



Fakultät für Medizin

**Phänotypische und funktionelle Auswirkungen des *Knockdowns*
und Regulation der Genexpression von *ADAMTS7*
in humanen glatten Gefäßmuskelzellen**

Patrick Michael Schindler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Prof. Dr. Heribert Schunkert
2. Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Die Dissertation wurde am 12.06.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.10.2020 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	XIV
TABELLENVERZEICHNIS.....	XVI
ZUSAMMENFASSUNG.....	XVIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Epidemiologie von Atherosklerose und KHK.....	1
1.2 Pathogenese der Atherosklerose	2
1.2.1 Übersicht der Pathogenese der Atherosklerose.....	2
1.2.2 Glatte Muskelzellen in der Atherosklerose	3
1.2.3 LDL-Cholesterin in der Pathogenese der Atherosklerose	5
1.3 Genetik von Atherosklerose und KHK	6
1.4 ADAMTS-7	8
1.4.1 <i>ADAMTS7</i> -Risikolocus	8
1.4.2 ADAMTS-Familie und Struktur von ADAMTS-7	9
1.4.3 Expression und Regulation von <i>ADAMTS7</i>	10
1.4.4 Enzymatische Funktion von ADAMTS-7	11
1.4.5 Pathophysiologische Bedeutung von ADAMTS-7	12
1.4.5.1 ADAMTS-7 in nicht-vaskulären Erkrankungen.....	12
1.4.5.2 ADAMTS-7 in vaskulären Erkrankungen	12
1.5 Fragestellung	14
2 MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1 Material	15
2.1.1 Geräte	15

2.1.2	Chemikalien.....	15
2.1.3	Standard-Puffer und -Lösungen	18
2.1.4	Western Blot: Puffer und Lösungen	19
2.1.5	Western Blot: Gele und Membranen	21
2.1.6	<i>Real Time</i> -PCR-Sonden.....	22
2.1.7	siRNA	22
2.1.8	Immunzytochemie: Reagenzien	22
2.1.9	Zellkultur-Medien.....	23
2.1.10	Zelllinien	24
2.1.11	Kommerziell verfügbare Kits	24
2.1.12	Antikörper	24
2.1.13	Software	26
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Western Blot.....	27
2.2.1.1	Proteingewinnung aus kultivierten Zellen.....	27
2.2.1.2	Gewinnung muriner Protein-Proben.....	27
2.2.1.3	Protein-Konzentrationsbestimmung	28
2.2.1.4	Aufbereitung der Protein-Proben	29
2.2.1.5	Elektrophorese	29
2.2.1.6	Membran-Transfer	30
2.2.1.7	Immunologischer Antigen-Nachweis.....	31
2.2.1.8	Auswertung	33
2.2.1.9	Modifiziertes Vorgehen zum Nachweis von ADAMTS-7	33
2.2.2	Immunzytochemie	34
2.2.3	Genexpressionsanalyse	34
2.2.3.1	RNA-Isolation und reverse Transkription	34
2.2.3.2	<i>Real Time</i> -Polymerase-Kettenreaktion	35
2.2.4	Zellkultur	37

2.2.4.1	HEK293-Zellen.....	37
2.2.4.2	HAoSMC	37
2.2.5	siRNA-vermittelter Gen- <i>Knockdown</i>	38
2.2.6	Transfektion kultivierter Zellen mit Plasmiden.....	39
2.2.7	Beschichtung von Zellkulturplatten.....	41
2.2.8	Kultur von HAoSMC auf beschichteten Zellkulturplatten.....	42
2.2.9	Zellmorphologische Analyse von HAoSMC.....	42
2.2.10	Analyse der zellulären Migration	44
2.2.11	Quantifizierung der zellulären Proliferation	46
2.2.12	Evaluation von anti-ADAMTS-7-Antikörpern im Western Blot.....	47
2.2.13	Evaluation von anti-ADAMTS-7-Antikörpern in der Immunzytochemie	48
2.2.14	Behandlung von HAoSMC mit oxLDL	48
2.2.15	Behandlung von HAoSMC mit Cholesterol	49
2.2.16	Korrelation zwischen LDL-C-GRS und <i>ADAMTS7</i> -assoziiertem KHK-Risiko	49
2.2.17	Behandlung von HAoSMC mit Rosiglitazon	54
2.2.18	Statistische Auswertung	54
3	ERGEBNISSE	57
3.1	Untersuchungen zur Detektion von <i>ADAMTS-7</i>	57
3.1.1	Etablierung des <i>ADAMTS7-Knockdowns</i> mittels RNA-Interferenz in HAoSMC.....	57
3.1.2	Etablierung der <i>ADAMTS7</i> -Überexpression in HEK293-Zellen und HAoSMC.....	58
3.1.3	Strukturierte Analyse von fünf kommerziell verfügbaren anti-ADAMTS-7-Antikörpern im Western Blot.....	59
3.1.4	Strukturierte Analyse von fünf kommerziell verfügbaren anti-ADAMTS-7-Antikörpern in der Immunzytochemie	64
3.2	Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von HAoSMC bei <i>ADAMTS-7</i>-Defizienz und unter proatherogenen Bedingungen	67

3.2.1	Phänotypische Charakterisierung von HAoSMC unter proatherogenen Bedingungen.....	68
3.2.1.1	Phänotypische Charakterisierung von HAoSMC unter dem Einfluss von oxLDL	68
3.2.1.2	Phänotypische Charakterisierung von HAoSMC unter dem Einfluss von Cholesterol	70
3.2.2	Phänotypische und funktionelle Charakterisierung ADAMTS-7-defizienter HAoSMC	71
3.2.2.1	Phänotypische Charakterisierung ADAMTS-7-defizienter HAoSMC	72
3.2.2.2	Funktionelle Charakterisierung ADAMTS-7-defizienter HAoSMC	74
3.2.2.2.1	Zelluläre Proliferation ADAMTS-7-defizienter HAoSMC	75
3.2.2.2.2	Zelluläre Migration ADAMTS-7-defizienter HAoSMC unter proatherogenen Bedingungen	76
3.3	Untersuchungen zur Regulation der <i>ADAMTS7</i>-Expression in HAoSMC	78
3.3.1	<i>ADAMTS7</i> -Expression unter dem Einfluss Atherosklerose-assoziiertes Komponenten der extrazellulären Matrix	78
3.3.2	<i>ADAMTS7</i> -Expression unter dem Einfluss von Cholesterol.....	79
3.3.3	<i>ADAMTS7</i> -Expression unter dem Einfluss von oxLDL	80
3.3.4	Weiterführende Untersuchungen zum Einfluss von oxLDL auf die <i>ADAMTS7</i> -Expression	81
3.3.4.1	Korrelation der KHK-Assoziation des <i>ADAMTS7</i> -Locus mit einem genetischen LDL-C-Risikoscore.....	81
3.3.4.2	<i>ADAMTS7</i> -Expression bei Stimulation von PPAR γ durch den Agonisten Rosiglitazon.....	82
3.3.4.3	Untersuchungen zu LOX-1 und dem ERK1/2-Signalweg	83
3.3.4.3.1	Phosphorylierung von ERK1/2 unter dem Einfluss von oxLDL..	84
3.3.4.3.2	Reversibilität der oxLDL-induzierten Verminderung der <i>ADAMTS7</i> -Expression durch <i>OLR1-Knockdown</i>	85
4	DISKUSSION	87
4.1	Untersuchungen zur Detektion von <i>ADAMTS-7</i>	87

4.1.1	Der <i>ADAMTS7-Knockdown</i> in HAoSMC ist effektiv und im Zeitraum von 24 bis 72 Stunden nach Transfektion stabil.....	87
4.1.2	Der Antikörper ab201083 (Abcam) erkennt spezifisch rekombinantes ADAMTS-7 im Western Blot und in der Immunzytochemie	88
4.2	Phänotypische und funktionelle Charakterisierung ADAMTS-7-defizienter HAoSMC	91
4.2.1	<i>ADAMTS7-Knockdown</i> bewirkt keine Veränderung des Phänotyps von HAoSMC.....	91
4.2.2	<i>ADAMTS7-Knockdown</i> beeinflusst nicht die Proliferationsrate von HAoSMC.....	92
4.2.3	Untersuchungen zur Migration von HAoSMC bei <i>ADAMTS7-Knockdown</i> unter proatherogenen Bedingungen	94
4.2.3.1	OxLDL bewirkt morphologische Veränderungen und eine verminderte Expression von Differenzierungsmarkern in HAoSMC	94
4.2.3.2	<i>ADAMTS7-Knockdown</i> führt in HAoSMC unter proatherogenen Bedingungen zu einem Trend verminderter Migration	96
4.3	Untersuchungen zur Regulation der <i>ADAMTS7</i>-Expression in HAoSMC	97
4.3.1	Die EZM-Bestandteile Laminin, Fibronektin und Kollagen I bewirken keine Veränderung der <i>ADAMTS7</i> -Expression in HAoSMC	97
4.3.2	OxLDL vermindert die <i>ADAMTS7</i> -Expression in HAoSMC.....	99
4.3.2.1	Die oxLDL-induzierte <i>ADAMTS7</i> -Expressionsverminderung ist ein spezifischer Effekt.....	100
4.3.2.2	Die Erhöhung des KHK-Risikos durch das <i>ADAMTS7-Risikoallele</i> korreliert invers mit genetisch prognostiziertem LDL-C	101
4.3.2.3	Die Verminderung der <i>ADAMTS7</i> -Expression durch oxLDL in HAoSMC ist unabhängig von PPAR γ und wird zum Teil über LOX-1 vermittelt.	102
4.4	Schlussfolgerungen und Ausblick	106
5	QUELLENVERZEICHNIS	109
ANHANG	129	
Anhang-Tabellen	129	
Anhang-Abbildungen.....	139	

Publikation	139
Unterstützung	140
DANKSAGUNG	141

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
AoSMC	Glatte Muskelzellen aus der Aorta (englisch: <i>aortic SMC</i>)
BCA	Bicinchoninsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure) (englisch: <i>bicinchoninic acid</i>)
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
Chol:M β CD	Cholesterol:Methyl- β -Cyklodextrin
CMV	Zytomegalievirus
C _T	Fluoreszenz-Schwellenwert bei der qPCR (englisch: <i>crossing threshold</i>)
CVRF	kardiovaskuläre Risikofaktoren (englisch: <i>cardiovascular risk factors</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Fetales Kälberserum
ggf.	gegebenenfalls
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HAoSMC	Humane AoSMC
HBSS	<i>Hank`s Balanced Salt Solution</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HEK [-Zellen]	<i>Human Embryonic Kidney</i> [-Zellen]
HRP	Meerrettich-Peroxidase (englisch: <i>horseradish peroxidase</i>)
ICC	<i>Immunocytochemistry</i> (= Immunzytochemie)
Ig	Immunglobulin

KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDL-C	LDL-Cholesterol
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
oxLDL	oxidiertes LDL
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: <i>polymerase chain reaction</i>)
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: <i>ribonucleic acid</i>)
s.	siehe
SDS	Natriumlaurylsulfat = Natriumdodecylsulfat (englisch: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMC	Glatte Muskelzellen (englisch: <i>smooth muscle cells</i>)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (englisch: <i>single nucleotide polymorphism</i>)
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TSR	Thrombospondin Typ 1 Motiv (englisch: <i>Thrombospondin Type 1 Repeat</i>)
VSMC	Vaskuläre glatte Muskelzellen (englisch: <i>vascular SMC</i>)
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
[Zahl] x g	[Zahl]-fache Erdbeschleunigung (englisch: <i>gravity</i>)
[Gen] ^{-/-} bzw. ^{+/+}	homozygot für das <i>Knockout</i> - bzw. Wildtyp-Allel

Proteine

Tabelle 1: Verzeichnis in der Arbeit genannter Proteine.

Verwendete Bezeichnung / Abkürzung	Empfohlene (Alternative) Bezeichnung nach UniProt (UniProt consortium, abgerufen 05.02.2018)	Gen-Name	UniProt Zugangsnummer (UniProt consortium, abgerufen 05.02.2018)
ADAMTS-4	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4	<i>ADAMTS4</i>	O75173
ADAMTS-7	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 7	<i>ADAMTS7</i>	Q9UKP4
ADAMTS-12	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 12	<i>ADAMTS12</i>	P58397
α 2-Makroglobulin	Alpha-2-macroglobulin	<i>A2M</i>	P01023
aSMA	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)	<i>ACTA2</i>	P62736
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein (Thrombospondin-5)	<i>COMP</i>	P49747
ERK-1	Mitogen-activated protein kinase 3 (Extracellular signal-regulated kinase 1; p44)	<i>MAPK3</i>	P27361
ERK-2	Mitogen-activated protein kinase 1 (Extracellular signal-regulated kinase 2; p42)	<i>MAPK1</i>	P28482
Fibronektin	Fibronectin	<i>FN1</i>	P02751
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD)	<i>GAPDH</i>	P04406
GPR-40	Free fatty acid receptor 1 (G-protein coupled receptor 40)	<i>FFAR1</i> (Synonym: <i>GPR40</i>)	O14842
Kollagen I	Die Kollagen-Tripel-Helix setzt sich aus drei Peptid-Ketten zusammen, im Falle von Kollagen I sind dies „Collagen alpha-1(I) chain“ und „Collagen alpha-2(I) chain“ (Alberts, 2015; National Center for Biotechnology Information (NCBI), abgerufen 20.12.2017)	<i>COL1A1</i> <i>COL1A2</i>	P02452 P08123

Laminin	Laminine sind heterotrimer Glykoproteine, die sich aus je einer α -, β - und γ -Kette zusammensetzen, von welchen jeweils Unterformen existieren. (Alberts, 2015; National Center for Biotechnology Information (NCBI), abgerufen 20.12.2017)		
LOX-1	Oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (Lectin-like oxidized LDL receptor 1)	<i>OLR1</i>	P78380
Myosin-11	Myosin-11 (Myosin heavy chain, smooth muscle isoform; SMMHC)	<i>MYH11</i>	P35749
p-ERK-1/2	Die phosphorylierte Form von ERK-1/2		
PDGF-B, bzw. PDGF-BB ¹	Platelet-derived growth factor subunit B	<i>PDGFB</i>	P01127
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	<i>PPARG</i>	P37231
Smoothelin	Smoothelin	<i>SMTN</i>	P53814
TGF β	Transforming growth factor beta (Zytokin aus der TGF β -Superfamilie, von welchem mehrere Isoformen existieren) (Alberts, 2015; National Center for Biotechnology Information (NCBI), abgerufen 20.12.2017)	<i>TGFB1</i> <i>TGFB2</i> <i>TGFB3</i>	P01137 P61812 P10600
TNF α	Tumor necrosis factor (TNF-alpha)	<i>TNF</i>	P01375
TSP-1	Thrombospondin-1	<i>THBS1</i>	P07996

Gene

Tabelle 2: Verzeichnis in der Arbeit genannter Gene.

Verwendete Bezeichnung	Empfohlenes Symbol nach HGNC <small>(HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute, abgerufen 05.02.2018)</small>	Empfohlener (Alternativer) Gen-Name nach HGNC	Entrez Gene-ID <small>(National Center for Biotechnology Information (NCBI), abgerufen 05.02.2018)</small>
<i>ACTA2</i>	<i>ACTA2</i>	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	59
<i>ADAMTS4</i>	<i>ADAMTS4</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 4	9507

¹ Biologisch aktives PDGF ist ein Homo- oder Heterodimer aus den PDGF-A- und -B-Untereinheiten. Je nach Zusammensetzung also PDGF-AA /-AB /-BB.

<i>ADAMTS7</i>	<i>ADAMTS7</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 7	11173
<i>ADAMTS12</i>	<i>ADAMTS12</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 12	81792
<i>COMP</i>	<i>COMP</i>	cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5)	1311
<i>ERK1</i>	<i>MAPK3</i>	mitogen-activated protein kinase 3 (p44mapk)	5595
<i>ERK2</i>	<i>MAPK1</i>	mitogen-activated protein kinase 1 (p42mapk)	5594
<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPD)	2597
<i>MYH11</i>	<i>MYH11</i>	myosin heavy chain 11 (SMMHC)	4629
<i>OLR1</i>	<i>OLR1</i>	oxidized low density lipoprotein receptor 1	4973
<i>PPARG</i>	<i>PPARG</i>	peroxisome proliferator activated receptor gamma	5468
<i>SMTN</i>	<i>SMTN</i>	smoothelin	6525
<i>TNFα</i>	<i>TNF</i>	tumor necrosis factor (TNF-alpha)	7124
<i>TSP1</i>	<i>THBS1</i>	thrombospondin 1	7057

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: HAoSMC in Zellkultur. A. Hellfeldmikroskopische Aufnahme. B. Immunzytochemische Darstellung von alpha Smooth Muscle Actin (aSMA; grün), Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). (eigene Aufnahmen).....	3
Abbildung 2: Molekularer Aufbau von ADAMTS-4 und ADAMTS-7. Abkürzung: PLAC = Protease-und-Lacumin. Nach Kelwick, Desanlis et al. 2015.	10
Abbildung 3: ADAMTS7-Expression in HAoSMC nach Transfektion mit spezifischer anti-ADAMTS7-siRNA und Inkubation für 24, 48 oder 72 Stunden.	58
Abbildung 4: Überexpression von ADAMTS7 in HEK293-Zellen (A) und HAoSMC (B).	59
Abbildung 5: Prüfung von fünf kommerziell verfügbaren anti-ADAMTS-7-Antikörpern in Western Blot (A) und Immunzytochemie (B) hinsichtlich des Erkennens von rekombinantem und endogenem ADAMTS-7 sowie ihrer Spezifität.	62
Abbildung 6: Darstellung von ADAMTS-7 mit dem Antikörper Abcam ab201083 im Western Blot.	64
Abbildung 7: HAoSMC in Immunzytochemie mit dem anti-ADAMTS-7-Antikörper Abnova H00011173-A01 (rot). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). HAoSMC in Passage 9. Einstellungen von Mikroskop und Kamera für beide Bilder identisch. A. scramble-siRNA. B. anti-ADAMTS7-siRNA.	66
Abbildung 8: Differenzierungsmarker in HAoSMC nach Inkubation mit 40 µg/ml oxLDL für 48 Stunden.	69
Abbildung 9: Morphologische Veränderung von HAoSMC durch Inkubation mit oxLDL (40 µg/ml) für 48 Stunden.	70
Abbildung 10: MYH11-Expression in HAoSMC nach Inkubation mit Chol:MβCD (20 µg/ml) für 48 Stunden. Die Graphik zeigt Mittelwerte ± Standardfehler der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte; n = 3 Versuche; ** p < 0,01.	71
Abbildung 11: Veränderung der SMC-Differenzierungsmarker Myosin-11 und Smoothelin durch ADAMTS7-Knockdown in HAoSMC.	73
Abbildung 12: Morphologie von HAoSMC bei ADAMTS7-Knockdown.	74
Abbildung 13: Proliferation von HAoSMC bei ADAMTS7-Knockdown.	75
Abbildung 14: Zelluläre Migration von HAoSMC bei Knockdown von ADAMTS7 mit und ohne oxLDL-Exposition. A. Relative Zunahme zellbedeckter Fläche nach	

24 Stunden; Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 3 Versuche; Abkürzung: n.s. = nicht signifikant. **B.** Exemplarische mikroskopische Abbildungen des Scratch Wound Assays (ein Versuch); die Einsatzbilder zeigen die entsprechenden binären Bilder nach Zellerkennung durch die Software CellProfiler, welche der Quantifizierung bedeckter Fläche zugrunde liegen; die Zeitangaben beziehen sich auf das Intervall nach „Scratching“ und Starten der Migration; Abkürzungen: siRNA_scr. = transfiziert mit siRNA_{scramble}; siRNA_AD.7 = transfiziert mit anti-ADAMTS7-siRNA..... 77

Abbildung 15: ADAMTS7-Expression in HAoSMC bei Kultur auf verschiedenen EZM-Komponenten. 79

Abbildung 16: ADAMTS7-Expression in HAoSMC nach Inkubation mit Chol:M β CD (20 μ g/ml) für 48 Stunden. Die Graphik zeigt Mittelwerte \pm Standardfehler der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der ADAMTS7-Expression bezogen auf nicht Chol:M β CD-exponierte HAoSMC; n = 4 Versuche; Abkürzung: n.s. = nicht signifikant. 80

Abbildung 17: ADAMTS7-Expression in HAoSMC nach 48-stündiger Inkubation mit oxLDL (40 μ g/ml)...... 81

Abbildung 18: Zusammenhang von ADAMTS7-zuzuschreibender Erhöhung des KHK-Risikos und LDL-C-GRS...... 82

Abbildung 19: ADAMTS7-Expression in HAoSMC nach Inkubation mit Rosiglitazon (0,01 μ mol/ml) für 48 Stunden...... 83

Abbildung 20: Phosphorylierung von ERK1/2 in HAoSMC bei oxLDL-Exposition...... 84

Abbildung 21: Expression von OLR1 und ADAMTS7 in HAoSMC nach Inkubation mit oxLDL (40 μ g/ml für 48 Stunden) und OLR1-Knockdown...... 85

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verzeichnis in der Arbeit genannter Proteine.	xi
Tabelle 2: Verzeichnis in der Arbeit genannter Gene.	xii
Tabelle 3: Verwendete Geräte.	15
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.	15
Tabelle 5: Verwendete qPCR-Sonden.	22
Tabelle 6: Verwendete siRNA.	22
Tabelle 7: Kommerziell verfügbare Kits, die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen.	24
Tabelle 8: Antikörper, die in dieser Arbeit in Western Blot oder Immunzytochemie verwendet wurden. Abkürzungen: WB = Western Blot; ICC = Immunzytochemie	24
Tabelle 9: Verwendete Software.	26
Tabelle 10: Übersicht des Einsatzes von Gesamtprotein im Western Blot. Abkürzung: KD = Knockdown.	30
Tabelle 11: Verdünnung der Primär-Antikörper im Western Blot.	32
Tabelle 12: Einsatz von siRNA und Transfektionsreagenz pro Well einer Zellkulturplatte.	39
Tabelle 13: Inkubationszeiten mit siRNA.	39
Tabelle 14: Transfektion von HEK293-Zellen und HAoSMC mit ADAMTS7-Plasmid.	41
Tabelle 15: Beschichtung von Zellkulturplatten mit EZM-Komponenten. Abkürzung: Vol. = Volumen; RT = Raumtemperatur)	41
Tabelle 16: Parameter Cell-Profiler – Identify Primary Objects.	43
Tabelle 17: Einstellungen Infinite® M200 PRO bei Proliferations-Analyse.	46
Tabelle 18: Western Blot zur Prüfung kommerziell-erhältlicher anti-ADAMTS-7-Antikörper, Belegung der Spalten. Abkürzungen: +/- bzw. -/- bedeutet homozygot für das Adamts7-Wildtyp bzw. -Knockout-Allel. ÜS: Überstand; Vol. = Volumen; Lsg. = Lösung; HEK: HEK293-Zellen.	47

Tabelle 19: Genetische Varianten, die in den LDL-C-GRS eingingen. Nach (Teslovich et al., 2010). Falls mehrere Lipide signifikant mit einem SNP assoziiert sind, ist unter Phänotyp dasjenige mit dem niedrigsten p-Wert angegeben. Abkürzungen: SNP = single nucleotide polymorphism; Chr. = Chromosom; Pos. = Position; n.b. = nicht bekannt; hdl = high density lipoprotein; ldl = low density lipoprotein; tc = Gesamt-Cholesterol; tg = Triglyzeride.....50

Tabelle 20: Charakteristika der fünf getesteten anti-ADAMTS-7-Antikörper gemäß Herstellerangaben. Quellen sind die jeweiligen Datenblätter der Antikörper (Abcam, abgerufen 15.06.2017a, abgerufen 15.06.2017b; Abnova, abgerufen 04.02.2018; Santa Cruz Biotechnology, abgerufen 24.06.2017) bzw. die online vom Hersteller zur Verfügung gestellten Informationen (Sigma Aldrich, abgerufen 15.06.2017). Grundlage der Zuordnung zu Domänen war die UniProt-Peptidsequenz von humanem ADAMTS-7 (UniProt Consortium, abgerufen 04.02.2018). AS. = Aminosäure; Empf. = empfohlene; WB = Western Blot; IHC = Immunhistochemie; IF = Immunfluoreszenz; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; TSR = Thrombospondin Type 1 Repeat; PLAC = Protease-und-Lacumin.....60

Tabelle 21: Beurteilung von fünf kommerziell verfügbaren anti-ADAMTS-7-Antikörpern anhand der strukturierten Prüfung im Western Blot.....63

Tabelle 22: Beurteilung von fünf kommerziell verfügbaren anti-ADAMTS-7-Antikörpern anhand der strukturierten Prüfung in der Immunzytochemie.....66

Zusammenfassung

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) ist die weltweit führende Todesursache. In den letzten Jahren wurden in genomweiten Assoziationsstudien zahlreiche mit der KHK assoziierte genetische Loci identifiziert. Von diesen steht nur eine Minderheit mit traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren in Zusammenhang und ihre pathophysiologische Rolle ist in den meisten Fällen unbekannt. Die funktionelle Charakterisierung ihrer Genprodukte zielt auf ein besseres pathophysiologisches Verständnis der KHK und die Identifikation neuer therapeutischer Ansatzpunkte ab.

Ein mehrfach replizierter KHK-Risikolocus ist das *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7- (ADAMTS7)* Gen. Das Gen kodiert für ADAMTS-7, eine Extrazellulärmatrix-Protease. *ADAMTS7* wird in atherosklerotischen Läsionen, insbesondere in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC), vermehrt exprimiert, wobei über die Regulation der Expression nur wenig bekannt ist. Unter proatherosklerotischen Bedingungen fördert ADAMTS-7 die Atherogenese und führt zu einer verstärkten Neointima-Bildung sowie zu einer verzögerten Reendothelialisierung nach Gefäßschädigung. Es steigert hierbei insbesondere die Migration von VSMC. Jedoch ist unklar, ob dieser Effekt auch unter proatherogenen Bedingungen Bedeutung hat.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle und phänotypische Charakterisierung ADAMTS-7-defizienter humaner VSMC, einschließlich einer Untersuchung der Zellmigration unter proatherogenen Bedingungen. In diesem Rahmen wurde ferner eine systematische Evaluation kommerziell verfügbarer anti-ADAMTS-7-Antikörper durchgeführt. Weiterhin wurden Untersuchungen zur Regulation der *ADAMTS7*-Expression durchgeführt.

In humanen VSMC wurde in der Zellkultur durch RNA-Interferenz eine ADAMTS-7-Defizienz induziert. Gen-Expressionsanalysen wurden mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Der Protein-Nachweis erfolgte mittels Western Blot und Immunzytochemie. Die Migration von VSMC wurde in einem *Scratch Wound-Assay* untersucht, ihre Proliferation mittels fluorometrischer DNA-Quantifizierung. Als proatherogener Stimulus wurde oxidiertes *Low Density Lipoprotein (oxLDL)* eingesetzt.

Insgesamt wurden fünf kommerziell verfügbare Antikörper untersucht. Während drei Antikörper ektop überexprimiertes ADAMTS-7 in Western Blot und Immunzytochemie erkannten, detektierte keiner der untersuchten Antikörper spezifisch endogenes ADAMTS-7. Der *Knockdown* von *ADAMTS7* in VSMC beeinflusste nicht die

Zellproliferation. Es zeigte sich jedoch ein Trend zu verminderter Migration, wobei proatherogene Bedingungen keine Effektverstärkung bewirkten. Die *ADAMTS7*-Expression wurde *in vitro* weder durch Atherosklerose-assoziierte Extrazellulärmatrix-Komponenten noch durch nicht Lipoprotein-gebundenes Cholesterin beeinflusst. OxLDL hingegen bewirkte eine Reduktion der *ADAMTS7*-Expression. Aufgrund dieser Daten wurde geprüft, ob die Assoziation von *ADAMTS7* mit der KHK durch genetisch determinierte LDL-Cholesterinspiegel beeinflusst wird. Die Berechnungen, welche von Dr. Lingyao Zeng, einer Bioinformatikerin in unserer Arbeitsgruppe, durchgeführt wurden, ergaben eine inverse Korrelation zwischen einem genetischen LDL-Cholesterin-Risikoscore (LDL-C-GRS) und der Assoziation von *ADAMTS7* mit der KHK, d.h. die Assoziation von *ADAMTS7* mit der KHK war nur bei einem niedrigen LDL-C-GRS nachweisbar. Während der *Peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) Agonist Rosiglitazon keine Veränderung der *ADAMTS7*-Expression bewirkte, war die oxLDL-induzierte Herunterregulation von *ADAMTS7* durch *Knockdown* des *Oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (OLR1)* teilweise reversibel.

Die Gen-Umwelt-Interaktion zwischen oxLDL und *ADAMTS7*, welche die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit implizieren, lässt eine perspektivische therapeutische *ADAMTS7*-Inhibition insbesondere bei KHK-Patienten mit medikamentös gesenktem LDL verheißungsvoll erscheinen. Angesichts einer beschriebenen biphasischen Wirkung von oxLDL auf intrazelluläre Signalkaskaden könnte der hier postulierte Regulationsmechanismus darüber hinaus zur Erklärung der transient verstärkten Expression von *ADAMTS7* nach Gefäßschädigung beitragen.

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie von Atherosklerose und KHK

Die Atherosklerose ist eine chronische Erkrankung der großen und mittelgroßen Arterien, die sich durch Einengung des Gefäßlumens und Entstehung von Thromben klinisch manifestiert (Libby et al., 2011; Lüscher, 2000; Virmani et al., 2000). Zu ihren wichtigsten Folgeerkrankungen zählen die Koronare Herzkrankheit (KHK), der Myokardinfarkt, der ischämische Schlaganfall und die periphere Arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) (Bentzon et al., 2014; Herrington et al., 2016). Der Begriff KHK bezeichnet die Manifestation der Atherosklerose an den Koronararterien mit konsekutiver Diskrepanz zwischen myokardialem Sauerstoffangebot und -bedarf (Herold, 2018). Der Myokardinfarkt stellt eine akute, ischämisch bedingte Myokardnekrose dar. Er ist meist atherothrombotisch bedingt (Anderson & Morrow, 2017). Die KHK ist die weltweit führende Todesursache (GBD 2015 Mortality Causes of Death Collaborators, 2016). Obgleich die durch KHK und ischämischen Schlaganfall bedingte Mortalität in den letzten 50 Jahren in Ländern mit hohem Einkommensniveau gesunken ist, erhöhte sich weltweit die absolute Anzahl kardiovaskulär bedingter Todesfälle zwischen 2005 und 2015 um 12,5 % (GBD 2015 Mortality Causes of Death Collaborators, 2016; Herrington et al., 2016). Dazu passend stiegen Inzidenz und Prävalenz der KHK im selben Zeitraum weltweit um 16 % bzw. 20 % an (GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2016). Im Jahr 2015 verursachten KHK und ischämischer Schlaganfall 15 Millionen Todesfälle (GBD 2015 Mortality Causes of Death Collaborators, 2016). Diese Zahlen unterstreichen die Bedeutung von Atherosklerose-bedingten Folgeerkrankungen und die Notwendigkeit fortgesetzter Forschung auf diesem Gebiet (Laslett et al., 2012).

1.2 Pathogenese der Atherosklerose

1.2.1 Übersicht der Pathogenese der Atherosklerose

Der initiale Schritt der Atherogenese ist die Ablagerung cholesterinhaltiger Lipoproteine in der Intima (Bentzon et al., 2014; Hansson et al., 2015). Diese werden über *Pattern Recognition*-Rezeptoren vor allem von Makrophagen aufgenommen, wodurch es zu einer zellulären Lipidüberladung und zur Auslösung einer Entzündungsreaktion kommt (Bentzon et al., 2014; Hansson et al., 2015; Libby et al., 2011). Makrophagen, die intrazelluläre Lipid-Tröpfchen akkumuliert haben, werden als „Schaumzellen“ bezeichnet (Stary et al., 1994). Es nehmen jedoch auch glatte Muskelzellen (SMC), dendritische Zellen und Endothelzellen Lipide auf (Bentzon et al., 2014; D. Steinberg, 2009) und etwa 50% der Schaumzellen weisen sowohl Makrophagen- als auch SMC-Marker auf (Tabas et al., 2015). Wichtige Schritte der Plaque-Entstehung sind die Einwanderung von SMC aus der Media in die Intima und ihre dortige Proliferation (Libby et al., 2011). Zudem kommt es zu Endothelaktivierung und zu der Invasion von Immunzellen (Libby et al., 2011). Nach der Einteilung von Virmani et al. (Virmani et al., 2000) werden frühe, reversible Intima-Läsionen, die durch das Vorkommen von Schaumzellen gekennzeichnet sind, als Xanthome oder „*Fatty Streaks*“ bezeichnet. Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es zum Auftreten extrazellulärer Lipidansammlungen in der Intima und zu Apoptose und Nekrose von Schaumzellen. Sobald die Fähigkeit umgebender Phagozyten erschöpft ist, den entstehenden Debris abzuräumen, entsteht ein nekrotischer Kern, der von einer fibrösen Kappe bedeckt ist. Die nun irreversible Läsion wird als Atherom bezeichnet (Virmani et al., 2000). Vor allem durch in der Plaque zahlenmäßig zunehmende glatte Muskelzellen kommt es zur Fibrosierung und teilweise zur Kalzifikation der Plaque (Bentzon et al., 2014). Die bis dahin asymptomatische Erkrankung kann sich klinisch entweder infolge einer lokalen Stenosierung durch eine Plaque oder durch die Entstehung eines Thrombus bemerkbar machen. Ein Thrombus kann wiederum einen lokalen Gefäßverschluss verursachen oder embolisieren (Bentzon et al., 2014). Die Thrombusbildung wird durch Plaqueruptur oder -erosion ausgelöst, welche zur Exposition thrombogener Bestandteile aus dem Inneren der Läsion führen (Bentzon et al., 2014).

1.2.2 Glatte Muskelzellen in der Atherosklerose

Glatte Muskelzellen (SMC) unterscheiden sich von Skelett- und Herzmuskelzellen vor allem durch ihre nicht in Sarkomeren angeordneten kontraktile Filamente, ihre Fähigkeit zu ausgeprägter, langanhaltender Kontraktion, ihre Morphologie (**Abbildung 1**) sowie durch ihre hohe Plastizität (Lüllmann-Rauch, 2009). Glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) kommen in der Media von Blutgefäßen vor. Im Gegensatz zu den häufig als Modellorganismen genutzten Nagetieren, treten VSMC auch in der physiologischen Intima menschlicher Arterien auf (Bennett et al., 2016; Libby et al., 2011). Beim Erwachsenen sind VSMC für die Angiogenese sowie für vaskuläres *Remodelling* essentiell (G. Wang et al., 2015).

Obwohl es sich bei adulten VSMC um spezialisierte, differenzierte Zellen handelt, stellt eine ihrer charakteristischsten Eigenschaften ihre erhaltene Fähigkeit dar, ihren Phänotyp zu verändern (Owens, 1995; Sandison et al., 2016). Diesem als *Phenotypic Switch* oder *Phenotypic Modulation* bezeichneten Vorgang, der eine Veränderung der normalen Struktur und Funktion differenzierter SMC beschreibt, wird eine bedeutende Rolle im vaskulären *Remodelling* und in der Atherogenese zugeschrieben (Bennett et al., 2016; Owens et al., 2004; G. Wang et al., 2015). VSMC bewegen sich auf einem kontinuierlichen Spektrum zwischen den beiden Polen des „differenzierten“ kontraktile und des „undifferenzierten“ synthetischen/ proliferativen Phänotyps (Owens et al., 2004). Ersterer herrscht in der Media gesunder Gefäße vor (Owens et al., 2004). Es handelt sich um spindelförmig elongierte Zellen, deren primäre Funktion die Kontraktion ist (Owens et al., 2004; Sandison et al., 2016). Kontraktile differenzierte VSMC proliferieren und migrieren kaum und synthetisieren nur wenig extrazelluläre Matrix (EZM). Sie exprimieren stärker klassische Differenzierungsmarker wie Myosin-11, Smoothelin und Smooth Muscle Alpha-Actin (aSMA) (Owens et al., 2004). Als spezifischster Marker kontraktile SMC gilt Myosin-11 (Owens et al., 2004; Sandison et al., 2016). Es wird empfohlen zur Identifikation differenzierter SMC mehrere Marker

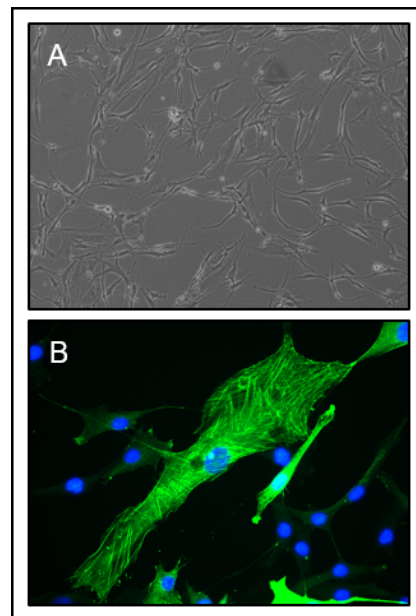


Abbildung 1: HAoSMC in Zellkultur.
A. Hellfeldmikroskopische Aufnahme.
B. Immunzytochemische Darstellung von alpha Smooth Muscle Actin (aSMA; grün), Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). (eigene Aufnahmen)

zu verwenden sowie histologische bzw. zytologische Kriterien zu beachten (Owens, 1995; Owens et al., 2004; Sandison et al., 2016). Der synthetische VSMC-Phänotyp zeichnet sich demgegenüber durch ausgeprägte Proliferation, Migration und EZM-Produktion aus (Owens et al., 2004). Dedifferenzierende VSMC verlieren ihre langgestreckte zugunsten einer abgerundeten Gestalt und die Expression der Differenzierungsmarker nimmt ab (Owens et al., 2004; Rensen et al., 2007; Sandison et al., 2016). Das klassische dichotome Modell spiegelt jedoch nur unzureichend die phänotypische Diversität von SMC wider. So schließen sich etwa Proliferation und Differenzierung nicht kategorisch gegenseitig aus (Alexander & Owens, 2012).

VSCM verändern ihren Phänotyp als Reaktion auf Umwelteinflüsse. Insbesondere führen auch verschiedene Lipide zu phänotypischer Modulation von SMC, was pathophysiologisch für die Entstehung der Atherosklerose bedeutsam ist (Bennett et al., 2016). Wichtige Beispiele sind oxidiertes LDL (oxLDL) (Cherepanova et al., 2009; Pidkovka et al., 2007; Yu et al., 2010) und Cholesterol (Rong et al., 2003). SMC nehmen oxLDL über *Scavenger*-Rezeptoren auf (Chellan et al., 2016; Ricciarelli et al., 2000).

Auch die EZM übt einen bedeutenden Einfluss auf den Phänotyp von SMC aus (Beamish et al., 2010; Thyberg & Hultgardhnilsson, 1994). Die EZM ist ein Netzwerk von Makromolekülen, welches Zellen umgibt und zusammen mit diesen ein Gewebe bildet. Ihre Hauptbestandteile sind Glykosaminoglykane, Faserproteine (vor allem Kollagene) und nicht-kollagene Glykoproteine wie Fibronectin und Laminin (Alberts, 2015). Fibronectin ist bedeutend für Zell-Matrix-Interaktionen, Laminin ist der wichtigste Bestandteil der Basallamina (Alberts, 2015). Lokale Zellen, wie SMC, sind für Synthese und Degradation der EZM durch Proteasen verantwortlich (Alberts, 2015). Proteom-Analysen deuten auf Unterschiede zwischen atherosklerotischen Plaques und gesunden Gefäßabschnitten hinsichtlich zahlreicher EZM-Komponenten hin (Hansmeier et al., 2018; Wierer et al., 2018).

Glatte Gefäßmuskelzellen gehören, neben Endothel- und Immunzellen, zu den für Entstehung und Verlauf der Atherosklerose bedeutsamsten Zelltypen (Alexander & Owens, 2012). Der SMC-Phänotyp ist ein maßgeblicher Parameter hinsichtlich des Einflusses glatter Muskelzellen auf eine atherosklerotische Läsion. Diese können einerseits durch Produktion von Kollagen die fibröse Kappe verstärken und so die Plaque stabilisieren. Andererseits können sie durch Ausschüttung von Matrix-

Metalloproteinasen (MMPs) eine erhöhte Vulnerabilität der Plaque herbeiführen (Alexander & Owens, 2012).

1.2.3 LDL-Cholesterin in der Pathogenese der Atherosklerose

Die Ablagerung Cholesterol- und Apolipoprotein B-haltiger Lipoproteine in der arteriellen Intima stellt das zentrale Ereignis der Atherogenese dar (Ference et al., 2017; Libby et al., 2011). Das bedeutsamste Apolipoprotein B-haltige Lipoprotein ist das *Low Density Lipoprotein* (LDL), welches in der klinischen Chemie als LDL-Cholesterin (LDL-C) gemessen wird (Ference et al., 2017). LDL besitzt einen hohen Cholesteringehalt von ca. 45 % und enthält das Apolipoprotein B-100 (Rassow, 2012). Es ist physiologisch bedeutsam für die Verteilung von Cholesterin im Körper, indem es nach Bindung des ubiquitären LDL-Rezeptors (LDLR) endozytiert wird (Rassow, 2012). Eine starke Korrelation zwischen Effekt auf einen kardiovaskulären Risikofaktor (CVRF) und Erhöhung des KHK-Risikos durch genetische KHK-Risikoloci konnte lediglich für LDL-C-assoziierte Loci gezeigt werden (Webb et al., 2017). Darüber hinaus ist LDL-C der mit den meisten KHK-Risikoloci assoziierte traditionelle CVRF (Webb et al., 2017).

Es ist seit Langem bekannt, dass Makrophagen LDL aufnehmen. Nur die Aufnahme modifizierter Formen von LDL, insbesondere des *in vivo* vorkommenden oxLDL, erreicht jedoch eine ausreichende Geschwindigkeit, um die Bildung von Schaumzellen zu bewirken (Daniel Steinberg & Witztum, 2010). Die Aufnahme von oxLDL wird hierbei vor allem über die *Scavenger*-Rezeptoren A und B und den *Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor 1* (= *Lectin-like oxLDL-Rezeptor 1*, LOX-1) vermittelt, welche im Gegensatz zu dem LDLR keiner negativen Rückkopplung unterliegen und somit eine Überladung der Zellen mit oxLDL zulassen (Goldstein et al., 1979; Daniel Steinberg & Witztum, 2010). Den für die Bindung durch *Scavenger*-Rezeptoren entscheidenden Bestandteil von oxLDL stellen oxidierte Phospholipide dar (D. Steinberg, 2009). Während klinische Studien zur „oxidativen Modifizierungshypothese“ bisher keinen eindeutigen Schluss zulassen, konnte im Tiermodell eine Abmilderung der Atherosklerose durch Antioxidantien gezeigt werden (D. Steinberg, 2009).

Es wurden verschiedene Wege intrazellulärer Signaltransduktion infolge des Einflusses von oxLDL beschrieben. Beteiligt daran sind unter anderem die Transkriptionsfaktoren NF κ B und PPAR γ . Letzterer wird infolge der oxLDL-Bindung an den *Scavenger*-Rezeptor B aktiviert und steigert daraufhin unter anderem dessen eigene Expression (Nagy et al., 1998). Eine vergleichbare positive Rückkopplung besteht auch für oxLDL und LOX-1 (Sun & Chen, 2011). Bemerkenswerterweise kann oxLDL in vaskulären Zellen in Abhängigkeit der Umstände sehr unterschiedliche, teils gegenteilige Effekte bewirken (Negre-Salvayre et al., 2017).

LOX-1 ist ein Transmembranprotein (Sawamura et al., 1997), das zu den *Scavenger*-Rezeptoren gezählt wird (Chistiakov et al., 2016). In gesunden Arterienwänden kaum nachzuweisen, wird LOX-1 unter proatherogenen Bedingungen unter anderem von Endothelzellen, Makrophagen und VSMC exprimiert (Chistiakov et al., 2016). Er scheint in der Atherosklerose der für die Bindung von oxLDL wichtigste *Scavenger*-Rezeptor zu sein (Chistiakov et al., 2016). Bei Bindung von oxLDL bewirkt LOX-1 vielfältige Effekte, unter anderem vermittelt durch verschiedene *mitogen-activated protein*-Kinasen (MAPK) (Negre-Salvayre et al., 2017). Unter diesen ist insbesondere der *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK) 1/2-Signalweg hervorzuheben (Tanigawa et al., 2006; Yamamoto et al., 2015), welchen oxLDL in VSMC je nach Inkubationszeit sowohl aktivieren als auch inhibieren kann (Chahine et al., 2009). Die Aktivierung von LOX-1 kann in VSMC eine gesteigerte Migration und eine Zunahme der zellulären Proliferation, ebenso wie andererseits einen Anstieg der Apoptoserate verursachen (Chistiakov et al., 2016).

1.3 Genetik von Atherosklerose und KHK

Die Atherosklerose ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung mit ausgeprägter genetischer Komponente. Die Erbllichkeit der KHK wird aktuell auf 40 - 50 % beziffert (Khera & Kathiresan, 2017; McPherson & Tybjaerg-Hansen, 2016). Es wurden im vergangenen Jahrzehnt große Anstrengungen zur Aufklärung der genetischen Grundlage der KHK bzw. der Atherosklerose unternommen. Diese zielen auf ein tiefergehendes pathogenetisches Verständnis, eine verbesserte Risikostratifizierung, die Identifikation neuer therapeutischer Angriffspunkte sowie den zielgerichteten

Einsatz von Pharmaka ab (Khera & Kathiresan, 2017; McPherson & Tybjaerg-Hansen, 2016).

Obgleich seltene, stark prädisponierende monogene Erkrankungen, wie die Familiäre Hypercholesterinämie, als Risikofaktor existieren, ist die KHK eine polygene Erkrankung. Die Aufklärung der genetischen Grundlage wurde erst durch den technischen Fortschritt der letzten Jahre ermöglicht. Einen ausschlaggebenden Ansatz stellten Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) dar. Seit den ersten, im Jahr 2007 publizierten KHK-GWAS wurde für mehr als 160 genomische Loci eine genomweit-signifikante Assoziation mit der KHK nachgewiesen, welche jedoch nur einen Teil der Erblichkeit der KHK erklärt (J. Erdmann et al., 2018). Als Ursache dieser „*missing heritability*“, die auch bei anderen komplexen Erkrankungen auftritt (Nikpay et al., 2017), werden unter anderem Gen-Umwelt-Interaktionen diskutiert (McPherson & Tybjaerg-Hansen, 2016). Zudem erreichen vermutlich viele zum genetischen Hintergrund der Erkrankung beitragende Varianten mit den heute üblichen Methoden keine genomweite Signifikanz (Nikpay et al., 2017).

