



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

**Aus dem Institut für Physiologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktorin: Prof. Dr. Kristina Kusche**

# Einfluss von Piezo1 auf die endotheliale Nanomechanik und vaskuläre Entzündungen

## **Inauguraldissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

Vorgelegt von  
**Johanna-Theres Borutta**  
aus Lübeck

Lübeck, 2026

**1. Berichtstatter/in:** Prof. Dr. Kristina Kusche

**2. Berichtstatter/in:** Prof. Dr. Enrico Leipold

**Tag der Mündlichen Prüfung:** 20.05.2026

**Zum Druck genehmigt:** 26.05.2026

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
1. Einleitung.....	4
1.1    Vaskuläres Endothel.....	4
1.1.1 Endotheliale Nanomechanik und das <i>Mechanosignaling</i> .....	6
1.1.1.1 Die endotheliale Glykokalyx (eGC) .....	6
1.1.1.2 Zellkortex .....	8
1.1.1.3 Mechanik und Funktion.....	9
1.1.2 Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) auf die Gefäßfunktion .....	13
1.1.3 Mechanosensitive Ionenkanäle in Endothelzellen.....	17
1.1.4 Piezo Ionenkanäle-Familie.....	18
1.1.4.1 Aktivierung von Piezo1 .....	20
1.1.4.2 Piezo1- <i>Signaling</i> .....	22
1.2    Vaskuläre Entzündungen .....	23
1.2.1 Vorarbeiten zum Einfluss von Piezo1 auf die endotheliale Nanomechanik.....	25
1.3    Zielsetzung .....	27
2. Materialien und Methoden .....	29
2.1    Materialien.....	29
2.1.1 Verbrauchsmaterialien .....	29
2.1.2 Chemikalien .....	30
2.1.3 Laborgeräte.....	33
2.1.4 Kits .....	34
2.1.5 Zelllinien.....	35
2.1.6 Primer .....	36
2.1.7 Software.....	37
2.2    Methoden .....	38

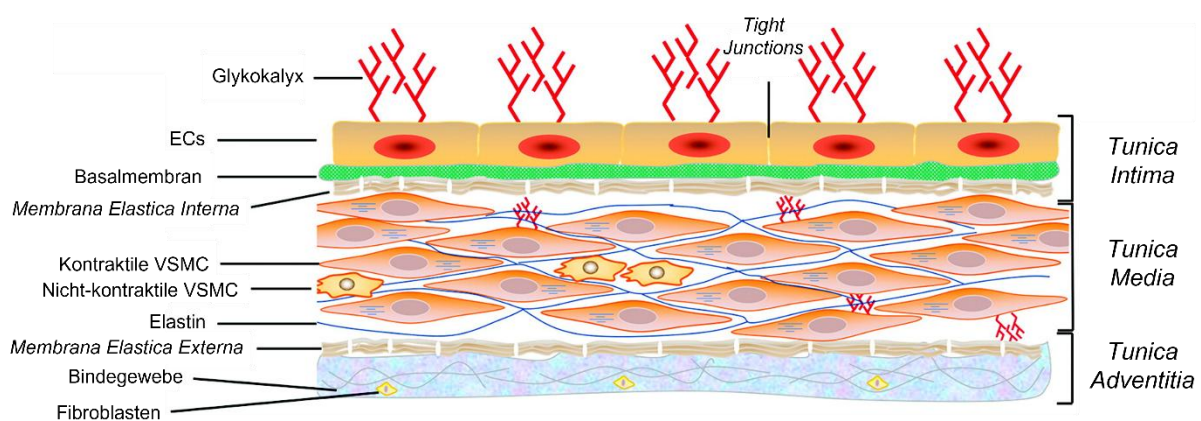
2.2.1 Zellkultur .....	38
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	39
2.2.2.1 CRISPR-Cas9.....	39
2.2.2.2 Western Blot .....	44
2.2.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion - qPCR .....	45
2.2.2.4 Syndecan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA .....	47
2.2.2.5 Neutrophilen-Assay.....	49
2.2.2.6 Rho GTPase Aktivität - GLISA.....	50
2.2.2.7 <i>Ex-vivo</i> Aorten-Präparation für AFM-Messungen.....	51
2.2.3 Rasterkraftmikroskopie ( <i>Atomic Force Microscopy</i> ).....	52
2.2.4 Quantifizierung von Stickstoffmonoxid .....	55
2.2.5 Statistische Analyse .....	56
3. Ergebnisse.....	58
3.1 Quantifizierung des Piezo1-Knockouts durch CRISPR-Cas9.....	58
3.2 Partieller Piezo1-Knockout führt zur Schädigung der eGC.....	61
3.3 Piezo1 Aktivierung verringert die Immunzelladhäsion .....	64
3.4 Piezo1 Aktivierung verringert die Rho GTPase Aktivität.....	65
3.5 Piezo1 Aktivierung wirkt sich auf die NO-Konzentration aus.....	67
3.6 Piezo1 Effekte in <i>ex vivo</i> Mausearten .....	69
4. Diskussion .....	71
4.1 Quantifizierung CRISPR-Cas9 – partieller Piezo1 Knockout.....	71
4.2 Piezo1 zeigt vasoprotektive und antiinflammatorische Eigenschaften .....	73
4.3 Die Aktivität von Piezo1 wird durch kleine GTPasen reguliert.....	74
4.4 Die Aktivierung von Piezo1 stimuliert die NO Bioverfügbarkeit .....	75
4.5 Piezo1 Aktivierung steigert die eGC-Höhe .....	76
4.6 Bedeutung von Piezo1 bei vaskulären Entzündungen .....	79
5. Zusammenfassung .....	82
6. Summary .....	85

7. Abkürzungsverzeichnis.....	88
8. Abbildungsverzeichnis.....	96
9. Tabellenverzeichnis.....	97
10. Literaturverzeichnis.....	98
11. Anhang.....	116
12. Danksagung.....	118

# 1. Einleitung

## 1.1 Vaskuläres Endothel

Das vaskuläre Endothel ist eine Zellschicht, welche das Innere von Lymph- und Blutgefäßen wie Arterien, Kapillaren und Venen auskleidet (Vanhoutte et al. 2017, Krüger-Genge et al. 2019). Das Endothel besteht aus einer Einzelschicht von Endothelzellen (ECs), welche über *adherens junctions*, *tight junctions* und *gap junctions* verfügen, die eine zentrale Rolle bei der Barriere- und Zellkommunikationsfunktion übernehmen (Wallez und Huber 2008). Unterhalb der Einzelschicht befindet sich die Basalmembran und die *Membrana Elastica Interna*. Diese Schichten bilden gemeinsam die *Tunica Intima* (Abbildung 1). Die Basalmembran enthält verschiedene Moleküle wie Kollagen, Laminin, Kollagen und Perlecan. Die *Tunica Media* setzt sich aus kontraktiven und nicht-kontraktiven vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) sowie Elastin zusammen. Darunter befindet sich die *Tunica Adventitia*, welche vor allem Fibroblasten enthält. Die Ausprägung der Schichten ist dabei von der Lokalisation und der Funktion des Gewebes abhängig (Bkaily et al. 2021, Józkwiaak et al. 2025).



**Abbildung 1: Aufbau der Gefäßwand.** Die innerste Schicht wird durch Endothelzellen (ECs), Basalmembran und *Membrana Elastica Interna* gebildet, welche als *Tunica Intima* bezeichnet wird. Darunter sind vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC) und Elastin lokalisiert. Sie bilden zusammen die *Tunica Media*. Die äußerste Schicht, die *Tunica Adventitia*, besteht aus der *Membrana Elastica Externa* und Bindegewebe (Verändert nach Bkaily et al. 2021).

Die Morphologie von Endothelzellen variiert je nach Art des Blutgefäßes. Während Endothelzellen in Arterien und Arteriolen eine spindelförmige Form annehmen, weisen Endothelzellen in Venen und Kapillaren eine abgerundete Form auf (Hennigs et al. 2021, Pluta et al. 2025). Aufgrund der Lokalisation als innerste Zellschicht der Blutgefäße sind Endothelzellen kontinuierlich mechanischen und biochemischen Kräften ausgesetzt. Sie fungieren als hochentwickelter Sensor und *Transducer*-Komplex und müssen in der Lage sein dynamisch auf sich ändernde Umweltbedingungen reagieren zu können, um eine ordnungsgemäße Funktion des Endothels zu gewährleisten. ECs formen eine Barriere und kontrollieren die Permeabilität zwischen dem Blut und dem umliegenden Gewebe (Yuan und Rigor 2010). Darüber hinaus regulieren ECs den peripheren Blutdruck, da sie vasoaktive Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin-1 produzieren (Alonso und Radomski 2003, Vanhoutte et al. 2017). ECs werden daher auch eine Funktion bei der Regulation von Blutflussgeschwindigkeit und -verteilung zugeschrieben. Des Weiteren sind sie essenziell für die Angiogenese. Auch bei der Blutgerinnung spielt das Endothel eine entscheidende Rolle. So stellen ECs bei Gefäßverletzungen die Sekretion von Gerinnungshemmern ein und sezernieren stattdessen den *von-Willebrand-Faktor* (VWF), wodurch die sekundäre Blutgerinnung eingeleitet wird (Cines et al. 1998, McCarron et al. 2017). Durch die Beteiligung von Endothelzellen an diesen zahlreichen Mechanismen zeigt sich ihre bedeutende Rolle in einem gesunden und intakten vaskulären System. An der Regulierung dieser Mechanismen sind verschiedene Komponenten des Endothels von entscheidender Bedeutung. Die endotheliale Glykokalyx (eGC) dient als mechanischer Sensor und ist sowohl mit mechanosensitive Ionenkanäle als auch den Zellkortex geknüpft. Zusammen bilden sie ein hochkomplexes System aus Sensoren und *Transducern* und sind entscheidend am Prozess des Mechanosignaling beteiligt (Fels und Kusche-Vihrog 2020).

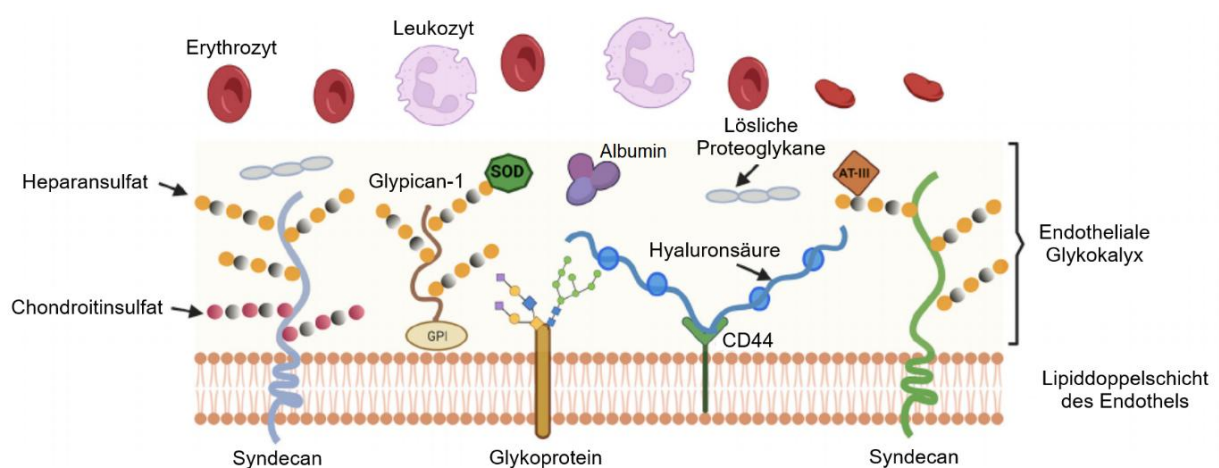
## 1.1.1 Endotheliale Nanomechanik und das *Mechanosignaling*

### 1.1.1.1 Die endotheliale Glykokalyx (eGC)

Das *Mechanosignaling* des Endothels beschreibt einen Prozess, bei dem die Schubspannung in den Blutgefäßen in ein biochemisches Signal umgewandelt wird (Chatterjee et al. 2015). An der Transduktion sind verschiedene Komponenten beteiligt. Dazu zählt die oberste Schicht des Endothels, die endotheliale Glykokalyx (eGC). Eine intakte eGC weist eine Höhe von 0,2 – 0,5 µm in Kapillaren und 2-3 µm in kleinen Arterien auf (van den Berg et al. 2003, van Haaren et al. 2003). Auch die Zusammensetzung und Dicke der eGC variiert in Abhängigkeit vom Gefäßbau, um optimal an die Umgebung angepasst zu sein (Richter 2019). So weist die eGC beispielsweise in den Kapillaren des Gehirns eine stärker ausgeprägte eGC auf, da sie an der Aufrechterhaltung der Blut-Hirnschranke beteiligt ist, als die eGC in Kapillaren in der Lunge. Dort findet sich eine dünne eGC, da der Gasaustausch zwischen Alveolen und Lungenkreislauf erleichtert werden soll (Suzuki et al. 2022). Die eGC im Herz hingegen ist durch eine hohe Glypican-1 Expression gekennzeichnet. Dies sorgt für eine robuste Mechanosensorik bei Schubspannung und einer erhöhten NO-Produktion, um schnellstmöglich auf Blutdruckveränderungen reagieren zu können (Suzuki et al. 2023).

Die eGC ist an vielen wichtigen Prozessen wie der Regulierung der Gefäßpermeabilität, Aufrechterhaltung eines gleichmäßigen Blutflusses, Mechanotransduktion, Schutz vor oxidativem Stress, der Blutgerinnung durch die Bindung von Antithrombin III (AT-III) an die eGC sowie der Immunzelladhäsion beteiligt (Florian et al. 2003, Pober und Sessa 2007, Bansch et al. 2011, Alphonsus und Rodseth 2014, Kolářová et al. 2014, Proudfoot et al. 2017, Suzuki et al. 2023). Wie in Abbildung 2 dargestellt, ist die eGC aus membrangebundenen, kohlenhydratreichen Molekülen wie Glykoproteinen und Proteoglykanen aufgebaut (Reitsma et al. 2007, Kaur und Harris 2023). Während Glykoproteine durch Sialinsäure charakterisiert sind, zeichnen sich Proteoglykane durch unverzweigte Glykosaminoglykane, wie Heparansulfat, Chondroitinsulfat und Hyaluronsäure, aus (Tkachenko et al. 2005, Sarrazin et al. 2011, Cosgun et al. 2020). Durch den hohen Anteil an Heparansulfat, Hyaluronsäure und Sialinsäure ergibt sich eine stark negativ geladene eGC. Dieser

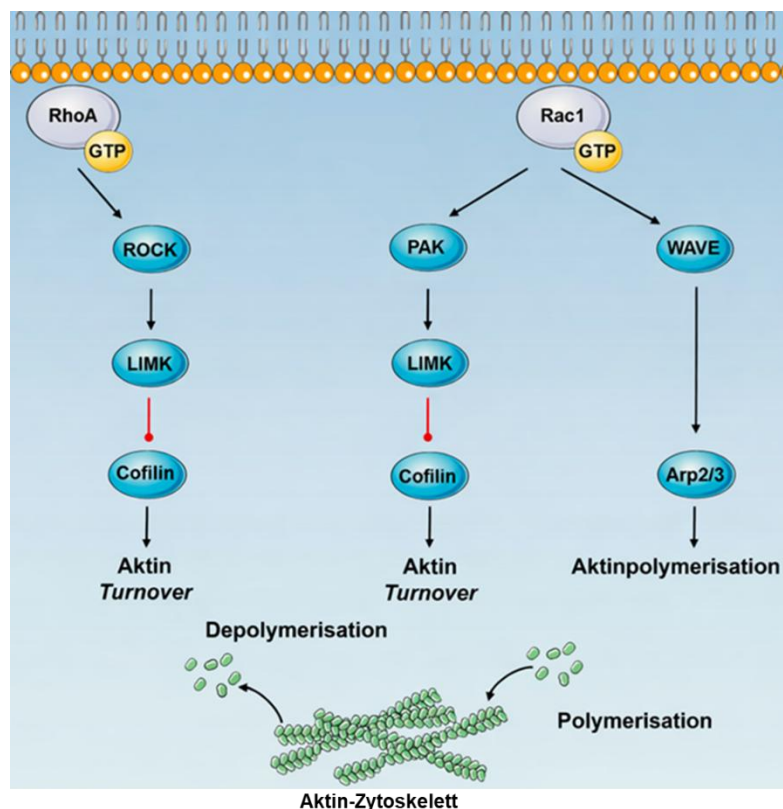
Umstand sorgt dafür, dass Blutzellen und Plasmaproteine, die ebenfalls negativ geladen sind, nicht adhären können und bildet somit eine protektive Barriere (Constantinescu et al. 2003). Die Höhe der eGC ist entscheidend für diese Schutzfunktion. Zum einen verhindert eine hohe eGC die Adhäsion von Immunzellen an der Gefäßwand, zum anderen sorgt sie für eine Permeabilitätsbarriere, wodurch Flüssigkeiten und Moleküle kontrolliert aus den Blutgefäßen in das umliegende Gewebe gelangen (van den Berg et al. 2003, Lipowsky 2012). Die eGC ist über das Transmembran-Kernprotein Syndecan, zu dessen Transmembranfamilie Syndecan-1-4 zählen, im Aktin-Zytoskelett verankert. Sie sind mechanisch miteinander gekoppelt, was der Signalweiterleitung von extra- nach intrazellulär dient (Tkachenk et al. 2005, Richter 2019, Li und Wang 2021).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der endothelialen Glykokalyx (eGC).** Die eGC dient als Schutzbarriere für ECs. Sie besteht aus Proteoglykanen wie Syndecan und Glypican-1, welche verschiedene Glykosaminoglykane wie Heparansulfat und Hyaluronsäure gebunden haben. Die Bindung von Antithrombin III (AT-III) an die eGC inhibiert die Blutgerinnung. Die Superoxid-Dismutase (SOD) bietet durch die Bindung an Heparansulfat Schutz vor oxidativem Stress (Verändert nach Kaur und Harris 2023).

### 1.1.1.2 Zellkortex

Eine weitere Komponente innerhalb des *Mechanosignaling* befindet sich direkt unterhalb der Plasmamembran von Endothelzellen, der Zellkortex. Der Zellkortex ist eine ca. 50-150 nm dynamische Schicht, welche in Kooperation mit der eGC mechanische Kräfte innerhalb des Blutstroms wahrnimmt und auf sich ändernde Umgebungsbedingungen reagiert. Er setzt sich primär aus Aktin sowie Aktin-bindenden Linker-Proteinen zusammen und wird durch das Motorprotein Myosin II vernetzt. Durch die Polymerisation von globulärem Aktin (G-Aktin) zu filamentösem Aktin (F-Aktin) und umgekehrt, kann der Kortex dynamisch auf Veränderungen im Blutfluss reagieren (Dominguez und Homes 2011, Cosgun et al. 2020). Durch den Polymerisierungszustand des Aktins wird die mechanische Steifigkeit des Zellkortex bestimmt. Polymerisiertes Aktin ist mit einem steifen Zellkortex assoziiert, während depolymerisiertes Aktin ein Merkmal eines weichen Zellkortex darstellt (Kasas et al. 2005, Fels et al. 2014).



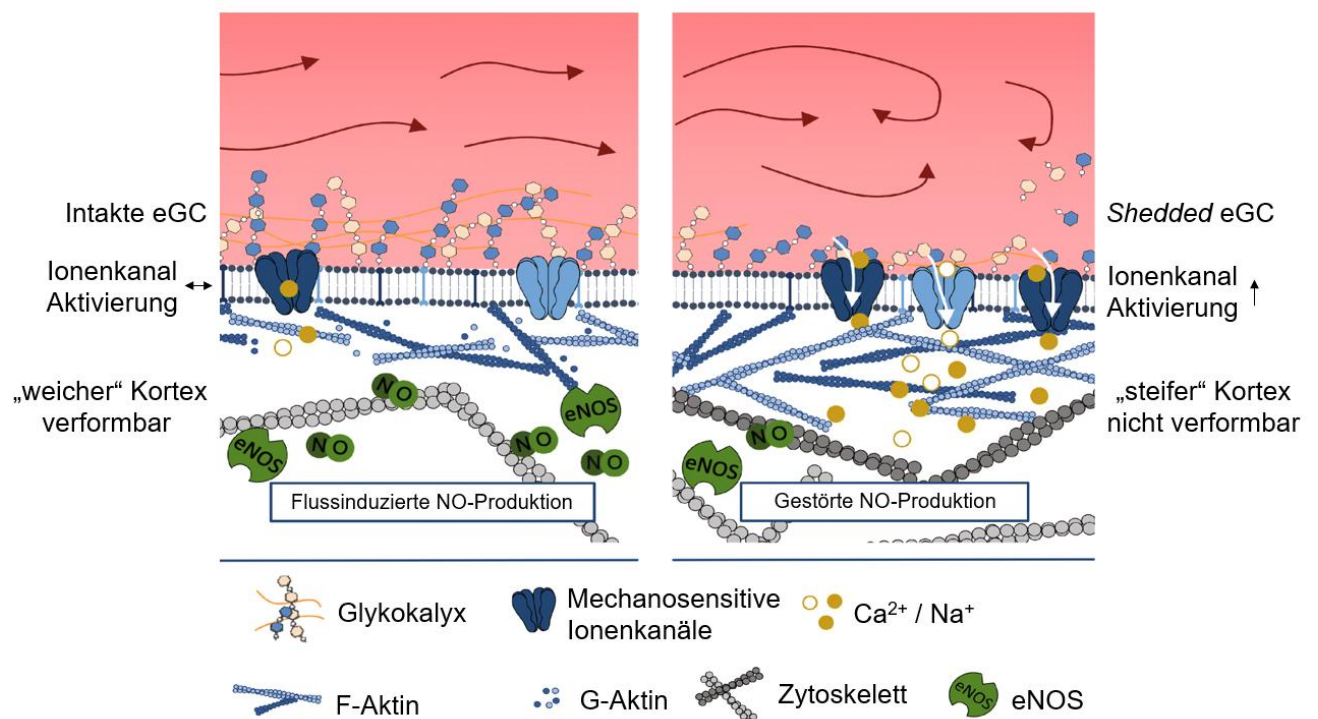
**Abbildung 3: RhoA und Rac1 Signalweg.** Aktiviertes Rac1 bindet den WAVE-Komplex (*Wiskott–Aldrich syndrome protein*) und stimuliert dadurch Arp2/3. Dies führt zur Aktinpolymerisation. Aktiviertes RhoA aktiviert die Rho-Kinase (ROCK), wodurch die LIM-Kinase aktiviert wird. Dies bewirkt eine Inhibition des Cofilin und damit einen Aktin *Turnover* (verändert nach Møller et al. 2019).

Die Steuerung des Aktingerüsts erfolgt über verschiedene Mechanismen. Eine zentrale Rolle spielen dabei die kleinen GTPasen RhoA und Rac1, deren Signalweg in Abbildung 3 dargestellt ist. Rac1 stimuliert Arp2/3 durch die Bindung des *WAVE regulatory complex* (*Wiskott–Aldrich syndrome protein*), wodurch die Filamentbildung durch Cortaktin induziert und das Aktingerüst stabilisiert wird. RhoA aktiviert Rho-Kinase (ROCK), welche wiederum die LIM-Kinase (LIMK) aktiviert und zur Inhibition des Aktin-depolymerisierenden Faktor Cofilin führt. Dies hat zur Folge, dass Stressfasern gebildet werden (Ohashi et al. 2000, dos Remedios et al. 2003, Fels et al. 2014, Chen et al. 2017). Sowohl die Inhibierung von RhoA als auch Rac1 induzieren einen weicheren endothelialen Kortex (Fels et al. 2025). Eine erhöhte Aktinpolymerisation, welche durch kleine GTPasen vermittelt werden, führt zu einem steifen Zellkortex, verringert die eNOS-Aktivität und bewirkt damit eine eingeschränkte Endothelfunktion. Während vermehrtes F-Aktin mit einer verringerten eNOS-Aktivität assoziiert ist, zeigt sich eine deutlich höhere eNOS-Aktivität bei vermehrten G-Aktin (Su et al. 2003, Jaffe und Hall 2005, Prasain und Stevens 2009, Fels et al. 2012). Ursächlich dafür ist die Bindung der eNOS an G-Aktin, wodurch die Phosphorylierung der eNOS gefördert wird und somit die NO-Produktion verstärkt wird (Villadangos und Serrador 2024). Polymerisiertes Aktin ist hingegen mit einer Abnahme der eNOS-Aktivität assoziiert, wodurch die NO-Produktion verringert wird (Su et al. 2003).

### **1.1.1.3 Mechanik und Funktion**

Die Fähigkeit von ECs, die Elastizität und Funktion verschiedener Kompartimente, wie eGC, Zellkortex, Zytoplasma und Zellkern, anzupassen, wird als Zellmechanik bezeichnet (Fels et al. 2014). Für die ordnungsgemäße Funktion des Endothels ist dies unerlässlich, da sich die endotheliale Nanomechanik flexibel an sich ändernde Umgebungsbedingungen anpassen muss (Cosgun et al. 2020). Veränderungen der endothelialen Nanomechanik beeinflussen unmittelbar Funktion der Zelloberfläche und damit das Verhalten der ganzen Zelle (Fels et al. 2014). Diese Änderungen in der Struktur von ECs können mit endothelialer Dysfunktion und vaskulären Entzündungen assoziiert sein (Fels and Kusche-Vihrog 2017). Zum Beispiel trägt eine anhaltende Versteifung des Endothels zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion bei. Diese wurde kürzlich als *stiff endothelial cell syndrome* (SECS) (Lang 2011).

Damit die Rolle der Zellmechanik und ihr Einfluss auf physiologische Abläufe präzise erfasst werden kann, ist es erforderlich, dass die molekularen Grundlagen der nanomechanischen Eigenschaften ermittelt und deren Wirkung auf zelluläre Signalprozesse charakterisiert werden (Fels et al. 2014). Die Zusammenhänge zwischen eGC-Höhe und Kortex-Steifigkeit, welche als endotheliale Nanomechanik zusammengefasst werden, sind in Abbildung 4 dargestellt. Die mechanischen Eigenschaften von ECs werden dabei von Ionenkanälen moduliert (Fels und Kusche Vihrog 2020). Durch die funktionelle Kopplung der eGC und des Zellkortex über Syndecan, führt eine Depolymerisation des kortikalen Aktin-Zytoskeletts zu einer Höhenzunahme der eGC, was charakteristisch für ein gesundes Endothel ist (Cosgun et al. 2020). Die Höhe der eGC ist für die Funktion des Endothels unerlässlich, da sie als Barriere zwischen Blutstrom und Gewebe agiert und somit für die Gefäßintegrität sorgt (Milusev et al. 2022).



**Abbildung 4: Modell der endothelialen Signaltransduktion.** Ein gesundes Endothel ist durch eine intakte eGC und einen weichen Kortex gekennzeichnet, welcher auf Veränderungen im Blut mit einer flussinduzierten NO-Produktion reagieren kann. Pathophysiologische Veränderungen führen zu einer *shedded* eGC und einem steifen Kortex sowie einem vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^{+}$  Einstrom. Daraus resultiert eine gestörte NO-Produktion (Verändert nach Fels und Kusche-Vihrog 2020).

Eine vermehrte Aktinpolymerisation des Kortex bedingt hingegen eine verringerte eGC-Höhe, eine erhöhte eGC-Steifigkeit und einen erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$  Einstrom (Oberleithner et al. 2011, Fels und Kusche-Vihrog 2020). Durch die Versteifung des Zellkortex wird die Verformbarkeit der Plasmamembran deutlich eingeschränkt und verhindert dadurch die Aktivierung der eNOS. Dies führt zu einer Reduzierung der NO-Freisetzung und damit zu einer eingeschränkten Vasodilatation (Fels et al. 2010). Yen et al. waren außerdem in der Lage eine Beeinträchtigung der flussinduzierten NO-Produktion durch die enzymatische Entfernung der eGC nachzuweisen (Yen et al. 2015).

Eine Schädigung der eGC kann unterschiedliche Ausprägungen annehmen. Diese werden als *shedded* oder *collapsed* bezeichnet (Cosgun et al. 2020). Beide Formen sind ein Charakteristikum für eine endotheliale Dysfunktion und vaskuläre Inflammation. Die Schädigungen der eGC werden dabei durch verschiedene Faktoren verursacht. Zum Beispiel beeinträchtigt ein erhöhter  $\text{Na}^+$ -Spiegel im Blutplasma die eGC und induziert die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Schierke et al. 2017). Eine reduzierte funktionelle Höhe der eGC führt zum Verlust ihrer Barrierefunktion, wodurch Flüssigkeit und Makromoleküle ins Gewebe eindringen und dort Gewebeödeme verursachen (Iba und Levy 2019, Patterson et al. 2022). Der Abbau der eGC hat auch zur Folge, dass Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 freigelegt werden, wodurch Immunzellen verstärkt adhäreren (Qu et al. 2021). Beispielsweise gelangen Neutrophile so über den Blutstrom verstärkt an den Ort der Inflammation. Ihr Zielort wird durch verschiedene Chemokinrezeptoren wie Leukotrien B<sub>4</sub>, Komplementfaktoren wie C5a und N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin erreicht. Am Bestimmungsort angelangt, sorgen exprimierte Adhäsionsrezeptoren der  $\beta$ 2- und  $\beta$ 1-Familie für das Rollen der Neutrophilen entlang des Endothels und verlangsamen sie dadurch. Des Weiteren sind L-Selektine und Liganden für P- und E-Selektine sowie ICAM-1 an diesem Prozess beteiligt. Nachdem die Neutrophilen gestoppt wurden, können diese durch das Endothel migrieren. Über Chemotaxis gelangen diese an den Ort der Entzündung, wo es zur Freisetzung von Proteasen und ROS kommt, sowie zur Auslösung der NETose (Ley et al. 2018).

Schädigungen der eGC sind mit diversen systemischen Erkrankungen wie Atherosklerose (Mitra et al. 2017), Sepsis (Fernández-Sarmiento et al. 2020), Diabetes mellitus (Dogné et al. 2018), Hypertension und Lungenödem (Collins et al. 2013) und

Krebs (Buffone und Weaver 2020) assoziiert. Ein wichtiger Mediator, der die eGC-Höhe reduziert und außerdem die eGC-Steifigkeit erhöht (Wiesinger et al. 2013), ist das Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ), welcher eine zentrale Rolle innerhalb von Entzündungsreaktionen spielt. Die Bindung an seinen Rezeptor (TNFR1) aktiviert sowohl den NF- $\kappa$ B-Signalweg als auch den MAPK-Signalweg und fördert dadurch Entzündungsreaktionen (van Loo und Bertrand 2023). Unter anderem fördert die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs die Transkription von Heparanasen (Ramani et al. 2017). Verschiedene Studien konnten außerdem zeigen, dass TNF- $\alpha$  die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) stimuliert (Hang et al. 2008, Lin et al. 2008). Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), welche unter anderem von Endothelzellen sekretiert werden, sind in der Lage Komponenten der eGC, wie Proteoglykane, zu schneiden, was zum *Shedding* der eGC führt. Durch das *Shedding* werden verschiedene Adhäsionsmoleküle, wie ICAM-1, auf der Oberfläche von Endothelzellen freigelegt, was die Adhäsion unterschiedlicher Immunzellen fördert. Zinkhaltige MMPs (Endopeptidasen) können Entzündungen modulieren sowie Wundheilung, Gewebeumbau und Angiogenese induzieren (Verma und Hansch 2007, Murphy und Nagase 2008, Lipowsky 2011, Lipowsky 2012). Ihre Aktivierung erfolgt unter anderem durch Plasmin (Davis et al. 2001), Mikropartikel (Lozito und Tuan 2012) oder Thrombin (Galis et al. 1997), während ihre Aktivität durch TIMPs streng reguliert wird. Ein Ungleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs kann zur Entstehung atherosklerotischer Plaques beitragen (Kremastiotis et al. 2020). Weitere Studien konnten die Beteiligung von MMPs an der Entwicklung von Atherosklerose bestätigen (Magdalena et al. 2006, Olejarz et al. 2020).

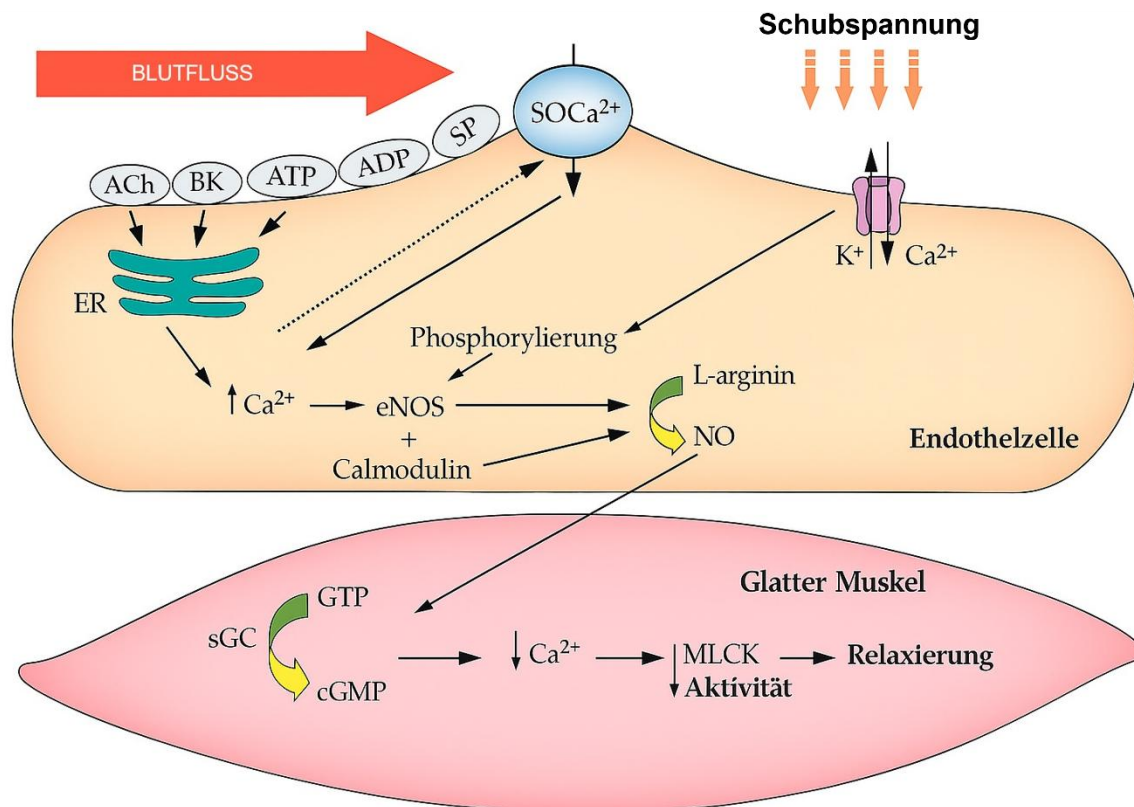
Des Weiteren ist bekannt, dass vielen kardiovaskulären Pathologien eine endotheliale Dysfunktion zugrunde liegt. Kürzlich konnte am Beispiel des akuten ST-Hebungsinfarktes (STEMI) gezeigt werden, dass dieser zur Schädigung der eGC führt und dadurch die Monozytenadhäsion an der Endotheloberfläche begünstigt. Als STEMI (*ST-Elevation Myocardial Infarction*) wird ein akuter und lebensbedrohlicher Herzinfarkt bezeichnet, der durch den Verschluss eines Herzkranzgefäßes verursacht wird. Beim STEMI war rekombinantes Syndecan-1 in der Lage den Wiederaufbau der geschädigten eGC zu unterstützen (Vahldieck et al. 2023). In einer weiterführenden Studie haben Vahldieck et al. gezeigt, dass beim akuten Myokardinfarkt das Komplementsystem stark aktiviert wird. Besonders wichtig dabei sind die Anaphylatoxine C3a und C5a, bei dem vor allem C5a eines der potentesten

proinflammatorischen Anaphylatoxine darstellt (Vahldieck et al. 2023). Der erhöhte C5a-Spiegel in STEMI-Patienten-Seren steigerte den Spiegel von Syndecan-1, Heparansulfat und Hyaluronsäure, was charakteristisch für eine *shedded* eGC ist. C5a löste zudem eine Aktivierung von RhoA aus, wodurch die Kortex-Steifigkeit erhöht wurde. In STEMI-Seren konnte außerdem eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit gemessen werden (Vahldieck et al. 2024). Es ist bekannt, dass eine übermäßige C5a-Konzentration zur Produktion von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-6 beisteuern, welche die Heparanasen-Expression und damit das *Shedding* der eGC induzieren (Yan und Gao 2012, Fels et al. 2022, Ghosh und Rana 2023, Vahldieck et al. 2024).

