

Der Einfluss des KHK-Gens *SVEP1* auf die Atherosklerose

Michael Josef Winkler

Vollständiger Abdruck der von TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Bernhard Haslinger

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Heribert Schunkert
2. Priv.-Doz. Dr. Stephan Kemmner
3. Prof. Dr. Ingo Hilgendorf

Die Dissertation wurde am 14.02.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 10.10.2024 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	III
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	4
2.1 <i>Koronare Herzkrankheit.....</i>	<i>4</i>
2.2 <i>SVEP1 als Risikogen der KHK</i>	<i>7</i>
2.3 <i>Ziele der Arbeit.....</i>	<i>9</i>
3 Material	10
3.1 <i>Zellkultur, Chemikalien und Lösungen.....</i>	<i>10</i>
3.2 <i>Assays, Enzyme, Primer und Antikörper</i>	<i>14</i>
3.3 <i>Kits, Software und Geräte.....</i>	<i>16</i>
4 Methoden.....	18
4.1 <i>Zellkultur</i>	<i>18</i>
4.1.1 Scratch Wound Assay.....	18
4.2 <i>Molekularbiologie</i>	<i>20</i>
4.2.1 Genexpression.....	20
4.2.2 Proteinexpression	22
4.3 <i>Tierversuche</i>	<i>23</i>
4.3.1 Genotypisierung	23
4.3.2 Restenose-Modell.....	25
4.3.3 Atherosklerose-Modell.....	27
4.3.4 Histologie und morphometrische Auswertung.....	30
5 Ergebnisse	31
5.1 <i>Der Einfluss von SVEP1 in humanen Zelllinien</i>	<i>31</i>
5.2 <i>Der Einfluss der Risikovariante von SVEP1</i>	<i>32</i>
5.3 <i>Der Einfluss der Svep1-Defizienz im Mausmodell</i>	<i>34</i>
5.3.1 Svep1-Defizienz im vaskulären Remodeling.....	35
5.3.2 Svep1-Defizienz in der Atherogenese.....	36
6 Diskussion	40
7 Publikation und Literaturverzeichnis	46
8 Curriculum Vitae und Danksagung.....	55

Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
Ao. ascendens	Aorta ascendens (aufsteigende Aorta)
A. femoralis	Arteria femoralis (Oberschenkelarterie)
Abb.	Abbildung
ADAMTS	<i>engl.</i> A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondine motifs
ApoE	Apolipoprotein E
Aqua dest	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw	beziehungsweise
cDNA	<i>engl.</i> Complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
d	Tage
DMEM	<i>engl.</i> Dulbecco's modified eagle medium
EC	<i>engl.</i> Endothelial cells (Endothelzelle)
ECM	<i>engl.</i> Extracellular matrix (extrazelluläre Matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>engl.</i> fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HCAEC	<i>engl.</i> Human coronary artery endothelial cell
HCL	Wasserstoffchlorid
HDL	<i>engl.</i> High density lipoprotein
HEKC	<i>engl.</i> Human embryonic kidney cell
HEPA	<i>engl.</i> high efficiency particulate air
HFD	<i>engl.</i> High fat diet (hochkalorische Diät)
HKG	<i>engl.</i> House-keeping-gene
HUVEC	<i>engl.</i> Human umbilical vein endothelial cell
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IVC	individuell ventilierte Käfige
KDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit

KO	Knockout
LDL	<i>engl.</i> Low density lipoprotein
M	Molare Masse
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
n	Gruppengröße
NaCl	Natriumchlorid
NI/M	Neointima / Media
oxLDL	<i>engl.</i> Oxidated low density lipoprotein
PBS	<i>engl.</i> Phosphate buffered saline
PBS-T	<i>engl.</i> Phosphate buffered saline with tween
PCI	Perkutane Koronare Intervention
PCR	<i>engl.</i> Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pH	Potentia hydrogenii
qPCR	<i>engl.</i> Quantitative Polymerase Chain Reaction
RIPA	Radioimmunopräzipitations Assay
RNA	<i>engl.</i> Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>engl.</i> rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
s.c.	subkutan
sek / s	Sekunde
SDS	<i>engl.</i> Sodium dodecyl phosphate
siRNA	<i>engl.</i> Small interfering ribonucleic acid
SMC	<i>engl.</i> Smooth muscle cell (Glatte Muskelzelle)
SNP	<i>engl.</i> Single nucleotid polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
Tab	Tabelle
TBE	Tris Borate EDTA
TBS	<i>engl.</i> TRIS buffered saline
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
VLDL	<i>engl.</i> Very low density lipoprotein
vs	versus
vSMC	<i>engl.</i> Vascular smooth muscle cell (vaskuläre Glattmuskelzelle)
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Zelluläre Mechanismen von <i>Svep1</i>	9
Abbildung 1 <i>SVEP1</i> Knockdown-Effizienz.	31
Abbildung 2 Auswirkungen des <i>SVEP1</i> -Knockdowns auf Proteinebene.	31
Abbildung 3 Zellmigration nach <i>SVEP1</i> Knockdown.....	32
Abbildung 4 Zellmigration nach Stimulation mit <i>SVEP1</i> und der Risikovariante.....	33
Abbildung 5 Zytokinexpression nach Inkubation mit <i>SVEP1</i> und Risikovariante.....	34
Abbildung 6 Expression von <i>Svep1</i> in verschiedenen murinen Geweben.....	34
Abbildung 7 <i>Svep1</i> -Haploinsuffizienz.....	35
Abbildung 8 Neointimaformation bei <i>Svep1</i> -Defizienz.....	36
Abbildung 9 Relevante Parameter unter HFD.....	37
Abbildung 10 Atherogenese bei <i>Svep1</i> -Defizienz.....	38
Abbildung 11 Inflammatorische Veränderungen bei <i>Svep1</i> -Defizienz.....	39
Abbildung 12 <i>SVEP1</i> in der Atherosklerose.....	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zellkultur.....	10
Tabelle 2 Chemikalien und Lösungen.....	10
Tabelle 3 Assays, Enzyme und Vektoren.....	14
Tabelle 4 Primer und Antikörper.....	15
Tabelle 5 Kommerziell verfügbare Kits.....	16
Tabelle 6 Software und Geräte.....	16
Tabelle 7 Transfektionsansatz siRNA Knockdown.....	19
Tabelle 8 Transfektionsansatz Überexpression.....	20
Tabelle 9 qPCR-Ansatz.....	21
Tabelle 10 PCR-Ansatz der murinen genomischen DNA.....	24
Tabelle 11 Thermozykler-Protokoll für OneTaq® 2x Master Mix.....	24
Tabelle 12 FACS-Antikörperansätze.....	29

1 Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit (KHK) als klinische Manifestation der Atherosklerose der Herzkranzgefäße mit ihren verschiedenen Ausprägungsformen zählt zu den global führenden Todesursachen und trägt zudem in den Industrienationen zu einer hohen Krankheitslast der Bevölkerung bei. Für die über Jahrzehnte andauernde Entstehung atherosklerotischer Plaques sind in den letzten Jahren neben klassischen Risikofaktoren wie Dyslipidämien, arterielle Hypertonie oder Tabakkonsum insbesondere genetische Faktoren als ursächlich entschlüsselt worden. Mithilfe einer exomweiten Assoziationsstudien wurde so eine mit einem erhöhten KHK-Risiko assoziierte *Missense*-Variante (p.D2702G) des Proteins Sushi, von Willebrand Factor Type A, EGF and Pentraxin domains-containing 1 (SVEP1) identifiziert. SVEP1 ist ein evolutionär gut konserviertes Extrazellulärmatrix-Protein, das zur vaskulären Differenzierung insbesondere in lymphatischen Endothelzellen exprimiert wird und als ein hochaffiner Ligand von Integrin $\alpha 9\beta 1$ identifiziert wurde. Der Mechanismus, über den SVEP1 die Pathogenese der Atherosklerose beeinflusst und wie die genetische Risikovariante das Risiko moduliert, wurde bisher nicht untersucht. Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welchen Einfluss SVEP1 auf vaskuläre Phänotypen, insbesondere das vaskuläre Remodelling nach Gefäßverletzung und die Ausbildung atherosklerotischer Plaques, ausübt. *In vitro* Daten zeigten, dass die Inkubation von Endothelzellen mit der *Missense*-Variante von SVEP1 im Vergleich zum Wildtyp-Protein mit einer reduzierten Migrationsgeschwindigkeit assoziiert war. Im Tierversuch zeigte sich jedoch kein Einfluss auf die Neointima-Bildung nach Draht-vermittelter Gefäßschädigung in *Svep1*-haploinsuffizienten (*Svep1*^{+/-}) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Um den Einfluss von *Svep1* auf die Ausbildung atherosklerotischer Plaques zu untersuchen, wurden *Svep1*-haploinsuffiziente Mäuse auf einen proatherogenen Hintergrund gekreuzt (*Apoe*-defiziente Mäuse, *Apoe*^{-/-}) und einer Western Diet unterzogen. Nach 12 Wochen dieser Diät wiesen *Svep1*^{+/-}*Apoe*^{-/-} Mäuse im Vergleich zu *Svep1*^{+/+}*Apoe*^{-/-} Mäusen größere Plaques auf. Ferner waren als Ausdruck einer gesteigerten vaskulären Inflammation in aortalen Zellsuspensionen von *Svep1*^{+/-}*Apoe*^{-/-} Mäusen höhere Zahlen von Neutrophilen, Ly6Chigh Monozyten und Makrophagen nachweisbar. *In vitro* Versuche wiesen darauf hin, dass die mit der KHK assoziierte Variante p.D2702G im Vergleich zum Wildtyp-Protein mit einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine in Endothelzellen assoziiert ist. In Zusammenschau der Befunde wurde in dieser Arbeit eine atheroprotektive Rolle von SVEP1 gezeigt, da die SVEP1-Defizienz im Mausmodell mit ausgeprägter Atherosklerose assoziiert war. Die gesteigerte Expression von inflammatorischen Zytokinen in Endothelzellen nach Inkubation mit der KHK-Variante legt eine gesteigerte intravaskuläre Inflammation nahe. Das vaskuläre Remodelling war hingegen nicht beeinflusst. Die Bedeutung der reduzierten Migration von Endothelzellen nach Inkubation mit SVEP1-p.D2702G bleibt Gegenstand

