränderte Expression einzelner epigenetischer Enzyme beschrieben sind (142).

Des Weiteren konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch im Atherosklerose-Mausmodell Änderungen epigenetischer Enzyme zu beobachten sind. So war in Zellsuspensionen aus der Milz von Ldlr<sup>-/-</sup>-Mäusen nach HFD im Vergleich zu Ldlr<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Diät eine relativ verminderte SET1 mRNA-Expression zu erkennen. Dass SET1 gerade hier, entgegen allen anderen Versuchen dieser Arbeit, in denen kein signifikanter Effekt einer Stimulation auf SET1 nachgewiesen werden konnte, eine relevante Alteration aufweist, könnte mit dessen entscheidender Rolle bei der Homöostase hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen in Zusammenhang stehen. So kann der Verlust von SET1 nachweislich zu einer gesteigerten extramedullären Blutbildung in der Milz führen (216). Die extramedulläre Blutbildung wiederum ist im Krankheitsbild Atherosklerose charakteristisch erhöht (217). Da für diesen Versuch allerdings Zellsuspensionen der Milz verwendet wurden, ist die Aussagekraft über einzelne betroffene Zellen eingeschränkt. Daher wäre eine der qPCR vorausgehende Mikrodissektion fixierter Milzen oder ein Fluoreszenz-*Cellsoring* der Zellsuspensionen anzustreben, um als weiteren Schritt einzelne Zellpopulationen von Ldlr<sup>-/-</sup>-Mäusen nach HFD im Vergleich zu Ldlr<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Diät gezielt auf Alterationen ihrer SET1-Expression untersuchen zu können.

Bei den geringen, jedoch signifikanten Unterschieden der Enzymexpressionen von SET2 und insbesondere SET7 zwischen Zellsuspensionen der Aorta von Ldlr<sup>-/-</sup>-Mäusen nach HFD und Ldlr<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Diät handelt es sich im Hinblick auf die augenscheinlich nur minimalen Abweichungen am ehesten um ein experimentelles Artefakt, das keine tatsächliche Veränderung der Enzymexpression als Reaktion auf eine Stimulation widerspiegelt. Eine Wiederholung des Versuches mit mehr Replikaten würde hier zur

weiteren Aufklärung beitragen. Für die Aortenwurzel von *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach HFD war kein Unterschied der mRNA-Expressionen von SET1, SET2, SET7, LSD, Kdm5, DNMT1 und DNMT3a im Vergleich zu den Kontrollen festzustellen, obwohl es an dieser Stelle charakteristischerweise zuerst zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques im Mausmodell kommt (207). Bei Annahme einer aberranten Enzymexpression in atherosklerotischen Läsionen wäre vom stärksten Effekt folglich im hierfür ausgeprägtesten Bereich auszugehen. Sollte es sich bei der unterschiedlichen SET7 Enzymexpression zwischen Zellsuspensionen der Aorta von *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach HFD und *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Diät doch um keine rein experimentell verursachte Abweichung handeln, könnte diese Beobachtung dafür sprechen, dass sich die SET7 Expression möglicherweise relevant zwischen den einzelnen Stadien der Atherosklerose unterscheidet, wie es schon für andere Histon-Methyltransferasen gezeigt werden konnte (142). Eine direkte histochemische Untersuchung von Atherosklerose-Schnitten, u.a. auf SET7, und eine genauere, auch phänotypische Untersuchung eines bereits beschriebenen SET7-KO Mausmodells hinsichtlich atherosklerotischer Gesichtspunkte wäre hier sicherlich ebenfalls aufschlussreich (218).

Für SET7, auf dem das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt, lässt sich eine Veränderung der mRNA-Expression in BMDM nach TNF $\alpha$ -Stimulation, bei der es sich um eine kurzfristige Reaktion handelt, nachweisen, und fraglich ebenfalls in Aorten des *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Atherosklerose-Mausmodells nach HFD, auch wenn die Abweichung der SET7 Expression hier am ehesten experimentell zu begründen ist. Somit ist anzunehmen, dass SET7 eine relevante Rolle im atherosklerotischen Krankheitsgeschehen spielt. Diese Vermutung bekräftigt sich, berücksichtigt man dessen Beteiligung an der Reaktion auf Hyperglykämie und oxidativen Stress sowie an einer durch NF $\kappa$ B vermittelten inflammatorischen Reaktion (84, 94, 95). Der Schlussfolgerung, dass SET7 aufgrund fehlender phänotypischer Unterschiede der SET7 knock-out Maus für essentielle Zellfunktionen abkömmlich scheint, steht dabei vor allem die große Anzahl beeinflussbarer zellulärer Zielstrukturen und die Einbettung von SET7 in ein fein abgestimmtes System aus Kontrollmechanismen, das gerade in der Epigenetik besonders ausgeprägt ist, gegenüber (96, 121). In der Zusammenschau ist vielmehr davon auszugehen, dass SET7 primär eine regulatorische Funktion besitzt und entscheidend in der Koordination einer vielseitigen und fein abgestimmten Zellantwort auf die

extrazelluläre Umwelt sein könnte, wobei Zelltyp, Mikro-Umgebung und die aktuellen intrazellulären Bedingungen wahrscheinlich maßgeblichen Einfluss nehmen (90, 94, 95). Ein Defizit würde sich daher auch erst im Laufe der Zeit in vollem Ausmaß bemerkbar machen. Diese Aufgaben und Funktionen passen gut in ein chronisches Krankheitsgeschehen, bei dem insbesondere eine gestörte Feinabstimmung der zellulären Antwort über die Jahre deutliche Auswirkungen haben kann. Es lässt sich weiterhin annehmen, dass auch in der Pathogenese der Atherosklerose eine Verknüpfung zwischen Umwelt und zellulärer Reaktion zumindest zum Teil über einige epigenetische Enzyme vermittelt wird, wie es für viele der Risikofaktoren in anderen Krankheitsentitäten bereits beschrieben ist (28, 152, 153, 155). Gerade dies könnte unter anderem über SET7 erfolgen. Anhalt hierzu gibt ein aktueller Versuch, bei dem eine temporäre Hyperglykämie über SET7 direkt zu einer erhöhten H3K4-Monomethylierung u.a. in der Promoterregion von IL-8, einem Entzündungsmediator, der entscheidend an der Aktivierung inflammatorischer Prozesse der Gefäßwand beteiligt ist, führte (88, 219). Noch plausibler wird die These einer relevanten Rolle von SET7 im atherosklerotischen Geschehen bei der Integration von Risikofaktoren, zieht man neueste Ergebnisse bezüglich der *'trained immunity'* heran: Monozyten und Makrophagen können, vermittelt insbesondere über die Methylierung von H3K4, auf bestimmte, vor allem inflammatorische Reize trainiert werden. So sind sie entweder durch das zugänglichere Chromatin bereits auf den erneuten Reiz vorbereitet, oder reagieren mit Toleranz auf Re-Exposition, indem die H3K4 Methylierung entfernt wird (146, 157, 220, 221). Hochaktuell zeigte sich für eine Exposition mit  $\beta$ -Glucan, dass SET7 direkt an dieser Vermittlung beteiligt ist (222). Hier findet sich also ein konkretes Beispiel für epigenetische Veränderungen an H3K4 über SET7 in für die Atherosklerose relevanten Zellen als Reaktion auf Inflammation und Infektion. Demnach ist die Vermittlung zwischen Risikofaktoren und ihren zellulären Effekten im Krankheitsgeschehen der Atherosklerose als explizite Aufgabe von SET7 möglich.