### 1.1.2 Rolle von Stickstoffmonoxid (NO) auf die Gefäßfunktion

Stickstoffmonoxid (NO) wurde bereits 1980 von Furchgott und Zawadzki als Relaxationsfaktor ermittelt (Furchgott und Zawadzki 1980). NO ist ein sekundärer Botenstoff, der über Vasodilatation den peripheren Blutdruck reguliert. Für die NO-Produktion nimmt die eGC zunächst die Schubspannung innerhalb des Blutstroms wahr und überträgt den mechanischen Reiz auf die Plasmamembran und das Zytoskelett der Endothelzellen. Dadurch werden mechanosensitive Ionenkanäle in der Membran aktiviert, wodurch u.a. ein Calcium-Einstrom ausgelöst wird (Dragovich et al. 2016). Wie in Abbildung 5 dargestellt kann der Calcium-Einstrom außerdem durch agonistisch wirkende Signalmoleküle wie Acetylcholin (ACh), Bradykinin (BK) oder ATP erfolgen oder aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) freigelassen werden (Sandoo et al. 2010).  $\text{Ca}^{2+}$  dient als essenzieller *second messenger* und vermittelt verschiedene Signalwege und immunologische Reaktionen, darunter MAPK-, NF- $\kappa$ B-, PI3K-Akt- und RhoA/ROCK-Signalweg (Du und Liu 2025, Pirri 2025). Der intrazelluläre Anstieg des Calciumspiegels führt unter anderem zur Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an Calmodulin. Durch eine strukturelle Veränderung kann der Calcium-Calmodulin-Komplex an die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) binden, wodurch diese aktiviert wird. Die aktivierte eNOS ist nun in der Lage die Umwandlung von L-Arginin zu endogenem NO zu katalysieren. Im Anschluss diffundiert NO aus der EC in den glatten Muskel. Dort angelangt aktiviert NO die lösliche Guanylatzyklase (sGC), welche das Pyrophosphat des Guanosintriphosphat (GTP) abspaltet, woraus der *second messenger* zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) hervorgeht. Das

cGMP wiederum aktiviert die Proteinkinase G (PKG), welche die Myosin-leichte-Kette-Phosphatase (MLCP) aktiviert. Diese wiederum dephosphoryliert die Myosin-leichte-Kette (MLC). Daraus resultiert die Relaxation der glatten Muskulatur und ein verringerter Gefäßtonus (Sandoo et al. 2010, Klinger und Kadowitz 2017, Nussinovitch et al. 2017, Tang et al. 2017, Álvarez-Santos et al. 2020, Fels und Kusche-Vihrog 2020).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der NO-vermittelten Vasodilatation glatter Gefäßmuskeln.** Durch Schubspannung innerhalb des Blutflusses oder durch NO-Agonisten wie Acetylcholin (ACh), Bradykinin (BK), Adenosintriphosphat und Adenosindiphosphat (ATP und ADP), sowie Substanz P (SP) und speichergesteuerter Calciumkanal (SOCa<sup>2+</sup>) steigt der intrazelluläre Calciumspiegel. Dadurch wird die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) aktiviert, was zur Vasodilatation der glatten Muskulatur führt (Verändert nach Sandoo et al. 2010 und Nussinovitch et al. 2017).

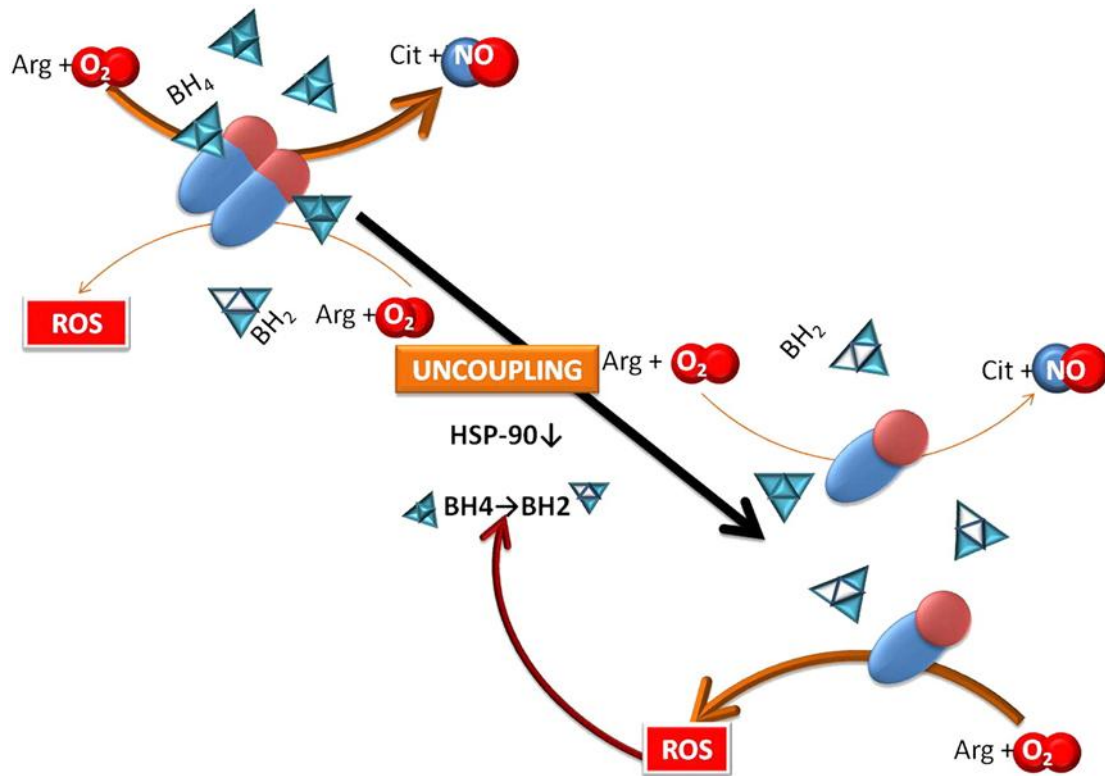
In einem ruhenden Endothel, also bei einem geringen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel, sorgt die Bindung der eNOS an Caveolin-1 für eine Hemmung der eNOS-Aktivität (Ju et al. 1997, Dudzinski et al. 2007, Sandoo et al. 2010, Askari et al. 2023). Das aktive eNOS-Dimer wird von zwei Monomeren gebildet. Während das erste Monomer über eine Reduktase-Domäne verfügt, welche Bindungsstellen für Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), Flavinadenindinukleotid (FAD) und

Flavinmononukleotid (FMN) enthalten, verfügt das zweite Monomer über eine Oxygenase-Domäne, mit Bindungsstellen für Häm, Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) und L-Arginin. Calmodulin koppelt die Monomere über die Reduktase- und Oxygenase-Domäne miteinander. FMN und FAD transferieren langsam Elektronen von NADH zur Oxygenase-Domäne, genauer gesagt ins Häm-Zentrum, wo O<sub>2</sub> zu O<sub>2</sub><sup>-</sup> reduziert wird. Um die Reaktion zu beschleunigen, nutzt die eNOS BH<sub>4</sub> zusätzlich als Elektronendonator. BH<sub>4</sub> vermindert außerdem die Freisetzung von Superoxiden (Gielis et al. 2011, Tran et al. 2022).

Zu den Aufgaben von NO zählt auch die Regulierung der vaskulären Permeabilität (Di Lorenzo et al. 2013). Ist NO ausreichend in Endothelzellen vorhanden, verhindert NO die Induktion verschiedener Enzyme wie Heparanasen, welche Bestandteile der eGC abbauen (Garsen et al. 2016). Sowohl unter Schubspannungs-Bedingungen und Belastung als auch durch NO-Agonisten wie ACh, BK, ADP und ATP steigt die endotheliale NO-Konzentration (Jin und Loscalzo 2010). Ein NO-Mangel entsteht durch Gefäßentzündungen, die mit einem *Shedding* der eGC einhergehen. Eine beeinträchtigte eGC hat zur Folge, dass die Aktivierung der mechanosensitiven Ionenkanäle deutlich eingeschränkt ist. Dadurch gelangt weniger Calcium in ECs, wodurch die Aktivität der eNOS reduziert wird und infolgedessen die NO-Produktion beeinträchtigt wird. An diesem Punkt entwickelt sich ein Teufelskreis, da ein NO-Mangel aufgrund der vermehrten Freisetzung von MMPs und Heparanasen den Schutz der eGC nicht mehr gewährleisten kann (Zhang et al. 2018, Goligorsky und Sun 2020, Wang et al. 2025). Eine *shedded* eGC führt zu einer erhöhten Permeabilität, wodurch mehr Immunzellen adhären können (Iba und Levy 2019). Ausgeschüttete Zytokine, wie TNF-α, welches von aktivierten Makrophagen, Lymphozyten und ECs sezerniert werden, inhibieren die eNOS-Expression, wodurch sich die Dysfunktion verschlimmert (Neumann et al. 2004). Die beeinträchtigte eGC und die gestörte NO-Produktion sind Merkmale der endothelialen Dysfunktion.

Die Verfügbarkeit von NO ist aufgrund des vermehrten Vorhandenseins von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reduziert. Diese wird durch die hohe Aktivität der NADPH-Oxidase 1, 2 und 5 (NOX) verursacht, wodurch eine übermäßige Menge an Superoxid Anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) entsteht. O<sub>2</sub><sup>-</sup> reagiert umgehend mit dem vorhandenen NO zu Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>), welches ein starkes Oxidationsmittel darstellt (Kuzkaya et al. 2005, Meza et al. 2019, Camargo et al. 2025). Es ist bekannt, dass Peroxynitrit Tetrahydrobiopterin

(BH<sub>4</sub>) oxidiert, welches ein elementarer Cofaktor für die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase darstellt. Durch die Oxidation von BH<sub>4</sub> zu BH<sub>3</sub>, welches dann zu Dihydrobiopterin (BH<sub>2</sub>) zerfällt, wird der aktive eNOS-Dimer destabilisiert. Abbildung 6 zeigt schematisch den Mechanismus des *Uncouplings*, wodurch die eNOS destabilisiert wird.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des eNOS *Uncouplings*.** BH<sub>4</sub> stabilisiert den eNOS Dimer. In Anwesenheit von BH<sub>4</sub> wird NO in ausreichenden Mengen generiert. Steigt die Konzentration an ROS wird BH<sub>4</sub> vermehrt zu BH<sub>2</sub> oxidiert, was zur Destabilisierung und damit zum *Uncoupling* des Dimers führt. Die NO-Produktion wird dadurch verringert, wodurch die Konzentration an ROS weiter steigt (Gielis et al. 2011).

Dieser ist dadurch in der Lage hinreichend L-Arginin und O<sub>2</sub> in Citrullin und NO umzuwandeln. Durch die Oxidation von BH<sub>4</sub> zu BH<sub>2</sub> durch vermehrte ROS wird die eNOS entkoppelt. Aufgrund der Entkopplung der eNOS entsteht ein Teufelskreislauf. Die entkoppelte eNOS generiert ihrerseits Superoxid, wodurch auch das verbliebende BH<sub>4</sub> oxidiert wird. Dies hat zur Folge, dass die NO-Produktion stark abnimmt (Gielis et al. 2011, Crabtree und Channon 2011). Eine weitere Funktion von NO ist das Verhindern der Thrombozytenaggregation und die Monozytenadhäsion (Naseem 2005, Jin und Loscalzo 2010). NO sorgt in Thrombozyten für die Aktivierung der Guanylatzyklase. Dies führt zu einem Anstieg der Botenstoffes cGMP und folglich zur

Aktivierung der Proteinkinase G. Dadurch sinkt die intrazelluläre Calciumkonzentration, was zur Inhibierung der Thrombozytenaggregation führt (Wang et al. 1998, Dangel et al. 2010, Russo et al. 2023).

### 1.1.3 Mechanosensitive Ionenkanäle in Endothelzellen

Mechanosensitive Ionenkanäle, welche in der Plasmamembran der ECs lokalisiert sind, stellen neben der eGC und dem Zellkortex eine weitere wichtige Komponente innerhalb des *Mechanosignalings* dar, da sie sowohl als Sensor als auch als *Transducer* und Effektor agieren. Sie können daher als Modulatoren der Endothelfunktion angesehen werden. Zu den Kanälen zählen unter anderem Mitglieder der *transient receptor potential* (TRP), der epithelialer Natriumkanal (ENaC) und Piezo. Ihre Aufgaben bestehen in der Wahrnehmung von mechanischen Kräften und Druckschwankungen innerhalb des Blutflusses. Durch die Dehnung bzw. Verformung der Zellmembran werden die Ionenkanäle geöffnet und können über den Ioneneinstrom mechanische Reize in ein zelluläres Signal umwandeln (Fels und Kusche-Vihrog 2020, Beverley et al. 2025). Unter Schubspannung stellt das Öffnen der mechanosensitiven Ionenkanäle den ersten Schritt des *Mechanosignalings* dar (Christensen und Corey 2007, Martino et al. 2018). Mechanosensitive Ionenkanäle weisen dabei unterschiedliche Eigenschaften auf. Während K<sup>+</sup>-selektive TREK-Kanäle eine Hyperpolarisation der ECs bewirken, ist Piezo1, welcher permeabel für Ca<sup>2+</sup>- und Na<sup>+</sup>-Ione ist, an der Depolarisation der ECs beteiligt. Der Calcium-Einstrom bewirkt eine Aktivierung der eNOS und damit die NO-Freisetzung, welche zur Vasodilatation führt (Fels und Kusche-Vihrog 2020). Die beschriebene Signalkaskade zeigt die Bedeutung mechanosensitiver Ionenkanäle bei der Blutdruckregulation. Eine besondere Rolle tragen hierbei die mechanosensitiven Ionenkanäle ENaC und Piezo1. Fels et al. konnten zeigen, dass der vermehrte Einbau von ENaC in ECs zu einer Versteifung der Endotheloberfläche führt (Fels et al. 2010).

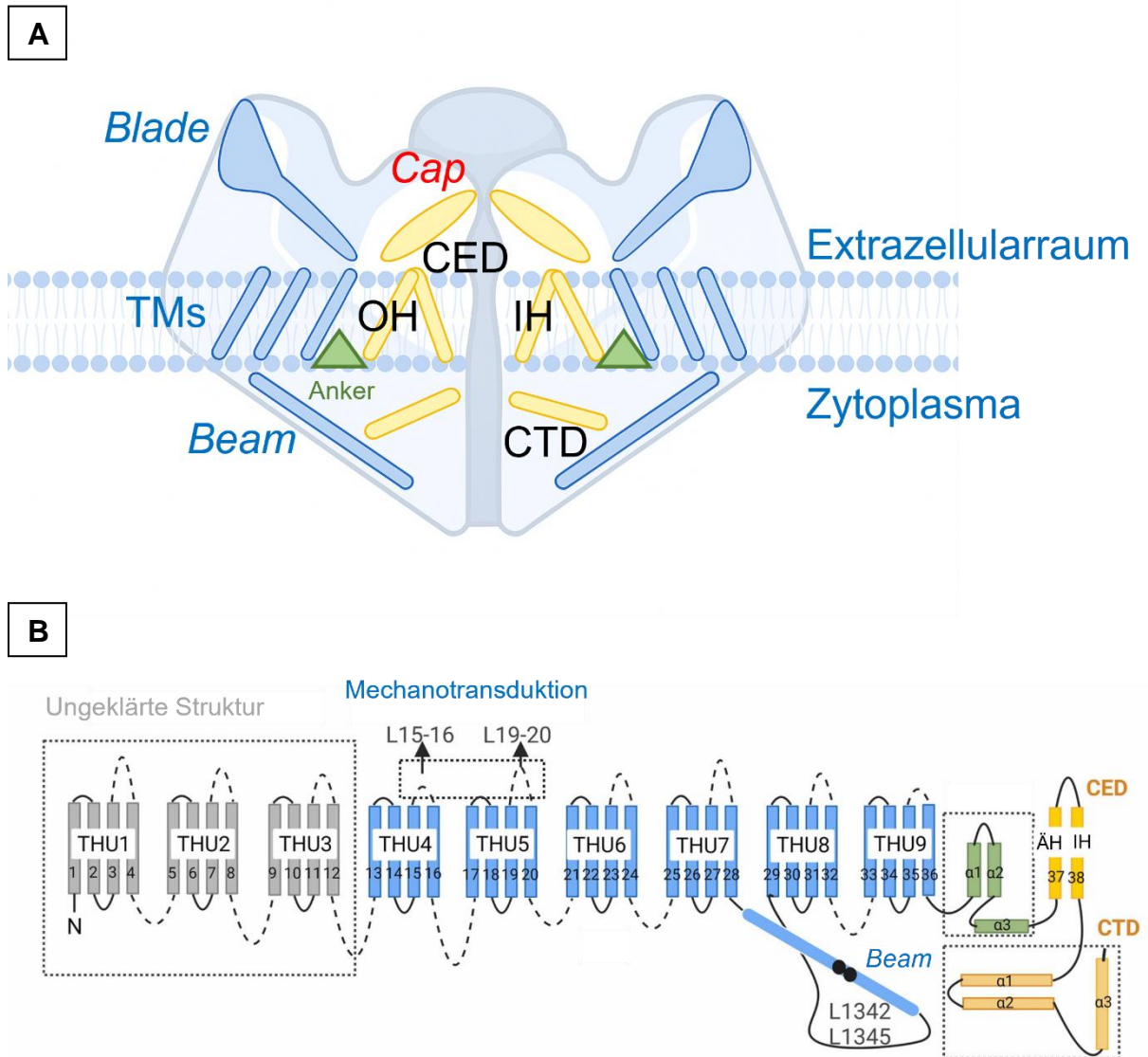
ENaC ist auch in glatten Muskelzellen lokalisiert, wo er die druckinduzierte Vasokonstriktion vermittelt (Drummond et al. 2008, Kim et al. 2013, Fels und Kusche-Vihrog 2020). Jeggle et al. konnten zeigen, dass Mutationen in der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des ENaC arteriellen Hypertonie fördern (Jeggle et al. 2013). Daraus geht

hervor, dass ECs und glatte Muskelzellen sich gegenseitig beeinflussen und in beide Richtungen miteinander interagieren. Die Reaktionen auf Schubspannungen im Blutfluss und die Regulierung des Gefäßtonus sind dabei stark von der endothelialen Nanomechanik abhängig. Daher ist ein Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten innerhalb des *Mechanosignaling* von essenzieller Bedeutung, damit sie flexibel auf Änderungen in der Umgebung reagieren können. Dies gewährleisten ECs durch den Wechsel zwischen „weichen“ und „steifen“ Zuständen. Der Wechsel stellt dabei ein elementares Charakteristikum eines gesunden Endothels dar. ECs, die diese Fähigkeit verloren haben, werden als dysfunktional angesehen. Fundamentale Komponenten des *Mechanosignaling* sind mechanosensitive Ionenkanäle. Fehlfunktionen dieser Kanäle sind mit diversen kardiovaskulären Erkrankungen verknüpft.

#### **1.1.4 Piezo Ionenkanäle-Familie**

Mechanosensitive Ionenkanäle der Piezo Familie stellen eine essenzielle Komponente innerhalb der Transduktion von mechanischen Reizen zu zellulären Signalen dar. Dieser Prozess ist vor allem bei der Gefäßentwicklung, der Blutdruckregulation sowie dem Schmerzempfinden von großer Bedeutung (Wang und Xiao 2017). Im Jahre 2010 wurden Piezo1 und Piezo2 als Mitglieder einer neuen Familie von mechanisch aktivierter Kationenkanäle charakterisiert (Coste et al. 2010). Während Piezo2 überwiegend in sensorischen Neuronen, wie Spinalganglion und *Ganglion trigeminale* exprimiert wird, wird Piezo1 überwiegend in Haut, Blase, Lunge, Niere und besonders stark in Endothelzellen und Erythrozyten exprimiert (Wu et al. 2017, Fang et al. 2021, Qin et al. 2021). Der hohe Stellenwert von Piezo1 wird u.a. durch die Studie um Ranade und Kollegen belegt, die die Letalität von Piezo1-defizienten Mäuseembryonen demonstrieren (Ranade et al. 2014).

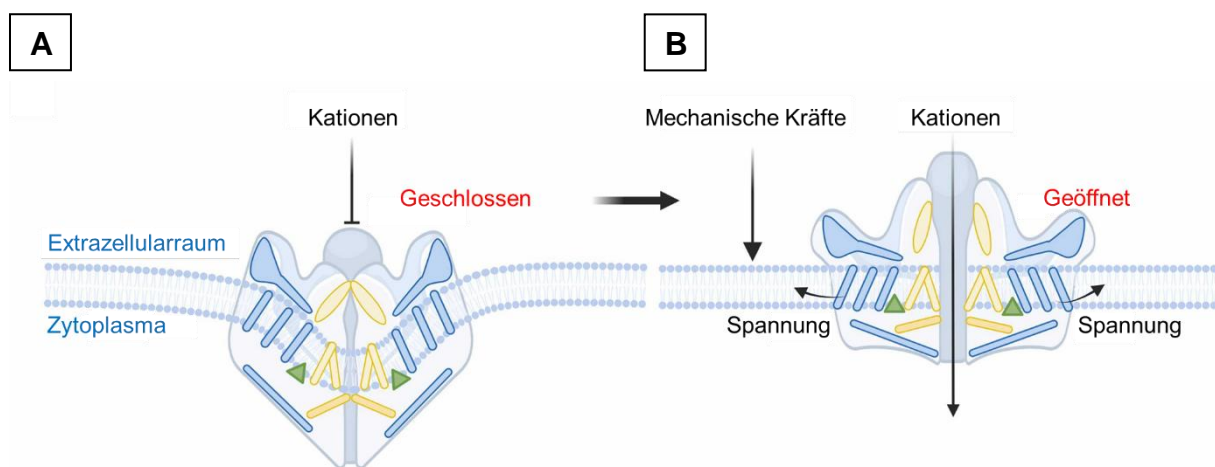
Piezo1 und Piezo2 weisen 42 % homologe Sequenzen und eine ähnliche Struktur auf (Qin et al. 2021). Bisherige Studien haben gezeigt, dass die Piezo-Kanäle eine 38-Transmembran-Helix Topologie und eine dreiklingige propellerähnliche homotrimere Struktur, welche als *Mechanotransducer* dient sowie eine C-terminale intra- (CTD) und extrazelluläre Strukturdomäne (CED) aufweisen.



**Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Piezo1 Kanals. (A)** Dargestellt sind die wichtigsten Strukturen des mechanosensitiven Ionenkanals Piezo1. Dazu zählen die *Cap*-Domäne, die multiplen Transmembrandomänen (TMs), die propellerförmig angeordnete Klinge (*Blade*), die extrazelluläre C-terminale Strukturdomäne (CED), *inner* (IH) und *outer* Helix (OH), der Anker, intrazelluläre C-terminale Strukturdomäne (CTD), sowie der Balken (*Beam*). **(B)** Skizziert die charakteristische 38- Transmembran-Helix-Topologie von Piezo-Kanälen (Verändert nach Zong et al. 2023).

Wie in Abbildung 7B dargestellt, ist jede Untereinheit des Homotrimeres in TM-Helix-Einheiten (THU) organisiert, welche aus jeweils vier gefalteten Transmembran-Helices aufgebaut sind. Die Transmembranhelices TM37 und TM38 bilden die *inner* und *outer* Helix (IH und OH), welche das zentrale Porenmodul umschließen. Die mechanosensitiven Klingen (*Blades*) im Extrazellularraum sind über einen Balken (*Beam*) mit der *Cap*-Domäne verbunden (siehe Abbildung 7A) (Fang et al. 2021, Jiang

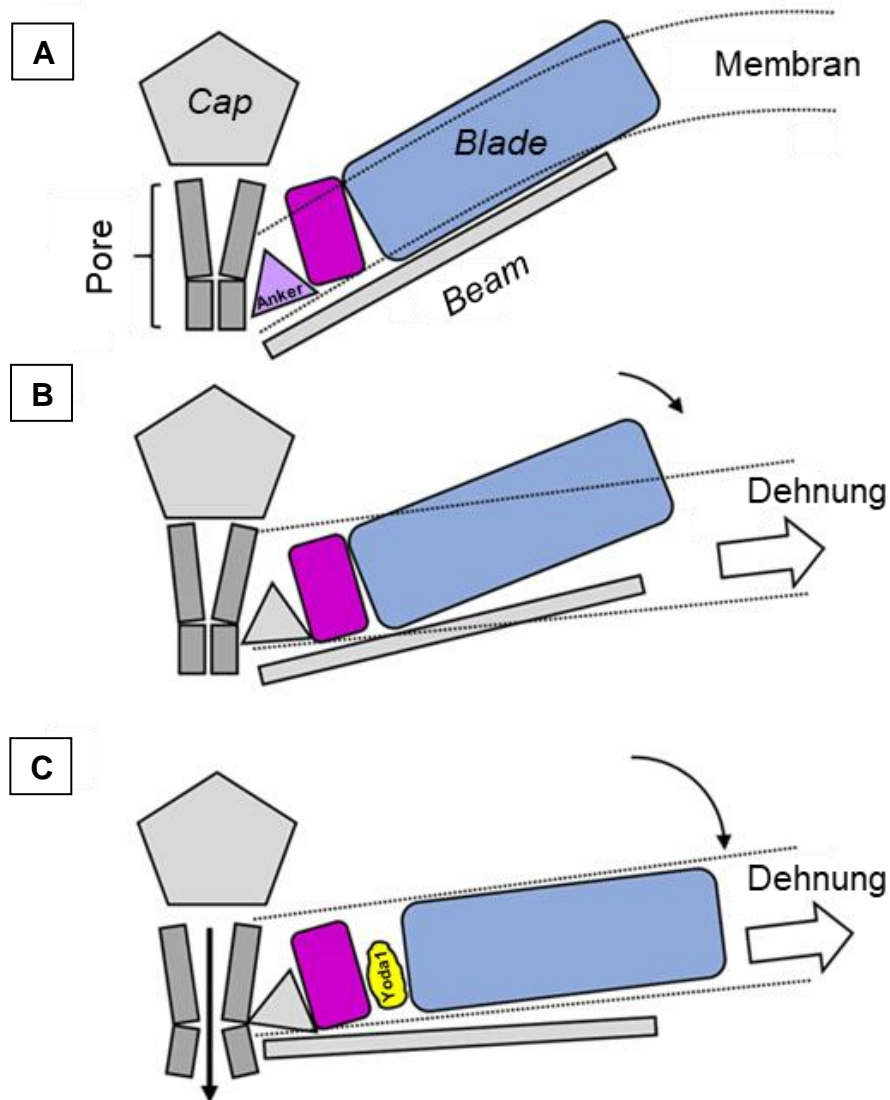
et al. 2021, Qin et al. 2021, Zong et al. 2023). Im entspannten Zustand (Abbildung 8A) ist der Piezo1-Ionenkanal leicht nach innen gebogen, wodurch die Pore verschlossen ist und kein Kationen-Einstrom ausgelöst wird. Bei einer Änderung der mechanischen Spannung werden die *Blades* durch mechanische Kräfte verformt (Abbildung 8B). Die *Beam*-Struktur dient hierbei als Hebel, wodurch Piezo1 in eine planare Konformation gezogen wird und sich dadurch die zentrale Pore öffnet, sodass diverse Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$  einströmen können (Wang et al. 2018, Zhao et al. 2019, Lin et al. 2019, Zong et al. 2023).



**Abbildung 8: Illustration der mechanischen Aktivierung des Piezo1-Kanals. (A)** Im entspannten Zustand werden die *Blades* des Piezo1-Ionenkanals nach innen gedrückt, wodurch die Pore verschlossen bleibt. **(B)** Unter Spannung wird der Kanal-Komplex in eine planare Konformation gezogen, wodurch die Pore geöffnet wird und ein Kationen-Einstrom ausgelöst wird (Verändert nach Zong et al. 2023).

#### 1.1.4.1 Aktivierung von Piezo1

Die Aktivierung von Piezo1, die zum Einstrom von verschiedenen Kationen führt, kann sowohl durch mechanische Kräfte als auch chemisch induziert werden. Im Ruhezustand ist die *Blade*-Struktur des Piezo1 Kanals in einer gebogenen Position (Abbildung 9A). Syeda et al. waren in der Lage ein kleines synthetisches Molekül namens Yoda1 als einen spezifischen Piezo1-Aktivator zu identifizieren. Die agonistische Wirkung konnte dabei sowohl für den humanen Piezo1 Ionenkanal als auch für murine Piezo1 Ionenkanäle gezeigt werden (Syeda et al. 2015). Bei mechanischer Reizung unterhalb der Schwelle wird dieser durch das Abflachen der Membran gestreckt.



**Abbildung 9: Aktivierung des mechanosensitiven Piezo1 Ionenkanals durch Yoda1.** (A) Im Ruhezustand ist der Arm des Piezo1-Kanals gebogen. (B) Bei einem unterschwelligen Reiz wird der Arm leicht gedehnt, allerdings kommt es noch nicht zur Öffnung des Kanals. (C) Durch die Bindung von Yoda1 wird das Abflachen des Arms und der Plasmamembran begünstigt (Verändert nach Botello-Smith et al. 2019).

Der Stimulus reicht jedoch nicht aus, um eine Öffnung der Poren zu gewährleisten (Abbildung 9B). Durch die Bindung von Yoda1 an der Ligandenbindungsstelle L13, welche in einer hydrophoben Tasche in der Nähe der Reste 1961-2036 lokalisiert ist, agiert Yoda1 als Keil und sorgt dadurch für eine Verstärkung des Abflachens der Membran (Abbildung 9C). Dieser Effekt sorgt für eine Konformationsänderung von Piezo1 und schließlich zur Öffnung der Kanalpore (Botello-Smith et al. 2019). Yoda1 sorgt daher für eine Stabilisierung der offenen Konformation des Kanals und senkt dadurch die Reizschwelle. Lacroix et al. konnten durch die Generierung von Piezo1-

Hybridkanälen außerdem zeigen, dass zur Öffnung des trimeren Piezo1-Kanals lediglich eine einzige agonistische Untereinheit ausreicht. Elektrophysiologische Studien haben außerdem gezeigt, dass für die Aktivierung von Piezo1 die chemische Zugabe von Yoda1 ausreichend ist und dazu kein mechanischer Stimulus notwendig ist (Syeda et al. 2015, Lacroix et al. 2018). Trotz der starken Homologie zwischen Piezo1 und Piezo2, hat Yoda1 keinen Einfluss auf die Modulation von Piezo2 (Lacroix et al. 2018). Da Yoda1 hoch spezifisch für Piezo1 ist und im Gegensatz zu anderen Piezo1-Aktivatoren/Modulatoren, wie Jedi1/2, nicht auf exogene mechanische Kräfte zur Aktivierung angewiesen ist, eignet sich Yoda1 hervorragend für isolierte Studie von Piezo1 (Syeda et al. 2015, Lacroix et al. 2018). So konnten Davies et al. beispielsweise zeigen, dass Yoda1 in der Lage ist ohne mechanische Reizung die durch Schubspannung-vermittelte Effekte auf die Adhäsionsmolekül-Expression nachzuahmen (Davies et al. 2019).

#### **1.1.4.2 Piezo1-Signaling**

Der durch die Aktivierung von Piezo1 vermittelte Calciumeinstrom löst unterschiedliche Signalwege aus. Wie bereits unter 1.1.2 beschrieben, führt ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in Endothelzellen zur Aktivierung der eNOS, wodurch eine Gefäßerweiterung gefördert wird. Durch Schubspannung aktivierte Piezo1-Kanäle vermitteln die Freisetzung von ATP aus ECs. Dies führt zur Aktivierung des G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>-gekoppelten purinergen P2Y<sub>2</sub> Rezeptors, was wiederum die Aktivierung von AKT sowie eNOS und damit eine Vasodilatation auslöst. (Wang et al. 2015, Wang et al. 2016, Albarrán-Juárez et al. 2018). Ein siRNA-vermittelter Piezo1-Knockdown in *human umbilical arterial endothelial cells* (HUAECs) inhibiert den Schubspannung-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom. Dadurch wird die Phosphorylierung von AKT und eNOS verhindert. Darüber hinaus waren Wang et al. in der Lage die Abnahme von Nitrat in Zellkulturüberständen nachzuweisen, was für eine verminderte eNOS-Aktivität spricht (Wang et al. 2016). Des Weiteren konnten Lhomme et al. zeigen, dass die NO-vermittelte Dilatation von intrapulmonalen Arterien bei Mäusen durch die Aktivierung von Piezo1 über seinen Aktivator Yoda1 vermittelt wird (Lhomme et al. 2019).

Der Calciueinstrom über Piezo führt auch zur Aktivierung der CaMKII. Dadurch wird eine Phosphorylierungskaskade ausgelöst, bei der zunächst MEKK3 und anschließend MEK5 und ERK5 phosphoryliert werden. Dies führt zu einer erhöhten Expression von KLF2/4, welche eine Inhibierung von NF-κB bewirkt. Daraus resultiert ein vasoprotektiver Effekt, da NF-κB typischerweise die Expression für Zytokine, Chemokine sowie Adhäsionsmoleküle auslöst und dadurch die Rekrutierung von Leukozyten und Entzündungen fördert (Lawrence 2009, Liu et al. 2022, Zheng et al. 2022). Pabst et al. haben gezeigt, dass die Aktivierung von Piezo1 sowohl chemisch (durch Yoda1) als auch mechanisch (durch Schubspannung) zur Aktivierung der *α5β1* Integrin und Metalloproteinase ADAM17 und ADAM10 führt (Pabst et al. 2026). Pabst et al. fanden außerdem heraus, dass ein (*small hairpin RNA*) shRNA-vermittelter Piezo1-Knockdown in HUVECs zu einer reduzierten Zellproliferation führt, wohingegen eine Aktivierung von Piezo1 durch Yoda1 zu einer gesteigerten Proliferation führt. Sie zeigten außerdem den Einfluss von Piezo1 auf die Zellmigration mit einer verminderten Wundverschlussreaktion in Piezo1-K.O.-Zellen (Pabst et al. 2026).