zukünftiger Forschungsprojekte. Diese Arbeit liefert eine funktionelle Einordnung des *SVEP1*-Gens im Kontext der Atherosklerose und bildet so eine Grundlage zum tieferen Verständnis der multifaktoriellen Genese, der mechanistischen Charakterisierung und der Identifikation weiterer therapeutischer Targets.

Summary

Coronary artery disease (CAD) as clinical manifestation of atherosclerosis with its different complications is globally one of the leading causes of death and contributes to a high burden of disease in industrialized countries. In addition to classical risk factors such as dyslipidemia, arterial hypertension or tobacco consumption, recently genetic factors have been deciphered to be causally involved in the pathogenesis. An exome-wide association study identified a missense-variant (p.D2702G) of the Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domains-containing 1 (SVEP1) protein, which encodes an evolutionary well-conserved extracellular protein and is associated with an increased CAD risk. SVEP1 is known to mediate the differentiation of lymphatic endothelial cells and was identified as a highly-affine ligand of integrin $\alpha 9\beta 1$. How SVEP1 and, in particular, the identified genetic variant influence the pathogenesis of atherosclerosis have not been described yet. One aim of this work was to investigate the influence of SVEP1 on vascular phenotypes, especially vascular remodeling after vascular injury and the formation of atherosclerotic plaques. Under *in vitro* conditions, endothelial cells incubated with the missense-variant of SVEP1 compared to wildtype displayed reduced migration capability. Animal experiments showed no effect on neointima formation after wire-induced vascular injury in SVEP1-haploinsufficient (Svep1^{+/-}) compared to wild-type mice. To assess the influence of Svep1 on atherosclerotic plaque formation, Svep1-haploinsufficient mice were crossbred to a proatherogenic background (ApoE-deficient, ApoE^{-/-}) and fed with a cholesterol-rich western diet. After 12 weeks on this diet, Svep1^{+/-} ApoE^{-/-} mice showed larger atherosclerotic lesions than Svep1^{+/+} ApoE^{-/-} mice. Moreover, reflecting enhanced vascular inflammation, higher numbers of neutrophils, Ly6C^{high} monocytes, and macrophages were detected in aortic cell suspensions of Svep1^{+/-} ApoE^{-/-} mice. In addition to that, *in vitro* studies indicated that the p.D2702G CAD-risk variant compared to the SVEP1-wildtype stimulates the expression of pro-inflammatory cytokines in endothelial cells.

Taken together, our findings suggest an atheroprotective role of SVEP1 due to the observation that Svep1-deficiency in mice was associated with a larger extent of atherosclerosis. Enhanced expression of inflammatory cytokines in endothelial cells after expression of the CAD variant suggests a modulatory role in vascular inflammation. No effect was observed regarding vascular remodeling. The significance of the impaired endothelial migration after incubation with the CAD-risk variant remains a subject of future investigations. In conclusion, we provide a first functional investigation of SVEP1 in atherosclerosis.

2 Einleitung

2.1 Koronare Herzkrankheit

Atherosklerose bezeichnet eine chronische Erkrankung der Arterien, bei der es zu einer Einlagerung von Lipiden und Inflammation in der Gefäßwand kommt und deren klinische Ausprägung neben zerebralen Schlaganfällen und peripherer arterieller Verschlusskrankheit insbesondere in koronarer Herzkrankheit (KHK), Myokardinfarkten und ischämischer Herzerkrankung resultiert (Libby et al., 2019). Deren Entstehung wird im Allgemeinen als Atherogenese und die atherosklerotischen Läsionen werden gemeinhin als Plaques bezeichnet.