Ein entscheidender Punkt bezüglich der Interpretation der hier gezeigten Daten ist zugleich eine Schwäche dieser Arbeit, nämlich die Annahme, dass die gesteigerte (mRNA-) Expression eines Enzyms in ähnlicher Weise zu einer Verstärkung der durch das Enzym vermittelten Effekte führt. Die Aktivität eines Enzyms kann allerdings auch durch verschiedene posttranslationale Modifikationen beeinflusst werden, ohne dass die

mRNA-Expression selbst verändert ist. Daher wären ergänzende Aktivitätsmessungen von SET7 in diesem Zusammenhang besonders interessant. Als potenzieller Biomarker für die SET7 Aktivität könnte hierzu das ribosomale Protein Rpl29 herangezogen werden (223). Außerdem verkompliziert die enge gegenseitige Einflussnahme epigenetischer Mechanismen, insbesondere der DNA- und Histon-Methylierung, eine Interpretation der Befunde zusätzlich. Für die hier untersuchten Enzyme ist allein schon eine direkte Verbindung zwischen SET7, LSD und DNMT1 nachgewiesen (74, 79, 96). Schließlich wurden hier nur einige epigenetische Enzyme, die insbesondere an H3K4 wirken, untersucht, dabei könnten andere eine noch entscheidendere Rolle in der Atherosklerose spielen und für beobachtete Veränderungen verantwortlich sein.

Mit dem Feld der Epigenetik öffnet sich für die Atherosklerose ein neuer Bereich diagnostischer Möglichkeiten, da, sollten sich die hier gestellten Hypothesen zumindest teilweise bestätigen, Alterationen der Epigenetik schon vor einer klinischen Manifestation der Atherosklerose stattfinden. Sie könnten so eventuell als Teil eines Risiko-Screenings genutzt werden, insbesondere solange die atherosklerotischen Veränderungen noch reversibel sind. Auch könnten sich hier neue therapeutische Möglichkeiten bieten. Gerade SET7, das unter den epigenetischen Enzymen durch seine vielen möglichen Effekte hervorsteht, scheint ein interessanter und vielversprechender Ansatz zu sein, um den Einfluss der Epigenetik auf die Atherosklerose weiter zu untersuchen.

Ein erster Schritt hinsichtlich neuer Untersuchungen ist durch die hier gezeigte Etablierung eines CRISPR/Cas9 SET7 knock-outs bereits gegangen, dessen Funktionalität im Rahmen dieser Arbeit validiert werden konnte: Durch Sequenzierung der genomischen DNA transduzierter Cas9 SMCs konnten Rückschlüsse auf ein erfolgreiches Binden der verwendeten sgRNA sowie Schneiden der DNA durch Cas9 gezogen werden, was Grundvoraussetzung für einen wirksamen Gen-KO ist. Insbesondere für sgRNA 1 (pSET7sg1) ist, bei deutlicher Überlagerung der Basenpeaks ab der zu erwartenden Cas9 Schnittstelle, von einem Erfolg der Methode auszugehen. Auch sgRNA 3 scheint zum Doppelstrangbruch und zur Indelformation geführt zu haben, wenn auch weniger eindrucklich.

Ob sgRNA 1 tatsächlich in der genomischen SET7 DNA-Sequenz der SMCs zellübergreifend eine einheitliche Mutation, nämlich den Basenverlust von GT, verursacht hat, wurde in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt. Entsprechend ist auch eine vorausgegangene Sequenzierung des SET7 Wildtyp Gens der Cas9 SMCs und ein Abgleich zur Referenzgen-Sequenz nicht erfolgt. Bei einem Folgeversuch wäre dieser Schritt generell als Vorarbeit anzuraten, auch um eine optimal auf die Zielzellen abgestimmte sgRNA zu gewährleisten.

Eine Aussage über die Effektivität des sgRNA vermittelten SET7 Gen-knock-outs lässt sich anhand der jeweiligen Sequenzierung nicht treffen, sie kann allerdings über die SET7 mRNA-Expression infizierter Cas9 SMCs abgeschätzt werden. Hierbei war für sgRNA 1 (pSET7sg1) ein stärkerer Effekt auf die SET7 mRNA-Expression zu beobachten als für sgRNA 3 (pSET7sg3). Vielmehr ist unter Verwendung von sgRNA 3 kein adäquater SET7-KO zu erwarten, da die nachgewiesene Verringerung der SET7 Expression zu gering ausfällt. Allein sgRNA 1 (pSET7sg1) führt zu einer deutlichen Reduktion der SET7 Expression.

Unter Zusammenschau der Daten mit den Ergebnissen aus der SMC-Sequenzierung lässt sich insgesamt davon ausgehen, dass sgRNA 1 nicht nur verlässlich zu einem Doppelstrangbruch, sondern gleichzeitig zum stärksten Funktionsverlust des SET7 Gens führt. Demgegenüber ist sgRNA 3, trotz wahrscheinlich erfolgreichem Binden und Schneiden der DNA, nicht geeignet, die SET7 Expression relevant zu beeinflussen. Zur Induktion eines SET7 knock-outs ist daher sgRNA 1 am erfolgversprechendsten und demnach die in folgenden Versuchsreihen zu wählende sgRNA.

Die dargestellte Ausführung der CRISPR/Cas9 Methode beschreibt nur einen möglichen Weg, um einen funktionalen SET7-KO zu erreichen. So könnten auf dieser Grundlage zukünftig Verbesserungen der Methode zu einer höheren viralen Ausbeute bis hin zu einem deutlich effizienteren Gen knock-out führen. Gerade die Menge rekombinanter sgRNA-AAV-Viren bzw. transduzierter SMCs war in dieser Arbeit teils limitierender Faktor in der Versuchsausführung und -ausweitung. Dabei bieten mehrere Zwischenschritte Ansatzstellen für Variationen: Schon im sgRNA Design, bei dem hier insgesamt drei verschiedene sgRNAs, die alle im dritten Exon von SET7 binden, generiert

wurden, ist dank neuer und modernerer Software-Tools das Finden optimierter sgRNAs deutlich erleichtert (224). Hierbei wäre interessant, sgRNAs in anderen Exons, bestmöglich in funktionalen Domänen des SET7 Gens, zu prüfen, oder beispielsweise das AAV-System durch einen anderen Vektor zu ersetzen. Des Weiteren bieten modifizierte, spezifischere Cas9 Endonukleasen mit weniger off-target-Aktivität eine Möglichkeit zur Verbesserung (225, 226). Auch wurde hier nur eine einzige MOI bezüglich ihrer Effektivität geprüft. Die Optimierung des Verhältnisses von infizierten Zellen zu rekombinanten Viren würde wahrscheinlich ebenfalls zu einer noch effektiveren Methode führen, auch im Hinblick auf die teils Apoptose-induzierende Wirkung durch CRISPR/Cas9-vermittelte Doppelstrangbrüche (227). Zudem sind mittlerweile bereits spezielle CRISPR/Cas9 Kits kommerziell erhältlich, in denen einzelne Arbeitsschritte standardisiert sind.

Der funktionale, CRISPR/Cas9-vermittelte SET7-KO bietet neue Möglichkeiten für zukünftige Forschungsansätze. Über einen flexibel induzierbaren knock-out könnte so die Bedeutung von SET7 für glatte Muskelzellen oder Makrophagen, insbesondere unter proatherogenen Bedingungen, wie z.B. einer erneuten Stimulation, untersucht werden. Auch könnte eine Ausweitung des SET7-KOs auf andere Zelllinien und später auch humane Zellen erfolgen. Allerdings müssten dann möglicherweise einzelne Teilschritte der CRISPR/Cas9 Methode an die jeweiligen zellulären Besonderheiten angepasst werden. Auch muss hierbei, insbesondere in Hinblick auf sich eventuell anschließende in vivo Studien und Versuche zu Inflammation und Immunität, die potenziell immunogene Wirkung von AAV-Viren, aber auch von bakteriellen Cas9 Endonukleasen beachtet werden (228, 229). Ein SET7-KO Versuch sollte außerdem generell mit Überexpressionsstudien zu SET7 kombiniert werden, um so beide Extremfälle vergleichen zu können. Gerade die verminderte Expression von SET7 in der Makrophagen-Zellkultur nach TNF $\alpha$ -Stimulation verlangt danach. Zwischen inhibierten und überexprimierenden Zellen kann dann nicht nur die mRNA-Expression bereits untersucht und zusätzlich neuer inflammatorischer Zytokine, Transkriptionsfaktoren, MMPs und TIMPs verglichen, sondern auch deren entsprechende Proteinebene via Western Blot oder ELISA betrachtet werden. Sinnvoll zu ergänzen wäre dies durch ein bereits erwähntes *ChIP-Sequencing* sowie die generelle Überprüfung der Histon- sowie

DNA-Methylierung. Letztere kann beispielsweise mithilfe einer Bisulfit-Behandlung und anschließenden Sequenzierung der DNA erfolgen.