## 1.2 Vaskuläre Entzündungen

Seit Beginn der 90er Jahre steigt die Anzahl an kardiovaskulären Erkrankungen (von 13,1 Mio. auf 19,2 Mio. im Jahre 2023) kontinuierlich an. Sie stellen weltweit die häufigste Todesursache dar (Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks 2023 Collaborators 2025). Die Risikofaktoren von Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind dabei sehr vielseitig. Dazu zählt vor allem eine ungesunde Lebensweise, welche durch schlechte Ernährung, Bewegungsmangel, Adipositas, Rauchen und Bluthochdruck gekennzeichnet ist. Es zeigen sich jedoch starke Unterschiede zwischen Geschlecht, Alter und ethnischer Zugehörigkeit (Bays et al. 2021). Während Frauen statistisch seltener an kardiovaskulären Erkrankungen erkranken, zeigen sie jedoch eine höhere Letalität nach akuten kardiovaskulären Ereignissen im Vergleich zu Männern (Gao et al. 2019).

Kardiovaskuläre Erkrankungen werden primär durch Atherosklerose und arterielle Hypertonie ausgelöst (Frostegård 2013, Fræk et al. 2022). Während Atherosklerose durch Lipidakkumulation und Entzündungen der Blutgefäße charakterisiert ist, ist

arterielle Hypertonie durch eine abnormale Gefäßstruktur, die den Gefäßwiderstand erhöht, gekennzeichnet (Björkegren und Lusis 2022, Ma et al. 2023). Die Ansammlung von Lipiden, darunter auch das *Low Density Lipoprotein* (LDL), erfolgt in der *Tunica Intima*. Van den Berg et al. konnten einen Zusammenhang zwischen einer *shedded* eGC und der LDL-Akkumulation feststellen. Sie bemerkten, dass eine geringere Menge Heparansulfat und Hyaluronsäure in der eGC mit einer erhöhten subendothelialen Anreicherung von LDL einhergeht und zu einem Verlust der Barrierefunktion der eGC führt (Van den Berg et al. 2009). Oxidiertes LDL induziert außerdem die Dephosphorylierung von Akt und beeinträchtigt dadurch die eNOS-Aktivierung (Chavakis et al. 2001). Darüber hinaus erhöht oxidiertes LDL die Steifigkeit von Endothelzellen (Chouinard et al. 2008).

Hypertonie wird ab einem systolischen Blutdruck von 130 mmHg (oder höher) und diastolischen Blutdruck von 80 mmHg (oder höher) definiert (Iqbal und Syed 2023). Die Ursachen für die Entstehung von Hypertonie sind dabei sehr vielfältig. Zu diesen Ursachen gehören auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Camargo et al. 2025). Diese entstehen vor allem durch die Aktivierung von NADPH-Oxidasen durch Angiotensin II. ROS reagieren mit NO, wodurch Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) entsteht (Viridis et al. 2011). Dadurch wird die Vasodilatation stark eingeschränkt. Peroxynitrit hemmt außerdem die Prostazyklin-Synthase, wodurch vermehrt PGH<sub>2</sub> entsteht. Diese wirkt auf den Thromboxan-Rezeptor und führt schließlich zu einer verstärkten Vasokonstriktion (Hink et al. 2003). Ein weiteres Merkmal von Hypertonie ist eine deutlich verringerte eGC-Höhe (Ikonomidis et al. 2018, Wang et al. 2025). Es ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Verringerung der eGC-Höhe durch mechanische Kräfte innerhalb des Blutflusses oder durch eine hohe Salzaufnahme verursacht wird (Wang et al. 2025). Studien haben bereits gezeigt, dass eine erhöhte extrazelluläre Natriumkonzentration über 5 Tage eine Reduzierung der eGC-Höhe um ca. 50 % bewirkt. In diesem Zeitraum wurde außerdem der Anteil an Heparansulfat um 68 % reduziert (Oberleithner et al. 2011). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte auch zeigen, dass Natriumkonzentrationen größer als 135 mM zu signifikant steiferen Endothelzellen führte (Oberleithner et al. 2007). Innerhalb des *stiff endothelial cell syndrome* (SECS), verursacht u.a. Aldosteron eine Hochregulierung des epithelialen Natriumkanals (ENaC) und löst dadurch eine reduzierte NO-Produktion und einen chronisch steifen Zellkortex aus (Fels und Kusche-Vihrog 2019). Extrazellulär verursacht eine hohe Natriumkonzentration eine Schädigung der eGC und ermöglicht

so den Einstrom von Natrium nach intrazellulär. Intrazellulär bewirkt Natrium eine Stabilisierung des F-Aktins, wodurch die Steifigkeit des Zellkortex gesteigert wird. Schlussendlich führt dies zu einer vaskulären Dysfunktion (Mutchler et al. 2021).

Ein wichtiges Kennzeichen für vaskuläre Entzündungen stellt die transendotheliale Migration (TEM) von Leukozyten dar. Die Diapedese ist dabei von der Substratsteifigkeit der Oberfläche von ECs, welche negativ mit Proteinen der extrazellulären Matrix korreliert, abhängig. Die Rezeptoraktivierung in Leukozyten (Integrine) und ECs (Selektine, VE-Cadherin, ICAM-1, PECAM-1 und Integriene) führen zu einer RhoA- vermittelten ROCK-Aktivität, welche die MLC-Phosphatase hemmt, wodurch Myosin II aktiviert wird. Hieraus resultiert eine Steigerung der Actomyosin-Aktivität, welche die kontraktilen Kräfte und zelluläre Steifigkeit fördert (Schaefer und Hordijk 2015).

### **1.2.1 Vorarbeiten zum Einfluss von Piezo1 auf die endotheliale Nanomechanik**

Die in diesem Abschnitt erläuterten Vorarbeiten, sind unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe (Bachelorarbeit Katja Schweim und Franziska Unrein, Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck sowie Doktorarbeit Erik Hertel, Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck). Durch Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die eGC-Höhe unter inflammatorischen Bedingungen durch die Aktivierung von Piezo1 verbessert wird. Die durch TNF- $\alpha$  verursachte Reduzierung der eGC-Höhe konnte durch die Zugabe von Yoda1 aufgehoben werden.

Weitere Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung von Piezo1 die Anzahl an adhärenierten Monozyten an ECs signifikant verringert. Bei einer gesunden eGC können nur unzureichend Monozyten an die Adhäsionsmoleküle der eGC binden. Daran anknüpfend wurden weitere Monozyten-wash-away-Assays durchgeführt, die demonstrieren, dass die Anzahl der adhärenierten Monozyten pro EC nach dem Induzieren von inflammatorischen Bedingungen durch TNF- $\alpha$ , im Vergleich zur Kontrolle signifikant anstieg. Dieser Effekt konnte durch Yoda1 aufgehoben werden.

Des Weiteren zeigte die Zell-Zell-Adhäsionsmessung, dass nach der Zugabe von Yoda1 sich die Kräfte zum Trennen des Monozyt und EC im Vergleich zur Kontrolle nicht veränderte. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass nach der Zugabe des Piezo1-Aktivators Yoda1 das Trennen des Monozyten und EC weniger Kraft erforderte als nach dem Induzieren einer Gefäßentzündung durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$ . Die Adhäsionskräfte zwischen Monozyt und EC waren durch Yoda1 folglich reduziert. Erstaunlicherweise konnte der durch TNF- $\alpha$ -induzierte Effekt durch die gleichzeitige Stimulation mit Yoda1 aufgehoben werden).

Die Aktivierung von Piezo1 kann außerdem Zytoskelett-vermittelt über das Linker-Protein Filamin induziert werden (Pathak et al. 2014; Retailleau et al. 2015). Dadurch zeigt sich erneut das enge Zusammenspiel von mechanosensitiven Ionenkanälen und dem Zytoskelett. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die endotheliale Nanomechanik die Ionenkanal mRNA-Expression beeinflusst. ECs wurden mit Jasplakinolide und Cytochalasin D behandelt, um entweder einen steifen oder weichen Zellkortex zu induzieren. Die Ergebnisse zeigten, dass das mRNA-Level von Piezo1 innerhalb eines steifen Zellkortex deutlich anstieg. Weitere Studien zur Untersuchung des Einflusses von Piezo1 auf die endotheliale Nanomechanik zeigten, dass die Stimulation mit dem spezifischen Piezo1-Aktivator Yoda1 zu einer signifikant geringeren Kortex-Steifigkeit führt. Darüber hinaus konnten Effekte auf die eGC beobachtet werden. Die Aktivierung von Piezo1 führte zum einen zu einer geringeren Steifigkeit der eGC und zum anderen zu einer Steigerung der eGC-Höhe im Vergleich zur Kontrolle. Piezo1 scheint daher eine wichtige Rolle als Mechanosensor zu spielen. Seine regulatorische Rolle bei der Endothelmechanik und sein Einfluss auf vaskuläre Entzündungen ist noch nicht ausreichend geklärt.

Aufgrund der hohen Bedeutung von vaskulären Erkrankungen ist die Erforschung ihrer Ursachen von zentraler Bedeutung. Eine beeinträchtigte Funktion von mechanosensitiven Ionenkanälen und damit eine gestörte endotheliale Nanomechanik sind an der Entstehung dieser Erkrankungen beteiligt. Der genaue Einfluss von Piezo1 auf die endotheliale Nanomechanik sowie seine Rolle bei vaskulären Entzündungen ist jedoch weitestgehend unklar. Dadurch ist eine umfangreiche Untersuchung unerlässlich.

### 1.3 Zielsetzung

Das Endothel ist eine wichtigste Struktur für die vaskuläre Homöostase und dient als Schnittstelle zwischen den Blutgefäßen und dem umliegenden Gewebe. Sensoren innerhalb des Endothels nehmen biochemische und mechanische Reize wahr und können über verschiedene Signalwege spezifische Reizantworten auslösen, wodurch unter anderem der Gefäßwiderstand und damit der Blutdruck reguliert werden kann. Das System muss dabei stets dynamisch auf sich ändernde Umgebungsbedingungen innerhalb des Blutflusses reagieren können, um eine ordnungsgemäße Funktion des Endothels zu gewährleisten. Die endotheliale Oberfläche ist unter physiologischen Bedingungen durch eine intakte endotheliale Glykokalyx, einen flexiblen Zellkortex und einer flussinduzierten NO-Produktion gekennzeichnet, während chronische Veränderungen in diesen Strukturen mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert sind und zu kardiovaskulären Erkrankungen führen können. Auch wenn die Ursachen für kardiovaskuläre Erkrankungen unterschiedlich sind, zeigen einige davon ähnliche Merkmale. Dazu gehören eine geschädigte eGC, ein hoher Einstrom an Kationen in ECs sowie ein steifer Zellkortex und eine gestörte NO-Produktion.

Piezo1 wurde als ein wichtiger mechanosensitiver Ionenkanal identifiziert. Die Rolle von Piezo1 bei der Regulierung der endothelialen Nanomechanik und der Endothelfunktion ist bislang nicht ausreichend geklärt. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich daher auf zwei Fragestellungen. Zum einen sollen die Auswirkungen von Piezo1 auf die endotheliale Nanomechanik und Endothelfunktion untersucht werden. Zum anderen soll der Einfluss von Piezo1 auf vaskuläre Entzündungen überprüft werden. Durch die gezielte Aktivierung von Piezo1 sollen die mechanischen Eigenschaften der endothelialen Oberfläche mittels *Atomic Force Microscope*-Nanoindentationsmessungen analysiert werden. Dazu gehört die Untersuchung der eGC-Höhe, sowie die Steifigkeit des Zellkortex. Außerdem soll die Rolle von Piezo1 bei der EC-Funktion durch einen CRISPR-Cas9-basierten Knockout charakterisiert werden. Ein weiterführendes Ziel ist die Darlegung ein endothelspezifischer Piezo1-Knockout in Mäuseaorten den Einfluss von Piezo1 auf die endotheliale Nanomechanik darlegen. Diese Untersuchung soll durch weitere molekularbiologische Untersuchungen, wie NO-Analyse und GTPase-Aktivität gestützt werden. Außerdem

soll der Einfluss von Piezo1 auf vaskuläre Entzündungen soll durch die Stimulierung mit TNF- $\alpha$ , wodurch Gefäßentzündungen induziert werden, quantifiziert werden.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
12-Well Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
24-Well Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser (15 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Gradientengel 4-20 %	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Kryogefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Neutral Polypropylengefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nitrocellulosemembran	Amersham™ Protran®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen (T-75)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen 35 mm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Zentrifugenröhrchen (15 mL und 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
---------------------------------------	----------------------------------

## 2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	Hersteller
Agarose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Biocoll – Trennlösung	Bio&Sell GmbH, Feucht/Nürnberg, Deutschland
Bio-Rad D <sub>c</sub> Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Calcein	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
Corning® Cell-Tak™	BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA
Dispase	Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA
DMEM	Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
DNA-Leiter 1 kb	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DTT	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA

ECL Clarity Western ECL Substrate Bio-Rad	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Ethanol (99 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA
Gelatine	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Heparin	Biochrom, Schaffhausen, Schweiz
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Medium 199	Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Midori Green Xtra	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Natriumiodid (NaI)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumnitrat (NaNO <sub>3</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NEAA	Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA
Opti-MEM	Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA
PBS -/- und +/+	Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA
Proteaseinhibitor	Calbiochem/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
SDS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
TNF- $\alpha$	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin	Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA
Tween	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Urea	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vanadiumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Yoda1	Tocris Bioscience™, Bristol, UK

### 2.1.3 Laborgeräte

Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte.

Laborgeräte	Hersteller
AFM (NanoWizard 4)	Bruker, Karlsruhe, Deutschland
Cycler Bio-Rad T100™ Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Eismaschine	Kälte-Berlin, Berlin, Deutschland
Gelkammer Bio-Rad Mini PROTEAN Tetra System	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Geldokumentationssystem biostep® Celvin® Chemiluminescence Imaging	Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland
Geldokumentationssystem Nippon Genetics FAS-DIGI PRO	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, Deutschland
Inkubator HERAcCell VIOS 160i	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Netzgerät Consort E835	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Netzgerät Bio-Rad Power PAC 3000	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
NO Analyzer (Zysense NOA208i Analyzer)	GE Water & Process Technologies, Analytic Instruments; Boulder, Colorado, USA
PCR Werkbank Erlab Captair Bio	BioCap GmbH, Frankfurt, Deutschland
Plattenreader Berthold Technologies	Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Deutschland
Plattenreader PCRmax Eco™	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, Deutschland
Präzisionswaage Sartorius	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland

Saugpumpe	neoLab® Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Sterilwerkbank	Schulz Lufttechnik, Sprockhövel, Deutschland
Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zellzähler	Nexcelom Bioscience, Lawrence, Massachusetts, USA
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 2.1.4 Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits.

Kit	Verwendung	Hersteller	Bestellnummer
CRISPRMAX	Transfektionsreagenzien CRISPR-Cas9 Generierung Piezo1 K.O.	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	CMAX0000
ELISA	Human Syndecan-1 ELISA	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	EHSDC1
GeneArt™ Genomic Cleavage Detection Kit	CRISPR-Cas9 Quantifizierung	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	A24372

GLISA	Rho GTPase Aktivität	Cytoskeleton, Denver, Colorado, USA	BK124
innuPREP RNA mini Kit 2.0	qPCR	Innuscreen GmbH, Berlin, Deutschland	845-KS- 2040010
sg RNA	CRISPR-Cas9 Generierung Piezo1 K.O.	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	A35533
TrueCut Cas9 v2-Protein	CRISPR-Cas9 Generierung Piezo1 K.O.	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	A36498

### 2.1.5 Zelllinien

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Ursprung	Herkunft
EA.hy926	Hybridzellen aus HUVECs und A549 (Lungenadenokarzinom) Zellen	Cora-Jean S. Edgell, <i>University of North Carolina</i> , Chapel Hill, North Carolina, USA
GM7373	Endothelzellen der Aorta aus <i>Bos taurus</i>	Leibnitz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland
HUVEC	Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen	Aus gespendeten Nabelschnüren des Marien-Krankenhauses Lübeck und des UKSH Lübeck isoliert

Piezo1-K.O.	Endothelzellen Mäusearten mit EC- spezifischen Piezo1-K.O.	Dr. Stefan Offermanns, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, Deutschland
-------------	--	--

### 2.1.6 Primer

Tabelle 6: Verwendete Primer für molekularbiologische Methoden.

Primer	Sequenz	Hersteller	Konzentration
L28 (fwd.) für qPCR	ATGGTCGTGCGGAACTGCT	Metabion International AG, Planegg, Deutschland	10 pmol
L28 (rev.) Für qPCR	TTGTAGCGGAAGGAATTGCG	Metabion International AG, Planegg, Deutschland	10 pmol
Piezo1 Primer (fwd.) für CRISPR	CTTCCTGGTGGCCCATCT	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	7,5 pmol
Piezo1 Primer (rev.) für CRISPR	CTCTGTCCCTCCTGGGTC	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	7,5 pmol
Piezo1 Primer (fwd.) für qPCR	CATCTTGGTGGTCTCCTCT	Metabion International AG, Planegg, Deutschland	10 pmol

Piezo1 Primer (rev.) für qPCR	TCCCTCTCATCATCATCCAG	Metabion International AG, Planegg, Deutschland	10 pmol
HPRT1 Primer (fwd.) für CRISPR	ACATCAGCTGTTCTG	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	7,5 pmol
HPRT1 Primer (rev.) für CRISPR	GGTGAAAGGAGAGAACT	ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	7,5 pmol

### 2.1.7 Software

Tabelle 7: Angewendete Software

Software	Anwendungsbereich	Hersteller
Advanced Image Data Analyzer AIDA Version 2.0	Densitometrie	AIDA IMAGING, Cocina, Kalifornien, USA
EcoStudy	Auswertung qPCR	Illumina, Inc., San Diego, Kalifornien, USA
GraphPad Prism 8	Statistische Auswertung	GraphPad, San Diego, Kalifornien, USA
OriginPro 8.5	Datenverarbeitung und Datenexport	OriginLab, Northampton, Massachusetts, USA
PUNIAS Version 1.0	Auswertung AFM-Kurven	Philippe Carl & Paul Dalhaimer, <a href="mailto:punias@free.fr">punias@free.fr</a>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellkulturarbeiten unter S1 Bedingungen durchgeführt.

Zur Durchführung der molekularbiologischen Methoden und Analysen wurden HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells* - HUVECs), EA.hy926 und GM7373 Zellen verwendet. HUVECs wurden aus gespendeten Nabelschnüren des Marien-Krankenhauses Lübeck und des UKSH Lübeck isoliert (genehmigt durch die lokale Ethikkommission, Fälle 18-325 und 2023-520\_1). Nach der Aussortierung von beschädigten Nabelschnüren, wurden die unbeschädigten Nabelschnüre durch die Einführung einer Knopfkanüle eingeführt und mit PBS -/- (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gewaschen, bis keine Verunreinigungen mehr zu erkennen waren. Nach dem Schließen und Befüllen der Nabelschnüre mit 1 mg/mL Dispase (Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA), wurden diese eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die entnommene Zellsuspension wurde anschließend 5 min bei 200 x g in einem 50 mL Falconröhrchen zentrifugiert. Darauf wurden die abgetrennten Zellen in eine mit 0,5 %iger Gelatine beschichtete T-75 Zellkulturflasche überführt und im Inkubator mit HUVEC-Zellkulturmedium 199 (10 % fetales Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin (100 U/ml; 100 µg/mL), 1 % *Large Vessel Endothelial Supplement* (alle: Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA) und Heparin 10 U/mL (Biochrom, Schaffhausen, Schweiz)) kultiviert (37 °C, 21 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>). Für die Beschichtung wurde eine T-75 Zellkulturflasche mit 0,5 %iger Gelatine, die zuvor in sterilem Wasser gelöst wurde, beschichtet. Darauffolgend wurde die Zellkulturflasche für eine Stunde in den Inkubator gestellt (37 °C, 21 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>). Anschließend wurde die überschüssige Gelatine mit einer Saugpumpe abgesaugt. Zellen, die nicht umgehend ausgesät wurden, wurden im 15 mL Falconröhrchen zentrifugiert (200 x g, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde im Kryomedium (Zellkulturmedium mit 10 % DMSO) resuspendiert und in 1 mL Kryogefäße überführt. Diese wurden die nächsten 24 h auf -80 °C heruntergekühlt und anschließend im flüssigen Stickstoff gelagert.

EA.hy926-Zellen sind Hybridzellen aus HUVECs und A549 (Lungenadenokarzinom) Zellen. Die EA.hy926-Zellen wurden freundlicherweise von Cora-Jean S. Edgell, *University of North Carolina*, Chapel Hill, North Carolina, USA, zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte im DMEM Zellkulturmedium (10 % fetalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin (alle Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA)).

GM7373 Zellen (Leibnitz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) wurden in MEM Zellkulturmedium (20 % fetales Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Vitaminlösung und 1 % NEAA (alle von Gibco, Carlsbad, Kalifornien, USA)) kultiviert.

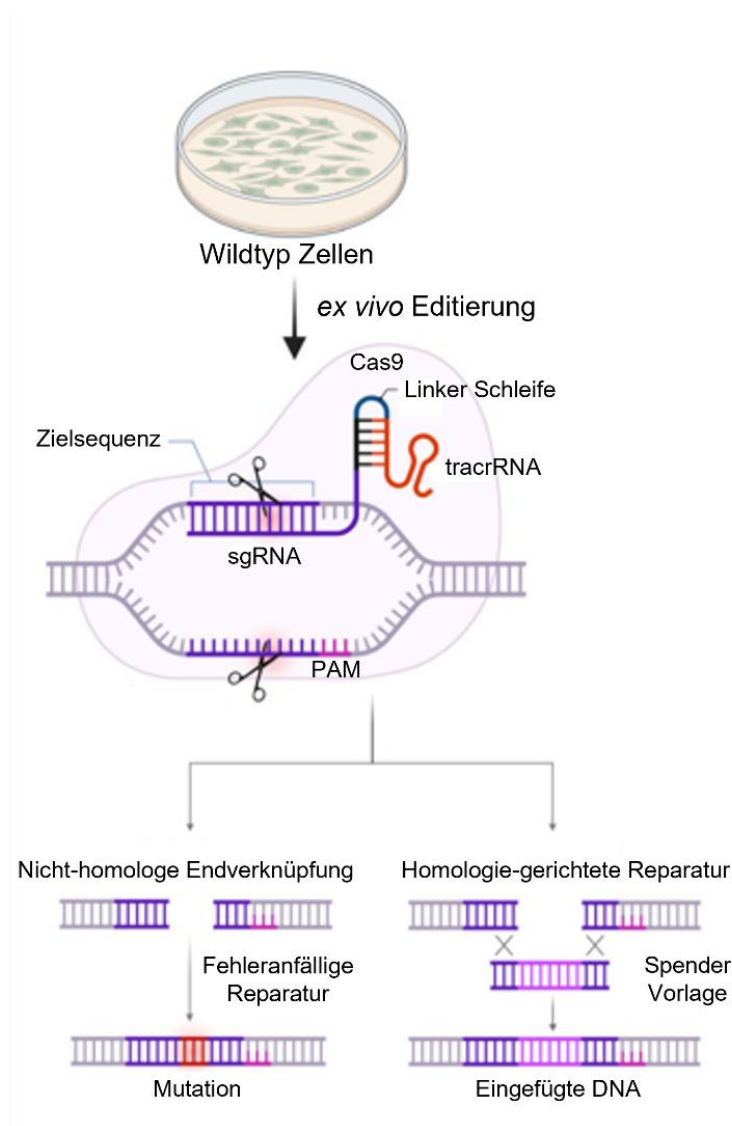
Zellen, die konfluent gewachsen waren, wurden im Verhältnis 1:5 passagiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS, wurden der Zellkulturflasche 0,05 %iges Trypsin zum Lösen der Zellen hinzugefügt und für 2-3 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nachdem mikroskopisch kontrolliert wurde, dass sich alle Zellen gelöst haben, wurde die Reaktion durch das Hinzufügen von 10 mL Medium gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 mL Falconröhrchen überführt und zentrifugiert (200 x g, 5min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1 mL Medium resuspendiert. Zur Zellzahlbestimmung wurden 40 µL der konzentrierten Suspension entnommen und mit 20 µL 0,2 % Trypanblau versetzt. Daran angeknüpft wurde die Zellzahl durch den *Cellcounter* ermittelt.

### **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.2.1 CRISPR-Cas9**

Der Ursprung des CRISPR-Cas9 Systems liegt in der Immunabwehr von Bakterien gegen virale DNA. Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen waren in der Lage, dieses System zu adaptieren und als Methode zur Genom Editierung zu etablieren. Dadurch können Fremd-DNA-Abschnitte präzise in ein anderes bestehendes Genom integriert werden oder es können Mutationen, die durch das Einfügen oder Deletieren von spezifischen Basen entstehen, generiert werden. Der Mechanismus des CRISPR-Cas9 Systems zur Genom-Editierung ist Abbildung 10 dargestellt. Der Komplex

besteht aus dem Cas9 Protein, welches als Nuklease fungiert und Doppelstrangbrüche an spezifischen Abschnitten der DNA erzeugen.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des CRISPR-Cas9 Mechanismus zur Genom-Editierung.** Der CRISPR-Cas9 Komplex besteht aus dem Cas9-Protein, welches den Doppelstrangbruch induziert, der sgRNA, welche die Zielsequenz lokalisiert und der tracrRNA, welche als Stabilisator des Komplexes dient. Der Doppelstrangbruch ermöglicht über nicht-homologe Endverknüpfungen das Einfügen von Mutationen, während die Homologie-gerichtete Reparatur ein Einfügen von spezifischen DNA-Abschnitten ermöglicht (Verändert nach Bonowicz et al. 2025).

Eine weitere Komponente des Komplexes ist die sgRNA, welche eine Gerüstregion besitzt über die Cas9 gebunden wird. Die sgRNA leitet Cas9 zur Zielsequenz. Über eine Linker-Schleife ist die sgRNA mit der tracrRNA verbunden, was für die Stabilisierung des Komplexes sorgt. Um präzise die Zielsequenz zu lokalisieren, wird

stromabwärts die PAM-Sequenz (*Protospacer Adjacent Motif*) benötigt. Diese Sequenz enthält die Basen NGG (wobei N für eine beliebige Base steht). Dieses Signal ermöglicht eine spezifische Bindung von Cas9 an der Zielsequenz. Das Cas9-Protein kann nun seine Nukleasefunktion ausüben und spaltet den DNA-Doppelstrang. Dabei werden entweder nicht-homologe Endverknüpfungen (NHEJ) oder eine Homologiegerichtete Reparatur (HDR) hervorgerufen. Während durch die NHEJ Insertionen und Deletionen erzeugt werden und daher zu Mutationen führen, wird bei der HDR gezielt ein DNA-Abschnitt eingebaut (Bonowicz et al. 2025). Um den Einfluss von Piezo1 auf die endotheliale Nanomechanik zu untersuchen, wurde mittels der CRISPR-Cas9-Methode in EA.hy926 Zellen ein Piezo1-K.O. generiert. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers (ThermoFisher Scientific).

Für die Transfektion von EA.hy926 Zellen wurden in einer 24-Well Platte ausgesät und mit 450 mL Medium (ohne Penicillin/Streptomycin) und 50 µL Transfektionsreagenz bedeckt (CRISPRMAX Lipofectamine Transfektionsreagenz). Dazu wurden in ein Polypropylengefäß 24 µL Opti-MEM, 1250 ng Cas9-Protein (TrueCut Cas9 v2-Protein) (dies entspricht 7,5 pmol), 240 ng der entsprechenden sgRNA (7,5 pmol) und 2,5 µL Cas9 Plus-Reagenz gemischt. Für die Negativkontrolle wurde das entsprechende Volumen an RNase-freiem Wasser statt der sgRNA verwendet. In ein zweites Polypropylengefäß wurden 25 µL Opti-MEM und 1,5 µL CRISPRMAX Lipofectamine Transfektionsreagenz gemischt und für eine Minute inkubiert. Anschließend wurden beide Gefäße zusammengeführt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde der Ansatz durchmischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde je 50 µL Transfektionsansatz zu je 450 µL Medium (ohne Penicillin/Streptomycin) pipettiert. Bevor der Ansatz auf die Zellen gegeben wurde, wurden die Zellen mit PBS/-/ gewaschen. Die Zellen wurden für zwei Tage mit entsprechendem Medium inkubiert.

Für die Lyse der Zellen und Extraktion wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen anschließend mit PBS/-/ gewaschen. Darauf wurden die Zellen für 1-2 min mit 50 µL Trypsin gelöst. Die Reaktion wurde dann mit 500 µL Medium (ohne Penicillin/Streptomycin) gestoppt und die Zellen wurden in ein Polypropylengefäß überführt und zentrifugiert (200 x g, 5 min, bei Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit 500 µL Medium resuspendiert. Daraufhin wurde eine 10 mL Grenzverdünnungslösung erstellt, damit eine Zelle pro Well (96-Well

Platte) ausgesät werden konnte. Am darauffolgenden Tag erfolgte eine Validierung durch mikroskopische Analyse, dass lediglich eine Zelle pro Well vorhanden war. Der Rest der Zellsuspension wurden erneut zentrifugiert (200 x g, 5 min, bei Raumtemperatur) und anschließend bei -80 °C gelagert. Ein Mediumwechsel der vereinzelt Zellen erfolgte wöchentlich.

Tabelle 8: Programmeinstellungen zur Zellyse.

Temperatur	Zeit
60 °C	15 min
95 °C	10 min
4 °C	Halten

Die PCR-Amplifikation diente zur Vervielfältigung und Nachweis/Überprüfung des Zielgens. Dies wurde mit dem GeneArt™ Genomic Cleavage Detection Kit durchgeführt. Dazu wurden zunächst 1 µL Protein *Degrader* mit 25 µL *Cell Lysis Buffer* zusammenpipettiert. Das Gemisch wurde anschließend dem Zellpellet hinzugefügt, in ein PCR-Gefäß überführt und in den *Cycler* gestellt. Die Tabelle 8 zeigt das verwendete Programm für die Lyse der Zellen. Das Zellysate wurde anschließend gevortext. Der PCR-Ansatz wurde, wie in Tabelle 9 aufgelistet, vorbereitet.

Tabelle 9: Zusammensetzung PCR-Ansatz.

Komponente	Ansatz	Kontrolle
Zellysate	2 µL	-
Primer for./rev. jeweils	1 µL	-
Kontrolle Template + Primer	-	1 µL
AmpliTaq Gold Mastermix	25 µL	25 µL
Wasser	21 µL	24 µL
<b>GESAMT</b>	<b>50 µL</b>	<b>50 µL</b>

Für die PCR wurden folgende Primer verwendet: Piezo1 CTCCTGGTGGCCCATCT (fwd.) und CTCTGTCCCTCCTGGGTC (rev.); HPRT1 ACATCAGCTGTTCTG (fwd.) und GGTGAAAGGAGAGAACT (rev.). Das PCR-Programm wurde wie in Tabelle 10 dargestellt eingestellt.

Tabelle 10: Programmeinstellungen für PCR.

Stufe	Temperatur	Zeit	Zyklus
Enzym Aktivierung	95 °C	10 min	1x
Denaturierung	95 °C	30 sec	40x
<i>Annealing</i>	52 °C	30 sec	40x
Extension	72 °C	30 sec	40x
Finale Extension	72 °C	7 min	1x
Halten	4 °C		

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden jeweils 3 µL mit 10 µL sterilem ddH<sub>2</sub>O und 5 µL 6xLoading Dye in die Taschen eines 2 %igen Agarosegel (in 1xTAE-Puffer mit Midori Green Xtra) pipettiert. Als Referenz diente die 1 kb Plus DNA-Leiter (ThermoFisher Scientific). Das Gel lief bei einer Spannung von 80 V für eine Stunde.

Für das *Re-Annealing* wurden 2 µL PCR-Produkt zusammen mit 1 µL *10xDetection-Reaction-Buffer* in ein PCR-Tube gegeben. Der Ansatz für auf 9 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Es wurden zudem eine interne Kontrolle, sowie eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Das *Re-Annealing* Programm wurde wie in Tabelle 11 gezeigt ausgewählt. Das *Re-Annealing* diente Quantifizierung der Editierungseffizienz durch anschließende Gelelektrophorese.

Tabelle 11: Programmeinstellungen für *Re-Annealing*.

Stufe	Temperatur	Zeit	Temperatur/Zeit
1	95 °C	5 min	1x
2	95-85 °C		-2 °C/sec
3	85-25 °C		-0,1 °C/sec
Halten	4 °C		

Der Enzymverdau durch die Zugabe von je 1  $\mu\text{L}$  Detection-Enzyme und 1  $\mu\text{L}$  Wasser erfolgte für eine Stunde bei 37 °C im *Cycler*. Abschließend erfolgte erneut eine Gel-Analyse. Dafür wurden 10  $\mu\text{L}$  Wasser dem 10  $\mu\text{L}$  Enzymverdau und anschließend 5  $\mu\text{L}$  6xLoading Dye hinzugefügt. Die Proben wurden in die Taschen eines 2 %igen Agarosegels pipettiert. Als Referenz diente die 1 kb Plus DNA-Leiter (ThermoFisher Scientific).

Der generierte Klon wurde von Eurofins genomics sequenziert. Die Sequenzierung zeigte eine Basenverschiebung, die zur Insertion eines vorzeitigen Stopcodons an Position 106 führte (ursprüngliche Sequenz: GACCCTCTCGCGACACATA, CRISPR-Sequenz: GACCCTCTCGCGA\*ACAACA\*ATA).

Die hier beschriebene CRISPR-Cas9 Methode wurde mehrfach durchgeführt. Leider zeigten die Auswertungen auch nach mehrfacher Durchführung und Anpassungen keinen eindeutigen Piezo1-Knockout. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit mit Piezo1 CRISPR-Zellen gearbeitet, welche von Erik Hertel (siehe Doktorarbeit Erik Hertel, Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck) generiert wurden.

### 2.2.2.2 Western Blot

Der Nachweis des Piezo1 Proteins in Wildtyp und Piezo1 CRISPR-Zellen wurde durch den Western Blot erbracht. Zunächst wurden konfluent gewachsene HUVECs, EA.hy926 und Piezo1 CRISPR-Zellen aus 10 cm Schalen mit einem Schaber geerntet. Die Zellen wurden anschließend in UREA-Puffer (100 % Glycerin, 10 % SDS, 1 M DTT, 1 M Tris, 8 M Urea und Proteaseinhibitor) durch Ultraschall lysiert. Die Proteinbestimmung erfolgte durch Bio-Rad Dc Protein Assay. 40 g Protein wurden auf ein SDS-PAGE Gradientengel (Bio-RAD Mini-PROTEAN TGX Gels Cat.: 4561094) aufgetragen. Das Gel lief für 3 h mit 60 V im Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS). Anschließend wurde das Gradientengel für 30 min in Blotpuffer (25 mM Tris-Base, 200 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) bei Raumtemperatur geschwenkt. Das Blotten wurden mit dem Bio-Rad Trans-Blot®SD Semi Dry bei 10 V (konstant) für 90 min auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham™ Protran®) durchgeführt. Die Membran wurde für 2 h in 5 % BSA/PBS + 0,025 % Tween blockiert. Über Nacht inkubierte die Membran mit dem primären Piezo1 Antikörper

(Proteintech, Kat. # 28511, 1:1000 in 5 % BSA/PBS + 0,025 % Tween) bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal für insgesamt 1 h mit 1xPBS + 0.025 % Tween gewaschen. Dann wurde der sekundäre Antikörper hinzugefügt (Dako, Glostrup, Dänemark, anti-rabbit HRP 1:20000 in 5 % BSA/PBS + 0,025 % Tween) und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut dreimal für insgesamt 1 h mit 1xPBS + 0,025 % Tween gewaschen. Darauffolgend wurde die Membran in ECL geschwenkt (Bio-Rad Clarity™ Western ECL Substrate). Als Ladungskontrolle wurde der Primärantikörper Lamin A/C (Cell Signaling, 1:1000 in 5 % Milch) eingesetzt. Der Antikörper wurde über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Der passende anti-Maus Sekundärantikörper (1:20000 in 5 % Milch PBS + 0,025 % Tween) wurde 45 min bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Zur Bildgebung wurde das biostep® Calvin® Chemiluminescence Imaging (Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland) System verwendet. Die Auswertung der Bilder erfolgte durch AIDA Advanced Image Analyzer (AIDA IMAGING, Cocina, Kalifornien, USA). Die Belichtungszeit mit Piezo1 Antikörper betrug 15 min und für Lamin A/C 5 min.