Epidemiologie

Die KHK als klinische Manifestation der Atherosklerose der Herzkranzgefäße stellt weltweit die häufigste Todesursache dar (Libby, 2021). Aktuelle Schätzungen gehen davon aus, dass 45 % der globalen Gesamtsterblichkeit in Frauen und 39% in Männern allein auf diese Erkrankung zurückzuführen ist (Timmis et al., 2022). Darüber hinaus stellt die KHK als häufigste kardiovaskuläre Erkrankung mit ca. 197 Millionen Fällen weltweit im Jahr 2019 eine massive Krankheitsbelastung für die Sozialsysteme und die Gesamtbevölkerung dar (Roth et al., 2020). In Deutschland verstarben im Jahr 2021 über 340.000 Menschen an den Folgen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, was einem Drittel der Gesamtsterblichkeit entspricht. Im Vergleich dazu starben 229.000 Menschen in Deutschland im gleichen Zeitraum an Krebserkrankungen (Destatis, 2022).

Pathogenese

Obwohl der initiale atherogene Stimulus noch unklar ist, konnten mehrere Faktoren identifiziert werden, die in der Entstehung atherosklerotischer Läsionen einen fundamentalen Beitrag leisten. Die Wesentlichsten sind eine endotheliale Aktivierung, die Einlagerung von Lipoproteinen und Leukozyten-Akkumulation mit konsekutiver Zellproliferation und Fibrosierung (Swirski & Nahrendorf, 2013). Eine der gängigsten Hypothesen der letzten Jahrzehnte ist die sogenannte "*Response to injury*"-Hypothese, nach der diese Prozesse auf einen initialen Verletzungsstimulus ablaufen (Ross & Glomset, 1976). Prinzipiell stellen Endothelzellen als innerste Schicht der Gefäßwand eine Barriere gegenüber den humoralen und zellulären Blutbestandteilen dar. Unter inflammatorischen Bedingungen jedoch vermitteln diese über die Expression von oberflächenständigen Adhäsionsmolekülen die Transmigration von Leukozyten und weiteren Molekülen in die Gefäßwand. In der Atherogenese wird die endotheliale Aktivierung insbesondere durch Low-Density-Lipoprotein (LDL) und turbulente Flussbedingungen mit Beanspruchung durch Scherkräfte verstärkt (Forstermann, Xia, & Li,

2017; Marchini, Mitre, & Wolf, 2021). Hohe Plasmacholesterinspiegel führen über die subendotheliale Aufnahme von cholesterinreichen LDL-Partikeln insbesondere über reaktive Sauerstoffspezies zu hochinflammatorischen Produkten wie oxidiertem LDL (oxLDL), welche die proinflammatorischen Bedingungen mitsamt der Expression von Adhäsionsmolekülen weiter verstärken (Poznyak et al., 2020). Diese Bedingungen vermitteln neben der Aktivierung und Proliferation lokaler Makrophagen über einen differenzierten und präzisen Prozess die Rekrutierung peripherer Leukozyten aus dem Blut, die insgesamt zu einer weiteren LDL-Aufnahme, Endothelzellaktivierung und somit selbstverstärkender Leukozyten-Akkumulation und propagierter Inflammation führen (Williams et al., 2020). Unter den einwandernden Zellen sind Monozyten von großer Bedeutung. Im Mausmodell werden insbesondere Ly6C^{high} Monozyten in atherosklerotische Läsionen rekrutiert (Gerhardt & Ley, 2015) und proliferieren dort oxLDL-vermittelt gemeinsam mit residenten Makrophagen zu den charakteristischen Schaumzellen (Gerrity, 1981). Zudem scheinen auch vaskuläre glatte Muskelzellen (engl. *vascular smooth muscle cells*, vSMC) zu Schaumzell-artigen Zellen transdifferenzieren zu können (Shankman et al., 2015) und wie die übrigen Makrophagen einen gewichtigen Anteil an der Erhaltung der inflammatorischen Bedingungen zu haben (Kim et al., 2018). In den letzten Jahren wurden außerdem neutrophile Granulozyten als weitere wesentliche Faktoren dieser Bedingungen identifiziert (Silvestre-Roig, Braster, Ortega-Gomez, & Soehnlein, 2020). Im weiteren Krankheitsverlauf entwickeln die Plaques einen typischen Aufbau mit einer fibrösen Kappe vornehmlich aus SMCs und Extrazellulärmatrix (ECM) sowie einem lipidreichen nekrotischen Kern (Lusis, 2000; Ross, 1999), können im weiteren Verlauf aber auch einen komplexen Umstrukturierungsprozess der arteriellen Wand durchlaufen, der als vaskuläres Remodeling bezeichnet wird (van Varik et al., 2012). Dieses Remodeling kann durch Ausdünnen der fibrösen Kappe zu einer Plaqueruptur mit Thrombusbildung und konsekutivem Gefäßverschluss führen, der klinisch als Myokardinfarkt apparent wird (Libby, Okamoto, Rocha, & Folco, 2010). Neben diesem Entstehungsmodell der akuten Koronarthrombose geraten zunehmend auch Mechanismen einer Plaque-Erosion mit der Formation von *neutrophil extracellular traps* (NETs) in den Vordergrund (Libby, 2021).