Nur etwa ein Drittel der genomweit KHK-assoziierten genetischen Loci steht in Zusammenhang mit etablierten CVRF (Webb et al., 2017). Dieser Umstand weist auf das große Potential hin, bisher unbekannte Aspekte der Pathogenese von KHK und Atherosklerose zu ergründen (McPherson & Tybjaerg-Hansen, 2016). Tatsächlich ist die Korrelation zwischen Ausmaß des Effekts auf den jeweiligen etablierten CVRF und der Erhöhung des KHK-Risikos, mit der bemerkenswerten Ausnahme von LDL-C, nicht sehr stark (Webb et al., 2017). Die meisten Assoziationen von KHK-Risikoloci mit etablierten CVRF betreffen LDL-C und allgemeiner den Lipidstoffwechsel (Khera & Kathiresan, 2017; Webb et al., 2017). Die restlichen verteilen sich auf Blutdruck, BMI und Diabetes mellitus Typ 2 (Khera & Kathiresan, 2017; Webb et al., 2017). Einige KHK-Risikoloci weisen pleiotrope Assoziationen auf. Diese betreffen zum Teil Erkrankungen, deren Ätiologie sich mit der der KHK überschneidet, wie etwa den ischämischen Schlaganfall (Webb et al., 2017). Andere betreffen pathologische Zustände, die ihrerseits eine Korrelation mit der KHK aufweisen (Webb et al., 2017). Ein Beispiel hierfür ist die Koronararterien-Kalzifizierung, mit welcher fünf KHK-Risikoloci assoziiert sind, darunter der *ADAMTS7*-Locus (Khera & Kathiresan, 2017; Webb et al., 2017).

Eine der größten anstehenden Herausforderungen der KHK-Genetik wird in der Erforschung der Mechanismen gesehen, welche die Assoziation der identifizierten

Risikoloci mit der KHK vermitteln. Dies bedeutet die Identifikation kausaler Gene und die funktionelle Charakterisierung ihrer Genprodukte. Es besteht die Hoffnung, dass hierdurch ein besseres pathophysiologisches Verständnis der Atherosklerose erreicht und neue therapeutische Zielstrukturen identifiziert werden können (J. Erdmann et al., 2018; Khera & Kathiresan, 2017).

1.4 ADAMTS-7

1.4.1 ADAMTS7-Risikolocus

Im Jahr 2011 wiesen drei Gruppen in GWAS eine genomweit signifikante Assoziation des *ADAMTS7*-Locus mit der KHK nach. Die untersuchten SNPs waren rs1994016 (Reilly et al., 2011), rs4380028 (The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium, 2011) und rs3825807 (Schunkert et al., 2011). Letzterer stellt eine kodierende, nicht-synonyme Variante dar. Die Allelfrequenz des jeweiligen Risikoallels liegt zwischen 0,57 und 0,65. Die Odds Ratio (KHK gegen Kontrolle) beträgt 1,07 (C4D), 1,08 (Schunkert et al.) und 1,19 (Reilly et al.). Für die Variante rs7173743 ergaben sich später vergleichbare Ergebnisse (Deloukas et al., 2013). Das Nicht-Risikoallel (G) von rs3825807 war auch mit verminderter Atherosklerose der Karotiden assoziiert (Pu, Xiao et al. 2013). Zudem wurde eine Assoziation des *ADAMTS7*-Locus mit koronarer Kalzifikation publiziert, was als Hinweis auf eine Förderung der Atherosklerose durch ADAMTS-7 gewertet wurde (O'Donnell et al., 2011). Kürzlich wurde eine Gen-Umwelt-Interaktion zwischen *ADAMTS7* und Zigaretten-Rauch beschrieben, wobei der protektive Effekt des Nicht-Risikoallels bei Rauchern abgeschwächt war (Saleheen et al., 2017). Bisher gibt es keinen Hinweis darauf, dass der Wirkmechanismus von ADAMTS-7 mit einem etablierten Therapieprinzip der KHK in Zusammenhang stünde (Reilly et al., 2011; Schunkert et al., 2011; The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium, 2011). Die molekulare und zelluläre Funktion von ADAMTS-7 ist bis heute nicht vollständig geklärt.

1.4.2 ADAMTS-Familie und Struktur von ADAMTS-7

1997 wurde *A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-1* (ADAMTS1) als erste ADAMTS-Protease beschrieben (Kuno et al., 1997). 1999 wurde eine verkürzte und 2004 die vollständige Sequenz von ADAMTS-7 publiziert (Hurskainen et al., 1999; Somerville et al., 2004). ADAMTS sind Zink-Metalloendoproteinasen und unter anderem mit MMPs strukturell verwandt (Kelwick et al., 2015; Rawlings & Barrett, abgerufen 30.10.2017; Takeda, 2016). Es handelt sich um sezernierte Enzyme mit einer katalytischen Domäne vom Reprolysin-Typ, deren Funktion in den meisten Fällen in der Spaltung von EZM-Proteinen zu bestehen scheint (Kelwick et al., 2015). ADAMTS enthalten mindestens ein Thrombospondin-Motiv. Thrombospondin Typ 1-Motive (*Thrombospondin type 1 repeats*; TSR) sind konserviert und Bestandteil zahlreicher menschlicher, meist EZM-assoziiertes, Proteine (Olsen & Kragelund, 2014; Tucker, 2004). In vielen Fällen wurde außerdem eine Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation und zellulären Differenzierung gezeigt (Olsen & Kragelund, 2014; Tucker, 2004).

ADAMTS-7 umfasst 1686 Aminosäuren, die vorhergesagte Masse beträgt ohne Signalpeptid 181 kDa (Somerville et al., 2004). Das Protein besteht aus folgenden Domänen (vom N- zum C-Terminus; vgl. **Abbildung 2**) (Somerville et al., 2004): Signalpeptid, Pro-Domäne, katalytische (Metalloproteinase-) Domäne, Disintegrin-artige Domäne, zentrales TSR, Cystein-reiche Domäne, Platzhalter-Domäne, TSR-Cluster (drei TSR), Muzin-Domäne, TSR-Cluster (vier TSR), PLAC-Domäne. Die Domänen 1 bis 7 entsprechen dabei dem typischen Grundaufbau von ADAMTS, wie er in ADAMTS-4 vorliegt (**Abbildung 2**) (Kelwick et al., 2015).

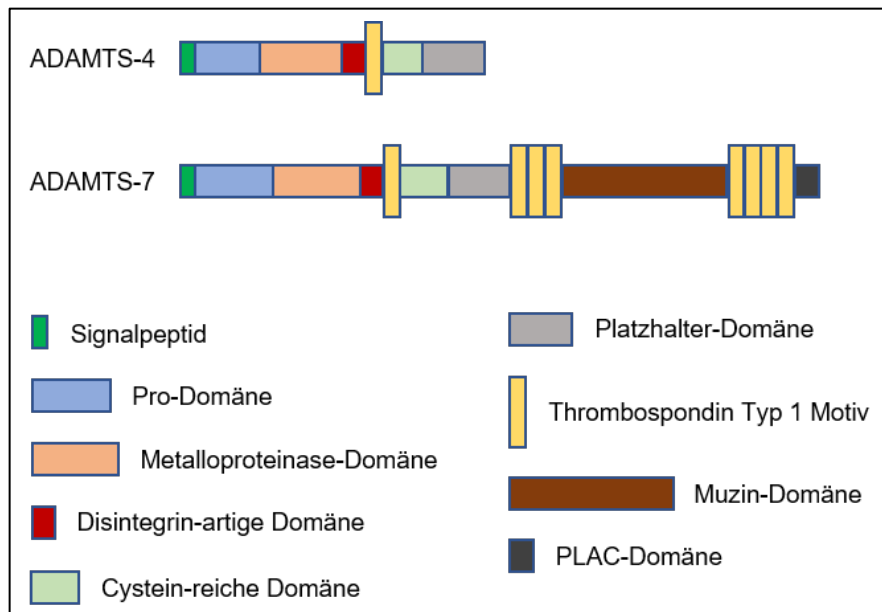


Abbildung 2: Molekularer Aufbau von ADAMTS-4 und ADAMTS-7. Abkürzung: PLAC = Protease-und-Lacumin. Nach Kelwick, Desanlis et al. 2015.

Der Abschnitt C-terminal des zentralen TSR wird als Zusatzdomäne bezeichnet und ist am wenigsten konserviert. ADAMTS-7 und das homologe ADAMTS-12 enthalten dort eine Muzin-/ Proteoglykan-Domäne (Hurskainen et al., 1999; Kelwick et al., 2015). ADAMTS-7 wird posttranslational durch Glykosaminoglykane an der Muzin-Domäne modifiziert. Es ist jedoch unklar, ob ADAMTS-7 stets als Proteoglykan vorliegt (Somerville et al., 2004).

Bislang wurde keine umfangreiche, strukturierte Evaluation von anti-ADAMTS-7-Antikörpern publiziert. Es gibt derzeit keinen etablierten, spezifischen Antikörper für ADAMTS-7.

1.4.3 Expression und Regulation von *ADAMTS7*

Die Expression von *ADAMTS7* wurde in zahlreichen unterschiedlichen Geweben nachgewiesen. Auf mRNA- und Protein-Ebene gut belegt ist die Expression von *ADAMTS-7* in VSMC (Bauer et al., 2015; Pu et al., 2013; Saleheen et al., 2017; L. Wang et al., 2009) und in Chondrozyten (Lai et al., 2014; Liu et al., 2006; Luan et al., 2008; X. F. Wang et al., 2016; Q. Zhang et al., 2012). Darüber hinaus wurde *ADAMTS-7* oder *ADAMTS7*-mRNA in Endothelzellen, Herz, Lunge, Leber, Niere, Gehirn und

Skelettmuskel nachgewiesen (Bauer et al., 2015; Hurskainen et al., 1999; Kessler et al., 2015; Liu et al., 2006; Pi et al., 2015; Saleheen et al., 2017; Somerville et al., 2004). Es liegen wenige Daten zur molekularen Regulation der *ADAMTS7*-Expression vor. Eine Steigerung der *Adamts7*-Expression wurde durch das inflammatorische Zytokin *Tumor necrosis factor* (TNF) α gezeigt, woran *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) beteiligt zu sein scheint (L. Wang et al., 2009). Diesbezüglich wurde eine positive Rückkopplungsschleife postuliert (Lai et al., 2014). Die Induktion von *Adamts7* durch TNF α wurde repliziert (Bauer et al., 2015), in einer späteren Studie konnte sie jedoch nicht nachgewiesen werden (X. F. Wang et al., 2016). Ferner wurde eine Steigerung der *Adamts7*-Expression durch *Platelet derived growth factor* (PDGF) -BB, Interleukin (IL) 1 β (L. Wang et al., 2009), Phosphat (Du et al., 2012) und *Parathyroid hormone-related peptide* (PTHrP) (Bai et al., 2009) beschrieben, sowie eine Verminderung durch den *Transforming growth factor* (TGF) β (L. Wang et al., 2009).

1.4.4 Enzymatische Funktion von ADAMTS-7

Aufgrund seiner Sekundärstruktur wurde postuliert, dass ADAMTS-7 eine Protease sei. Bestätigend konnte enzymatische Aktivität im α 2-Makroglobulin-Assay nachgewiesen werden (Somerville et al., 2004). Später wurden *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (COMP) und Thrombospondin-1 (TSP-1) als Substrate von ADAMTS-7 beschrieben. COMP ist ein nicht-kollagener Bestandteil von Knorpel und Gefäßwänden und kommt insbesondere auch in atherosklerotischen Läsionen vor (Liu et al., 2006). ADAMTS-7 bindet und spaltet COMP (Liu et al., 2006). Die Förderung der Migration von VSMC und der Neointima-Bildung durch ADAMTS-7 scheint zumindest teilweise auf die Spaltung von COMP zurückzuführen zu sein (L. Wang et al., 2009). TSP-1 liegt als Bestandteil der EZM insbesondere in der Wand von Blutgefäßen und darüber hinaus in den α -Granula von Thrombozyten vor (Krishna & Golledge, 2013). Es spielt unter anderem eine Rolle in der Regulation zellulärer Adhäsion, Migration und Proliferation (Krishna & Golledge, 2013). Die Spaltung von TSP-1 durch ADAMTS-7 ist essentiell für die Hemmung der Reendothelialisierung durch ADAMTS-7 (Kessler et al., 2015). Ferner wurden eine Spaltung des Wachstumsfaktors *Granulin-Epithelin Precursor* (GEP) (Guo et al., 2010) und des

EZM-Proteins *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) (Pi et al., 2015) durch ADAMTS-7 beschrieben. Bei allen vier Substraten handelt es sich um EZM-assoziierte Proteine (Guo et al., 2010; Krishna & Golledge, 2013; Liu et al., 2006; Pi et al., 2015).

1.4.5 Pathophysiologische Bedeutung von ADAMTS-7

1.4.5.1 ADAMTS-7 in nicht-vaskulären Erkrankungen

ADAMTS-7 scheint Arthrose und Arthritis zu fördern. Eine erhöhte *ADAMTS7*-Expression zeigte sich im Gelenkknorpel von Patienten, die an Rheumatoider Arthritis leiden sowie, in geringerem Maße, auch bei Arthrose-Patienten (Liu, Kong et al. 2006). In degenerativ veränderten *Disci intervertebrales* wurden erhöhte ADAMTS-7-Level nachgewiesen (Q. Zhang et al., 2012). Bei *Adamts7-Knockdown* konnte eine Abschwächung der Induktion kataboler Enzyme in *Nucleus pulposus*-Zellen gezeigt werden (X. F. Wang et al., 2016). *Adamts7^{-/-}*-Mäuse weisen keinen offensichtlichen pathologischen Phänotyp auf (Kessler et al., 2015). Im Tiermodell ließ sich jedoch durch Veränderung der *Adamts7*-Expression der Progress der Arthrose beeinflussen (Lai et al., 2014). Eine verstärkte Aktivierung hepatischer Ovalzellen bei *Adamts7*-Mangel im Tiermodell führte zu der Hypothese möglicher protektiver Effekte von ADAMTS-7 bei Leberschädigung (Pi et al., 2015).

1.4.5.2 ADAMTS-7 in vaskulären Erkrankungen

Während ADAMTS-7 unter physiologischen Umständen nur in geringer Menge in Gefäßwänden vorliegt, wurde nach Ballon-Verletzung der Karotiden von Ratten eine deutliche Zunahme von *Adamts7* in der Neointima nachgewiesen (L. Wang et al., 2009). Die Expression von *Adamts7* war hierbei vorrangig in VSMC erhöht (L. Wang et al., 2009). Die Neointimabildung ließ sich in diesem Modell durch *Adamts7*-Überexpression steigern und umgekehrt durch *Adamts7-Knockdown* abmildern (L. Wang et al., 2009). Eine Verminderung der Neointimabildung ließ sich auch bei *Adamts7^{-/-}*-Mäusen nach Draht-Verletzung der Karotiden (Kessler et al., 2015) und

Femoralarterien (Bauer et al., 2015) nachweisen. ADAMTS-7 war außerdem in atherosklerotischen Läsionen im Mausmodell sowie in atherosklerotisch veränderten menschlichen Koronararterien nachweisbar (Bauer et al., 2015). *Adamts7^{-/-}*-Mäuse entwickelten signifikant weniger Atherosklerose (Bauer et al., 2015). Auch in atherosklerotischen humanen Karotiden wurde ADAMTS-7 nachgewiesen, wobei der Gehalt bei symptomatischer Stenose höher lag (Bengtsson et al., 2017). Zudem wurde hierbei eine Assoziation von ADAMTS-7 mit einem vulnerablen Plaque-Phänotyp und mit einer erhöhten Rate postoperativer kardiovaskulärer Ereignisse beschrieben (Bengtsson et al., 2017). *Adamts7*-Überexpression bewirkte eine Erhöhung der Migrationsfähigkeit von Ratten-AoSMC, der *Knockdown* wiederum eine Abnahme (L. Wang et al., 2009). Dies konnte an murinen AoSMC repliziert werden (Kessler et al., 2015). In einer anderen Studie war die Hemmung der VSMC-Migration durch *Adamts7-Knockout* nur unter TNF α -Stimulation nachweisbar, wobei eine Abhängigkeit vom Substrat (Kollagen I, Laminin, Fibronectin) bestand (Bauer et al., 2015). Darüber hinaus wurde eine stärkere Migration bei Vorliegen des Risiko-Genotyps A/A an rs3825807 gezeigt (Pu et al., 2013). Die Beeinflussung der VSMC-Migration durch ADAMTS-7 scheint abhängig von der Spaltung seines Substrats COMP zu sein (Pu et al., 2013; L. Wang et al., 2009).

In einer Studie wurde eine Steigerung der VSMC-Proliferation durch ADAMTS-7 beschrieben (L. Zhang et al., 2015).

Neben Abmilderung der Neointimabildung wurde nach Draht-Verletzung muriner Karotiden bei *Adamts7^{-/-}*-Mäusen eine beschleunigte Reendothelialisierung gezeigt (Kessler et al., 2015). Als Grundlage dessen war eine Verringerung der Endothel-Proliferation und eine Verminderung der Endothelzell-Migration durch ADAMTS-7 nachzuweisen, wofür die Spaltung von TSP-1 verantwortlich gemacht wurde (Kessler et al., 2015).

Es wurde eine vermehrte *ADAMTS7*-Expression in kalzifizierenden VSMC, kalzifizierenden Arterien im Tiermodell sowie in Arterien niereninsuffizienter Patienten gezeigt (Du et al., 2012; Du et al., 2011). Zudem wurde eine Beeinflussung der VSMC-Kalzifikation durch *Adamts-7* mittels COMP-Spaltung demonstriert (Du et al., 2012).

1.5 Fragestellung

ADAMTS7 wurde in GWAS als KHK-Risikolocus identifiziert (Reilly et al., 2011; Schunkert et al., 2011; The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium, 2011). Funktion und pathophysiologische Rolle von *ADAMTS-7* sind jedoch bis heute nicht vollständig geklärt. So ist unvollständig untersucht, ob *ADAMTS-7* den Phänotyp von VSMC beeinflusst. Zur Proliferation von VSMC in Abhängigkeit ihrer *ADAMTS7*-Expression liegt eine einzelne Studie vor (L. Zhang et al., 2015). Am besten untersucht ist eine durch *ADAMTS-7* verursachte Steigerung der VSMC-Migration (Bauer et al., 2015; Kessler et al., 2015; Pu et al., 2013; L. Wang et al., 2009). Allerdings fehlen bislang Studien, die die VSMC-Migration in Abhängigkeit von *ADAMTS-7* unter spezifischen proatherogenen Bedingungen untersuchen. Deshalb war eine phänotypische und funktionelle Charakterisierung *ADAMTS-7*-defizienter VSMC ein wesentlicher Bestandteil dieses Promotionsprojekts, insbesondere nach Modifikation der endogenen Expression von *ADAMTS7*. Diese beinhaltete eine Untersuchung der Migration *ADAMTS-7*-defizienter VSMC unter proatherogenen Bedingungen. LDL-Cholesterin kommt eine kausale Bedeutung in der Atherogenese zu (Ference et al., 2017), wobei Effekte auf zellulärer Ebene vor allem für modifizierte Derivate wie oxLDL gezeigt wurden (Daniel Steinberg & Witztum, 2010). Daher wurde in diesem Projekt oxLDL als proatherogener Stimulus verwendet.

Es liegen ferner nur wenige Untersuchungen zur Regulation von *ADAMTS-7* vor. Aufgrund ihrer pathogenetischen Bedeutung in der Atherosklerose wurde in dieser Arbeit deshalb der jeweilige Einfluss von oxLDL, Cholesterin und Bestandteilen der EZM auf die *ADAMTS7*-Expression untersucht.

Derzeit ist ein zuverlässiger Nachweis von *ADAMTS-7* mit kommerziell verfügbaren Antikörpern nicht möglich und es liegt keine strukturierte Prüfung von anti-*ADAMTS-7*-Antikörpern vor. Aufgrund dessen umfasst die vorliegende Arbeit darüber hinaus eine systematische Evaluation von fünf kommerziell verfügbaren anti-*ADAMTS-7*-Antikörpern in Western Blot und Immunzytochemie.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte.

Gerät	Firma	Sitz der Firma
Applied Biosystems™ ViiA™ 7 real-time PCR system	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Infinite® M200 PRO	Tecan Group	Männedorf, CH
ImageQuant™ LAS 4000	GE Healthcare Life Sciences	Chicago, IL, US
Leica® DMRB	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH	Wetzlar, DE
Leica® DFC450C	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH	Wetzlar, DE
Milli-Q® Reference	Merck Millipore	Billerica, US
Mini-PROTEAN® tetra cell	Bio-Rad	Hercules, US
Mini Trans-Blot® electrophoretic transfer cell	Bio-Rad	Hercules, US
Nucleofector™ 2b Device	Lonza	Basel, CH
Scepter™	Merck Millipore	Billerica, US
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (1704150)	Bio-Rad	Hercules, US
Wheaton™ Micro Tissue Grinder With Cap, PTFE Pestle and Cap Liner	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Zeiss® Axiovert 100	Carl Zeiss AG	Oberkochen, DE
Zeiss® AxioCam HRc	Carl Zeiss AG	Oberkochen, DE

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.

Produktbezeichnung	Hersteller	Sitz des Herstellers	Artikelnummer
10X RIPA	New England Biolabs	Ipswich, US	9806S
10X TRIS/glycine/SDS	Bio-Rad	Hercules, US	161-0772

2X Laemmli	Bio-Rad	Hercules, US	161-0737
2-propanol ROTIPURAN® ≥99.8 %	Carl Roth	Karlsruhe	6752
4X Laemmli	Bio-Rad	Hercules, US	161-0747
Amphotericin B solution (250 µg/mL in deionized water)	Sigma Aldrich	St. Louis, US	A2942
Cholesterol-Water Soluble powder, BioReagent, suitable for cell culture Synonym: Cholesterol-methyl-β- cyclodextrin	Sigma Aldrich	St. Louis, US	C4951
Collagen Solution from calf skin	Sigma Aldrich	St. Louis, US	C 8919
Color prestained protein standard, broad range (11-245 kDa)	New England Biolabs	Ipswich, US	P7712S
cOmplete™, EDTA- free Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich	St. Louis, US	04693132001 Roche
DMEM 4.5 g/l glucose w/ UltraGlutamine	Lonza	Basel, CH	BE12-604F
Dimethylsulfoxid für die Zellkultur	AppliChem	Darmstadt, DE	A3672
Dulbecco's® PBS solution without Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Merk Millipore/Biochrom	Billerica, US	L 1825
EMPURA® ethanol absolute	Merck Millipore	Billerica, US	1070172511
Ethanol denatured ≥96 %	Carl Roth	Karlsruhe, DE	T171
Fetal bovine serum (FBS) superior	Merk Millipore/Biochrom	Billerica, US	S 0615
Fibronectin from bovine plasma	Sigma Aldrich	St. Louis, US	F4759
FuGENE® HD transfection reagent	Promega Corporation	Madison, US	E2312
Gibco™ Geneticin® selective antibiotic (G418 Sulfate)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	11811031
Gibco™ Opti-MEM® I reduced serum medium	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	31985062
Gibco™ PBS (10X), pH 7.4	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	70011044
Hanks' Balanced Salt Solution	Sigma Aldrich	St. Louis, US	55021C
HEPES buffered saline solution	PromoCell	Heidelberg, DE	C-40020

Horse Serum, heat inactivated, New Zealand origin	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	26050070
Hydrochloric acid (HCl), 6 mol/l - 6 N	Carl Roth	Karlsruhe, DE	281
Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-free distilled Water	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	10977035
Invitrogen™ UltraPure™ TRIS-borate-EDTA (TBE) buffer, 10X	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	15581028
Laminin from human fibroblasts cell culture derived	Sigma Aldrich	St. Louis, US	L4544
Lipofectamine® RNAiMAX™ transfection reagent	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	13778150
Lipoprotein, low density, oxidized, human plasma, 99%, BT-910	Thermo Fisher Scientific (Alfa Aesar)	Waltham, US	J65591
Methanol (MeOH)	AppliChem	Darmstadt, DE	131091
Nonfat dry milk powder BioChemica	AppliChem	Darmstadt, DE	A0830
Novex™ MagicMark™ XP Western protein standard	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	LC5602
Penicillin-streptomycin (10,000 units penicillin/ml, 10 mg streptomycin/ml)	Sigma Aldrich	St. Louis, US	P4333
PHOSS-RO Roche PhosSTOP™	Sigma Aldrich	St. Louis, US	04906845001 Roche
pUC19 Vector	New England Biolabs	Ipswich, US	N3041S
Quick-Load® Taq 2X Master Mix	New England Biolabs	Ipswich, US	M0271L
Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	46430
SlowFade™ Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	S36939
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	34076
TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	4440041
TRIS PUFFERAN® ≥99.9 %	Carl Roth	Karlsruhe, DE	4855

Triton™-X-100	Sigma Aldrich	St. Louis, US	T8787
Trypsin neutralising solution (0.05 % trypsin inhibitor in 0.1 % BSA)	PromoCell	Heidelberg, DE	C-41120
Trypsin-EDTA (0.04 %/0.03 %)	PromoCell	Heidelberg, DE	C-41020
Tween® 20 BioChemica	AppliChem	Darmstadt, DE	A1389

2.1.3 Standard-Puffer und -Lösungen

1X phosphate buffered saline (PBS)

Endkonzentration von 1 mM KH₂PO₄, 0,16 M NaCl, 2,97 mM Na₂HPO₄-7H₂O, pH 7,4 bei Raumtemperatur

100 ml 10X Gibco™ PBS (Thermo Fisher Scientific)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

1X TRIS-Borat-EDTA (TBE)

Endkonzentration von 0.1 M TRIS, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,3 at 20 °C

100 ml 10X Invitrogen™ UltraPure™ TRIS-borate-EDTA (TBE) Puffer (Thermo Fisher Scientific)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

70 % v/v Ethanol

35 ml EMPURA® ethanol absolute (Merck Millipore)

ad 50 ml DNase/RNase-free water

Lagerung bei Raumtemperatur

2.1.4 Western Blot: Puffer und Lösungen

1X radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer

10 ml 10X RIPA (New England Biolabs)

ad 100 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei -20 °C

2X Laemmli Puffer

Mit einer Endkonzentration von 355 mM β -Mercaptoethanol

50 μ l β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

950 μ l 2X Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories),

welcher sich folgendermaßen zusammensetzt:

- 65,8 mM Tris-HCl (pH 6,8)
- 26,3 % Glycerin
- 2,1 % SDS
- 0,01 % Bromphenolblau

Lagerung bei -20 °C

4X Laemmli Puffer

Mit einer Endkonzentration von 355 mM β -Mercaptoethanol

100 μ l β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

900 μ l 4X Laemmli (Bio-Rad Laboratories),

welcher sich folgendermaßen zusammensetzt:

- 277,8 mM Tris-HCl (pH 6,8)
- 44,4 % Glycerin
- 4,4 % Lithiumlaurylsulfat (LDS)
- 0,02 % Bromphenolblau

Lagerung bei -20 °C

1X Elektrophorese Puffer

100 ml 10X Tri/Glycine/SDS (Bio-Rad)

enthält

- 0,025 M Tris
- 0,192 M Glycin
- 0,1 % SDS
- pH = 8,3

2 ml Tween® 20 (AppliChem)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

1X Transfer Puffer

3,03 g TRIS PUFFERAN® (Carl Roth)

14,4 g glycine PUFFERAN® (Carl Roth)

0,2 l methanol (AppliChem)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

1X Transfer Puffer ohne Methanol (für den Nachweis von endogenem ADAMTS-7)

5,8 g TRIS PUFFERAN® (Carl Roth)

2,8 g glycine PUFFERAN® (Carl Roth)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

1X PBS-T

Mit einer Endkonzentration von 1 mM KH_2PO_4 , 0,16 M NaCl, 2,97 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0,2 % v/v Tween® 20, pH 7,4 bei Raumtemperatur

100 ml 10X Gibco™ PBS (Thermo Fisher Scientific)

2 ml Tween® 20 (AppliChem)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

5 % w/v Milch in PBS

5 g Magermilchpulver (AppliChem)

ad 100 ml 1X PBS (10X Gibco™ PBS verdünnt in Millipore® Wasser)

Lagerung bei 4 °C für maximal zwei Tage

2,5 % w/v Milch in PBS-T

2,5 g Magermilchpulver (AppliChem)

ad 100 ml 1X PBS-T (siehe oben)

Lagerung bei 4 °C für maximal zwei Tage

1,25 % w/v Milch in PBS-T

1,25 g Magermilchpulver (AppliChem)

ad 100 ml 1X PBS-T (siehe oben)

Lagerung bei 4 °C für maximal zwei Tage

2.1.5 Western Blot: Gele und Membranen

Gele:

Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, 50 µl (Bio-Rad, Hercules, USA, Artikelnummer 4561094)

Membranen:

Trans-Blot® Turbo™ Mini PVDF Transfer Packs (Bio-Rad, Hercules, USA, Artikelnummern 1704156, 1704157)

Immun-Blot® PVDF Membrane, Roll, 26 cm x 3,3 m (Bio-Rad, Hercules, USA, Artikelnummer 1620177)

2.1.6 Real Time-PCR-Sonden

Tabelle 5: Verwendete qPCR-Sonden.

Zielgen	Assay ID	Hersteller	Sitz des Herstellers
<i>ADAMTS7</i>	Hs00276223_m1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
<i>MYH11</i>	Hs00224610_m1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
<i>OLR1</i>	Hs01552593_m1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
<i>GAPDH</i>	Hs02758991_g1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US

2.1.7 siRNA

Tabelle 6: Verwendete siRNA.

Zielgen / Bezeichnung	Assay ID	Hersteller	Sitz des Herstellers
<i>ADAMTS7</i>	s22050	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
<i>ADAMTS7</i>	s22051	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
<i>ADAMTS7</i>	s22052	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
<i>OLR1</i>	s9842	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US
Silencer™ Select Negative Control No. 1 siRNA	4390843	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US

2.1.8 Immunzytochemie: Reagenzien

0,1 % Triton-X Lösung

10 µl Triton-X

1 ml Horse Serum

ad 10 ml PBS

Lagerung bei 4 °C für max. 24 h

Puffer zum Blocken

1 ml Horse Serum

ad 10 ml PBS

Lagerung bei 4 °C für max. 24 h

2.1.9 Zellkultur-Medien

VSMC Medium

500 ml smooth muscle cell growth medium 2 Basal Medium (PromoCell)

25 ml smooth muscle cell growth medium 2 SupplementMix (PromoCell)

5 ml Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich)

Lagerung bei 4 °C

Es wurde zum „*serum-starving*“ Basal Medium ohne Zusatz des „Supplement Mix“, welches FKS, Insulin, EGF und FGF enthält, verwendet.

HEK 293 Medium

500 ml DMEM 4,5 g/l Glucose w/ UltraGlutamine (Lonza)

50 ml FBS superior (Merck Millipore/Biochrom)

5 ml Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich)

5 ml Amphotericin B (Sigma-Aldrich)

500 µl Geneticin® (250 mg/ml)

Lagerung bei 4 °C

250 mg/ml Geneticin

1,5 g Geneticin® selective antibiotic (Thermo Fisher Scientific)

ad 6 ml Millipore® Wasser

Die Gentitacin-Lösung wurde mit Hilfe von Stericup® Filtern (Merck Millipore) steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Bevor Zellen zur Lagerung eingefroren wurden, wurde den Medien 10 % DMSO (AppliChem) zugesetzt.

2.1.10 Zelllinien

Humane aortale glatte Muskelzellen (HAoSMC) wurden in kryokonservierter Form von den Unternehmen PromoCell (Human Aortic Smooth Muscle Cells, Produktnummer C-12533, PromoCell GmbH, Heidelberg, DE) und Lonza (AoSMC-Aortic Smooth Mus Cells, cryo amp, Produktnummer CC-2571, Lonza Group AG, Basel, CH) bezogen.

2.1.11 Kommerziell verfügbare Kits

Tabelle 7: Kommerziell verfügbare Kits, die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen.

Kit	Hersteller	Sitz des Herstellers	Artikelnummer
Amaxa® Human AoSMC Nucleofector® Kit	Lonza	Basel, CH	CC-2571
BlackPREP® Rodent Tail DNA Kit	Analytik Jena	Jena, DE	845-BP-0010250
CyQUANT® NF Cell Proliferation Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	C35007
Pierce™ BCA protein assay kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	23225
Pierce™ ECL Western blotting substrate	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	32106
QIAshredder™	Qiagen	Hilden, DE	79656
RNeasy® Mini Kit	Qiagen	Hilden, DE	74106
ThermoScript™ RT-PCR system for first-strand cDNA synthesis	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	11146016

2.1.12 Antikörper

Tabelle 8: Antikörper, die in dieser Arbeit in Western Blot oder Immunzytochemie verwendet wurden. Abkürzungen: WB = Western Blot; ICC = Immunzytochemie

Antigen	Bezeichnung	Produkt-nummer	Hersteller	Sitz des Herstellers	Anwendung
Primär-Antikörper					
ADAMTS-7	Anti-ADAMTS7 antibody	ab201083	Abcam	Cambridge, GB	WB, ICC

ADAMTS-7	Anti-ADAMTS7 antibody	ab45044	Abcam	Cambridge, GB	WB, ICC
ADAMTS-7	Anti-ADAMTS7 antibody produced in rabbit	HPA 045284	Sigma Aldrich	St. Louis, US	WB, ICC
ADAMTS-7	ADAMTS7 polyclonal antibody (A01)	H00011173-A01	Abnova	Taipei City, Taiwan, CN	WB, ICC
ADAMTS-7	ADAMTS-7 (P-16)	sc-163642	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, US	WB
aSMA	Anti-alpha smooth muscle Actin antibody [EPR5368]	ab124964	Abcam	Cambridge, GB	WB, ICC
ERK1/2	p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb	4695	Cell Signaling Technology	Danvers, US	WB
GAPDH	GAPDH (D16H11) XP® Rabbit mAb	5174	Cell Signaling Technology	Danvers, US	WB
Myosin-11	Anti-smooth muscle Myosin heavy chain 11 antibody	ab53219	Abcam	Cambridge, GB	WB
p-ERK1/2	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb	4370	Cell Signaling Technology	Danvers, US	WB
Smoothelin	Anti-Smoothelin antibody [R4A]	ab21108	Abcam	Cambridge, GB	WB
V5	V5 Tag Monoclonal Antibody	R960-25 (ehemals Invitrogen 46-0705)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	WB, ICC
Sekundär-Antikörper					
Kaninchen-IgG	Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	7074	Cell Signaling Technology	Danvers, US	WB
Kaninchen-IgG	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	R37116	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	ICC
Maus-IgG	Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	7076	Cell Signaling Technology	Danvers, US	WB

Maus-IgG	Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 594	R37121	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	ICC
Ziege-IgG	donkey anti-goat IgG-HRP	sc-2020	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, US	WB

2.1.13 Software

Tabelle 9: Verwendete Software.

Software	Urheber	Sitz des Urhebers	Anwendung
CellProfiler (Version 2014-07-23T17:45:00 6c2d896)	Open Source (Carpenter et al., 2006)		Morphologische Zell-Analyse, <i>Scratch Wound-Assay</i>
GraphPad Prism® software, Prism for Windows, version 7.03	GraphPad Software, Inc.	La Jolla, US	Statistische Analyse
EndNote™ X7.7.1	Thomson Reuters	Toronto, CA	Management Literatur-Quellen
FIJI (Fiji is just ImageJ)	Open Source (Schindelin et al., 2012; Schneider et al., 2012)		Western Blot (Quantifizierung), morphologische Zell-Analyse, <i>Scratch Wound-Assay</i>
i-control™ Microplate Reader Software	Tecan Group	Männedorf, CH	RNA-Konzentrationsmessung
ImageQuant™ LAS 4000 v1.2	GE Healthcare Life Sciences	Chicago, US	Western Blot (Aufnahmen der Bilder)
Magellan™ - Data Analysis Software	Tecan Group	Männedorf, CH	Protein-Konzentrationsmessung (BCA), Proliferationsassay
Microsoft Excel®	Microsoft Corporation	Redmond, US	diverse Tabellen-Kalkulationen
Microsoft Word®	Microsoft Corporation	Redmond, US	Textverarbeitung
ViiA™ 7 software v1.2.2	Thermo Fisher Scientific	Waltham, US	qPCR
Zen lite® 2012	Carl Zeiss AG	Oberkochen	Zellkultur

2.2 Methoden

2.2.1 Western Blot

Western Blot ist eine Methode zum immunologischen Nachweis spezifischer Proteine (Alberts, 2015). Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte beschrieben.

2.2.1.1 Proteingewinnung aus kultivierten Zellen

Zur Analyse von Proteinen aus Zellkulturen wurde Vollzelllysat eingesetzt. Kultivierte Zellen wurden auf der Zellkulturplatte dreimal mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und anschließend in RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor und, für die Versuche zum Nachweis von phosphoryliertem ERK1/2, zusätzlich mit Phosphatase-Inhibitor für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines *Cell Scrapers* abgelöst. Es wurden pro einzelner *Well* auf einer 6-*Well*-Zellkulturplatte 200 µl RIPA-Puffer eingesetzt. Bei Versuchen, welche in Duplikaten oder in Triplikaten durchgeführt wurden, wurden 300 µl RIPA-Puffer verwendet. Dabei wurde das gesamte Volumen jeweils nach Ablösen der Zellen eines *Wells* vollständig in das nächste *Well* überführt. Die gewonnene Lösung wurde in ein Eppendorf Tube® überführt und bei -80 °C für mindestens zwei Stunden eingefroren. Nach Auftauen auf Eis wurden die Eppendorf Tubes® dreimal für 30 s in ein Ultraschallbad getaucht und anschließend jeweils für 30 s auf Eis gekühlt. Danach wurden die Proben mit 13000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit dem darin gelösten Protein in ein neues Eppendorf Tube® überführt. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Gewinnung muriner Protein-Proben

Es wurden Aorten und Herzen von acht weiblichen Mäusen im Alter von 9 bis 24 Wochen, je zur Hälfte ADAMTS7^{+/+} und ADAMTS7^{-/-}, gewonnen. Die Tiere wurden durch Genickbruch getötet. Es wurden unmittelbar darauf der Thorax und das Abdomen eröffnet und das Gefäßsystem über den rechten Ventrikel mit eiskalter

Ringer-Lösung gespült. Das Herz wurde an den Abgängen der großen Gefäße abgesetzt, entnommen und in eiskaltem PBS auf Eis gelegt. Die Aorta wurde bis zur Bifurkation dargestellt und unter möglichst vollständiger Entfernung des periaortalen Bindegewebes präpariert. Nach Absetzung oberhalb der Bifurkation wurde sie in eiskaltem PBS auf Eis gelegt. Anschließend wurden die Organe jeweils von verbliebenem Bindegewebe befreit, zerkleinert und in eiskalten RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor überführt (100 µl pro Aorta, 1 ml pro Herz). Daraufhin wurden die Proben in einem Homogenisator (SpeedMill PLUS®, Analytik Jena) unter dauernder Kühlung mechanisch homogenisiert. Als nächstes wurden die Proben zentrifugiert (10 min mit 300 x g bei 4 °C), die Überstände in neue Behältnisse überführt und bei - 80 °C gelagert.

2.2.1.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Es wurde eine kolorimetrische Messung der Gesamtprotein-Konzentration mit dem „Pierce® BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Quantifizierung von Protein mit Bicinchoninsäure (BCA) stellt eine Weiterentwicklung der Biuret-Methode dar (Smith et al., 1985). Es wurde gemäß der Herstellerempfehlungen vorgegangen. Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt, wobei pro Ansatz 200 µl der BCA-Arbeitslösung und 10 µl der zu untersuchenden Probe eingesetzt wurden. Neben den zu analysierenden Proben wurden eine Leerprobe sowie eine BSA- (bovines Serum-Albumin-) Verdünnungsreihe aufgetragen. Das Herstellerprotokoll gibt einen Arbeitsbereich von 20 bis 2000 µg/ml Gesamtprotein an. Die Ansätze wurden auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Diese wurde luftdicht verschlossen, gevortext, für 30 s bei 200 x g zentrifugiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die kolorimetrische Auswertung wurde mit mittels *Multiplate-Reader* (Infinite® M200 PRO, Tecan) durchgeführt.

2.2.1.4 Aufbereitung der Protein-Proben

Es wurden „2X Laemmli-Puffer“ und „4X Laemmli-Puffer“ verwendet (Abschnitt 2.1.4). Die Proteinproben in RIPA mit Proteaseinhibitor wurden mit „Laemmli-Puffer“ (entsprechend 1 : 2 bzw. 1 : 4) versetzt, für 15 s gevortext, 15 s abzentrifugiert und dann bei geschlossenem Gefäß für 10 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben erneut gevortext, zentrifugiert und ggf. bei - 20 °C gelagert. Bei zu geringer Proteinkonzentration wurde diese durch teilweise Verdampfung flüssiger Bestandteile der Proben erhöht. Zu diesem Zweck wurden die der gewünschten Masse entsprechenden Volumina der Proben aus einem Experiment in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und mit RIPA-Puffer angeglichen. Anschließend wurde entsprechend des Zielvolumens Laemmli-Puffer zugesetzt. Die so vorbereiteten Proben wurden abermals gevortext, zentrifugiert und für mindestens 10 min, je Versuch konstant, auf 95 °C erhitzt. Letzteres wurde bei offenstehenden Deckeln der Reaktionsgefäße unter einem Abzug durchgeführt, so dass eine Volumenreduktion durch Verdampfung erzielt wurde.

2.2.1.5 Elektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Protein-Proben werden hierbei in Laemmli-Puffer gelöst, welcher das anionische Tensid SDS (Natriumlaurylsulfat) enthält, und thermisch denaturiert. SDS bindet hydrophobe Protein-Abschnitte, wodurch diese eine negative elektrische Gesamtladung annehmen und daher in einem elektrischen Feld in Richtung Anode wandern. In einem Gel mit geringem Porendurchmesser werden darin wandernde Moleküle abgebremst und so nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt (Bass et al., 2017; Laemmli, 1970).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden kommerziell erhältliche 4-20 % T-Polyacrylamid-Gradientengele verwendet. Die Porengröße hängt ab vom Acrylamid-Gesamtgehalt eines Gels (% T entsprechend g/100 ml (w/v)), sowie von dem Anteil an N,N'-Methylen-bis-acrylamid (% C (w/w)) (Holmes & Stellwagen, 1991). Bei Gradientengelen weist das Trenngel eine nach unten zunehmende Acrylamid-

Konzentration auf, wodurch eine bessere Darstellung von Proteinen unterschiedlicher Masse möglich ist.

Vor Beladen des Gels wurde dieses mit Elektrophorese-Puffer gespült. Als Proteinstandard wurden 5 µl des „Color Prestained Protein Standard“ (New England Biolabs) und ggf. zusätzlich 5 µl des „MagicMark™ XP Western Protein Standard“ (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Die einzusetzenden Volumina der Protein-Proben wurden, soweit nicht anders angegeben, anhand der BCA-Messung so bestimmt, dass für alle Proben eines Versuchs die gleiche Protein-Masse eingesetzt wurde. Eine Übersicht über den Proteineinsatz bietet **Tabelle 10**. Die Volumina der Proben für ein Gel wurden anschließend mit 1x Laemmli-Puffer angeglichen. Leer bleibende Taschen wurden mit 1x Laemmli-Puffer bestückt. In dem Versuch zur Optimierung der Plasmid-Transfektion wurde von den HEK293-Zell-Lysaten zur Beurteilung der produzierten ADAMTS-7-Menge das konstante Volumen von je 10 µl eingesetzt. HAoSMC-Lysate wurden zur Beurteilung der Transfektions-Effizienz mit konstanter Proteinmenge eingesetzt (200 000 Zellen: 0,25 µg, 400 000 Zellen: 1 µg, 800 000 Zellen: 2 µg). Es wurde eine Spannung von 100 V angelegt, die nach Erreichen des Trenngels schrittweise auf 200 V erhöht wurde. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald das Bromphenolblau den unteren Rand des Gels erreichte.

Tabelle 10: Übersicht des Einsatzes von Gesamtprotein im Western Blot.

Abkürzung: KD = *Knockdown*.

Versuch	Einsatz Protein (µg)
Optimierung Transfektion <i>ADAMTS7</i> -Plasmid	s.o.
Evaluation anti- <i>ADAMTS-7</i> -Antikörper	s. Abschnitt 2.2.12
Erweiterte Evaluation anti- <i>ADAMTS-7</i> -ab	20
Myosin-11 in HAoSMC nach oxLDL	10
αSMA in HAoSMC nach oxLDL	5
Myosin-11 & Smoothelin in SMC bei <i>ADAMTS7</i> -KD	20
(p-)ERK1/2	10

2.2.1.6 Membran-Transfer

Das *Western Blotting* im engeren Sinn bezeichnet den Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran, welche meist, wie auch im vorliegenden Projekt, aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) besteht. Auf der Membran ist das Protein immobilisiert

und kann analysiert werden. Der Transfer erfolgt mittels eines senkrecht auf Gel und Membran stehenden elektrischen Feldes, in welchem das Protein infolge der Assoziation mit SDS in Richtung der Anode wandert. Hierbei kann man zwischen „nassem“ Transfer und „semi-trockenem“ Transfer unterscheiden. Bei erstgenannter Methode (Towbin et al., 1979) findet die Übertragung in einem Puffer-gefüllten Tank mit Platindraht-Elektroden statt. Bei letzterer befinden sich Membran und Gel zwischen zwei flächigen, horizontalen Plattenelektroden. Bei beiden Methoden befinden sich Gel und Membran zwischen Filterpapieren (Kurien & Scofield, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die „semi-trockene“ Transfertechnik lediglich für die Etablierung der Überexpression von *ADAMTS7* angewandt, da eine vergleichsweise geringere Effektivität bei der Übertragung größerer Proteine zu beobachten war. Für den „nassen“ Transfer wurde zunächst die PVDF-Membran für 30 s in Methanol aktiviert. Anschließend wurde sie auf dem Gel platziert und eventuelle Luftblasen entfernt. Membran und Gel wurden zwischen zwei Filterpapieren und Schwämmen zwischen den Elektroden in dem Puffer-Tank platziert. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 1,5 h unter Platzierung eines Kühl-Akkus in dem Behälter (Ausnahme s. Abschnitt 2.2.1.9).