### 2.2.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion - qPCR

Mittels der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion wurde spezifisch ein DNA-Abschnitt in Echtzeit vervielfältigt. Für die Durchführung der qPCR wurde zunächst RNA aus EA.hy926 Wildtyp und CRIPSR Zellen mittels innuPREP RNA mini Kit 2.0 (Innuscreen GmbH, Berlin, Deutschland) isoliert. Dafür wurden 200 µL (Änderung zum Nutzungsprotokoll des Herstellers) Lysepuffer auf die Zellen gegeben, welche mit einer Zelldichte von  $10^5$  Zellen pro Well (12-Well Platte) ausgesät wurden. Nach einer Inkubation von 2 min bei Raumtemperatur wurde das Lysat achtsam resuspendiert und nochmals 3 min inkubiert. Der Überstand wurde darauf auf eine Säule mit einem Auffangtube übertragen, um die gDNA zu entfernen. Die Säule mit dem Lysat wurde dann zentrifugiert (11000 x g, 2 min, bei Raumtemperatur). Der Filter der Säule wurde verworfen. Das Lysat wurde daraufhin das äquivalente Volumen an 70 %igem Ethanol zugefügt. Nach dem Durchmischen wurde die Suspension auf einen weiteren Filter pipettiert, um die RNA selektiv zu binden. Das Lysat wurde erneut zentrifugiert (11000 x g, 2 min, bei Raumtemperatur). Darauffolgend wurde der Filter in ein neues

Polypropylengefäße gesteckt. Es folgte ein mehrstufiger Waschvorgang. Zunächst wurden 50 µL HS Waschlösung auf den Filter pipettiert. Der Filter samt Auffangtube wurde dann zentrifugiert (11000 x g, 1 min, bei Raumtemperatur). Das Filtrat wurde anschließend verworfen und der Filter auf ein neues Auffangtube gesteckt. Nun wurden 700 µL LS Waschlösung auf den Filter pipettiert und erneut zentrifugiert (11000 x g, 1 min, bei Raumtemperatur). Das Filtrat wurde erneut verworfen und der Filter auf ein neues Auffangtube gesetzt. Das Tube wurde schließlich wieder zentrifugiert (11000 x g, 3 min, bei Raumtemperatur). Der Filter wurde nun in ein Elutionstube gesetzt. Nachdem 40 µL RNase-freies Wasser auf den Filter gegeben wurde, folgte die letzte Zentrifugation (11000 x g, 1 min, bei Raumtemperatur). Im Anschluss wurde die RNA-Konzentration am NanoDrop gemessen. Da die qPCR nur doppelsträngige DNA amplifiziert, musste die RNA zunächst über die reverse Transkription in eine komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt werden. Für die reverse Transkription wurden 450 ng RNA, 1 µL *Random Hexamer*, 4 µL dNTPs und DEPEC-Wasser zusammen pipettiert, sodass ein Gesamtvolumen von 16 µL vorlag. Der Ansatz wurde gevortext, herunterzentrifugiert und für 5 min bei 65 °C (*Thermocycler*) erwärmt. Danach wurde der Ansatz auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurde der Mastermix mit 2 µL 10-fach Puffer, 0,25 µL RNase-Inhibitor, 0,75 µL DEPC-Wasser und 1 µL Reverse Transkriptase (x10 für 10-fach Ansatz) angesetzt. Jeweils 4 µL Mastermix wurden zur Probe hinzugefügt und dann für 1 h bei 42 °C inkubiert. Die nun generierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Die *Real Time* qPCR wurde mit dem Eco48 qPCR System (PCRmax Limited Beacon Road, Staffordshire, Vereinigtes Königreich) durchgeführt. Zur Erstellung des Mastermix wurden je Reaktion 5 µL SYBR Green, 0,4 µL *forward* Primer (10 pmol) und 0,4 µL *reverse* Primer (10 pmol) und 3,2 µL Wasser zusammen pipettiert. Jeweils 9 µL Mastermix und 1 µL cDNA (0,5 µg) wurden pro Well auf die Trägerplatte aufgetragen. Des Weiteren wurde eine Wasserkontrolle und eine Plattenkontrolle (eine identische Probe, auf allen Platten) mitgeführt. Die fertig pipettierte Platte wurde nun mit einer Folie verschlossen und kurz anzentrifugiert. Für das PCR-Programm wurden die in Tabelle 12 dargestellten Zyklen und Temperaturen eingestellt.

Tabelle 12: Temperaturen und Zyklen zur Durchführung der qPCR.

Temperatur	Zeit
95 °C	10 min
95 °C	10 sec
60 °C	30 sec

} x40

Die EcoStudy Software quantifiziert Fluoreszenzsignale (SYBR Green), welche bei der temperaturabhängigen Denaturierung des DNA-Doppelstrangs sichtbar werden. Dadurch lässt sich der so genannte Ct-Wert bestimmen, welcher aussagt, wie viele Zyklen benötigt werden, um einen Fluoreszenz-Schwellenwert zu erreichen. Ein hoher Ct-Wert bedeutet daher, dass eine geringe DNA-Ausgangskonzentration vorlag, ein niedriger Ct-Wert bedeutet, dass eine hohe DNA-Ausgangskonzentration vorlag. Darüber hinaus kann über die Schmelzkurve des DNA-Doppelstrangs die Spezifität der PCR überprüft werden. Die Schmelztemperatur ist von der Länge und Basenzusammensetzung der DNA abhängig und ist daher spezifisch für bestimmte Sequenzen. Zur Auswertung der qPCR wurde die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode angewendet. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem ermittelten Ct-Wert. Dieser wird zunächst ins Verhältnis zum Haushaltsgen L28 gesetzt, um Schwankungen in der DNA-Konzentration ausgleichen zu können. Anschließend wird die Kontrolle von den stimulierten Proben subtrahiert. Über die Potenz der zweiten Basis wird die relative Expression errechnet.

#### 2.2.2.4 Syndecan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA

Humanes Syndecan-1 wird als valider Marker für die Untersuchung der eGC-Integrität angesehen (Johansson et al. 2011, Steppan et al. 2011). Zur Vorbereitung des ELISAs (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, Kat. # EHSDC1) wurden zunächst verschiedene Puffer, wie vom Hersteller angegeben, angesetzt. Für den Waschpuffer wurden 20 mL des Waschkonzentrats in 380 mL entionisiertem Wasser verdünnt (1xWaschpuffer). Das Verdünnungsmittel B wurde vor dem Gebrauch 5-fach mit entionisiertem Wasser verdünnt (1xVerdünnungsmittel B). Das Biotin-Konjugat wurde kurz anzentrifugiert. Anschließend wurden 100 µL des Verdünnungsmittel B in

das Fläschchen mit dem Biotin-Konjugat überführt (80-fach verdünnt). Zur Probenvorbereitung wurden EA.hy926 Wildtyp-Zellen und Piezo1 CRISPR-Zellen in 24-Well Platten ausgesät und mit DMSO, 10 ng/mL TNF- $\alpha$  und 0,5  $\mu$ M Yoda1 behandelt. Die entnommenen Überstände wurden mit 1xVerdünnungsmittel B verdünnt. Für die Erstellung der Standardlösung wurde der lyophilisierte Standard mit 400  $\mu$ L 1xVerdünnungsmittel B vermengt (50 ng/mL Standardlösung). Aus der Standardlösung wurden für die Standardreihe folgende Verdünnungen mit dem 1xVerdünnungsmittel B erstellt: 4000 pg/mL, 1600 pg/mL, 640 pg/mL, 256 pg/mL, 102,4 pg/mL, 40,96 pg/mL, 16,38 pg/mL, 0 pg/mL (Blank) Syndecan-1. Die Streptavidin-HRP wurde 200-fach mit 1xVerdünnungsmittel verdünnt. Nach dem vorsichtigen Durchmischen wurden 60  $\mu$ L des HRP-Konzentrats in ein Falconröhrchen mit 12 mL 1xVerdünnungsmittel B pipettiert (200-fach verdünnte HRP-Streptavidin-Lösung). Zur Antigenbindung wurden je 100  $\mu$ L Standard und 100  $\mu$ L der verdünnten Überstände in die Vertiefung der 96-Well Platte pipettiert. Darauf wurde die Platte mit einer Plastikfolie verschlossen und für 2,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung entfernt und die Platte viermal mit 300  $\mu$ L 1xWaschpuffer gewaschen. Daraufhin wurden 100  $\mu$ L des 1xBiotin-Konjugats in jede Vertiefung pipettiert. Die Platte wurde nun für 1 h bei Raumtemperatur auf den Schüttler bei 40 U/min inkubiert. Darauf wurde die Platte wie zuvor viermal mit 1xWaschpuffer gewaschen. Nach dem Hinzufügen von 100  $\mu$ L Streptavidin-HRP-Lösung wurde die Platte erneut für 45 min bei Raumtemperatur bei 40 U/min leicht geschüttelt. Darauf wurde die Platte erneut wie bereits beschrieben gewaschen. Durch das Hinzufügen von 100  $\mu$ L TMB-Substrat erfolgte innerhalb der Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln (40 U/min) ein Farbumschlag von gelblich zu blau. Schlussendlich wurden 50  $\mu$ L Stopplösung hinzugefügt. Durch das vorsichtige Klopfen an der Seite der Platte, sollte die Lösung durchgemischt werden. Es erfolgte erneut ein Farbumschlag von blau zu gelb. Direkt nach Zugabe der Stopplösung wurde die optische Dichte mit dem Berthold bei 450 nm bestimmt, wodurch die Syndecan-Konzentration bestimmt wurde. Der Syndecan-ELISA nutzt ein „Sandwich-Prinzip“ bei dem Syndecan zwischen einem spezifischen Antikörperpaar gebunden ist. Einer verankert das Syndecan in der Mikroplatte, wodurch dieses immobilisiert wird. Der zweite Antikörper dient als Detektor, welcher das hinzugefügte Substrat umsetzt und für einen Farbumschlag sorgt. Das hervorgerufene Signal ist dabei proportional zur Konzentration des Syndecans.

### 2.2.2.5 Neutrophilen-Assay

Der Neutrophilen-Adhäsions-Assay ist ein *in vitro* Verfahren, um die Adhäsion zwischen neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen zu untersuchen. Für die Durchführung des Neutrophilen-Adhäsions-Assays wurden zunächst Neutrophile Granulozyten aus EDTA-Blut gewonnen. Die „Blutspenden“ erfolgten durch freiwillige Spender des Instituts für Physiologie (Ethik-Votum: 19-310). In einem 50 mL Falcon wurden 7 mL Blut mit 7 mL PBS gemischt. In ein weiteres 50 mL Röhrchen wurden 14 mL Biocoll vorgelegt, worauf das Blut-PBS-Gemisch mit größter Vorsicht überführt wurde. Biocoll dient hier als eine Art Filter und ermöglicht so die Trennung von Blutzellen in einem Dichte-Gradienten. Nach der anschließenden Zentrifugation (800 x g, 25 min, bei Raumtemperatur, ohne Beschleunigung und Bremse) wurden die obersten Schichten, welche Plasma, Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und das Biocoll enthielten, abgesaugt. Dem Erythrozyten-Pellet wurden daraufhin 2 Volumenanteile 1 %iger Polyvinylalkohol zugesetzt und durchmischt. Die Zellen sollten dann für 20 min bei Raumtemperatur sedimentieren. Der Überstand wurde danach in ein neues 50 mL Röhrchen überführt und anschließend auf 50 mL mit PBS aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation (650 x g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und mit der Restflüssigkeit resuspendiert. Nach dem Hinzufügen von 25 mL Bidec für 30 sec, wurden 25 mL 1,8 % NaCl dazugegeben. Darauf folgte eine Zentrifugation (650 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde abermals verworfen und der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Das Zellpellet wurde nun mit 25 mL kaltem PBS aufgefüllt. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen zentrifugiert (650 x g, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde nun so in Medium aufgenommen, dass  $1 \times 10^6$  Zellen pro mL vorhanden waren. Anschließend wurden 3  $\mu$ M Calcein hinzugefügt. Das Röhrchen wurde mit Alufolie umwickelt, um das Calcein vor Licht zu schützen und für 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit Zentrifugation (450 x g, 5 min, bei Raumtemperatur) und Mediumwechsel. Dazu wurde der Überstand zunächst verworfen und im ersten Waschschriff mit 10 mL Medium resuspendiert und gewaschen, im zweiten Waschschriff mit 8 mL Medium. Die Suspension wurde anschließend durch einen 40  $\mu$ m Filter gegeben und mit einem 15 mL Falconröhrchen aufgefangen. Der Filter wurde im Anschluss zwei Mal mit Medium gespült. Die für 24 h stimulieren EA.hy926 Zellen (mit DMSO, 10 ng/mL TNF- $\alpha$  und 0,5  $\mu$ M Yoda1) wurden zunächst in 12-Well Platten mit Medium gewaschen und anschließend mit den

Calcein-markierten Neutrophilen für 20 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm und 535 nm Emissionswellenlänge bestimmt.

### 2.2.2.6 Rho GTPase Aktivität - GLISA

Der GLISA Test ist eine Sonderform des ELISAs und dient der Bestimmung der aktiven RhoA Proteinaktivität, welche GTP gebunden hat. Rho GTPasen sind an der Regulation von verschiedenen zellulären Prozessen wie Zelladhäsion, Zellteilung, Zellmigration und der Zellproliferation beteiligt (Eckenstaler et al. 2022).

Der Signalweg erfolgt wie in Abbildung 4 dargestellt. ROCK ist außerdem in der Lage die eNOS-Aktivität zu inhibieren (Randar et al. 2025). Darüber hinaus spielt der RhoA/ROCK Signalweg eine wichtige Rolle bei verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Hypertonie (Wirth 2010). Die Bestimmung der Rho-GTPase-Aktivität erfolgte durch die Gebrauchsanweisung des Herstellers (Cytoskeleton Inc., Kat. # BK124, Denver, Colorado, USA). Zunächst wurden EA.hy926 Wildtyp und CRISPR- Zellen für 24 h einem Mangelmedium ausgesetzt (DMEM mit Penicillin/Streptomycin, ohne FCS). Nach Ablauf der 24 h wurden die Zellen mit DMSO, 10 ng/mL TNF- $\alpha$  und 0,5  $\mu$ M Yoda1 stimuliert und für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellkulturschalen wurden schließlich dem Inkubator entnommen, sofort auf Eis gestellt und mit eiskaltem PBS gewaschen, um Serumproteine zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 300  $\mu$ L Lysepuffer und Proteaseinhibitor-Cocktail lysiert. Die mit dem Zellschaber geernteten Zellen wurden in ein 1,5 mL Polypropylengefäß überführt und sofort zentrifugiert (10000 x g, 1min, 4 °C). Hieraus wurden 30  $\mu$ L für die Proteinquantifizierung eingesetzt. Des Weiteren wurden 2 x 70  $\mu$ L für die RhoA-Quantifizierung und 130  $\mu$ L des restlichen Lysats im flüssigen Stickstoff eingefroren. Für die Messung der Lysat-Protein-Konzentration wurden 30  $\mu$ L (Änderung zum Protokoll) des Lysats in eine 1 mL Einwegküvette pipettiert. Anschließend wurde dem Lysat 1 mL des Precision Red™ Advanced Protein Assay Reagenz hinzugefügt und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Der Leerwert mit dem Lysepuffer wurde bei 60 nM ermittelt und die Extinktion der Proben wurde

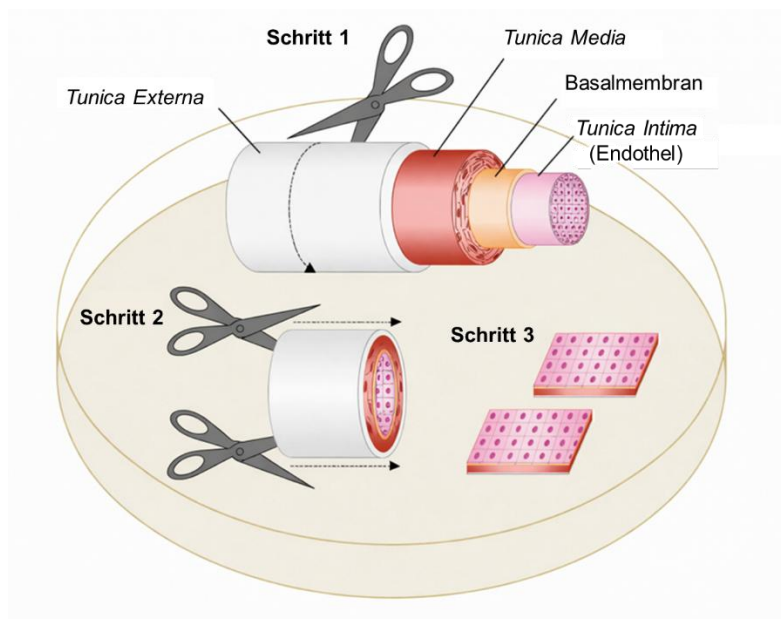
abgelesen. Die Proteinkonzentration soll laut Hersteller zwischen 0,4 und 2,0 mg/mL liegen, was auf alle Proben zutrif.

Für den G-LISA Assay wurden 60 µL Lysepuffer mit 60 µL eiskaltem Bindungspuffer gemischt und auf Eis gelagert (Pufferleerwert). Darauf wurden 12 µl Rho-Kontrollprotein mit 48 µL Zellysepuffer und 60 µL Bindungspuffer gemischt und auf Eis gestellt (Positivkontrolle). Die Rho-Platten mit dem enthaltenen Pulver wurden auf Eis gestellt mit 100 mL eiskaltem Wasser aufgefüllt. Jedem Lysat wurden jeweils 60 µL Bindungspuffer hinzugefügt. Nach dem Durchmischen wurden sowohl je 50 µL Lysat als auch 50 µL Pufferleerwertkontrolle und RhoA Positivkontrolle in die Vertiefung der vorbereiteten Rho-Platte pipettiert und auf Eis gestellt. Die Platte wurde für 30 min auf einen Schüttler (200 U/min) in einem Kühlraum bei 4 °C gestellt. Während der Inkubation wurde der primäre Anti-RhoA-Antikörper im Verdünnungspuffer verdünnt (1:250). Nach den 30 min wurde die Platte zweimal mit 200 µL Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde sofort 200 µL des Antigenpräsentationspuffers in jedes Well pipettiert und genau 2 min inkubiert. Nach Entfernen des Antigenpräsentationspuffers wurde erneut mit 200 µL Waschpuffer gewaschen. Danach wurde 50 µL des Anti-RhoA-Antikörpers in jedes Well pipettiert und für 45 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (200 x g) inkubiert. Während der Inkubation wurde der sekundäre HRP-markierte Antikörper im Verdünnungspuffer verdünnt (1:62,5). Nach einem erneuten Waschschrift wurden 50 µL des sekundären Antikörpers in jedes Well pipettiert und für 45 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (200 x g) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die HRP-Detektionsreagenzien A und B (vor Licht schützen) in gleichen Mengen gemischt und anschließend jedem Well hinzugefügt (50 µL), welche zuvor erneut mit 200 µL Waschpuffer gewaschen wurden. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37 °C, wurde jedem Well 50 µL HRP-Stopp-Puffer hinzugefügt. Abschließend wurde die Absorption bei 490 nm in einem Mikroplatten-Spektrophotometer abgelesen.

### **2.2.2.7 Ex-vivo Aorten-Präparation für AFM-Messungen**

Die Bereitstellung von EC-spezifischen Piezo1-Knockout-Mäusen Cdh5CreER2 erfolgte durch Prof. Dr. Stefan Offermanns (Max-Planck-Institut für Herz- und

Lungenforschung, Bad Nauheim, Deutschland). Die Aorten wurden auf Trockeneis verschickt. Nach Erhalt der Aorten wurden diese umgehend, wie in Abbildung 11 dargestellt präpariert. Zunächst wurden die Aorten vom umgebenden Gewebe bereinigt und in Ringe geschnitten. Durch einen Längsschnitt wurden die Ringe geöffnet, sodass die Präparate eine Größe von ca. 4 mm<sup>2</sup> aufwiesen. Die Aortenpräparate wurden mit den Zellen nach oben gerichtet auf Deckgläser geklebt (1,4 mg/ mL Cell-Tak® BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA) und die ECs auf den Aortenpatches wurden mit TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und Yoda1 (0,5  $\mu$ M) stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Höhe der eGC und die Steifigkeit des Kortex mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy) gemessen.

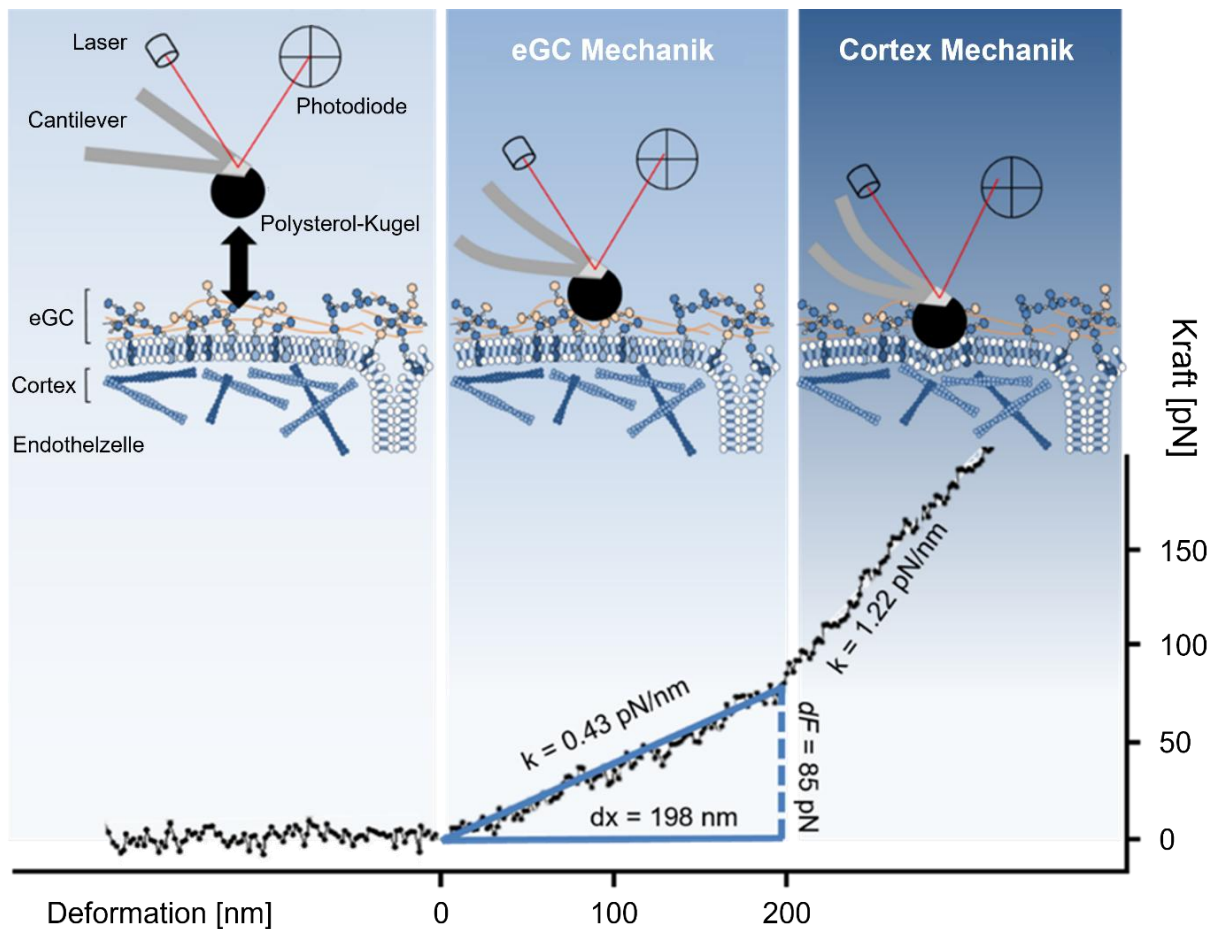


**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Mäuseaorten-Präparation.** Im ersten Schritt wurde das umliegende Gewebe entfernt und die Aorten in Ringe geschnitten. Im zweiten Schritt wurden die Ringe durch einen Längsschnitt geöffnet. Im dritten Schritt wurden die Aortenpräparate auf Deckgläser geklebt (verändert nach Wiesinger et al. 2013).

### 2.2.3 Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy*)

Das Rasterkraftmikroskop (*Atomic Force Microscope* – AFM) ermöglicht die Untersuchung von Zelloberflächen und Zelleigenschaften. Wie in Abbildung 12

dargestellt wird dafür ein metallischer, triangulärer Cantilever, an dessen Spitze sich eine Polyesterol-Kugel (10  $\mu\text{m}$  Durchmesser) befindet, in Kontakt mit einer konfluenten Einzelschicht von endothelialen Zellen gebracht (Federkonstante 10 pN/nm für eGC und 30 pN/nm für Cortex). Dabei wird ein Laserstrahl auf den goldbeschichteten Cantilever gerichtet. Durch den Kontakt mit der Zelloberfläche, kommt es zur Biegung des Cantilevers. Die Ablenkung des Lasers, der auf die Cantileverspitze gerichtet ist, wird durch die Photodiode detektiert (V).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Nanoindentation Messung.** Der Cantilever mit einer Polyesterol-Kugel wird an die Zelloberfläche herangeführt. Durch den Kontakt mit der Zelle wird der Cantilever gebogen, was durch eine Photodiode über die Auslenkung des Lasersignals detektiert und in eine Kraft-Distanz-Kurve konvertiert wurde.

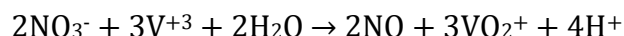
Um die notwendige Kraft ( $F$ ) zum Eindringen der Zelle zu bestimmen, wurden die Federkonstante und Deflektionsempfindlichkeit ( $\alpha$ ) mittels kontaktbasierter Kalibration und *thermal-noise* Verfahren determiniert ( $F = V \times \alpha \times K_{\text{cant}}$ ). Die

Deflektionsempfindlichkeit wird durch das Drücken auf ein Deckglas bestimmt. Wenn der Cantilever in Kontakt mit dem Deckglas gebracht wird, wird dieser nach oben gebogen. Durch Ablenkung des Lasers auf der Photodiode entsteht eine Kraft-Distanz-Kurve. Der Kehrwert der Steigung des linearen Anstiegs der Kraft-Distanz-Kurve stellt die Deflektionsempfindlichkeit dar. Beim *thermal-noise* Verfahren wird die thermisch angeregte freie Schwingung des Cantilever gemessen. Das Frequenzspektrum der Schwingungen wertet die NanoWizard Software aus, wodurch die Federkonstante bestimmt werden kann. Durch die Piezo-Dehnung ( $x_{piezo}$ ) lässt sich die Deformation der Probe ( $x_{sample}$ ) kalkulieren ( $x_{sample} = x_{piezo} - (\alpha \times V)$ ). Durch das Hook'sche Gesetz „ $F = D \times \Delta x$ “, wobei  $D$  die Federkonstante repräsentiert und  $\Delta x$  die Längenänderung (Biegung des Cantilever) darlegt, lässt sich die Steifigkeit der Probe ermitteln. Die daraus resultierenden Kraft-Distanz-Kurven dienen als Grundlage für die Bestimmung der Höhe und Steifigkeit der endothelialen Glykokalyx und des Zellkortex. Die Bestimmung der Höhe und Steifigkeit erfolgte an HUVECs und EA.hy926 Zellen sowie an Mäuseaorten. Diese wurden zuvor für 24 h mit 10 ng/mL TNF- $\alpha$  und 0,5  $\mu$ M Yoda1 stimuliert. Die mit HUVECs und EA.hy926 Zellen bedeckten Deckgläser wurden in 35 mm Schalen geklebt. Anschließend wurde 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure HEPES Puffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Glucose, 10 mM HEPES) hinzugefügt. Für Glykokalyx-Messungen wurde dem HEPES Puffer 1 % FCS beigefügt. Pro Deckglas wurden 20-27 Zellen mit jeweils 8 Kurven gemessen. Die Auswertung der Kraft-Distanz-Kurven erfolgte mittels Nanoindentation-Analyse Software PUNIAS (Philippe Carl & Paul Dalhaimer, punias@free.fr Version 1.0). Im Verlauf der Kraft-Distanz-Kurven mit entsprechendem Cantilever lässt sich aus dem ersten Anstieg die Höhe ( $dx$ ) und die Steifigkeit  $e_{GC}$  bzw. die Steifigkeit des Kortex ableiten. Kurven, die keine gleichmäßige oder flache Annäherung vor dem ersten Kontakt haben, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Die Daten wurden anschließend in OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA) exportiert. Des Weiteren flossen nur Zellen mit mindestens 4 auswertbaren Kurven in die Analyse ein. Die statistische und graphische Analyse der selektierten Kraft-Distanz-Kurven erfolgte durch GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA).

## 2.2.4 Quantifizierung von Stickstoffmonoxid

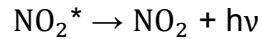
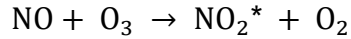
Stickstoffmonoxid (NO) erfüllt im Endothel wichtige Aufgaben. Zum einen ist NO ein wichtiger Regulator des peripheren Blutdrucks. Wie bereits beschrieben, ist NO in der Lage in glatte Muskelzellen zu diffundieren, wo es eine Vasodilatation bewirkt, was zu einer Senkung des Blutdrucks führt. Darüber hinaus verhindert NO die Thrombozytenaggregation und die Monozytenadhäsion und ist außerdem an der Regulierung der vaskulären Permeabilität beteiligt. Daraus lässt sich ableiten, dass NO ein wichtiger Marker für die Integrität von Endothelzellen darstellt.

Zur Bestimmung der NO-Konzentration wurden zunächst GM7373 Zellen in 24-Well Platten ausgesät. Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren, wurden die Zellen für 24 h mit 10 ng/mL TNF- $\alpha$  und 0,5  $\mu$ M Yoda1 stimuliert. Nachdem die Zellüberstände gesammelt wurden, folgte die Proteinfällung der Proben, um interferierende Proteine zu entfernen. Als Vorbereitung wurden Polypropylengefäße zweimal mit entionisiertem Wasser gewaschen, um Kontaminationen von Nitrit- und Nitrat-Derivaten zu entfernen. Je 100  $\mu$ L der Überstände wurden in den zuvor gewaschenen Gefäßen mit 200  $\mu$ L eiskaltem 99 %igem Ethanol (1:3) durch vortexen für 10 sec durchmischt. Anschließend wurden die Proben für 30 min auf Eis gestellt. Darauf wurden die Proben zentrifugiert (14000 x g, 5min, 4 °C). Die Überstände der Proben wurden entnommen und bis zur Messung bei -80 °C gelagert. Die Ermittlung und Analyse der NO-Konzentrationen der Zellkulturüberstände von GM7373 Zellen erfolgte durch den Zysense NOA208i *Analyzer* (GE Water & Process Technologies, Analytic Instruments; Boulder, Colorado, USA). Duplikate zu je 100  $\mu$ L der deprotonierten Proben wurden über eine Spritze durch den Injektionsport injiziert. Das dort enthaltene Reduktionsmittel Vanadiumchlorid reduziert Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) bei ca. 95 °C zu NO:



Das Vanadiumchlorid wandelt außerdem Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und S-Nitrose-Verbindungen wie Nitroarginin, Natrium-Nitroprussid und Nitroglycerin, in NO um. Das nun freigesetzte NO wird in den Kondensator geleitet, um interferierende Komponenten zu minimieren. Von dort gelangt es in eine NaOH-Falle (1 M NaOH), wo Säuredämpfe entfernt

werden. Schließlich wird NO in den Analyzer geleitet, wo NO mit Ozon (O<sub>3</sub>) gemischt wird:



Dabei entsteht angeregtes Stickstoffmonoxid (NO<sub>2</sub>\*), welches umgehend in seinen ursprünglichen Zustand zurückfällt. Ein Detektor ist in der Lage, das emittierte Licht mit einer Wellenlänge größer als 600 nm wahrzunehmen. Die Intensität des detektierten Lichts ist dabei proportional zur NO-Konzentration. Die Kalibrierungskurve wurde unter Verwendung von 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM, 5 µM, 10 µM und 100 µM NaNO<sub>3</sub><sup>-</sup> mit der NOAnalysis™ Software (Version 3.2) berechnet.

### 2.2.5 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse und zur graphischen Auswertung der generierten Daten, wurde die Software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA) verwendet. Innerhalb der statistischen Analyse wurden Ausreißer durch den ROUT Ausreißer Test (*Robust Regression and Outlier Removal*) eliminiert (*False Discovery Rate* (FDR); Q Wert = 1 %). Der Test beruht auf einer robusten nichtlinearen Regression. Die Residuen der robusten Kurve werden analysiert, um Ausreißer zu ermitteln. Basierend auf der FDR werden jene Punkte identifiziert, welche signifikante Abweichungen aufweisen. Diese Ausreißer werden eliminiert (Motulsky und Brown 2006).

Zur Überprüfung der Normalverteilung diente der D'Agostino-Pearson Test oder Shapiro-Wilk Test. Dabei eignet sich der Shapiro-Wilk Test besonders für kleine Stichproben im Vergleich zum D'Agostino-Pearson Test (Mishra et al. 2019). Für Vergleiche von zwei Testgruppen wurde der Student's t-Test (parametrische Daten) oder der Mann-Whitney-U-Test (nicht-parametrische Daten) angewendet. Gruppenvergleiche zwischen drei oder mehr Gruppen wurden mit Hilfe der einfachen

Varianzanalyse (ANOVA) für parametrische oder mit dem Kruskal-Wallis-Test für nicht-parametrische, Daten analysiert. Als Posthoc Tests wurde der Tukey`s und Dunn`s Test in Abhängigkeit der Normalverteilung angewendet.