Die Rolle der Extrazellulärmatrix

Die Extrazellulärmatrix (ECM) umgibt die Endothel- und Glattmuskelzellen als formgebendes und stabilisierendes Netz aus Makromolekülen und organisiert die Basalmembran, eine verankernde epitheliale Trennschicht. Zudem spielt sie eine entscheidende Rolle bei der zellulären Differenzierung, Adhäsion, Migration und Apoptose (Hynes, 2009; Kalluri, 2003). Hauptbestandteile sind Kollagene, Glykoproteine und Proteoglykane (Bonnans, Chou, & Werb, 2014), über deren membranständige Komponenten intrazelluläre Signalkaskaden angestoßen werden können (Lu, Takai, Weaver, & Werb, 2011). Somit hat sie nicht nur eine

hohe Relevanz zur physiologischen Gewebshomöostase, sondern kann auch zur Schlüsselkomponente pathologischer Prozesse werden. Matrixproteine sind in hohem Maße am vaskulären Remodeling beteiligt und können so über die Beeinflussung von Stromazellen und dem Abbau struktureller Kollagenbestandteile zu einem instabilen Plaque führen (Newby, 2008). So konnte eine Expressionsänderung im Rahmen der Atherogenese von über 180 ECM-Proteinen nachgewiesen werden, darunter unter anderem Kollagene und Matrixmetalloproteinasen (Wierer et al., 2018).

Klassische Risikofaktoren

In der Atherosklerose-Forschung konnten schon früh Faktoren ermittelt werden, die zu einer erhöhten Auftretenswahrscheinlichkeit der koronaren Herzkrankheit führen. Darunter werden neben fortschreitendem Lebensalter, dem männlichen Geschlecht, eine Dyslipidämie, Tabakkonsum, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas und Bewegungsarmut verstanden (Lusis, 2000; Yusuf et al., 2004). Insbesondere Tabakkonsum stellt den stärksten unabhängigen modifizierbaren Risikofaktor dar (Benjamin et al., 2019). Eine aktuelle Analyse zeigte, dass sowohl bei Männern als auch bei Frauen etwa 50% des kardiovaskulären Risikos auf traditionelle Risikofaktoren zurückzuführen ist (Global Cardiovascular Risk et al., 2023).

Genetische Risikofaktoren

Obwohl bei traditionellen KHK-Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie genetische Komponenten vorliegen, ist eine familiäre Prädisposition als unabhängiger Risikofaktor identifiziert worden und liegt dann vor, wenn erstgradige Verwandte bei Erstdiagnose als Männer ein Alter von < 55 Jahren und als Frauen ein Alter von < 60 Jahren aufweisen (Schildkraut, Myers, Cupples, Kiely, & Kannel, 1989). Im Gegensatz zu monogenen Erkrankungen werden bei der KHK bis auf Geschlecht und die Höhe des Lipoprotein a (Lp(a))-Blutspiegels die bekannten Risikofaktoren von vielen verschiedenen Genen beeinflusst (Lusis, 2000). Bei komplexen und häufigen Erkrankungen wird zudem angenommen, dass nicht nur multiple Gene für die Ausbildung eines Phänotyps verantwortlich sind, sondern diese auch miteinander und mit Umweltfaktoren interagieren können (Li, Pang, Zeng, Guldener, & Schunkert, 2021). Um den genetischen Einfluss auf die KHK und den Myokardinfarkt charakterisieren zu können, wurden in den letzten beiden Jahrzehnten global angelegte genomweite Assoziationsstudien (GWAS) durchgeführt. Das Ziel war hierbei, Polymorphismen einzelner Nukleotide (engl. single-nucleotide polymorphism, SNP) zu identifizieren, die mit dem Auftreten dieser Erkrankung assoziiert sind. Die Durchführung erfolgt über einen Vergleich der Genome der erkrankten und der gesunden Population und wurde erst 2003 durch die humane Genomentschlüsselung im Rahmen des Human Genome Project sowie das International HapMap Project und das 1000 Genomes Project ermöglicht