2.2.1.7 Immunologischer Antigen-Nachweis

Die hohe Spezifität der Methode ist auf die Bindung des Zielproteins durch einen spezifischen Antikörper zurückzuführen. Zum Chemilumineszenz-basierten Nachweis der Primärantikörper wurde die Membran mit Sekundärantikörpern inkubiert, welche gegen die Fc-Domäne der Primärantikörper gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert sind. Bei Inkubation der Membran mit Luminol wird dieses durch die HRP oxidiert und emittiert daraufhin Licht (Kurien & Scofield, 2006).

Die Protein-tragende Membran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % (w/v) Milch in PBS geblockt. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in 2,5 % (w/v) Milch in PBS-T bei 4 °C über Nacht. Für die Antikörper ab201083 (anti-ADAMTS-7, Abcam) und ab21108 (anti-Smoothelin, Abcam) wurde 1,25 % statt 2,5 % PBST-Milch zur Lösung des Antikörpers verwendet. Die eingesetzten Verdünnungen der Primärantikörper sind in **Tabelle 11** aufgelistet. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS-T (je fünf Minuten) wurde die Membran mit dem

Sekundärantikörper (Verdünnung 1 : 100 000) in 2,5 % (w/v) Milch in PBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem fünfmaligem Waschen mit PBS-T (je fünf Minuten) erfolgte die Behandlung mit der Entwicklungslösung und unmittelbar danach die Entwicklung. Zur Quantifizierung des Zielproteins diente GAPDH als interne Referenz. Sofern das Zielprotein, erstens, ein deutliches Signal aufwies und sich, zweitens, hinsichtlich seiner molekularen Masse klar von GAPDH unterschied, wurde zusätzlich ein gegen GAPDH gerichteter Primärantikörper hinzugegeben. Gegebenenfalls wurde entsprechend mit zwei Sekundärantikörpern inkubiert. Sofern sich die Banden von Zielprotein und interner Kontrolle in ihrer Intensität stark unterschieden, wurde für eine deutliche aber überstrahlungsfreie Darstellung beider Banden mit zwei verschiedenen Belichtungszeiten entwickelt. Wenn eine parallele Darstellung von Zielprotein und GAPDH nicht sinnvoll war, wurde die Membran nach ihrer Entwicklung mit PBS-T gewaschen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur „gestript“ (Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer, Thermo Fisher), also von den gebundenen Antikörpern befreit. Nach Waschen mit PBS (fünfmal für je fünf Minuten) wurde die Membran erneut geblockt, danach mit anti-GAPDH-Antikörper inkubiert und entwickelt.

Tabelle 11: Verdünnung der Primär-Antikörper im Western Blot.

Antikörper: anti-	Versuch	Verdünnung
ADAMTS-7 ab201083	Test anti-ADAMTS-7-Antikörper	1 : 2 000
	Erweiterter Antikörper-Test	1 : 1 000
ADAMTS-7 ab45044	Test anti-ADAMTS-7-Antikörper	1 : 2 000
ADAMTS-7 HPA 045284	Test anti-ADAMTS-7-Antikörper	1 : 1 000
ADAMTS-7 H00011173-A01	Test anti-ADAMTS-7-Antikörper	1 : 2 000
ADAMTS-7 sc-163642	Test anti-ADAMTS-7-Antikörper	1 : 2 000
aSMA	SMC-Phänotyp unter oxLDL	1 : 20 000
ERK1/2	Signalwege oxLDL / <i>ADAMTS7</i>	1 : 1 000
GAPDH	wo interne Kontrolle benötigt	1 : 100 000
Myosin-11	SMC-Phänotyp unter oxLDL und bei <i>ADAMTS7-Knockdown</i>	1 : 3 000
p-ERK1/2	Signalwege oxLDL / <i>ADAMTS7</i>	1 : 1 000
Smoothelin	SMC-Phänotyp bei <i>ADAMTS7-Knockdown</i>	1 : 500
V5	Optimierung Transfektion	1 : 10 000

2.2.1.8 Auswertung

Die densitometrische Quantifizierung des nachzuweisenden Proteins erfolgte mithilfe der Software FIJI (Schindelin et al., 2012). Hierzu wurde wie folgt vorgegangen:

1. Bild, im Format 8-bit, „.tiff“
2. Inversion
3. Subtraktion des Hintergrundes (rolling ball radius = 50,0 pixels)
4. Mittels „Toolbar“ Rechteck um die erste zu analysierende Bande zeichnen (so eng wie möglich, ohne die Bande zu berühren)
5. Messung („area“ und „integrated density“)
6. Rechteck mit Pfeiltasten oder Maus auf nächste Bande verschieben und Wiederholung von Schritt 5; Entsprechendes für jede weitere zu analysierende Bande
7. Rechteck in Bereich ohne Banden bewegen und Messung (wie Schritt 5) um einen Hintergrund-Wert zu erheben

Von den erhaltenen densitometrischen Werten (*RawIntDen*, Einheit: *arbitrary densitometric units*, ADU) wurde jeweils der Hintergrund-Wert subtrahiert. Das Ergebnis wurde auf GAPDH normalisiert. Ggf. wurden „Vielfache der Kontrolle“ berechnet.

2.2.1.9 Modifiziertes Vorgehen zum Nachweis von ADAMTS-7

Es handelt sich bei ADAMTS-7 um ein mit mehr als 200 kDa vergleichsweise großes Protein (Somerville et al., 2004). Daher wurde in der erweiterten Prüfung des anti-ADAMTS-7-Antikörpers ab201083 (Abcam) eine auf diese Anforderungen hin modifizierte Vorgehensweise gewählt:

Das Blotting wurde in Methanol-freiem Transferpuffer und bei 25 V für 21 Stunden bei 4 °C durchgeführt. Der Primärantikörper wurde in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt (entsprechend 1 µg/ml, vgl. **Tabelle 11**) und hierzu, in Abweichung vom sonst angewandten Vorgehen, in 1,25 % (w/v) PBS-T-Milch verdünnt. Zur Normalisierung wurden die Blot-Membranen nach Aufnahme von Bildern „gestrippt“ und anschließend das auf ihnen gebundene GAPDH quantifiziert. Der Protein-Einsatz je Probe betrug 20 µg.

2.2.2 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie (ICC) ist eine Methode zur mikroskopischen Darstellung zellulärer Antigene mittels spezifischer Antikörper (Skoog & Tani, 2011). Hierzu wurde gemäß folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Aussäen von Zellen auf 6-Well-Zellkulturplatten, deren Wells sterilisierte Deckgläser enthielten, und Inkubation
2. Fixieren
 - a. Zweimal Waschen mit kaltem PBS
 - b. Fixieren mit eiskaltem Methanol für fünf Minuten
 - c. Dreimaliges Waschen in PBS für je fünf Minuten
3. Blocken: 10 % *Horse Serum*-PBS mit 0,2 % Triton 100-X für eine Stunde
4. Inkubation mit Primärantikörper
 - a. Antikörper-Verdünnung 1 : 500
 - b. In 10 % *Horse Serum*-PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur
5. Inkubation mit Fluoreszenz-markiertem Sekundärantikörper
 - a. Dreimaliges Waschen mit PBS für je fünf Minuten
 - b. Antikörper 1 : 500 in *Horse-Serum*-PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur
 - c. Dreimaliges Waschen mit PBS für je fünf Minuten
6. Eindeckung und Gegenfärbung der Zellkerne mit *SlowFade™ Gold Antifade Mountant with DAPI* (ThermoFisher), Aufbringen auf Objektträger und fluoreszenzmikroskopische Visualisierung.

2.2.3 Genexpressionsanalyse

2.2.3.1 RNA-Isolation und reverse Transkription

Für Genexpressionsanalysen wurde RNA aus kultivierten Zellen isoliert und mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierzu wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Ernte der Zellen:
 - a. Absaugen des Kulturmediums von der 24-Well-Zellkulturplatte
 - b. Dreimaliges Waschen mit 4 °C kaltem PBS
 - c. Einfrieren der Kulturplatte nach letztmaligem Absaugen bei -80 °C
2. Isolation der mRNA
 - a. Ablösen der Zellen mittels *Cell-Scraper* und Homogenisierung mithilfe des QIAshredder® (Qiagen)
 - b. RNA-Isolation mithilfe des RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, DE)

- c. Messung der RNA-Konzentration mithilfe des Infinite® M200 PRO *Microplate Readers* (Tecan) und entsprechender Konzentrationsangleich durch Verdünnung mit DNase-/RNase-freiem destilliertem Wasser auf 10 ng/µl
 - d. Lagerung der RNA bei -80 °C
3. Reverse Transkription unter Verwendung des Kits „Invitrogen® ThermoScript® RT-PCR System for First-Strand cDNA Synthesis“ (Thermo Fisher Scientific)
- a. Einsatz von 7,5 µl gelöster RNA entsprechend 75 ng
 - b. Als Primer wurden „*Random Hexamers*“ und „*Oligo dT*“ im Verhältnis 1:1 verwendet
 - c. Die optionale Inkubation mit einer RNase als abschließendem Schritt wurde stets durchgeführt.

2.2.3.2 Real Time-Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung von DNA (Saiki et al., 1985). Sie ermöglicht die effiziente Vervielfältigung und den hochsensitiven Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen *in vitro*. Ein PCR-Zyklus setzt sich aus drei Schritten zusammen: 1. Denaturierung der DNA-Vorlage; 2. Anlagerung der Primer; 3. DNA-Synthese durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Jeder Schritt findet bei einer spezifischen Temperatur statt. Es werden 20 bis 40 aufeinanderfolgende Zyklen durchlaufen, wobei sich unter optimalen Bedingungen die betreffende DNA-Sequenz pro Zyklus verdoppelt. Somit kommt es zur selektiven Vervielfältigung und relativen Aufreinigung der gewünschten DNA-Sequenz (Rassow, 2012). Die PCR wird auch zur Quantifizierung von DNA verwendet (quantitative PCR, qPCR), heute in der Regel als Echtzeit-qPCR (*real time*-qPCR) mit fluorometrischer Messung während jedes einzelnen Zyklus. Die Quantifizierung erfolgt hierbei in der exponentiellen Phase der PCR, indem die Anzahl benötigter Zyklen bis zum Erreichen eines festgesetzten Fluoreszenz-Schwellenwerts (*crossing threshold*, C_T) bestimmt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde die auf *fluorescence-resonance energy transfer* (FRET) basierende TaqMan®-Technologie verwendet (VanGuilder et al., 2008). Die *real time*-qPCR wird zur Messung der Genexpression durch Quantifizierung von *messenger RNA* (mRNA) genutzt. Dies wird ermöglicht durch vorausgehendes Umschreiben der mRNA in komplementäre DNA (cDNA) mittels reverser Transkription. Die Reverse Transkriptase-qPCR (RT-qPCR) ermöglicht die präzise Quantifizierung der Genexpression. Bei der Analyse von

Genexpressionsniveaus werden meist relative Quantifizierungsstrategien angewandt, wie die in der vorliegenden Arbeit genutzte $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (komparative C_T -Methode) (Derveaux et al., 2010; VanGuilder et al., 2008). Hierbei wird die Differenz der C_T -Werte des zu analysierenden Gens und des Referenzgens ermittelt (ΔC_T). Im nächsten Schritt wird der ΔC_T -Wert der unbehandelten Probe (Kalibrator) von dem der behandelten Probe subtrahiert ($\Delta\Delta C_T$). Der Anschaulichkeit halber wird der negative Wert von $\Delta\Delta C_T$ verwendet, da der C_T -Wert invers mit der Anzahl von DNA-Kopien in der Reaktion korreliert. Da es sich bei C_T -Werten, aufgrund der exponentiellen Zunahme der Anzahl von DNA-Kopien in der PCR, um logarithmische Werte handelt, werden diese in lineare Werte transformiert, um gängige statistische Tests anwenden zu können. Zusammengefasst gilt:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-[(C_{T, \text{Gen von Interesse}} - C_{T, \text{interne Kontrolle}})_{\text{behandelte Probe}} - (C_{T, \text{Gen von Interesse}} - C_{T, \text{interne Kontrolle}})_{\text{Kalibrator}}]}$$

Zugrunde liegt die Annahme einer für Ziel- und Referenzgen identischen Effizienz der PCR von nahezu 100 %. Der Vorteil der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode liegt in der Möglichkeit, die Daten als relative Veränderung (*fold change*, FC) zu präsentieren: $FC = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Schmittgen & Livak, 2008).

Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. *Real time*-qPCR
 - a. Verwendetes Kit: TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG (Thermo Fisher Scientific)
 - b. Einsatz von 2 µl gelöster cDNA entsprechend 7,5 ng pro Ansatz in einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Ansatz
 - c. Durchführung in Triplikaten (technische Wiederholungen)
 - d. Auftragen zweier Ansätze ohne Zugabe von cDNA als Negativkontrolle von RT und qPCR (dem Universal Master Mix II wurde dabei zugegeben 1. H₂O, 2. RT-Ansatz ohne Einsatz von RNA)
 - e. Verwendung spezifischer TaqMan®-Sonden (vgl. Abschnitt 2.1.6) gegen *ADAMTS7*, *MYH11* und *GAPDH*
 - f. Durchführung der qPCR in dem *Applied Biosystems™ ViiA™ 7 real-time PCR system* unter Verwendung der *ViiA™ 7 software v1.2.2* (Thermo Fisher Scientific)
2. Auswertung der Daten nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode
 - a. Interne Kontrolle: *GAPDH*
 - b. Berechnung auf Grundlage des Mittelwerts der C_T -Werte der je drei Replikate je Ansatz und Ziel-Gen

2.2.4 Zellkultur

Beim Arbeiten mit den Zellen wurden aseptische Standard-Techniken angewandt. Zellen wurden in unbeschichteten Kunststoff-Zellkulturflaschen kultiviert. Für Versuche wurden sie auf unbeschichteten Kunststoff-Zellkulturplatten ausgesät. Eine Ausnahme stellt der Versuch zum möglichen Einfluss von EZM auf die *ADAMTS7*-Expression dar (Abschnitt 3.3.1). Zur Anwendung kamen

- 6-Well-Zellkulturplatten zur Gewinnung von Protein, für die ICC und zur morphologischen Analyse,
- 24-Well-Zellkulturplatten zur Gewinnung von RNA und für den Migrations-Assay und
- 96-Well-Zellkulturplatten für den Proliferations-Assay.

2.2.4.1 HEK293-Zellen

Human embryonic kidney (HEK) 293-Zellen wurden in unbeschichteten Kunststoff-Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden jeden zweiten, bzw. an Wochenenden jeden dritten, Tag geteilt, jeweils nach lichtmikroskopischer Kontrolle. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Entfernen des Kulturmediums und Waschen mit PBS
2. Trypsinierung der Zellen (Trypsin-EDTA 0,04 % / 0,03 %, für fünf Minuten bei 37 °C)
3. Stoppen mit FKS-haltigem Kulturmedium, Lösen hierin und Aussäen

2.2.4.2 HAoSMC

In Einklang mit den Herstellerempfehlungen wurden HAoSMC folgendermaßen in Kultur genommen:

1. Auftauen im Wasserbad (37 °C) für zwei Minuten
2. Aussäen in Kulturfalsche (25 cm²) in 9 ml Kulturmedium
3. Austausch des Mediums nach 24 Stunden

HAoSMC wurden in Passage vier bis elf für Versuche verwendet. Die kultivierten Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 % geteilt. Hierzu wurden die

Zellen jeden zweiten Tag lichtmikroskopisch inspiziert und es wurde bei geringerer Konfluenz ein Mediumwechsel durchgeführt. Für das Teilen der Zellen wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Entfernen des Kulturmediums und Waschen mit Hepes BSS
2. Trypsinierung der Zellen (Trypsin-EDTA 0,04 % / 0,03 %) bei Raumtemperatur unter mikroskopischer Kontrolle
3. Stoppen mit *Trypsin Neutralization Solution*, Lösen hierin, Überführen in ein steriles Zentrifugenröhrchen und Zentrifugation für drei Minuten bei 220 x g
4. Verwerfen des Überstands, Lösen der Zellen in Kulturmedium und Aussäen bei 7500 - 10000 Zellen pro cm²

2.2.5 siRNA-vermittelter Gen-Knockdown

Die RNA-Interferenz ist ein Vorgang, im Zuge dessen kurze, nicht-kodierende RNAs spezifisch an andere, in der Zelle vorliegende RNAs binden und deren Degradation oder verminderte Expression bewirken. Eine Art kurzer, nicht-kodierender RNAs sind *small interfering RNAs* (siRNAs), welche durch Spaltung doppelsträngiger RNAs in der Zelle entstehen und vorrangig der Abwehr komplementärer, fremder RNAs dienen (Alberts, 2015). SiRNAs bilden die Grundlage einer Methode zur selektiven Ausschaltung der Expression einzelner Gene („*Knockdown*“).

Im Rahmen des hier beschriebenen Projekts wurden HAoSMC mit siRNAs transfiziert. Hierzu wurde das für siRNA optimierte Transfektionsreagenz „Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent“ verwendet, das auf Basis kationischer Lipide funktioniert (Thermo Fisher Scientific). Es kamen kommerziell verfügbare, spezifische siRNAs vom Typ „Silencer® Select“ zur Anwendung (Thermo Fisher Scientific). Dies sind zum Zweck höherer Effizienz und geringerer *off-target*-Effekte chemisch modifizierte siRNAs (Life Technologies Corporation, 2011). Es wurde dem Hersteller-Protokoll gemäß vorgegangen (Invitrogen by life technologies, 2013). Demzufolge wurden pro *Well* einer Zellkulturplatte die in **Tabelle 12** aufgelisteten Stoffmengen siRNA und Volumina Lipofectamine® RNAiMAX eingesetzt.

Tabelle 12: Einsatz von siRNA und Transfektionsreagenz pro *Well* einer Zellkulturplatte.

Kulturplatte, Anzahl <i>Wells</i>	siRNA (pmol)	Lipofectamine® (µl)
96	1	0,3
24	5	1,5
6	25	7,5

Zellen wurden ausgesät und für 24 Stunden zu Subkonfluenz von ca. 80% inkubiert. Die Transfektion folgte unmittelbar auf einen Austausch des Mediums gegen neues Vollmedium. Eine Ausnahme stellen die Experimente dar, die neben der siRNA-Transfektion eine Inkubation mit oxLDL beinhalteten (Abschnitte 3.2.2.2.2 und 3.3.4.3.2). Hier wurde, aufgrund der Erfordernisse des Protokolls zur oxLDL-Inkubation, zu einem späteren Zeitpunkt (72 Stunden nach Aussäen, davon 48 in Voll- und 24 in Basalmedium) und in FKS-freiem Basalmedium transfiziert. Auch bei der morphologischen Analyse von SMC bei *ADAMTS7-Knockdown* wurde eine Transfektion in FKS-freiem Medium angewandt (Abschnitt 3.2.2.1). In dem Versuch zur SMC-Proliferation bei *ADAMTS7-Knockdown* (Abschnitt 3.2.2.2.1) wurde aufgrund des Versuchsaufbaus in Einklang mit den Herstellerempfehlungen (Invitrogen by life technologies, 2013), „revers“, also zeitgleich mit dem Aussäen der Zellen, transfiziert. Die Inkubationszeiten mit siRNA gehen aus **Tabelle 13** hervor. Der *ADAMTS7-Knockdown* wurde, wie unter Abschnitt 3.1.1 beschrieben, etabliert. In den darauffolgenden Versuchen wurde entsprechend die siRNA- s22052 verwendet.

Tabelle 13: Inkubationszeiten mit siRNA.

Versuch	Inkubationszeit (Stunden)	72	48	24
SMC-Phänotyp (3.4)		X		
SMC-Proliferation (3.5.1)			X	
SMC-Migration (3.5.2)				X
<i>OLR1-Knockdown</i> (3.8.2.2)				X

2.2.6 Transfektion kultivierter Zellen mit Plasmiden

Im Rahmen dieses Projekts wurden HEK293-Zellen und HAoSMC mit einem *ADAMTS7*-Plasmid transfiziert. Das Plasmid wies folgende Struktur auf: *DEST40-*

ADAMTS7_FL_WT-V5-His, also die Volllänge- (*full length*, FL) Sequenz von *ADAMTS7* vom Wildtyp (WT) mit C-terminalen *His*- und *V5*-Tags. Ggf. wurde als Negativkontrolle mit pUC19 transfiziert. Die Transfektion erfolgte je nach zu transfizierender Zelllinie auf unterschiedliche Weise.

HEK293-Zellen wurden mit Hilfe des Lipid-basierten, nicht-liposomalen FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega) transfiziert. Hierzu wurden Zellen einen Tag vor der Transfektion ausgesät. Gemäß Herstellerempfehlung wurden das Transfektionsreagenz und das Plasmid im Verhältnis 4 : 1 (v/w) eingesetzt und nach Lösung in Serum-reduziertem Medium direkt auf die Kultur-*Wells* pipettiert. Es wurde eine Optimierung der Transfektionsbedingungen durchgeführt (s. Abschnitt 3.1.2). Hierzu wurde eine Ausgangslösung hergestellt und je nach gewünschter DNA-Menge (**Tabelle 14**) in unterschiedlichen Volumina eingesetzt. Variiert wurde zudem die Anzahl der Zellen pro Ansatz (**Tabelle 14**). Als Negativkontrolle diente ein nicht-transfizierter Ansatz je Zellzahl. HEK293-Zellen wurden hierbei 96-*Well*-Zellkulturplatten in Triplikaten angesetzt, welche jeweils nach Ernte zusammengefasst wurden.

Da es sich bei HAoSMC um schwer zu transfizierende Primärzellen handelt, wurde für diese Zelllinie ein Elektroporationsverfahren angewandt. Dazu wurde ein Nucleofector™ Device in Kombination mit dem Amaxa® Human AoSMC Nucleofector® Kit (Lonza) genutzt. Trypsinierte HAoSMC wurden zentrifugiert und anschließend in AoSMC Nucleofector® Solution, welcher zuvor das Plasmid zugegeben worden war, gelöst und in Transfektionküvetten überführt. Anschließend wurden die Zellen der Elektroporation unterzogen (Programm U-025) und danach ausgesät. Es wurde eine Optimierung des Verfahrens hinsichtlich verwendeter Zellzahl und Plasmid-Einsatz durchgeführt (**Tabelle 14** und Abschnitt 3.1.2). HAoSMC wurden hierbei auf 6-*Well*-Zellkulturplatten ausgesät und 24 Stunden nach Transfektion geerntet. Aus HEK293-Zellen und HAoSMC wurde jeweils nach der Ernte Protein isoliert. Die Beurteilung der Transfektion erfolgte mittels Western Blot.

Tabelle 14: Transfektion von HEK293-Zellen und HAoSMC mit ADAMTS7-Plasmid.

HEK293					
Anzahl Zellen	Einsatz Plasmid-DNA (μg)				
1000	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20
2000	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20
4000	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20
HAoSMC					
Anzahl Zellen	Einsatz Plasmid-DNA (μg)				
200 000	1,00	2,00	4,00	8,00	
400 000	1,00	2,00	4,00	8,00	
800 000	1,00	2,00	4,00	8,00	

2.2.7 Beschichtung von Zellkulturplatten

Die verwendeten EZM-Komponenten waren (vgl. Abschnitt 2.1.2):

- Kollagen I
- Fibronectin
- Laminin

Bei den zu beschichtenden Platten handelte es sich um Standard-24-Well-Zellkulturplatten aus Kunststoff. Die Beschichtung erfolgte gemäß der jeweiligen Empfehlung des Herstellers. Das jeweilige Protokoll und die jeweils resultierende Masse pro Fläche sind **Tabelle 15** zu entnehmen.

Tabelle 15: Beschichtung von Zellkulturplatten mit EZM-Komponenten.
Abkürzung: Vol. = Volumen; RT = Raumtemperatur)

Beschichtung	Endkonz. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Flüssigkeit Verdünnung	Verhältnis Verdünnung	Vol. pro Well (μl)	Prozedere
Kollagen I	10	H ₂ O	1:10	200	1. 4 h bei RT 2. Überschuss abpipettieren 3. Lufttrockenen über Nacht
Fibronectin	5	HBSS	1:20	200	Lufttrocknen für 45 min
Laminin	1	HBSS	1:50	200	1. 2 h bei RT 2. Überschuss abpipettieren 3. Vor Aussäen von Zellen mit HBSS wässern

2.2.8 Kultur von HAoSMC auf beschichteten Zellkulturplatten

Es kamen mit EZM-Komponenten beschichtete (s. Abschnitt 2.2.7) 24-Well-Zellkulturplatten zur Anwendung. Dabei wurden pro Versuchswiederholung für jeden untersuchten EZM-Bestandteil zwei *Wells* angesetzt, welche jeweils bei der Ernte zusammengefasst wurden. Pro Einzelversuch wurden als Kontrolle zwei unbeschichtete *Wells* angesetzt. Pro *Well* wurden 80000 HAoSMC in 200 µl Medium ausgesät und für 72 Stunden ohne Mediumwechsel inkubiert. Anschließend erfolgten die Ernte der Zellen, RNA-Isolation, reverse Transkription und Quantifizierung der *ADAMTS7*-cDNA mittels qPCR.

2.2.9 Zellmorphologische Analyse von HAoSMC

Zur standardisierten Analyse der zellulären Morphologie von HAoSMC wurden softwaregestützt die Gestalt deren Zellkörper vermessen. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Nach der jeweiligen Behandlung der Zellen, bspw. nach Inkubation mit oxLDL, wurden je Ansatz zwei lichtmikroskopische Bilder aufgenommen (Mikroskop: Zeiss Axiovert® 100, 2,5x-Objektiv, Kamera: Zeiss AxioCam® HRc, Carl Zeiss AG). Die Auswertung erfolgte mithilfe der *Open Source*-Software CellProfiler (Carpenter et al., 2006). Es wurde eine spezielle „*Pipeline*“ erstellt, also eine Abfolge konfigurierter Module der Software, welche das zu analysierende Bild durchläuft. Diese war für die beiden genannten Experimente weitgehend identisch. Im Detail bestanden folgende Unterschiede: (a) nur bei der oxLDL-Versuchsreihe war eine Umwandlung der Bilder in Graustufen erforderlich, da sonst bereits in diesem Farbformat aufgenommen; (b) in der Konfiguration des Moduls „*IdentifyPrimaryObjects*“ wurde in der *ADAMTS7-Knockdown*-Versuchsreihe durchgehend ein „*Threshold correction factor*“ von 0,980 gesetzt. In der oxLDL-Versuchsreihe wurde er je Versuchswiederholung angepasst (Werte zwischen 0,963 und 1,000), wobei innerhalb einer Versuchswiederholung für Kontroll- und Behandlungsgruppe stets der selbe Wert gesetzt wurde; (c) ebenfalls in der Konfiguration des Moduls „*IdentifyPrimaryObjects*“ wurden in der oxLDL-Versuchsreihe für den Parameter „*Typical diameter of objects, in pixel units (Min, Max)*“ die Werte „10, 150“ gesetzt, in der *ADAMTS7-Knockdown*-Versuchsreihe „10, 35“. Detaillierte Transkripte der

„Pipelines“ befinden sich im Anhang der Arbeit. Der grundsätzliche Aufbau mit den wichtigsten Konfigurations-Parametern ist im Folgenden aufgeführt:

1. *Crop*
2. *CorrectIlluminationCalculate*
3. *CorrectIlluminationApply*
4. *ImageMath*
 - *Operation:Invert*
5. *IdentifyPrimaryObjects*:

Tabelle 16: Parameter Cell-Profiler – Identify Primary Objects.

<i>Typical diameter of objects, in pixel units (Min,Max)</i>	[s.o.]
<i>Discard objects outside the diameter range?</i>	Yes
<i>Try to merge too small objects with nearby larger objects?</i>	No
<i>Discard objects touching the border of the image?</i>	Yes
<i>Method to distinguish clumped objects</i>	<i>Laplacian of Gaussian</i>
<i>Method to draw dividing lines between clumped objects</i>	None
<i>Size of smoothing filter</i>	10
<i>Suppress local maxima that are closer than this minimum allowed distance</i>	7,0
<i>Speed up by using lower-resolution image to find local maxima?</i>	Yes
<i>Fill holes in identified objects?</i>	<i>After both thresholding and declumping</i>
<i>Automatically calculate size of smoothing filter for declumping?</i>	Yes
<i>Automatically calculate minimum allowed distance between local maxima?</i>	Yes
<i>Retain outlines of the identified objects?</i>	Yes
<i>Automatically calculate the threshold using the Otsu method?</i>	Yes
<i>Enter Laplacian of Gaussian threshold</i>	0,5
<i>Automatically calculate the size of objects for the Laplacian of Gaussian filter?</i>	Yes
<i>Enter LoG filter diameter</i>	5,0
<i>Handling of objects if excessive number of objects identified</i>	<i>Continue</i>
<i>Maximum number of objects</i>	500
<i>Threshold setting version</i>	1
<i>Threshold strategy</i>	<i>Global</i>
<i>Thresholding method</i>	<i>RobustBackground</i>
<i>Select the smoothing method for thresholding</i>	<i>Automatic</i>
<i>Threshold smoothing scale</i>	1,0
<i>Threshold correction factor</i>	[s.o.]
<i>Lower and upper bounds on threshold</i>	0,0;1,0
<i>Approximate fraction of image covered by objects?</i>	0,01
<i>Manual threshold</i>	0,0
<i>Select the measurement to threshold with</i>	None
<i>Select binary image</i>	None
<i>Masking objects</i>	None
<i>Two-class or three-class thresholding?</i>	<i>Two classes</i>
<i>Minimize the weighted variance or the entropy?</i>	<i>Weighted variance</i>
<i>Assign pixels in the middle intensity class to the foreground or the background?</i>	<i>Foreground</i>

6. *MeasureObjectSizeShape*
7. *ExportToSpreadsheet*

Die Software nähert dem Umriss jeder einzelnen Zelle eine bestmöglich passende Ellipse an. Deren lange und kurze Ache werden jeweils (in Pixeln) gemessen. Im

nächsten Schritt wurde das Verhältnis von längerer zu kürzerer Achsenlänge jeder Einzelzelle bestimmt und daraus der jeweilige Mittelwert pro unabhängiger Versuchswiederholung berechnet.

2.2.10 Analyse der zellulären Migration

Mit Migration ist im Folgenden die zweidimensionale Migration bezeichnet, welche aus pragmatischen Gründen in der überwiegenden Anzahl von Migrationsassays beurteilt wird (Ashby & Zijlstra, 2012). Grundsätzlich beruhen Migrations-Assays entweder auf dem Ausschluss einer definierten Fläche vom Zellwachstum oder auf der lokalen Entfernung von Zellen. Letzteres wird als *wound healing*-Assay bezeichnet. Deren gängigster Vertreter ist der *scratch wound*-Assay, bei welchem eine zellfreie Fläche durch mechanisches Kratzen geschaffen wird (Ashby & Zijlstra, 2012). In *wound-healing*-Assays können zwei Arten zellulärer Migration unterschieden werden: Die epitheliale Wanderung im festen Zellverbund und die Wanderung mesenchymaler Zellen, wozu auch SMC gehören, bei welcher die Migration der Einzelzelle im Vordergrund steht (Ascione et al., 2016).

Im vorliegenden Projekt wurde der *scratch wound*-Assay verwendet. Ein wesentlicher Vorteil ist die Möglichkeit der Durchführung ohne dabei vom gewünschten Zellkultur-Protokoll abzuweichen. Dies war für das relativ komplexe und langwierige Vorgehen bei der Behandlung von HAoSMC mit oxLDL nötig. Es wurde wie folgt vorgegangen: HAoSMC wurden in Triplikaten auf unbeschichteten 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für 48 Stunden bis zum Erreichen annähernder Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel gegen FKS-freies Basalmedium vorgenommen. Dieses *serum starving* war einerseits Bestandteil des oxLDL-Protokolls (Abschnitt 2.2.14) und stellt andererseits eine übliche Vorgehensweise bei *wound healing*-Assays dar, um die zelluläre Proliferation als möglichen Störfaktor zu minimieren (Jonkman et al., 2014). 24 Stunden später wurde mit anti-ADAMTS7- bzw. *scramble*-siRNA transfiziert. Im Zuge dessen wurde ein erneuter Mediumwechsel mit Basalmedium durchgeführt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Kulturmedium gegen frisches Basalmedium ausgetauscht und diesem in der jeweils entsprechenden Gruppe pro Ansatz 10 µl PBS bzw. oxLDL auf ein Gesamtvolumen von 500 µl zugegeben. In der oxLDL-Gruppe resultiert hieraus eine Gesamtkonzentration von

40 µg/ml oxLDL. Es folgte eine Inkubationsperiode von 48 Stunden. Nach Ablauf der 48 Stunden wurde mit einer Pipettenspitze unter Zuhilfenahme eines Lineals ein „Scratch“ in jedem Zellkultur-Well gezogen, also ein Streifen definierter Breite von adhärenen Zellen befreit. Daraufhin wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um Debris und losgelöste Zellen zu entfernen. Anschließend wurde Vollmedium zugegeben um die Migration zu starten. Zu den Zeitpunkten Null (A_0) und 24 Stunden (A_1) nach Starten der Migration wurden phasenkontrastmikroskopische Bilder aufgenommen. Mit Hilfe der Software FIJI wurden alle Bilder auf dieselbe Größe zugeschnitten. Die weitere Auswertung erfolgte mit der Software CellProfiler (Carpenter et al., 2006), wobei automatisiert die von Zellen bedeckte Fläche jedes Bildes abgegrenzt und quantifiziert wurde. SMC werden aufgrund ihrer elongierten Morphologie von den verfügbaren Standard-Werkzeugen der Software CellProfiler ungenau abgegrenzt. Aus diesem Grund wurde eine spezielle „Pipeline“ erstellt. Diese ist im Detail dem Anhang dieser Arbeit zu entnehmen, ihr grundsätzlicher Aufbau ist folgender:

1. *CorrectIlluminationCalculate*
2. *CorrectIlluminationApply*
3. *Enhance Edges*
4. *Smooth*
5. *Crop*
6. *IdentifyPrimaryObjects*
7. *MeasureImageAreaOccupied*
8. *ExportToSpreadsheet*

Die Ergebnisse wurden im Format „txt“ gespeichert und in Microsoft Excel® importiert. Es wurde der prozentuale Verschluss der freien Fläche nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{-Verschluss} = (A_0 - A_1) / A_0$$

wobei A die freie Fläche unmittelbar nach Ziehen des „scratch“ (A_0) bzw. nach 24 Stunden (A_1) ist.

2.2.11 Quantifizierung der zellulären Proliferation

Die Quantifizierung zellulärer Proliferation erfolgte mittels des CyQUANT® NF Cell Proliferation Assay Kits (Thermo Fisher Scientific). Dieses basiert auf der Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts unter Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffs, welcher zelluläre DNA bindet und hierdurch seine Fluoreszenzeigenschaften verändert (Johnson, 2010; Molecular Probes Inc., 2006). Es wurde, in Einklang mit den Herstellerempfehlungen, gemäß des folgenden Protokolls vorgegangen:

1. Aussäen von HAoSMC
 - a. Aussäen von 1000 Zellen pro *Well*
 - b. Verwendung derselben Ausgangs-Zellsuspension für alle *Wells* eines Versuchs, um Unterschiede in der ausgesäten Zellzahl zu minimieren
 - c. Arbeiten mit zwölffachen technischen Replikaten, um durch diese hohe Anzahl das Risiko eines Bias durch Schwankungen der ausgesäten Zellzahl weiter zu verringern

Verwendung für die Fluorometrie geeigneter 96-*Well*-Zellkulturplatten (lichtundurchlässig, flacher Boden; Microplate, 96 Well, F-Bottom (Chimney Well), Black, Fluotrac, high binding, sterile, Produktnummer 655 077, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AT)

2. Zeitgleich mit Aussäen „reverse“ Transfektion mit anti-*ADAMTS7*- bzw. *scramble*-siRNA. Somit entfällt ein weiterer Schritt mit dem Potential die Zellzahl zu beeinflussen und es wird eine sinnvolle Inkubationszeit bzgl. des *ADAMTS7-Knockdown* erreicht.
3. Inkubation für 48 Stunden
4. Anwendung des Kits nach Herstellerprotokoll (Molecular Probes Inc., 2006)
5. Fluorometrische Messung unter Verwendung eines *Multiplate-Readers* („Infinite® M200 PRO“, Tecan) mit folgenden Einstellungen (**Tabelle 17**):

Tabelle 17: Einstellungen Infinite® M200 PRO bei Proliferations-Analyse.

Mode	Fluorescence Top Reading
Multiple Reads per Well (Square (filled))	4 x 4
Multiple Reads per Well (Border)	750 µm
Excitation Wavelength	485 nm
Emission Wavelength	530 nm
Excitation Bandwidth	9 nm
Emission Bandwidth	20 nm

6. Auswertung als relative Proliferation

$$\ln(\text{Fluoreszenz}_{\text{anti-ADAMTS7-siRNA}}) / \ln(\text{Fluoreszenz}_{\text{scramble-siRNA}})$$

Dies ergibt sich folgendermaßen: Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur Menge an zellulärer DNA und damit zur Zellzahl. Aufgrund des exponentiellen Zusammenhangs zwischen Zellzahl und der Anzahl von Zellverdopplungszyklen ($N_1 = N_0 \cdot 2^n$ mit N = Zellzahl je zum Zeitpunkt 0 oder 1 und n = Anzahl der Verdopplungszyklen) besteht ein linearer Zusammenhang zwischen $\ln(N_1)$ und n und dementsprechend auch zwischen $\ln(N_1)_{Knockdown} / \ln(N_1)_{Kontrolle}$ und $n_{Knockdown} / n_{Kontrolle}$. Da N_1 proportional der gemessenen Fluoreszenz entspricht, ist das Verhältnis der logarithmierten Fluoreszenzwerte proportional zum Verhältnis der jeweiligen Anzahl von Zellverdopplungszyklen.

2.2.12 Evaluation von anti-ADAMTS-7-Antikörpern im Western Blot

Es wurden kommerziell erhältliche anti-ADAMTS-7-Antikörper im Western Blot an humanem und murinem Material getestet. Für die murinen Proben wurde jeweils Material zweier Tiere zusammengefasst. HAoSMC wurden in Vollmedium kultiviert, für zwei Tage vor Ernte wurde kein Mediumwechsel durchgeführt. Es wurden der Überstand abpipettiert und die Zellen zur Proteinisolation geerntet. Für die Positivkontrolle wurden HEK293-Zellen mit dem Plasmid *DEST40-ADAMTS7_FL_WT-V5-His* transfiziert. Es wurden für jeden Antikörper dieselben Protein-Isolate verwendet und dabei immer das gleiche Volumen einer Probe eingesetzt. Zur Belegung der Gel-Taschen und den jeweils eingesetzten Volumina der Protein-Isolate siehe **Tabelle 18**. Für die Verdünnung der Antikörper siehe **Tabelle 11**.

Tabelle 18: Western Blot zur Prüfung kommerziell-erhältlicher anti-ADAMTS-7-Antikörper, Belegung der Spalten.

Abkürzungen: +/- bzw. -/- bedeutet homozygot für das *Adamts7*-Wildtyp bzw. -*Knockout*-Allel. ÜS: Überstand; Vol. = Volumen; Lsg. = Lösung; HEK: HEK293-Zellen.

Position	1	2	3	4	5	6	7	8
Probe	Aorta, murin +/+	Aorta, murin -/-	Herz, murin +/+	Herz, murin -/-	HAo-SMC, Lysat	HAo-SMC ÜS	HEK, Lysat	HEK, Positivkontrolle
Vol. Protein-Lsg. (μ l)	15	15	3	3	30	20	20	10

2.2.13 Evaluation von anti-ADAMTS-7-Antikörpern in der Immunzytochemie

Kommerziell verfügbare anti-ADAMTS-7-Antikörper wurden in der Immunzytochemie an HAoSMC getestet, welche mit *DEST40-ADAMTS7_FL_WT-V5-His* bzw. mit *pUC19* transfiziert wurden. Jeder *Well* beider Ansätze wurde mit dem jeweiligen anti-ADAMTS-7-Antikörper sowie einem anti-V5-Antikörper als Primärantikörper inkubiert. Die beiden Antikörper wurden dabei gleichzeitig aufgebracht. Es kamen in der Maus sowie im Kaninchen produzierte anti-V5-Antikörper zur Verwendung, immer in Kombination mit einem anti-ADAMTS-7-Antikörper aus der jeweils anderen Spezies. I. e. für Abnova H00011173-A01 Kaninchen-anti-V5, für die restlichen anti-ADAMTS-7-Antikörper Maus-anti-V5. Entsprechend wurde jeder *Well* beider Ansätze mit anti-Kaninchen- und anti-Maus-Sekundärantikörpern behandelt, welche ebenfalls gleichzeitig aufgebracht wurden. Somit war in der Fluoreszenzmikroskopie, durch sequentielle Verwendung von monochromatischem Licht zweier unterschiedlicher Wellenlängen, eine Unterscheidung von endogenem und rekombinantem ADAMTS-7 möglich, da nur letzteres die V5-Markierung aufweist. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. Es wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen erstellt, wobei von jedem Ausschnitt drei Bilder aufgenommen wurden, je eines pro Wellenlänge. Aus diesen drei Fotografien eines Ausschnitts wurde zudem ein *Overlay*-Bild erstellt. Die Kamera-Parameter waren, bei gleicher Wellenlänge und Vergrößerung, für die Aufnahmen eines *ADAMTS7-V5*-transfizierten und des zugehörigen, *pUC19*-transfizierten Ansatzes identisch.

2.2.14 Behandlung von HAoSMC mit oxLDL

HAoSMC wurden nach folgender Vorgehensweise mit oxLDL behandelt: Nach Aussäen auf Standard-Zellkulturplatten (24-*Well* für qPCR und 6-*Well* für Western Blot sowie für die mikroskopische Beurteilung) wurden die Zellen bis zur Subkonfluenz (ca. 80 %) in Vollmedium und anschließend für 48 Stunden in FKS- und Hormon-freiem Basalmedium kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde ein Austausch des Mediums, erneut gegen FKS- und Hormon-freies Zellkulturmedium, durchgeführt und oxLDL in einer Endkonzentration von 40 µg/ml appliziert. Die HAoSMC wurden für 48 Stunden mit oxLDL inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen, nach

dreimaligem Waschen mit PBS um tote Zellen und Debris zu entfernen, unter dem Auflichtmikroskop fotografiert, geerntet oder es wurde mit dem jeweiligen Assay fortgeföhren.

2.2.15 Behandlung von HAoSMC mit Cholesterol

HAoSMC wurden, analog zu oxLDL, mit freiem Cholesterol inkubiert. Aufgrund seiner schlechten Wasserlöslichkeit wurde es im Komplex mit Methyl- β -Cyclodextrin (Chol:M β CD) verwendet. Die Angaben zu Masse bzw. Konzentration im Folgenden beziehen sich dabei immer auf Cholesterol. HAoSMC wurden auf Standard-24-Well-Zellkulturplatten ausgesät und bis zur Subkonfluenz (ca. 80 %) kultiviert. Dann wurde das Medium gegen FKS- und Hormon-freies Basalmedium ausgetauscht und die Zellen für 48 Stunden inkubiert. Verbunden mit erneutem Austausch des Zellkulturmediums gegen Basalmedium wurde sodann Chol:M β CD in der resultierenden Endkonzentration 20 μ g/ml Cholesterol zugegeben. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die HAoSMC geerntet.

2.2.16 Korrelation zwischen LDL-C-GRS und ADAMTS7-assoziiertem KHK-

Risiko

Es wurden auf Grundlage der Publikation von Teslovich et al. (Nature, 2010) die in **Tabelle 19** aufgelisteten genetischen Varianten ausgewählt, welche signifikant mit dem Lipid-Phänotyp assoziiert sind. Unter Verwendung von Daten aus den GWAS GerMIFS I-V und LURIC (Deloukas et al., 2013; Jeanette Erdmann et al., 2009; Jeanette Erdmann et al., 2011; Grammer et al., 2011; Löwel et al., 2005; Nikpay et al., 2015; Samani et al., 2007; Schunkert et al., 2011) wurde von Dr. Lingyao Zeng ein genetischer LDL-C-Risiko-Score (GRS) berechnet. Nach Einteilung in Quintilen nach dem LDL-C-GRS wurde durch Dr. Lingyao Zeng die Assoziation von *ADAMTS7* mit der KHK berechnet, wobei die Daten der einzelnen Studien metaanalysiert wurden.

Tabelle 19: Genetische Varianten, die in den LDL-C-GRS eingingen. Nach (Teslovich et al., 2010). Falls mehrere Lipide signifikant mit einem SNP assoziiert sind, ist unter Phänotyp dasjenige mit dem niedrigsten p-Wert angegeben. Abkürzungen: SNP = single nucleotide polymorphism; Chr. = Chromosom; Pos. = Position; n.b. = nicht bekannt; hdl = high density lipoprotein; ldl = low density lipoprotein; tc = Gesamt-Cholesterol; tg = Triglyzeride.