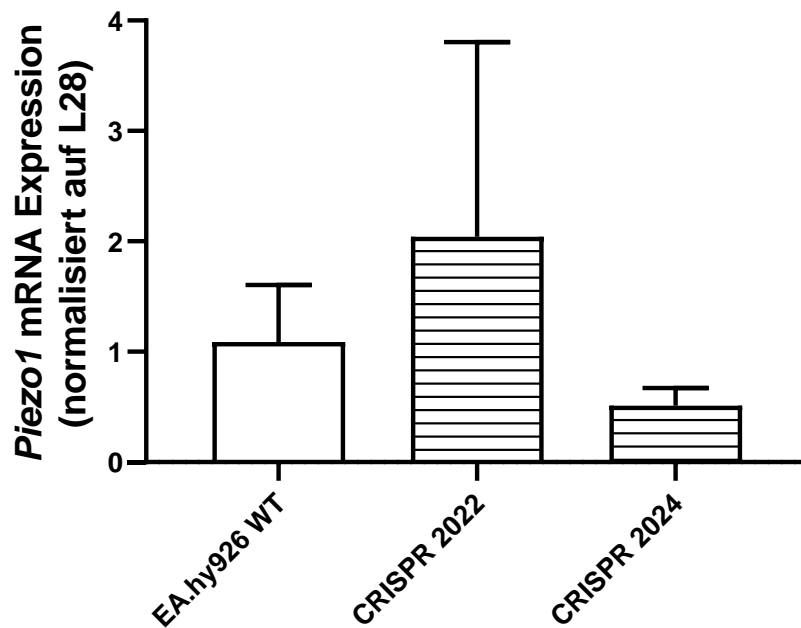
Mit der deskriptiven Statistik wurden der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet. Diese Werte wurden auf eine Nachkommastelle gerundet. Ausnahmen stellten hier die Auswertung der Rho GTPase Aktivität durch die GLISA-Methode und der Syndecan ELISA dar. Aufgrund der niedrigen Werte wurden für diese Ergebnisse mehr als eine Nachkommastelle angegeben.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Quantifizierung des Piezo1-Knockouts durch CRISPR-Cas9

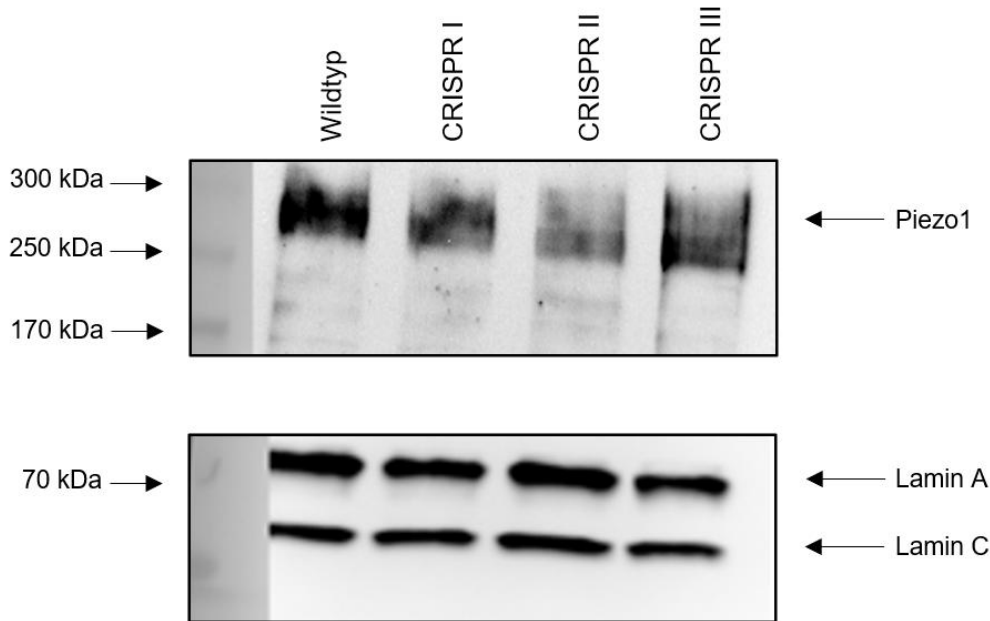
Um den Einfluss von Piezo1 auf die endotheliale Nanomechanik und seine Rolle bei vaskulären Entzündungen zu untersuchen, wurde in Vorarbeit der Arbeitsgruppe ein Piezo1-Knockout mittels CRISPR-Cas9 generiert. Um den Erfolg der Methode zu überprüfen, wurde zunächst der generierten Piezo1 CRISPR-Zellen von Eurofins genomics sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, wie bereits unter 2.2.2.1 beschrieben, eine Basenverschiebung, die zur Insertion eines vorzeitigen Stopcodons an Position 106 führte. Dieser CRISPR-Klon wurde durch Erik Hertel generiert (siehe Doktorarbeit Erik Hertel, Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck). Es konnte jedoch unter anderem durch Immunfluoreszenz-Färbungen mit einem spezifischen Piezo1-Antikörper gezeigt werden, dass diese generierten Piezo1 CRISPR-Zellen einen partiellen Knockout, nicht aber einen vollständigen Knockout aufwiesen. Diese CRISPR-Zellen zeigten zwar eine signifikante Reduzierung der Piezo1-Kanäle innerhalb der Piezo1 CRISPR-Zellen im Vergleich zu EA.hy926 Wildtyp Zellen (siehe Doktorarbeit Erik Hertel, Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die CRISPR-Cas9-Methode mehrfach wiederholt, um einen vollständigen Piezo1-K.O. zu generieren. Die Sequenzierungen zeigten jedoch nicht den gezielten Einbau des Stopcodons. Infolgedessen wurden die Piezo1 CRISPR-Zellen aus Vorarbeiten von Erik Hertel erneut vereinzelt. Die Überprüfung der ursprünglichen Piezo1 CRISPR-Zellen und der neu vereinzelt Piezo1 CRISPR-Zellen erfolgte durch die quantitative *real-time* PCR. CRISPR 2022 bezeichnet den ursprünglich erzeugten Piezo1-K.O. Klon durch die CRISPR-Cas9 Methode, CRISPR 2024 bezeichnet die neu vereinzelt Piezo1 CRISPR-Zellen. Die *piezo1*-Expression wurde durch die Anwendung der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode analysiert. Die Auswertung ergab, wie in Abbildung 13 dargestellt, dass das Expressionslevel von Piezo1 in CRISPR 2024 Zellen auf  $0,5 \pm 0,2$  verringert war, im Vergleich zu Wildtyp-Zellen ( $1,1 \pm 0,5$ ). Die CRISPR 2022 Zellen hingegen zeigten eine höhere Piezo1-Expression ( $2,0 \pm 1,8$ ). Da die CRISPR 2024 Zellen eine deutlich verringerte *piezo1* mRNA Expression zeigte,

wurde im weiteren Verlauf der Experimente auf diesen Klon zurückgegriffen (fortan als „CRISPR“ bezeichnet).

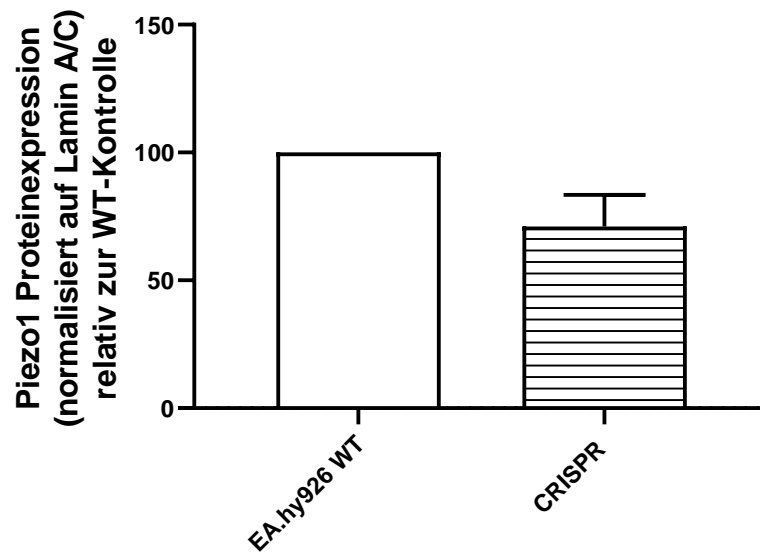


**Abbildung 13: Relative *piezo1* mRNA Expression in Wildtyp EA.hy926 und Piezo1 CRISPR-Zellen.** Durch qPCR wurde die *piezo1*-Expression untersucht. CRISPR 2022 repräsentiert die ursprünglichen CRISPR EA.hy926 Zellen. CRISPR 2024 bezeichnet Piezo1 CRISPR-Zellen, die erneut vereinzelt wurden (Kruskal-Wallis-Test: N = 1, n = 4; nicht signifikant).

Anschließend wurde die Piezo1-Proteinexpression in CRISPR-Zellen über die Western Blot Analyse ermittelt. Dazu wurde je 40 µg Lysat von EA.hy926 Wildtyp-Zellen und drei Lysate von CRISPR EA.hy926 Zellen (CRISPR I-III), welche aus unterschiedlichen Splitvorgängen stammten, auf ein Gradientengel geladen. Wie in Abbildung 14 dargestellt, zeigten sowohl Wildtyp EA.hy926 Zellen als auch alle CRISPR-Proben eine Bande um 300 kDa, was dem Molekulargewicht von Piezo1 entspricht. Bei einem erfolgreich durchgeführten Knockout durch die CRISPR-Cas9-Methode wäre keine Piezo1 Bande zu erwarten gewesen. Dennoch war Piezo1 in CRISPR-Zellen nachweisbar. Allerdings ist der Piezo1-Proteingehalt, der durch qPCR ermittelt wurde, in den Piezo1 CRISPR-Zellen geringer als in Wildtyp EA.hy926 Zellen (siehe auch Abbildung 15). Leider waren zwischen N1-3 große Unterschiede zu erkennen. Bei einzelner Betrachtung (nicht dargestellt) zeigte CRISPR II dabei eine besonders stark reduzierte Piezo1-Expression.



**Abbildung 14: Auswirkung des CRISPR-Cas9-Knockouts auf die Piezo1-Proteinexpression.** Zur Überprüfung des Piezo1-Knockouts durch CRISPR-Cas9 wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. EA.hy926 Wildtyp-Zellen und Piezo1 CRISPR-Zellen wurden lysiert und der Proteingehalt durch die Western Blot Analyse und Piezo1-Antikörper visualisiert. Die Ladungskontrolle erfolgte durch Lamin A und C. CRISPR I bis III stellen verschiedene Lysate dar, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten erstellt wurden (N = 1, n = 1-3).

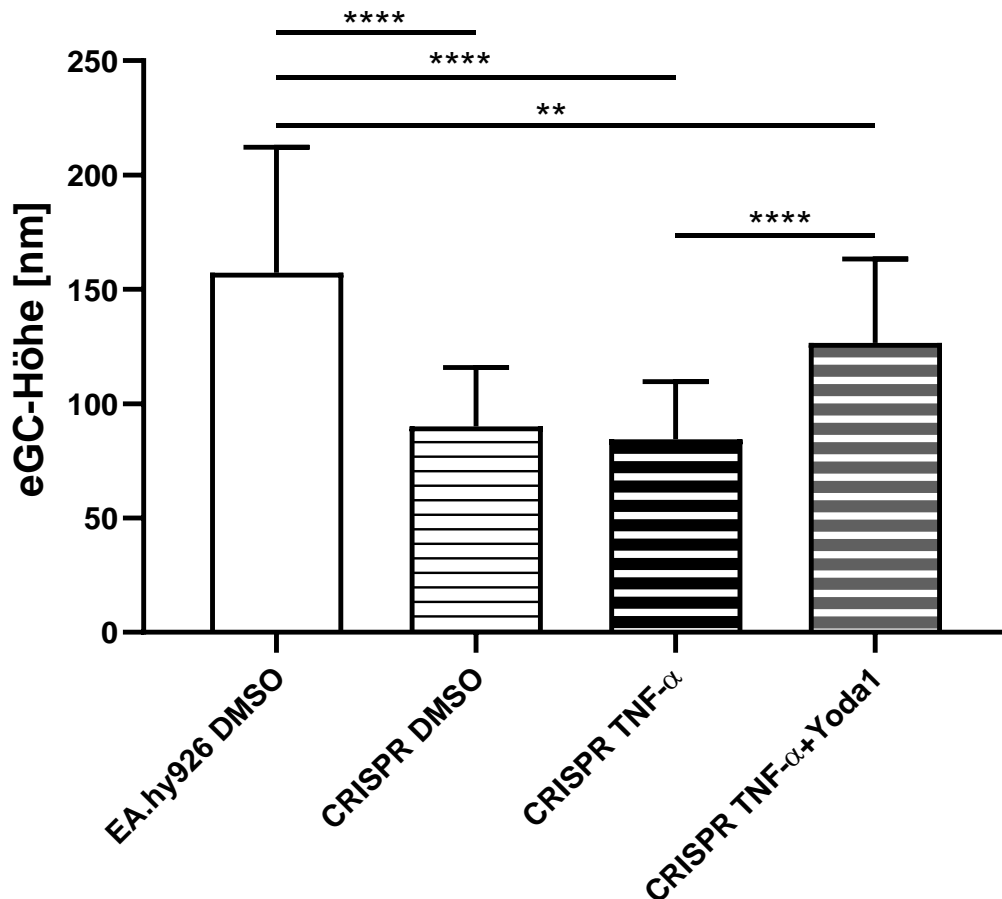


**Abbildung 15: Nachweis der Expression von Piezo1 in EA.hy926 Wildtyp-Zellen und in Piezo1 CRISPR-Zellen durch Western Blot Analyse.** Die relativen Signalintensitäten wurden mit AIDA ermittelt. Dargestellt sind die relative Piezo1-Proteinexpression (normalisiert auf Lamin A/C) in Piezo1 CRISPR-Zellen im Vergleich zu EA.hy926 Wildtyp-Zellen (Student's t-Test: N = 1 für EA.hy923 WT und N = 3 für CRISPR, nicht signifikant).

Das Expressionslevel entsprach nur noch 47 % relative zu den Wildtyp-Zellen. Insgesamt lässt sich daraus ableiten, dass der generierte Klon keinen vollständigen Knockout von Piezo1 aufweist, sondern einen partiellen. CRISPR I (77 %) und III (89 %) wiesen eine etwas höhere Piezo1-Expression im Vergleich zu CRISPR II auf. Da jedoch eine signifikant verringerte Piezo1-Expression in Piezo1 CRISPR-Zellen II nachgewiesen werden konnte, wurden weitere Versuche mit dem Klon dieser Passage weitergearbeitet.

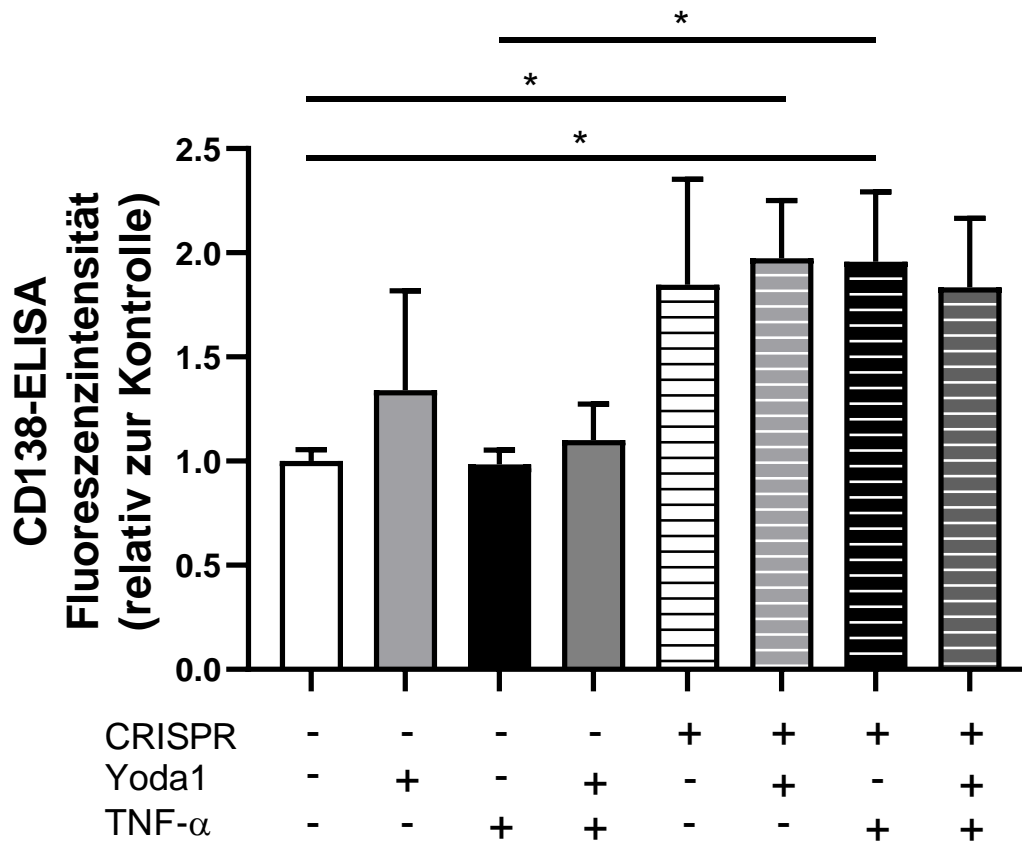
### **3.2 Partieller Piezo1-Knockout führt zur Schädigung der eGC**

Unter Verwendung der CRISPR-Cas9-Methode sollte die Auswirkung eines Piezo1-K.O. auf die endotheliale Nanomechanik bestimmt werden. Dazu wurde die eGC-Höhe der unstimulierten Piezo1 CRISPR-Zellen bzw. nach 24-stündiger Inkubation mit Yoda1 und TNF- $\alpha$  mittels AFM-Messungen bestimmt. Die durchschnittliche eGC-Höhe unter Kontrollbedingungen (EA.hy926) betrug  $157,4 \pm 54,8$  nm (Abbildung 16). Die partielle Piezo1-K.O. CRISPR-Zellen zeigten eine signifikant verringerte eGC-Höhe ( $90,0 \pm 25,8$  nm) im Vergleich zu EA.hy926 Wildtyp-Zellen. Darüber hinaus zeigten Piezo1 CRISPR-Zellen, welche mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurde ( $84,5 \pm 25,3$  nm), eine Verringerung der eGC-Höhe um 50,9 % im Vergleich zu EA.hy926 DMSO. Eine gleichzeitige Behandlung mit TNF- $\alpha$  und Yoda1 konnte den Effekt abmildern ( $126,5 \pm 36,8$  nm), jedoch wird das eGC-Niveau der EA.hy926 DMSO Kontrollgruppe nicht erreicht.



**Abbildung 16: Piezo1-K.O. führt zu einer reduzierten eGC-Höhe.** Der durch CRISPR-Cas9 induzierte Piezo1-K.O. führt zu einer verringerten eGC-Höhe. Mithilfe der Rasterkraftmikroskopie wurde die eGC-Höhe nativer EA.hy926-Zellen mit einer Population von CRISPR-Cas9 Zellen verglichen. Dabei zeigten die CRISPR-Cas9 Zellen eine Verringerung der eGC-Höhe im Vergleich zu DMSO-Kontrollbedingungen. Darüber hinaus wurde eine mögliche Wirkung von Yoda1 in der Piezo1-K.O. untersucht (Kruskal-Wallis-Test: N = 7, n = 159-183; p-Wert: \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ).

Da Piezo1 CRISPR-Zellen eine geringere eGC-Höhe im Vergleich zu EA.hy926 Wildtyp-Zellen aufwiesen, sollte im nächsten Schritt ein Syndecan ELISA durchgeführt werden, um den Abbau der eGC über eGC-Bestandteile im Zellüberstand nachzuweisen. Dazu wurden EA.hy926 Wildtyp-Zellen und Piezo1 CRISPR-Zellen mit Yoda1 und TNF- $\alpha$  behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.



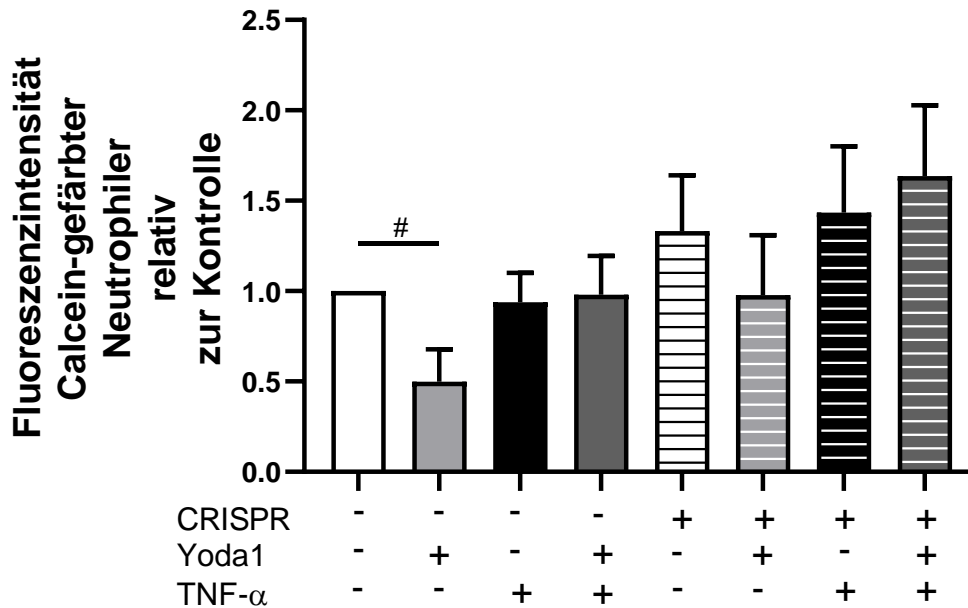
**Abbildung 17: Piezo1 beeinflusst die Menge an verdautem Syndecan in Endothelzellen.** EA.hy926 Wildtyp (ausgefüllte Balken) und Piezo1 CRISPR-Zellen (gestreifte Balken) wurden für 24 h mit Yoda1 und TNF- $\alpha$  stimuliert. Anschließend wurde die Syndecan-Konzentration in Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt (Kruskal-Wallis Test: N = 3, n = 6; \*: p < 0,05).

Die Menge an Syndecan im Überstand stieg signifikant von  $0,06 \pm 0,003$ . (EA.hy926 DMSO) auf  $0,12 \pm 0,017$  (CRISPR Yoda1) und  $0,12 \pm 0,02$  (CRISPR TNF- $\alpha$ ) an. Auch ein Vergleich zwischen EA.hy926 TNF- $\alpha$  ( $0,060 \pm 0,004$ ) und CRISPR TNF- $\alpha$  ( $0,120 \pm 0,020$ ) zeigt eine steigende Syndecan-Konzentration. Die Tendenz zu einer höheren Syndecan-Konzentration innerhalb der Piezo1 CRISPR-Zellen war dabei klar zu erkennen. Diese Beobachtung wird außerdem durch WGA-Färbungen (*wheat-germ-agglutinin*) unserer Arbeitsgruppe gestützt (siehe Doktorarbeit Erik Hertel, Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck). Allerdings konnte entgegen den Erwartungen kein signifikanter Anstieg von Syndecan nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  in EA.hy926 Zellen beobachtet werden, was die Interpretation erschwert.

### **3.3 Piezo1 Aktivierung verringert die Immunzelladhäsion**

Chronische Veränderungen der Endotheloberfläche sind mit Gefäßentzündungen assoziiert. Daher war es das Ziel den Einfluss von Yoda1 auf Endothelzellen bei TNF- $\alpha$ -induzierten Entzündungen zu untersuchen. Vorausgehende Studien unserer Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass nach Stimulation von ECs mit Yoda1 weniger Monozyten an Endothelzellen adhärieren. Darüber hinaus zeigte die Einzelzell-Spektroskopie, dass nach der Zugabe von Yoda1 die Adhäsionskräfte zwischen Monozyten und Endothelzellen reduziert war (siehe Doktorarbeit Erik Hertel, Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck).

Durch weiterführende Studien sollte untersucht werden, ob Piezo1 auch die Adhäsion von Neutrophilen an Endothelzellen beeinflusst. Dazu wurden humane Neutrophile isoliert und mit Endothelzellen inkubiert. Die ECs wurden zuvor für 24 h mit Yoda1 und TNF- $\alpha$  stimuliert. Die statistische Auswertung mittels ANOVA ergab keine Signifikanzen innerhalb der Gruppen (siehe Abbildung 18). Dennoch zeigte der Student's t-Test zwischen EA.hy926 DMSO und EA.hy926 Yoda1 einen signifikanten Unterschied (p-Wert: 0,0483).

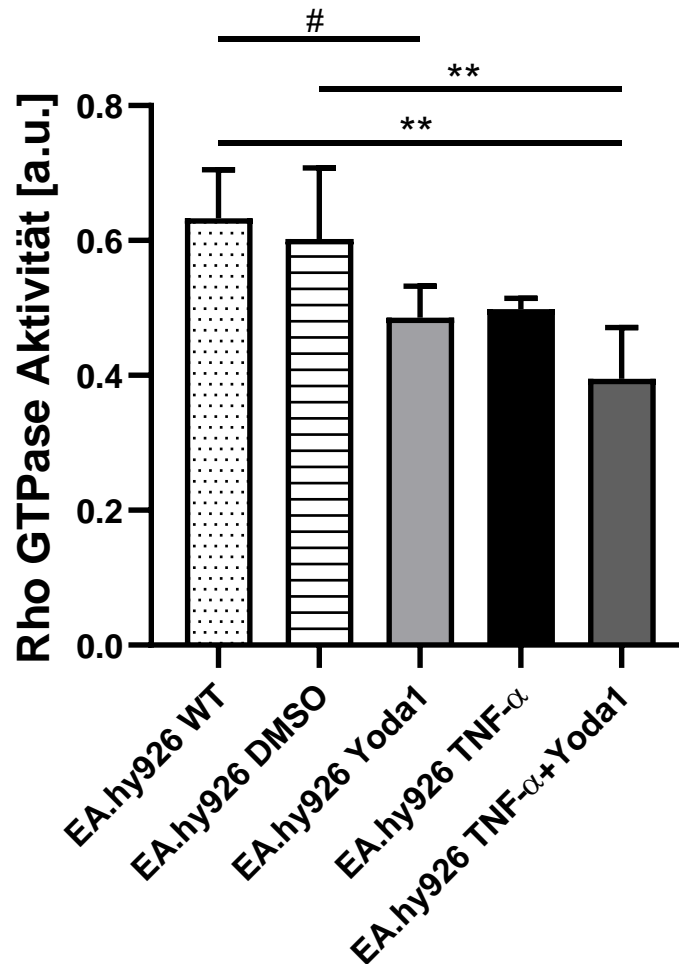


**Abbildung 18: Einfluss von Piezo1 auf die Adhäsion von Neutrophilen.** Isolierte Calcein-gefärbte Neutrophile wurden mit Endothelzellen inkubiert. Diese wurden für 24 h mit Yoda1 und TNF- $\alpha$  stimuliert (Student's t-Test: N = 5, n = 10; p-Wert: # 0,0483).

### 3.4 Piezo1 Aktivierung verringert die Rho GTPase Aktivität

Vorausgehende Studien unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die chemische Aktivierung von Piezo1 durch seinen Aktivator Yoda1 zu einer geringeren Steifigkeit des Zellkortex und zu einer Steigerung der eGC-Höhe führt (unpubliziert). Diese Faktoren sind charakteristisch für ein gesundes Endothel. Ein weicher Zellkortex trägt außerdem zu einer flussinduzierten NO-Produktion bei, während ein steifer Zellkortex mit einer gestörten NO-Produktion assoziiert ist (Fels und Kusche-Vihrog 2020). Der steife Zellkortex wird dabei über die Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalwegs vermittelt. Die Aktivierung induziert die Bildung von Stressfasern und verstärkt die zelluläre Kontraktilität (Aguilar et al. 2023). Der RhoA/ROCK-Signalweg ist außerdem an der Funktion der eNOS beteiligt. RhoA/Rock senkt die Stabilität der eNOS-mRNA, wodurch die eNOS-Expression vermindert wird (Yao et al. 2010). Unter inflammatorischen Bedingungen wird RhoA aktiviert und sorgt für eine Störung der Barrierefunktion (Kugelmann et al. 2018). Um die Bedeutung der Rho GTPasen, welche als Modulator der Aktinpolymerisation bekannt sind, zu quantifizieren, wurde

ihre Aktivität mittels ELISA-basierter Analyse überprüft. Wie in Abbildung 19 dargestellt, zeigten EA.hy926 welche mit TNF- $\alpha$  und Yoda1 stimuliert wurden, die geringste Rho GTPase Aktivität ( $0,4 \pm 0,08$  a.u.).

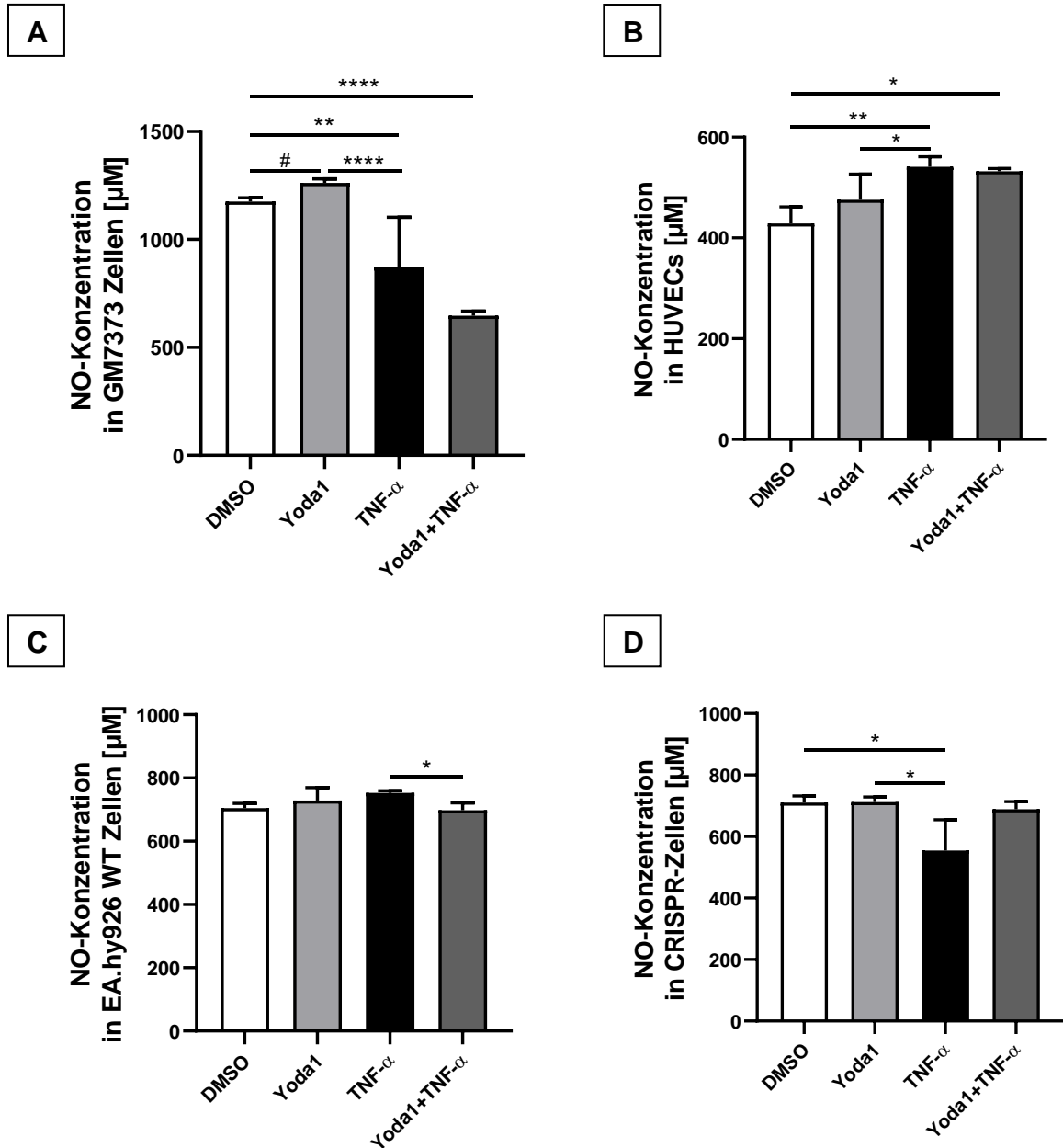


**Abbildung 19: Piezo1 Aktivierung verändert die Rho GTPase Aktivität.** EA.hy926 Zellen wurden für 24 h mit Yoda1 und/oder TNF- $\alpha$  behandelt. Anschließend wurde die Rho GTPase Aktivität analysiert (ANOVA: N = 1, n = 4; p-Wert: \*\*: p < 0.01 und Student's t-Test zwischen EA.hy926 WT und EA.hy926 Yoda1; p-Wert: # 0,0142).

Die Aktivität war dabei signifikant geringer als bei EA.hy926 Wildtyp-Zellen ( $0,6 \pm 0,07$  a.u.) und EA.hy926 DMSO ( $0,6 \pm 0,11$  a.u.). Zwischen allen anderen Gruppen waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Im direkten Vergleich der Kontrolle mit Yoda1-Stimulation ergab sich eine signifikant verringerte Rho-Aktivität (Student's t-Test 0,0142).

### 3.5 Piezo1 Aktivierung wirkt sich auf die NO-Konzentration aus

Um die Auswirkung der Piezo1-Aktivierung auf vaskuläre Entzündungen zu untersuchen, wurden verschiedene Endothelzelllinien für 24 h mit 0,5  $\mu\text{M}$  Yoda1 und 10 ng/mL TNF- $\alpha$  stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden entnommen und anschließend wurde die NO-Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse der NO-Quantifizierung ist in Abbildung 20 dargestellt. Verglichen mit allen Zelllinien konnte in GM7373 Zellen die höchste NO-Konzentration gemessen werden. Dort zeigte die Stimulation mit TNF- $\alpha$  eine deutlich verringerte NO-Konzentration von  $871,3 \pm 231,9 \mu\text{M}$  im Vergleich zur DMSO-Kontrolle  $1176,0 \pm 17,2 \mu\text{M}$ . Die Stimulation mit Yoda1 führte zu einem Anstieg der NO-Konzentration auf  $1262,0 \pm 18,7 \mu\text{M}$ . Die statistische Auswertung zwischen DMSO und Yoda1 zeigte eine Signifikanz mit einem P-Wert von  $<0,0001$  (Abbildung 20A). Dieses Ergebnis unterstützt die bisherigen Untersuchungen, dass die Aktivierung von Piezo1 sich positiv auf die Endothelfunktion auswirkt. Die NO-Konzentration in HUVECs zeigte im Vergleich zu GM7373 Zellen eine deutlich geringere NO-Konzentration. Entgegen den Erwartungen zeigte eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  eine höhere NO-Konzentration  $541,4 \pm 20,2 \mu\text{M}$  im Vergleich zur DMSO-Kontrolle  $428,9 \pm 32, \mu\text{M}$  7 (Abbildung 17B). In EA.hy926 WT Zellen führte eine gleichzeitige Stimulation mit Yoda1 und TNF- $\alpha$  ( $697,6 \pm 23,8 \mu\text{M}$ ) zu einer Abnahme der NO-Konzentration im Vergleich zur Stimulation mit ausschließlich TNF- $\alpha$  ( $752,7 \pm 6,6 \mu\text{M}$ ). Wie in Abbildung 20D dargestellt, zeigte sich innerhalb der Piezo1 CRISPR-Zellen eine signifikant reduzierte NO-Konzentration nach der Behandlung mit TNF- $\alpha$  ( $554,2 \pm 100,3 \mu\text{M}$ ) im Gegensatz zur Kontrolle ( $710,2 \pm 22,3 \mu\text{M}$ ). Durch eine hohe Streuung innerhalb der TNF- $\alpha$  Probe, konnte keine Signifikanz zwischen TNF- $\alpha$  und Yoda1+TNF- $\alpha$  ( $668,5 \pm 24,9 \mu\text{M}$ ) ermittelt werden.