Auch wäre eine kombinierte Untersuchung wichtiger atherosklerotischer Risikofaktoren besonders interessant, gerade auch hinsichtlich einer epigenetisch vermittelten *'trained immunity'* der Zellen. So könnte z.B. überprüft werden, ob sich die Effekte eines turbulenten Blutflusses (158) mit denen einer gleichzeitigen oder vorangegangenen pro-atherosklerotischen Stimulation auf DNA- oder Histon-Methylierung und mRNA-Expression verschiedener epigenetischer Enzyme potenzieren.

Letztendlich wird aber vor allem die Zusammenschau aller gewonnenen Daten aus *in vitro* Versuchen und Studien im Mausmodell sowie Ergebnissen aus humanen Atherosklerose-Plaques und großen Studien zu Genom-weiten Veränderungen im pathologischen Gewebe entscheidend sein, um kausale Mechanismen und funktionelle Zusammenhänge aufzudecken.

## 5. Zusammenfassung

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine chronische inflammatorische Erkrankung, die sich an der arteriellen Gefäßinnenwand abspielt. Ihre Haupt-Manifestationsformen Schlaganfall und Herzinfarkt zählen zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Eine chronische Endothelbelastung und -funktionsstörung, beeinflusst durch Risikofaktoren wie Diabetes, arterieller Bluthochdruck, Rauchen und Entzündungszustände, führen zur Permeabilitätserhöhung des Endothels, zur Zelleinwanderung, subendothelialen Lipidanreicherung, Migration glatter Muskelzellen und der Ausbildung atherosklerotischer Läsionen. Es kommt zu Aktivierung des Immunsystems und fortschreitender Entzündungsreaktion, schließlich zur Ausbildung eines nekrotischen Kerns und zunehmender Vulnerabilität des Plaques.

Epigenetische Veränderungen betreffen klassischerweise das Chromatingerüst. Durch DNA-Methylierung und -Demethylierung sowie verschiedene Modifikationen der Histon-Proteine kann die DNA in ihrer Zugänglichkeit verändert werden. So kann die Transkription eines bestimmten Gens direkt und potenziell längerfristig beeinflusst werden, ohne dass Alterationen der DNA-Basenfolge selbst stattfinden. Das Enzym SET7 nimmt hierbei eine Sonderrolle ein, da es neben einer Methylierung von Histon 3 auch verschiedene zelluläre Zielstrukturen posttranslational direkt methylieren kann.

Epigenetische Veränderungen im Kontext der Atherosklerose sind bereits vereinzelt beschrieben. Auch sind sie relevant in der Reaktion auf Umwelteinflüsse und bei inflammatorischen Vorgängen. Der Frage, ob epigenetische Mechanismen im atherosklerotischen Geschehen eine Rolle spielen, sollte in dieser Arbeit nachgegangen werden. Dazu wurde in Zellkulturversuchen für Makrophagen und glatte Muskelzellen geprüft, ob die einzelnen pro-atherosklerotischen Stimuli oxLDL, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und LPS bereits zu relevanten Veränderungen epigenetischer Enzyme führen. Dies erfolgte über Vergleich der entsprechenden mRNA mittels qPCR. Zur Untersuchung der genaueren Dynamik wurde für die Enzyme SET7 und DNMT1 der zeitliche Ablauf dieser Reaktion auf TNF $\alpha$ -Stimulation in Makrophagen genauer betrachtet. Unter gleichen Versuchsbedingungen wurde außerdem die Änderung der mRNA-Expression einiger Matrixmetalloproteasen, TIMP-Enzyme, Zytokine und Transkriptionsfaktoren analysiert,

um zukünftig kausale Zusammenhänge weiter aufdecken zu können. Auch die Frage nach Veränderungen epigenetischer Enzyme in der *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Maus nach fettreicher Diät im Vergleich zu *Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne Diät sollte hier beantwortet werden. Dazu wurde die mRNA der Zellsuspensionen aus Milz, Aortenwurzel und gesamter Aorta der Tiere mithilfe der qPCR verglichen. Schließlich sollte ein effizienter Weg für einen individuellen und flexiblen SET7 knock-out etabliert werden, um weitere Studien dieses Enzyms zu ermöglichen. Hierzu wurde die Methode des CRISPR/Cas9 Systems gewählt und abschließend die Funktionalität des Systems überprüft.

## Summary

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease which occurs at the inner layer of the artery wall. Its two main manifestations are stroke and myocardial infarction, which are two of the most common causes of death worldwide. Chronical endothelial stress and endothelial dysfunction, affected by different risk factors such as hypertension, diabetes mellitus, smoking, and an inflammatory state, lead to an increased permeability, cell accumulation, subendothelial lipid accumulation and migration of smooth muscle cells, causing immune system activation, a subsequent inflammatory reaction, and the formation of atherosclerotic lesions. Finally, the development of a necrotic core occurs, accompanied by a progressive plaque vulnerability.

Epigenetic mechanisms affect the chromatin structure. Therefore, the accessibility of the DNA can be altered by DNA methylation, -demethylation and different modifications of histone proteins. This can directly affect the transcription of a certain gene in a potentially long-lasting way without altering the DNA base sequence itself. The enzyme SET7 is noteworthy because of its ability of direct methylation of different cellular targets in addition to its function as a histone 3 methyltransferase.

Some epigenetic alterations in the context of atherosclerosis have already been described. Epigenetic changes also play a role in the reaction to environmental signals and in processes caused by inflammation. The aim of this study was to clarify whether epigenetic mechanisms play a role in atherosclerosis. Therefore, epigenetic alterations in

macrophages and smooth muscle cells after pro-atherosclerotic stimulation with oxLDL, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and LPS were tested in cell culture experiments and their mRNA expression was compared via qPCR. Regarding the dynamics, the temporal SET7 and DNMT1 expression after stimulation was investigated for macrophages in detail. Furthermore, changes of mRNA expression for certain matrix-metalloproteases, TIMP-enzymes, cytokines, and transcription factors could be detected under constant experimental conditions. By this, the detection of causal dependencies between individual changes could be facilitated in the future. To answer the question of relevant changes in epigenetic enzyme expression in *Ldlr*<sup>-/-</sup>-mice after high-fat diet compared to mice without any diet, mRNA expression of cell suspension gained from the mice spleen, aortic sinus and total aorta were compared by using qPCR. Finally, an efficient way of knocking down SET7 was established by the usage of the CRISPR/Cas9 method, and functionality of this approach was demonstrated in this study.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-26.
2. Colin Mathers GS, Wahyu Retno Mahanani, Jessica Ho, Doris Ma Fat and Dan Hogan. WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000-2015. WHO; December 2016.
3. Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Trends in age-specific coronary heart disease mortality in the European Union over three decades: 1980-2009. *Eur Heart J.* 2013;34(39):3017-27.
4. Büttner R, Thomas C. *Allgemeine Pathologie: mit 15 Tabellen: Schattauer; 2003.*
5. WHO. Classification of atherosclerotic lesions : report of a study group [meeting held in Washington, D.C. from 7 to 11 October 1957]. World Health Organization; 1958.
6. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine.* 2011;17(11):1410-22.
7. Tabas I, Williams KJ, Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation.* 2007;116(16):1832-44.
8. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):56.
9. Kwon GP, Schroeder JL, Amar MJ, Remaley AT, Balaban RS. Contribution of macromolecular structure to the retention of low-density lipoprotein at arterial branch points. *Circulation.* 2008;117(22):2919-27.
10. Mahmoudi MJ, Mahmoudi M, Siassi F, Shokri F, Eshraghian MR, Zarnani AH, et al. Lymphocyte cytotoxicity of oxLDL in patients with atherosclerosis. *Iran J Immunol.* 2011;8(1):27-33.
11. Saleptsis VG, Labropoulos N, Halaris A, Angelopoulos NV, Giannoukas AD. Depression and atherosclerosis. *Int Angiol.* 2011;30(2):97-104.
12. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the Arterial Smooth Muscle Cell. *Science.* 1973;180(4093):1332-9.
13. Jonsson AL, Backhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2017;14(2):79-87.
14. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol.* 2011;12(3):204-12.