Phäno- -typ	SNP	Chr.	Pos.	Gen	Risiko- -allel	Nicht- risiko- -allel	Risiko- -allel- -frequenz	Effekt Risiko- -allel	p
hdl	rs4660293	1	4002818 0	<i>PABP C4</i>	A	G	0,77	0,48	4,00 E-10
hdl	rs1689800	1	1821688 85	<i>ZNF6 48</i>	A	G	0,65	0,47	3,00 E-10
hdl	rs4846914	1	2302956 91	<i>GAL NT2</i>	A	G	0,6	0,61	4,00 E-21
hdl	rs1232867 5	2	1655408 00	<i>n.b.</i>	C	T	0,13	0,68	3,00 E-10
hdl	rs2972146	2	2271006 98	<i>IRS1</i>	G	T	0,37	0,46	3,00 E-09
hdl	rs1310732 5	4	1031887 09	<i>SLC3 9A8</i>	C	T	0,93	0,84	7,00 E-11
hdl	rs6450176	5	5329802 5	<i>ARL1 5</i>	G	A	0,74	0,49	5,00 E-08
hdl	rs2814944	6	3455279 7	<i>C6orf 106</i>	G	A	0,84	0,49	4,00 E-09
hdl	rs605066	6	1398296 66	<i>CITE D2</i>	T	C	0,58	0,39	3,00 E-08
hdl	rs4731702	7	1304333 84	<i>KLF1 4</i>	T	C	0,48	0,59	1,00 E-15
hdl	rs9987289	8	9183358	<i>PPP1 R3B</i>	G	A	0,91	1,21	6,00 E-25
hdl	rs2293889	8	1165991 99	<i>TRPS 1</i>	G	T	0,59	0,44	6,00 E-11
hdl	rs581080	9	1530537 8	<i>TTC3 9B</i>	C	G	0,82	0,65	3,00 E+1 2
hdl	rs1883025	9	1076643 01	<i>ABCA 1</i>	C	T	0,75	0,94	2,00 E-33
hdl	rs2923084	11	1038878 2	<i>AMP D3</i>	A	G	0,83	0,41	5,00 E-08
hdl	rs3136441	11	4674324 7	<i>LRP4</i>	C	T	0,15	0,78	3,00 E-18
hdl	rs7134375	12	2047375 8	<i>PDE3 A</i>	A	C	0,42	0,4	4,00 E-08
hdl	rs7134594	12	1100001 93	<i>MVK</i>	T	C	0,53	0,44	7,00 E-15
hdl	rs4759375	12	1237962 38	<i>SBN O1</i>	T	C	0,06	0,86	7,00 E-09
hdl	rs4765127	12	1244601 67	<i>ZNF6 64</i>	T	G	0,34	0,44	3,00 E-10
hdl	rs838880	12	1252615 93	<i>SCAR B1</i>	C	T	0,31	0,61	3,00 E-14
hdl	rs1532085	15	5868336 6	<i>LIPC</i>	A	G	0,39	1,45	3,00 E-96

hdl	rs2652834	15	6339686 7	LACT B	G	A	0,8	0,39	9,00 E-09
hdl	rs3764261	16	5699332 4	CETP	A	C	0,32	3,39	0
hdl	rs1694288 7	16	6792804 2	LCAT	A	G	0,12	1,27	8,00 E-33
hdl	rs2925979	16	8153479 0	CMIP	C	T	0,7	0,45	2,00 E-11
hdl	rs1186928 6	17	3781385 6	STAR D3	C	G	0,66	0,48	1,00 E-13
hdl	rs4148008	17	6687529 4	ABCA 8	C	G	0,68	0,42	2,00 E-10
hdl	rs4129767	17	7640398 4	PGS1	A	G	0,51	0,39	8,00 E-09
hdl	rs7241918	18	4716095 3	LIPG	T	G	0,83	1,31	3,00 E-49
hdl	rs1296713 5	18	5784902 3	MC4 R	G	A	0,77	0,42	7,00 E-09
hdl	rs7255436	19	8433196	ANG PTL4	A	C	0,53	0,45	3,00 E-08
hdl	rs737337	19	1134749 3	LOC5 5908	T	C	0,92	0,64	3,00 E-09
hdl	rs386000	19	5479276 1	LILRA 3	C	G	0,2	0,83	4,00 E-16
hdl	rs1800961	20	4304236 4	HNF4 A	C	T	0,97	1,88	1,00 E-15
hdl	rs6065906	20	4455401 5	PLTP	T	C	0,82	0,93	2,00 E-22
hdl	rs181362	22	2193206 8	UBE2 L3	C	T	0,8	0,46	1,00 E-08
ldl	rs2479409	1	5550465 0	PCSK 9	G	A	0,3	2,01	2,00 E-28
ldl	rs629301	1	1098183 06	SORT 1	T	G	0,78	5,65	1,00 E- 170
ldl	rs1367117	2	2126390 0	APO B	A	G	0,3	4,05	4,00 E- 114
ldl	rs4299376	2	4407257 6	ABC G5/8	G	T	0,3	2,75	2,00 E-47
ldl	rs3757354	6	1612740 7	MYLI P	C	T	0,78	1,43	1,00 E-11
ldl	rs1800562	6	2609314 1	HFE	G	A	0,94	2,22	6,00 E-10
ldl	rs1564348	6	1605788 60	LPA	T	C	0,83	0,56	2,00 E-17
ldl	rs1113634 1	8	1450435 43	PLEC 1	G	A	0,4	1,4	4,00 E-13
ldl	rs1122046 2	11	1262439 52	ST3G AL4	A	G	0,14	1,95	1,00 E-15
ldl	rs8017377	14	2488388 7	NYN RIN	A	G	0,47	1,14	5,00 E-11

ldl	rs7206971	17	4542511 5	<i>OSBP L7</i>	A	G	0,49	0,78	2,00 E-08
ldl	rs6511720	19	1120230 6	<i>LDLR</i>	G	T	0,89	6,99	4,00 E- 117
ldl	rs4420638	19	4542294 6	<i>APOE</i>	G	A	0,17	7,14	9,00 E- 147
ldl	rs6029526	20	3967261 8	<i>TOP1</i>	A	T	0,47	1,39	4,00 E-19
tc	rs1202713 5	1	2577573 3	<i>LDLR AP1</i>	T	A	0,55	1,22	4,00 E-11
tc	rs7515577	1	9300943 8	<i>EVI5</i>	A	C	0,79	1,18	3,00 E-08
tc	rs2642442	1	2209735 63	<i>MOS C1</i>	T	C	0,68	1,39	6,00 E-13
tc	rs514230	1	2348585 97	<i>IRF2 BP2</i>	T	A	0,52	1,36	5,00 E-14
tc	rs7570971	2	1358379 06	<i>RAB3 GAP1</i>	A	C	0,34	1,25	2,00 E-08
tc	rs2290159	3	1262892 0	<i>RAF1</i>	G	C	0,78	1,42	4,00 E-09
tc	rs12916	5	7465653 9	<i>HMG CR</i>	C	T	0,39	2,84	9,00 E-47
tc	rs6882076	5	1563902 97	<i>TIMD 4</i>	C	T	0,65	1,98	7,00 E-28
tc	rs2814982	6	3454656 0	<i>n.b.</i>	C	T	0,89	1,86	5,00 E-11
tc	rs9488822	6	1163128 93	<i>FRK</i>	A	T	0,65	1,18	2,00 E-10
tc	rs1267079 8	7	2160735 2	<i>DNA H11</i>	C	T	0,23	1,43	9,00 E-10
tc	rs2072183	7	4457918 0	<i>NPC1 L1</i>	C	G	0,25	2,01	3,00 E-11
tc	rs2081687	8	5938856 5	<i>CYP7 A1</i>	T	C	0,35	1,23	2,00 E-22
tc	rs2737229	8	1166485 65	<i>n.b.</i>	A	C	0,7	1,11	2,00 E-08
tc	rs2255141	10	1139338 86	<i>GPA M</i>	A	G	0,3	1,14	2,00 E-10
tc	rs1012871 1	11	1863298 4	<i>SPTY 2D1</i>	C	T	0,72	1,04	3,00 E-08
tc	rs7941030	11	1225223 75	<i>UBAS H3B</i>	C	T	0,38	0,97	2,00 E-10
tc	rs1106598 7	12	1120724 24	<i>BRAP</i>	A	G	0,58	0,96	7,00 E-12
tc	rs1169288	12	1214166 50	<i>HNF1 A</i>	C	A	0,33	1,42	1,00 E-14
tc	rs2000999	16	7210809 3	<i>HPR</i>	A	G	0,2	2,34	3,00 E-24
tc	rs1040196 9	19	1940771 8	<i>CILP2</i>	T	C	0,93	4,74	3,00 E-38

tc	rs492602	19	4920641 7	<i>FLJ36 070</i>	G	A	0,49	1,27	2,00 E-10
tc	rs2277862	20	3415278 2	<i>ERGI C3</i>	C	T	0,85	1,19	4,00 E-10
tc	rs2902940	20	3909148 7	<i>MAF B</i>	A	G	0,71	1,38	6,00 E-11
tg	rs2131925	1	6302594 2	<i>ANG PTL3</i>	T	G	0,68	4,94	9,00 E-43
tg	rs1042034	2	2122528 1	<i>n.b.</i>	T	C	0,78	5,99	1,00 E-45
tg	rs1260326	2	2773094 0	<i>GCKR</i>	T	C	0,41	8,76	6,00 E- 133
tg	rs1019525 2	2	1655130 91	<i>COBL L1</i>	T	C	0,6	2,01	2,00 E-10
tg	rs645040	3	1359266 22	<i>MSL2 L1</i>	T	G	0,78	2,22	3,00 E-08
tg	rs442177	4	8803026 1	<i>KLHL 8</i>	T	G	0,59	2,25	9,00 E-12
tg	rs9686661	5	5586178 6	<i>MAP 3K1</i>	T	C	0,2	2,57	1,00 E-10
tg	rs1323820 3	7	7212966 7	<i>TYW 1B</i>	C	T	0,96	7,91	1,00 E-09
tg	rs1714573 8	7	7298287 4	<i>MLXI PL</i>	C	T	0,88	9,32	6,00 E-58
tg	rs1177676 7	8	1068392 9	<i>PINX 1</i>	C	G	0,37	2,01	1,00 E-08
tg	rs1495741	8	1827288 1	<i>NAT2</i>	G	A	0,22	2,85	5,00 E-14
tg	rs1267891 9	8	1984422 2	<i>LPL</i>	A	G	0,88	13,64	2,00 E- 115
tg	rs2954029	8	1264909 72	<i>TRIB 1</i>	A	T	0,53	5,64	3,00 E-55
tg	rs1076173 1	10	6502761 0	<i>JMJD 1C</i>	A	T	0,57	2,38	3,00 E-12
tg	rs2068888	10	9483964 2	<i>CYP2 6A1</i>	G	A	0,54	2,28	2,00 E-08
tg	rs174546	11	6156983 0	<i>FADS 1-2-3</i>	T	C	0,34	3,82	5,00 E-24
tg	rs964184	11	1166489 17	<i>APO A1</i>	G	C	0,13	16,95	7,00 E- 240
tg	rs1161335 2	12	5779258 0	<i>LRP1</i>	C	T	0,77	2,7	4,00 E-10
tg	rs2412710	15	4268378 7	<i>CAP N3</i>	A	G	0,02	7	2,00 E-08
tg	rs2929282	15	4424593 1	<i>FRM D5</i>	T	A	0,05	5,13	2,00 E-11
tg	rs1164965 3	16	3091848 7	<i>CTF1</i>	C	G	0,6	2,13	3,00 E-08
tg	rs439401	19	4541445 1	<i>n.b.</i>	C	T	0,64	5,5	1,00 E-30

tg	rs5756931	22	3854603 3	PLA2 G6	T	C	0,6	1,54	4,00 E-08
----	-----------	----	--------------	------------	---	---	-----	------	--------------

2.2.17 Behandlung von HAoSMC mit Rosiglitazon

Es wurden HAoSMC mit Rosiglitazon behandelt und anschließend ihre ADAMTS7-Expression quantifiziert. Hierzu wurden HAoSMC auf 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Bei Subkonfluenz wurde das Kulturmedium gegen FKS-freies Basalmedium ausgetauscht. Nach einer Inkubationsperiode von 48 Stunden wurde ein erneuter Austausch des Mediums, wiederum gegen FKS-freies Basalmedium, durchgeführt und in DMSO gelöstes Rosiglitazon, bzw. den Kontrollansätzen nur DMSO, zugegeben. Die resultierende Endkonzentration von Rosiglitazon betrug 0,01 µmol/ml. Dadurch wurden jedem Well, auf ein Gesamtvolumen von 500 µl, 0,5 µl des Lösungsmittels DMSO zugegeben. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die HAoSMC geerntet und es wurde RNA isoliert, diese revers transkribiert und mittels qPCR die ADAMTS7-cDNA je Ansatz quantifiziert.

2.2.18 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism® (Version 7.03; GraphPad Software, Inc, La Jolla, US). Für jeden Versuch wurden mindestens drei unabhängige Wiederholungen (biologische Replikate) durchgeführt. Wenn mehrere technische Replikate zur Anwendung kamen, floss deren Mittelwert in die statistische Auswertung ein. Ausreißer wurden von der statistischen Auswertung ausgenommen. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert mit dem Standardfehler. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurden zweiseitige t-Tests verwendet. $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Wenn die relative Veränderung bezüglich der Kontrolle von Interesse war, wurde der „behandelte“ Ansatz ins Verhältnis zu der Kontrolle gesetzt. Bei den Migrations-Assays und bei der morphologischen Analyse wurde t-Tests für verbundene Stichproben durchgeführt, da Zellen mehrerer Spender verwendet wurden. Bei den restlichen Experimenten wurden Einstichproben-t-Tests angewandt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur Detektion von ADAMTS-7

Eine zuverlässige Detektion von ADAMTS-7 auf Proteinebene ist bisher nicht möglich. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, eine strukturierte Untersuchung kommerziell erhältlicher anti-ADAMTS-7-Antikörper durchzuführen. Um unspezifische Signale zu minimieren, wurden zunächst ein spezifischer *Knockdown* und die Überexpression von *ADAMTS7* in HEK 293-Zellen und humanen aortalen glatten Gefäßmuskelzellen (HAoSMC) etabliert. Anschließend wurden die Antikörper nach einem standardisierten Protokoll im Western Blot und in der Immunzytochemie evaluiert.

3.1.1 Etablierung des *ADAMTS7-Knockdowns* mittels RNA-Interferenz in

HAoSMC

Eine Voraussetzung für die systematische Evaluation der anti-ADAMTS-7-Antikörper, wie auch für folgende funktionelle Untersuchungen, war die Etablierung eines spezifischen *Knockdowns* von *ADAMTS7* in HAoSMC. Hierzu wurde die endogene *ADAMTS7*-Expression nach Transfektion mit drei anti-*ADAMTS7*-siRNAs nach drei Inkubationszeiträumen (24, 48 und 72 Stunden) untersucht. Zum Vergleich wurden HAoSMC mit einer Kontroll-siRNA (siRNA_{scramble}) transfiziert. Die *ADAMTS7*-Expression wurde mittels qPCR quantifiziert.

In **Abbildung 3** ist die *ADAMTS7*-Expression nach Transfektion der drei siRNAs zu den drei Zeitpunkten dargestellt. Alle siRNAs führten zu einer signifikanten Reduktion der endogenen *ADAMTS7*-Expression nach 48 Stunden (Mittelwert \pm Standardfehler; s22050: $13,8 \pm 5,0$ %, $p < 0,0001$; s22051: $29,2 \pm 6,6$ %, $p = 0,0004$; s22052: $29,0 \pm 10,5$ %, $p = 0,003$) und 72 Stunden (s22050: $22,5 \pm 6,3$ %, $p = 0,0002$; s22051: $19,5 \pm 6,8$ %, $p = 0,0003$; s22052: $20,8 \pm 5,7$ %, $p = 0,0002$). Für die siRNAs s22051 und s22052 war bereits nach 24 Stunden eine signifikante Reduktion der *ADAMTS7*-Expression nachweisbar (s22051: $51,9 \pm 7,8$ %, $p = 0,004$; s22052: $30,3 \pm 2,8$ %, $p < 0,0001$), nicht jedoch bei siRNA s22050 (s22050: $84,5 \pm 28,0$ %, $p = 0,611$). Da die

ADAMTS7-Expression nach Transfektion mit siRNA s22052 zu allen drei getesteten Zeitpunkten reduziert war und sie nach 24 Stunden den stärksten Effekt bewirkte, wurde siRNA s22052 für die folgenden Versuche ausgewählt.

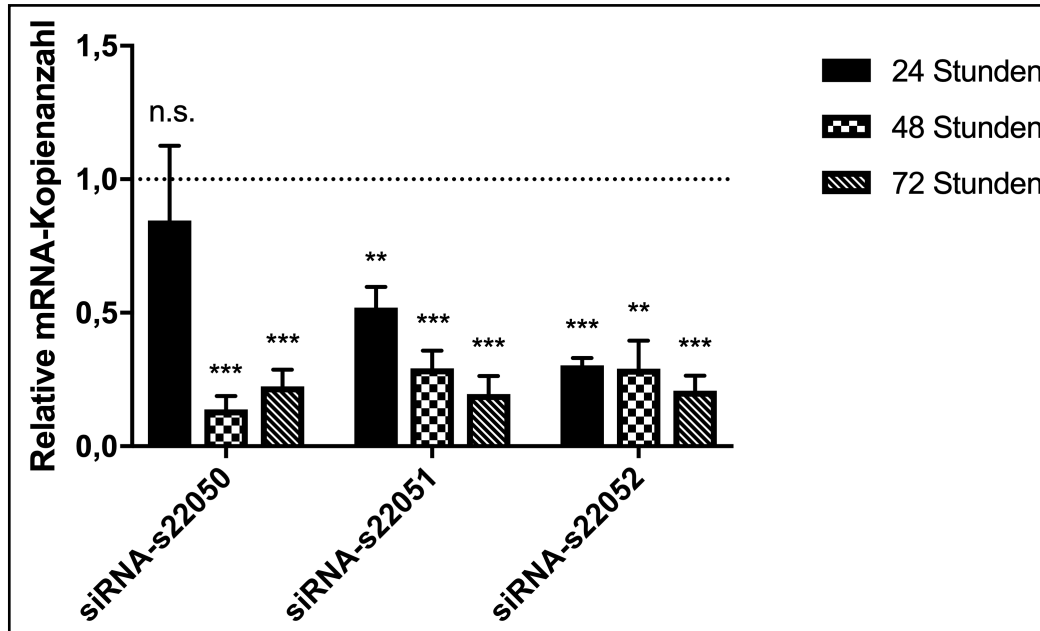


Abbildung 3: *ADAMTS7*-Expression in HAoSMC nach Transfektion mit spezifischer anti-*ADAMTS7*-siRNA und Inkubation für 24, 48 oder 72 Stunden.

Die Graphik zeigt Mittelwerte \pm Standardfehler der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte im Vergleich zur Kontrolle (siRNA_{scramble}); n = 5 Versuche. Abkürzungen: n.s. = nicht signifikant; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

3.1.2 Etablierung der *ADAMTS7*-Überexpression in HEK293-Zellen und HAoSMC

Neben der Reduktion der *ADAMTS7*-Expression, und damit der *ADAMTS7*-Proteinmenge, ist der Nachweis einer steigenden Proteinmenge eine Möglichkeit, in der Evaluation von Antikörpern unspezifische Signale auszuschließen. *ADAMTS7* wurde unter Verwendung eines Expressionskonstrukts, welches die *ADAMTS7* Vollängen-Sequenz enthält (*pDEST40-ADAMTS7-V5-His*), in HAoSMC und HEK293-Zellen überexprimiert. *ADAMTS7* konnte in HEK 293-Zellen und HAoSMC durch den Nachweis des C-terminalen V5-His-Tags mittels eines anti-V5-Antikörpers im Western Blot detektiert werden.

Tabelle 20: Charakteristika der fünf getesteten anti-ADAMTS-7-Antikörper gemäß Herstellerangaben. Quellen sind die jeweiligen Datenblätter der Antikörper (Abcam, abgerufen 15.06.2017a, abgerufen 15.06.2017b; Abnova, abgerufen 04.02.2018; Santa Cruz Biotechnology, abgerufen 24.06.2017) bzw. die online vom Hersteller zur Verfügung gestellten Informationen (Sigma Aldrich, abgerufen 15.06.2017). Grundlage der Zuordnung zu Domänen war die UniProt-Peptidsequenz von humanem ADAMTS-7 (UniProt Consortium, abgerufen 04.02.2018). AS. = Aminosäure; Empf. = empfohlene; WB = Western Blot; IHC = Immunhistochemie; IF = Immunfluoreszenz; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; TSR = Thrombospondin Type 1 Repeat; PLAC = Protease-und-Lacumin.

Bezeichnung	Hersteller	Klonalität	Organismus	Speziesreaktivität	Empf. Anwendung	Immungen (Domäne)
ab201083	Abcam	polyklonal	Kaninchen	Mensch, Maus, Ratte	WB	AS. 199 - 244 (Pro-Domäne) ²
ab45044	Abcam	polyklonal	Kaninchen	Mensch	WB	AS. 80 - 140 (Pro-Domäne)
HPA 045284	Sigma	polyklonal	Kaninchen	Mensch	IHC	AS. 116 - 160 (Pro-Domäne)
H0001117 3-A01	Abnova	polyklonal	Maus	Mensch	WB, ELISA	AS. 1589 - 1686 (TSR 8 und PLAC)
sc-163642	Santa Cruz	polyklonal	Ziege	Mensch, Maus, Ratte	WB, IF, ELISA	„a peptide mapping within an internal region of ADAMTS-7“ (Santa Cruz Biotechnology, abgerufen 24.06.2017)

Alle Antikörper wurden zunächst im Western Blot untersucht. Es wurden dabei jeweils acht Protein-Proben aufgetragen: 1. Murine Aorta, *Adamts7^{+/+}*; 2. Murine Aorta, *Adamts7^{-/-}*; 3. Murines Herz, *Adamts7^{+/+}*; 4. Murines Herz, *Adamts7^{-/-}*; 5. HAoSMC, Zellysat; 6. HAoSMC, Überstand; 7. HEK293, Zellysat, als Negativkontrolle; 8. HEK293, Zellysat von *ADAMTS7* ektop überexprimierenden Zellen, als Positivkontrolle.

Die Kriterien zur Beurteilung der im Western Blot getesteten anti-ADAMTS-7-Antikörper waren: (a) Erkennung der Positivkontrolle, (b) Erkennung von endogenem ADAMTS-7, insbesondere in HAoSMC, und (c) Spezifität. Repräsentative Western Blots sind in **Abbildung 5 A** dargestellt.

Der Antikörper ab201083 (Abcam) detektierte durch ektop Überexpression verstärkt produziertes ADAMTS-7, jedoch kein endogenes ADAMTS-7. Ebenso erkannte der

² Die Pro-Domäne von ADAMTS-7 reicht bis Aminosäure 236, mit Aminosäure 242 beginnt die Metalloproteinase-Domäne (Sequenz Q9UKP4-1) (UniProt Consortium abgerufen 04.02.2018).

Antikörper ab45044 (Abcam) durch ektope Überexpression verstärkt produziertes ADAMTS-7 aber kein endogenes ADAMTS-7. Darüber hinaus zeigte dieser Antikörper unspezifische Banden. Der Antikörper HPA 045284 (Sigma) detektierte eine spezifische Bande bei ca. 80 kDa in der Positivkontrolle, deren Herkunft unklar ist. Endogenes ADAMTS-7 wurde nicht detektiert. Der Antikörper H00011173-A01 (Abnova) detektierte eine Bande bei etwas mehr als 220 kDa, welche sowohl in der Positivkontrolle als auch in Zelllysaten von HAoSMC nachweisbar war. Eine korrespondierende Bande war auch bei Wildtyp- (*Adamts7^{+/+}*) sowie *Adamts7*-defizienten (*Adamts7^{-/-}*) Mäusen nachweisbar. Es könnte sich bei diesem Signal in den humanen Proben um endogenes ADAMTS-7 handeln. Die Tatsache, dass vergleichbare Banden sowohl bei *Adamts7^{+/+}* als auch bei *Adamts7^{-/-}* Mäusen nachweisbar war, spricht jedoch gegen ein Signal durch ADAMTS-7. Da der Antikörper nach Herstellerangaben nur humanes ADAMTS-7 detektiert, ist dies jedoch nicht sicher auszuschließen. Der Antikörper sc-163642 (Santa Cruz) detektierte weder endogenes noch durch ektope Überexpression verstärkt produziertes ADAMTS-7. In **Abbildung 5 B** ist den Western Blots die immunzytochemische Darstellung von ADAMTS-7 in HAoSMC mit dem jeweils selben Antikörper gegenübergestellt. Zur strukturierten Prüfung der anti-ADAMTS-7-Antikörper in der Immunzytochemie siehe Abschnitt 3.1.4.

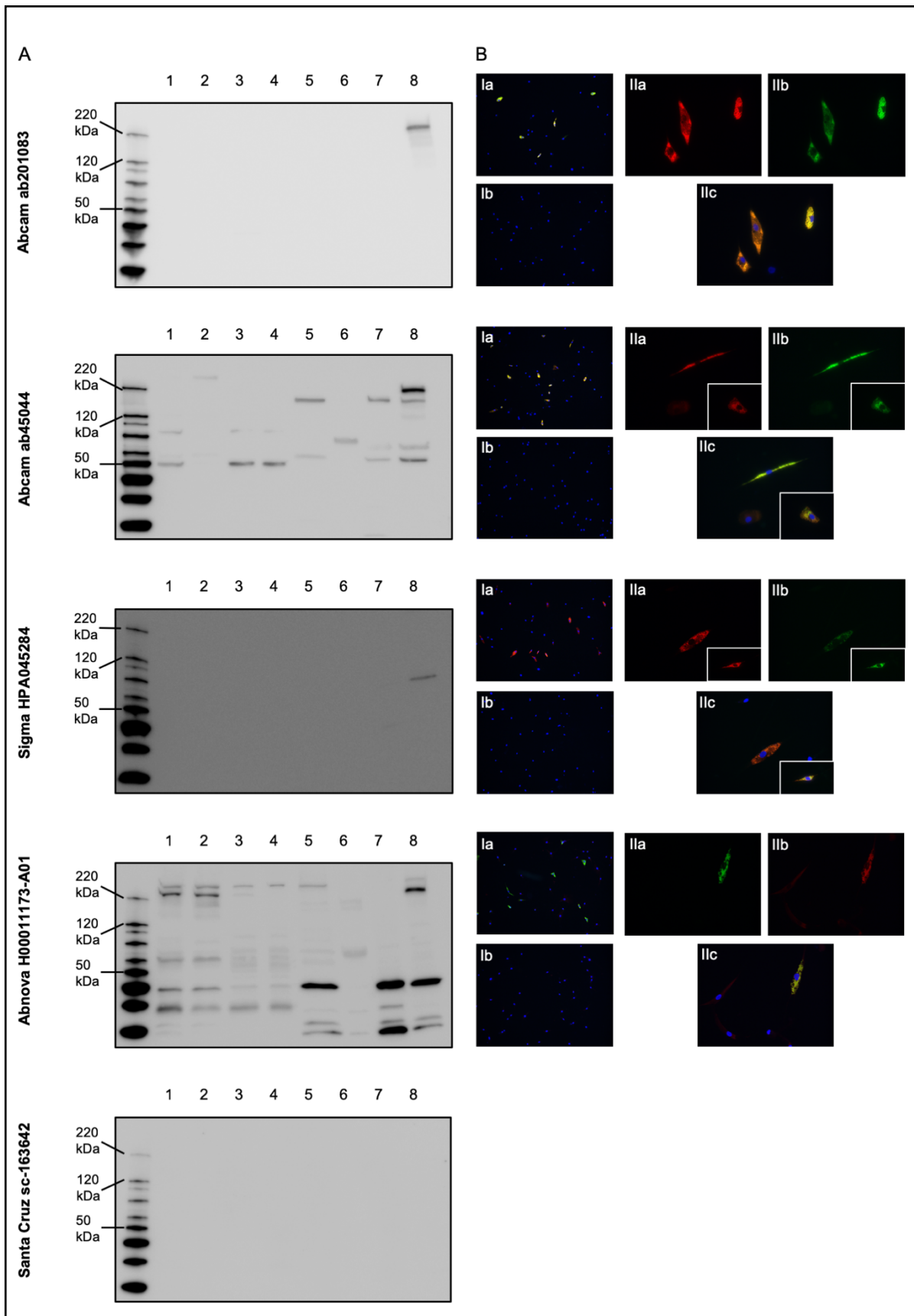


Abbildung 5: Prüfung von fünf kommerziell verfügbaren anti-ADAMTS-7-Antikörpern in Western Blot (A) und Immunzytochemie (B) hinsichtlich des Erkennens von rekombinantem und endogenem ADAMTS-7 sowie ihrer Spezifität.

(Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Fortsetzung der Legende zu Abbildung 5: A. Western Blots; Belegung der Spalten (vgl. Tabelle 18): 1: Aorta murin +/+; 2: Aorta murin -/-; 3: Herz murin +/+; 4: Herz murin -/-; 5: HAoSMC-Lysat; 6: HAoSMC-Überstand; 7: HEK293-Lysat; 8: Lysat *ADAMTS7*-überexprimierender HEK293-Zellen als Positivkontrolle. +/+ bzw. -/- bedeutet homozygot für das *Adamts7*-Wildtyp bzw. -*Knockout*-Allel. **B.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HAoSMC (Passage 9-11) nach Transfektion mit *DEST40-ADAMTS7-V5-His* (Ia, IIa-c) bzw. pUC19 (Ib); Ia: Übersicht, Overlay (anti-ADAMTS-7, anti-V5 und DAPI); Ib: Übersicht, Overlay (anti-ADAMTS-7, anti-V5 und DAPI); IIa: Anti-V5; IIb: anti-ADAMTS-7; IIc: Overlay (anti-ADAMTS-7, anti-V5 und DAPI).

Tabelle 21 fasst die Beurteilung der fünf untersuchten anti-ADAMTS-7-Antikörper anhand der oben genannten Kriterien zusammen.

Tabelle 21: Beurteilung von fünf kommerziell verfügbaren anti-ADAMTS-7-Antikörpern anhand der strukturierten Prüfung im Western Blot.

Antikörper	Erkennt Positivkontrolle	Erkennt endogenes ADAMTS-7	Spezifität
Abcam ab201083	+	-	+
Abcam ab45044	+	-	-
Sigma HPA045284	unklar	-	+
Abnova H00011173-A01	+	unklar	-
Santa Cruz sc-163642	-	-	nicht beurteilbar

Der Antikörper ab201083 (Abcam) erfüllte als einziger der getesteten Antikörper zwei der oben aufgelisteten Kriterien und wurde deshalb hinsichtlich der Erkennung von endogenem ADAMTS-7 in HAoSMC weiterführend untersucht. Es wurde geprüft, ob sich die bei *ADAMTS7*-Überexpression nachweisbare Bande in endogen *ADAMTS7* exprimierenden HAoSMC detektieren lässt und ob die Intensität dieser Bande nach *Knockdown* von *ADAMTS7* mittels RNA-Interferenz abnimmt.

Bei kurzer Belichtungszeit zeigte sich in der Positivkontrolle die aus dem Vorversuch bekannte Bande (**Abbildung 6 A**, Pfeil). Eine auf derselben Höhe liegende Bande war in der Spalte der endogen *ADAMTS7* exprimierenden HAoSMC nur angedeutet. Bei längerer Belichtungszeit und unter Abdeckung der Positivkontrolle zur Vermeidung von Überstrahlungsartefakten war sie jedoch deutlich zu erkennen (**Abbildung 6 B**, Pfeil). Diese Bande fehlte vollständig in den mit anti-*ADAMTS7*-siRNA transfizierten HAoSMC. Deutlich schwächer war sie in den unbehandelten HEK293-Zellen zu erkennen. Darüber hinaus waren mehrere Banden zu sehen, welche sich zwischen

Knockdown- und Kontroll-HAoSMC nicht unterschieden. Zusammenfassend detektierte der anti-ADAMTS-7-Antikörper ab201083 (Abcam) im Western Blot eine Bande bei etwa 220 kDa in *ADAMTS7*-überexprimierenden HEK293-Zellen und in siRNA_{scramble}-transfizierten HAoSMC. In *ADAMTS7-Knockdown*-HAoSMC war diese Bande nicht zu erkennen. Jedoch traten hier unspezifische Banden auf.

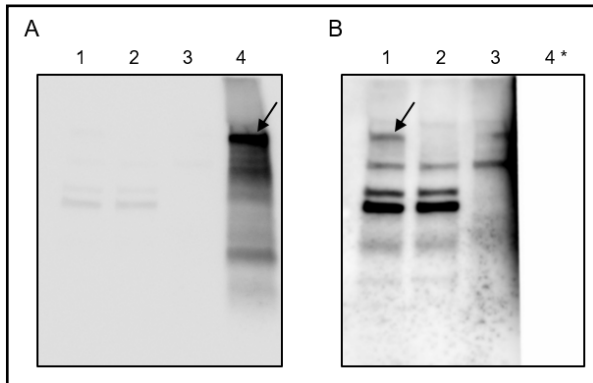


Abbildung 6: Darstellung von ADAMTS-7 mit dem Antikörper Abcam ab201083 im Western Blot.
 Belegung: 1) HAoSMC, transfiziert mit *scramble*-siRNA; 2) HAoSMC, transfiziert mit anti-*ADAMTS7*-siRNA; 3) HEK293; 4) HEK293, Überexpression von rekombinantem *ADAMTS7* (Positivkontrolle). Pfeil: a.e. ADAMTS-7 entsprechende Bande. **A.** Kurze Belichtungszeit (8 s), **B.** Lange Belichtungszeit (30 min); * Die Positivkontrolle wurde abgedeckt, um eine Überbelichtung und damit eine reduzierte Beurteilbarkeit der übrigen Banden zu vermeiden.

3.1.4 Strukturierte Analyse von fünf kommerziell verfügbaren anti-ADAMTS-7-Antikörpern in der Immunzytochemie

Die im Western Blot evaluierten anti-ADAMTS-7-Antikörper wurden auch in der Immunzytochemie nach einem standardisierten Protokoll getestet. Der Antikörper sc-163642 (Santa Cruz) detektierte im Western Blot durch ektope Überexpression verstärkt produziertes ADAMTS-7 nicht und wurde daher nicht weiter untersucht.

Die Untersuchungen wurden an HAoSMC durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten *ADAMTS7* ektope überexprimierende HAoSMC. Das Expressionskonstrukt enthielt die *ADAMTS7*-Vollängensequenz und einen *V5-His*-Tag. Infolge ektope Überexpression produziertes ADAMTS-7 konnte somit mittels eines anti-V5-Antikörpers nachgewiesen werden. Die verwendeten anti-V5-Antikörper stammen aus einer anderen Spezies als der jeweils untersuchte anti-ADAMTS-7-Antikörper. Es wurden speziesspezifische anti-Immunglobulin G-Sekundärantikörper verwendet, die sich in ihren Absorptions-

und Emissionsspektren unterscheiden. Nach Ko-Inkubation der HAoSMC mit anti-ADAMTS-7- und anti-V5-Antikörpern war deshalb eine Unterscheidung zwischen endogenem und infolge ektopter Überexpression produziertem ADAMTS-7 möglich (**Abbildung 5 B, I a und II a-c**). Um unspezifische Signale infolge der Transfektion der HAoSMC mit dem *ADAMTS7*-Expressionskonstrukt auszuschließen, wurden zusätzliche Ansätze mit HAoSMC angelegt. Diese wurden mit dem Klonierungsvektor pUC19 transfiziert. Die pUC19-transfizierten HAoSMC wurden mit anti-ADAMTS-7- und anti-V5-Antikörpern sowie den entsprechenden Sekundärantikörpern inkubiert (**Abbildung 5 B, I b**).

Zum Ausschluss unspezifischer Signale durch unselektive Bindung der anti-Immunglobulin G-Sekundärantikörper an zelluläre Strukturen wurden zusätzlich native HAoSMC ausschließlich mit Sekundärantikörpern inkubiert. Hier zeigte sich kein Signal (Anhang-Abbildung 1).

Die Kriterien zur Beurteilung der in der Immunzytochemie getesteten anti-ADAMTS-7-Antikörper waren: (a) Erkennung der Positivkontrolle, (b) Erkennung von endogenem ADAMTS-7 in HAoSMC und (c) Spezifität.

Alle vier untersuchten Antikörper detektierten durch ektope Überexpression vermehrt produziertes ADAMTS-7. Jedoch erkannten die Antikörper ab201083 (Abcam), ab45044 (Abcam) und HPA 045284 (Sigma) kein endogenes ADAMTS-7. Da diese Antikörper nicht effektiv transfizierte, V5-negative, sowie mit pUC19 transfizierte HAoSMC nicht zur Darstellung brachten, besteht kein Hinweis auf unspezifische Bindung der Antikörper. Der Antikörper H00011173-A01 (Abnova) zeigte ein schwaches Signal in *ADAMTS7* nicht ektopt überexprimierenden HAoSMC. Dieses Signal kann prinzipiell entweder auf endogenes ADAMTS-7 zurückzuführen oder Ausdruck einer unspezifischen Antikörper-Bindung sein.

Um zwischen Erkennung von endogenem ADAMTS-7 und einem unspezifischen Signal zu differenzieren, wurde der Antikörper H00011173-A01 (Abnova) zusätzlich an *ADAMTS7* vermindert exprimierenden HAoSMC mit konsekutiv verringertem ADAMTS-7-Proteingehalt als Negativkontrolle getestet. Die verminderte Expression wurde durch *ADAMTS7-Knockdown* mittels RNA-Interferenz erreicht. Zum Vergleich wurden mit Kontroll-siRNA (siRNA_{scramble}) transfizierte HAoSMC untersucht. Der Antikörper H00011173-A01 (Abnova) erbrachte sowohl an den mit siRNA_{scramble} transfizierten HAoSMC als auch an den *ADAMTS7* vermindert produzierenden HAoSMC ein gleichartiges Signal (**Abbildung 7**). Demzufolge ist davon auszugehen,

dass der Antikörper H00011173-A01 (Abnova) nicht spezifisch endogenes ADAMTS-7 detektiert, sondern unselektiv an zelluläre Strukturen von HAoSMC bindet.

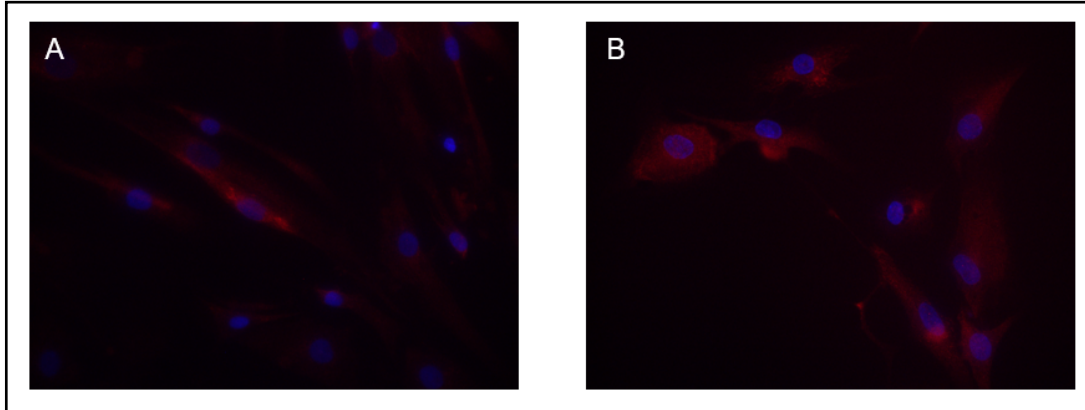


Abbildung 7: HAoSMC in Immunzytochemie mit dem anti-ADAMTS-7-Antikörper Abnova H00011173-A01 (rot). Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). HAoSMC in Passage 9. Einstellungen von Mikroskop und Kamera für beide Bilder identisch. **A.** *scramble*-siRNA. **B.** anti-ADAMTS7-siRNA.

Tabelle 22 fasst die Beurteilung der vier in der Immunzytochemie untersuchten anti-ADAMTS-7-Antikörper anhand der oben genannten Kriterien zusammen.

Tabelle 22: Beurteilung von fünf kommerziell verfügbaren anti-ADAMTS-7-Antikörpern anhand der strukturierten Prüfung in der Immunzytochemie.

Antikörper	Erkennt Positivkontrolle	Erkennt endogenes ADAMTS-7	Spezifität
Abcam ab201083	+	-	+
Abcam ab45044	+	-	+
Sigma HPA045284	+	-	+
Abnova H00011173-A01	+	-	-

In Zusammenschau der Ergebnisse stellte nur der Antikörper Abcam ab201083 in Western Blot und Immunzytochemie spezifisch infolge ektopter Überexpression vermehrt vorliegendes ADAMTS-7 dar. In einem modifizierten experimentellen Ansatz zeigte der Antikörper ab201083 (Abcam) ein mit endogenem ADAMTS-7 zu vereinbarendes Signal im Western Blot, welches bei *ADAMTS7-Knockdown* nicht

nachzuweisen war. Mit der Modifikation ging jedoch ein Verlust der Spezifität einher. Somit war zusammenfassend sowohl im Western Blot als auch in der Immunzytochemie mit keinem der untersuchten Antikörper ein spezifischer Nachweis von endogenem ADAMTS-7 möglich.

3.2 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von HAoSMC bei ADAMTS-7-Defizienz und unter proatherogenen Bedingungen

Bisherige Untersuchungen zur Funktion von ADAMTS-7 in VSMC basieren hauptsächlich auf einer artifiziellen Überexpression. Die Auswirkungen einer ADAMTS-7-Defizienz auf Funktion und Phänotyp von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) sind hingegen bislang nur unvollständig untersucht. Insbesondere liegen keine Daten hinsichtlich einer möglichen Verstärkung des promigratorischen Effekts von ADAMTS-7 auf VSMC unter proatherogenen Bedingungen vor. Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, ADAMTS-7-defiziente HAoSMC phänotypisch und funktionell zu charakterisieren. Die funktionelle Charakterisierung beinhaltete Untersuchungen der Zellmigration unter proatherogenen Bedingungen. Ein proatherogenes Umfeld wurde durch oxLDL-Exposition simuliert. Zum Nachweis einer effektiven Wirkung von oxLDL auf zellulärer Ebene erfolgte zunächst eine phänotypische Charakterisierung oxLDL-exponierter HAoSMC. Um in folgenden Versuchen eine Unterscheidung spezifischer Effekte von oxLDL von allgemeinen Auswirkungen einer VSMC-Dedifferenzierung zu ermöglichen, wurden zudem phänotypische Untersuchungen an HAoSMC unter dem Einfluss von Cholesteroll durchgeführt.

3.2.1 Phänotypische Charakterisierung von HAoSMC unter proatherogenen Bedingungen

3.2.1.1 Phänotypische Charakterisierung von HAoSMC unter dem Einfluss von oxLDL

Eine Voraussetzung für die Untersuchung der Auswirkungen von ADAMTS-7 auf die zelluläre Migrationsfähigkeit von HAoSMC unter dem proatherogenen Einfluss von oxLDL war der Nachweis der Wirksamkeit von oxLDL auf zellulärer Ebene. Deshalb wurde zunächst eine phänotypische Analyse oxLDL-exponierter HAoSMC durchgeführt. Hierzu wurden HAoSMC mit oxLDL inkubiert und anschließend die Expression des SMC-Differenzierungsmarkers *Myosin11* (*MYH11*) mittels qPCR quantifiziert. Zudem wurde im Western Blot der Proteingehalt von Myosin-11 sowie des SMC-Differenzierungsmarkers *alpha-Smooth Muscle Actin* (aSMA) bestimmt.

Die Inkubation mit oxLDL bewirkte in HAoSMC eine Verringerung der *MYH11*-Expression auf 67,7 % (Mittelwert; Standardfehler = 6,2 %; $p = 0,03$; **Abbildung 8**) im Vergleich zu den als Kontrolle in oxLDL-freiem Medium kultivierten HAoSMC. Auf Protein-Ebene war zu diesem Zeitpunkt noch keine statistisch signifikante Veränderung von Myosin-11 (Mittelwert \pm Standardfehler; $90,1 \pm 17,6$ %; $p = 0,63$) und aSMA ($104,5 \pm 12,6$ %; $p = 0,75$) nachzuweisen (**Abbildung 8**).

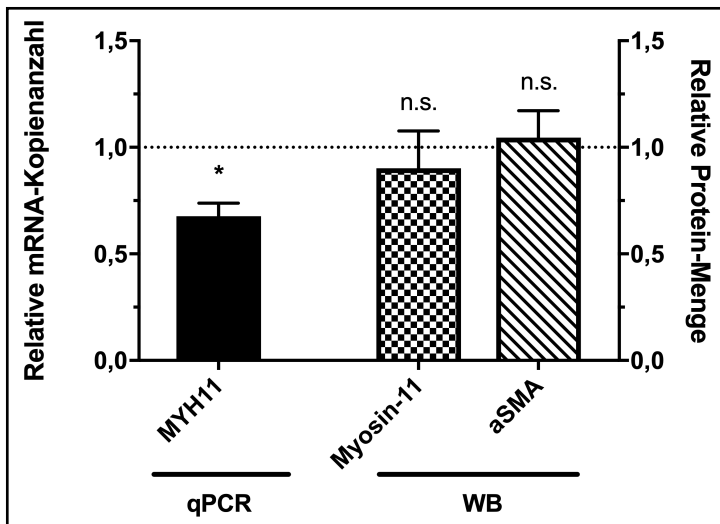


Abbildung 8: Differenzierungsmarker in HAoSMC nach Inkubation mit 40 µg/ml oxLDL für 48 Stunden.

Die Graphik zeigt Mittelwerte \pm Standardfehler der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte bzw. der im Western Blot bestimmten relativen Protein-Menge bezogen auf die nicht oxLDL-exponierte Kontrolle. $n = 3$ Versuche. MYH11 = Myosin heavy chain 11; Protein: Myosin-11; α SMA = alpha-Smooth Muscle Actin. Abkürzungen: WB = Western Blot; * $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant.

Dedifferenzierende VSMC verlieren typischerweise ihre elongierte Form. Zur Beurteilung ihres Phänotyps wurden daher oxLDL-exponierte HAoSMC auch morphometrisch analysiert. Dazu wurden softwaregestützt mikroskopisch die längere und kürzere Achse der Zellkörper der HAoSMC vermessen.

In jeder unabhängigen Versuchswiederholung wurden im Mittel je Ansatz 2245 (Standardfehler = 178) Zellen vermessen. Das mittlere Verhältnis von längerer zu kürzerer Achsenlänge war in mit oxLDL inkubierten HAoSMC geringer als ohne oxLDL-Exposition (Mittelwert \pm Standardfehler; oxLDL: $3,15 \pm 0,36$; Kontrolle: $4,56 \pm 0,46$; $p = 0,02$; **Abbildung 9 A**). Dies entspricht einer relativen Abrundung oxLDL-exponierter HAoSMC. Die Häufigkeitsverteilung des Verhältnisses der Zellachsen in einem exemplarischen Versuch ist in **Abbildung 9 B** dargestellt, **Abbildung 9 C** zeigt exemplarische mikroskopische Aufnahmen.