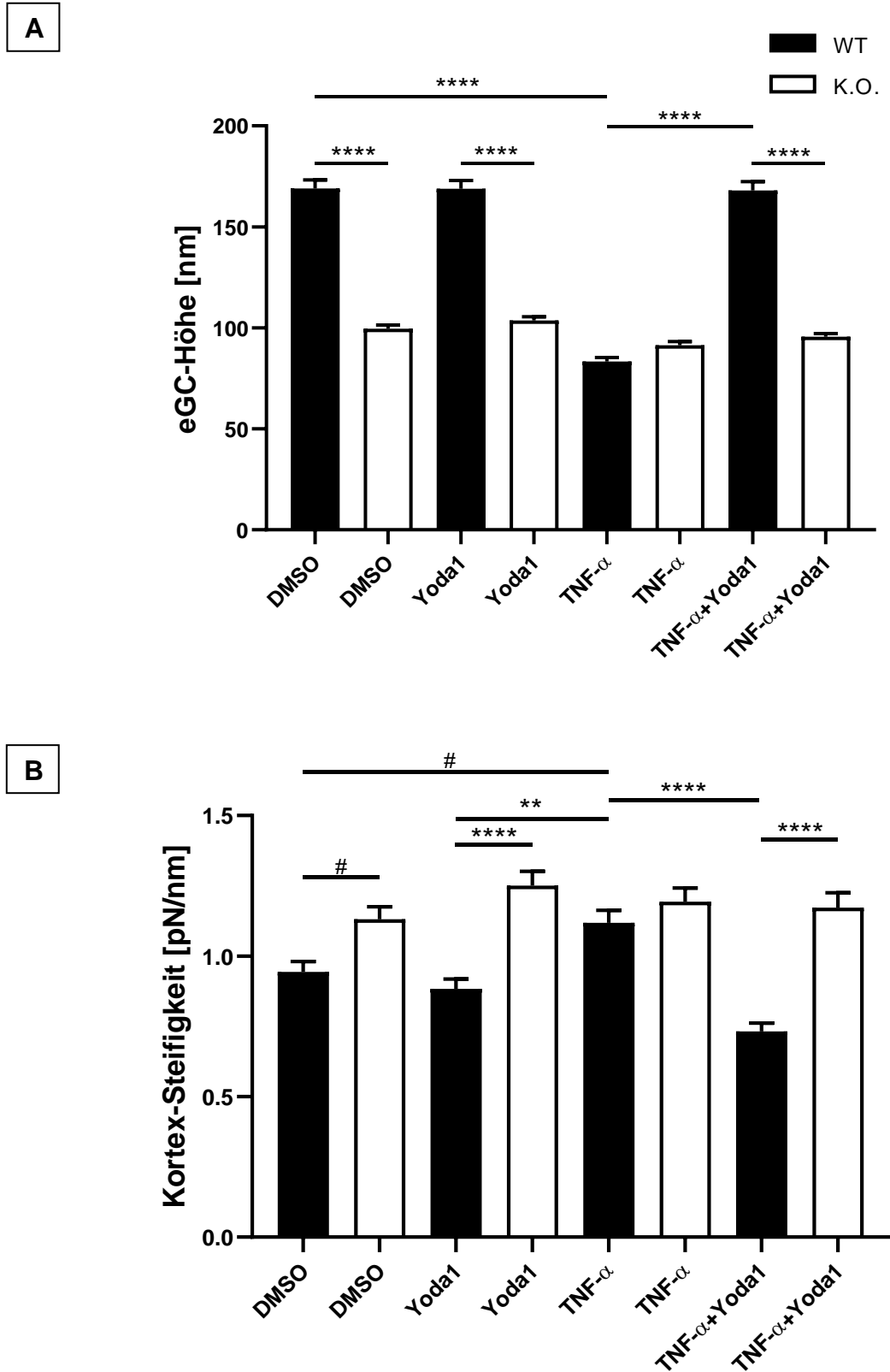


**Abbildung 20: Quantifizierung von Stickstoffmonoxid in Zellkulturüberständen.** Verschiedene Endothelzellen wurden für 24 h mit 0,5 µM Yoda1 und 10 ng/mL TNF-α stimuliert. Anschließend wurde die NO-Konzentration in Zellkulturüberständen gemessen. **(A)** NO-Konzentration aus Zellkulturüberständen von GM7373 Zellen (ANOVA: N = 1, n = 6; p-Wert: \*\*\*\*: p < 0,0001; \*\*: p < 0.01 und Student's t-Test zwischen DMSO und Yoda1; p-Wert: # < 0,0001). **(B)** NO-Konzentration aus Zellkulturüberständen von HUVECs (Kruskal-Wallis Test: N = 1, n = 6; \*\*: p < 0.01; \*: p < 0,05). **(C)** NO-Konzentration aus Zellkulturüberständen von EA.hy926 WT Zellen (Kruskal-Wallis Test: N = 1, n = 6; \*: p < 0,05). **(D)** NO-Konzentration aus Zellkulturüberständen von Piezo1 CRISPR-Zellen (Kruskal-Wallis Test: N = 1, n = 6; \*: p < 0,05).

### 3.6 Piezo1 Effekte in *ex vivo* Mäusaorten

Aorten von Endothel-spezifischen Piezo1-K.O.-Mäusen wurden für die weitere *ex-vivo*-Analyse der endothelialen Nanomechanik, also der eGC-Höhe und der Kortex-Steifigkeit, verwendet. Die Aorten-Patches wurden für 24 h mit Yoda1 und TNF- $\alpha$  stimuliert. Anschließend wurde mittels AFM die eGC-Höhe und die Kortex-Steifigkeit gemessen. Abbildung 21A zeigt die eGC-Höhe der Wildtyp Mäusaorten (schwarze Balken) und der EC-spezifischen Piezo1-K.O. Mäusaorten (weiße Balken). Es konnte beobachtet werden, dass der EC-spezifische Piezo1-K.O. eine signifikant geringere eGC-Höhe  $99,5 \pm 27,3$  nm im Vergleich zum Wildtyp zeigte ( $169,1 \pm 60,2$  nm). Weder im Wildtyp noch im K.O. führte die alleinige Stimulation mit Yoda1 zu einer Veränderung der eGC-Höhe im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Behandlung mit TNF- $\alpha$  führte dagegen im Wildtyp ( $83,41 \pm 27,2$  nm) zu einer signifikant reduzierten eGC-Höhe. Durch die gleichzeitige Zugabe von Yoda1 konnte der negative Effekt von TNF- $\alpha$  im Wildtyp aufgehoben werden ( $168,1 \pm 54,5$  nm). Dieses Ergebnis deckt sich mit den vorangegangenen *in-vitro* Studien (siehe Abschnitt 3.2). Innerhalb des TNF- $\alpha$  K.O.s ( $95,7 \pm 20,6$  nm) konnte der TNF- $\alpha$ -Effekt in der Yoda1-Kostimulation nicht aufgehoben werden. Der EC-spezifische Piezo1-K.O. zeigte konstant über alle Gruppen eine niedrigere eGC-Höhe im Vergleich zur Kontrolle.

Die Auswertung der Kortex-Steifigkeit zeigte eine höhere durchschnittliche Kortex-Steifigkeit im K.O. im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 21B). Während die Steifigkeit nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  im Wildtyp ( $1,1 \pm 0,7$  pN/nm) im Vergleich zur Stimulation mit Yoda1 ( $0,9 \pm 0,5$  pN/nm) zunahm, war dieser Anstieg im K.O. nicht festzustellen. Dieser TNF- $\alpha$ -vermittelte Anstieg konnte im Wildtyp mit der gleichzeitigen Stimulation mit Yoda1 ( $0,7 \pm 0,4$  pN/nm) rückgängig gemacht werden. Auch hier ist festzuhalten, dass dieser Effekt im K.O. nicht aufgehoben werden konnte. Des Weiteren konnten innerhalb des K.O.s keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stimulationen (Yoda1/TNF- $\alpha$ ) detektiert werden. Im paarweisen Vergleich zeigte sich jedoch eine signifikante Zunahme der kortikalen Steifigkeit in den Piezo1-K.O. Aorten im Vergleich zur WT Kontrolle (DMSO Wildtyp:  $0,9 \pm 0,6$  pN/nm, DMSO K.O.:  $1,1 \pm 0,6$  pN/nm, Mann-Whitney p 0.0021). Ebenfalls zeigte sich eine signifikante Zunahme in WT Aorten nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  (DMSO Wildtyp  $0,9 \pm 0,6$  pN/nm;  $1,1 \pm 0,7$  pN/nm, Mann-Whitney p 0,0088) auf.



**Abbildung 21: Einfluss von EC-spezifischem Piezo1-K.O. in Mäuseorten auf die eGC-Höhe und Kortex-Steifigkeit. (A) eGC- Höhe und (B) Kortex-Steifigkeit nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  und Yoda1 (Kruskal-Wallis Test: N = 10, n = 164-227; p-Wert: \*\*\*\*: p < 00001; \*\*: p < 0.01 und Mann-Whitney Test p-Wert: 0,0021 zwischen WT und K.O. DMSO und p-Wert: 0,0088 zwischen WT DMSO und WT TNF- $\alpha$ ).**

Eine Einzelanalyse durch den Mann-Whitney Test zwischen DMSO Wildtyp ( $0,9 \pm 0,6$  pN/nm) und DMSO K.O. ( $1,1 \pm 0,6$  pN/nm) zeigte eine Signifikanz mit einem p-Wert von 0,0021. Eine zweite Einzelanalyse mittels Mann-Whitney Test zwischen DMSO Wildtyp ( $0,9 \pm 0,6$  pN/nm) und TNF- $\alpha$  Wildtyp ( $1,1 \pm 0,7$  pN/nm) wies ebenfalls eine Signifikanz mit einem p-Wert von 0,0088 auf.

## 4. Diskussion

Die endotheliale Nanomechanik ist für eine ordnungsgemäße Funktion des Endothels unerlässlich. Chronische Veränderungen sind mit endothelialer Dysfunktion assoziiert. Vorausgegangene Versuche unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die pharmakologische Aktivierung des mechanosensitive Ionenkanals Piezo1 mittels Yoda1 die nanomechanischen Eigenschaften der Endotheloberfläche beeinflusst. So führt eine Aktivierung zu einer verringerten Steifigkeit des Aktinkortex in HUVECs sowie eine Steigerung der eGC-Höhe. Mechanosensitive Ionenkanäle wie Piezo1 sind an der Regulierung dieser mechanischen Eigenschaften beteiligt. Ziel der vorliegenden Arbeit war den Einfluss von Piezo1 auf die endotheliale Nanomechanik mit speziellem Fokus auf die eGC und seine Rolle bei Gefäßentzündungen zu untersuchen. Dies erfolgte durch die Anwendung verschiedener Methoden wie AFM-Nanoindentationsmessungen, Immunoassays und weitere molekularbiologischen Verfahren.

### 4.1 Quantifizierung CRISPR-Cas9 – partieller Piezo1 Knockout

Um die Auswirkung von Piezo1 auf die endotheliale Nanomechanik zu untersuchen, wurde zunächst ein Knockout mittels CRISPR-Cas9 generiert. Wie bereits unter Abschnitt 3.1 erläutert, wurde der ursprünglich generierte CRISPR-Klon durch Erik Hertel generiert (siehe Doktorarbeit Erik Hertel, Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck). Da es Hinweise darauf gab, dass die CRISPR-Methode einen partiellen, nicht

aber einen vollständigen Knockout generiert hat und die mehrfache Wiederholung dieser Methode nicht zum korrekten Einbau des Stopcodons geführt hat, wurden die Piezo1 CRISPR-Zellen erneut vereinzelt. Die Quantifizierung der neu vereinzelt Piezo1 CRISPR-Zellen erfolgte durch qPCR. Die Auswertung der qPCR zeigte eine verringerte *piezo1* mRNA-Expression in Piezo1 CRISPR-Zellen (2024) im Vergleich zu Wildtyp EA-hy926 Zellen und zum ursprünglichen Klon (CRISPR 2022). Da ein vollständiger Knockout keine mRNA-Expression zeigen würde, wird die Vermutung bestärkt, dass es sich um einen partiellen Piezo1-Knockout handelt. Der partielle K.O. könnte sich durch den Stopcodon-vermittelten Abbau der mRNA erklärt werden. Aufgrund eines vorzeitigen Stopcodons in der mRNA, wird die Expression des fehlerhaften Proteins unterbunden. Jedoch konnte die Vereinzlung zumindest eine geringere *piezo1* Expression bewirken. Allerdings war zwischen den Wildtyp-Zellen und Piezo1 CRISPR-Zellen 2024 keine signifikanten Unterschiede zu ermitteln. Es ist davon auszugehen, dass keine Signifikanz festgestellt werden konnte, da die Streuung innerhalb der Kontrolle sehr hoch war. Auch an dieser Stelle müssen weitere Wiederholungen durchgeführt werden, damit eine zweifelsfreie Quantifizierung der CRISPR-Methode über die qPCR gewährleistet werden kann.

Zusätzlich wurde die CRISPR-Methode durch eine Western Blot Analyse quantifiziert. Die densitometrische Auswertung des Western Blots zeigte eine verringerte Piezo1-Expression in CRISPR-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die statistische Analyse ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 14). Da trotz des CRISPR-Cas9-Verfahrens und erfolgter positiver Sequenzierung (mit Nachweis des K.O.s) weiterhin eine Piezo1 Expression im Western Blot nachweisbar war, muss hier von einem partiellen K.O. bzw. einem Misch-Klon ausgegangen werden. Es ist hervorzuheben, dass zwischen den unabhängigen Versuchen N1-3 große Unterschiede in der Signalintensität zu beobachten waren. Vor allem das Molekulargewicht von Piezo1 stellte experimentell eine große Herausforderung dar (Piezo1-Monomer 300 kDa) und erschwerte eine Etablierung eines standardisierten Protokolls. Es ist daher nötig weitere Western Blots durchzuführen, damit die Piezo1 Expression eindeutig quantifiziert werden kann. Aufgrund vorheriger Studien unserer Arbeitsgruppe, die über Immunfluoreszenz mit spezifischem Piezo1-Antikörper gezeigt haben, dass Piezo1 CRISPR-Zellen signifikant weniger Piezo1-Ionenkanäle exprimierten (siehe Doktorarbeit Erik Hertel, Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck), ist die Annahme berechtigt, dass die CRISPR-Methode einen partiellen

Knockout generiert hat. Für weitere Experiment kann außerdem das Verwenden einer siRNA in Betracht gezogen werden, um die Piezo1-Expression zu unterdrücken. Die Methode beruht auf der komplementären Bindung der mRNA, wodurch diese abgebaut wird und schließlich die Translation verhindert wird. Da der Effekt der siRNA temporär ist, könnte der Effekt von Piezo1 während des Abschaltens und auch danach untersucht werden.

## 4.2 Piezo1 zeigt vasoprotektive und antiinflammatorische Eigenschaften

Die eGC trägt entscheidend zu einer ordnungsgemäßen Endothelfunktion bei. Eine gesunde und aufgerichtete Glykokalyx bildet eine Schutzbarriere, die die Adhäsion von Immunzellen verhindert (Yung und Chan 2023). Entzündungen führen zum Abbau von eGC-Komponenten wie Heparansulfat und Syndecan-1, die im Blut der Patienten nachweisbar sind (Dogné und Flamion 2020). Dies kann zur Aktivierung dendritischer Zellen und zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine führen (Goodall et al. 2014). Darüber hinaus führt eine geschädigte eGC zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität (Hu et al. 2021). Cosgun et al. haben bereits beschrieben, dass TNF- $\alpha$  zu einer verringerten eGC-Höhe führt (Cosgun et al. 2020). TNF- $\alpha$  bewirkt die Abspaltung von Syndecan-4, was durch die Sekretion von Heparinasen und Metalloproteinase-9 vermittelt wird und in der Folge zu einer degradierten eGC führt (Ramnath et al. 2014). TNF- $\alpha$  kann daher für *in vitro* Experiment eingesetzt werden, um Gefäßentzündungen zu simulieren. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen eindrucksvoll, dass die durch TNF- $\alpha$  verursachte Schädigung der eGC durch die gleichzeitige Zugabe von Yoda1 aufgehoben werden konnte. Da dieser TNF- $\alpha$ -Effekt auch in Piezo1 CRISPR-Zellen nach der Behandlung mit Yoda1 gezeigt wurde, stützen diese Ergebnisse die Erkenntnis, dass durch die CRISPR-Cas9 Methode nur ein partieller Piezo1-Knockout generiert wurde. Der positive Effekt von Piezo1 auf die eGC-Höhe belegt den Einfluss auf die endotheliale Nanomechanik von Endothelzellen. Diese Erkenntnisse werden zudem eindrucksvoll durch unsere Ergebnisse aus dem *ex vivo* Ansatz gestützt (Abbildung 21A+21B). Endothelspezifische Piezo1-K.O.-Zellen zeichneten sich durch eine deutlich geringere eGC-Höhe sowie einen steiferen Zellkortex im Vergleich

Wildtyp-Zellen aus. Unter inflammatorischen Bedingungen, die durch TNF- $\alpha$  induziert wurden, zeigten Wildtyp-Zellen dagegen eine vergleichbar geringe eGC-Höhe wie Piezo1-K.O.-Zellen. Dagegen zeigte sich ein vasoprotektiver Effekt nach paralleler Aktivierung von Piezo1 (Yoda1) durch Aufhebung der TNF-induzierten Schädigung. Die vasoprotektiven Eigenschaften werden außerdem durch die Vorarbeiten der Arbeitsgruppe unterstützt. Durch die Aktivierung von Piezo1 konnte die Anzahl von adhären Monozyten an ECs reduziert werden. Mithilfe der Einzelzell-Adhäsionsmessung konnte zudem gezeigt werden, dass die erhöhten Adhäsionskräfte nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  durch gleichzeitige Stimulation mit Yoda1 aufgehoben werden konnten. Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Neutrophilen-Assay zeigte analog zu den Vorarbeiten außerdem eine geringe Adhäsion von Neutrophilen nach der Piezo1 Aktivierung durch Yoda1 in Wildtyp-Zellen. Somit vermittelt eine Piezo1 Aktivierung nicht nur vasoprotektive sondern auch antiinflammatorische Effekte auf Endothelzellebene.

### **4.3 Die Aktivität von Piezo1 wird durch kleine GTPasen reguliert**

Mechanosensitive Ionenkanäle sind über Ankerproteine mit dem Zytoskelett verbunden. Die Ionenkanalaktivität wird durch die Aktindynamik beeinflusst, welche über kleine GTPasen wie RhoA und Rac1 vermittelt wird (Jaffe und Hall 2005). Der Einfluss von Piezo1 auf die GTPase-Interaktion ist dabei noch unbekannt. Über eine ELISA-basierte Analyse sollte die Rho-Aktivität ermittelt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von Piezo1 durch Yoda1 zu einer verringerten Rho-Aktivität im Vergleich zu Wildtyp-Zellen bzw. zur DMSO-Kontrolle führte (siehe Abbildung 19). Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass die Inhibierung der kleinen GTPase RhoA zu einer Aktin Depolymerisierung und damit zu einem weichen endothelialen Kortex führt (Fels et al. 2025). Ebenso führt die Stimulation mit Yoda1 zu einem weichen Kortex (siehe Bachelorarbeit Franziska Unrein, Institut für Physiologie, UZL). Dieses Ergebnis spielt sich auch hier in der Rho-Aktivität nach der Stimulation mit Yoda1 wider. Übereinstimmend damit, konnte im endothelspezifischen Piezo1-K.O. gezeigt werden, dass K.O.-Zellen einen steiferen Kortex aufwiesen als

Wildtyp-Zellen. Während in WT-Zellen eine TNF- $\alpha$  Stimulation zu einem steiferen (dysfunktionalen) Kortex führt, konnte dieser Effekt ebenfalls durch gleichzeitige Stimulation mit Yoda1 aufgehoben werden.

Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 erläutert führt die Aktivierung des mechanosensitiven Ionenkanals Piezo1 führt zu einem Calcium-Einstrom in die EC. Dieser aktiviert die eNOS, wodurch NO produziert wird. Das NO diffundiert in die glatten Muskelzellen und aktiviert dort die Guanylatzyklase, wodurch cGMP ansteigt. cGMP wiederum aktiviert die Proteinkinase G, welche ihrerseits RhoA bzw. den Rho/ROCK-Signalweg inhibiert.

#### **4.4 Die Aktivierung von Piezo1 stimuliert die NO Bioverfügbarkeit**

Stickstoffmonoxid ist ein wichtiger Indikator für die Funktion des Endothels. Während ein gesundes Endothel durch eine flussinduzierte NO-Produktion charakterisiert ist, ist die NO-Produktion unter pathophysiologischen Bedingungen eingeschränkt. Die NO-Produktion ist u.a. vom Calcium-Einstrom durch mechanosensitive Ionenkanäle abhängig (Gerhold und Schwartz 2016). Lhomme et al. konnten durch ihre Studie bereits zeigen, dass die Aktivierung von Piezo1 durch seinen Aktivator Yoda1 zu einer NO-vermittelten Vasodilatation führt (Lhomme et al. 2019). Mäuse mit einem endothelspezifischen Piezo1-K.O. sind nicht mehr in der Lage eine flussvermittelte Gefäßerweiterung durch die Bildung von NO zu induzieren (Wang et al. 2016).

Die Ergebnisse der durchgeführten NO-Analyse im Rahmen dieser Arbeit zeigte zum einen, dass in GM7373 Zellen die NO-Konzentration in Zellkulturüberständen höher als in EA.hy926 oder HUVCEs war. Zum anderen konnte beobachtet werden, dass die NO-Konzentration in GM7373 Zellen nach Piezo1-Aktivierung signifikant höher im Vergleich zur Kontrolle und zu TNF- $\alpha$ -stimulierten Zellen war. Eine Verbesserung durch gleichzeitige Gabe von TNF- $\alpha$  und Yoda1 konnte jedoch nicht beobachtet werden. Dagegen konnte der Effekt von TNF- $\alpha$  durch die gleichzeitige Stimulation mit Yoda1 in Piezo1 CRISPR-Zellen aufgehoben werden, was mit bisherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe übereinstimmt. In Anbetracht der bisherigen Resultate, fällt auf, dass die Stimulation mit TNF- $\alpha$  für die NO-Analyse nicht konform mit den bisherigen

Ergebnissen dieser Arbeit bzw. unserer Arbeitsgruppe ist. Insgesamt muss festgehalten werden, dass die Daten der NO-Messungen nicht konsistent sind. Eine mögliche Ursache stellt die geringe Anzahl an unabhängigen Wiederholungen (N = 1) dar.

## 4.5 Piezo1 Aktivierung steigert die eGC-Höhe

Es ist bekannt, dass das Zytokin TNF- $\alpha$  zum proinflammatorischen Phänotyp des Endothels beiträgt (Szczygiel et al. 2012). Es induziert das *Shedding* der eGC und zerstört dadurch die Gefäß-Schutzbarriere (Chappell et al. 2009). Durch AFM-Nanoindentationsmessungen konnte gezeigt werden, dass Piezo1 CRISPR-Zellen zu einer signifikant geringeren eGC-Höhe im Vergleich zu Wildtyp EA.hy926 Zellen aufwiesen (siehe Abbildung 16). TNF- $\alpha$  vermittelte folglich keinen zusätzlichen eGC-Schaden in Piezo1 CRISPR-Zellen. Piezo1 CRISPR-Zellen, die sowohl mit TNF- $\alpha$  als auch Yoda1 stimuliert wurden, wiesen dagegen eine partielle Verbesserung der eGC-Höhe im Vergleich zu den Piezo1 CRISPR-Zellen auf, die ausschließlich mit TNF- $\alpha$  behandelt wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung von Piezo1 durch Yoda1 den negativen Effekt von TNF- $\alpha$  aufheben konnte. Ob und wie Piezo1 Aktivierung den direkten Abbau von eGC-Komponenten, wie Syndecan-1 und Heparansulfat, abmildern bleibt aktuell jedoch noch unklar. Der positive Effekt von Piezo1 auf die Endotheloberfläche konnte durch WGA-Färbungen (*wheat germ agglutinin*) bestätigt werden (siehe Doktorarbeit Erik Hertel, Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck). Agglutinine sind Lektine, welche kovalent mit einem Farbstoff markiert sind, und spezifisch an eGC-Komponenten binden. Sie können daher zum Nachweis der eGC verwendet werden. Für weiterführende Experimente könnten Lebendfärbungen von Piezo1 CRISPR-Zellen und Wildtyp-Zellen mit spezifischem Piezo1-Antikörper durchgeführt werden. In Kombination mit dem AFM kann visuell direkt beurteilt werden, welche Zellen Piezo1 exprimieren und welche nicht bzw. deutlich weniger. Auf diese Weise können Kraft-Distanz-Kurven zur Bestimmung der eGC-Höhe und der Kortex-Steifigkeit generiert werden, die sich direkt in Wildtyp-Zellen und Piezo1 CRISPR-Zellen unterteilen lassen.

Da AFM-Messungen mit CRISPR DMSO und CRISPR TNF- $\alpha$  eine deutlich geringere eGC-Höhe als Wildtyp EA.hy926 Zellen auswiesen, sollte dieses Ergebnis durch den Syndecan-ELISA belegt werden. Die Auswertung des Syndecan-ELISAs ergab, dass in Überständen der Piezo1 CRISPR-Zellen grundsätzlich eine höhere Konzentration an Syndecan gegenüber Wildtyp-Zellen nachweisbar war. Folglich scheint Piezo1 für die Integrität der eGC-Höhe oder Verankerung des Syndecans von entscheidender Bedeutung zu sein. Durch die Verknüpfung der eGC und dem Aktinkortex, wirkt sich eine Veränderung der eGC-Höhe auch auf die Steifigkeit des Kortex aus. Die Ergebnisse zeigen, dass die Kortex-Steifigkeit in Wildtyp-Zellen geringer als in Piezo1-K.O.-Zellen ist (siehe Abbildung 21B). Der TNF- $\alpha$ -induzierte Anstieg der kortikalen Steifigkeit in Wildtyp-Zellen, konnte durch die Zugabe von Yoda1 aufgehoben werden. Das Fehlen des Piezo1-Ionenkanals zeigte dagegen konstant eine höhere Steifigkeit im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Innerhalb der Wildtyp-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Syndecan-1-Konzentration nach der Stimulation mit Yoda1 und TNF- $\alpha$  festgestellt werden. Dies galt auch für den Vergleich EA.hy926 DMSO und EA.hy926 TNF- $\alpha$ . Obwohl Studien gezeigt haben, dass TNF- $\alpha$  das *Shedding* der eGC induziert (Chappell et al. 2009, Dogné und Flamion 2020), konnte nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  kein Anstieg der Syndecan-1-Konzentration beobachtet werden. Eine Erklärung dafür liefern Kainulainen et al. Sie haben herausgefunden, dass TNF- $\alpha$  die Syndecan-1 Expression in ECs unterdrückt. Die Unterdrückung der Expression zeigte sich bereits nach 6 Stunden nach der Stimulierung und erreichte nach 10 Stunden die maximale Inhibition. Nach 12-24 Stunden stieg die Expression wieder leicht an, jedoch blieb das Niveau unter 50 % im Vergleich zum Zeitpunkt 0 h. Nach 74 Stunden war die Unterdrückung reversibel (Kainulainen et al. 1996). Für zukünftige Experimente sollte zusätzlich ein zeitlicher Verlauf mit TNF- $\alpha$ -Stimulation (z.B. 0, 3, 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden) durchgeführt werden. Die zeitabhängige Stimulation mit TNF- $\alpha$  bietet außerdem die Möglichkeit die Wechselwirkung zwischen dem Zytokin und dem Piezo1 Aktivator Yoda1 zu genauer zu untersuchen. So könnte ein zeitabhängiger Syndecan-ELISA Aufschluss über die Menge an Syndecan-1 geben und die Fragen beantworten, ob die Aktivierung von Piezo1 den Abbau der eGC verhindert oder den Wiederaufbau initiiert.

Weitere Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Aktivierung von Piezo1 die Interaktion zwischen Endothel und Monozyten beeinflusst (siehe Doktorarbeit Erik Hertel, Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck). Einerseits zeigten Monozyten-

wash-away-Assays, dass nach der Stimulation mit TNF- $\alpha$  mehr Monozyten an ECs adhäreren im Vergleich zur Kontrolle. Die gleichzeitige Stimulation mit Yoda1 und TNF- $\alpha$  führte hingegen dazu, dass weniger Monozyten an ECs adhäreren im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation mit TNF- $\alpha$ . Dies lässt Rückschlüsse auf eine intakte eGC zu, da eine hohe eGC die Immunzelladhäsion durch abstoßende Kräfte, wie eine negative Ladung, der Monozyten und ECs verhindert. Zum anderen konnte durch Einzelzell-Adhäsionsmessungen demonstriert werden, dass die Aktivierung von Piezo1 an der EC die Adhäsionskräfte zwischen Monozyten und Endotheloberfläche reduzierte. Auch hier konnte durch die gleichzeitige Stimulation mit Yoda1 und TNF- $\alpha$  die negative Wirkung von TNF- $\alpha$  aufheben.

Das TNF- $\alpha$ -vermittelte *Shedding* der eGC unter Entzündungsbedingungen führt zur Diapedese von Leukozyten, zu deren Unterklassen nicht nur Monozyten, sondern auch Neutrophile zählen (Milusev et al. 2022). Neutrophile erreichen innerhalb der Leukozyten-Klasse als erstes den Infektionsherd (Rosales 2020). Daher sollte innerhalb dieser Arbeit der Einfluss von Piezo1 auf die Neutrophilenadhäsion untersucht werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Stimulation von Wildtyp EA.hy926 Zellen mit Yoda1 im Vergleich zur Kontrolle zu einer geringeren Anzahl adhärierter Neutrophile führte. Entgegen den Erwartungen zeigte die Behandlung mit TNF- $\alpha$  jedoch keine vermehrte Adhäsion. Die Piezo1 CRISPR-Zellen zeigten eine höhere Tendenz bei der Neutrophilenadhäsion im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Die Unterschiede erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau  $p < 0.05$ . Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass Neutrophile-Bindungsassays sehr fehleranfällig sind. Wilhelmsen et al. quantifizierten in ihrer Arbeit *In-vitro*-Adhäsionstests für Calcein-markierten Neutrophile (Wilhelmsen et al. 2013). Sie berichten unter anderem, dass eine zu hohe Calcein-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  zum Farbverlust und damit zu einem geringeren Fluoreszenzsignal führen kann. Zwar wurden in der vorliegenden Arbeit 3  $\mu\text{M}$  Calcein eingesetzt, jedoch könnten Wiederholungen des Neutrophilen-Test mit noch geringer Konzentration durchgeführt werden, um ein optimales Fluoreszenzsignal zu ermöglichen. Eine weitere Überlegung wäre, die Inkubationszeit mit Neutrophilen und Calcein auf 30-45 min zu verlängern. Eine zu lange Inkubation sollte jedoch vermieden werden, da dies wiederum zu einem zu hohem Fluoreszenzsignal führen kann (Wilhelmsen et al. 2013). Blanter et al. beschäftigten sich in ihren Experimenten mit der Optimierung der Neutrophilenaufreinigung (Blanter et al. 2022). Sie legen nahe, dass die Aufreinigung über Dichtegradienten einen

höheren Aktivierungszustand aufweisen im Vergleich zur Aufreinigung mit immunomagnetische *Beads*. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Aktivierungsrate in den durchgeführten Assays ausreichend war. Es ist festzuhalten, dass der Effekt von TNF- $\alpha$  erneut validiert werden muss, da dieser Effekt als Positivkontrolle für den Assay angesehen werden kann.

Um den Einfluss von Piezo1 auf die Endotheloberfläche zu vertiefen, sollten weiterführende Experimente die Untersuchung von Metalloproteasen durch Zymographie beinhalten. Da Metalloproteasen Bestandteile der eGC abbauen, kann diese Methode als weiterer Nachweis für den Zustand der eGC nach der Stimulation mit Yoda1 und TNF- $\alpha$  genutzt werden. Des Weiteren würde die Methode Aufschluss darüber geben, ob Yoda1 den Abbau der eGC verhindert oder den Aufbau verstärkt.

## 4.6 Bedeutung von Piezo1 bei vaskulären Entzündungen

Der mechanosensitive Ionenkanal Piezo1 wird durch Schubspannung im Blutfluss und besonders durch Gefäßentzündungen aktiviert und sorgt für die Umwandlung von mechanischen Reizen in biochemische Signale. Seine Aktivierung löst einen Calcium-Einstrom in ECs aus und induziert dort verschiedene Signalwege (Zheng et al. 2022, Yang et al. 2025). Wie in Abschnitt 1.1.2 erläutert, löst der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom die Aktivierung der eNOS aus, was zu einer NO-vermittelten Vasodilatation führt. Die Vasodilatation ist Teil der Entzündungsreaktion, um über den Blutfluss Immunzellen an den Entzündungsort zu locken (Lallo und Bracaglia 2024). Der Calcium-Einstrom über Piezo1 induziert außerdem den NF- $\kappa$ B-Signalweg, welcher die Leukozytenadhäsion vermittelt (Lawrence 2009, Liu et al. 2022, Zheng et al. 2022). Über den NF- $\kappa$ B-Signalweg wird außerdem die Transkription von Heparanasen gefördert, die zum Abbau der eGC beitragen (Ramani et al. 2017). Wie in Abschnitt 1.1.4.1 beschrieben, bewirkt der Calcium-Einstrom auch eine erhöhte Expression von KLF2/4, welche eine Inhibierung von NF- $\kappa$ B bewirkt. Die Aktivierung von Piezo1 trägt daher sowohl über seine inflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkung zum Schutz des Endothels bei.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Aktivierung von Piezo1 zu einer Stabilisierung der endothelialen Nanomechanik führt, was sich in einer hohen eGC und

einem weichen Kortex widerspiegelt. Das Fehlen des mechanosensitiven Ionenkanals führte hingegen zu entzündungsähnlichen Zuständen wie eine verringerte eGC-Höhe und einem steifen Kortex (siehe Abbildung 16 sowie 21A+21B). Durch die Aktivierung von Piezo1 konnte außerdem die Anzahl an adhärennten Monozyten reduziert werden (siehe Doktorarbeit Erik Hertel, Institut für Physiologie, Universität zu Lübeck), was durch die Beobachtung unterstützt wird, dass Piezo1 mit der Stabilisierung der endothelialen Nanomechanik assoziiert ist. Piezo1 könnte auch eine Rolle bei der Neutrophilenadhäsion spielen. Piezo1 CRISPR-Zellen zeigten tendenziell eine vermehrte Neutrophilenadhäsion im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Dieses Ergebnis muss vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass TNF- $\alpha$ -Effekte nicht deutlich wurden.