(Pearson & Manolio, 2008). So konnten inzwischen dank der deutlich breiteren Verfügbarkeit sowie der schnelleren und ökonomischeren Durchführung in den letzten Jahren durch Hochdurchsatzverfahren zur Genomsequenzierung großer Populationen GWAS durchgeführt werden (Lusis, 2012). Mittlerweile wurden so in mehreren unabhängigen Analysen über 300 Genvarianten identifiziert, die mit der koronaren Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt assoziiert und überwiegend in nicht-kodierenden Abschnitten angesiedelt sind (Aragam et al., 2022; Chen & Schunkert, 2021; Erdmann et al., 2009; Erdmann, Kessler, Munoz Venegas, & Schunkert, 2018; Reilly et al., 2011; Samani et al., 2007; Schunkert et al., 2011). Dennoch lässt sich mit diesen identifizierten Genvarianten nur etwa ein Drittel der Heritabilität der koronaren Herzkrankheit erklären, so dass Gen-Gen- bzw. Gen-Umwelt-Interaktionen untersucht und die Gene der identifizierten Loci funktionell charakterisiert werden müssen (McPherson & Tybjaerg-Hansen, 2016).

2.2 SVEP1 als Risikogen der KHK

In einer exomweiten Assoziationsstudie konnte eine *Missense*-Variante (rs111245230, p.D2702G) im *Sushi*, von *Willebrand Factor Type A*, *EGF* and *Pentraxin domains-containing 1* (*SVEP1*) Gen identifiziert werden, die genomweit signifikant ($p=4,2 \cdot 10^{-10}$) mit einem um 14 % erhöhtem KHK-Risiko assoziiert war (OR 1,14). Das Gen befindet sich auf Chromosom 9 und das seltenere Allel hat eine Frequenz von 3,6 %. Die Assoziation wurde in einer unabhängigen Replikationskohorte repliziert. Zusätzlich zu den genetischen Daten wurden relevante unabhängige kardiovaskuläre Risikofaktoren erfasst, im Gegensatz zur LDL-, HDL-, und Triglyceridkonzentration im Blut oder dem Vorliegen eines Typ 2 Diabetes mellitus wurde ein genomweit signifikanter höherer Blutdruck (0,94 mmHg systolisch und 0,57 mmHg diastolisch) beim Vorliegen der Risikovariante beobachtet (Stitzel et al., 2016). Durch eine genetisch bedingte Erhöhung des systolischen arteriellen Blutdrucks von 1,6 mmHg wurde zuvor eine Erhöhung des KHK-Risikos um 10% beschrieben (International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association et al., 2011). Somit lässt sich die mit der Variante assoziierte KHK-Risikoerhöhung nicht allein durch höheren Blutdruck erklären.

Molekularbiologische Charakterisierung von SVEP1

SVEP1 kodiert für ein 391 kDa schweres ECM-Protein, das ein hohes Maß an evolutionärer Konservierung aufweist und als ein essenzieller Bestandteil der Formation von lymphatischen Gefäßen in komplexen Organismen identifiziert wurde. Im Zebrafisch resultiert eine *Svep1*-Mutation in einer aberranten Migration von endothelialen lymphatischen Vorläuferzellen und homozygot *Svep1*-defiziente Mausembryos entwickeln aufgrund defekter lymphovenöser Verbindungen und defizitärem endotheliale Remodeling schon intrauterin schwere Ödeme (Karpanen et al., 2017).

Svep1 wird für die endotheliale Differenzierung insbesondere von umgebenden mesenchymalen Zellen exprimiert und scheint dabei über Angiopoietin-2 und Tie1-Rezeptoren eine Hochregulation für den Transkriptionsfaktor Foxc2, der in diesem Kontext ein relevanter intrazellulärer Faktor zu sein scheint, zu bewirken (Abbildung 1). Insgesamt ist Svep1 so an der Erhaltung der vaskulären Integrität über die Tie1-vermittelte Bindung an Angiopoetin-2 (ANG2) beteiligt (Morooka et al., 2017).

Das Angiopoietin/Tie-Rezeptorsystem vermittelt seinerseits vaskuläre Angiogenese und Remodeling. So konnte gezeigt werden, dass insbesondere die ANG2-vermittelte Aktivierung von Tie1 in Abhängigkeit von β 1-Integrinen endotheliales Remodeling bewirkt. Sowohl eine Defizienz von endotheliale Tie1 oder die rasche Spaltung davon unter akuten inflammatorischen Bedingungen geht mit einer verminderten ANG2-Aktivität und somit vaskulärer Stabilität einher (Korhonen et al., 2016).