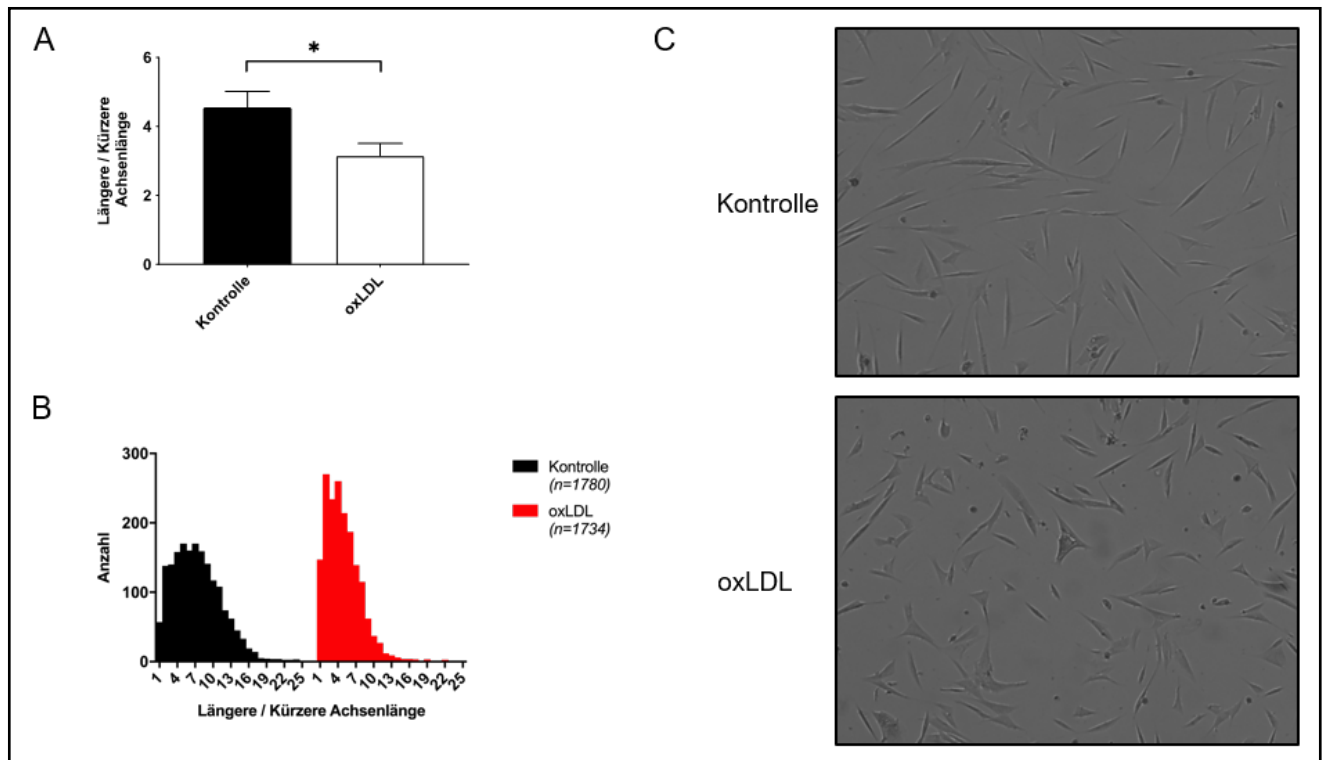


Abbildung 9: Morphologische Veränderung von HAoSMC durch Inkubation mit oxLDL (40 µg/ml) für 48 Stunden.

A. Verhältnis von längerer zu kürzerer zellulärer Achsenlänge; Mittelwerte \pm Standardfehler; $n = 4$ Versuche; $* p < 0,05$. **B.** Histogramm der Verhältnisse von längerer zu kürzerer zellulärer Achsenlänge je Einzelzelle; Daten aus einem exemplarischen Versuch; $n =$ Anzahl analysierter Zellen. **C.** Beispielhafte auflichtmikroskopische Bildausschnitte.

Zusammenfassend bewirkte oxLDL in HAoSMC eine Abnahme der *MYH11*-Expression, wohingegen auf Proteinebene keine Veränderung der untersuchten Differenzierungsmarker nachweisbar war. Die morphometrische Analyse zeigte eine Abrundung der Gestalt oxLDL-exponierter HAoSMC. Dies spricht insgesamt für einen Effekt von oxLDL auf zellulärer Ebene im Sinne einer SMC-Dedifferenzierung.

3.2.1.2 Phänotypische Charakterisierung von HAoSMC unter dem Einfluss von Cholesterol

Um in folgenden Experimenten spezifische Effekte von oxLDL von generellen Folgen der HAoSMC-Dedifferenzierung unterscheiden zu können, erfolgte ergänzend eine fokussierte phänotypische Analyse von HAoSMC nach Inkubation mit Cholesterol. Aufgrund der Hydrophobie von Cholesterol wurde dieses als Komplex mit Methyl-beta-

Cyclodextrin (Chol:M β CD) eingesetzt. Anschließend wurde die Expression des glattmuskulären Differenzierungsmarkers *MYH11* mittels qPCR quantifiziert. Cholesterol-exponierte HAoSMC zeigten eine im Vergleich zu nicht mit Chol:M β CD inkubierten HAoSMC auf 42,8 % (Mittelwert; Standardfehler = 3,4 %; $p = 0,004$) verringerte *MYH11*-Expression (**Abbildung 10**). Demzufolge konnte Cholesterol in Folgeversuchen zur Unterscheidung zwischen Auswirkungen der glattmuskulären Dedifferenzierung von spezifischen oxLDL-Effekten verwendet werden.

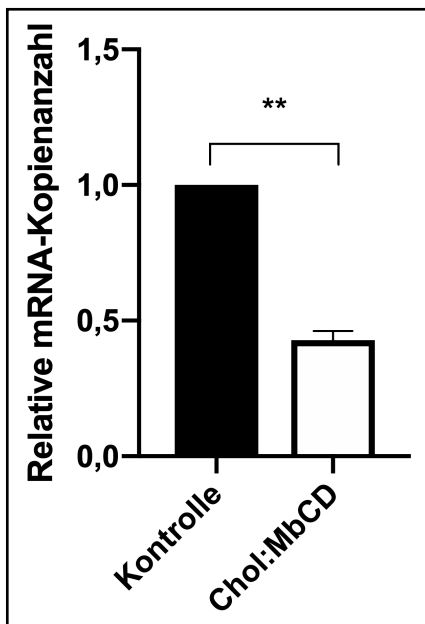


Abbildung 10: *MYH11*-Expression in HAoSMC nach Inkubation mit Chol:M β CD (20 μ g/ml) für 48 Stunden. Die Graphik zeigt Mittelwerte \pm Standardfehler der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte; $n = 3$ Versuche; ** $p < 0,01$.

3.2.2 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung ADAMTS-7-defizienter HAoSMC

Der Phänotyp und funktionelle Eigenschaften von VSMC sind für die Atherogenese bedeutsam. Auswirkungen von ADAMTS-7 auf den Phänotyp von VSMC wurden bislang nicht ausführlich untersucht. Hinsichtlich der Auswirkungen auf die Funktion von VSMC liegen keine Untersuchungen unter proatherogenen Bedingungen vor. Eine Möglichkeit, die Effekte eines Proteins zu beurteilen, stellt die spezifische Verminderung der Expression des betreffenden Gens durch RNA-Interferenz dar.

Deshalb wurden in dieser Arbeit HAoSMC nach spezifischem *ADAMTS7-Knockdown* phänotypisch und funktionell analysiert.

3.2.2.1 Phänotypische Charakterisierung *ADAMTS-7*-defizienter HAoSMC

Um zu untersuchen, ob *ADAMTS-7* Einfluss auf den Phänotyp von VSMC hat, wurden in dieser Arbeit HAoSMC nach Induktion eines spezifischen *ADAMTS7-Knockdowns* phänotypisiert. Um unspezifische Effekte der Transfektion mit anti-*ADAMTS7*-siRNA auszuschließen, wurden zum Vergleich mit einer Kontroll-siRNA (siRNA_{scramble}) transfizierte HAoSMC herangezogen. Zur Beurteilung des glattmuskulären Phänotyps wurden zunächst die SMC-Differenzierungsmarker Myosin-11 und Smoothelin im Western Blot quantifiziert.

Der *ADAMTS7-Knockdown* bewirkte keine signifikante Veränderung des zellulären Proteingehalts an Myosin-11 (Mittelwert \pm Standardfehler; $114,1 \pm 24,3$ %; $p = 0,60$) und Smoothelin ($118,1 \pm 10,5$ %; $p = 0,18$) im Vergleich zu den Kontroll-HAoSMC (**Abbildung 11 A**). In **Abbildung 11 B** sind repräsentative Western Blots dargestellt.

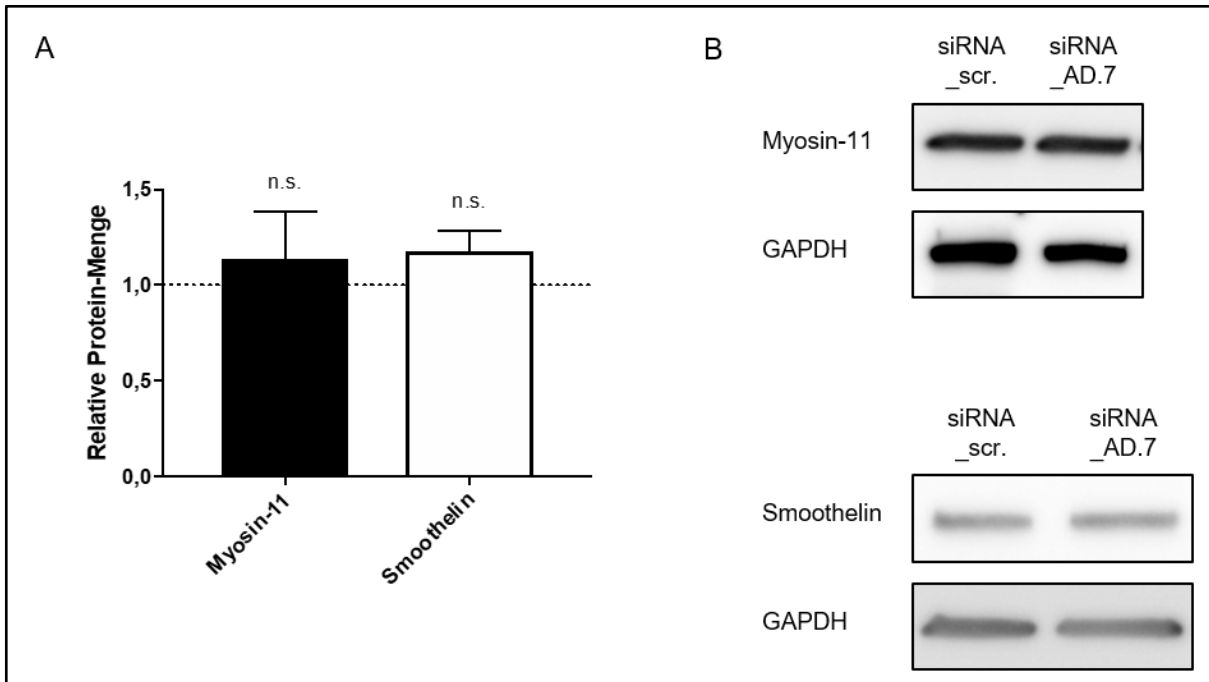


Abbildung 11: Veränderung der SMC-Differenzierungsmarker Myosin-11 und Smoothelin durch ADAMTS7-Knockdown in HAoSMC.

A. Mittelwerte \pm Standardfehler der im Western Blot bestimmten relativen Protein-Menge im Verhältnis zur Kontrolle (siRNA_{scramble}); n = 4 Versuche; Abkürzung: n.s. = nicht signifikant. **B.** Repräsentative Western Blots. Abkürzungen: siRNA_scr. = siRNA_{scramble}; siRNA_AD.7 = anti-ADAMTS7 siRNA.

Zur näheren Charakterisierung des glattmuskulären Phänotyps wurde eine morphometrische Analyse durchgeführt. Hierbei wurden HAoSMC nach Transfektion mit anti-ADAMTS7- bzw. Kontroll-siRNA (siRNA_{scramble}) miteinander verglichen. Anhand mikroskopischer Aufnahmen wurden softwaregestützt die längere und kürzere Achse der Zellkörper der HAoSMC vermessen.

Je Versuchswiederholung und Bedingung wurden im Mittel 1312 Zellen (Standardfehler = 15,3 Zellen) analysiert. Das Verhältnis von längerer zu kürzerer Zellachse unterschied sich nicht signifikant zwischen ADAMTS7-defizienten und Kontroll-HAoSMC (Mittelwert \pm Standardfehler; ADAMTS7-Knockdown: $4,16 \pm 0,05$; Kontrolle: $3,94 \pm 0,31$; $p = 0,50$; **Abbildung 12 A**). Die Häufigkeitsverteilung des Verhältnisses von längerer zu kürzerer Achsenlänge je Zelle innerhalb eines Versuchs war bei Kontroll- und Knockdown-HAoSMC ähnlich (exemplarisches Histogramm in **Abbildung 12 B**). Repräsentative mikroskopische Aufnahmen sind in **Abbildung 12 C** dargestellt. Insgesamt war somit nach ADAMTS7-Knockdown in HAoSMC keine phänotypische Veränderung nachweisbar.

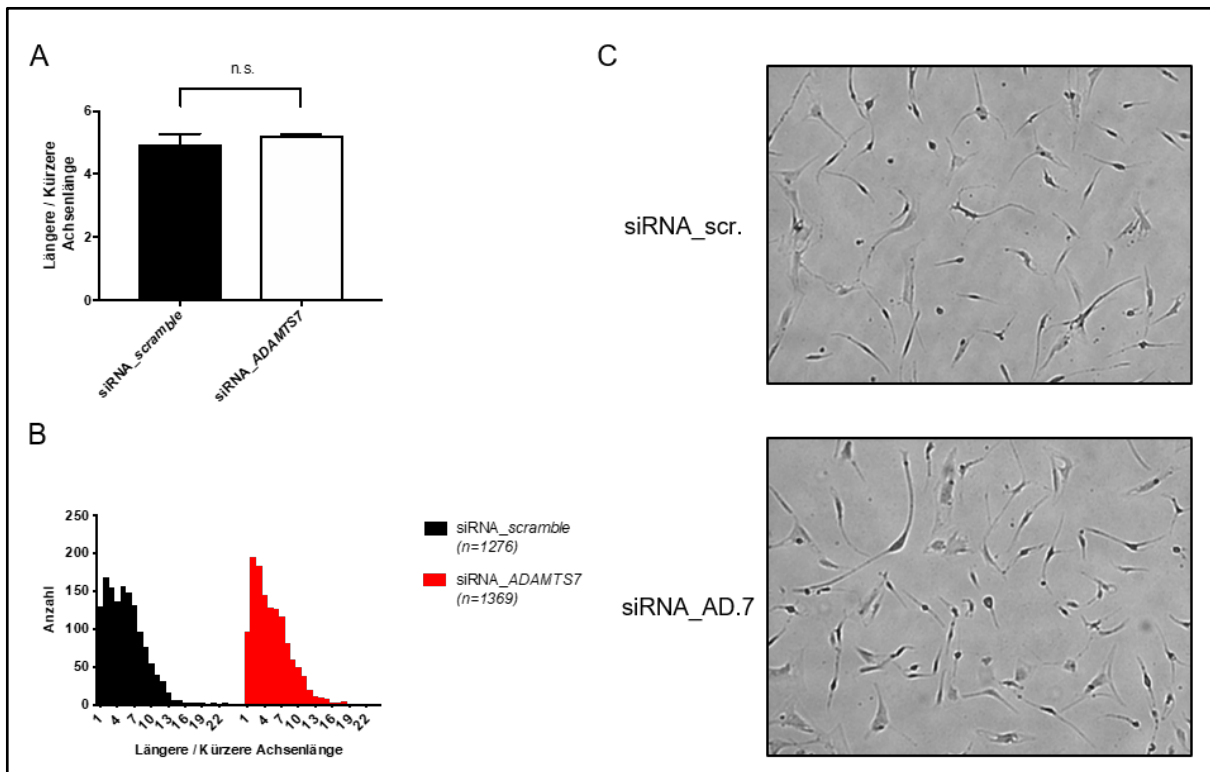


Abbildung 12: Morphologie von HAoSMC bei ADAMTS7-Knockdown.

A. Verhältnis von längerer zu kürzerer zellulärer Achsenlänge; Mittelwerte \pm Standardfehler; $n = 3$ Versuche; Abkürzung: n.s. = nicht signifikant. **B.** Histogramm der Verhältnisse von längerer zu kürzerer zellulärer Achsenlänge je Einzelzelle; Daten aus einem exemplarischen Versuch; $n =$ Anzahl der analysierten Zellen. **C.** Beispielhafte auflichtmikroskopische Bildausschnitte; Abkürzungen: siRNA_scr. = siRNA_{scramble}; siRNA_AD.7 = anti-ADAMTS7-siRNA.

3.2.2.2 Funktionelle Charakterisierung ADAMTS-7-defizienter HAoSMC

Funktionelle Eigenschaften von VSMC sind für die Pathophysiologie der Atherosklerose bedeutsam. Die Auswirkungen von ADAMTS-7-Defizienz auf die pathophysiologisch bedeutsame glattmuskuläre Zellproliferation wurden bislang nicht an humanen Zellen untersucht. Darüber hinaus ist nicht bekannt, ob eine proatherogene Umgebung den promigratorischen Effekt von ADAMTS-7 auf VSMC verstärkt. Deshalb wurden in dieser Arbeit die zelluläre Proliferation und Migration von ADAMTS-7-defizienten HAoSMC analysiert. Die Untersuchung der Zellmigration erfolgte zusätzlich unter proatherogenen Bedingungen. Diese wurden durch Inkubation mit oxLDL hergestellt.

3.2.2.2.1 Zelluläre Proliferation ADAMTS-7-defizienter HAoSMC

Um die Auswirkungen von ADAMTS-7 auf die zelluläre Proliferation von humanen VSMC zu untersuchen, wurden *ADAMTS7* vermindert exprimierende HAoSMC verwendet. Hierzu wurde zunächst durch Transfektion mit anti-*ADAMTS7*-siRNA ein spezifischer *Knockdown* induziert. Zum Ausschluss unspezifischer Effekte wurden zum Vergleich HAoSMC mit einer Kontroll-siRNA (siRNA_{scramble}) transfiziert. Zur Quantifizierung der Zellproliferation wurde nach 48 Stunden fluorometrisch der zelluläre DNA-Gehalt bestimmt und das Verhältnis von Zellverdopplungszyklen der *ADAMTS7-Knockdown* HAoSMC im Vergleich zu Kontroll-HAoSMC berechnet.

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der zellulären Proliferation zwischen *ADAMTS7-Knockdown*- und Kontroll-HAoSMC (Verhältnis von Zellverdopplungszyklen *Knockdown* / Kontrolle; Mittelwert = 100,65 %; Standardfehler = 0,30 %; $p = 0,12$; **Abbildung 13**).

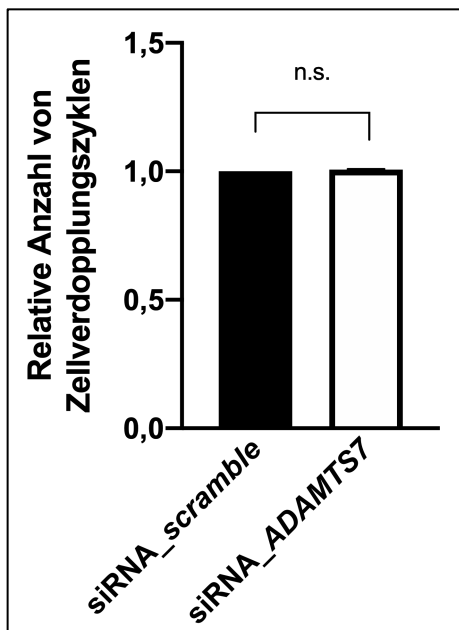


Abbildung 13: Proliferation von HAoSMC bei *ADAMTS7-Knockdown*.

Die Graphik zeigt die Zellverdopplungszyklen von HAoSMC nach *ADAMTS7-Knockdown* (siRNA_*ADAMTS7*) innerhalb von 48 Stunden Inkubation im Verhältnis zu den Zellverdopplungszyklen von Kontroll-HAoSMC (siRNA_*scramble*). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardfehler; $n = 4$ Versuche. Abkürzung: n.s. = nicht signifikant.

3.2.2.2 Zelluläre Migration ADAMTS-7-defizienter HAoSMC unter proatherogenen Bedingungen

Es ist nicht bekannt, ob der Effekt von ADAMTS-7 auf die Migrationsfähigkeit von VSMC durch proatherogene Umgebungsbedingungen moduliert wird. Deshalb wurde in dieser Arbeit die zelluläre Migration von HAoSMC mit verminderter *ADAMTS7*-Expression nach Inkubation mit proatherogenem oxLDL untersucht. Eine Verringerung der *ADAMTS7*-Expression wurde durch RNA-Interferenz induziert. Zum Ausschluss unspezifischer Effekte der Transfektion wurden HAoSMC mit einer Kontroll-siRNA (siRNA_{scramble}) transfiziert. Die zelluläre Migration wurde mittels eines *Scratch Wound* Assays quantifiziert. Damit beurteilt werden konnte, ob sich eine verminderte *ADAMTS7*-Expression unter proatherogenen Bedingungen andersartig auf die SMC-Migration auswirkt, als unter nicht-proatherogenen Bedingungen, wurde dieses Experiment zusätzlich ohne oxLDL durchgeführt.

Zunächst wurde die zelluläre Migration ohne Inkubation mit oxLDL analysiert. Hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied, jedoch ein Trend zu verminderter Migration der HAoSMC bei *ADAMTS7-Knockdown* im Vergleich zu siRNA_{scramble}-transfizierten HAoSMC (Zunahme zellbedeckter Fläche; Mittelwert \pm Standardfehler; *ADAMTS7-Knockdown*: $11,5 \pm 1,3$ %; Kontrolle: $16,9 \pm 2,5$ %; $p = 0,11$; **Abbildung 14 A**). Nach oxLDL-Exposition zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der HAoSMC-Migration bei *ADAMTS7-Knockdown* (Zunahme zellbedeckter Fläche; Mittelwert \pm Standardfehler; *ADAMTS7-Knockdown*: $11,7 \pm 1,9$ %; Kontrolle: $13,5 \pm 2,0$ %; $p = 0,69$; **Abbildung 14 A**). **Abbildung 14 B** zeigt exemplarische mikroskopische Aufnahmen des *Scratch Wound* Assays.

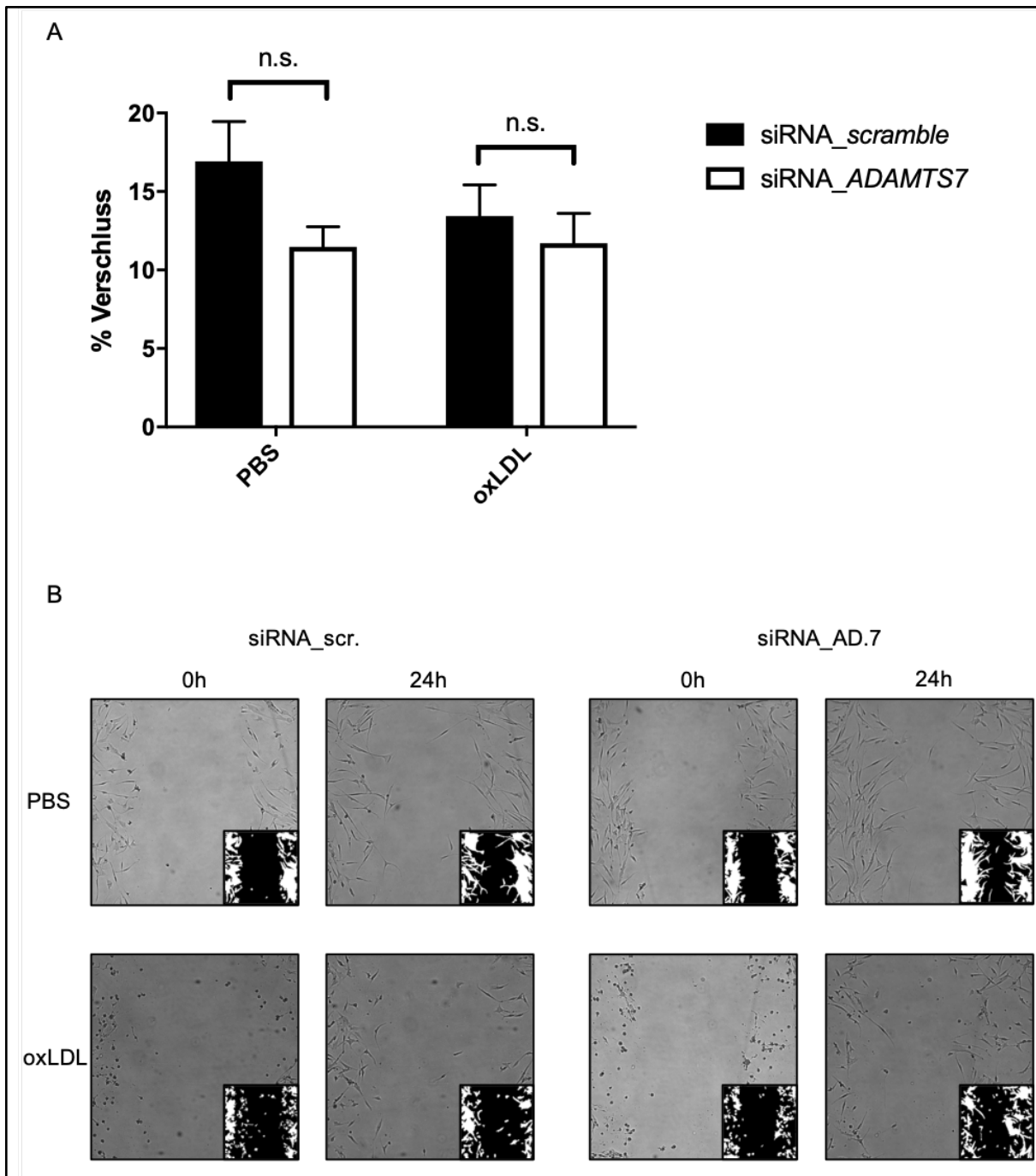


Abbildung 14: Zelluläre Migration von HAoSMC bei *Knockdown* von *ADAMTS7* mit und ohne oxLDL-Exposition.

A. Relative Zunahme zellbedeckter Fläche nach 24 Stunden; Mittelwerte \pm Standardfehler; $n = 3$ Versuche; Abkürzung: n.s. = nicht signifikant. **B.** Exemplarische mikroskopische Abbildungen des *Scratch Wound Assays* (ein Versuch); die Einsatzbilder zeigen die entsprechenden binären Bilder nach Zellerkennung durch die Software CellProfiler, welche der Quantifizierung bedeckter Fläche zugrunde liegen; die Zeitangaben beziehen sich auf das Intervall nach „*Scratching*“ und Starten der Migration; Abkürzungen: siRNA_scr. = transfiziert mit siRNA_{scramble}; siRNA_AD.7 = transfiziert mit anti-*ADAMTS7*-siRNA.

3.3 Untersuchungen zur Regulation der *ADAMTS7*-Expression in HAoSMC

ADAMTS7 wird in atherosklerotischen Gefäßen vermehrt exprimiert (vgl. Abschnitt 1.4.5.2). VSMC stehen dort unter dem Einfluss zahlreicher externer Faktoren. Inwieweit diese die *ADAMTS7*-Expression beeinflussen, wurde bislang nur wenig untersucht. Deshalb war es ein Ziel dieser Arbeit, die *ADAMTS7*-Expression in HAoSMC unter dem Einfluss ausgewählter Atherosklerose-assoziiierter Faktoren zu analysieren.

3.3.1 *ADAMTS7*-Expression unter dem Einfluss Atherosklerose-assoziiierter Komponenten der extrazellulären Matrix

Es wurden beschrieben, dass sich der Effekt von *ADAMTS7* auf die VSMC-Migration in Anwesenheit von Kollagen I, Fibronectin und Laminin unterscheidet (s. Abschnitt 1.4.5.2). Diese Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) sind jedoch keine bekannten Substrate von *ADAMTS7*. Ob sie die Expression von *ADAMTS7* beeinflussen, wurde bislang nicht untersucht. Deshalb war es ein Ziel dieser Arbeit die *ADAMTS7*-Expression in VSMC in Abhängigkeit dieser EZM-Komponenten zu analysieren. Hierzu wurden HAoSMC auf mit Kollagen I, Fibronectin oder Laminin beschichteten Zellkulturplatten kultiviert. Als Referenz wurden HAoSMC auf unbeschichteten Zellkulturplatten kultiviert. Die *ADAMTS7*-Expression wurde mittels qPCR quantifiziert.

Die *ADAMTS7*-Expression in HAoSMC unterschied sich bei Kultur auf keinem der drei untersuchten EZM-Bestandteile signifikant von der *ADAMTS7*-Expression in HAoSMC auf unbeschichteten Zellkulturplatten (Mittelwert \pm Standardfehler; Laminin: $108,5 \pm 18,0$ %; $p = 0,67$; Fibronectin: $117,5 \pm 10,9$ %; $p = 0,21$; Kollagen I: $89,5 \pm 15$ %; $p = 0,53$; **Abbildung 15**).

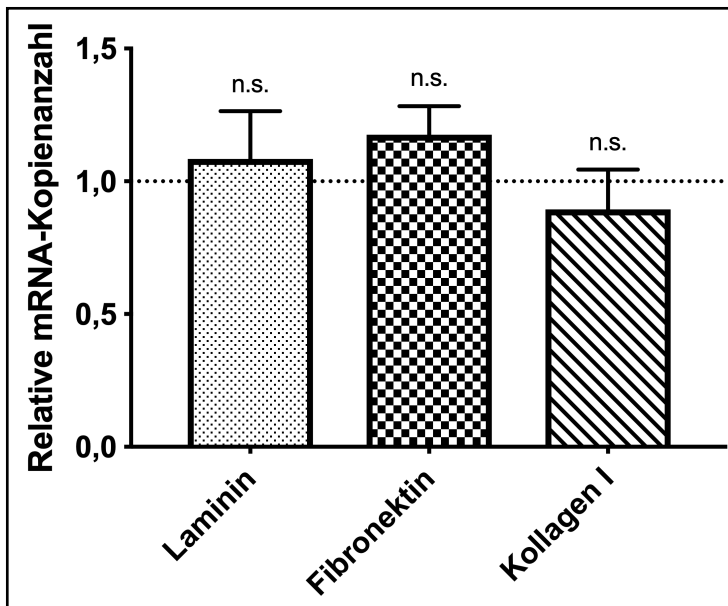


Abbildung 15: ADAMTS7-Expression in HAoSMC bei Kultur auf verschiedenen EZM-Komponenten.

Die Graphik zeigt Mittelwerte \pm Standardfehler der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der ADAMTS7-Expression in Relation zu Kontroll-HAoSMC auf unbeschichteten Zellkulturplatten; n = 4 Versuche; Abkürzung: n.s. = nicht signifikant.

3.3.2 ADAMTS7-Expression unter dem Einfluss von Cholesterol

Cholesterolhaltige Lipoproteine haben eine zentrale Bedeutung in der Atherogenese, welche sich zum Teil aus ihrer Wirkung auf VSMC ergibt. Ob Cholesterol selbst die ADAMTS7-Expression in VSMC beeinflusst, ist nicht bekannt. Deshalb wurde in dieser Arbeit die ADAMTS7-Expression in Cholesterol-exponierten HAoSMC untersucht. Es ist außerdem unklar, ob eine Dedifferenzierung von VSMC die Expression von ADAMTS7 verändert. Sowohl Cholesterol als auch oxLDL wirken dedifferenzierend auf HAoSMC. Daher war es ein weiteres Ziel dieses Versuchs, einen spezifischen Einfluss von oxLDL auf die ADAMTS7-Expression von einer Folge glattmuskelzellulärer Dedifferenzierung zu unterscheiden. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von Cholesterol wurden HAoSMC mit Chol:M β CD anstatt mit reinem Cholesterol inkubiert. Die ADAMTS7-Expression wurde mittels qPCR quantifiziert. Nach Inkubation mit Chol:M β CD zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der ADAMTS7-Expression in HAoSMC im Vergleich zu nicht Chol:M β CD-exponierten HAoSMC (Mittelwert: 114 %; Standardfehler: 22,5 %; p = 0,58; **Abbildung 16**).

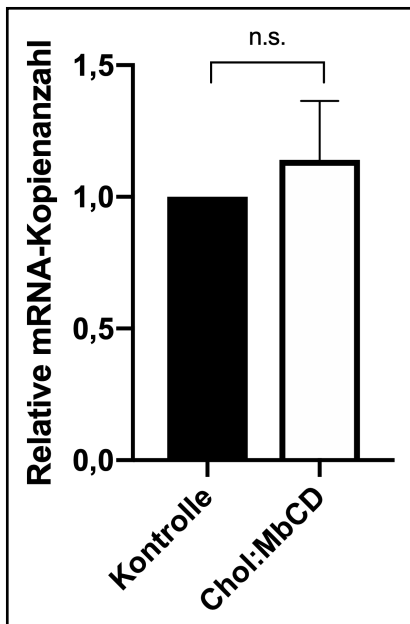


Abbildung 16: ADAMTS7-Expression in HAoSMC nach Inkubation mit Chol:MβCD (20 µg/ml) für 48 Stunden. Die Graphik zeigt Mittelwerte \pm Standardfehler der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte der ADAMTS7-Expression bezogen auf nicht Chol:MβCD-exponierte HAoSMC; n = 4 Versuche; Abkürzung: n.s. = nicht signifikant.

3.3.3 ADAMTS7-Expression unter dem Einfluss von oxLDL

LDL und seine oxidierte Form oxLDL tragen maßgeblich zur Atherogenese bei, unter anderem durch ihre Wirkung auf VSMC. Es wurde deshalb in dieser Arbeit untersucht, ob oxLDL die ADAMTS7-Expression in HAoSMC beeinflusst. Hierzu wurden HAoSMC mit oxLDL inkubiert und ihre ADAMTS7-Expression mittels qPCR quantifiziert.

Wie **Abbildung 17** zeigt, wiesen oxLDL-exponierte HAoSMC in diesem Versuch eine signifikante Abnahme der ADAMTS7-Expression auf (Mittelwert 59,9 %; Standardfehler: 5,5 %; $p = 0,002$).

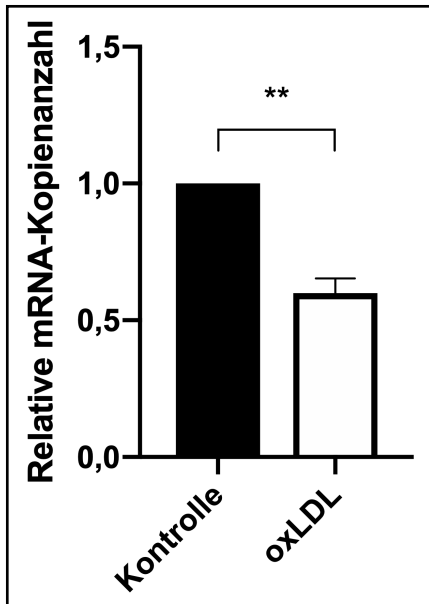


Abbildung 17: ADAMTS7-Expression in HAoSMC nach 48-stündiger Inkubation mit oxLDL (40 µg/ml). Die Graphik zeigt Mittelwerte \pm Standardfehler der ADAMTS7-Expression in Relation zur Kontrolle als $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte; n = 5 Versuche; ** p < 0,01.

3.3.4 Weiterführende Untersuchungen zum Einfluss von oxLDL auf die ADAMTS7-Expression

In dieser Arbeit zeigte sich eine Verminderung der ADAMTS7-Expression in HAoSMC durch oxLDL. Die pathophysiologische Relevanz dieser Beobachtung und die molekularen Grundlagen dieses Zusammenhangs sind jedoch unklar. Deshalb wurde zunächst untersucht, ob die Erhöhung des KHK-Risikos durch das ADAMTS7-Risikoallel mit LDL-C assoziiert ist. Im nächsten Schritt wurden Untersuchungen zu an der Vermittlung des Effekts von oxLDL auf die ADAMTS7-Expression beteiligten molekularen Signalwegen durchgeführt.

3.3.4.1 Korrelation der KHK-Assoziation des ADAMTS7-Locus mit einem genetischen LDL-C-Risikoscore

Ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung des KHK-Risikos durch das ADAMTS7-Risikoallel und LDL-C wäre ein Hinweis auf pathophysiologische Relevanz der oxLDL-induzierten Minderexpression von ADAMTS7 in der Zellkultur. Genetische LDL-C-

Risiko-Scores sind Surrogatparameter für LDL-C-Spiegel, die anhand genetischer Daten verfügbar sind. Es wurde deshalb untersucht, ob die dem *ADAMTS7*-Risikoallel zuzuschreibende Erhöhung des KHK-Risikos von genetisch bedingtem LDL-C abhängig ist.

Hierzu wurden Patientendatensätze aus GWAS nach einem genetischen LDL-C-Risiko-Score (GRS) in Quintilen unterteilt. In Daten aus verfügbaren deutschen GWAS (n = 8510 Fälle, 7602 Kontrollen) zeigte sich, dass eine Assoziation des *ADAMTS7*-Risikoallels mit der KHK nur in den Quintilen 1 (Odds Ratio = 1,21 [95 %-Konfidenzintervall 1,08 - 1,36], p < 0,001) und 2 (Odds Ratio = 1,15 [95 %-Konfidenzintervall 1,01 - 1,30], p < 0,05) des LDL-C-GRS nachweisbar war (Berechnung durch Dr. Lingyao Zeng, **Abbildung 18**).

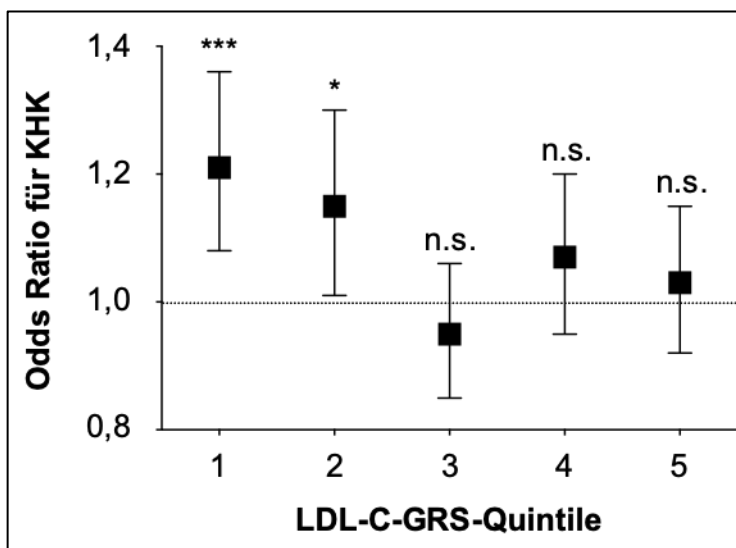


Abbildung 18: Zusammenhang von *ADAMTS7*-zuzuschreibender Erhöhung des KHK-Risikos und LDL-C-GRS.

Die Graphik zeigt die Odds Ratio \pm 95%-Konfidenzintervall für KHK bei Vorliegen eines *ADAMTS7*-Risikoallels stratifiziert nach Quintile des LDL-C-GRS; n.s. = nicht signifikant; * p < 0,05; *** p < 0,001.

3.3.4.2 *ADAMTS7*-Expression bei Stimulation von PPAR γ durch den Agonisten

Rosiglitazon

Zur Untersuchung der molekularen Grundlage einer durch oxLDL induzierten Herunterregulation von *ADAMTS7* wurde auf Basis einer Literaturrecherche zunächst der Transkriptionsfaktor PPAR γ ausgewählt, welcher von oxLDL aktiviert wird (s.

Abschnitt 1.2.3). Eine Möglichkeit zu prüfen, ob dies für die Verminderung der *ADAMTS7*-Expression verantwortlich ist, besteht darin, die *ADAMTS7*-Expression unter dem Einfluss eines anderen PPAR γ -Agonisten zu quantifizieren. Deshalb wurden HAoSMC mit dem PPAR γ -Agonisten Rosiglitazon inkubiert. Anschließend wurde die *ADAMTS7*-Expression mittels qPCR bestimmt. Da Rosiglitazon in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wurde, dienten als Negativkontrolle mit DMSO inkubierte HAoSMC.

Die Rosiglitazon-exponierten HAoSMC zeigten keine Veränderung ihrer *ADAMTS7*-Expression im Vergleich zur Kontrolle (Mittelwert = 93,7 %; Standardfehler = 12,3 %; $p = 0,63$; **Abbildung 19**).

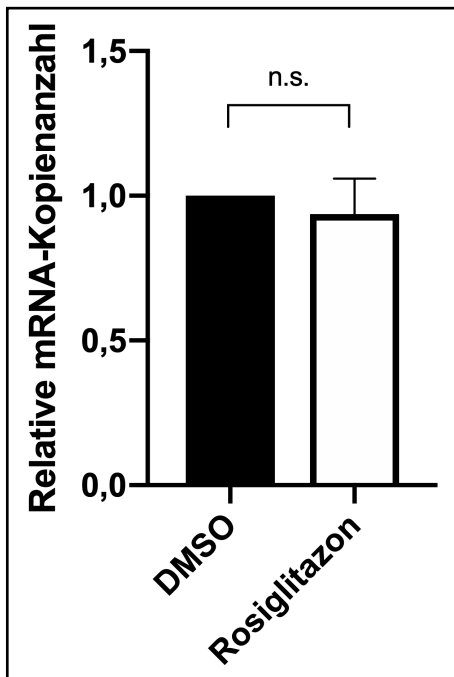


Abbildung 19: *ADAMTS7*-Expression in HAoSMC nach Inkubation mit Rosiglitazon (0,01 $\mu\text{mol/ml}$) für 48 Stunden.

Die Graphik zeigt Mittelwerte \pm Standardfehler der *ADAMTS7*-Expression in Relation zur Kontrolle (DMSO) als $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Werte; $n = 6$ Versuche; Abkürzung: n.s. = nicht signifikant.

3.3.4.3 Untersuchungen zu LOX-1 und dem ERK1/2-Signalweg

Der *Oxidized low-density lipoprotein receptor 1* (LOX-1) ist ein zentraler *Scavenger*-Rezeptor für die zelluläre Aufnahme von oxLDL im Kontext der Atherosklerose (s. Abschnitt 1.2.3). Deshalb wurde untersucht, ob LOX-1 an der Herunterregulation von

ADAMTS7 in HAoSMC infolge von oxLDL-Exposition beteiligt ist. LOX-1 nachgeschaltet ist unter anderem der ERK1/2-Signalweg. Es wurden sowohl eine Aktivierung als auch eine Deaktivierung des ERK1/2-Signalwegs durch oxLDL beschrieben (s. Abschnitt 1.2.3). Deshalb wurde zunächst der Einfluss von oxLDL auf ERK1/2 untersucht. Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob LOX-1 essentiell für die oxLDL induzierte Verminderung der *ADAMTS7*-Expression ist.

3.3.4.3.1 Phosphorylierung von ERK1/2 unter dem Einfluss von oxLDL

Phosphorylierung führt zur Aktivierung, Dephosphorylierung zur Deaktivierung von ERK1/2. Um den Einfluss von oxLDL auf den ERK1/2-Signalweg zu prüfen, wurde darum die Phosphorylierung von ERK1/2 in oxLDL-exponierten sowie in nicht mit oxLDL inkubierten HAoSMC bestimmt. Hierzu wurden mittels Western Blot gesamt-ERK1/2 und phosphoryliertes ERK1/2 (p-ERK1/2) quantifiziert.

Bei annähernd konstantem gesamt-ERK1/2 (oxLDL / Kontrolle; Mittelwert \pm Standardfehler; $96,4 \pm 14,0$ %; $p = 0,13$) zeigte sich eine Verringerung von p-ERK1/2 in den oxLDL-behandelten HAoSMC ($78,0 \pm 3,1$ %; $p = 0,02$; **Abbildung 20**).

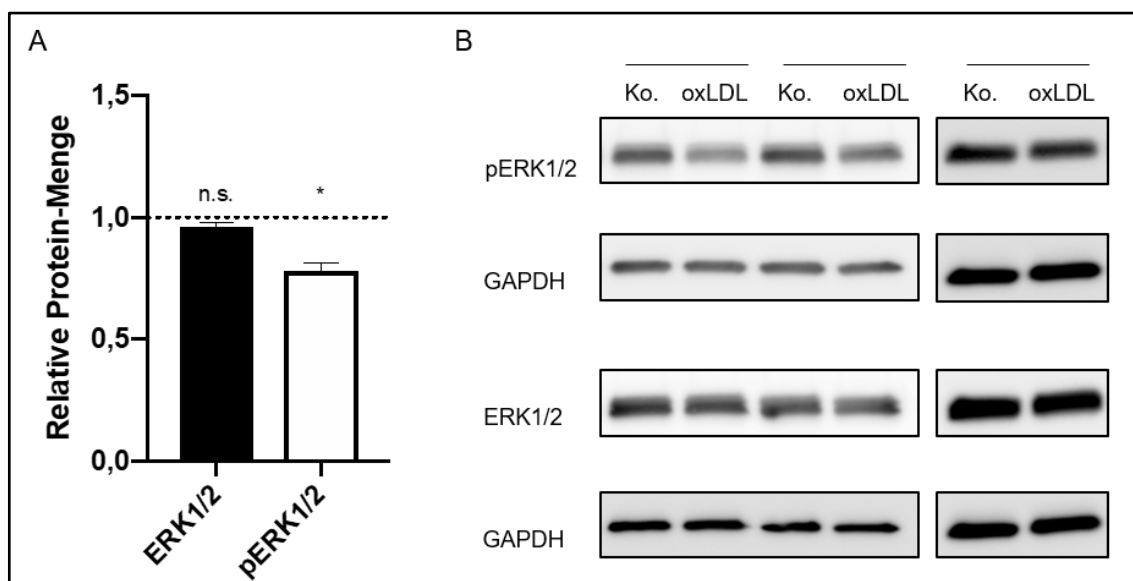


Abbildung 20: Phosphorylierung von ERK1/2 in HAoSMC bei oxLDL-Exposition.