Die flussinduzierte NO-Produktion ist ein Merkmal einer ordnungsgemäßen Endothelfunktion. Unter chronischen Entzündungen ist diese NO-Produktion gestört. In GM7373 Zellen konnte durch die Aktivierung von Piezo1 ein Anstieg von NO beobachtet werden. Dieser Anstieg lässt sich durch den vermehrten Calcium-Einstrom über den mechanosensitiven Ionenkanal erklären, wodurch die Aktivität der eNOS gesteigert wird. Auch hier ist zu beachten, dass die Inkonsistenz innerhalb der NO-Messungen hoch war. Eine Ursache dafür kann die geringe Anzahl an unabhängigen Wiederholungen sein.

Eine zentrale Frage die sich aus der vorliegenden Arbeit ergibt ist, wie Piezo1 seine vasoprotektive Wirkung ausübt. Ob die Aktivierung von Piezo1 den Abbau der eGC verhindert oder ihren Wiederaufbau induziert. Zum einen könnte die Aktivierung von Piezo1 und der damit verbundene Calcium-Einstrom einen Anstieg der Expression von KLF2/4 begünstigen, wodurch die Komponenten der eGC nicht abgebaut werden. Es wäre aber auch möglich, dass der Piezo1-vermittelte Calcium-Einstrom die Synthese von Komponenten der eGC initiiert.

Interessanterweise zeigt Piezo1 starke Ähnlichkeiten mit dem mechanosensitiven Ionenkanal TRPV4. Beide fungieren als Mechanosensor und reagieren auf mechanische Reize. Ihre Aktivierung führt jeweils zu einem Calcium-Einstrom, welche über nachgeschaltete Signalkaskaden die Bildung von NO induzieren (Fels und Kusche-Vihrog 2020). Vor diesem Hintergrund sollte auch der Einfluss des TRPV4-Kanals auf die endotheliale Nanomechanik durch zukünftige Experimente untersucht werden.

Der vasoprotektive Effekt von Piezo1 macht den mechanosensitiven Ionenkanal zu einem vielversprechenden Ziel bei der zukünftigen Behandlung von vaskulären Erkrankungen. Die weitere Charakterisierung von Piezo1 bezüglich seiner antiinflammatorischen Eigenschaften ist daher von großer Bedeutung.

## 5. Zusammenfassung

Das vaskuläre Endothel ist eine Zellschicht, welche das Innere von Lymph- und Blutgefäßen wie Arterien, Kapillaren und Venen auskleidet. Das Endothel besteht aus einer Einzelschicht von Endothelzellen (ECs), welche zum einen als hochentwickelter Sensor und *Transducer*-Komplex fungieren, welcher extrazellulär mechanische Kräfte aus dem Blutstrom wahrnimmt und intrazellulär in ein biochemisches Signal umwandelt. Zum anderen bilden Sie eine Schutzbarriere zwischen dem Blutstrom und dem umliegenden Gewebe. Die Mechanotransduktion wird über spezifische Strukturen wie der endothelialen Glykokalyx, mechanosensitive Ionenkanäle und dem dynamischen Aktin-Kortex vermittelt. Aufgrund ihrer Lokalisation müssen Endothelzellen in der Lage sein flexibel auf sich ändernde Bedingungen aus dem Blutstrom reagieren zu können. ECs regulieren den peripheren Blutdruck, da sie vasoaktive Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) produzieren. Der Wechsel zwischen einem weichen und steifen Aktinkortex ist daher ein wichtiges physiologisches Merkmal und ist für die ordnungsgemäße Funktion des Endothels unerlässlich. ECs, die diese Funktion verloren haben, können als dysfunktional angesehen werden und sind mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert.

Kürzlich wurde der mechanosensitive Ionenkanal Piezo1 charakterisiert, dessen Rolle bezüglich der Regulation der Mechanik und Funktion von ECs bisher wenig erforscht ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Einfluss von Piezo1 auf die endotheliale Nanomechanik und auf vaskuläre Entzündungen zu untersuchen. Bisherige Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die endotheliale Nanomechanik die Ionenkanal mRNA-Expression beeinflusst. Hierfür wurden ECs mit Jasplakinolide und Cytochalasin D behandelt, um entweder einen steifen oder weichen Zellkortex zu induzieren. Das Ergebnis zeigte, dass das mRNA-Level von Piezo1 innerhalb eines steifen Zellkortex deutlich anstieg. Des Weiteren führte die direkte Stimulation mit dem spezifischen Piezo1-Aktivator Yoda1 zu einer signifikant geringeren Kortex-Steifigkeit führt und einer verbesserte eGC. Während durch Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF eine Schädigung der eGC induziert wurde, konnte bei gleichzeitige Piezo1 Aktivierung durch Yoda1 dieser Effekt aufgehoben werden. Dieser antiinflammatorische Effekt unterstreicht die Bedeutung von Piezo1 für die endotheliale Nanomechanik.

Durch die Generierung eines CRISPR-Cas9-vermittelten Piezo1-Knockouts sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Piezo1 auf die endotheliale Nanomechanik tiefgründiger untersucht werden. Zwar konnte durch die CRISPR-Cas9-Methode nur ein partieller Knockout generiert werden, dennoch konnten durch ihn deutliche Ergebnisse generiert werden. Piezo1 CRISPR-Zellen zeigten im Vergleich zu Wildtyp ECs eine signifikant geringere eGC-Höhe. Während durch Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF eine Schädigung der eGC induziert wurde, konnte bei gleichzeitiger Piezo1 Aktivierung durch Yoda1 dieser Effekt aufgehoben werden. Dieser antiinflammatorische Effekt unterstreicht die Bedeutung von Piezo1 für die endotheliale Nanomechanik. Bemerkenswerterweise konnte durch die Zugabe des Piezo1-Aktivators Yoda1 dennoch der negative TNF-Effekt auf die eGC-Höhe abgemildert werden. Um diese Ergebnisse bestätigen zu können, wurde die Konzentration von Syndecan, welches ein Bestandteil der eGC ist, in Zellkulturüberständen bestimmt. In der Tat war die Konzentration von Syndecan in Wildtyp-Zellen niedriger im Vergleich zu Piezo1 CRISPR-Zellen. Folglich scheint Piezo1 einen vasoprotektiven Effekt zu vermitteln.

Die eGC-Höhe beeinflusst die Immunzelladhäsion. Eine verringerte eGC-Höhe ermöglicht die Adhäsion von Immunzellen. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass die Aktivierung von Piezo1 die Anzahl an adhärenierten Monozyten an ECs verringert. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte auch der Einfluss von Piezo1 auf die Neutrophilenadhäsion überprüft werden. Die Auswertung ergab, dass die Piezo1-Aktivierung durch Yoda1, und damit Verbesserung/Stabilisierung der eGC als Nanobarriere, zu einer geringeren Anzahl an adhärenierten Neutrophilen führte. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass mehr Neutrophile an Piezo1 CRISPR-Zellen adhärenierten als an Wildtyp-Zellen. Auch hier zeigte sich ein antiinflammatorischer Effekt der Piezo1-Aktivierung auf die Immunzelladhäsion.

Bei der Regulierung der endothelialen Nanomechanik spielen die kleine GTPase, wie RhoA, eine zentrale Rolle. RhoA ist u.a. an der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts und der Myosin-Kontraktibilität beteiligt. Aktiviertes RhoA reguliert das hierbei F-Aktin und G-Aktin Gleichgewicht. Die Aktivierung des RhoA/ROCK-Signalwegs und damit die Stabilisierung des F-Aktins führt zu einer Verringerung der eNOS-Aktivität und zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und fördert Gefäßentzündungen und eine endotheliale Dysfunktion. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung

von Piezo1 zu einer verringerten Rho-Aktivität führte. Eine verringerte Rho-Aktivität vermittelt für die Depolymerisation des kortikalen Aktins und den Shift zu mehr G-Aktin. Dieses Resultat stimmt mit den bisherigen Ergebnissen überein, dass die Stimulation mit Yoda1 sich positiv auf die endotheliale Nanomechanik auswirkt.

Ein wichtiger Mediator der Endothelfunktion ist Stickstoffmonoxid. Seine Bildung wird durch die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase vermittelt und löst eine Vasodilatation aus. Ein gesundes Endothel ist durch eine flussinduzierte-NO Produktion gekennzeichnet, während die NO-Produktion bei chronischen Entzündungen gestört ist. In Zellkulturüberständen von GM7373 Zellen konnte die NO-Konzentration durch die Stimulation mit Yoda1 im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden. Die Stimulation mit TNF- $\alpha$ , welche eine Gefäßentzündung simuliert, zeigte im Vergleich zu Yoda1 eine signifikant geringere NO-Konzentration. Es ist jedoch festzuhalten, dass die Daten der NO-Messungen sehr inkonsistent waren, wodurch eine Einordnung der Ergebnisse erschwert wird.

Aorten von Endothel-spezifischen Piezo1-K.O.-Mäusen wurden für die weitere *ex-vivo*-Analyse der endothelialen Nanomechanik, also der eGC-Höhe und der Kortex Steifigkeit, verwendet. Es konnte beobachtet werden, dass Piezo1-K.O.-Zellen stets eine verminderte eGC-Höhe im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. Darüber hinaus konnte auch in diesem *ex vivo* Ansatz der negative Effekt von TNF- $\alpha$  in Wildtyp-Zellen durch die gleichzeitige Stimulation mit Yoda1 aufgehoben werden. Die Messung der Kortex-Steifigkeit zeigt einen Anstieg bei Piezo1-K.O.-Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Auch hier konnte der negative Effekt von TNF- $\alpha$  durch Yoda aufgehoben werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Aktivierung von Piezo1 positiv auf die endotheliale Nanomechanik auswirkt und einen vasoprotektiven Schutz bildet. Da eine gestörte Mechanik mit Gefäßerkrankungen assoziiert ist, machen diese Resultate Piezo1 besonders als möglichen Kandidaten für die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen interessant.

## 6. Summary

The vascular endothelium is a layer of cells that lines the interior of lymphatic and blood vessels, such as arteries, capillaries, and veins. The endothelium consists of a single layer of endothelial cells (ECs), which, on the one hand, function as a highly developed sensor and transducer complex that detects extracellular mechanical forces from the blood flow and converts them intracellularly into a biochemical signal. On the other hand, they form a protective barrier between the blood flow and the surrounding tissue. Mechanotransduction is mediated by specific structures such as the endothelial glycocalyx, mechanosensitive ion channels, and the dynamic actin cortex. Due to their location, endothelial cells must be able to respond flexibly to changing conditions in the bloodstream. ECs regulate peripheral blood pressure by producing vasoactive mediators such as nitric oxide (NO). The transition between a soft and stiff actin cortex is therefore an important physiological feature and is essential for the proper function of the endothelium. ECs that have lost this function can be considered dysfunctional and are associated with cardiovascular diseases.

The mechanosensitive ion channel Piezo1 was recently characterized. However, its role in regulating the mechanics and function of endothelial cells (ECs) has been little studied to date. The aim of this study was to investigate the influence of Piezo1 on endothelial nanomechanics and vascular inflammation. Previous studies by our research group have shown that endothelial nanomechanics influence ion channel mRNA expression. For this purpose, ECs were treated with jasplakinolide and cytochalasin D to induce either a stiff or soft cell cortex. The results showed that the mRNA level of Piezo1 increased significantly within a stiff cell cortex. Furthermore, direct stimulation with the specific Piezo1 activator Yoda1 led to significantly lower cortex stiffness and improved eGC. While stimulation with the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  induced damage to the eGC, this effect was reversed upon simultaneous Piezo1 activation by Yoda1. This anti-inflammatory effect underscores the importance of Piezo1 for endothelial nanomechanics.

By generating a CRISPR-Cas9-mediated Piezo1 knockout, the present study aimed to investigate the influence of Piezo1 on endothelial nanomechanics in greater depth. Although the CRISPR-Cas9 method could only generate a partial knockout, it

nevertheless yielded clear results. Piezo1 CRISPR cells exhibited a significantly lower eGC-height compared to wild type ECs. While stimulation with the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  induced damage to the eGC, this effect was reversed upon simultaneous Piezo1 activation by Yoda1. This anti-inflammatory effect underscores the importance of Piezo1 for endothelial nanomechanics. Notably, the addition of the Piezo1 activator Yoda1 nevertheless mitigated the negative TNF effect on eGC-height. To confirm these results, the concentration of syndecan, a component of the eGC, was measured in cell culture supernatants. Indeed, the concentration of syndecan was lower in wild type cells compared to Piezo1 CRISPR cells. Consequently, Piezo1 appears to mediate a vasoprotective effect.

The height of the endothelial glycocalyx (eGC) influences immune cell adhesion. A reduced eGC-height facilitates the adhesion of immune cells. Previous work by our research group has already shown that the activation of Piezo1 reduces the number of monocytes adhering to endothelial cells (ECs). Based on these results, the effect of Piezo1 on neutrophil adhesion was also investigated. The analysis revealed that Piezo1 activation by Yoda1, and thus the enhancement/stabilization of the eGC as a nanobarrier, resulted in a lower number of adhered neutrophils. Furthermore, it was observed that more neutrophils adhered to Piezo1 CRISPR cells than to wild-type cells. Here, too, an anti-inflammatory effect of Piezo1 activation on immune cell adhesion was evident.

Small GTPases, such as RhoA, play a central role in regulating endothelial nanomechanics. RhoA is involved, among other things, in regulating the actin cytoskeleton and myosin contractility. Activated RhoA regulates the balance between F-actin and G-actin in this process. Activation of the RhoA/ROCK signaling pathway and the resulting stabilization of F-actin leads to a reduction in eNOS activity and increased vascular permeability, promoting vascular inflammation and endothelial dysfunction. In the present study, it was demonstrated that activation of Piezo1 led to reduced Rho activity. Reduced Rho activity mediates the depolymerization of cortical actin and the shift toward more G-actin. This result is consistent with previous findings that stimulation with Yoda1 has a positive effect on endothelial nanomechanics.

Nitric oxide is an important mediator of endothelial function. Its production is mediated by endothelial nitric oxide synthase and triggers vasodilation. A healthy endothelium is characterized by flow-induced NO production, whereas NO production is impaired in

chronic inflammation. In cell culture supernatants from GM7373 cells, NO concentration was increased by stimulation with Yoda1 compared to the control. Stimulation with TNF- $\alpha$ , which simulates vascular inflammation, resulted in a significantly lower NO concentration compared to Yoda1. It should be noted, however, that the data from the NO measurements were highly inconsistent, making it difficult to interpret the results.

Aortas from endothelial-specific Piezo1 knockout mice were used for further *ex vivo* analysis of endothelial nanomechanics, specifically the eGC-height and cortex stiffness. It was observed that Piezo1 knockout cells consistently exhibited a reduced eGC-height compared to wild-type cells. Furthermore, in this *ex vivo* approach, the negative effect of TNF- $\alpha$  in wild-type cells could be reversed by simultaneous stimulation with Yoda1. Measurements of cortical stiffness showed an increase in Piezo1-KO cells compared to wild-type cells. Here, too, the negative effect of TNF- $\alpha$  was reversed by Yoda.

In summary, it can be said that the activation of Piezo1 has a positive effect on endothelial nanomechanics and provides vasoprotective benefits. Since impaired mechanics are associated with vascular diseases, these results make Piezo1 particularly interesting as a potential candidate for the treatment of cardiovascular diseases.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Im folgenden Abschnitt werden in dieser Arbeit verwendete Abkürzungen aufgeführt. Aus dem Englischen abgeleiteten Abkürzungen werden sowohl in englischer als auch deutscher Sprache erläutert.

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>%</b>	Prozent
<b>A</b>	Adenin Base
<b>ACh</b>	Acetylcholin
<b>ADAM</b>	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i> , Disintegrin und Metalloproteinase
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>AFM</b>	<i>Atomic force microscope</i> , Rasterkraftmikroskop
<b>AT-III</b>	Antithrombin
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BH<sub>2</sub></b>	Dihydrobiopterin
<b>BH<sub>4</sub></b>	Tetrahydrobiopterin
<b>BK</b>	Bradykinin
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
<b>bzw</b>	Beziehungsweise
<b>C</b>	Cytosin Base
<b>ca.</b>	Circa
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calciumion
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calciumchlorid

<b>CD44</b>	<i>Cluster of differentiation 44</i> , Unterscheidungsgruppe 44
<b>cDNA</b>	<i>Complementary DNA</i> , komplementäre DNA
<b>CED</b>	Extrazelluläre C-terminale Strukturdomäne
<b>cGMP</b>	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> , zyklisches Guanosinmonophosphat
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>CRISPR</b>	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i> , gehäuft auftretende, regelmäßig unterbrochene, kurze Palindrom-Wiederholungen
<b>CTD</b>	Intrazelluläre C-terminale Strukturdomäne
<b>DAMP</b>	Damage-associated molecular patterns, schadensassoziierte molekulare Muster
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
<b>DNA/DNS</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphate
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>ECs</b>	<i>Endothelial cells</i> , Endothelzellen
<b>ECL</b>	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> , verstärkte Chemilumineszenz
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiamintetraessigsäure
<b>eGC</b>	<i>Endothelial glycocalyx</i> , endotheliale Glykokalyx
<b>ENaC</b>	<i>Epithelial sodium channel</i> , Epithelialer Natriumkanal
<b>eNOS</b>	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum

---

<b>FAD</b>	Flavinadenindinukleotid
<b>F-Aktin</b>	Filamentöses Aktin
<b>FCS/FKS</b>	<i>Fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
<b>FDR</b>	<i>False discovery rate</i> , Falscherkennungsrate
<b>FMN</b>	Flavinmononukleotid
<b>fwd</b>	<i>Forward</i> , vorwärts
<b>G</b>	Guanin Base
<b>gDNA</b>	Genomische DNA
<b>G-Aktin</b>	Globuläres Aktin
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>h</b>	Stunde/Stunden
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HDR</b>	<i>Homology-directed repair</i> , Homologie-gerichtete Reparatur
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
<b>HUVEC</b>	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> , menschliche Endothelzellen der Nabelvenen
<b>HUAEC</b>	<i>Human umbilical arterial endothelial cells</i> , menschliche Endothelzellen der Nabelarterie
<b>ICAM-1</b>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> , interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
<b>IH</b>	<i>Inner helix</i> , innere Helix
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin-1 $\beta$
<b>K<sup>+</sup></b>	Kalium
<b>kb</b>	Kilobasen
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid

---

<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat
<b>Kir</b>	<i>Inward-rectifier potassium channel</i> , einwärts gleichgerichtender Kaliumkanal
<b>K.O.</b>	<i>Knockout</i>
<b>LDL</b>	<i>Low density lipoprotein</i> , Lipoprotein niedriger Dichte
<b>LIMK</b>	LIM-Kinase
<b>M</b>	Molar
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> , Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
<b>MEM</b>	<i>Eagle`s Minimum Essential Medium</i>
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesiumion
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>min</b>	Minute/Minuten
<b>Mio</b>	Million
<b>mL</b>	Milliliter
<b>MLCK</b>	<i>Myosin light chain kinase</i> , Myosin-leichte-Ketten-Kinase
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mmHg</b>	Millimeter-Quecksilbersäule
<b>mM</b>	Millimolar
<b>mm<sup>2</sup></b>	Quadratmillimeter
<b>MMPs</b>	Matrix-Metalloproteinasen
<b>mRNA</b>	<i>Messenger RNA</i> , Boten-Ribonukleinsäure
<b>N</b>	beliebige Base
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natrium
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid

---

<b>NADH</b>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dinatriumhydrogenphosphat
<b>NaI</b>	Natriumiodid
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	Natriumnitrat
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NEAA</b>	<i>Non-essential amino acids</i> , nicht-essentielle Aminosäuren
<b>NET</b>	<i>Neutrophil extracellular traps</i> , Neutrophile extrazelluläre Fallen
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NHEJ</b>	<i>Non-homologous end joining</i> , nicht-homologe Endverknüpfungen
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrit
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrat
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NO<sub>2</sub></b>	Stickstoffdioxid
<b>NOX</b>	NADPH-Oxidase
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Dioxygen
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozon
<b>OH</b>	<i>Outer helix</i> , äußere Helix
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrit

<b>PAM</b>	<i>Protospacer adjacent motif</i> , Vorabstandshalter- angrenzendes Motiv
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered solution</i> , Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
<b>pH</b>	<i>pondus hydrogenii</i> , Wasserstoffkraft
<b>PI3K</b>	Phosphoinositid-3-Kinase
<b>PKG</b>	Proteinkinase G
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>pN</b>	Pikoneutron
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> , quantitative Polymerase-Kettenreaktion
<b>ref</b>	<i>Reverse</i> , rückwärts
<b>rcf</b>	<i>Relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalbeschleunigung
<b>RhoA</b>	<i>Ras homolog family member A</i> , Ras-Homologes- Familienmitglied A
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>ROCK</b>	<i>Rho-associated coiled-coil kinase</i> , Rho-Kinase
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
<b>sec</b>	<i>second/seconds</i> , Sekunde/Sekunden
<b>SECS</b>	<i>Stiff endothelial cell syndrome</i> , Syndrom der steifen Endothelzelle
<b>sGC</b>	<i>Soluble guanylate cyclase</i> , lösliche Guanylatzyklase

---

<b>sgRNA</b>	<i>Single guide RNA</i>
<b>shRNA</b>	<i>Small hairpin RNA</i> , kleine Haarnadel-RNA
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering RNA</i> , kleine eingreifende RNA
<b>SOCa<sup>2+</sup></b>	Store-operated Ca <sup>2+</sup> channel, speichergesteuerter Calciumkanal
<b>SOD</b>	Superoxid-Dismutase
<b>SP</b>	Substanz P
<b>STEMI</b>	<i>ST-Elevation myocardial infarction</i> , ST-Hebungs-Myokardinfarkt
<b>T</b>	Thymin Base
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>TEM</b>	Transendotheliale Migration
<b>THU</b>	<i>Transmembrane helix unit</i> , Transmembran Helix Einheit
<b>TIMP</b>	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i> , Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
<b>TNFR</b>	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
<b>TLC</b>	<i>Toll-like receptor</i> , Toll-artiger Rezeptor
<b>tracrRNA</b>	<i>Trans-activating CRISPR RNA</i> , transaktivierende CRISPR RNA
<b>TRP</b>	<i>Transient receptor potential</i> , transiente Rezeptorpotenzial-Kanäle
<b>U</b>	Umdrehungen
<b>V</b>	Volt
<b>VCAM-1</b>	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> , vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1

<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor,</i> Endothelwachstumsfaktor
<b>v/v</b>	Volumenprozent
<b>v/w</b>	Gewichtsvolumen
<b>w/v</b>	Massenkonzentration
<b>VWF</b>	von-Willebrand-Faktor
<b>WAVE</b>	<i>WASP-family verprolin-homologous protein,</i> WAVE-Protein
<b>WGA</b>	<i>wheat-germ-agglutinin,</i> Weizenkeim-Agglutinin
<b>μL</b>	Mikroliter
<b>μm</b>	Mikrometer
<b>μM</b>	Mikromolar

## 8. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Aufbau der Gefäßwand</b> .....	4
<b>Abbildung 2: Schematische Darstellung der endothelialen Glykokalyx (eGC)</b> ...	7
<b>Abbildung 3: RhoA und Rac1 Signalweg</b> .....	8
<b>Abbildung 4: Modell der endothelialen Signaltransduktion.</b> .....	10
<b>Abbildung 5: Schematische Darstellung der NO-vermittelten Vasodilatation glatter Gefäßmuskeln</b> .....	14
<b>Abbildung 6: Schematische Darstellung des eNOS Uncouplings</b> .....	16
<b>Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines Piezo1 Kanals</b> .....	19
<b>Abbildung 8: Illustrierung der mechanischen Aktivierung des Piezo1-Kanals.</b>	20
<b>Abbildung 9: Aktivierung des mechanosensitiven Piezo1 Ionenkanals durch Yoda1</b> .....	21
<b>Abbildung 10: Schematische Darstellung des CRISPR-Cas9 Mechanismus zur Genom-Editierung.</b> .....	40
<b>Abbildung 11: Schematische Darstellung der Mäuseaorten-Präparation</b> .....	52
<b>Abbildung 12: Schematische Darstellung der Nanoindentation Messung</b> .....	53
<b>Abbildung 13: Relative piezo1 mRNA Expression in Wildtyp EA.hy926 und Piezo1 CRISPR-Zellen.</b> .....	59
<b>Abbildung 14: Auswirkung des CRISPR-Cas9-Knockouts auf die Piezo1-Proteinexpression.</b> .....	60
<b>Abbildung 15: Nachweis der Expression von Piezo1 in EA.hy926 Wildtyp-Zellen und in Piezo1 CRISPR-Zellen durch Western Blot Analyse</b> .....	60
<b>Abbildung 16: Piezo1-K.O. führt zu einer reduzierten eGC-Höhe</b> .....	62
<b>Abbildung 17: Piezo1 beeinflusst die Menge an verdautem Syndecan in Endothelzellen.</b> .....	63
<b>Abbildung 18: Einfluss von Piezo1 auf die Adhäsion von Neutrophilen</b> .....	65
<b>Abbildung 19: Piezo1 Aktivierung verändert die Rho GTPase Aktivität.</b> .....	66
<b>Abbildung 20: Vollständiger Western Blot zur Quantifizierung der CRISPR-Cas9 Methode</b> .....	116
<b>Abbildung 21: Vollständiger Western Blot mit Ladungskontrolle Lamin A und C zur Quantifizierung der CRISPR-Cas9 Methode.</b> .....	117

## 9. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien.</b> .....	29
<b>Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.</b> .....	30
<b>Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte.</b> .....	33
<b>Tabelle 4: Verwendete Kits.</b> .....	34
<b>Tabelle 5: Verwendete Zelllinien.</b> .....	35
<b>Tabelle 6: Verwendete Primer für molekularbiologische Methoden.</b> .....	36
<b>Tabelle 7: Angewendete Software</b> .....	37
<b>Tabelle 8: Programmeinstellungen zur Zellyse.</b> .....	42
<b>Tabelle 9: Zusammensetzung PCR-Ansatz.</b> .....	42
<b>Tabelle 10: Programmeinstellungen für PCR.</b> .....	43
<b>Tabelle 11: Programmeinstellungen für Re-Annealing.</b> .....	43
<b>Tabelle 12: Temperaturen und Zyklen zur Durchführung der qPCR.</b> .....	47

## 10. Literaturverzeichnis

Aguilar VM, Paul A, Lazarko D, Levitan I. Paradigms of endothelial stiffening in cardiovascular disease and vascular aging. *Front Physiol.* 2023;13:1081119. Published 2023 Jan 11. doi:10.3389/fphys.2022.1081119

Albarrán-Juárez J, Iring A, Wang S, et al. Piezo1 and Gq/G11 promote endothelial inflammation depending on flow pattern and integrin activation. *J Exp Med.* 2018;215(10):2655-2672. doi:10.1084/jem.20180483

Alonso D, Radomski MW. The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart Fail Rev.* 2003;8(1):107-115. doi:10.1023/a:1022155206928

Alphonsus CS, Rodseth RN. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia.* 2014;69(7):777-784. doi:10.1111/anae.12661

Álvarez-Santos MD, Álvarez-González M, Estrada-Soto S, Bazán-Perkins B. Regulation of Myosin Light-Chain Phosphatase Activity to Generate Airway Smooth Muscle Hypercontractility. *Front Physiol.* 2020;11:701. Published 2020 Jun 26. doi:10.3389/fphys.2020.00701

Askari H, Sadeghinejad M, Fancher IS. Mechanotransduction and the endothelial glycocalyx: Interactions with membrane and cytoskeletal proteins to transduce force. *Curr Top Membr.* 2023;91:43-60. doi:10.1016/bs.ctm.2023.02.003

Bansch P, Nelson A, Ohlsson T, Bentzer P. Effect of charge on microvascular permeability in early experimental sepsis in the rat. *Microvasc Res.* 2011;82(3):339-345. doi:10.1016/j.mvr.2011.08.008

Bays HE, Taub PR, Epstein E, et al. Ten things to know about ten cardiovascular disease risk factors. *Am J Prev Cardiol.* 2021;5:100149. Published 2021 Jan 23. doi:10.1016/j.ajpc.2021.100149

Beverley KM, Ahn SJ, Levitan I. Flow-sensitive ion channels in vascular endothelial cells: Mechanisms of activation and roles in mechanotransduction. *Biophys J.* Published online March 27, 2025. doi:10.1016/j.bpj.2025.03.021

Björkegren JLM, Lusis AJ. Atherosclerosis: Recent developments. *Cell.* 2022;185(10):1630-1645. doi:10.1016/j.cell.2022.04.004

Bkaily G, Abou Abdallah N, Simon Y, Jazzar A, Jacques D. Vascular smooth muscle remodeling in health and disease. *Can J Physiol Pharmacol.* 2021;99(2):171-178. doi:10.1139/cjpp-2020-0399

Blanter M, Cambier S, De Bondt M, et al. Method Matters: Effect of Purification Technology on Neutrophil Phenotype and Function. *Front Immunol.* 2022;13:820058. Published 2022 Feb 10. doi:10.3389/fimmu.2022.820058

Bonowicz K, Jerka D, Piekarska K, et al. CRISPR-Cas9 in Cardiovascular Medicine: Unlocking New Potential for Treatment. *Cells.* 2025;14(2):131. Published 2025 Jan 17. doi:10.3390/cells14020131

Botello-Smith WM, Jiang W, Zhang H, et al. A mechanism for the activation of the mechanosensitive Piezo1 channel by the small molecule Yoda1. *Nat Commun.* 2019;10(1):4503. Published 2019 Oct 3. doi:10.1038/s41467-019-12501-1

Buffone A, Weaver VM. Don't sugarcoat it: How glycocalyx composition influences cancer progression. *J Cell Biol.* 2020;219(1):e201910070. doi:10.1083/jcb.201910070

Camargo LL, Rios FJ, Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species in hypertension. *Nat Rev Cardiol.* 2025;22(1):20-37. doi:10.1038/s41569-024-01062-6

Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, et al. TNF-alpha induced Shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin. *Basic Res Cardiol.* 2009;104(1):78-89. doi:10.1007/s00395-008-0749-5

Chavakis E, Dernbach E, Hermann C, Mondorf UF, Zeiher AM, Dimmeler S. Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway. *Circulation.* 2001;103(16):2102-2107. doi:10.1161/01.cir.103.16.2102

Chen B, Chou HT, Brautigam CA, et al. Rac1 GTPase activates the WAVE regulatory complex through two distinct binding sites. *Elife.* 2017;6:e29795. Published 2017 Sep 26. doi:10.7554/eLife.29795

Chatterjee S, Fujiwara K, Pérez NG, Ushio-Fukai M, Fisher AB. Mechanosignaling in the vasculature: emerging concepts in sensing, transduction and physiological responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;308(12):H1451-H1462. doi:10.1152/ajpheart.00105.2015

- Christensen AP, Corey DP. TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation?. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(7):510-521. doi:10.1038/nrn2149
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91(10):3527-3561.
- Collins SR, Blank RS, Deatherage LS, Dull RO. Special article: the endothelial glycocalyx: emerging concepts in pulmonary edema and acute lung injury. *Anesth Analg*. 2013;117(3):664-674. doi:10.1213/ANE.0b013e3182975b85
- Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(9):1541-1547. doi:10.1161/01.ATV.0000085630.24353.3D
- Cosgun ZC, Fels B, Kusche-Vihrog K. Nanomechanics of the Endothelial Glycocalyx: From Structure to Function. *Am J Pathol*. 2020;190(4):732-741. doi:10.1016/j.ajpath.2019.07.021
- Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*. 2010 Oct 1;330(6000):55-60. doi:10.1126/science.1193270. Epub 2010 Sep 2. PMID: 20813920; PMCID: PMC3062430.
- Crabtree MJ, Channon KM. Synthesis and recycling of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Nitric Oxide*. 2011;25(2):81-88. doi:10.1016/j.niox.2011.04.004
- Dangel O, Mergia E, Karlisch K, Groneberg D, Koesling D, Friebe A. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *J Thromb Haemost*. 2010;8(6):1343-1352. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03806.x
- Davis GE, Pintar Allen KA, Salazar R, Maxwell SA. Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 5):917-930. doi:10.1242/jcs.114.5.917
- Di Lorenzo A, Lin MI, Murata T, et al. eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 24):5541-5552. doi:10.1242/jcs.115972

Dogné S, Flamion B, Caron N. Endothelial Glycocalyx as a Shield Against Diabetic Vascular Complications: Involvement of Hyaluronan and Hyaluronidases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(7):1427-1439. doi:10.1161/ATVBAHA.118.310839

Dogné S, Flamion B. Endothelial Glycocalyx Impairment in Disease: Focus on Hyaluronan Shedding. *Am J Pathol.* 2020;190(4):768-780. doi:10.1016/j.ajpath.2019.11.016

Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys.* 2011;40:169-186. doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155359

dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, et al. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 2003;83(2):433-473. doi:10.1152/physrev.00026.2002

Dragovich MA, Chester D, Fu BM, et al. Mechanotransduction of the endothelial glycocalyx mediates nitric oxide production through activation of TRP channels. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016;311(6):C846-C853. doi:10.1152/ajpcell.00288.2015

Drummond HA, Jernigan NL, Grifoni SC. Sensing tension: epithelial sodium channel/acid-sensing ion channel proteins in cardiovascular homeostasis. *Hypertension.* 2008;51(5):1265-1271. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.093401

Du S, Liu K. Mechanosensitive ion channels and inflammation: key links in cellular signal transduction. *Inflamm Res.* 2025;74(1):104. Published 2025 Jul 16. doi:10.1007/s00011-025-02057-w

Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res.* 2007;75(2):247-260. doi:10.1016/j.cardiores.2007.03.023

Eckenstaler R, Hauke M, Benndorf RA. A current overview of RhoA, RhoB, and RhoC functions in vascular biology and pathology. *Biochem Pharmacol.* 2022;206:115321. doi:10.1016/j.bcp.2022.115321

Fang XZ, Zhou T, Xu JQ, et al. Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels. *Cell Biosci.* 2021;11(1):13. Published 2021 Jan 9. doi:10.1186/s13578-020-00522-z

- Fels B, Kusche-Vihrog K. It takes more than two to tango: mechanosignaling of the endothelial surface. *Pflugers Arch.* 2020;472(4):419-433. doi:10.1007/s00424-020-02369-2
- Fels B, Acharya S, Vahldieck C, et al. Mineralocorticoid receptor-antagonism prevents COVID-19-dependent glycocalyx damage. *Pflugers Arch.* 2022;474(10):1069-1076. doi:10.1007/s00424-022-02726-3
- Fels B, Fischer F, Herrnboeck L, et al. SECS, drugs, and Rac1&Rho: regulation of EnNaC in vascular endothelial cells. *Pflugers Arch.* 2025;477(7):977-992. doi:10.1007/s00424-025-03093-5
- Fels J, Callies C, Kusche-Vihrog K, Oberleithner H. Nitric oxide release follows endothelial nanomechanics and not vice versa. *Pflugers Arch.* 2010;460(5):915-923. doi:10.1007/s00424-010-0871-8
- Fels J, Jeggle P, Kusche-Vihrog K, Oberleithner H. Cortical actin nanodynamics determines nitric oxide release in vascular endothelium. *PLoS One.* 2012;7(7):e41520. doi:10.1371/journal.pone.0041520
- Fels J, Jeggle P, Liashkovich I, Peters W, Oberleithner H. Nanomechanics of vascular endothelium. *Cell Tissue Res.* 2014;355(3):727-737. doi:10.1007/s00441-014-1853-5
- Fels J, Kusche-Vihrog K. Endothelial Nanomechanics in the Context of Endothelial (Dys)function and Inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2019;30(7):945-959. doi:10.1089/ars.2017.7327
- Fernández-Sarmiento J, Salazar-Peláez LM, Carcillo JA. The Endothelial Glycocalyx: A Fundamental Determinant of Vascular Permeability in Sepsis. *Pediatr Crit Care Med.* 2020;21(5):e291-e300. doi:10.1097/PCC.0000000000002266
- Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM. Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res.* 2003;93(10):e136-e142. doi:10.1161/01.RES.0000101744.47866.D5
- Frań W, Wojtasińska A, Lisińska W, Młynarska E, Franczyk B, Rysz J. Pathophysiology of Cardiovascular Diseases: New Insights into Molecular Mechanisms of Atherosclerosis, Arterial Hypertension, and Coronary Artery Disease. *Biomedicines.* 2022;10(8):1938. Published 2022 Aug 10. doi:10.3390/biomedicines10081938