SVEP1 ist ein hochaffiner Ligand von Integrin α 9 β 1 und vermittelt eine davon abhängige zelluläre Adhäsion in der extrazellulären Matrix. Zudem konnte SVEP1 mit Integrin α 9 β 1 in der mesenchymalen Submukosa in murinen gastrointestinalen- und pulmonalen Geweben kolo-kalisiert werden (Sato-Nishiuchi et al., 2012).

Der Transkriptionsfaktor Integrin α 9 vermittelt über seinen ECM-Liganden Fibronectin-ELIIA die Bildung intakter und kompetenter endothelialer Lymphgefäßklappen. Sowohl eine endotheliale Depletion von Integrin α 9 als auch ein Fehlen der aktiven Domäne seines Liganden führen über eine desorganisierte extrazelluläre Matrix zu einer nur rudimentären Ausbildung von Lymphgefäßklappen (Bazigou et al., 2009).

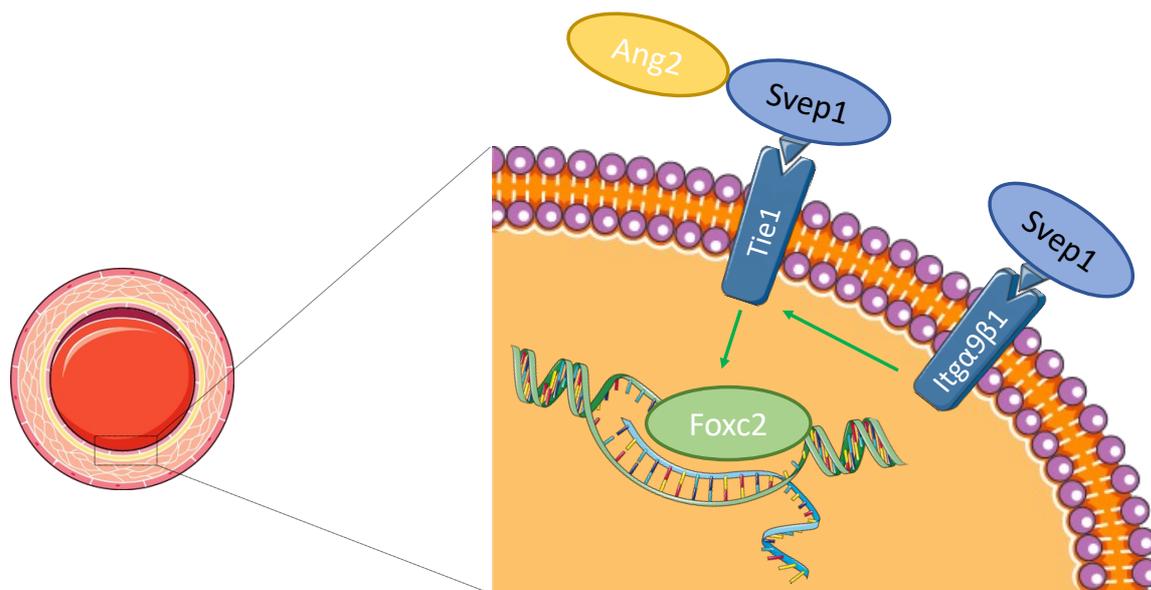


Abbildung 1 Zelluläre Mechanismen von SVEP1. Schematische Darstellung der Bindung von SVEP1 an Integrin $\alpha 9 \beta 1$ sowie Tie1. Durch die konsekutive Steigerung der Expression von Foxc2 resultiert eine verbesserte vaskuläre Integrität (Morooka et al., 2017; Korhonen et al., 2016; Sato-Nishiuchi et al., 2012). Teile dieser Abbildung wurden mit Servier Medical Art unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution 4.0 International License erstellt.

2.3 Ziele der Arbeit

SVEP1 wurde als ein wesentliches extrazelluläres Matrixprotein beschrieben, das von mesenchymalen Zellen exprimiert wird und einen stabilisierenden und adhäsiven Einfluss auf Endothelzellen zu haben scheint. Trotz seiner deutlichen Assoziation mit der KHK ist die Rolle von *SVEP1* und der Risikovariante p.D2702G in der Pathogenese der koronaren Atherosklerose nicht geklärt. Ziel dieser Arbeit ist es, das *SVEP1*-Gen im Kontext der Atherosklerose funktionell einzuordnen. Hierfür soll der Einfluss von SVEP1 auf vaskuläre Phänotypen in Mausmodellen und der Einfluss der Risikovariante im Vergleich zum SVEP1-Wildtyp in relevanten humanen Zelltypen untersucht werden um damit eine Grundlage zum tieferen Verständnis der multifaktoriellen Genese, der mechanistischen Charakterisierung und der Identifikation weiterer therapeutischer Targets zu bilden.