15. Insull W, Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med.* 2009;122(1 Suppl):S3-S14.
16. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Jerome WGJ, Linton EF, Vickers KC. The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext.* South Dartmouth (MA)2000.
17. Tabas I, Garcia-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *The Journal of cell biology.* 2015;209(1):13-22.
18. Cochain C, Zerneck A. Macrophages in vascular inflammation and atherosclerosis. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 2017;469(3-4):485-99.
19. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(8 Suppl):C7-12.
20. Hansson GK, Robertson AK, Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:297-329.
21. Ellulu MS, Patimah I, Khaza'ai H, Rahmat A, Abed Y, Ali F. Atherosclerotic cardiovascular disease: a review of initiators and protective factors. *Inflammopharmacology.* 2016;24(1):1-10.
22. Rosenblit PD. Extreme Atherosclerotic Cardiovascular Disease (ASCVD) Risk Recognition. *Curr Diab Rep.* 2019;19(8):61.
23. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell.* 2007;128(4):635-8.
24. Wilson AG. Epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response and relevance to common diseases. *Journal of periodontology.* 2008;79(8 Suppl):1514-9.
25. Harvey ZH, Chen Y, Jarosz DF. Protein-Based Inheritance: Epigenetics beyond the Chromosome. *Mol Cell.* 2018;69(2):195-202.
26. Boskovic A, Rando OJ. Transgenerational Epigenetic Inheritance. *Annu Rev Genet.* 2018;52:21-41.
27. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature.* 2013;502(7472):472-9.
28. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics.* 2003;33 Suppl:245-54.
29. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews Genetics.* 2009;10(5):295-304.

30. Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics*. 2010;2(5):657-69.
31. Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol*. 2004;14(14):R546-51.
32. Couture JF, Trievel RC. Histone-modifying enzymes: encrypting an enigmatic epigenetic code. *Current opinion in structural biology*. 2006;16(6):753-60.
33. Kim JK, Samaranyake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009;66(4):596-612.
34. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. 1993;3(2):226-31.
35. Colot V, Rossignol JL. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays*. 1999;21(5):402-11.
36. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*. 2002;16(1):6-21.
37. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature genetics*. 2007;39(4):457-66.
38. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*. 1982;10(8):2709-21.
39. Sado T, Fenner MH, Tan SS, Tam P, Shioda T, Li E. X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Dev Biol*. 2000;225(2):294-303.
40. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-57.
41. Barlow DP, Bartolomei MS. Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(2).
42. Wigler M, Levy D, Perucho M. The somatic replication of DNA methylation. *Cell*. 1981;24(1):33-40.
43. Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:481-514.
44. Ren W, Gao L, Song J. Structural Basis of DNMT1 and DNMT3A-Mediated DNA Methylation. *Genes (Basel)*. 2018;9(12).

45. Teitell M, Richardson B. DNA methylation in the immune system. *Clinical immunology*. 2003;109(1):2-5.
46. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 1995;374(6522):546-9.
47. Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature reviews Genetics*. 2010;11(3):204-20.
48. Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science*. 1999;286(5439):481-6.
49. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*. 2000;403(6769):501-2.
50. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930-5.
51. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010;466(7310):1129-33.
52. Song CX, Yi C, He C. Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome. *Nat Biotechnol*. 2012;30(11):1107-16.
53. He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. 2011;333(6047):1303-7.
54. Luger K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev*. 2003;13(2):127-35.
55. Audia JE, Campbell RM. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(4):a019521.
56. Liu L, Jin G, Zhou X. Modeling the relationship of epigenetic modifications to transcription factor binding. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(8):3873-85.
57. Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*. 2006;311(5762):844-7.
58. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41-5.
59. Wolffe AP, Hayes JJ. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Res*. 1999;27(3):711-20.

60. Maas NL, Miller KM, DeFazio LG, Toczyski DP. Cell cycle and checkpoint regulation of histone H3 K56 acetylation by Hst3 and Hst4. *Mol Cell*. 2006;23(1):109-19.
61. Bradbury EM. Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays*. 1992;14(1):9-16.
62. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
63. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & development*. 1998;12(5):599-606.
64. Schotta G, Ebert A, Krauss V, Fischer A, Hoffmann J, Rea S, et al. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *The EMBO journal*. 2002;21(5):1121-31.
65. Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, et al. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. 2002;419(6905):407-11.
66. Zhang X, Huang Y, Shi X. Emerging roles of lysine methylation on non-histone proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2015;72(22):4257-72.
67. Alvarez-Venegas R, Avramova Z. SET-domain proteins of the Su(var)3-9, E(z) and trithorax families. *Gene*. 2002;285(1-2):25-37.
68. Binda O. On your histone mark, SET, methylate! *Epigenetics*. 2013;8(5):457-63.
69. Jones RS, Gelbart WM. The *Drosophila* Polycomb-group gene Enhancer of zeste contains a region with sequence similarity to trithorax. *Mol Cell Biol*. 1993;13(10):6357-66.
70. Wysocka J, Myers MP, Laherty CD, Eisenman RN, Herr W. Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes & development*. 2003;17(7):896-911.
71. Rasmussen TL, Ma Y, Park CY, Harriss J, Pierce SA, Dekker JD, et al. Smyd1 facilitates heart development by antagonizing oxidative and ER stress responses. *PLoS one*. 2015;10(3):e0121765.
72. Chuikov S, Kurash JK, Wilson JR, Xiao B, Justin N, Ivanov GS, et al. Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature*. 2004;432(7015):353-60.
73. Couture JF, Collazo E, Hauk G, Trievel RC. Structural basis for the methylation site specificity of SET7/9. *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(2):140-6.

74. Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, et al. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nature genetics*. 2009;41(1):125-9.
75. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 2004;119(7):941-53.
76. Klose RJ, Yan Q, Tothova Z, Yamane K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. The retinoblastoma binding protein RBP2 is an H3K4 demethylase. *Cell*. 2007;128(5):889-900.
77. Yang J, Huang J, Dasgupta M, Sears N, Miyagi M, Wang B, et al. Reversible methylation of promoter-bound STAT3 by histone-modifying enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(50):21499-504.
78. Xie Q, Hao Y, Tao L, Peng S, Rao C, Chen H, et al. Lysine methylation of FOXO3 regulates oxidative stress-induced neuronal cell death. *EMBO reports*. 2012;13(4):371-7.
79. Esteve PO, Chang Y, Samaranyake M, Upadhyay AK, Horton JR, Feehely GR, et al. A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human DNMT1 stability. *Nature structural & molecular biology*. 2011;18(1):42-8.
80. Wang D, Zhou J, Liu X, Lu D, Shen C, Du Y, et al. Methylation of SUV39H1 by SET7/9 results in heterochromatin relaxation and genome instability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(14):5516-21.
81. Carr SM, Munro S, Kessler B, Oppermann U, La Thangue NB. Interplay between lysine methylation and Cdk phosphorylation in growth control by the retinoblastoma protein. *The EMBO journal*. 2011;30(2):317-27.
82. Kouskouti A, Scheer E, Staub A, Tora L, Talianidis I. Gene-specific modulation of TAF10 function by SET9-mediated methylation. *Mol Cell*. 2004;14(2):175-82.
83. Pagans S, Kauder SE, Kaehleke K, Sakane N, Schroeder S, Dormeyer W, et al. The Cellular lysine methyltransferase Set7/9-KMT7 binds HIV-1 TAR RNA, monomethylates the viral transactivator Tat, and enhances HIV transcription. *Cell host & microbe*. 2010;7(3):234-44.
84. Liu X, Chen Z, Xu C, Leng X, Cao H, Ouyang G, et al. Repression of hypoxia-inducible factor alpha signaling by Set7-mediated methylation. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(10):5081-98.
85. Gaughan L, Stockley J, Wang N, McCracken SR, Treumann A, Armstrong K, et al. Regulation of the androgen receptor by SET9-mediated methylation. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(4):1266-79.