A. p-ERK1/2 und ERK1/2 in oxLDL-behandelten HAoSMC relativ zur Kontrolle; Mittelwerte \pm Standardfehler; **B.** Western-Blots. $n = 3$ Versuche; Abkürzungen: * $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Ko. = Kontrolle.

3.3.4.3.2 Reversibilität der oxLDL-induzierten Verminderung der *ADAMTS7*-Expression durch *OLR1*-Knockdown

Eine Möglichkeit zu untersuchen, ob die oxLDL-induzierte Verminderung der *ADAMTS7*-Expression von LOX-1 (Gen: *OLR1*) abhängig ist, ist die Prüfung ihrer Reversibilität durch Reduktion der *OLR1*-Expression. Hierzu wurden HAoSMC mit oxLDL inkubiert. Anschließend wurde durch siRNA-Interferenz ein *OLR1*-Knockdown induziert. Zum Ausschluss unspezifischer Effekte wurden oxLDL-exponierte HAoSMC mit einer Kontroll-siRNA (siRNA_{scramble}) transfiziert. Die *OLR1*- sowie die *ADAMTS7*-Expression wurde mittels qPCR quantifiziert.

Mit anti-*OLR1*-siRNA inkubierte HAoSMC wiesen gegenüber der Kontrolle (siRNA_{scramble}) eine Abnahme der *OLR1*-Expression auf 28,1 % (Mittelwert; Standardfehler = 10,0 %; $p = 0,02$) auf. Die Expression von *ADAMTS7* in *OLR1*-defizienten, oxLDL-exponierten HAoSMC war im Vergleich zur, ebenso oxLDL-exponierten, Kontrolle im Mittel um 19,3 % erhöht (Standardfehler = 6,9 %; $p = 0,048$).

Abbildung 21 stellt die *OLR1*- und *ADAMTS7*-Expression in oxLDL-exponierten HAoSMC bei *OLR1*-Knockdown dar.

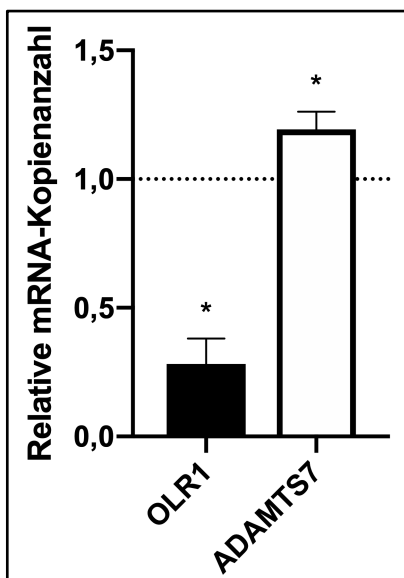


Abbildung 21: Expression von *OLR1* und *ADAMTS7* in HAoSMC nach Inkubation mit oxLDL (40 µg/ml für 48 Stunden) und *OLR1*-Knockdown.

Die Graphik zeigt Mittelwerte \pm Standardfehler der Expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte) von *OLR1* ($n = 3$ Versuche) und *ADAMTS7* ($n = 5$ Versuche) relativ zur Kontrolle. Die Kontrolle sind oxLDL-exponierte HAoSMC, welche mit siRNA_{scramble} transfiziert wurden. * $p < 0,05$.

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen zur Detektion von ADAMTS-7

4.1.1 Der *ADAMTS7-Knockdown* in HAoSMC ist effektiv und im Zeitraum von 24 bis 72 Stunden nach Transfektion stabil

Die *ADAMTS7*-Expression in VSMC (L. Wang et al., 2009) konnte mittels qPCR nachgewiesen werden. Der *Knockdown* von *ADAMTS7* mittels RNA-Interferenz war eine Vorbedingung für die Untersuchungen zur Detektion von ADAMTS-7 sowie für die phänotypische und funktionelle Charakterisierung ADAMTS-7-defizienter humaner VSMC.

Mit Ausnahme der siRNA s22050 zum frühesten untersuchten Zeitpunkt, war der *ADAMTS7-Knockdown* in HAoSMC mit allen drei geprüften siRNAs effektiv. Dabei hatte die Verminderung der *ADAMTS7*-mRNA, mit der genannten Ausnahme, im Zeitraum von 24 bis 72 Stunden nach Transfektion Bestand. Als am geeignetsten erwies sich siRNA s22052, welche eine effektive Verringerung der *ADAMTS7*-Expression über einen Zeitraum bewirkte, der alle hierauf aufbauenden Experimente dieses Projekts umfasst. Die Reduktion der *ADAMTS7*-Expression durch siRNA s22052 war nach 24 Stunden im Vergleich zu den anderen siRNAs am stärksten ausgeprägt. Zu den anderen Zeitpunkten war sie ähnlich effektiv wie die anderen siRNAs.

Der spezifische *Knockdown* hat Überexpressionsexperimenten gegenüber den Vorteil, die perspektivisch klinisch relevante Situation einer medikamentösen Inhibition von ADAMTS-7 zu imitieren (vgl. auch Muller, Kessler et al. 2016). Anders als der *Knockout* ist eine siRNA-vermittelte Expressionsverringering in der Zellkultur auch an menschlichem Material durchführbar, wodurch sich eine Speziesbarriere vermeiden lässt. Letzterer Aspekt ist in Hinblick auf die Atherosklerose relevant, denn in der Maus kommt diese Erkrankung unter natürlichen Bedingungen nicht vor und lässt sich, im Gegensatz zu anderen Spezies, durch cholesterinreiche Diät allein kaum hervorrufen. Hinsichtlich der Pathologie der Atherosklerose bestehen deutliche Unterschiede zwischen Mensch und Maus (von Scheidt et al., 2017). Zu den allgemeinen Nachteilen des siRNA-*Knockdowns* zählen *off-target*-Effekte. Diese lassen sich durch die Verwendung modifizierter siRNAs, wie in der vorliegenden Arbeit (Life Technologies

Corporation, 2011), zwar vermindern aber nicht völlig ausschließen (Petri & Meister, 2013).

4.1.2 Der Antikörper ab201083 (Abcam) erkennt spezifisch rekombinantes ADAMTS-7 im Western Blot und in der Immunzytochemie

Spezifische Antikörper sind in der biologischen Grundlagenforschung essentiell für Methoden wie Western Blot, Immunzyto/ -histochemie oder Durchflusszytometrie. Die einzige publizierte Evaluation mehrerer anti-ADAMTS-7-Antikörper umfasst nur drei Antikörper und mit der Immunzytochemie nur eine Methode (Bengtsson et al., 2017). Somit könnte die in dieser Arbeit beschriebene strukturierte Evaluation von fünf anti-ADAMTS-7-Antikörpern in zwei Methoden eine relevante Grundlage für weitere Studien darstellen.

Eine Vorbedingung hierfür war, neben dem spezifischen *ADAMTS7-Knockdown*, die Etablierung der ektopten Überexpression von *ADAMTS7*. Insgesamt erwies sich die Transfektion von HEK293-Zellen mit einem *ADAMTS7-V5*-Plasmid als geeignet, um rekombinantes *ADAMTS-7* zu produzieren. Hierbei ist es ein Vorteil, dass es sich bei HEK293-Zellen um eine menschliche Zelllinie handelt. Zudem wurde eine Überexpression von *ADAMTS7* in HEK293-Zellen bereits beschrieben (Somerville et al., 2004). In den transfizierten HAoSMC war V5 nur in Ansätzen mit hohem Plasmid-Einsatz nachweisbar. Der CMV-Promotor des Vektors bewirkt in transfizierten Zellen eine sehr starke Transkription des Plasmids. In Zusammenschau mit der immunzytochemischen Darstellung im Rahmen der Antikörperevaluation ist davon auszugehen, dass nur ein relativ geringer Anteil der behandelten HAoSMC effektiv transfiziert wurde. Dies kann auf die Beschaffenheit von HAoSMC als schwierig zu transfizierenden Primärzellen zurückgeführt werden. So wurde in einer methodologischen Veröffentlichung für Elektroporationsverfahren, wie in der vorliegenden Arbeit angewandt, eine Transfektionseffizienz von unter 50% für HAoSMC gefunden (Gresch et al., 2004). Daher erscheint die Transfektion von HAoSMC mit dem *ADAMTS7*-Plasmid für die Versuche zur Evaluierung von anti-ADAMTS-7-Antikörpern geeignet, wäre aber unzureichend für Untersuchungen bzgl. biologischer Effekte gesteigerter *ADAMTS7*-Expression.

Anti-ADAMTS-7-Antikörper wurden bezüglich Ihrer Sensitivität und Spezifität hinsichtlich der Detektion von endogenem ADAMTS-7 in HAoSMC und rekombinantem ADAMTS-7 beurteilt. Im Western Blot erwies sich ab201083 (Abcam) als sensitiv und im Vergleich am spezifischsten. Er detektierte in der Positivkontrolle (infolge ektopter Überexpression produziertes ADAMTS-7) genau eine Bande auf der für ADAMTS-7 zu erwartenden Höhe (Somerville et al., 2004). Somit erkannte ab201083 als einziger der geprüften Antikörper spezifisch die Positivkontrolle. Unter Anwendung eines modifizierten Western Blot-Protokolls ließ sich mit diesem Antikörper zudem in nicht transfizierten HAoSMC eine Bande nachweisen, welche bei *ADAMTS7-Knockdown* nicht vorlag und mit hoher Wahrscheinlichkeit endogenem ADAMTS-7 zu entsprechen scheint. Hierbei waren allerdings Abstriche hinsichtlich der Spezifität des Antikörpers zu verzeichnen. Die weiteren geprüften anti-ADAMTS-7-Antikörper erkannten entweder nicht sicher die Positivkontrolle (HPA 045284, Sigma Aldrich und sc-163642, Santa Cruz) oder erwiesen sich als wenig spezifisch (ab45044, Abcam und H00011173-A01, Abnova).

Ergänzend wurde unter Verwendung von Material aus Herzen und Aorten von Wildtyp (WT)- und *ADAMTS7-Knockout* (KO)-Mäusen das Vermögen der Antikörper geprüft, murines Adams-7 im Western Blot nachzuweisen. Ab45044 (Abcam) und H00011173-A01 (Abnova) stellten Banden in den Spalten des murinen Materials dar. Der Abnova-Antikörper wirkt dabei angesichts der großen Anzahl dargestellter Banden unspezifisch und wies keinen Unterschied zwischen WT- und KO-Proben auf. In diesem Zusammenhang sollte beachtet werden, dass H00011173-A01 (Abnova), als einziger der hier untersuchten Antikörper, aus der Maus stammt. Ab45044 (Abcam) zeigte in den murinen Proben keine Bande in der erwarteten Höhe und keinen plausiblen Unterschied zwischen WT und KO. Möglicherweise könnte die Expression eines trunkierten Proteins in den KO-Tieren hierfür verantwortlich sein. Zusammenfassend gelang mit keinem der untersuchten Antikörper eine sichere Darstellung von murinem Adams-7 im Western Blot.

In der Immunzytochemie kamen nur mit dem Antikörper H00011173-A01 (Abnova) auch V5-negative HAoSMC zur Darstellung. Um zu differenzieren, ob der Antikörper endogenes ADAMTS-7 erkennt oder lediglich mangelnde Spezifität aufweist, wurde dieser zusätzlich an *ADAMTS7-Knockdown*-HAoSMC getestet. Hierbei war kein Unterschied zu *scramble*-siRNA-transfizierten HAoSMC festzustellen, sodass H00011173-A01 als unspezifisch gelten muss. Als Grundlage der geringen Spezifität

könnte der Umstand in Frage kommen, dass die immunogene Zielsequenz dieses Antikörpers in einem *thrombospondin type 1 repeat* (TSR)-Cluster liegt (Abnova, abgerufen 04.02.2018; UniProt Consortium, abgerufen 04.02.2018). TSR sind Bestandteil von mehr als 40 humanen Proteinen (Tan et al., 2002).

Zusammenfassend stellte sich in dieser systematischen Evaluation der Antikörper ab201083 (Abcam) als geeignetster der untersuchten anti-ADAMTS-7-Antikörper dar. Er erkannte spezifisch rekombinantes ADAMTS-7 in Western Blot und Immunzytochemie. Darüber hinaus ergaben sich Hinweise darauf, dass mit diesem Antikörper auch der Nachweis von endogenem ADAMTS-7 in humanen SMC möglich sein könnte. Einschränkend ist zu erwähnen, dass ab201083, wie viele kommerzielle anti-ADAMTS-7-Antikörper, gegen die Prodomäne des Proteins gerichtet ist. Dies könnte möglicherweise die Darstellung von extrazellulärem ADAMTS-7 einschränken. Zwar liegt extrazelluläres ADAMTS-7 teilweise mit Prodomäne vor, jedoch wurden sowohl intra- als auch extrazelluläre Abspaltungsvorgänge nachgewiesen (Somerville et al., 2004). Ein sicherer, spezifischer Nachweis von endogenem ADAMTS-7 in Western Blot und Immunzytochemie gelang mit keinem der geprüften Antikörper, ebenso wenig wie der Nachweis von endogenem murinem Adams-7 im Western Blot.

Hinsichtlich HPA 045284 (Sigma Aldrich) ist bemerkenswert, dass dieser Antikörper in der Immunzytochemie spezifisch *ADAMTS7*-transfizierte Zellen darstellte, so dass es sich bei seiner singulären Western Blot-Bande bei 80kDa in der Spalte der Positivkontrolle möglicherweise um ein ADAMTS-7-Spaltprodukt handeln könnte. Wenig plausibel erscheint jedoch der Umstand, dass eine Bande dieser Höhe nur bei diesem Antikörper auftrat, obwohl er nicht als einziger der untersuchten Antikörper gegen die Prodomäne von ADAMTS-7 gerichtet ist.

Im Kontext weiterführender Studien erscheint eine Evaluation weiterer anti-ADAMTS-7-Antikörper mit Fokus auf dem Nachweis des endogenen Proteins wünschenswert. Vorrangig könnten hierbei Antikörper gewählt werden, welche nicht gegen Prodomäne oder Signalpeptid gerichtet sind und deren immunogenes Ziel kein konserviertes Motiv umfasst. Ferner könnte ein nicht aus dem murinen Organismus stammender Antikörper Vorteile bieten. Des Weiteren könnte eine Prüfung von anti-ADAMTS-7-Antikörpern, insbesondere von ab201083 (Abcam), in der Durchflusszytometrie eine sinnvolle Ergänzung darstellen.

4.2 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung ADAMTS-7-defizienter HAoSMC

4.2.1 *ADAMTS7-Knockdown* bewirkt keine Veränderung des Phänotyps von HAoSMC

Eine Besonderheit glatter Muskelzellen ist ihre hohe phänotypische Variabilität, welche einen wichtigen pathophysiologischen Faktor im Kontext der Atherosklerose darstellt (Alexander & Owens, 2012). Da der pathophysiologische Mechanismus, der dem proatherogenen Effekt von ADAMTS-7 zugrunde liegt, bislang unzureichend verstanden ist, erscheint die Evaluation einer möglichen Beeinflussung des VSMC-Phänotyps durch ADAMTS-7 gerechtfertigt. Darüber hinaus könnte ein hypothetischer *Phenotypic Switch* durch ADAMTS-7 die Fähigkeit von VSMC zur Migration beeinflussen. Die phänotypische Charakterisierung von VSMC in Abhängigkeit von ADAMTS-7 könnte also einen Beitrag zum Verständnis der pathophysiologischen Rolle von ADAMTS-7 liefern. Sie hat darüber hinaus Bedeutung für die Interpretation von Untersuchungen bezüglich des Einflusses von ADAMTS-7 auf VSMC-Migration und -Proliferation.

In der vorliegenden Arbeit zeigten HAoSMC nach *ADAMTS7-Knockdown* keine statistisch signifikante Veränderung der SMC-Differenzierungsmarker Smoothelin, welches als besonders sensitiver Marker gilt (Rensen et al., 2007), und Myosin-11. Die Zellmorphologie veränderte sich infolge des *ADAMTS7-Knockdowns* nicht wesentlich und der Unterschied erreichte keine statistische Signifikanz.

Eine relevante Beeinflussung der zellulären Migrationsfähigkeit durch phänotypische Veränderungen des geringen, beobachteten Ausmaßes erscheint fraglich. Das Ergebnis stimmt mit der Beobachtung von Bauer et al. überein, der zufolge sich der Myosin-11-Gehalt atherosklerotischer Läsionen zwischen *Adamts7^{-/-}* und *Adamts7^{+/+}* Mäusen nicht unterscheidet (Bauer et al., 2015). Die Gruppe beschrieb jedoch andererseits eine höhere neointimale *MYH11*- und *aSMA*-Expression bei *Adamts7-Knockout* (Bauer et al., 2015). Es ist vor diesem Hintergrund auffällig, dass in der vorliegenden Arbeit alle drei in diesem Zusammenhang beurteilten Parameter eine gleichsinnige Änderung aufwiesen, nämlich hin zu einer kontraktilen Differenzierung bei verringerter Expression von *ADAMTS7*. Dies wäre vereinbar mit der vorbeschriebenen verringerten Migrationsfähigkeit ADAMTS-7-defizienter VSMC.

Bemerkenswerterweise passt die Beobachtung zu der in der Literatur beschriebenen Förderung der kontraktilen SMC-Differenzierung durch das ADAMTS-7-Substrat COMP (L. Wang et al., 2009; L. Wang et al., 2010). Des Weiteren führt Mangel an TSP-1, ebenfalls ein Substrat von ADAMTS-7, zu einem synthetischen VSMC-Phänotyp (Krishna & Golledge, 2013). Die Spaltung von COMP und TSP-1 könnte also eine VSMC-Dedifferenzierung durch ADAMTS-7 erklären. Darüber hinaus wäre eine große Effektstärke nicht zu erwarten, da *Adamts7^{-/-}*-Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp aufweisen (Kessler et al., 2015) und die Effektstärke des KHK-Risikolocus *ADAMTS7* im Bereich einer Odds Ratio von 1,07 bis 1,19 liegt (Reilly et al., 2011; Schunkert et al., 2011; The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium, 2011).

Die hier erhobenen Daten könnten deshalb einen Anlass zur weiteren Untersuchung dieses Sachverhalts bieten. Beispielsweise wären Versuche zum VSMC-Phänotyp in der *Adamts7^{-/-}*-Maus auf zellulärer Ebene oder, in Analogie zu den Experimenten von Pu et al. (Pu et al., 2013), ein dahingehender Vergleich der VSMC von *ADAMTS7*-Risiko- versus Nicht-Risikoallelträgern vorstellbar.

4.2.2 *ADAMTS7*-Knockdown beeinflusst nicht die Proliferationsrate von HAoSMC

Die Proliferation von VSMC ist ein bedeutender Faktor in der Atherosklerose (Bennett et al., 2016). Während in frühen atherosklerotischen Läsionen eine gesteigerte VSMC-Proliferation beobachtet wurde, ist sie in fortgeschrittenen Läsionen vermindert (Bennett et al., 2016). In letzterem Fall wird von einem positiven Einfluss stärkerer Proliferation auf die Plaque-Stabilität ausgegangen (Bennett et al., 2016). Darüber hinaus ist die Hyperplasie von VSMC wesentlich an der Neointimabildung im Zusammenhang mit In-Stent-Restenosen beteiligt (Byrne et al., 2015). Außerdem hat die zelluläre Proliferation potentiell Einfluss auf Experimente zur zellulären Migration. Zur Beurteilung einer möglichen Rolle der VSMC-Proliferation in der Vermittlung der Effekte von *ADAMTS7* auf Atherogenese und Neointimabildung wurde daher die Proliferation von HAoSMC bei *ADAMTS7*-Knockdown untersucht.

Das Ergebnis des Experiments war eine geringfügige, statistisch nicht signifikante Zunahme der HAoSMC-Proliferation bei *ADAMTS7-Knockdown*.

Dies stünde im Gegensatz zu einem dedifferenzierenden Effekt von ADAMTS-7, für den es in der Literatur indirekte Hinweise gibt, wie unter Abschnitt 4.2.1 ausgeführt. Es ist jedoch zu betonen, dass sich Proliferation und Differenzierung von SMC nicht gegenseitig ausschließen (Alexander & Owens, 2012).

Nach aktueller Datenlage hat ADAMTS-7 zwar Einfluss auf die Proliferation verschiedener Zelltypen wie Endothelzellen (Kessler et al., 2015), hepatischen Progenitorzellen (Pi et al., 2015) und Chondrozyten (Bai et al., 2009). Es liegt diesbezüglich jedoch nur eine einzelne Studie an VSMC vor, welche eine ADAMTS-7-abhängige Proliferationssteigerung von Ratten-VSMC ergab (L. Zhang et al., 2015). Pu et al. fanden keine Veränderung der SMC-Proliferation bei Vorliegen des *ADAMTS7*-Risikoallels, welches allerdings auch mit keiner relevanten quantitativen Veränderung von ADAMTS-7 einherging (Pu et al., 2013). Dies steht in Einklang mit dem hier berichteten Ergebnis. Eine Zunahme der SMC-Proliferation bei ADAMTS-7-Mangel stünde im Gegensatz zu den Ergebnissen von Zhang et al. (L. Zhang et al., 2015), wäre aber andererseits mit der beschriebenen Hemmung endothelialer Zellproliferation durch ADAMTS-7 vereinbar (Kessler et al., 2015). Eine verstärkte VSMC-Proliferation bei ADAMTS-7-Defizienz könnte zudem eine pathophysiologische Erklärung der Assoziation von ADAMTS-7 mit einem vulnerablen Plaque-Phänotyp bieten (Bengtsson et al., 2017).

Unter methodischen Gesichtspunkten ist auf eine relativ hohe Variabilität der Basalwerte zwischen den einzelnen Versuchswiederholungen hinzuweisen. Diese ist vermutlich auf eine Potenzierung initialer Unterschiede über die Inkubationsfrist hinweg zurückzuführen. Der Hersteller des verwendeten Zellzählers (Scepter® Cell Counter, Merck Millipore®) gibt einen Variationskoeffizienten von ca. 5 - 10 % an (Millipore Corporation, 2010). Die entscheidende Varianz des Ergebnisses, welches sich aus dem Quotienten zwischen *Knockdown* und Kontrolle ergibt, erwies sich jedoch als sehr gering. Nicht zuletzt dürfte hierzu die hohe Anzahl technischer Replikate beigetragen haben.

Allgemein sollte bei fehlender statistischer Signifikanz eine Überinterpretation vermieden werden. Der mögliche Effekt von ADAMTS-7 auf die VSMC-Proliferation scheint kein Ausmaß zu erreichen, welches einen relevanten Störfaktor für die im Rahmen dieses Projekts durchgeführten Migrationsexperimente darstellen würde.

Zudem würde eine durch ADAMTS-7 gehemmte Proliferation den beschriebenen Effekt einer Steigerung der Migration durch dieses Protein am ehesten verringern. Interessant erscheint eine zukünftige Untersuchung dieses Sachverhalts mit einer weiteren methodischen Herangehensweise, wie etwa der Quantifizierung von Zellzyklusmarkern.

4.2.3 Untersuchungen zur Migration von HAoSMC bei *ADAMTS7-Knockdown* unter proatherogenen Bedingungen

Die Migration glatter Gefäßmuskelzellen ist ein zentraler pathophysiologischer Prozess verschiedener vaskulärer Erkrankungen. Insbesondere trägt die Einwanderung von VSMC in die arterielle Intima wesentlich zum Wachstum atherosklerotischer Plaques bei, ebenso wie zur Ausbildung einer zu Restenosen führenden Neointima nach vaskulärer Schädigung, beispielsweise durch Perkutane Koronarangioplastie (PTCA) (Bennett et al., 2016; Byrne et al., 2015; Komatsu et al., 1998). In mehreren Studien wurde eine Verstärkung der VSMC-Migration durch ADAMTS-7 gezeigt (Bauer et al., 2015; L. Wang et al., 2009). Der Nachweis verstärkter VSMC-Migration bei Vorliegen eines KHK-Risikoallels spricht für die pathophysiologische Relevanz dieser Beobachtung (Pu et al., 2013). Bisher wurde der Einfluss von ADAMTS-7 auf die Migrationsfähigkeit von VSMC jedoch noch nie unter spezifischen proatherogenen Bedingungen untersucht. Eine hierbei gesteigerte Effektstärke würde ein weiteres Argument für eine kausale Beteiligung von ADAMTS-7 an der Pathogenese der Atherosklerose darstellen. Dies zu prüfen, war ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit.

4.2.3.1 OxLDL bewirkt morphologische Veränderungen und eine verminderte Expression von Differenzierungsmarkern in HAoSMC

In der vorliegenden Arbeit kam oxLDL als proatherogener Stimulus zur Anwendung. Der Einfluss von oxLDL auf VSMC manifestiert sich maßgeblich in Form deren Dedifferenzierung (Daniel Steinberg & Witztum, 2010). Dieser phänotypische Wandel

stellt ein wesentliches pathogenetisches Element der Atherosklerose dar (Alexander & Owens, 2012). Darüber hinaus migrieren differenzierte VSMC unter physiologischen Bedingungen kaum, sondern erlangen diese Fähigkeit erst im Zuge phänotypischer Veränderungen. Deshalb wurden Anzeichen der VSMC-Dedifferenzierung als Indikator effektiver zellulärer Wirkung von oxLDL verwendet.

Zur Auswahl geeigneter Konzentration und Inkubationszeit wurde die Literatur herangezogen: Cao et al. zeigten eine annähernde Verdopplung des zellulären Cholesterolgehalts in VSMC nach Inkubation mit 50 µg/ml oxLDL für 48 Stunden, während nach 24 Stunden noch keine signifikante Zunahme zu beobachten war (Cao et al., 2017). Pidkovka et al. wiesen eine Dedifferenzierung kultivierter VSMC nach 72-stündiger Inkubation mit oxidierten Phospholipiden (10-100 µg/ml) nach, welche einen wesentlichen Bestandteil von oxLDL darstellen (Pidkovka et al., 2007). Chellan et al. zeigten Schaumzellbildung bei Exposition kultivierter VSMC gegenüber oxLDL für 24 Stunden. Sie verwendeten hierzu allerdings die hohe Konzentration von 200 µg/ml, bei Überschreiten derer sie relevante Zytotoxizität beobachteten (Chellan et al., 2016).

Inkubation mit oxLDL nach dem unter Abschnitt 2.2.14 beschriebenen Protokoll resultierte in der vorliegenden Arbeit in einer signifikanten Abnahme der Expression des SMC-Differenzierungsmarkers *MYH11*. Zudem konnte ein Verlust der charakteristischen, elongierten Gestalt differenzierter SMC zugunsten einer abgerundeteren Form nachgewiesen werden. Somit ist von einem Effekt von oxLDL auf die kultivierten HAoSMC im Sinne eines dedifferenzierenden, proatherogenen Einflusses auszugehen. Für die gegenüber der Veränderung auf mRNA-Ebene relativ geringe, statistisch nicht signifikante Abnahme von Myosin-11 im Western Blot könnte die zeitlich verzögerte Veränderung auf Protein-Ebene verglichen mit der mRNA verantwortlich sein. Angesichts seiner höheren Spezifität für kontraktile differenzierte SMC (Owens et al., 2004; Rensen et al., 2007) erscheint die stärkere Abnahme von Myosin-11 gegenüber α SMA plausibel. Die vorliegende Konstellation ist also mit der zu erwartenden, moderaten Veränderung des HAoSMC-Phänotyps vereinbar. Darüber hinaus spricht sie dafür, dass keine zu ausgeprägte Dedifferenzierung der Zellen induziert wird und wesentliche SMC-typische Eigenschaften erhalten bleiben. Ein weitergehender Differenzierungsverlust von VSMC würde möglicherweise am ehesten der Schaumzellbildung und Vorgängen im Lipid-Kern fortgeschrittener atherosklerotischer Läsionen entsprechen. Dagegen könnte das vorliegende

Zellkultur-Modell besser die Situation *in vivo* während der allmählichen Entwicklung atherosklerotischer Gefäßveränderungen über Jahre hinweg abbilden.

4.2.3.2 ADAMTS7-Knockdown führt in HAoSMC unter proatherogenen

Bedingungen zu einem Trend verminderter Migration

Um Veränderungen in der zellulären Migration von VSMC durch *ADAMTS7-Knockdown* unter proatherogenen Bedingungen valide interpretieren zu können, musste eine Replikation des vorbeschriebenen Effekts unter Normalbedingungen angestrebt werden. Hierbei wiesen *ADAMTS7*-defiziente HAoSMC im *Scratch Wound*-Assay einen Trend zu geringerer Migration auf.

Der beobachtete Effekt steht damit in Übereinstimmung mit der Literatur (Bauer et al., 2015; L. Wang et al., 2009). Im Gegensatz zu dem hier beschriebenen Projekt wurden in den Migrations-Experimenten von Wang et al. und Bauer et al. (Bauer et al., 2015; L. Wang et al., 2009) keine menschlichen VSMC verwendet. Bauer et al. verwendeten VSMC aus *Adamts7*^{-/-}-Mäusen. Die Gruppe konnte signifikante Unterschiede hinsichtlich der VSMC-Migration nur bei zusätzlicher Stimulation durch TNF α nachweisen. TNF α bewirkt eine Heraufregulation von *ADAMTS7* (L. Wang et al., 2009). Es resultiert durch komplettes Ausschalten des Gens auf der einen, und zusätzliche Steigerung der Expression auf der anderen Seite eine wohl wesentlich größere Differenz des *ADAMTS7*-Gehalts, als in der vorliegenden Arbeit. Eine geringere Effektstärke erscheint also plausibel. Wang et al. zeigten eine signifikant gesteigerte VSMC-Migration bei adenoviraler *ADAMTS7*-Überexpression. Dies stellt eine in hohem Maße artifizielle Situation dar und erscheint nicht als Widerspruch zu dem quantitativ geringeren Unterschied in dieser Arbeit. Die Gruppe führte zudem Migrations-Experimente mit *Adamts7-Knockdown*-VSMC durch. Bei einer um ca. 50 % verminderten *Adamts7*-Expression beschreiben die Autoren schon zu dem relativ frühen Zeitpunkt von sechs Stunden nach „*Scratch*“ eine um etwa 50 % verringerte Migration. Dies steht nicht in Einklang mit den Daten von Bauer et al. und wirkt bemerkenswert angesichts der Tatsache, dass *Adamts7*^{-/-}-Mäuse keinen wesentlichen pathologischen Phänotyp aufweisen (Kessler et al., 2015). Möglicherweise wären Umfang und Zeitpunkt des von Wang et al. beobachteten Effekts durch *per se* starke

Migrationsfähigkeit der dort untersuchten VSMC zu erklären. Die in dem vorliegenden Projekt verwendeten VSMC wiesen Eigenschaften kontraktile Differenzierung auf. Da zu den Merkmalen kontraktile differenzierter VSMC eine geringe Migrationsfähigkeit gehört, erscheint die geringere Effektstärke mit einer um 32,0 % verringerten Migration plausibel.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Effekt von ADAMTS-7 auf die VSMC-Migration unter proatherogenen Bedingungen verstärkt sei. Bei der Analyse der Zellmigration von *ADAMTS7-Knockdown*-HAoSMC unter dem Einfluss von oxLDL ergab sich hierfür jedoch kein Anhalt. Tatsächlich war der, auch hier zu beobachtende, Trend geringerer Migration bei *ADAMTS7-Knockdown* schwächer ausgeprägt als in Abwesenheit von oxLDL.

Dieses unerwartete Ergebnis lässt eine Verstärkung von ADAMTS-7-Effekten auf VSMC durch oxLDL unwahrscheinlich wirken. Tatsächlich könnte es sich sogar um den gegenteiligen Effekt handeln, worauf in Abschnitt 4.3.2 näher eingegangen wird. Die Auswirkungen von oxLDL auf VSMC scheinen stark von den exakten Bedingungen, wie Inkubationsdauer, Konzentration und Oxidierungsgrad abzuhängen (Negre-Salvayre et al., 2017). Da es sich hier um die erste Untersuchung der ADAMTS-7-abhängigen VSMC-Migration unter oxLDL-Einfluss handelt, wären anderslautende Ergebnisse bei veränderter oxLDL-Konzentration oder Inkubationszeit denkbar (vgl. Abschnitt 4.3.2). Derartige Experimente könnten Bestandteil weiterführender Studien sein. Ferner erscheinen entsprechende Untersuchungen an Endothelzellen interessant, deren Migrationspotential ebenfalls von ADAMTS-7 beeinflusst wird (Kessler et al., 2015).

4.3 Untersuchungen zur Regulation der *ADAMTS7*-Expression in HAoSMC

4.3.1 Die EZM-Bestandteile Laminin, Fibronectin und Kollagen I bewirken

keine Veränderung der *ADAMTS7*-Expression in HAoSMC

Die EZM der arteriellen Media und in atherosklerotischen Plaques wird im Wesentlichen von VSMC gebildet, insbesondere wenn diese einen synthetischen Phänotyp aufweisen (Lacolley et al., 2012; Wagenseil & Mecham, 2009). VSMC tragen zudem zum Abbau der vaskulären EZM durch EZM-degradierende Proteasen bei

(Lacolley et al., 2012), welchen auch die ADAMTS-Familie zugerechnet wird (Kelwick et al., 2015). Umgekehrt werden VSMC als Ausdruck von Zell-Matrix-Interaktionen von der sie umgebenden EZM beeinflusst (Alexander & Owens, 2012). Hinsichtlich des Effekts von ADAMTS-7 auf die Migrationsfähigkeit von VSMC wurden EZM-abhängige Unterschiede gefunden (Bauer et al., 2015). Da keines der dabei geprüften EZM-Proteine Fibronectin, Laminin und Kollagen I als ein Substrat von ADAMTS-7 bekannt ist, erscheint eine Beeinflussung der *ADAMTS7*-Expression in VSMC durch die umgebende EZM als Grundlage des Effekts denkbar. Daher wurde im Rahmen des vorliegenden Projekts untersucht, ob sich die Expression von *ADAMTS7* in HAoSMC je nach Beschichtung der Kulturplatten mit Fibronectin, Laminin oder Kollagen I unterscheidet.

Es zeigten sich hierbei jedoch keine statistisch signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kultur auf unbeschichteten Platten.

Die geprüften Matrix-Elemente, insbesondere Laminin und Fibronectin, verändern bekanntermaßen den Differenzierungsstatus von VSMC, und zwar in entgegengesetzte Richtungen (Beamish et al., 2010; Orr et al., 2009; Thyberg & Hultgardhnilsson, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Modulation des VSMC-Phänotyps durch Cholesterol zu keiner relevanten Veränderung der *ADAMTS7*-Expression führt. Dieser Befund wird somit durch die hier diskutierten Ergebnisse untermauert.

Die ausgeprägteste Veränderung der *ADAMTS7*-Expression in VSMC zeigte sich bei Beschichtung der Kulturplatten mit Fibronectin. Trotz auch hierbei verfehlter statistischer Signifikanz soll in diesem Zusammenhang auf zwei Aspekte hingewiesen werden. Zum einen wurde ein vermehrtes Vorliegen von Fibronectin in vulnerablen Plaques beschrieben (Langley et al., 2017). Da dies auch für ADAMTS-7 publiziert wurde (Bengtsson et al., 2017), erscheint ein ursächlicher Zusammenhang prinzipiell vorstellbar. Zum anderen ist eine Aktivierung von ERK durch Fibronectin bekannt (Roovers et al., 1999; Zhu & Assoian, 1995). Dementsprechend stünde eine unter dem Einfluss von Fibronectin gesteigerte *ADAMTS7*-Expression in Einklang mit den in dieser Arbeit beschriebenen Hinweisen auf eine Expressionsverminderung bei Hemmung des ERK-Signalwegs. Ein derartiger Zusammenhang könnte in Hinblick auf die Plaque-Vulnerabilität pathophysiologisch relevant sein.

Angesichts dessen könnte eine Replikation dieses Experiments hinsichtlich Fibronectin also sinnvoll erscheinen, erweitert um eine Bestimmung des

Phosphorylierungsgrades von ERK1/2. In diesem Zusammenhang wäre, sobald ein geeigneter Antikörper verfügbar ist, eine ergänzende Untersuchung von ADAMTS-7 auf Protein-Ebene wünschenswert.

4.3.2 OxLDL vermindert die *ADAMTS7*-Expression in HAoSMC

Um aus den in GWAS identifizierten KHK-Risikoloci ein verbessertes pathophysiologisches Verständnis abzuleiten, ist neben der Charakterisierung der betreffenden Proteine die Untersuchung der Regulation der Genexpression notwendig (Nurnberg et al., 2016). Abgesehen von der relativ gut etablierten Expressionssteigerung durch TNF α (Bauer et al., 2015; Lai et al., 2014; L. Wang et al., 2009), ist die diesbezügliche Datenlage zu *ADAMTS7* dünn. Aufgrund seiner pathogenetischen Bedeutung für die Atherosklerose wurde hier untersucht, ob oxLDL die *ADAMTS7*-Expression in VSMC beeinflusst. Dabei zeigte sich eine deutliche Abnahme der *ADAMTS7*-mRNA in HAoSMC bei Inkubation mit oxLDL.

Es lag bislang nur eine veröffentlichte Untersuchung der *ADAMTS7*-Expression unter dem Einfluss von oxLDL vor. Hierbei war keine relevante Veränderung nachweisbar (L. Wang et al., 2009). Die Vergleichbarkeit dieser Studie mit der vorliegenden Arbeit wird jedoch durch folgende Punkte erschwert: Aus der Publikation von Wang et al. geht das verwendete oxLDL nicht hervor. Es gibt jedoch erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Herstellungsverfahren hinsichtlich des Oxidierungsgrades mit relevanten biologischen Auswirkungen (Meyer et al., 2014). Des Weiteren wäre die Spezies, aus der das LDL stammt, von Interesse. Relevant könnte auch der relativ kurze Serumentzug sein. In der vorliegenden Arbeit wurden für analoge Versuche doppelt so lange Inkubationszeiten in FKS-freiem Medium angewandt. Zudem geht aus der Publikation nicht ausdrücklich hervor, ob die oxLDL-Exposition in FKS-freiem Medium erfolgte. Nicht zuletzt fehlt eine Angabe zur Inkubationszeit mit oxLDL, was für einen aussagekräftigen Vergleich mit den entsprechenden Versuchen der vorliegenden Arbeit unabdingbar wäre.

Die Verminderung der *ADAMTS7*-Expression unter oxLDL-Einfluss passt zu dem unter oxLDL geringer erscheinenden Effekt des *ADAMTS7-Knockdowns* auf die VSMC-Migration, von dem in der vorliegenden Arbeit berichtet wird. In Zusammenschau sprechen diese Beobachtungen gegen eine Verstärkung ADAMTS-

7-vermittelter Effekte in VSMC durch oxLDL. Darüber hinaus lassen sich diese Ergebnisse sogar als möglicher Hinweis auf eine Subgruppe von Patienten interpretieren, in welchen die Auswirkungen eines *ADAMTS7*-Risikoallels auf die Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose geringer ausgeprägt sein könnten (vgl. Abschnitt 4.3.2.2).

Bei Verfügbarkeit eines validen anti-ADAMTS-7-Antikörpers wäre eine Replikation dieses Experiments mit zusätzlicher Quantifizierung des Proteins wünschenswert. Hierbei sollte beachtet werden, dass es Hinweise auf von der Expositionszeit abhängige, möglicherweise biphasische Effekte von oxLDL gibt (vgl. Abschnitt 4.3.2.3). Es wäre daher eine Bestimmung von ADAMTS-7 und der *ADAMTS7*-Expression zu mehreren Zeitpunkten der oxLDL-Inkubation sinnvoll.

4.3.2.1 Die oxLDL-induzierte *ADAMTS7*-Expressionsverminderung ist ein spezifischer Effekt

OxLDL übt durch Induktion eines phänotypischen Wandels weitreichende Effekte auf VSMC aus. Daher stellte sich die Frage, inwieweit die Expressionsverminderung von *ADAMTS7* in VSMC einen spezifischen oder lediglich einen Nebeneffekt der Dedifferenzierung darstellt. Diese Überlegung wird auch durch den Umstand nahegelegt, dass TNF α und PDGF sowohl die *ADAMTS7*-Expression steigern als auch eine dedifferenzierende Wirkung auf VSMC haben (Owens et al., 2004; L. Wang et al., 2009). Dahingegen senkt TGF β die *ADAMTS7*-Expression und trägt zu kontraktile Differenzierung bei (Owens et al., 2004; L. Wang et al., 2009). Da oxLDL von SMC aufgenommen wird (Ricciarelli et al., 2000) ist zudem unklar, ob oxLDL über eine Cholesterol-Beladung der Zellen oder über spezifische, Rezeptor-vermittelte Mechanismen auf die *ADAMTS7*-Expression wirkt. Es wurde gezeigt, dass mit Chol:M β CD inkubierte VSMC Cholesterol aufnehmen, anreichern und dadurch eine Dedifferenzierung erfahren (Rong et al., 2003). Eine Untersuchung der *ADAMTS7*-Expression in VSMC nach Behandlung mit Chol:M β CD erschien daher geeignet, um sowohl Dedifferenzierung als auch zelluläre Cholesterol-Beladung als Ursachen der Expressionsverminderung durch oxLDL auszuschließen. Die Inkubation von VSMC

mit Chol:M β CD führte zu einer ähnlich ausgeprägten Dedifferenzierung wie oxLDL. Die *ADAMTS7*-Expression zeigte sich jedoch unverändert.

Somit steht die Herunterregulation von *ADAMTS7* durch oxLDL nicht in Widerspruch zu der vorbeschriebenen Steigerung der *ADAMTS7*-Expression durch die dedifferenzierenden Zytokine TNF α und PDGF (L. Wang et al., 2009). Auch die in dieser Arbeit beschriebene Unabhängigkeit der *ADAMTS7*-Expression von EZM-Bestandteilen, welche den Differenzierungsstatus von SMC beeinflussen (Beamish et al., 2010), spricht gegen eine wesentliche Abhängigkeit der *ADAMTS7*-Expression vom SMC-Phänotyp. Somit scheint die Herunterregulation von *ADAMTS7* in VSMC ein spezifischer Effekt von oxLDL, und keine Folge der zellulären Cholesterobeladung oder der VSMC-Dedifferenzierung zu sein.

4.3.2.2 Die Erhöhung des KHK-Risikos durch das *ADAMTS7*-Risikoallele

korreliert invers mit genetisch prognostiziertem LDL-C

Der *ADAMTS7*-Risikogenotyp geht mit einer mehrfach replizierten Erhöhung des KHK-Risikos einher (vgl. Abschnitt 1.4.1). Dies wird nicht über Beeinflussung eines etablierten kardiovaskulären Risikofaktors vermittelt, was *ADAMTS-7* zu einem vielversprechenden Kandidaten bei der Suche nach neuen Behandlungsansätzen der KHK macht. Von entscheidender Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Charakterisierung von Patientensubgruppen, welche in besonderem Ausmaß von einer perspektivischen therapeutischen Inhibition von *ADAMTS-7* profitieren könnten. Die Verminderung der *ADAMTS7*-Expression in oxLDL-exponierten VSMC, von der in der vorliegenden Arbeit berichtet wird, könnte dahingehend einen Hinweis geben.

Es war im Weiteren eine inverse Korrelation der Höhe des, mittels genetischem Risikoscore prognostizierten, LDL-C mit dem Ausmaß der Erhöhung des KHK-Risikos bei Vorliegen eines *ADAMTS7*-Risikoallels festzustellen. Obgleich diese Ergebnisse unabhängiger Replikation bedürfen, könnten sie in Zusammenschau mit den diskutierten Befunden aus der Zellkultur als Hinweis auf eine Patientensubgruppe im obigen Sinne gelten. Eine therapeutische *ADAMTS-7*-Inhibition könnte demnach in Patienten mit niedrigem LDL-C besonders vielversprechend sein. Die Indikation zur strengen medikamentösen Senkung von LDL-C bei KHK- und Schlaganfall-

Risikopatienten, sowie die Möglichkeit diese durch neu entwickelte Medikamenten-Klassen, wie PCSK9-Inhibitoren, bei immer mehr Patienten zu erreichen, verleihen dem zusätzliche Relevanz.

Ein allgemeiner Nachteil zellkultureller Untersuchungen ist ihre im Einzelfall unklare Übertragbarkeit auf übergeordnete biologische Systeme. Diese Problematik könnte durch die charakteristische, hohe phänotypische Plastizität von VSMC und die auffallende Variabilität von Befunden im Zusammenhang mit oxLDL (Negre-Salvayre et al., 2017) noch verstärkt werden. Die Prüfung der Relevanz der hier beschriebenen Verminderung der *ADAMTS7*-Expression in oxLDL-exponierten VSMC *in vivo* ist also dringend geboten. Die Beobachtung einer inversen Korrelation zwischen *ADAMTS7*-Effektstärke und LDL-C-GRS kann dies nicht ersetzen. Sie könnte jedoch als ein Hinweis angesehen werden, der für die Relevanz einer Gen-Umwelt-Interaktion zwischen oxLDL und *ADAMTS7* im menschlichen Organismus spricht.

4.3.2.3 Die Verminderung der *ADAMTS7*-Expression durch oxLDL in HAoSMC ist unabhängig von PPAR γ und wird zum Teil über LOX-1 vermittelt

Da es sich bei der Verminderung der *ADAMTS7*-Expression in humanen VSMC um einen spezifischen Effekt von oxLDL zu handeln scheint, stellt sich die Frage nach hieran beteiligten Signalwegen.

PPAR γ ist ein nukleärer Rezeptor, der unter anderem Einfluss auf die Speicherung von Fettsäuren, die Differenzierung von Adipozyten und den Glukosemetabolismus hat (Derosa et al., 2018; S. B. Wang et al., 2016). Außerdem sind entzündungshemmende und antiangiogenetische Effekte bekannt (Derosa et al., 2018; S. B. Wang et al., 2016). Eine Aktivierung von PPAR γ wurde unter anderem für oxLDL gezeigt (Nagy et al., 1998; S. B. Wang et al., 2016). Es sei angemerkt, dass sowohl eine Aktivierung (Nagy et al., 1998) als auch eine Herunterregulation (Cao et al., 2017) von PPAR γ durch oxLDL beschrieben wurden, was möglicherweise Ausdruck einer dualen Signalübertragung von oxLDL (Negre-Salvayre et al., 2017) sein könnte.