Frostedgård J. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. *BMC Med.* 2013;11:117. Published 2013 May 1. doi:10.1186/1741-7015-11-117

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288(5789):373-376. doi:10.1038/288373a0

Galis ZS, Kranzhöfer R, Fenton JW 2nd, Libby P. Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(3):483-489. doi:10.1161/01.atv.17.3.483

Gao Z, Chen Z, Sun A, Deng X. Gender differences in cardiovascular disease. *Medicine in Novel Technology and Devices.* 2019;4:100025. doi:10.1016/j.medntd.2019.100025

Garsen M, Rops AL, Li J, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Prevents Heparanase Induction and the Development of Proteinuria. *PLoS One.* 2016;11(8):e0160894. Published 2016 Aug 9. doi:10.1371/journal.pone.0160894

Gerhold KA, Schwartz MA. Ion Channels in Endothelial Responses to Fluid Shear Stress. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(5):359-369. doi:10.1152/physiol.00007.2016

Gielis JF, Lin JY, Wingler K, Van Schil PE, Schmidt HH, Moens AL. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(7):765-776. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.018

Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks 2023 Collaborators. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors in 204 Countries and Territories, 1990-2023. *J Am Coll Cardiol.* 2025;86(22):2167-2243. doi:10.1016/j.jacc.2025.08.015

Ghosh M, Rana S. The anaphylatoxin C5a: Structure, function, signaling, physiology, disease, and therapeutics. *Int Immunopharmacol.* 2023;118:110081. doi:10.1016/j.intimp.2023.110081

Goligorsky MS, Sun D. Glycocalyx in Endotoxemia and Sepsis. *Am J Pathol.* 2020;190(4):791-798. doi:10.1016/j.ajpath.2019.06.017

Goodall KJ, Poon IK, Phipps S, Hulett MD. Soluble heparan sulfate fragments generated by heparanase trigger the release of pro-inflammatory cytokines through

TLR-4. PLoS One. 2014;9(10):e109596. Published 2014 Oct 8. doi:10.1371/journal.pone.0109596

Hennigs JK, Matuszcak C, Trepel M, Körbelin J. Vascular Endothelial Cells: Heterogeneity and Targeting Approaches. Cells. 2021;10(10):2712. Published 2021 Oct 10. doi:10.3390/cells10102712

Hink U, Oelze M, Kolb P, et al. Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. J Am Coll Cardiol. 2003;42(10):1826-1834. doi:10.1016/j.jacc.2003.07.009

Iba T, Levy JH. Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis. J Thromb Haemost. 2019;17(2):283-294. doi:10.1111/jth.14371

Ikonomidis I, Voumvourakis A, Makavos G, et al. Association of impaired endothelial glycocalyx with arterial stiffness, coronary microcirculatory dysfunction, and abnormal myocardial deformation in untreated hypertensives. J Clin Hypertens (Greenwich). 2018;20(4):672-679. doi:10.1111/jch.13236

Iqbal AM, Jamal SF. Essential Hypertension. [Updated 2023 Jul 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539859/>

Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21:247-269. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721

Jeggle P, Callies C, Tarjus A, et al. Epithelial sodium channel stiffens the vascular endothelium in vitro and in Liddle mice. Hypertension. 2013;61(5):1053-1059. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.199455

Jiang Y, Yang X, Jiang J, Xiao B. Structural Designs and Mechanogating Mechanisms of the Mechanosensitive Piezo Channels. Trends Biochem Sci. 2021;46(6):472-488. doi:10.1016/j.tibs.2021.01.008

Jin RC, Loscalzo J. Vascular Nitric Oxide: Formation and Function. J Blood Med. 2010;2010(1):147-162. doi:10.2147/JBM.S7000

Johansson PI, Stensballe J, Rasmussen LS, Ostrowski SR. A high admission syndecan-1 level, a marker of endothelial glycocalyx degradation, is associated with

inflammation, protein C depletion, fibrinolysis, and increased mortality in trauma patients. *Ann Surg.* 2011;254(2):194-200. doi:10.1097/SLA.0b013e318226113d

Józkowiak M, Niebora J, Domagała D, et al. New insights into endothelial cell physiology and pathophysiology. *Biomed Pharmacother.* 2025;190:118415. doi:10.1016/j.biopha.2025.118415

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC. Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem.* 1997;272(30):18522-18525. doi:10.1074/jbc.272.30.18522

Kainulainen V, Nelimarkka L, Järveläinen H, Laato M, Jalkanen M, Elenius K. Suppression of syndecan-1 expression in endothelial cells by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 1996;271(31):18759-18766. doi:10.1074/jbc.271.31.18759

Kasas S, Wang X, Hirling H, et al. Superficial and deep changes of cellular mechanical properties following cytoskeleton disassembly. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2005;62(2):124-132. doi:10.1002/cm.20086

Kaur G, Harris NR. Endothelial glycocalyx in retina, hyperglycemia, and diabetic retinopathy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2023;324(5):C1061-C1077. doi:10.1152/ajpcell.00188.2022

Kim EC, Choi SK, Lim M, Yeon SI, Lee YH. Role of endogenous ENaC and TRP channels in the myogenic response of rat posterior cerebral arteries. *PLoS One.* 2013;8(12):e84194. Published 2013 Dec 31. doi:10.1371/journal.pone.0084194

Klinger JR, Kadowitz PJ. The Nitric Oxide Pathway in Pulmonary Vascular Disease. *Am J Cardiol.* 2017;120(8S):S71-S79. doi:10.1016/j.amjcard.2017.06.012

Kolářová H, Ambrůzová B, Svihálková Šindlerová L, Klinke A, Kubala L. Modulation of endothelial glycocalyx structure under inflammatory conditions. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:694312. doi:10.1155/2014/694312

Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18):4411. Published 2019 Sep 7. doi:10.3390/ijms20184411

Kremastiotis G, Handa I, Jackson C, George S, Johnson J. Disparate effects of MMP and TIMP modulation on coronary atherosclerosis and associated myocardial fibrosis.

Sci Rep. 2021;11(1):23081. Published 2021 Nov 30. doi:10.1038/s41598-021-02508-4

Kugelmann D, Rotkopf LT, Radeva MY, Garcia-Ponce A, Walter E, Waschke J. Histamine causes endothelial barrier disruption via Ca<sup>2+</sup>-mediated RhoA activation and tension at adherens junctions. Sci Rep. 2018;8(1):13229. Published 2018 Sep 5. doi:10.1038/s41598-018-31408-3

Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. Biochem Pharmacol. 2005;70(3):343-354. doi:10.1016/j.bcp.2005.05.009

Lacroix JJ, Botello-Smith WM, Luo Y. Probing the gating mechanism of the mechanosensitive channel Piezo1 with the small molecule Yoda1. Nat Commun. 2018;9(1):2029. Published 2018 May 23. doi:10.1038/s41467-018-04405-3

Lallo V, Bracaglia LG. Influencing Endothelial Cells' Roles in Inflammation and Wound Healing Through Nucleic Acid Delivery. Tissue Eng Part A. 2024;30(7-8):272-286. doi:10.1089/ten.TEA.2023.0296

Lang F. Stiff endothelial cell syndrome in vascular inflammation and mineralocorticoid excess. Hypertension. 2011;57(2):146-147. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.164558

Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2009;1(6):a001651. doi:10.1101/cshperspect.a001651

Ley K, Hoffman HM, Kubes P, et al. Neutrophils: New insights and open questions. Sci Immunol. 2018;3(30):eaat4579. doi:10.1126/sciimmunol.aat4579

Lhomme A, Gilbert G, Pele T, et al. Stretch-activated Piezo1 Channel in Endothelial Cells Relaxes Mouse Intrapulmonary Arteries. Am J Respir Cell Mol Biol. 2019;60(6):650-658. doi:10.1165/rcmb.2018-0197OC

Li W, Wang W. The role of actomyosin in the regulation of syndecan-1 in hyperosmosis. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2021;1865(10):129975. doi:10.1016/j.bbagen.2021.129975

- Lin CC, Tseng HW, Hsieh HL, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB in A549 cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008;229(3):386-398. doi:10.1016/j.taap.2008.01.032
- Lin, Y. C., Guo, Y. R., Miyagi, A., Levring, J., MacKinnon, R., & Scheuring, S. (2019). Force-induced conformational changes in PIEZO1. *Nature*, 573(7773), 230–234. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1499-2>
- Lipowsky HH. Protease Activity and the Role of the Endothelial Glycocalyx in Inflammation. *Drug Discov Today Dis Models.* 2011;8(1):57-62. doi:10.1016/j.ddmod.2011.05.004
- Lipowsky HH. The endothelial glycocalyx as a barrier to leukocyte adhesion and its mediation by extracellular proteases. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(4):840-848. doi:10.1007/s10439-011-0427-x
- Liu D, Zhong Z, Karin M. NF-κB: A Double-Edged Sword Controlling Inflammation. *Biomedicines.* 2022;10(6):1250. Published 2022 May 27. doi:10.3390/biomedicines10061250
- Lozito TP, Tuan RS. Endothelial cell microparticles act as centers of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) activation and vascular matrix remodeling. *J Cell Physiol.* 2012;227(2):534-549. doi:10.1002/jcp.22744
- Ma J, Li Y, Yang X, et al. Signaling pathways in vascular function and hypertension: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):168. Published 2023 Apr 20. doi:10.1038/s41392-023-01430-7
- Magdalena K, Magdalena K, Grazyna S. The Role of Matrix Metalloproteinase-3 In the Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Events. *EJIFCC.* 2006;17(1):2-5. Published 2006 Mar 20.
- Martino F, Perestrelo AR, Vinarský V, Pagliari S, Forte G. Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Front Physiol.* 2018;9:824. Published 2018 Jul 5. doi:10.3389/fphys.2018.00824
- McCarron JG, Lee MD, Wilson C. The Endothelium Solves Problems That Endothelial Cells Do Not Know Exist. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(4):322-338. doi:10.1016/j.tips.2017.01.008

Meza CA, La Favor JD, Kim DH, Hickner RC. Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS?. *Int J Mol Sci.* 2019;20(15):3775. Published 2019 Aug 2. doi:10.3390/ijms20153775

Milusev A, Rieben R, Sorvillo N. The Endothelial Glycocalyx: A Possible Therapeutic Target in Cardiovascular Disorders. *Front Cardiovasc Med.* 2022;9:897087. Published 2022 May 13. doi:10.3389/fcvm.2022.897087

Mishra P, Pandey CM, Singh U, Gupta A, Sahu C, Keshri A. Descriptive statistics and normality tests for statistical data. *Ann Card Anaesth.* 2019;22(1):67-72. doi:10.4103/aca.ACA\_157\_18

Mitra R, O'Neil GL, Harding IC, Cheng MJ, Mensah SA, Ebong EE. Glycocalyx in Atherosclerosis-Relevant Endothelium Function and as a Therapeutic Target. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19(12):63. Published 2017 Nov 10. doi:10.1007/s11883-017-0691-9

Møller LLV, Klip A, Sylow L. Rho GTPases-Emerging Regulators of Glucose Homeostasis and Metabolic Health. *Cells.* 2019;8(5):434. Published 2019 May 9. doi:10.3390/cells8050434

Motulsky HJ, Brown RE. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:123. Published 2006 Mar 9. doi:10.1186/1471-2105-7-123

Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med.* 2008;29(5):290-308. doi:10.1016/j.mam.2008.05.002

Mutchler SM, Kirabo A, Kleyman TR. Epithelial Sodium Channel and Salt-Sensitive Hypertension. *Hypertension.* 2021;77(3):759-767. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14481

Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 2005;26(1-2):33-65. doi:10.1016/j.mam.2004.09.003

Neumann P, Gertzberg N, Johnson A. TNF-alpha induces a decrease in eNOS promoter activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286(2):L452-L459. doi:10.1152/ajplung.00378.2002

Nussinovitch U, Sandoo A, Malik M: "Chapter 5 - A Study of Cardiac Function, Atherosclerosis, and Arrhythmogenicity" in: "The Heart in Rheumatic, Autoimmune and Inflammatory Diseases", Pathophysiology, Clinical Aspects and Therapeutic Approaches 2017, Pages 91-125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803267-1.00005-3>.

Oberleithner H, Riethmüller C, Schillers H, MacGregor GA, de Wardener HE, Hausberg M. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(41):16281-16286. doi:10.1073/pnas.0707791104

Oberleithner H, Peters W, Kusche-Vihrog K, et al. Salt overload damages the glycocalyx sodium barrier of vascular endothelium. *Pflugers Arch*. 2011;462(4):519-528. doi:10.1007/s00424-011-0999-1

Ohashi K, Nagata K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S, Mizuno K. Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem*. 2000;275(5):3577-3582. doi:10.1074/jbc.275.5.3577

Olejarz W, Łacheta D, Kubiak-Tomaszewska G. Matrix Metalloproteinases as Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability. *Int J Mol Sci*. 2020;21(11):3946. Published 2020 May 31. doi:10.3390/ijms21113946

Pabst A, Brock N, Hardt S, et al. Mechanoresponsive ion channels Piezo1 and TRPV4 stimulate ADAM10 and ADAM17 with differential impact on endothelial migration and proliferation. *Cell Commun Signal*. 2026;24(1):52. Published 2026 Jan 10. doi:10.1186/s12964-025-02633-x

Patterson EK, Cepinkas G, Fraser DD. Endothelial Glycocalyx Degradation in Critical Illness and Injury. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9:898592. Published 2022 Jul 8. doi:10.3389/fmed.2022.898592

Pirri C. PIEZO Channels in Mechano-Inflammation: Gatekeepers of Neuroimmune Crosstalk. *Diseases*. 2025;13(8):263. Published 2025 Aug 15. doi:10.3390/diseases13080263

Pluta W, Lubkowska A, Dudzińska W. Vascular Endothelium in Health and Disease: Structure, Function, Assessment and Role in Metabolic Disorders. *Vasc Health Risk Manag*. 2025;21:729-747. Published 2025 Sep 3. doi:10.2147/VHRM.S519426

- Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(10):803-815. doi:10.1038/nri2171
- Prasain N, Stevens T. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res.* 2009;77(1):53-63. doi:10.1016/j.mvr.2008.09.012
- Proudfoot AEI, Johnson Z, Bonvin P, Handel TM. Glycosaminoglycan Interactions with Chemokines Add Complexity to a Complex System. *Pharmaceuticals (Basel).* 2017;10(3):70. Published 2017 Aug 9. doi:10.3390/ph10030070
- Qin L, He T, Chen S, et al. Roles of mechanosensitive channel Piezo1/2 proteins in skeleton and other tissues. *Bone Res.* 2021;9(1):44. Published 2021 Oct 20. doi:10.1038/s41413-021-00168-8
- Qu J, Cheng Y, Wu W, Yuan L, Liu X. Glycocalyx Impairment in Vascular Disease: Focus on Inflammation. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:730621. Published 2021 Sep 13. doi:10.3389/fcell.2021.730621
- Ramani VC, Vlodaysky I, Ng M, et al. Chemotherapy induces expression and release of heparanase leading to changes associated with an aggressive tumor phenotype. *Matrix Biol.* 2016;55:22-34. doi:10.1016/j.matbio.2016.03.006
- Ramnath R, Foster RR, Qiu Y, et al. Matrix metalloproteinase 9-mediated Shedding of syndecan 4 in response to tumor necrosis factor  $\alpha$ : a contributor to endothelial cell glycocalyx dysfunction. *FASEB J.* 2014;28(11):4686-4699. doi:10.1096/fj.14-252221
- Ranade SS, Qiu Z, Woo SH, et al. Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(28):10347-10352. doi:10.1073/pnas.1409233111
- Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 2007;454(3):345-359. doi:10.1007/s00424-007-0212-8
- Retailleau K, Duprat F, Arhatte M, et al. Piezo1 in Smooth Muscle Cells Is Involved in Hypertension-Dependent Arterial Remodeling. *Cell Rep.* 2015;13(6):1161-1171. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.072

- Richter JR. Glycocalyx Gone Awry: Pathologic Cell Signaling during Endotheliopathy. *American Journal of Biomedical Science & Research*. 2019;5(2):118-126. doi:10.34297/ajbsr.2019.05.000891
- Rosales C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*. 2020;108(1):377-396. doi:10.1002/JLB.4MIR0220-574RR
- Russo I, Barale C, Melchionda E, Penna C, Pagliaro P. Platelets and Cardioprotection: The Role of Nitric Oxide and Carbon Oxide. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7):6107. Published 2023 Mar 24. doi:10.3390/ijms24076107
- Sandoo A, van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J*. 2010 Dec 23;4:302-12. doi:10.2174/1874192401004010302. PMID: 21339899; PMCID: PMC3040999.
- Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(7):a004952. Published 2011 Jul 1. doi:10.1101/cshperspect.a004952
- Schaefer A, Hordijk PL. Cell-stiffness-induced mechanosignaling - a key driver of leukocyte transendothelial migration. *J Cell Sci*. 2015;128(13):2221-2230. doi:10.1242/jcs.163055
- Schierke F, Wyrwoll MJ, Wisdorf M, et al. Nanomechanics of the endothelial glycocalyx contribute to Na<sup>+</sup>-induced vascular inflammation. *Sci Rep*. 2017;7:46476. Published 2017 Apr 13. doi:10.1038/srep46476
- Steppan J, Hofer S, Funke B, et al. Sepsis and major abdominal surgery lead to flaking of the endothelial glycocalyx. *J Surg Res*. 2011;165(1):136-141. doi:10.1016/j.jss.2009.04.034
- Su Y, Edwards-Bennett S, Bubb MR, Block ER. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284(6):C1542-C1549. doi:10.1152/ajpcell.00248.2002
- Suzuki A, Tomita H, Okada H. Form follows function: The endothelial glycocalyx. *Transl Res*. 2022;247:158-167. doi:10.1016/j.trsl.2022.03.014
- Suzuki K, Miura T, Okada H. The endothelial glycocalyx-All the same? No, it is not. *Acute Med Surg*. 2023;10(1):e896. Published 2023 Oct 4. doi:10.1002/ams2.896

Syeda R, Xu J, Dubin AE, et al. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *Elife*. 2015;4:e07369. Published 2015 May 22. doi:10.7554/eLife.07369

Szczygiel AM, Brzezinka G, Targosz-Korecka M, Chlopicki S, Szymonski M. Elasticity changes anti-correlate with NO production for human endothelial cells stimulated with TNF- $\alpha$ . *Pflugers Arch*. 2012;463(3):487-496. doi:10.1007/s00424-011-1051-1

Tang H, Vanderpool RR, Wang J, Yuan JX. Targeting L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*. 2017;7(3):569-571. doi:10.1177/2045893217728261

Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res*. 2005;96(5):488-500. doi:10.1161/01.RES.0000159708.71142.c8

Vahldieck C, Cianflone E, Fels B, et al. Endothelial Glycocalyx and Cardiomyocyte Damage Is Prevented by Recombinant Syndecan-1 in Acute Myocardial Infarction. *Am J Pathol*. 2023;193(4):474-492. doi:10.1016/j.ajpath.2022.12.009

Vahldieck C, Fels B, Löning S, Nickel L, Weil J, Kusche-Vihrog K. Prolonged Door-to-Balloon Time Leads to Endothelial Glycocalyx Damage and Endothelial Dysfunction in Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction. *Biomedicines*. 2023;11(11):2924. Published 2023 Oct 29. doi:10.3390/biomedicines11112924

Vahldieck C, Löning S, Hamacher C, et al. Dysregulated complement activation during acute myocardial infarction leads to endothelial glycocalyx degradation and endothelial dysfunction via the C5a:C5a-Receptor1 axis. *Front Immunol*. 2024;15:1426526. Published 2024 Jul 11. doi:10.3389/fimmu.2024.1426526

van den Berg BM, Vink H, Spaan JA. The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ Res*. 2003;92(6):592-594. doi:10.1161/01.RES.0000065917.53950.75

van den Berg BM, Spaan JA, Vink H. Impaired glycocalyx barrier properties contribute to enhanced intimal low-density lipoprotein accumulation at the carotid artery bifurcation in mice. *Pflugers Arch*. 2009;457(6):1199-1206. doi:10.1007/s00424-008-0590-6

van Haaren PM, VanBavel E, Vink H, Spaan JA. Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(6):H2848-H2856. doi:10.1152/ajpheart.00117.2003

Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219(1):22-96. doi:10.1111/apha.12646

van Loo G, Bertrand MJM. Death by TNF: a road to inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2023;23(5):289-303. doi:10.1038/s41577-022-00792-3

Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem*. 2007;15(6):2223-2268. doi:10.1016/j.bmc.2007.01.011

Villadangos L, Serrador JM. Subcellular Localization Guides eNOS Function. *Int J Mol Sci*. 2024;25(24):13402. Published 2024 Dec 13. doi:10.3390/ijms252413402

Virdis A, Duranti E, Taddei S. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. *Int J Hypertens*. 2011;2011:916310. doi:10.4061/2011/916310

Wallez Y, Huber P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(3):794-809. doi:10.1016/j.bbamem.2007.09.003

Wang GR, Zhu Y, Halushka PV, Lincoln TM, Mendelsohn ME. Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(9):4888-4893. doi:10.1073/pnas.95.9.4888

Wang J, Ma L, Fang Y, Ye T, Li H, Lan P. Factors influencing glycocalyx degradation: a narrative review. *Front Immunol*. 2025;15:1490395. Published 2025 Jan 16. doi:10.3389/fimmu.2024.1490395

Wang S, Iring A, Strilic B, et al. P2Y<sub>2</sub> and Gq/G<sub>11</sub> control blood pressure by mediating endothelial mechanotransduction. *J Clin Invest*. 2015;125(8):3077-3086. doi:10.1172/JCI81067

- Wang S, Chennupati R, Kaur H, Iring A, Wettschureck N, Offermanns S. Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release. *J Clin Invest.* 2016;126(12):4527-4536. doi:10.1172/JCI87343
- Wang Y, Xiao B. The mechanosensitive Piezo1 channel: structural features and molecular bases underlying its ion permeation and mechanotransduction. *J Physiol.* 2018 Mar 15;596(6):969-978. doi: 10.1113/JP274404. Epub 2017 Dec 19. PMID: 29171028; PMCID: PMC5851880.
- Wang Y, Chi S, Guo H, et al. A lever-like transduction pathway for long-distance chemical- and mechano-gating of the mechanosensitive Piezo1 channel. *Nat Commun.* 2018;9(1):1300. Published 2018 Apr 3. doi:10.1038/s41467-018-03570-9
- Wang Y, Zhang Z, Qu X, Zhou G. Role of the endothelial cell glycocalyx in sepsis-induced acute kidney injury. *Front Med (Lausanne).* 2025;12:1535673. Published 2025 Apr 4. doi:10.3389/fmed.2025.1535673
- Wiesinger A, Peters W, Chappell D, et al. Nanomechanics of the endothelial glycocalyx in experimental sepsis. *PLoS One.* 2013;8(11):e80905. Published 2013 Nov 20. doi:10.1371/journal.pone.0080905
- Wilhelmsen K, Farrar K, Hellman J. Quantitative in vitro assay to measure neutrophil adhesion to activated primary human microvascular endothelial cells under static conditions. *J Vis Exp.* 2013;(78):e50677. Published 2013 Aug 23. doi:10.3791/50677
- Wirth A. Rho kinase and hypertension. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(12):1276-1284. doi:10.1016/j.bbadis.2010.05.002
- Wu J, Lewis AH, Grandl J. Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends Biochem Sci.* 2017;42(1):57-71. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.004
- Yan C, Gao H. New insights for C5a and C5a receptors in sepsis. *Front Immunol.* 2012;3:368. Published 2012 Dec 10. doi:10.3389/fimmu.2012.00368
- Yang J, Xu C, Xie X, Wang J, Shi P. Roles of Piezo1 in chronic inflammatory diseases and prospects for drug treatment (Review). *Mol Med Rep.* 2025;32(1):200. doi:10.3892/mmr.2025.13565

Yao L, Romero MJ, Toque HA, Yang G, Caldwell RB, Caldwell RW. The role of RhoA/Rho kinase pathway in endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Dis Res.* 2010;1(4):165-170. doi:10.4103/0975-3583.74258

Yen W, Cai B, Yang J, et al. Endothelial surface glycocalyx can regulate flow-induced nitric oxide production in microvessels in vivo. *PLoS One.* 2015;10(1):e0117133. Published 2015 Jan 9. doi:10.1371/journal.pone.0117133

Yuan SY, Rigor RR. Regulation of Endothelial Barrier Function. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010. Chapter 1, Introduction. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54120/>

Yung S, Chan TM. Endothelial cell activation and glycocalyx Shedding - potential as biomarkers in patients with lupus nephritis. *Front Immunol.* 2023;14:1251876. Published 2023 Oct 3. doi:10.3389/fimmu.2023.1251876

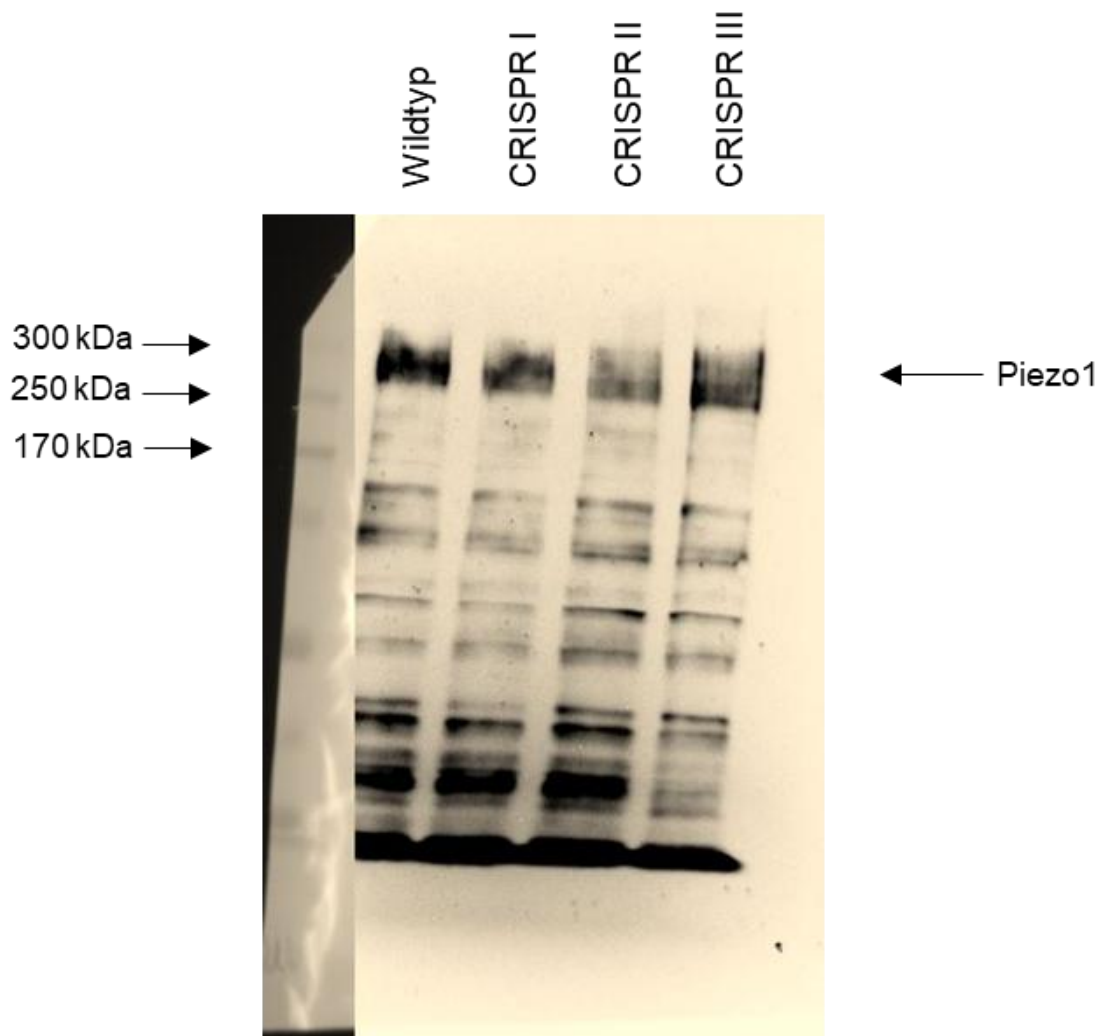
Zhang X, Sun D, Song JW, et al. Endothelial cell dysfunction and glycocalyx - A vicious circle. *Matrix Biol.* 2018;71-72:421-431. doi:10.1016/j.matbio.2018.01.026

Zhao Q, Zhou H, Li X, Xiao B. The mechanosensitive Piezo1 channel: a three-bladed propeller-like structure and a lever-like mechanogating mechanism. *FEBS J.* 2019;286(13):2461-2470. doi:10.1111/febs.14711

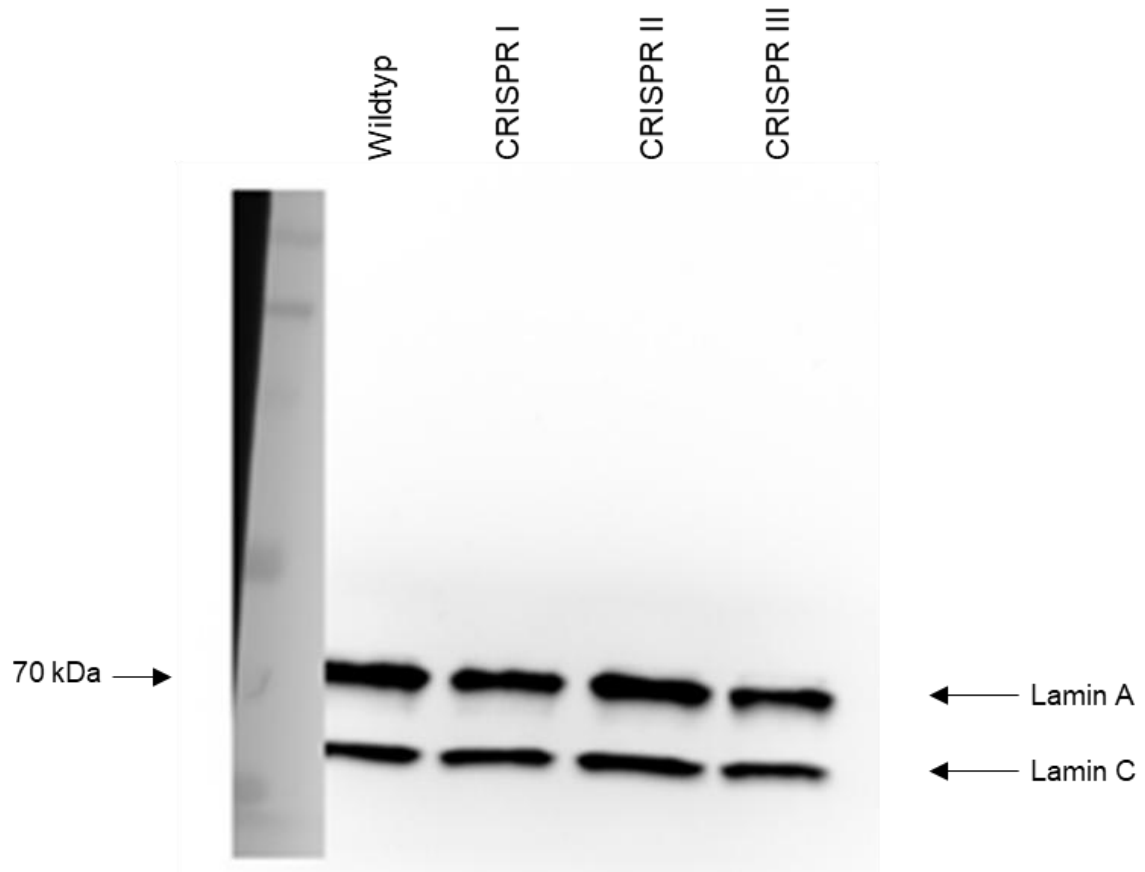
Zheng Q, Zou Y, Teng P, et al. Mechanosensitive Channel PIEZO1 Senses Shear Force to Induce KLF2/4 Expression via CaMKII/MEKK3/ERK5 Axis in Endothelial Cells. *Cells.* 2022;11(14):2191. Published 2022 Jul 13. doi:10.3390/cells11142191

Zong B, Yu F, Zhang X, et al. Mechanosensitive Piezo1 channel in physiology and pathophysiology of the central nervous system. *Ageing Res Rev.* 2023;90:102026. doi:10.1016/j.arr.2023.102026

## 11. Anhang



**Abbildung 20: Vollständiger Western Blot zur Quantifizierung der CRISPR-Cas9 Methode.** Der Western Blot zeigt die Auswirkung des CRISPR-Cas9 Knockouts auf die Piezo1-Proteinexpression. EA.hy926 Wildtyp-Zellen und Piezo1 CRISPR-Zellen wurden lysiert und der Proteingehalt durch die Western Blot Analyse und Piezo1-Antikörper visualisiert. CRISPR I bis III stellen verschiedene Lysate dar, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten erstellt wurden.



**Abbildung 21: Vollständiger Western Blot mit Ladungskontrolle Lamin A und C zur Quantifizierung der CRISPR-Cas9 Methode.** Der Western Blot zeigt die Ladungskontrolle zum Piezo1-K.O. Blot. CRISPR I bis III stellen verschiedene Lysate dar, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten erstellt wurden.

## 12. Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Kristina Kusche für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit am Institut für Physiologie unter ihrer Leitung durchzuführen. Vielen Dank für die großartige Betreuung, die unermüdliche Unterstützung und unzählige wertvolle Erfahrungen, die ich sammeln durfte.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Enrico Leipold für die Übernahme des zweiten Berichterstatters bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Benedikt Fels für die hervorragende Betreuung und Unterstützung im Labor sowie die Beantwortung zahlreicher Fragen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. Carl Vahldieck für seine stets offene Tür und Ohren und den konstruktiven Austausch bedanken.

Ferner möchte ich mich herzlich beim gesamten Institut für Physiologie, allen voran Dr. Reinhard Depping, Dr. Thomas Hellwig-Bürgel, Gabriele Huck, Patricia Rouina, Bettina Rudzewski, Susanne Schindler, Tanja Svensson und Urszula Frackowski, für die Unterstützung und Hilfestellungen im Labor und in der Lehre bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Mutter und Schwester, meinem Bruder und all meinen Freunden bedanken, die immer für mich da waren und mich zu jeder Zeit unterstützt haben.