86. Kassner I, Andersson A, Fey M, Tomas M, Ferrando-May E, Hottiger MO. SET7/9-dependent methylation of ARTD1 at K508 stimulates poly-ADP-ribose formation after oxidative stress. *Open biology*. 2013;3(10):120173.
87. Fujimaki K, Ogihara T, Morris DL, Oda H, Iida H, Fujitani Y, et al. SET7/9 Enzyme Regulates Cytokine-induced Expression of Inducible Nitric-oxide Synthase through Methylation of Lysine 4 at Histone 3 in the Islet beta Cell. *J Biol Chem*. 2015;290(27):16607-18.
88. Okabe J, Orłowski C, Balcerczyk A, Tikellis C, Thomas MC, Cooper ME, et al. Distinguishing hyperglycemic changes by Set7 in vascular endothelial cells. *Circulation research*. 2012;110(8):1067-76.
89. Tao Y, Nepl RL, Huang ZP, Chen J, Tang RH, Cao R, et al. The histone methyltransferase Set7/9 promotes myoblast differentiation and myofibril assembly. *The Journal of cell biology*. 2011;194(4):551-65.
90. Chen J, Guo Y, Zeng W, Huang L, Pang Q, Nie L, et al. ER stress triggers MCP-1 expression through SET7/9-induced histone methylation in the kidneys of db/db mice. *American journal of physiology Renal physiology*. 2014;306(8):F916-25.
91. Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, et al. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes & development*. 2002;16(4):479-89.
92. Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Borchers C, Tempst P, et al. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell*. 2001;8(6):1207-17.
93. Kwon T, Chang JH, Kwak E, Lee CW, Joachimiak A, Kim YC, et al. Mechanism of histone lysine methyl transfer revealed by the structure of SET7/9-AdoMet. *The EMBO journal*. 2003;22(2):292-303.
94. He S, Owen DR, Jelinsky SA, Lin LL. Lysine Methyltransferase SETD7 (SET7/9) Regulates ROS Signaling through mitochondria and NFE2L2/ARE pathway. *Scientific reports*. 2015;5:14368.
95. Li Y, Reddy MA, Miao F, Shanmugam N, Yee JK, Hawkins D, et al. Role of the histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET7/9, in the regulation of NF-kappaB-dependent inflammatory genes. Relevance to diabetes and inflammation. *J Biol Chem*. 2008;283(39):26771-81.
96. Keating ST, Ziemann M, Okabe J, Khan AW, Balcerczyk A, El-Osta A. Deep sequencing reveals novel Set7 networks. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2014;71(22):4471-86.

97. Dhayalan A, Kudithipudi S, Rathert P, Jeltsch A. Specificity analysis-based identification of new methylation targets of the SET7/9 protein lysine methyltransferase. *Chemistry & biology*. 2011;18(1):111-20.
98. Castano J, Morera C, Sese B, Boue S, Bonet-Costa C, Marti M, et al. SETD7 Regulates the Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS one*. 2016;11(2):e0149502.
99. Guo HB, Guo H. Mechanism of histone methylation catalyzed by protein lysine methyltransferase SET7/9 and origin of product specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(21):8797-802.
100. Calnan DR, Webb AE, White JL, Stowe TR, Goswami T, Shi X, et al. Methylation by Set9 modulates FoxO3 stability and transcriptional activity. *Aging*. 2012;4(7):462-79.
101. Masatsugu T, Yamamoto K. Multiple lysine methylation of PCAF by Set9 methyltransferase. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;381(1):22-6.
102. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer*. 2013;12:86.
103. Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*. 1999;19(8):5785-99.
104. Perkins ND. Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29(12):1433-48.
105. Ea CK, Baltimore D. Regulation of NF-kappaB activity through lysine monomethylation of p65. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(45):18972-7.
106. Yang XD, Huang B, Li M, Lamb A, Kelleher NL, Chen LF. Negative regulation of NF-kappaB action by Set9-mediated lysine methylation of the RelA subunit. *The EMBO journal*. 2009;28(8):1055-66.
107. Lu T, Stark GR. NF-kappaB: Regulation by Methylation. *Cancer research*. 2015;75(18):3692-5.
108. Paneni F, Costantino S, Battista R, Castello L, Capretti G, Chiandotto S, et al. Adverse epigenetic signatures by histone methyltransferase Set7 contribute to vascular dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2015;8(1):150-8.
109. Paneni F, Volpe M, Luscher TF, Cosentino F. SIRT1, p66(Shc), and Set7/9 in vascular hyperglycemic memory: bringing all the strands together. *Diabetes*. 2013;62(6):1800-7.

110. Keating ST, El-Osta A. Transcriptional regulation by the Set7 lysine methyltransferase. *Epigenetics*. 2013;8(4):361-72.
111. Oudhoff MJ, Freeman SA, Couzens AL, Antignano F, Kuznetsova E, Min PH, et al. Control of the hippo pathway by Set7-dependent methylation of Yap. *Developmental cell*. 2013;26(2):188-94.
112. Cai J, Zhang N, Zheng Y, de Wilde RF, Maitra A, Pan D. The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes & development*. 2010;24(21):2383-8.
113. Shen C, Wang D, Liu X, Gu B, Du Y, Wei FZ, et al. SET7/9 regulates cancer cell proliferation by influencing beta-catenin stability. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2015;29(10):4313-23.
114. Oudhoff MJ, Braam MJ, Freeman SA, Wong D, Rattray DG, Wang J, et al. SETD7 Controls Intestinal Regeneration and Tumorigenesis by Regulating Wnt/beta-Catenin and Hippo/YAP Signaling. *Developmental cell*. 2016;37(1):47-57.
115. Kontaki H, Talianidis I. Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol Cell*. 2010;39(1):152-60.
116. Subramanian K, Jia D, Kapoor-Vazirani P, Powell DR, Collins RE, Sharma D, et al. Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Mol Cell*. 2008;30(3):336-47.
117. Montenegro MF, Sanchez-Del-Campo L, Gonzalez-Guerrero R, Martinez-Barba E, Pinero-Madrona A, Cabezas-Herrera J, et al. Tumor suppressor SET9 guides the epigenetic plasticity of breast cancer cells and serves as an early-stage biomarker for predicting metastasis. *Oncogene*. 2016;35(47):6143-52.
118. Song Y, Zhang J, Tian T, Fu X, Wang W, Li S, et al. SET7/9 inhibits oncogenic activities through regulation of Gli-1 expression in breast cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(7):9311-22.
119. Akiyama Y, Koda Y, Byeon SJ, Shimada S, Nishikawaji T, Sakamoto A, et al. Reduced expression of SET7/9, a histone mono-methyltransferase, is associated with gastric cancer progression. *Oncotarget*. 2016;7(4):3966-83.
120. Si W, Zhou J, Zhao Y, Zheng J, Cui L. SET7/9 promotes multiple malignant processes in breast cancer development via RUNX2 activation and is negatively regulated by TRIM21. *Cell Death Dis*. 2020;11(2):151.
121. Campaner S, Spreafico F, Burgold T, Doni M, Rosato U, Amati B, et al. The methyltransferase Set7/9 (Setd7) is dispensable for the p53-mediated DNA damage response in vivo. *Mol Cell*. 2011;43(4):681-8.