Rosiglitazon ist ein orales Antidiabetikum aus der Klasse der Insulin-Sensitizer, dessen Zulassung in der Europäischen Union aufgrund einer Erhöhung des kardiovaskulären

Risikos derzeit ruht (EMA, 2010a, 2010b). Die Substanz ist ein potenter und selektiver Agonist von PPAR γ (Forman et al., 1995; Lehmann et al., 1995). Des Weiteren machen auch die antiinflammatorischen Effekte von Rosiglitazon sowie eine im Tiermodell beobachtete Verminderung atherosklerotischer Läsionen (Giannini et al., 2004) eine Herunterregulation von *ADAMTS7* durch dieses Medikament denkbar. Auch eine Hemmung der Migration von VSMC durch Rosiglitazon wurde beschrieben (Goetze et al., 1999).

Die Stimulation von humanen VSMC mit Rosiglitazon bewirkte jedoch in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der *ADAMTS7*-Expression. PPAR γ scheint demnach nicht in die Regulation der *ADAMTS7*-Expression eingebunden zu sein. Ein möglicher Störfaktor des hier beschriebenen Experiments könnte allerdings die Hemmung der *Cyclin-dependent kinase 5* (Cdk5) durch Rosiglitazon sein (Choi et al., 2010). Diese phosphoryliert PPAR γ und führt dadurch zu veränderter Genexpression, ohne PPAR γ jedoch pauschal zu agonisieren oder antagonisieren (Choi et al., 2010). Da LOX-1 als der bezüglich der Bindung von oxLDL wichtigste *Scavenger*-Rezeptor unter proatherogenen Bedingungen bezeichnet wird (Chistiakov et al., 2016), wurden auch dieser Rezeptor und ihm nachgeschaltete Signalwege als Mediatoren der *ADAMTS7*-Expressionsverminderung durch oxLDL in Erwägung gezogen. LOX-1 bewirkt seine Effekte auf VSMC unter anderem maßgeblich über den ERK1/2-Signalweg (Tanigawa et al., 2006; Yamamoto et al., 2015). Allgemeiner wurde gezeigt, dass ERK1/2 eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Effekte von oxLDL auf VSMC spielt (Chahine et al., 2009). Es sei ergänzend erwähnt, dass ERK1/2 auch Einfluss auf die VSMC-Migration hat (Graf et al., 1997; Shi et al., 2010). Es wurde in VSMC eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2, was einer Aktivierung des Signalwegs entspricht, nach oxLDL-Exposition für wenige Minuten (Tanigawa et al., 2006) bis 24 Stunden nachgewiesen. Umgekehrt wurde bei 48-stündiger Exposition eine Inhibition gezeigt (Chahine et al., 2009).

Wie beschrieben, konnte die Abnahme der Phosphorylierung von ERK1/2 bei oxLDL-Exposition repliziert werden. Die Inkubationsdauer von 48 Stunden entsprach dabei der von Chahine et al. beschriebenen. Auch die Konzentration von oxLDL war ähnlich: 50 $\mu\text{g/ml}$ in der genannten Studie, 40 $\mu\text{g/ml}$ in der vorliegenden Arbeit (Chahine et al., 2009). Dieses Ergebnis ist mit einer Einbindung des ERK1/2-Signalwegs in die Herunterregulation von *ADAMTS7* durch oxLDL vereinbar. Es ist in Unterstützung dieser Hypothese bemerkenswert, dass sowohl für TNF α als auch für PDGF, welche

die Expression von *ADAMTS7* in VSMC steigern (L. Wang et al., 2009), eine Aktivierung von ERK1/2 in VSMC gezeigt wurde (Peppel et al., 2005). Allgemein erscheint die Herunterregulation von *ADAMTS7*, welches die inflammatorische Erkrankung Atherosklerose fördert, durch Hemmung eines proinflammatorischen Signalwegs plausibel.

In der vorliegenden Arbeit wird eine teilweise Reversibilität der oxLDL-induzierten *ADAMTS7*-Expressionsverminderung durch *OLR1-Knockdown* beschrieben. Dies spricht für eine Beteiligung von LOX-1 an der Herunterregulation von *ADAMTS7* durch oxLDL. Der Befund könnte zudem als Indiz einer Beteiligung des ERK1/2-Signalwegs gewertet werden. LOX-1 ist ein bekannter Vermittler oxLDL-abhängiger Effekte auf VSMC. Im Zuge dessen wurde jedoch eine Aktivierung statt einer Inhibition des ERK1/2-Signalwegs beschrieben, allerdings bei sehr kurzer oxLDL-Exposition von unter einer halben Stunde (Tanigawa et al., 2006; Yamamoto et al., 2015). Es ist demzufolge bekannt, dass LOX-1 in die Vermittlung kurzfristiger oxLDL-Effekte auf VSMC, einschließlich der ERK1/2-Aktivierung, involviert ist. Ob der Rezeptor auch Anteil an den teils konträren Folgen längerfristiger oxLDL-Exposition hat, ist unklar. Die Befunde der vorliegenden Arbeit scheinen hierfür zu sprechen, eine abschließende Beurteilung ist allein auf dieser Basis jedoch nicht möglich. Ein sinnvoller nächster Schritt im Rahmen weiterführender Studien könnte eine Bestimmung der ERK1/2-Phosphorylierung nach oxLDL-Exposition bei *OLR1-Knockdown* sein.

Die Ergebnisse hinsichtlich ERK1/2 und LOX-1 implizieren zudem einen möglichen Erklärungsansatz für die fehlende Auswirkung der PPAR γ -Aktivierung auf die *ADAMTS7*-Expression. Zum einen wurde eine Verminderung der Expression von *OLR1* durch Glitazone beschrieben (Mehta et al., 2003), was nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit möglicherweise einer Verminderung der *ADAMTS7*-Expression entgegenwirken könnte. Darüber hinaus ist bekannt, dass Glitazone, neben ihrer agonistischen Wirkung auf PPAR γ , den *G protein-coupled receptor 40* (GPR-40) binden und aktivieren (S. B. Wang et al., 2016). GPR-40 wiederum ist in der Lage ERK1/2 zu aktivieren (S. B. Wang et al., 2016). Rosiglitazon wirkt also einerseits über PPAR γ antiinflammatorisch und hemmt die Expression von NF- κ B-Zielgenen (Pascual et al., 2005), zu welchen auch *ADAMTS7* gehört (Lai et al., 2014; L. Wang et al., 2009). Andererseits aktiviert Rosiglitazon über GPR-40 den proinflammatorischen ERK1/2-Signalweg (S. B. Wang et al., 2016), wodurch, gestützt auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, eine Expressionssteigerung von

ADAMTS7 zu erwarten wäre. Es ist also denkbar, dass sich diese gegensätzlichen Effekte von Rosiglitazon in Bezug auf die Expression von *ADAMTS7* gegenseitig nivellieren.

Abschließend sei noch einmal auf biphasische Effekte von oxLDL hingewiesen. OxLDL kann je nach Inkubationsdauer sowohl eine Aktivierung als auch eine Inhibition des ERK1/2-Signalwegs bewirken (Chahine et al., 2009). Hierzu passt eine kürzlich publizierte Interpretation der häufigen Widersprüche oxLDL-betreffender Veröffentlichungen: dieser zufolge bewirkt oxLDL in vaskulären Zellen „duale Effekte“, abhängig unter anderem von der Beschaffenheit und Konzentration von oxLDL (Negre-Salvayre et al., 2017). Hier wird die These aufgestellt, dass oxLDL über LOX-1 und den ERK1/2-Signalweg Einfluss auf die *ADAMTS7*-Expression in VSMC nimmt. Eine kurzfristige oxLDL-Exposition bewirkt nach aktueller Datenlage eine Aktivierung des proinflammatorischen ERK1/2-Signalwegs (Tanigawa et al., 2006; Yamamoto et al., 2015). Dies ließe vor dem Hintergrund der Heraufregulation von *ADAMTS7* infolge verschiedener proinflammatorischer Einflüsse (L. Wang et al., 2009) eine Zunahme der *ADAMTS7*-Expression erwarten. Wie in methodisch ähnlichen, in der Literatur beschriebenen Experimenten (Chahine et al., 2009), schien eine längere oxLDL-Inkubation in der vorliegenden Arbeit eine Inhibition des ERK1/2-Signalwegs hervorzurufen. Dies ging mit einer Verminderung der Expression von *ADAMTS7* einher. Zu einem frühen Zeitpunkt der oxLDL-Exposition wäre demnach eine Steigerung der *ADAMTS7*-Expression anzunehmen. Die vorliegende Arbeit enthält keine Bestimmung der *ADAMTS7*-Expression nach kurzer oxLDL-Exposition. Eine Untersuchung des Zeitverlaufs der *ADAMTS7*-Expression in VSMC unter dem Einfluss von oxLDL im Rahmen zukünftiger Studien könnte Aufschluss über das Zutreffen der in dieser Arbeit entwickelten These geben.

Die Heraufregulation von *ADAMTS7* nach Gefäßverletzung sowie in der Atherogenese scheint transientser Natur zu sein (Bauer et al., 2015). Eine ebenso transiente Aktivierung des proinflammatorischen ERK1/2-Signalwegs könnte, angesichts der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, als Grundlage dessen infrage kommen. Bemerkenswert erscheint ferner, dass eine Hemmung von LOX-1 und von ERK1/2 durch Statine beschrieben wurde (Hofnagel et al., 2006; Li et al., 2001; Z. Y. Zhang et al., 2013). In der Akutphase einer Gefäßverletzung könnte eine Statin-Therapie somit möglicherweise eine transiente Induktion von *ADAMTS7* abmildern.

4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Als erster Abschnitt dieses Promotionsprojekts wurden fünf kommerziell verfügbare anti-ADAMTS-7-Antikörper in Western Blot und Immunzytochemie systematisch evaluiert. Angesichts der großen Bedeutung spezifischer Antikörper für zahlreiche molekularbiologische Methoden könnte dies weiteren, ADAMTS-7-betreffenden Forschungsprojekten zugutekommen.

Die vorliegende Arbeit enthält die ersten Untersuchungen des VSMC-Phänotyps in Abhängigkeit der *ADAMTS7*-Expression auf Ebene der Einzelzelle und an humanem Material. Der Trend zu kontraktiler Differenzierung bei verminderter *ADAMTS7*-Expression hat mögliche Implikationen für die pathophysiologische Rolle von ADAMTS-7 und könnte Folge seiner Funktion als COMP-Protease sein.

Obwohl die Steigerung der Zellmigration der am besten untersuchte Effekt von ADAMTS-7 auf VSMC ist, liegen bisher keine diesbezüglichen Untersuchungen unter proatherogenen Bedingungen vor. In diesem Projekt ergab sich kein Anhalt für einen verstärkten Effekt von ADAMTS-7 auf die VSMC-Migration unter dem Einfluss von proatherogenem oxLDL.

Hierzu passend zeigte sich in oxLDL-exponierten VSMC unerwartet eine verminderte *ADAMTS7*-Expression. Anhand vorliegender GWAS-Daten wurde eine inverse Korrelation zwischen einem LDL-C-GRS und der Effektstärke des *ADAMTS7*-KHK-Risikoalles gefunden. Diese Gen-Umwelt-Interaktion kann als Hinweis auf eine Patientensubgruppe verstanden werden, die besonders von einer perspektivischen, therapeutischen ADAMTS-7-Inhibition profitieren könnte. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Verminderung der *ADAMTS7*-Expression um einen spezifischen Effekt von oxLDL handelt. Es ergaben sich Anhaltspunkte dafür, dass dieser teilweise über LOX-1 und den ERK1/2-Signalweg vermittelt wird. Aus der Literatur lassen sich Hinweise auf eine mögliche Zeitabhängigkeit dieser Effekte ableiten. Angesichts des transienten Charakters einer pathologischen Heraufregulation von *ADAMTS7 in vivo* könnte dies Thema zukünftiger Studien sein.

5 Quellenverzeichnis

- Abcam. (abgerufen 15.06.2017a). Product Datasheet Anti-Adamts7 Antibody Ab45044. In. Cambridge, GB: Abcam.
- Abcam. (abgerufen 15.06.2017b). Product Datasheet Product Datasheet Anti-Adamts7 Antibody Ab201083 In. Cambridge, GB: Abcam.
- Abnova. (abgerufen 04.02.2018). Datasheet Adamts7 Polyclonal Antibody (A01). In. Taipei, Taiwan.
- Alberts, B. J., Alexander; Lewis, Julian; Morgan, David; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. (2015). *Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition*. New York, NY, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group, LCC.
- Alexander, M. R., & Owens, G. K. (2012). Epigenetic Control of Smooth Muscle Cell Differentiation and Phenotypic Switching in Vascular Development and Disease. *Annu Rev Physiol*, 74, 13-40.
- Anderson, J. L., & Morrow, D. A. (2017). Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*, 376(21), 2053-2064.
- Ascione, F., Vasaturo, A., Caserta, S., D'Esposito, V., Formisano, P., & Guido, S. (2016). Comparison between Fibroblast Wound Healing and Cell Random Migration Assays in Vitro. *Experimental Cell Research*, 347(1), 123-132.
- Ashby, W. J., & Zijlstra, A. (2012). Established and Novel Methods of Interrogating Two-Dimensional Cell Migration. *Integrative Biology*, 4(11), 1338-1350.
- Bai, X. H., Wang, D. W., Kong, L., Zhang, Y., Luan, Y., Kobayashi, T., Kronenberg, H. M., Yu, X. P., & Liu, C. J. (2009). Adamts-7, a Direct Target of Pthrp, Adversely Regulates Endochondral Bone Growth by Associating with and Inactivating Gep Growth Factor. *Molecular and Cellular Biology*, 29(15), 4201-4219.
- Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., & Atherton, P. J. (2017). An Overview of Technical Considerations for Western Blotting Applications to Physiological Research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 27(1), 4-25.
- Bauer, R. C., Tohyama, J., Cui, J., Cheng, L., Yang, J., Zhang, X., Ou, K., Paschos, G. K., Zheng, X. L., Parmacek, M. S., Rader, D. J., & Reilly, M. P. (2015).

- Knockout of Adamts7, a Novel Coronary Artery Disease Locus in Humans, Reduces Atherosclerosis in Mice. *Circulation*, 131(13), 1202-1213.
- Beamish, J. A., He, P., Kottke-Marchant, K., & Marchant, R. E. (2010). Molecular Regulation of Contractile Smooth Muscle Cell Phenotype: Implications for Vascular Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B-Reviews*, 16(5), 467-491.
- Bengtsson, E., Hultman, K., Duner, P., Ascitutto, G., Almgren, P., Orho-Melander, M., Melander, O., Nilsson, J., Hultgardh-Nilsson, A., & Goncalves, I. (2017). Adamts-7 Is Associated with a High-Risk Plaque Phenotype in Human Atherosclerosis. *Scientific Reports*, 7, 12.
- Bennett, M. R., Sinha, S., & Owens, G. K. (2016). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 692-702.
- Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R., & Falk, E. (2014). Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circulation Research*, 114(12), 1852-1866.
- Byrne, R. A., Joner, M., & Kastrati, A. (2015). Stent Thrombosis and Restenosis: What Have We Learned and Where Are We Going? The Andreas Gruntzig Lecture Esc 2014. *European Heart Journal*, 36(47), 3320-+.
- Cao, X. J., Zhang, L. L., Chen, C. H., Wang, Q. S., Guo, L., Ma, Q. L., Deng, P., Zhu, G., Li, B. H., Pi, Y., Long, C. Y., Zhang, L., Yu, Z. P., Zhou, Z., & Li, J. C. (2017). The Critical Role of Abcg1 and Ppar Gamma/Lxr Alpha Signaling in Tlr4 Mediates Inflammatory Responses and Lipid Accumulation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Cell and Tissue Research*, 368(1), 145-157.
- Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Guertin, D. A., Chang, J. H., Lindquist, R. A., Moffat, J., Golland, P., & Sabatini, D. M. (2006). Cellprofiler: Image Analysis Software for Identifying and Quantifying Cell Phenotypes. *Genome Biology*, 7(10), R100.
- Chahine, M. N., Blackwood, D. P., Dibrov, E., Richard, M. N., & Pierce, G. N. (2009). Oxidized Ldl Affects Smooth Muscle Cell Growth through Mapk-Mediated Actions on Nuclear Protein Import. *J Mol Cell Cardiol*, 46(3), 431-441.
- Chellan, B., Reardon, C. A., Getz, G. S., & Bowman, M. A. H. (2016). Enzymatically Modified Low-Density Lipoprotein Promotes Foam Cell Formation in Smooth Muscle Cells Via Macropinocytosis and Enhances Receptor-Mediated Uptake of Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 36(6), 1101-+.

- Cherepanova, O. A., Pidkovka, N. A., Sarmiento, O. F., Yoshida, T., Gan, Q., Adiguzel, E., Bendeck, M. P., Berliner, J., Leitinger, N., & Owens, G. K. (2009). Oxidized Phospholipids Induce Type VIII Collagen Expression and Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Circulation Research*, *104*(5), 609-U112.
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2016). Lox-1-Mediated Effects on Vascular Cells in Atherosclerosis. *Cell Physiol Biochem*, *38*(5), 1851-1859.
- Choi, J. H., Banks, A. S., Estall, J. L., Kajimura, S., Bostrom, P., Laznik, D., Ruas, J. L., Chalmers, M. J., Kamenecka, T. M., Bluher, M., Griffin, P. R., & Spiegelman, B. M. (2010). Anti-Diabetic Drugs Inhibit Obesity-Linked Phosphorylation of Ppar Gamma by Cdk5. *Nature*, *466*(7305), 451-U451.
- Deloukas, P., Kanoni, S., Willenborg, C., Farrall, M., Assimes, T. L., Thompson, J. R., Ingelsson, E., Saleheen, D., Erdmann, J., Goldstein, B. A., Stirrups, K., Konig, I. R., Cazier, J. B., Johansson, A., Hall, A. S., Lee, J. Y., Willer, C. J., Chambers, J. C., Esko, T., Folkersen, L., Goel, A., Grundberg, E., Havulinna, A. S., Ho, W. K., Hopewell, J. C., Eriksson, N., Kleber, M. E., Kristiansson, K., Lundmark, P., Lytikainen, L. P., Rafelt, S., Shungin, D., Strawbridge, R. J., Thorleifsson, G., Tikkanen, E., Van Zuydam, N., Voight, B. F., Waite, L. L., Zhang, W. H., Ziegler, A., Absher, D., Altshuler, D., Balmforth, A. J., Barroso, I., Braund, P. S., Burgdorf, C., Claudi-Boehm, S., Cox, D., Dimitriou, M., Do, R., Doney, A. S. F., El Mokhtari, N., Eriksson, P., Fischer, K., Fontanillas, P., Franco-Cereceda, A., Gigante, B., Groop, L., Gustafsson, S., Hager, J., Hallmans, G., Han, B. G., Hunt, S. E., Kang, H. M., Illig, T., Kessler, T., Knowles, J. W., Kolovou, G., Kuusisto, J., Langenberg, C., Langford, C., Leander, K., Lokki, M. L., Lundmark, A., McCarthy, M. I., Meisinger, C., Melander, O., Mihailov, E., Maouche, S., Morris, A. D., Muller-Nurasyid, M., Nikus, K., Peden, J. F., Rayner, N. W., Rasheed, A., Rosinger, S., Rubin, D., Rumpf, M. P., Schafer, A., Sivananthan, M., Song, C., Stewart, A. F. R., Tan, S. T., Thorgeirsson, G., van der Schoot, C. E., Wagner, P. J., Wells, G. A., Wild, P. S., Yang, T. P., Amouyel, P., Arveiler, D., Basart, H., Boehnke, M., Boerwinkle, E., Brambilla, P., Cambien, F., Cupples, A. L., de Faire, U., Dehghan, A., Diemert, P., Epstein, S. E., Evans, A., Ferrario, M. M., Ferrieres, J., Gauguier, D., Go, A. S., Goodall, A. H., Gudnason, V., Hazen, S. L., Holm, H., Iribarren, C., Jang, Y., Kahonen, M., Kee, F., Kim, H. S., Klopp, N., Koenig, W., Kratzer, W., Kuulasmaa, K., Laakso, M., Laaksonen, R., Lee, J. Y., Lind, L., Ouwehand, W. H., Parish, S., Park, J. E., Pedersen, N. L., Peters, A., Quertermous, T., Rader, D. J., Salomaa, V., Schadt, E., Shah, S. H., Sinisalo, J., Stark, K., Stefansson, K., Tregouet, D. A., Virtamo, J., Wallentin, L., Wareham, N., Zimmermann, M. E., Nieminen, M. S., Hengstenberg, C., Sandhu, M. S., Pastinen, T., Syvanen, A. C., Hovingh, G. K., Dedoussis, G., Franks, P. W., Lehtimaki, T., Metspalu, A., Zalloua, P. A., Siegbahn, A., Schreiber, S., Ripatti, S., Blankenberg, S. S., Perola, M., Clarke, R., Boehm, B. O., O'Donnell, C., Reilly, M. P., Marz, W., Collins, R., Kathiresan, S., Hamsten, A., Kooner, J. S., Thorsteinsdottir, U., Danesh, J., Palmer, C. N. A., Roberts, R., Watkins, H., Schunkert, H., Samani, N. J., Consortium, C. A. D., Consortium, D., Consortium, C., Mu, T. C., & Wellcome Trust Case, C. (2013).

Large-Scale Association Analysis Identifies New Risk Loci for Coronary Artery Disease. *Nature Genetics*, 45(1), 25-U52.

Derosa, G., Sahebkar, A., & Maffioli, P. (2018). The Role of Various Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Their Ligands in Clinical Practice. *Journal of Cellular Physiology*, 233(1), 153-161.

Derveaux, S., Vandesompele, J., & Hellemans, J. (2010). How to Do Successful Gene Expression Analysis Using Real-Time Pcr. *Methods*, 50(4), 227-230.

Du, Y. Y., Gao, C., Liu, Z. Y., Wang, L., Liu, B., He, F., Zhang, T., Wang, Y., Wang, X. J., Xu, M. J., Luo, G. Z., Zhu, Y., Xu, Q. B., Wang, X., & Kong, W. (2012). Upregulation of a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs-7 by Mir-29 Repression Mediates Vascular Smooth Muscle Calcification. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 32(11), 2580-+.

Du, Y. Y., Wang, Y., Wang, L., Liu, B., Tian, Q. Y., Liu, C. J., Zhang, T., Xu, Q. B., Zhu, Y., Oldberg, A., Qi, Y. F., Tang, C. C., Kong, W., & Wang, X. (2011). Cartilage Oligomeric Matrix Protein Inhibits Vascular Smooth Muscle Calcification by Interacting with Bone Morphogenetic Protein-2. *Circulation Research*, 108(8), 917-U979.

EMA. (2010a). *Press Release: European Medicines Agency Recommends Suspension of Avandia, Avandamet and Avaglim*

EMA. (2010b). *Questions and Answers on the Suspension of Rosiglitazone-Containing Medicines (Avandia, Avandamet and Avaglim)*.

Erdmann, J., Großhennig, A., Braund, P. S., König, I. R., Hengstenberg, C., Hall, A. S., Linsel-Nitschke, P., Kathiresan, S., Wright, B., Trégouët, D.-A., Cambien, F., Bruse, P., Aherrahrou, Z., Wagner, A. K., Stark, K., Schwartz, S. M., Salomaa, V., Elosua, R., Melander, O., Voight, B. F., O'Donnell, C. J., Peltonen, L., Siscovick, D. S., Altshuler, D., Merlini, P. A., Peyvandi, F., Bernardinelli, L., Ardissino, D., Schillert, A., Blankenberg, S., Zeller, T., Wild, P., Schwarz, D. F., Tiret, L., Perret, C., Schreiber, S., Mokhtari, N. E. E., Schäfer, A., März, W., Renner, W., Bugert, P., Klüter, H., Schrezenmeir, J., Rubin, D., Ball, S. G., Balmforth, A. J., Wichmann, H. E., Meitinger, T., Fischer, M., Meisinger, C., Baumert, J., Peters, A., Ouwehand, W. H., Italian Atherosclerosis, T., Vascular Biology Working, G., Myocardial Infarction Genetics, C., Wellcome Trust Case Control, C., Cardiogenics, C., Deloukas, P., Thompson, J. R., Ziegler, A., Samani, N. J., & Schunkert, H. (2009). New Susceptibility Locus for Coronary Artery Disease on Chromosome 3q22.3. *Nature Genetics*, 41, 280.

- Erdmann, J., Kessler, T., Munoz Venegas, L., & Schunkert, H. (2018). A Decade of Genome-Wide Association Studies for Coronary Artery Disease: The Challenges Ahead. *Cardiovasc Res*, *114*(9), 1241-1257.
- Erdmann, J., Willenborg, C., Nahrstaedt, J., Preuss, M., König, I. R., Baumert, J., Linsel-Nitschke, P., Gieger, C., Tennstedt, S., Belcredi, P., Aherrahrou, Z., Klopp, N., Loley, C., Stark, K., Hengstenberg, C., Bruse, P., Freyer, J., Wagner, A. K., Medack, A., Lieb, W., Großhennig, A., Sager, H. B., Reinhardt, A., Schäfer, A., Schreiber, S., El Mokhtari, N. E., Raaz-Schrauder, D., Illig, T., Garlachs, C. D., Ekici, A. B., Reis, A., Schrezenmeir, J., Rubin, D., Ziegler, A., Wichmann, H. E., Doering, A., Meisinger, C., Meitinger, T., Peters, A., & Schunkert, H. (2011). Genome-Wide Association Study Identifies a New Locus for Coronary Artery Disease on Chromosome 10p11.23. *European Heart Journal*, *32*(2), 158-168.
- Ference, B. A., Ginsberg, H. N., Graham, I., Ray, K. K., Packard, C. J., Bruckert, E., Hegele, R. A., Krauss, R. M., Raal, F. J., Schunkert, H., Watts, G. F., Boren, J., Fazio, S., Horton, J. D., Masana, L., Nicholls, S. J., Nordestgaard, B. G., van de Sluis, B., Taskinen, M. R., Tokgozoglu, L., Landmesser, U., Laufs, U., Wiklund, O., Stock, J. K., Chapman, M. J., & Catapano, A. L. (2017). Low-Density Lipoproteins Cause Atherosclerotic Cardiovascular Disease. 1. Evidence from Genetic, Epidemiologic, and Clinical Studies. A Consensus Statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J*, *38*(32), 2459-2472.
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., & Evans, R. M. (1995). 15-Deoxy-Delta(12,14)-Prostaglandin J(2) Is a Ligand for the Adipocyte Determination Factor Ppar-Gamma. *Cell*, *83*(5), 803-812.
- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. (2016). Global, Regional, and National Incidence, Prevalence, and Years Lived with Disability for 310 Diseases and Injuries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, *388*(10053), 1545-1602.
- GBD 2015 Mortality Causes of Death Collaborators. (2016). Global, Regional, and National Life Expectancy, All-Cause Mortality, and Cause-Specific Mortality for 249 Causes of Death, 1980-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, *388*(10053), 1459-1544.
- Giannini, S., Serio, M., & Galli, A. (2004). Pleiotropic Effects of Thiazolidinediones: Taking a Look Beyond Antidiabetic Activity. *Journal of Endocrinological Investigation*, *27*(10), 982-991.
- Goetze, S., Xi, X. P., Kawano, H., Gotlibowski, T., Fleck, E., Hsueh, W. A., & Law, R. E. (1999). Ppar Gamma-Ligands Inhibit Migration Mediated by Multiple Chemoattractants in Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *33*(5), 798-806.

- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., & Brown, M. S. (1979). Binding Site on Macrophages That Mediates Uptake and Degradation of Acetylated Low Density Lipoprotein, Producing Massive Cholesterol Deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 333-337.
- Graf, K., Xi, X. P., Yang, D., Fleck, E., Hsueh, W. A., & Law, R. E. (1997). Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Is Involved in Platelet-Derived Growth Factor-Directed Migration by Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension*, 29(1), 334-339.
- Grammer, T. B., Hoffmann, M. M., Renner, W., Kleber, M. E., Winkelmann, B. R., Böhm, B. O., & März, W. (2011). Apolipoprotein E Genotypes, Circulating C-Reactive Protein and Angiographic Coronary Artery Disease: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*, 215(2), 487-493.
- Gresch, O., Engel, F. B., Nestic, D., Tran, T. T., England, H. M., Hickman, E. S., Korner, I., Gan, L., Chen, S., Castro-Obregon, S., Hammermann, R., Wolf, J., Muller-Hartmann, H., Nix, M., Siebenkotten, G., Kraus, G., & Lun, K. (2004). New Non-Viral Method for Gene Transfer into Primary Cells. *Methods*, 33(2), 151-163.
- Guo, F. J., Lai, Y. J., Tian, Q. Y., Lin, E. A., Kong, L., & Liu, C. J. (2010). Granulin-Epithelin Precursor Binds Directly to Adamts-7 and Adamts-12 and Inhibits Their Degradation of Cartilage Oligomeric Matrix Protein. *Arthritis and Rheumatism*, 62(7), 2023-2036.
- Hansmeier, N., Buttigieg, J., Kumar, P., Pelle, S., Choi, K. Y., Kopriva, D., & Chao, T. C. (2018). Identification of Mature Atherosclerotic Plaque Proteome Signatures Using Data-Independent Acquisition Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 17(1), 164-176.
- Hansson, G. K., Libby, P., & Tabas, I. (2015). Inflammation and Plaque Vulnerability. *J Intern Med*, 278(5), 483-493.
- Herold, G. (2018). *Innere Medizin*. Köln: Gerd Herold.
- Herrington, W., Lacey, B., Sherliker, P., Armitage, J., & Lewington, S. (2016). Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res*, 118(4), 535-546.
- Hofnagel, O., Luechtenborg, B., Eschert, H., Weissen-Plenz, G., Severs, N. J., & Robenek, H. (2006). Pravastatin Inhibits Expression of Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 (Lox-1) in Watanabe Heritable

Hyperlipidemic Rabbits: A New Pleiotropic Effect of Statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(3), 604-610.

Holmes, D. L., & Stellwagen, N. C. (1991). Estimation of Polyacrylamide Gel Pore Size from Ferguson Plots of Linear DNA Fragments. II. Comparison of Gels with Different Crosslinker Concentrations, Added Agarose and Added Linear Polyacrylamide. *Electrophoresis*, 12(9), 612-619.

HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute. (abgerufen 05.02.2018). Hugo Gene Nomenclature Committee. Abgerufen 05.02.2018, from HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute www.genenames.org

Hurskainen, T. L., Hirohata, S., Seldin, M. F., & Apte, S. S. (1999). Adam-Ts5, Adam-Ts6, and Adam-Ts7, Novel Members of a New Family of Zinc Metalloproteases - General Features and Genomic Distribution of the Adam-Ts Family. *Journal of Biological Chemistry*, 274(36), 25555-25563.

Invitrogen by life technologies. (2013). Lipofectamine® Rnaimax Reagent. In *Protocol Pub. No. MAN0007825 Rev.1.0*: invitrogen by life technologies.

Johnson, I. D. (2010). *The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 11th Edition* (Vol. 11): Life Technologies Corporation.

Jonkman, J. E. N., Cathcart, J. A., Xu, F., Bartolini, M. E., Amon, J. E., Stevens, K. M., & Colarusso, P. (2014). An Introduction to the Wound Healing Assay Using Live-Cell Microscopy. *Cell Adhesion & Migration*, 8(5), 440-451.

Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G. N., & Edwards, D. R. (2015). The Adamts (a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) Family. *Genome Biology*, 16(1), 113.

Kessler, T., Zhang, L., Liu, Z., Yin, X., Huang, Y., Wang, Y., Fu, Y., Mayr, M., Ge, Q., Xu, Q., Zhu, Y., Wang, X., Schmidt, K., de Wit, C., Erdmann, J., Schunkert, H., Aherrahrou, Z., & Kong, W. (2015). Adamts-7 Inhibits Re-Endothelialization of Injured Arteries and Promotes Vascular Remodeling through Cleavage of Thrombospondin-1. *Circulation*, 131(13), 1191-1201.

Khera, A. V., & Kathiresan, S. (2017). Genetics of Coronary Artery Disease: Discovery, Biology and Clinical Translation. *Nat Rev Genet*, 18(6), 331-344.

Komatsu, R., Ueda, M., Naruko, T., Kojima, A., & Becker, A. E. (1998). Neointimal Tissue Response at Sites of Coronary Stenting in Humans - Macroscopic, Histological, and Immunohistochemical Analyses. *Circulation*, 98(3), 224-233.

- Krishna, S. M., & Golledge, J. (2013). The Role of Thrombospondin-1 in Cardiovascular Health and Pathology. *International Journal of Cardiology*, 168(2), 692-706.
- Kuno, K., Kanada, N., Nakashima, E., Fujiki, F., Ichimura, F., & Matsushima, K. (1997). Molecular Cloning of a Gene Encoding a New Type of Metalloproteinase-Disintegrin Family Protein with Thrombospondin Motifs as an Inflammation Associated Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 272(1), 556-562.
- Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2006). Western Blotting. *Methods*, 38(4), 283-293.
- Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z. L., & Michel, J. B. (2012). The Vascular Smooth Muscle Cell in Arterial Pathology: A Cell That Can Take on Multiple Roles. *Cardiovascular Research*, 95(2), 194-204.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lai, Y. J., Bai, X. H., Zhao, Y. P., Tian, Q. Y., Liu, B., Lin, E. A., Chen, Y. Q., Lee, B., Appleton, C. T., Beier, F., Yu, X. P., & Liu, C. J. (2014). Adamts-7 Forms a Positive Feedback Loop with Tnf-Alpha in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(8), 1575-1584.
- Langley, S. R., Willeit, K., Didangelos, A., Matic, L. P., Skroblin, P., Barallobre-Barreiro, J., Lengquist, M., Rungger, G., Kapustin, A., Kedenko, L., Molenaar, C., Lu, R. F., Barwari, T., Suna, G., Yin, X. K., Iglseder, B., Paulweber, B., Willeit, P., Shalhoub, J., Pasterkamp, G., Davies, A. H., Monaco, C., Hedin, U., Shanahan, C. M., Willeit, J., Kiechl, S., & Mayr, M. (2017). Extracellular Matrix Proteomics Identifies Molecular Signature of Symptomatic Carotid Plaques. *Journal of Clinical Investigation*, 127(4), 1546-1560.
- Laslett, L. J., Alagona, P., Jr., Clark, B. A., 3rd, Drozda, J. P., Jr., Saldivar, F., Wilson, S. R., Poe, C., & Hart, M. (2012). The Worldwide Environment of Cardiovascular Disease: Prevalence, Diagnosis, Therapy, and Policy Issues: A Report from the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*, 60(25 Suppl), S1-49.
- Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smitholiver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M., & Kliewer, S. A. (1995). An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High-Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma(Ppar-Gamma). *Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 12953-12956.

- Li, D. Y., Chen, H. J., & Mehta, J. L. (2001). Statins Inhibit Oxidized-Ldl-Mediated Lox-1 Expression, Uptake of Oxidized-Ldl and Reduction in Pkb Phosphorylation. *Cardiovasc Res*, *52*(1), 130-135.
- Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011). Progress and Challenges in Translating the Biology of Atherosclerosis. *Nature*, *473*(7347), 317-325.
- Life Technologies Corporation. (2011). Insert Pn 4457171 Rev. B, Silencer® Select Pre-Designed, Validated, and Custom Designed Sirna; Custom Select Sirna, Ambion® in Vivo Pre-Designed, Custom Designed, and Custom Sirna, Standard Purity. In. Carlsbad, CA 92008 USA: Life Technologies Corporation.
- Liu, C. J., Kong, W., Ilalov, K., Yu, S., Xu, K., Prazak, L., Fajardo, M., Sehgal, B., & Di Cesare, P. E. (2006). Adamts-7: A Metalloproteinase That Directly Binds to and Degrades Cartilage Oligomeric Matrix Protein. *FASEB J*, *20*(7), 988-990.
- Löwel, H., Meisinger, C., Heier, M., & Hörmann, A. (2005). The Population-Based Acute Myocardial Infarction (Ami) Registry of the Monica/Kora Study Region of Augsburg. [Das bevölkerungsbezogene Herzinfarktregister der MONICA/KORA-Studienregion Augsburg]. *Gesundheitswesen*, *67*(S 01), 31-37.
- Luan, Y., Kong, L., Howell, D. R., Ilalov, K., Fajardo, M., Bai, X. H., Di Cesare, P. E., Goldring, M. B., Abramson, S. B., & Liu, C. J. (2008). Inhibition of Adamts-7 and Adamts-12 Degradation of Cartilage Oligomeric Matrix Protein by Alpha-2-Macroglobulin. *Osteoarthritis and Cartilage*, *16*(11), 1413-1420.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Taschenlehrbuch Histologie, 3. Auflage*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, *407*(6801), 233-241.
- McPherson, R., & Tybjaerg-Hansen, A. (2016). Genetics of Coronary Artery Disease. *Circ Res*, *118*(4), 564-578.
- Mehta, J. L., Hu, B., Chen, J. W., & Li, D. Y. (2003). Pioglitazone Inhibits Lox-1 Expression in Human Coronary Artery Endothelial Cells by Reducing Intracellular Superoxide Radical Generation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, *23*(12), 2203-2208.
- Meyer, J. M., Ji, A. L., Cai, L., & van der Westhuyzen, D. R. (2014). Minimally Oxidized Ldl Inhibits Macrophage Selective Cholesteryl Ester Uptake and Native Ldl-Induced Foam Cell Formation. *Journal of lipid research*, *55*(8), 1648-1656.

Millipore Corporation. (2010). The Scepter™ Cell Counter Performs with High Precision and Speed across Multiple Cell Lines. In.

Molecular Probes Inc. (2006). Cyquant® Nf Cell Proliferation Assay Kit In. Eugene, OR 97402, USA.

Muller, M., Kessler, T., Schunkert, H., Erdmann, J., & Tennstedt, S. (2016). Classification of Adamts Binding Sites: The First Step toward Selective Adamts7 Inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 471(3), 380-385.

Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G. A., Chen, H., & Evans, R. M. (1998). Oxidized Ldl Regulates Macrophage Gene Expression through Ligand Activation of Ppar β . *Cell*, 93(2), 229-240.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (abgerufen 05.02.2018). Entrez Gene. Abgerufen 05.02.2018, from National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov/gene

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (abgerufen 20.12.2017). National Center for Biotechnology Information. Pubchem Compound Database; Cid=5997. Available from National Center for Biotechnology Information PubChem Abgerufen 20.12.2017, from National Center for Biotechnology Information <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5997>

Negre-Salvayre, A., Auge, N., Camare, C., Bacchetti, T., Ferretti, G., & Salvayre, R. (2017). Dual Signaling Evoked by Oxidized Ldls in Vascular Cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 106, 118-133.

Nikpay, M., Goel, A., Won, H. H., Hall, L. M., Willenborg, C., Kanoni, S., Saleheen, D., Kyriakou, T., Nelson, C. P., Hopewell, J. C., Webb, T. R., Zeng, L., Dehghan, A., Alver, M., Armasu, S. M., Auro, K., Bjornes, A., Chasman, D. I., Chen, S. F., Ford, I., Franceschini, N., Gieger, C., Grace, C., Gustafsson, S., Huang, J., Hwang, S. J., Kim, Y. K., Kleber, M. E., Lau, K. W., Lu, X. F., Lu, Y. C., Lytikainen, L. P., Mihailov, E., Morrison, A. C., Pervjakova, N., Qu, L. M., Rose, L. M., Salfati, E., Saxena, R., Scholz, M., Smith, A. V., Tikkanen, E., Uitterlinden, A., Yang, X. L., Zhang, W. H., Zhao, W., de Andrade, M., de Vries, P. S., van Zuydam, N. R., Anand, S. S., Bertram, L., Beutner, F., Dedoussis, G., Frossard, P., Gauguier, D., Goodall, A. H., Gottesman, O., Haber, M., Han, B. G., Huang, J., Jalilzadeh, S., Kessler, T., Konig, I. R., Lannfelt, L., Lieb, W., Lind, L., Lindgren, C. M., Lokki, M. L., Magnusson, P. K., Mallick, N. H., Mehra, N., Meitinger, T., Memon, F. U. R., Morris, A. P., Nieminen, M. S., Pedersen, N. L., Peters, A., Rallidis, L. S., Rasheed, A., Samuel, M., Shah, S. H., Sinisalo, J., Stirrups, K. E., Trompet, S., Wang, L. Y., Zaman, K. S., Ardissino, D., Boerwinkle, E., Borecki, I. B., Bottinger, E. P., Buring, J. E., Chambers, J. C., Collins, R., Cupples, L. A., Danesh, J., Demuth, I., Elosua, R., Epstein, S. E., Esko, T., Feitosa, M. F., Franco, O. H.,

- Franzosi, M. G., Granger, C. B., Gu, D. F., Gudnason, V., Hall, A. S., Hamsten, A., Harris, T. B., Hazen, S. L., Hengstenberg, C., Hofman, A., Ingelsson, E., Iribarren, C., Jukema, J. W., Karhunen, P. J., Kim, B. J., Kooner, J. S., Kullo, I. J., Lehtimaki, T., Loos, R. J. F., Melander, O., Metspalu, A., Marz, W., Palmer, C. N., Perola, M., Quertermous, T., Rader, D. J., Ridker, P. M., Ripatti, S., Roberts, R., Salomaa, V., Sanghera, D. K., Schwartz, S. M., Seedorf, U., Stewart, A. F., Stott, D. J., Thiery, J., Zalloua, P. A., O'Donnell, C. J., Reilly, M. P., Assimes, T. L., Thompson, J. R., Erdmann, J., Clarke, R., Watkins, H., Kathiresan, S., McPherson, R., Deloukas, P., Schunkert, H., Samani, N. J., Farrall, M., & Consortium, C. A. D. (2015). A Comprehensive 1000 Genomes-Based Genome-Wide Association Meta-Analysis of Coronary Artery Disease. *Nature Genetics*, *47*(10), 1121-+.
- Nikpay, M., Stewart, A. F. R., & McPherson, R. (2017). Partitioning the Heritability of Coronary Artery Disease Highlights the Importance of Immune-Mediated Processes and Epigenetic Sites Associated with Transcriptional Activity. *Cardiovascular Research*, *113*(8), 973-983.
- Nurnberg, S. T., Zhang, H., Hand, N. J., Bauer, R. C., Saleheen, D., Reilly, M. P., & Rader, D. J. (2016). From Loci to Biology: Functional Genomics of Genome-Wide Association for Coronary Disease. *Circ Res*, *118*(4), 586-606.
- O'Donnell, C. J., Kavousi, M., Smith, A. V., Kardina, S. L. R., Feitosa, M. F., Hwang, S. J., Sun, Y. V., Province, M. A., Aspelund, T., Dehghan, A., Hoffmann, U., Bielak, L. F., Zhang, Q. Y., Eiriksdottir, G., van Duijn, C. M., Fox, C. S., de Andrade, M., Kraja, A. T., Sigurdsson, S., Elias-Smale, S. E., Murabito, J. M., Launer, L. J., van der Lugt, A., Kathiresan, S., Krestin, G. P., Herrington, D. M., Howard, T. D., Liu, Y. M., Post, W., Mitchell, B. D., O'Connell, J. R., Shen, H. Q., Shuldiner, A. R., Altshuler, D., Elosua, R., Salomaa, V., Schwartz, S. M., Siscovick, D. S., Voight, B. F., Bis, J. C., Glazer, N. L., Psaty, B. M., Boerwinkle, E., Heiss, G., Blankenberg, S., Zeller, T., Wild, P. S., Schnabel, R. B., Schillert, A., Ziegler, A., Munzel, T., White, C. C., Rotter, J. I., Nalls, M., Oudkerk, M., Johnson, A. D., Newman, A. B., Uitterlinden, A. G., Massaro, J. M., Cunningham, J., Harris, T. B., Hofman, A., Peyser, P. A., Borecki, I. B., Cupples, L. A., Gudnason, V., Witteman, J. C. M., & Consortium, C. A. (2011). Genome-Wide Association Study for Coronary Artery Calcification with Follow-up in Myocardial Infarction. *Circulation*, *124*(25), 2855-U2255.
- Olsen, J. G., & Kragelund, B. B. (2014). Who Climbs the Tryptophan Ladder? On the Structure and Function of the Wsxws Motif in Cytokine Receptors and Thrombospondin Repeats. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *25*(3), 337-341.
- Orr, A. W., Lee, M. Y., Lemmon, J. A., Yurdagul, A., Gomez, M. F., Bortz, P. D. S., & Wamhoff, B. R. (2009). Molecular Mechanisms of Collagen Isotype-Specific Modulation of Smooth Muscle Cell Phenotype. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, *29*(2), 225-231.