122. Tuano NK, Okabe J, Ziemann M, Cooper ME, El-Osta A. Set7 mediated interactions regulate transcriptional networks in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(19):9206-17.
123. Son MJ, Kim WK, Oh KJ, Park A, Lee da S, Han BS, et al. Methyltransferase and demethylase profiling studies during brown adipocyte differentiation. *BMB Rep.* 2016;49(7):388-93.
124. Mossel DM, Moganti K, Riabov V, Weiss C, Kopf S, Cordero J, et al. Epigenetic Regulation of S100A9 and S100A12 Expression in Monocyte-Macrophage System in Hyperglycemic Conditions. *Front Immunol.* 2020;11:1071.
125. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):562-73.
126. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):221-33.
127. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, et al. Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature.* 1994;370(6490):555-7.
128. Schonbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 beta by matrix metalloproteinases: a novel caspase-1-independent pathway of IL-1 beta processing. *J Immunol.* 1998;161(7):3340-6.
129. Back M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 2010;52(5):410-28.
130. Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, Meisel S, Xu XO, Chai NN, et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation.* 1999;99(24):3103-9.
131. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94(6):2493-503.
132. Newby AC. Do metalloproteinases destabilize vulnerable atherosclerotic plaques? *Curr Opin Lipidol.* 2006;17(5):556-61.
133. Johnson JL, Jenkins NP, Huang WC, Di Gregoli K, Sala-Newby GB, Scholtes VP, et al. Relationship of MMP-14 and TIMP-3 expression with macrophage activation and human atherosclerotic plaque vulnerability. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:276457.
134. Wagsater D, Zhu C, Bjorkegren J, Skogsberg J, Eriksson P. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(-/-)Apob(100/100) mouse. *Int J Mol Med.* 2011;28(2):247-53.

135. Di Gregoli K, George SJ, Jackson CL, Newby AC, Johnson JL. Differential effects of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 on atherosclerosis and monocyte/macrophage invasion. *Cardiovasc Res*. 2016;109(2):318-30.
136. Pelisek J, Deutsch L, Ansel A, Pongratz J, Stadlbauer T, Gebhard H, et al. Expression of a metalloproteinase family of ADAMTS in human vulnerable carotid lesions. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2017;18(1):10-8.
137. Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*. 2009;1(2):239-59.
138. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(10):726-34.
139. Kim J, Kim JY, Song KS, Lee YH, Seo JS, Jelinek J, et al. Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(1):72-80.
140. Baccarelli A, Tarantini L, Wright RO, Bollati V, Litonjua AA, Zanobetti A, et al. Repetitive element DNA methylation and circulating endothelial and inflammation markers in the VA normative aging study. *Epigenetics*. 2010;5(3):222-8.
141. Krishna SM, Trollope AF, Golledge J. The relevance of epigenetics to occlusive cerebral and peripheral arterial disease. *Clin Sci (Lond)*. 2015;128(9):537-58.
142. Greissel A, Culmes M, Napieralski R, Wagner E, Gebhard H, Schmitt M, et al. Alternation of histone and DNA methylation in human atherosclerotic carotid plaques. *Thrombosis and haemostasis*. 2015;114(2):390-402.
143. Nazarenko MS, Puzyrev VP, Lebedev IN, Frolov AV, Barbarash OL, Barbarash LS. [Methylation profiling of human atherosclerotic plaques]. *Mol Biol (Mosk)*. 2011;45(4):610-6.
144. Cao Q, Wang X, Jia L, Mondal AK, Diallo A, Hawkins GA, et al. Inhibiting DNA Methylation by 5-Aza-2'-deoxycytidine ameliorates atherosclerosis through suppressing macrophage inflammation. *Endocrinology*. 2014;155(12):4925-38.
145. Yu J, Qiu Y, Yang J, Bian S, Chen G, Deng M, et al. DNMT1-PPARgamma pathway in macrophages regulates chronic inflammation and atherosclerosis development in mice. *Scientific reports*. 2016;6:30053.
146. Hoeksema MA, de Winther MP. Epigenetic Regulation of Monocyte and Macrophage Function. *Antioxidants & redox signaling*. 2016;25(14):758-74.
147. Nanni L, Romualdi C, Maseri A, Lanfranchi G. Differential gene expression profiling in genetic and multifactorial cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41(6):934-48.

148. Anderson CL, Brown CJ. Epigenetic predisposition to expression of TIMP1 from the human inactive X chromosome. *BMC Genet.* 2005;6:48.
149. Yan C, Wang H, Toh Y, Boyd DD. Repression of 92-kDa type IV collagenase expression by MTA1 is mediated through direct interactions with the promoter via a mechanism, which is both dependent on and independent of histone deacetylation. *J Biol Chem.* 2003;278(4):2309-16.
150. Chernov AV, Strongin AY. Epigenetic regulation of matrix metalloproteinases and their collagen substrates in cancer. *Biomol Concepts.* 2011;2(3):135-47.
151. Couillard J, Demers M, Lavoie G, St-Pierre Y. The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression. *Biochemical and biophysical research communications.* 2006;342(4):1233-9.
152. Wilson VL, Smith RA, Ma S, Cutler RG. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. *J Biol Chem.* 1987;262(21):9948-51.
153. Van den Veyver IB. Genetic effects of methylation diets. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:255-82.
154. Heijmans BT, Tobi EW, Lumey LH, Slagboom PE. The epigenome: archive of the prenatal environment. *Epigenetics.* 2009;4(8):526-31.
155. Zhang W, Song M, Qu J, Liu GH. Epigenetic Modifications in Cardiovascular Aging and Diseases. *Circulation research.* 2018;123(7):773-86.
156. Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell.* 2014;159(6):1312-26.
157. van der Heijden C, Noz MP, Joosten LAB, Netea MG, Riksen NP, Keating ST. Epigenetics and Trained Immunity. *Antioxidants & redox signaling.* 2017.
158. Dunn J, Qiu H, Kim S, Jjingo D, Hoffman R, Kim CW, et al. Flow-dependent epigenetic DNA methylation regulates endothelial gene expression and atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2014;124(7):3187-99.
159. Breton CV, Park C, Siegmund K, Gauderman WJ, Whitfield-Maxwell L, Hodis HN, et al. NOS1 methylation and carotid artery intima-media thickness in children. *Circulation Cardiovascular genetics.* 2014;7(2):116-22.
160. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 2014;371(26):2488-98.

161. Li G, Peng J, Liu Y, Li X, Yang Q, Li Y, et al. Oxidized low-density lipoprotein inhibits THP-1-derived macrophage autophagy via TET2 down-regulation. *Lipids*. 2015;50(2):177-83.
162. Zhang Q, Zhao K, Shen Q, Han Y, Gu Y, Li X, et al. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6. *Nature*. 2015;525(7569):389-93.
163. Liu Y, Peng W, Qu K, Lin X, Zeng Z, Chen J, et al. TET2: A Novel Epigenetic Regulator and Potential Intervention Target for Atherosclerosis. *DNA Cell Biol*. 2018;37(6):517-23.
164. Yang Q, Li X, Li R, Peng J, Wang Z, Jiang Z, et al. Low Shear Stress Inhibited Endothelial Cell Autophagy Through TET2 Downregulation. *Ann Biomed Eng*. 2016;44(7):2218-27.
165. Liu R, Jin Y, Tang WH, Qin L, Zhang X, Tellides G, et al. Ten-eleven translocation-2 (TET2) is a master regulator of smooth muscle cell plasticity. *Circulation*. 2013;128(18):2047-57.
166. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, Polackal MN, Ostriker AC, Chakraborty R, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science*. 2017;355(6327):842-7.
167. Tough DF, Tak PP, Tarakhovsky A, Prinjha RK. Epigenetic drug discovery: breaking through the immune barrier. *Nature reviews Drug discovery*. 2016;15(12):835-53.
168. Oppi S, Luscher TF, Stein S. Mouse Models for Atherosclerosis Research-Which Is My Line? *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:46.
169. Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest*. 1994;93(5):1885-93.
170. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 1993;92(2):883-93.
171. Babaev VR, Patel MB, Semenkovich CF, Fazio S, Linton MF. Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem*. 2000;275(34):26293-9.
172. Green MR SJ. Analysis of DNA. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.

173. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*. 2012;13:134.
174. Pabinger S, Rodiger S, Kriegner A, Vierlinger K, Weinhausel A. A survey of tools for the analysis of quantitative PCR (qPCR) data. *Biomol Detect Quantif*. 2014;1(1):23-33.
175. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 1993;11(9):1026-30.
176. Holzapfel B, Wickert, L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit* 2007;37(2):120-6.
177. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
178. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
179. Wang H, La Russa M, Qi LS. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annu Rev Biochem*. 2016;85:227-64.
180. Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010;468(7320):67-71.
181. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-23.
182. Bak RO, Gomez-Ospina N, Porteus MH. Gene Editing on Center Stage. *Trends Genet*. 2018;34(8):600-11.
183. Eid A, Mahfouz MM. Genome editing: the road of CRISPR/Cas9 from bench to clinic. *Exp Mol Med*. 2016;48(10):e265.
184. Kim H, Kim M, Im SK, Fang S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res*. 2018;34(4):147-59.
185. Nikam RR, Gore KR. Journey of siRNA: Clinical Developments and Targeted Delivery. *Nucleic Acid Ther*. 2018;28(4):209-24.
186. McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(10):737-47.
187. Nishimasu H, Cong L, Yan WX, Ran FA, Zetsche B, Li Y, et al. Crystal Structure of *Staphylococcus aureus* Cas9. *Cell*. 2015;162(5):1113-26.

188. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(6):467-77.
189. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-21.
190. Haeussler M, Concordet JP. Genome Editing with CRISPR-Cas9: Can It Get Any Better? *J Genet Genomics.* 2016;43(5):239-50.
191. Charpentier E, Doudna JA. Biotechnology: Rewriting a genome. *Nature.* 2013;495(7439):50-1.
192. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys.* 2017;46:505-29.
193. Mojica FJM, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (Reading).* 2009;155(Pt 3):733-40.
194. Rodgers K, McVey M. Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks. *J Cell Physiol.* 2016;231(1):15-24.
195. Yue JJ, Hong CY, Wei P, Tsai YC, Lin CS. How to start your monocot CRISPR/Cas project: plasmid design, efficiency detection, and offspring analysis. *Rice (N Y).* 2020;13(1):9.
196. Rabinowitz JE, Samulski J. Adeno-associated virus expression systems for gene transfer. *Curr Opin Biotechnol.* 1998;9(5):470-5.
197. Grimm D, Lee JS, Wang L, Desai T, Akache B, Storm TA, et al. In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *J Virol.* 2008;82(12):5887-911.
198. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977;36(1):59-74.
199. Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li Y, Trombetta J, et al. In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol.* 2015;33(1):102-6.
200. Bohenzky RA, LeFebvre RB, Berns KI. Sequence and symmetry requirements within the internal palindromic sequences of the adeno-associated virus terminal repeat. *Virology.* 1988;166(2):316-27.

201. Samuelson JC, Zhu Z, Xu SY. The isolation of strand-specific nicking endonucleases from a randomized SapI expression library. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(12):3661-71.
202. Matsushita T, Elliger S, Elliger C, Podsakoff G, Villarreal L, Kurtzman GJ, et al. Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther.* 1998;5(7):938-45.
203. Jackson-Grusby L, Beard C, Possemato R, Tudor M, Fambrough D, Csankovszki G, et al. Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nature genetics.* 2001;27(1):31-9.
204. Chen T, Hevi S, Gay F, Tsujimoto N, He T, Zhang B, et al. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nature genetics.* 2007;39(3):391-6.
205. Zhao H, Bernardo MM, Osenkowski P, Sohail A, Pei D, Nagase H, et al. Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem.* 2004;279(10):8592-601.
206. Wang Y, Dubland JA, Allahverdian S, Asonye E, Sahin B, Jaw JE, et al. Smooth Muscle Cells Contribute the Majority of Foam Cells in ApoE (Apolipoprotein E)-Deficient Mouse Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019;39(5):876-87.
207. Venegas-Pino DE, Banko N, Khan MI, Shi Y, Werstuck GH. Quantitative analysis and characterization of atherosclerotic lesions in the murine aortic sinus. *J Vis Exp.* 2013(82):50933.
208. Fernandez-Garcia V, Gonzalez-Ramos S, Martin-Sanz P, Castrillo A, Bosca L. Contribution of Extramedullary Hematopoiesis to Atherosclerosis. The Spleen as a Neglected Hub of Inflammatory Cells. *Front Immunol.* 2020;11:586527.
209. Potteaux S, Ait-Oufella H, Mallat Z. Role of splenic monocytes in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2015;26(5):457-63.
210. Robbins CS, Chudnovskiy A, Rauch PJ, Figueiredo JL, Iwamoto Y, Gorbatov R, et al. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation.* 2012;125(2):364-74.
211. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science.* 2009;325(5940):612-6.
212. Cull AH, Snetsinger B, Buckstein R, Wells RA, Rauh MJ. Tet2 restrains inflammatory gene expression in macrophages. *Exp Hematol.* 2017;55:56-70 e13.

213. Hayes EM, Tsaousi A, Di Gregoli K, Jenkinson SR, Bond AR, Johnson JL, et al. Classical and Alternative Activation and Metalloproteinase Expression Occurs in Foam Cell Macrophages in Male and Female ApoE Null Mice in the Absence of T and B Lymphocytes. *Front Immunol.* 2014;5:537.
214. Head SR, Komori HK, LaMere SA, Whisenant T, Van Nieuwerburgh F, Salomon DR, et al. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques.* 2014;56(2):61-4, 6, 8, passim.
215. Newby AC. Metalloproteinase production from macrophages - a perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction. *Exp Physiol.* 2016;101(11):1327-37.
216. Schmidt K, Zhang Q, Tasdogan A, Petzold A, Dahl A, Arneith BM, et al. The H3K4 methyltransferase Setd1b is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis in mice. *Elife.* 2018;7.
217. Murphy AJ, Tall AR. Disordered haematopoiesis and athero-thrombosis. *Eur Heart J.* 2016;37(14):1113-21.
218. Lehnertz B, Rogalski JC, Schulze FM, Yi L, Lin S, Kast J, et al. p53-dependent transcription and tumor suppression are not affected in Set7/9-deficient mice. *Mol Cell.* 2011;43(4):673-80.
219. Apostolakis S, Vogiatzi K, Amanatidou V, Spandidos DA. Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2009;84(3):353-60.
220. Saeed S, Quintin J, Kerstens HH, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F, et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science.* 2014;345(6204):1251086.
221. Bekkering S, Quintin J, Joosten LA, van der Meer JW, Netea MG, Riksen NP. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(8):1731-8.
222. Keating ST, Groh L, van der Heijden C, Rodriguez H, Dos Santos JC, Fanucchi S, et al. The Set7 Lysine Methyltransferase Regulates Plasticity in Oxidative Phosphorylation Necessary for Trained Immunity Induced by beta-Glucan. *Cell Rep.* 2020;31(3):107548.
223. Hamidi T, Singh AK, Veland N, Vemulapalli V, Chen J, Hardikar S, et al. Identification of Rpl29 as a major substrate of the lysine methyltransferase Set7/9. *J Biol Chem.* 2018;293(33):12770-80.
224. Cui Y, Xu J, Cheng M, Liao X, Peng S. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools. *Interdiscip Sci.* 2018;10(2):455-65.

225. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013;154(6):1380-9.
226. Wyvekens N, Topkar VV, Khayter C, Joung JK, Tsai SQ. Dimeric CRISPR RNA-Guided FokI-dCas9 Nucleases Directed by Truncated gRNAs for Highly Specific Genome Editing. *Hum Gene Ther*. 2015;26(7):425-31.
227. Lips J, Kaina B. DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis*. 2001;22(4):579-85.
228. Schirmbeck R, Reimann J, Kochanek S, Kreppel F. The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multispecificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens. *Mol Ther*. 2008;16(9):1609-16.
229. Charlesworth CT, Deshpande PS, Dever DP, Camarena J, Lemgart VT, Cromer MK, et al. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nature medicine*. 2019;25(2):249-54.