- Owens, G. K. (1995). Regulation of Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells. *Physiol Rev*, 75(3), 487-517.
- Owens, G. K., Kumar, M. S., & Wamhoff, B. R. (2004). Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol Rev*, 84(3), 767-801.
- Pascual, G., Fong, A. L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A. C., Perissi, V., Rose, D. W., Willson, T. M., Rosenfeld, M. G., & Glass, C. K. (2005). A Sumoylation-Dependent Pathway Mediates Transrepression of Inflammatory Response Genes by Ppar-Gamma. *Nature*, 437(7059), 759-763.
- Peppel, K., Zhang, L. S., Orman, E. S., Hagen, P. O., Amalfitano, A., Brian, L., & Freedman, N. J. (2005). Activation of Vascular Smooth Muscle Cells by Tnf and Pdgf: Overlapping and Complementary Signal Transduction Mechanisms. *Cardiovascular Research*, 65(3), 674-682.
- Petri, S., & Meister, G. (2013). Sirna Design Principles and Off-Target Effects. *Methods Mol Biol*, 986, 59-71.
- Pi, L. Y., Jorgensen, M., Oh, S. H., Protopapadakis, Y., Gjymishka, A., Brown, A., Robinson, P., Liu, C. J., Scott, E. W., Schultz, G. S., & Petersen, B. E. (2015). A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin Type I Motif 7 a New Protease for Connective Tissue Growth Factor in Hepatic Progenitor/Oval Cell Niche. *American Journal of Pathology*, 185(6), 1552-1563.
- Pidkovka, N. A., Cherepanova, O. A., Yoshida, T., Alexander, M. R., Deaton, R. A., Thomas, J. A., Leitinger, N., & Owens, G. K. (2007). Oxidized Phospholipids Induce Phenotypic Switching of Vascular Smooth Muscle Cells in Vivo and in Vitro. *Circulation Research*, 101(8), 792-801.
- Pu, X. Y., Xiao, Q. Z., Kiechl, S., Chan, K., Ng, F. L., Gor, S., Poston, R. N., Fang, C. C., Patel, A., Senver, E. C., Shaw-Hawkins, S., Willeit, J., Liu, C. J., Zhu, J. H., Tucker, A. T., Xu, Q. B., Caulfield, M. J., & Ye, S. (2013). Adamts7 Cleavage and Vascular Smooth Muscle Cell Migration Is Affected by a Coronary-Artery-Disease-Associated Variant. *American Journal of Human Genetics*, 92(3), 366-374.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. (2012). *Duale Reihe Biochemie, 3. Auflage*. Stuttgart: Thieme.
- Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (abgerufen 30.10.2017). Merops the Peptidase Database Abgerufen 30.10.2017, from EMBL-European Bioinformatics Institute <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/pepsum?id=M12.231>

- Reilly, M. P., Li, M. Y., He, J., Ferguson, J. F., Stylianou, I. M., Mehta, N. N., Burnett, M. S., Devaney, J. M., Knouff, C. W., Thompson, J. R., Horne, B. D., Stewart, A. F. R., Assimes, T. L., Wild, P. S., Allayee, H., Nitschke, P. L., Patel, R. S., Martinelli, N., Girelli, D., Quyyumi, A. A., Anderson, J. L., Erdmann, J., Hall, A. S., Schunkert, H., Quertermous, T., Blankenberg, S., Hazen, S. L., Roberts, R., Kathiresan, S., Samani, N. J., Epstein, S. E., Rader, D. J., Myocardial Infarction Genetics, C., & Wellcome Trust Case Control, C. (2011). Identification of Adamts7 as a Novel Locus for Coronary Atherosclerosis and Association of Abo with Myocardial Infarction in the Presence of Coronary Atherosclerosis: Two Genome-Wide Association Studies. *Lancet*, 377(9763), 383-392.
- Rensen, S. S. M., Doevendans, P., & van Eys, G. (2007). Regulation and Characteristics of Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Diversity. *Netherlands Heart Journal*, 15(3), 100-108.
- Ricciarelli, R., Zingg, J. M., & Azzi, A. (2000). Vitamin E Reduces the Uptake of Oxidized Ldl by Inhibiting Cd36 Scavenger Receptor Expression in Cultured Aortic Smooth Muscle Cells. *Circulation*, 102(1), 82-87.
- Rong, J. X., Shapiro, M., Trogan, E., & Fisher, E. A. (2003). Transdifferentiation of Mouse Aortic Smooth Muscle Cells to a Macrophage-Like State after Cholesterol Loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(23), 13531-13536.
- Roovers, K., Davey, G., Zhu, X. Y., Bottazzi, M. E., & Assoian, R. K. (1999). Alpha 5 Beta 1 Integrin Controls Cyclin D1 Expression by Sustaining Mitogen-Activated Protein Kinase Activity in Growth Factor-Treated Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 10(10), 3197-3204.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle-Cell Anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Saleheen, D., Zhao, W., Young, R., Nelson, C. P., Ho, W., Ferguson, J. F., Rasheed, A., Ou, K., Nurnberg, S. T., Bauer, R. C., Goel, A., Do, R., Stewart, A. F. R., Hartiala, J., Zhang, W. H., Thorleifsson, G., Strawbridge, R. J., Sinisalo, J., Kanoni, S., Sedaghat, S., Marouli, E., Kristiansson, K., Zhao, J. H., Scott, R., Gauguier, D., Shah, S. H., Smith, A. V., van Zuydam, N., Cox, A. J., Willenborg, C., Kessler, T., Zeng, L. Y., Province, M. A., Ganna, A., Lind, L., Pedersen, N. L., White, C. C., Joensuu, A., Kleber, M. E., Hall, A. S., Marz, W., Salomaa, V., O'Donnell, C., Ingelsson, E., Feitosa, M. F., Erdmann, J., Bowden, D. W., Palmer, C. N. A., Gudnason, V., De Faire, U., Zalloua, P., Wareham, N., Thompson, J. R., Kuulasmaa, K., Dedoussis, G., Perola, M., Dehghan, A., Chambers, J. C., Kooner, J., Allayee, H., Deloukas, P., McPherson, R., Stefansson, K., Schunkert, H., Kathiresan, S., Farrall, M., Frossard, P. M., Rader, D. J., Samani, N. J., Reilly, M. P., Promis, &

Cardiogramplusc4D. (2017). Loss of Cardioprotective Effects at the Adamts7 Locus as a Result of Gene-Smoking Interactions. *Circulation*, 135(24), 2336-+.

Samani, N. J., Erdmann, J., Hall, A. S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., Dixon, R. J., Meitinger, T., Braund, P., Wichmann, H.-E., Barrett, J. H., König, I. R., Stevens, S. E., Szymczak, S., Tregouet, D.-A., Iles, M. M., Pahlke, F., Pollard, H., Lieb, W., Cambien, F., Fischer, M., Ouwehand, W., Blankenberg, S., Balmforth, A. J., Baessler, A., Ball, S. G., Strom, T. M., Brænne, I., Gieger, C., Deloukas, P., Tobin, M. D., Ziegler, A., Thompson, J. R., & Schunkert, H. (2007). Genomewide Association Analysis of Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, 357(5), 443-453.

Sandison, M. E., Dempster, J., & McCarron, J. G. (2016). The Transition of Smooth Muscle Cells from a Contractile to a Migratory, Phagocytic Phenotype: Direct Demonstration of Phenotypic Modulation. *J Physiol*, 594(21), 6189-6209.

Santa Cruz Biotechnology. (abgerufen 24.06.2017). Adamts-7 (P-16): Sc-163642 In. Dallas, US: Santa Cruz Biotechnology.

Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T., & Masaki, T. (1997). An Endothelial Receptor for Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Nature*, 386(6620), 73-77.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis. *Nature Methods*, 9, 676.

Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing Real-Time Pcr Data by the Comparative Ct Method. *Nature Protocols*, 3, 1101.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). Nih Image to Imagej: 25 Years of Image Analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675.

Schunkert, H., König, I. R., Kathiresan, S., Reilly, M. P., Assimes, T. L., Holm, H., Preuss, M., Stewart, A. F. R., Barbalic, M., Gieger, C., Absher, D., Aherrahrou, Z., Allayee, H., Altshuler, D., Anand, S. S., Andersen, K., Anderson, J. L., Ardissino, D., Ball, S. G., Balmforth, A. J., Barnes, T. A., Becker, D. M., Becker, L. C., Berger, K., Bis, J. C., Boehholdt, S. M., Boerwinkle, E., Braund, P. S., Brown, M. J., Burnett, M. S., Buysschaert, I., Carlquist, J. F., Chen, L., Cichon, S., Codd, V., Davies, R. W., Dedoussis, G., Dehghan, A., Demissie, S., Devaney, J. M., Diemert, P., Do, R., Doering, A., Eifert, S., El Mokhtari, N. E., Ellis, S. G., Elosua, R., Engert, J. C., Epstein, S. E., de Faire, U., Fischer, M., Folsom, A. R., Freyer, J., Gigante, B., Girelli, D., Gretarsdottir, S., Gudnason, V., Gulcher, J. R., Halperin, E., Hammond, N., Hazen, S. L., Hofman, A., Horne, B. D., Illig, T., Iribarren, C., Jones, G. T., Jukema, J. W., Kaiser, M. A., Kaplan, L. M., Kastelein, J. J. P., Khaw, K. T., Knowles, J. W.,

- Kolovou, G., Kong, A., Laaksonen, R., Lambrechts, D., Leander, K., Lettre, G., Li, M. Y., Lieb, W., Loley, C., Lotery, A. J., Mannucci, P. M., Maouche, S., Martinelli, N., McKeown, P. P., Meisinger, C., Meitinger, T., Melander, O., Merlini, P. A., Mooser, V., Morgan, T., Muhleisen, T. W., Muhlestein, J. B., Munzel, T., Musunuru, K., Nahrstaedt, J., Nelson, C. P., Nothen, M. M., Olivieri, O., Patel, R. S., Patterson, C. C., Peters, A., Peyvandi, F., Qu, L., Quyyumi, A. A., Rader, D. J., Rallidis, L. S., Rice, C., Rosendaal, F. R., Rubin, D., Salomaa, V., Sampietro, M. L., Sandhu, M. S., Schadt, E., Schafer, A., Schillert, A., Schreiber, S., Schrezenmeir, J., Schwartz, S. M., Siscovick, D. S., Sivananthan, M., Sivapalaratnam, S., Smith, A., Smith, T. B., Snoep, J. D., Soranzo, N., Spertus, J. A., Stark, K., Stirrups, K., Stoll, M., Tang, W. H. W., Tennstedt, S., Thorgeirsson, G., Thorleifsson, G., Tomaszewski, M., Uitterlinden, A. G., van Rij, A. M., Voight, B. F., Wareham, N. J., Wells, G. A., Wichmann, H. E., Wild, P. S., Willenborg, C., Wittteman, J. C. M., Wright, B. J., Ye, S., Zeller, T., Ziegler, A., Cambien, F., Goodall, A. H., Cupples, L. A., Quertermous, T., Marz, W., Hengstenberg, C., Blankenberg, S., Ouwehand, W. H., Hall, A. S., Deloukas, P., Thompson, J. R., Stefansson, K., Roberts, R., Thorsteinsdottir, U., O'Donnell, C. J., McPherson, R., Erdmann, J., Samani, N. J., & Consortium, C. A. (2011). Large-Scale Association Analysis Identifies 13 New Susceptibility Loci for Coronary Artery Disease. *Nature Genetics*, 43(4), 333-U153.
- Shi, Z. D., Ji, X. Y., Berardi, D. E., Qazi, H., & Tarbell, J. M. (2010). Interstitial Flow Induces Mmp-1 Expression and Vascular Smc Migration in Collagen I Gels Via an Erk1/2-Dependent and C-Jun-Mediated Mechanism. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 298(1), H127-H135.
- Sigma Aldrich. (abgerufen 15.06.2017). Hpa045284 Sigma Anti-Adamts7 Antibody Produced in Rabbit Abgerufen von <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/hpa045284?lang=de®ion=DE>
- Skoog, L., & Tani, E. (2011). Immunocytochemistry: An Indispensable Technique in Routine Cytology. *Cytopathology*, 22(4), 215-229.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem*, 150(1), 76-85.
- Somerville, R. P. T., Longpré, J.-M., Apel, E. D., Lewis, R. M., Wang, L. W., Sanes, J. R., Leduc, R., & Apte, S. S. (2004). Adamts7b, the Full-Length Product of the Adamts7 Gene, Is a Chondroitin Sulfate Proteoglycan Containing a Mucin Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35159-35175.
- Stary, H. C., Chandler, A. B., Glagov, S., Guyton, J. R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., & Wissler, R. W. (1994). A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis.

- A Report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 89(5), 2462-2478.
- Steinberg, D. (2009). The Ldl Modification Hypothesis of Atherogenesis: An Update. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S376-381.
- Steinberg, D., & Witztum, J. L. (2010). Oxidized Low-Density Lipoprotein and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(12), 2311-2316.
- Sun, Y. Y., & Chen, X. P. (2011). Ox-Ldl-Induced Lox-1 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells: Role of Reactive Oxygen Species. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 25(5), 572-579.
- Tabas, I., Garcia-Cardena, G., & Owens, G. K. (2015). Recent Insights into the Cellular Biology of Atherosclerosis. *J Cell Biol*, 209(1), 13-22.
- Takeda, S. (2016). Adam and Adamts Family Proteins and Snake Venom Metalloproteinases: A Structural Overview. *Toxins*, 8(5), 35.
- Tan, K., Duquette, M., Liu, J. H., Dong, Y., Zhang, R., Joachimiak, A., Lawler, J., & Wang, J. H. (2002). Crystal Structure of the Tsp-1 Type 1 Repeats: A Novel Layered Fold and Its Biological Implication. *J Cell Biol*, 159(2), 373-382.
- Tanigawa, H., Miura, S., Zhang, B., Uehara, Y., Matsuo, Y., Fujino, M., Sawamura, T., & Saku, K. (2006). Low-Density Lipoprotein Oxidized to Various Degrees Activates Erk1/2 through Lox-1. *Atherosclerosis*, 188(2), 245-250.
- Teslovich, T. M., Musunuru, K., Smith, A. V., Edmondson, A. C., Stylianou, I. M., Koseki, M., Pirruccello, J. P., Ripatti, S., Chasman, D. I., Willer, C. J., Johansen, C. T., Fouchier, S. W., Isaacs, A., Peloso, G. M., Barbalic, M., Ricketts, S. L., Bis, J. C., Aulchenko, Y. S., Thorleifsson, G., Feitosa, M. F., Chambers, J., Orho-Melander, M., Melander, O., Johnson, T., Li, X., Guo, X., Li, M., Shin Cho, Y., Jin Go, M., Jin Kim, Y., Lee, J. Y., Park, T., Kim, K., Sim, X., Tsee-Hee Ong, R., Croteau-Chonka, D. C., Lange, L. A., Smith, J. D., Song, K., Hua Zhao, J., Yuan, X., Luan, J., Lamina, C., Ziegler, A., Zhang, W., Zee, R. Y., Wright, A. F., Witteman, J. C., Wilson, J. F., Willemssen, G., Wichmann, H. E., Whitfield, J. B., Waterworth, D. M., Wareham, N. J., Waeber, G., Vollenweider, P., Voight, B. F., Vitart, V., Uitterlinden, A. G., Uda, M., Tuomilehto, J., Thompson, J. R., Tanaka, T., Surakka, I., Stringham, H. M., Spector, T. D., Soranzo, N., Smit, J. H., Sinisalo, J., Silander, K., Sijbrands, E. J., Scuteri, A., Scott, J., Schlessinger, D., Sanna, S., Salomaa, V., Saharinen, J., Sabatti, C., Ruukonen, A., Rudan, I., Rose, L. M., Roberts, R., Rieder, M., Psaty, B. M., Pramstaller, P. P., Pichler, I., Perola, M., Penninx, B. W., Pedersen, N. L., Pattaro, C., Parker, A. N., Pare, G., Oostra, B. A., O'Donnell, C. J., Nieminen, M. S., Nickerson, D. A., Montgomery, G. W., Meitinger, T., McPherson, R., McCarthy, M. I., McArdle, W., Masson, D.,

Martin, N. G., Marroni, F., Mangino, M., Magnusson, P. K., Lucas, G., Luben, R., Loos, R. J., Lokki, M. L., Lettre, G., Langenberg, C., Launer, L. J., Lakatta, E. G., Laaksonen, R., Kyvik, K. O., Kronenberg, F., König, I. R., Khaw, K. T., Kaprio, J., Kaplan, L. M., Johansson, A., Jarvelin, M. R., Janssens, A. C., Ingelsson, E., Igl, W., Kees Hovingh, G., Hottenga, J. J., Hofman, A., Hicks, A. A., Hengstenberg, C., Heid, I. M., Hayward, C., Havulinna, A. S., Hastie, N. D., Harris, T. B., Haritunians, T., Hall, A. S., Gyllenstein, U., Guiducci, C., Groop, L. C., Gonzalez, E., Gieger, C., Freimer, N. B., Ferrucci, L., Erdmann, J., Elliott, P., Ejebe, K. G., Doring, A., Dominiczak, A. F., Demissie, S., Deloukas, P., de Geus, E. J., de Faire, U., Crawford, G., Collins, F. S., Chen, Y. D., Caulfield, M. J., Campbell, H., Burt, N. P., Bonnycastle, L. L., Boomsma, D. I., Boekholdt, S. M., Bergman, R. N., Barroso, I., Bandinelli, S., Ballantyne, C. M., Assimes, T. L., Quertermous, T., Alshuler, D., Seielstad, M., Wong, T. Y., Tai, E. S., Feranil, A. B., Kuzawa, C. W., Adair, L. S., Taylor, H. A., Jr., Borecki, I. B., Gabriel, S. B., Wilson, J. G., Holm, H., Thorsteinsdottir, U., Gudnason, V., Krauss, R. M., Mohlke, K. L., Ordovas, J. M., Munroe, P. B., Kooner, J. S., Tall, A. R., Hegele, R. A., Kastelein, J. J., Schadt, E. E., Rotter, J. I., Boerwinkle, E., Strachan, D. P., Mooser, V., Stefansson, K., Reilly, M. P., Samani, N. J., Schunkert, H., Cupples, L. A., Sandhu, M. S., Ridker, P. M., Rader, D. J., van Duijn, C. M., Peltonen, L., Abecasis, G. R., Boehnke, M., & Kathiresan, S. (2010). Biological, Clinical and Population Relevance of 95 Loci for Blood Lipids. *Nature*, 466(7307), 707-713.

The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium. (2011). A Genome-Wide Association Study in Europeans and South Asians Identifies Five New Loci for Coronary Artery Disease. *Nat Genet*, 43(4), 339-344.

Thyberg, J., & Hultgardhnilsson, A. (1994). Fibronectin and the Basement-Membrane Components Laminin and Collagen Type-Iv Influence the Phenotypic Properties of Subcultured Rat Aortic Smooth-Muscle Cells Differently. *Cell and Tissue Research*, 276(2), 263-271.

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), 4350-4354.

Tucker, R. P. (2004). The Thrombospondin Type 1 Repeat Superfamily. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(6), 969-974.

UniProt Consortium. (abgerufen 04.02.2018). Uniprotkb - Q9ukp4 (Ats7_Human). UniProt Abgerufen 04.02.2018, from UniProt Consortium,

UniProt consortium. (abgerufen 05.02.2018). Universal Protein Resource Knowledgebase (Uniprotkb). Abgerufen 05.02.2018, from UniProt consortium www.uniprot.org

- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-Five Years of Quantitative Pcr for Gene Expression Analysis. *Biotechniques*, *44*(5), 619-626.
- Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A., & Schwartz, S. M. (2000). Lessons from Sudden Coronary Death: A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *20*(5), 1262-1275.
- von Scheidt, M., Zhao, Y. Q., Kurt, Z., Pan, C., Zeng, L. Y., Yang, X., Schunkert, H., & Lusis, A. J. (2017). Applications and Limitations of Mouse Models for Understanding Human Atherosclerosis. *Cell Metabolism*, *25*(2), 248-261.
- Wagenseil, J. E., & Mecham, R. P. (2009). Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiol Rev*, *89*(3), 957-989.
- Wang, G., Jacquet, L., Karamariti, E., & Xu, Q. B. (2015). Origin and Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Physiology-London*, *593*(14), 3013-3030.
- Wang, L., Zheng, J., Bai, X., Liu, B., Liu, C. J., Xu, Q., Zhu, Y., Wang, N., Kong, W., & Wang, X. (2009). Adamts-7 Mediates Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Neointima Formation in Balloon-Injured Rat Arteries. *Circ Res*, *104*(5), 688-698.
- Wang, L., Zheng, J. G., Du, Y. Y., Huang, Y. Q., Li, J., Liu, B., Liu, C. J., Zhu, Y., Gao, Y. S., Xu, Q. B., Kong, W., & Wang, X. (2010). Cartilage Oligomeric Matrix Protein Maintains the Contractile Phenotype of Vascular Smooth Muscle Cells by Interacting with Alpha(7)Beta(1) Integrin. *Circulation Research*, *106*(3), 514-525.
- Wang, S. B., Dougherty, E. J., & Danner, R. L. (2016). Ppar Gamma Signaling and Emerging Opportunities for Improved Therapeutics. *Pharmacological Research*, *111*, 76-85.
- Wang, X. F., Li, C. H., Liang, A. J., Peng, Y., Sun, J. C., Huang, D. S., Xu, K., & Ye, W. (2016). Regulation of a Disintegrins and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 7 During Inflammation in Nucleus Pulposus (Np) Cells: Role of Ap-1, Sp1 and Nf-Kappa B Signaling. *Inflammation Research*, *65*(12), 951-962.
- Webb, T. R., Erdmann, J., Stirrups, K. E., Stitzel, N. O., Masca, N. G. D., Jansen, H., Kanoni, S., Nelson, C. P., Ferrario, P. G., Konig, I. R., Eicher, J. D., Johnson, A. D., Hamby, S. E., Betsholtz, C., Ruusalepp, A., Franzen, O., Schadt, E. E., Bjorkegren, J. L. M., Weeke, P. E., Auer, P. L., Schick, U. M., Lu, Y. C., Zhang, H., Dube, M. P., Goel, A., Farrall, M., Peloso, G. M., Won, H. H., Do, R., van Iperen, E., Kruppa, J., Mahajan, A., Scott, R. A., Willenborg, C.,

- Braund, P. S., van Capelleveen, J. C., Doney, A. S. F., Donnelly, L. A., Asselta, R., Merlini, P. A., Duga, S., Marziliano, N., Denny, J. C., Shaffer, C., El-Mokhtari, N. E., Franke, A., Heilmann, S., Hengstenberg, C., Hoffmann, P., Holmen, O. L., Hveem, K., Jansson, J. H., Jockel, K. H., Kessler, T., Kriebel, J., Laugwitz, K. L., Marouli, E., Martinelli, N., McCarthy, M. I., Van Zuydam, N. R., Meisinger, C., Esko, T., Mihailov, E., Escher, S. A., Alver, M., Moebus, S., Morris, A. D., Virtamo, J., Nikpay, M., Olivieri, O., Provost, S., AlQarawi, A., Robertson, N. R., Akinsansya, K. O., Reilly, D. F., Vogt, T. F., Yin, W., Asselbergs, F. W., Kooperberg, C., Jackson, R. D., Stahl, E., Muller-Nurasyid, M., Strauch, K., Varga, T. V., Waldenberger, M., Zeng, L. Y., Chowdhury, R., Salomaa, V., Ford, I., Jukema, J. W., Amouyel, P., Kontto, J., Nordestgaard, B. G., Ferrieres, J., Saleheen, D., Sattar, N., Surendran, P., Wagner, A., Young, R., Howson, J. M. M., Butterworth, A. S., Danesh, J., Ardissino, D., Bottinger, E. P., Erbel, R., Franks, P. W., Girelli, D., Hall, A. S., Hovingh, G. K., Kastrati, A., Lieb, W., Meitinger, T., Kraus, W. E., Shah, S. H., McPherson, R., Orho-Melander, M., Melander, O., Metspalu, A., Palmer, C. N. A., Peters, A., Rader, D. J., Reilly, M. P., Loos, R. J. F., Reiner, A. P., Roden, D. M., Tardif, J. C., Thompson, J. R., Wareham, N. J., Watkins, H., Willer, C. J., Samani, N. J., Schunkert, H., Deloukas, P., Kathiresan, S., Wellcome Trust Case, C., Investigators, M., & Myocardial Infarction, G. (2017). Systematic Evaluation of Pleiotropy Identifies 6 Further Loci Associated with Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, *69*(7), 823-836.
- Wierer, M., Prestel, M., Schiller, H. B., Yan, G., Schaab, C., Azghandi, S., Werner, J., Kessler, T., Malik, R., Murgia, M., Aherrahrou, Z., Schunkert, H., Dichgans, M., & Mann, M. (2018). Compartment-Resolved Proteomic Analysis of Mouse Aorta During Atherosclerotic Plaque Formation Reveals Osteoclast-Specific Protein Expression. *Mol Cell Proteomics*, *17*(2), 321-334.
- Yamamoto, K., Kakino, A., Takeshita, H., Hayashi, N., Li, L., Nakano, A., Hanasaki-Yamamoto, H., Fujita, Y., Imaizumi, Y., Toyama-Yokoyama, S., Nakama, C., Kawai, T., Takeda, M., Hongyo, K., Oguro, R., Maekawa, Y., Itoh, N., Takami, Y., Onishi, M., Takeya, Y., Sugimoto, K., Kamide, K., Nakagami, H., Ohishi, M., Kurtz, T. W., Sawamura, T., & Rakugi, H. (2015). Oxidized Ldl (Oxldl) Activates the Angiotensin Ii Type 1 Receptor by Binding to the Lectin-Like Oxldl Receptor. *FASEB J*, *29*(8), 3342-3356.
- Yu, J., Li, Y., Li, M., Qu, Z., & Ruan, Q. (2010). Oxidized Low Density Lipoprotein-Induced Transdifferentiation of Bone Marrow-Derived Smooth Muscle-Like Cells into Foam-Like Cells in Vitro. *Int J Exp Pathol*, *91*(1), 24-33.
- Zhang, L., Yu, F., Wang, L., Zheng, J., Du, Y., Huang, Y., Liu, B., Wang, X., & Kong, W. (2015). Adamts-7 Promotes Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation in Vitro and in Vivo. *Sci China Life Sci*, *58*(7), 674-681.

Zhang, Q., Huang, M., Wang, X. L., Xu, X. J., Ni, M., & Wang, Y. (2012). Negative Effects of Adamts-7 and Adamts-12 on Endplate Cartilage Differentiation. *Journal of Orthopaedic Research*, 30(8), 1238-1243.

Zhang, Z. Y., Zhang, M., Li, Y. H., Liu, S. Y., Ping, S. N., Wang, J. J., Ning, F., Xie, F. K., & Li, C. H. (2013). Simvastatin Inhibits the Additive Activation of Erk1/2 and Proliferation of Rat Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Combined Mechanical Stress and Oxldl through Lox-1 Pathway. *Cellular Signalling*, 25(1), 332-340.

Zhu, X. Y., & Assoian, R. K. (1995). Integrin-Dependent Activation of Map Kinase - a Link to Shape-Dependent Cell-Proliferation. *Molecular Biology of the Cell*, 6(3), 273-282.

Name the output image	OrigRed
Convert green to gray?	Yes
Name the output image	OrigGreen
Convert blue to gray?	Yes
Name the output image	OrigBlue
Convert hue to gray?	Yes
Name the output image	OrigHue
Convert saturation to gray?	Yes
Name the output image	OrigSaturation
Convert value to gray?	Yes
Name the output image	OrigValue
Channel count	1
Channel number	Redx3A 1
Relative weight of the channel	1.0
Image name	Channel1
Crop	
Select the input image	OrigGray
Name the output image	CropGray
Select the cropping shape	Rectangle
Select the cropping method	Coordinates
Apply which cycle's cropping pattern?	Every
Left and right rectangle positions	45,-160
Top and bottom rectangle positions	90,end
Coordinates of ellipse center	500,5
Ellipse radius, X direction	400
Ellipse radius, Y direction	200
Use Plate Fix?	No
Remove empty rows and columns?	No
Select the masking image	None
Select the image with a cropping mask	None
Select the objects	None
CorrectIlluminationCalculate	
Select the input image	CropGray
Name the output image	IllumGray
Select how the illumination function is calculated	Background
Dilate objects in the final averaged image?	No
Dilation radius	1
Block size	60
Rescale the illumination function?	No
Calculate function for each image individually, or based on all images?	Each
Smoothing method	Splines
Method to calculate smoothing filter size	Automatic
Approximate object size	10
Smoothing filter size	10
Retain the averaged image?	No
Name the averaged image	IllumBlueAvg
Retain the dilated image?	No
Name the dilated image	IllumBlueDilated
Automatically calculate spline parameters?	Yes
Background mode	auto
Number of spline points	5
Background threshold	2.0
Image resampling factor	2.0
Maximum number of iterations	40
Residual value for convergence	0.001
CorrectIlluminationApply	
Select the input image	CropGray
Name the output image	CorrGray
Select the illumination function	IllumGray
Select how the illumination function is applied	Subtract
ImageMath	
Operation	Invert
Raise the power of the result by	1.0
Multiply the result by	1.0
Add to result	0.0
Set values less than 0 equal to 0?	Yes
Set values greater than 1 equal to 1?	Yes
Ignore the image masks?	No
Name the output image	ImageAfterMath
Image or measurement?	Image
Select the first image	CorrGray
Multiply the first image by	1.0
Measurement	
Image or measurement?	Image

Select the second image	
Multiply the second image by	1.0
Measurement	
IdentifyPrimaryObjects	
Select the input image	ImageAfterMath
Name the primary objects to be identified	SMC
Typical diameter of objects, in pixel units (Min,Max)	10,15
Discard objects outside the diameter range?	Yes
Try to merge too small objects with nearby larger objects?	No
Discard objects touching the border of the image?	Yes
Method to distinguish clumped objects	Laplacian of Gaussian
Method to draw dividing lines between clumped objects	Shape
Size of smoothing filter	10
Suppress local maxima that are closer than this minimum allowed distance	7.0
Speed up by using lower-resolution image to find local maxima?	Yes
Name the outline image	PrimaryOutlines
Fill holes in identified objects?	After both thresholding and declumping
Automatically calculate size of smoothing filter for declumping?	Yes
Automatically calculate minimum allowed distance between local maxima?	Yes
Retain outlines of the identified objects?	Yes
Automatically calculate the threshold using the Otsu method?	Yes
Enter Laplacian of Gaussian threshold	0.5
Automatically calculate the size of objects for the Laplacian of Gaussian filter?	Yes
Enter LoG filter diameter	5.0
Handling of objects if excessive number of objects identified	Continue
Maximum number of objects	500
Threshold setting version	1
Threshold strategy	Global
Thresholding method	RobustBackground
Select the smoothing method for thresholding	Automatic
Threshold smoothing scale	1.0
Threshold correction factor	1.0
Lower and upper bounds on threshold	0.0,1.0
Approximate fraction of image covered by objects?	0.01
Manual threshold	0.0
Select the measurement to threshold with	None
Select binary image	None
Masking objects	None
Two-class or three-class thresholding?	Two classes
Minimize the weighted variance or the entropy?	Weighted variance
Assign pixels in the middle intensity class to the foreground or the background?	Foreground
Method to calculate adaptive window size	Image size
Size of adaptive window	10
MeasureObjectSizeShape	[module_num
Select objects to measure	SMC
Calculate the Zernike features?	Yes
MeasureImageAreaOccupied	[module_num
Hidden	1
Measure the area occupied in a binary image, or in objects?	Objects
Select objects to measure	SMC
Retain a binary image of the object regions?	Yes
Name the output binary image	Binary_SMC_area_covered
Select a binary image to measure	None
SaveImages	[module_num
Select the type of image to save	Image
Select the image to save	CropGray
Select the objects to save	None
Select the module display window to save	None
Select method for constructing file names	From image filename
Select image name for file prefix	Original_color
Enter single file name	OrigBlue
Number of digits	4
Append a suffix to the image file name?	Yes
Text to append to the image name	#NAME?
Saved file format	tif

Select the image type	Color image
Name to assign these images	Original
Match metadata	\x5B\x5D
Image set matching method	Order
Set intensity range from	Image metadata
Assignments count	1
Single images count	0
Select the rule criteria	and (file does contain """)
Name to assign these images	DNA
Name to assign these objects	Cell
Select the image type	Grayscale image
Set intensity range from	Image metadata
Retain outlines of loaded objects?	No
Name the outline image	LoadedOutlines
Groups	
Do you want to group your images?	No
grouping metadata count	1
Metadata category	None
Crop	
Select the input image	Original
Name the output image	CropGray
Select the cropping shape	Rectangle
Select the cropping method	Coordinates
Apply which cycle's cropping pattern?	Every
Left and right rectangle positions	45,-160
Top and bottom rectangle positions	90,end
Coordinates of ellipse center	500,5
Ellipse radius, X direction	400
Ellipse radius, Y direction	200
Use Plate Fix?	No
Remove empty rows and columns?	No
Select the masking image	None
Select the image with a cropping mask	None
Select the objects	None
CorrectIlluminationCalculate	
Select the input image	CropGray
Name the output image	IllumGray
Select how the illumination function is calculated	Background
Dilate objects in the final averaged image?	No
Dilation radius	1
Block size	60
Rescale the illumination function?	No
Calculate function for each image individually, or based on all images?	Each
Smoothing method	Splines
Method to calculate smoothing filter size	Automatic
Approximate object size	10
Smoothing filter size	10
Retain the averaged image?	No
Name the averaged image	IllumBlueAvg
Retain the dilated image?	No
Name the dilated image	IllumBlueDilated
Automatically calculate spline parameters?	Yes
Background mode	auto
Number of spline points	5
Background threshold	2.0
Image resampling factor	2.0
Maximum number of iterations	40
Residual value for convergence	0.001
CorrectIlluminationApply	
Select the input image	CropGray
Name the output image	CorrGray
Select the illumination function	IllumGray
Select how the illumination function is applied	Subtract
ImageMath	
Operation	Invert
Raise the power of the result by	1.0
Multiply the result by	1.0
Add to result	0.0
Set values less than 0 equal to 0?	Yes
Set values greater than 1 equal to 1?	Yes
Ignore the image masks?	No
Name the output image	ImageAfterMath
Image or measurement?	Image

Select the first image	CorrGray
Multiply the first image by	1.0
Measurement	
Image or measurement?	Image
Select the second image	
Multiply the second image by	1.0
Measurement	
IdentifyPrimaryObjects	
Select the input image	ImageAfterMath
Name the primary objects to be identified	SMC
Typical diameter of objects, in pixel units (Min,Max)	10,35
Discard objects outside the diameter range?	Yes
Try to merge too small objects with nearby larger objects?	No
Discard objects touching the border of the image?	Yes
Method to distinguish clumped objects	Laplacian of Gaussian
Method to draw dividing lines between clumped objects	None
Size of smoothing filter	10
Suppress local maxima that are closer than this minimum allowed distance	7.0
Speed up by using lower-resolution image to find local maxima?	Yes
Name the outline image	PrimaryOutlines
Fill holes in identified objects?	After both thresholding and declumping
Automatically calculate size of smoothing filter for declumping?	Yes
Automatically calculate minimum allowed distance between local maxima?	Yes
Retain outlines of the identified objects?	Yes
Automatically calculate the threshold using the Otsu method?	Yes
Enter Laplacian of Gaussian threshold	0.5
Automatically calculate the size of objects for the Laplacian of Gaussian filter?	Yes
Enter LoG filter diameter	5.0
Handling of objects if excessive number of objects identified	Continue
Maximum number of objects	500
Threshold setting version	1
Threshold strategy	Global
Thresholding method	RobustBackground
Select the smoothing method for thresholding	Automatic
Threshold smoothing scale	1.0
Threshold correction factor	0.98
Lower and upper bounds on threshold	0.0,1.0
Approximate fraction of image covered by objects?	0.01
Manual threshold	0.0
Select the measurement to threshold with	None
Select binary image	None
Masking objects	None
Two-class or three-class thresholding?	Two classes
Minimize the weighted variance or the entropy?	Weighted variance
Assign pixels in the middle intensity class to the foreground or the background?	Foreground
Method to calculate adaptive window size	Image size
Size of adaptive window	10
MeasureObjectSizeShape	
Select objects to measure	SMC
Calculate the Zernike features?	Yes
MeasureImageAreaOccupied	
Hidden	1
Measure the area occupied in a binary image, or in objects?	Objects
Select objects to measure	SMC
Retain a binary image of the object regions?	Yes
Name the output binary image	Binary_SMC_area_covered
Select a binary image to measure	None
SaveImages	
Select the type of image to save	Image
Select the image to save	CropGray
Select the objects to save	None
Select the module display window to save	None
Select method for constructing file names	From image filename
Select image name for file prefix	Original
Enter single file name	OrigBlue

Number of digits	4
Append a suffix to the image file name?	Yes
Text to append to the image name	#NAME?
Saved file format	tif
Output file location	Default Output Folder\x7C
Image bit depth	16
Overwrite existing files without warning?	No
When to save	Every cycle
Rescale the images?	No
Save as grayscale or color image?	Grayscale
Select colormap	gray
Record the file and path information to the saved image?	No
Create subfolders in the output folder?	No
Base image folder	Elsewhere...\x7C
Saved movie format	avi
SaveImages	
Select the type of image to save	Image
Select the image to save	PrimaryOutlines
Select the objects to save	None
Select the module display window to save	None
Select method for constructing file names	From image filename
Select image name for file prefix	Original
Enter single file name	Outlines
Number of digits	4
Append a suffix to the image file name?	Yes
Text to append to the image name	_SMC-outlines
Saved file format	tif
Output file location	Default Output Folder\x7C
Image bit depth	8
Overwrite existing files without warning?	No
When to save	Every cycle
Rescale the images?	No
Save as grayscale or color image?	Grayscale
Select colormap	gray
Record the file and path information to the saved image?	No
Create subfolders in the output folder?	No
Base image folder	Elsewhere...\x7C
Saved movie format	avi
ExportToSpreadsheet	
Select the column delimiter	Comma (",")
Add image metadata columns to your object data file?	No
Limit output to a size that is allowed in Excel?	No
Select the measurements to export	No
Calculate the per-image mean values for object measurements?	Yes
Calculate the per-image median values for object measurements?	No
Calculate the per-image standard deviation values for object measurements?	No
Output file location	Default Output Folder\x7C
Create a GenePattern GCT file?	No
Select source of sample row name	Metadata
Select the image to use as the identifier	None
Select the metadata to use as the identifier	None
Export all measurement types?	Yes
Press button to select measurements to export	
Representation of Nan/Inf	NaN
Add a prefix to file names?	Yes
Filename prefix\x3A	MyExpt_
Overwrite without warning?	No
Data to export	Do not use
Combine these object measurements with those of the previous object?	No
File name	DATA.csv
Use the object name for the file name?	Yes

Anhang-Tabelle 3: CellProfiler-Pipeline zur Analyse von *Scratch Wound*-Assays mit HAoSMC.

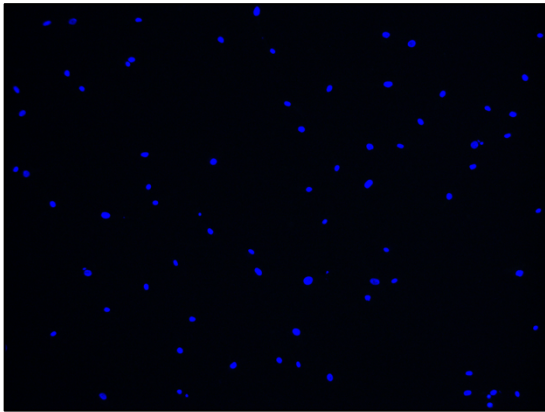
CellProfiler_Version	2014-07-23T17:45:00 6c2d896"
ChannelType_Color	Color"
ImageSet_Zip_Dictionary	[60 63 120 ..., 75 68 45]"
Pipeline_Pipeline "CellProfiler Pipeline	""CellProfiler Pipeline: http://www.cellprofiler.org "

Dilate objects in the final averaged image?	No
Dilation radius	1
Block size	60
Rescale the illumination function?	No
Calculate function for each image individually, or based on all images?	Each
Smoothing method	Splines
Method to calculate smoothing filter size	Automatic
Approximate object size	10
Smoothing filter size	10
Retain the averaged image?	No
Name the averaged image	IllumBlueAvg
Retain the dilated image?	No
Name the dilated image	IllumBlueDilated
Automatically calculate spline parameters?	Yes
Background mode	auto
Number of spline points	5
Background threshold	2.0
Image resampling factor	2.0
Maximum number of iterations	40
Residual value for convergence	0.001
CorrectIlluminationApply	
Select the input image	OrigGray
Name the output image	CorrGray
Select the illumination function	IllumGray
Select how the illumination function is applied	Subtract
EnhanceEdges	[module_num
Select the input image	CorrGray
Name the output image	EdgedImage
Automatically calculate the threshold?	Yes
Absolute threshold	0.2
Threshold adjustment factor	1.0
Select an edge-finding method	Sobel
Select edge direction to enhance	All
Calculate Gaussian's sigma automatically?	Yes
Gaussian's sigma value	10.0
Calculate value for low threshold automatically?	Yes
Low threshold value	0.1
Smooth	
Select the input image	EdgedImage
Name the output image	SmoothedImage
Select smoothing method	Gaussian Filter
Calculate artifact diameter automatically?	No
Typical artifact diameter	10.0
Edge intensity difference	0.1
Clip intensities to 0 and 1?	Yes
Crop	
Select the input image	SmoothedImage
Name the output image	Crop
Select the cropping shape	Rectangle
Select the cropping method	Coordinates
Apply which cycle's cropping pattern?	Every
Left and right rectangle positions	1,-1
Top and bottom rectangle positions	1,-30
Coordinates of ellipse center	500,500
Ellipse radius, X direction	400
Ellipse radius, Y direction	200
Use Plate Fix?	No
Remove empty rows and columns?	No
Select the masking image	None
Select the image with a cropping mask	None
Select the objects	None
IdentifyPrimaryObjects	
Select the input image	EdgedImage
Name the primary objects to be identified	SMC_Tissue
Typical diameter of objects, in pixel units (Min,Max)	15,9999
Discard objects outside the diameter range?	Yes
Try to merge too small objects with nearby larger objects?	No
Discard objects touching the border of the image?	No
Method to distinguish clumped objects	None
Method to draw dividing lines between clumped objects	Intensity
Size of smoothing filter	10
Suppress local maxima that are closer than this minimum allowed distance	7.0

Speed up by using lower-resolution image to find local maxima?	Yes
Name the outline image	PrimaryOutlines
Fill holes in identified objects?	After both thresholding and declumping
Automatically calculate size of smoothing filter for declumping?	Yes
Automatically calculate minimum allowed distance between local maxima?	Yes
Retain outlines of the identified objects?	No
Automatically calculate the threshold using the Otsu method?	Yes
Enter Laplacian of Gaussian threshold	0.5
Automatically calculate the size of objects for the Laplacian of Gaussian filter?	Yes
Enter LoG filter diameter	5.0
Handling of objects if excessive number of objects identified	Continue
Maximum number of objects	500
Threshold setting version	1
Threshold strategy	Global
Thresholding method	Otsu
Select the smoothing method for thresholding	Automatic
Threshold smoothing scale	0.4
Threshold correction factor	0.93
Lower and upper bounds on threshold	0.0,1.0
Approximate fraction of image covered by objects?	0.01
Manual threshold	0.0
Select the measurement to threshold with	None
Select binary image	None
Masking objects	None
Two-class or three-class thresholding?	Two classes
Minimize the weighted variance or the entropy?	Weighted variance
Assign pixels in the middle intensity class to the foreground or the background?	Foreground
Method to calculate adaptive window size	Image size
Size of adaptive window	10
MeasureImageAreaOccupied	
Hidden	1
Measure the area occupied in a binary image, or in objects?	Objects
Select objects to measure	SMC_Tissue
Retain a binary image of the object regions?	Yes
Name the output binary image	Scratch_bin
Select a binary image to measure	None
SaveImages	
Select the type of image to save	Image
Select the image to save	Scratch_bin
Select the objects to save	None
Select the module display window to save	None
Select method for constructing file names	Sequential numbers
Select image name for file prefix	Color
Enter file prefix	OrigBlue
Number of digits	4
Append a suffix to the image file name?	No
Text to append to the image name	
Saved file format	tif
Output file location	Default Output Folder\x7C
Image bit depth	8
Overwrite existing files without warning?	No
When to save	Every cycle
Rescale the images?	No
Save as grayscale or color image?	Grayscale
Select colormap	gray
Record the file and path information to the saved image?	No
Create subfolders in the output folder?	No
Base image folder	Elsewhere...\x7C
Saved movie format	avi
ExportToSpreadsheet	
Select the column delimiter	Tab
Add image metadata columns to your object data file?	No
Limit output to a size that is allowed in Excel?	No
Select the measurements to export	No
Calculate the per-image mean values for object measurements?	No
Calculate the per-image median values for object measurements?	No
Calculate the per-image standard deviation values for object measurements?	No
Output file location	Default Output Folder\x7C

Create a GenePattern GCT file?	No
Select source of sample row name	Metadata
Select the image to use as the identifier	None
Select the metadata to use as the identifier	None
Export all measurement types?	Yes
Press button to select measurements to export	
Representation of Nan/Inf	NaN
Add a prefix to file names?	Yes
Filename prefixx3A	Scratch_
Overwrite without warning?	No
Data to export	Do not use
Combine these object measurements with those of the previous object?	No
File name	DATA.csv
Use the object name for the file name?	Yes
Run_Timestamp 2016-10-18T23:39:52.820000	

Anhang-Abbildungen



Anhang-Abbildung 1: HAoSMC mit Sekundärantikörpern. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HAoSMC, welche ohne vorherige Inkubation mit Primär-Antikörpern mit anti-Maus (rote Fluoreszenz) und anti-Kaninchen-Immunglobulin (grüne Fluoreszenz) Sekundär-Antikörpern inkubiert wurden; Färbung der Zellkerne mit DAPI (blaue Fluoreszenz); überlagerte Darstellung der drei Farbkanäle (*Overlay*).

Publikation

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in Form von Poster-Präsentationen auf der 83. Jahrestagung der DGK im April 2017 in Mannheim (Schindler et al. „Gene-environment interaction at the *ADAMTS7* coronary artery disease locus with LDL-cholesterol“) und auf dem 85th Congress of the European Atherosclerosis Society im April 2017 in Prag (Schindler et al. „Genetic and functional interaction of the coronary artery disease risk gene *ADAMTS7* with LDL-cholesterol“) durch den Autor vorgestellt.

Unterstützung

Die vorliegende Dissertation wurde von der Deutschen Herzstiftung e.V. mit einem Kaltenbach-Doktorandenstipendium unterstützt.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Prof. Dr. Heribert Schunkert, für die freundliche Überlassung des Themas und für die zur Verfügung gestellten Möglichkeiten es zu bearbeiten.

Meinem Mentor, Dr. Thorsten Keßler, danke ich für seine wertvolle Unterstützung und seinen Rat während des gesamten Projekts.

Dr. Simon von Ameln danke ich für seine freundliche Hilfe und seine wertvollen Ratschläge zu Beginn meines Promotionsprojekts.

Zudem danke ich allen Mitgliedern der AG Schunkert für ihre Unterstützung, insbesondere Dr. Jana Wobst, Dr. Julia Werner, Tan An Dang und Dr. Lingyao Zeng.

Der Deutschen Herzstiftung e.V. gilt mein Dank für die Gewährung eines Kaltenbach-Doktorandenstipendiums.

Besonders danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und Charlotte für Ihre geduldige Begleitung während der gesamten Zeit.