## Appendix

### I Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
BMD	aus dem Knochenmark gewonnen ( <i>bone marrow derived</i> )
BMDM	aus dem Knochenmark gewonnene Makrophagen ( <i>bone marrow-derived macrophages</i> )
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
crRNA	CRISPR-RNA
CT	Schwellenwert in der qPCR ( <i>cycle threshold</i> )
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated proteins 9</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )

DNMT	DNA-Methyltransferase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
HDM	Histon-Demethylase
HFD	fettreiche Diät ( <i>high-fat diet</i> )
HK	<i>housekeeping</i>
HMT	Histon-Methyltransferase
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
i.d.R.	in der Regel
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
KO	<i>knock-out</i>
Ldlr	Low-Density-Lipoprotein Rezeptor
LPS	Lipopolysaccharid
LSD	<i>Lysine-specific Demethylase</i>
min.	Minuten
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic acid</i> )
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor</i> $\kappa$ B
NT	unbehandelt ( <i>non-treated</i> )
oxLDL	oxidiertes Low-Density-Lipoprotein
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic acid</i> )
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>Rotations per minute</i> )

RT	Raumtemperatur
s.Abb.	siehe Abbildung
sec./Sek.	Sekunden
sgRNA	<i>single-guide RNA</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
sog.	sogenannte/s
SMCs	glatte Muskelzellen ( <i>smooth muscle cells</i> )
TET	<i>Ten-eleven Translocation</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Matrix-Metalloproteases</i>
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrosefaktor $\alpha$
tracrRNA	<i>Trans-activating crRNA</i>
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

## II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl veröffentlichter Publikationen zur Suchanfrage ' atherosclerosis ' auf pubmed pro Jahr, Stand: Oktober 2020.....	1
Abbildung 2: Stadienverlauf der Atherosklerose.....	4
Abbildung 3: Übersicht der wichtigsten chromatinverändernden epigenetischen Mechanismen. ....	5
Abbildung 4: Auswahl relevanter SET7 Mechanismen – zusammenfassende Grafik.....	13
Abbildung 5: Makrophagenkultur Tag 7 .....	29
Abbildung 6: Schritte qPCR Programm .....	38
Abbildung 7: Zugehöriger Abschnitt der SET7-Gensequenz für sgRNA 1, 2 und 3.....	40
Abbildung 8: Zwischenschritt Plasmidsequenzierung (exemplarisch für sgRNA 1).....	44
Abbildung 9: Standardkurve zur AAV Titer Berechnung .....	46
Abbildung 10: Gelelektrophorese der PCR Produkte zu den verwendeten epigenetischen Primern in BMDM .....	49
Abbildung 11: Veränderte mRNA-Expression der Histon-Methyltransferasen und -Demethylasen nach Stimulation. ....	50
Abbildung 12: Veränderte mRNA-Expression der DNA-Methyltransferasen bzw. -Demethylasen nach Stimulation .....	51
Abbildung 13: Zeitkurve der mRNA-Expression von SET7 nach Stimulation mit TNF $\alpha$ . ....	52
Abbildung 14: Zeitkurve der mRNA-Expression von DNMT1 sowie der Positivkontrolle IL-1 $\beta$ nach Stimulation mit TNF $\alpha$ . ....	53
Abbildung 15: Gelelektrophorese der PCR-Produkte zu den verwendeten MMP- und TIMP-Primern in BMDM .....	54
Abbildung 16: Veränderte mRNA-Expression von MMP2, MMP9 und MMP14 nach Stimulation.....	55
Abbildung 17: Veränderte mRNA-Expression von TIMP1 und TIMP2 nach Stimulation.....	56

Abbildung 18: Übersicht: Vergleich der mRNA-Expression der MMPs und TIMPs zwischen stimulierten und unstimulierten BMDM .....	57
Abbildung 19: Veränderte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ sowie NF $\kappa$ B nach Stimulation.....	58
Abbildung 20: Expression epigenetischer Enzyme nach Stimulation in SMCs .....	59
Abbildung 21: Expression epigenetischer Enzyme in Zellsuspensionen aus der Aorta von Ldlr <sup>-/-</sup> -Mäusen nach HFD im Vergleich zu diätfreien Kontrollen. ....	61
Abbildung 22: Expression epigenetischer Enzyme in Zellsuspensionen aus der Aortenwurzel von Ldlr <sup>-/-</sup> -Mäusen nach HFD im Vergleich zu diätfreien Kontrollen .....	63
Abbildung 23: Expression epigenetischer Enzyme in Zellsuspensionen aus der Milz von Ldlr <sup>-/-</sup> -Mäusen nach HFD im Vergleich zu diätfreien Kontrollen. ....	64
Abbildung 24: Verringerte mRNA-Expression von SET1 in Milz-Zellsuspensionen von Ldlr <sup>-/-</sup> -Mäusen nach HFD im Vergleich zu diätfreien Kontrollen .....	65
Abbildung 25: Schema zur Sequenzierung der sgRNA-transduzierten Zellen.....	66
Abbildung 26: Gelelektrophorese der PCR-Produkte für SET7 aus der genomischen DNA transduzierter Cas9 SMCs .....	67
Abbildung 27: Sequenzierung genomischer DNA von mit sgRNA 1 transduzierten Cas9 SMCs .....	68
Abbildung 28: Sequenzierung genomischer DNA von mit sgRNA 3 transduzierten Cas9 SMCs .....	69
Abbildung 29: Verminderte SET7 mRNA Expression nach CRISPR/Cas9 vermitteltem Gen-KO. ....	70

### III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Enzyme und Zytokine .....	18
Tabelle 2: cDNA Synthese: Schritte Thermocycler .....	33
Tabelle 3: Polymerasekettenreaktion – Mengenangaben und Schritte Thermocycler .....	34
Tabelle 4: qPCR: Substanzen und Mengenangaben .....	37
Tabelle 5: Sequenzen der designten sgRNA Oligonukleotide .....	41
Tabelle 6: Einbau der sgRNA 1, 2 und 3 in das PX552 Plasmid .....	42
Tabelle 7: Zusammenfassung der Effekte einzelner relevanter Stimulationen auf die mRNA-Expression untersuchter epigenetischer Enzyme, MMPs, TIMPs, für IL1- $\beta$ , TNF $\alpha$ und NF $\kappa$ B in BMDM .....	75

## **IV Danksagung**

An vorrangiger Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in ihrer Forschungsgruppe anfertigen zu dürfen, und für das große Vertrauen, das mir hierbei stets entgegengebracht wurde, bedanken. Dabei hatte ich nicht nur die Möglichkeit, mir praktischen Fähigkeiten in den unterschiedlichsten Methoden anzueignen, auch konnte ich einen tieferen Einblick in einen spannenden und hochrelevanten Bereich der Wissenschaft bekommen.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Sandra Vorlovà für ihre große Unterstützung und Hilfe. Danke für ein immer offenes Ohr und das Beantworten all meiner endlosen Fragen. Vielen Dank auch für das mühevoll Korrekturlesen meiner Arbeit.

Dank gebührt ebenfalls der 'Graduate School of Life Sciences' Würzburg für die Förderung und Aufnahme in ihr strukturiertes Promovierenden-Programm.

Ein spezieller Dank gehört Yvonne Kerstan, die mir mit unerschöpflicher Geduld ab meiner ersten Stunde im Labor zur Seite stand. Vielen Dank auch an Dr. Jesús Gil Pulido, Petra Hönig-Liedl, Doris Kitzberger und Melanie Rösch für die Hilfe und Unterstützung im Labor. Schließlich möchte ich es nicht versäumen, allen Mitarbeitern des Labors für ihre Unterstützung zu danken, sei es durch technischen Beistand, Ratschläge oder das kollegiale Klima, sodass mir meine Zeit dort in sehr positiver Erinnerung bleiben wird.

Einen großen Dank nicht zuletzt an meine Familie und Freunde für ihre uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung.



## Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled ‘Analysis of the expression of SET7 and other epigenetic enzymes in vitro and vivo in a model of atherosclerosis’ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Untersuchung der Expression von SET7 und anderer epigenetischer Enzyme in vitro und vivo im Modell der Atherosklerose“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