3 Material

3.1 Zellkultur, Chemikalien und Lösungen

Human embryonic kidney (HEK) 293 cells und humane Primärzelllinien (HCASMC, HUVEC) wurden von Promocell, Heidelberg, D bezogen. Zur langfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff bei ca. -195 °C wurde den Medien 10 % DMSO (AppliChem, Darmstadt, D) zugesetzt, das anschließend nach einem ersten Auftauschritt bei 37 °C im Wasserbad und konsekutiver 24-stündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wieder durch Medienwechsel entfernt wurde.

Tabelle 1 Zellkultur

Zellkultur	Hersteller	Ort	Artikelnummer
Human coronary artery smooth muscle cells (HCASMC)	PromoCell	Heidelberg, D	C-12533
Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)	PromoCell	Heidelberg, D	C-12200
Amicon Ultra-15 PLHK Ultracel-PL Membran 100 kDA	Merck Millipore	Billerica, USA	UFC910024
Zellkulturflaschen T75	Sarstedt	Nürnbrecht, D	83.3911.002
Zellkulturschalen 10 cm	Sarstedt	Nürnbrecht, D	TA19.1

Tabelle 2 Chemikalien und Lösungen

Chemikalien und Lösungen	Hersteller	Ort	Artikelnummer
4x Laemmli	Bio-Rad	Hercules, USA	1610747
10x Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) Puffer	New England Biolabs	Ipswich, USA	9806 S
10x TRIS/glycine/SDS	Bio-Rad	Hercules, USA	1610772
Amphotericin B solution 250 µg/ml	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA	A2942-100ML
Atipamezol 5 mg/ml	Orion Pharma	Espoo, FI	
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA	m3148-25ml
Bovines Serum Albumin (BSA)	AppliChem	Darmstadt, D	23209
Buprenorphin 0,3 mg/ml	RB Pharmaceuticals	Berkshire, UK	
Dexpanthenol 5 %	Bayer	Leverkusen, D	
DMEM 4,5 g/l glucose w/ UltraGlutamine	Lonza	Basel, SUI	880010-12
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem	Darmstadt, D	A3006.0100
EMPURE® Ethanol absolute	Merck Millipore	Billerica, USA	8.18760.2500
Endothelial cell growth medium MV	PromoCell	Heidelberg, D	C-22020
Endothelial cell growth medium MV SupplementMix	PromoCell	Heidelberg, D	C-22011
Eosin G 0,5 % wässrig	Carl Roth	Karlsruhe, D	3137.2
Fetal bovine serum (FBS) superior	Merck Millipore/Biochrom	Billerica, USA	S 0615

Fentanyl 0,5 mg/ml	Albrecht	Aulendorf, D	
Flumazenil 0,5 mg/ml	Hexal	Holzkirchen, D	
Formaldehyd 4 % phosphatgepuffert	AppliChem	Darmstadt, D	28908
FuGENE® HD transfection reagent	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	E2312
Gibco™ Geneticin® selective antibiotic (G418 Sulfate)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	11811-031
Gibco™ Opti-MEM® I reduced serum medium	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	31985062
Gibco™ PBS (10x) pH 7,4	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	70011051
Gibco™ Trypan blue solution 0,4 %	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	93595-50ML
Glycine PUFFERAN® ≥99 %	Carl Roth	Karlsruhe, D	3908
Gradientpolyacrylamidgel (4-20 %)	Bio-Rad	Hercules, USA	4568094
HCl-Lösung 0,1 %	Carl Roth	Karlsruhe, D	281
HEPES buffered saline solution	PromoCell	Heidelberg, D	C40010
Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-free distilled water	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	10977023
Invitrogen™ Lipofectamine® RNAiMAX™ transfection reagent	Invitrogen	Karlsruhe, D	13778100
Invitrogen™ UltraPure™ TRIS-borate-EDTA (TBE) 10x Puffer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	15581028
Kodan Tinktur Forte	Schülke	Norderstedt, D	
Magermilchpulver	AppliChem	Darmstadt	A0830.1000
Maus Zucht 10 mm Pellets	Ssniff Spezialdiäten	Soest, D	
Mayers Hämalau	Carl Roth	Karlsruhe, D	T865.3
Medetomidin 1 mg/ml	Zoetis	Madison, USA	
Midazolam 15 mg/3 ml	Ratiopharm	Ulm, D	
Methanol (MeOH)	AppliChem	Darmstadt, D	1310911212
Naloxon 0,4 mg/ml	Ratiopharm	Ulm, D	
NatriumChlorid 0,9 %	AlleMan Pharma	Pfullingen, D	A2942.1000
Penicillin-Streptomycin (10.000 IE/10 mg per ml)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA	P4333-100ML
Pentobarbital-Natrium 300 mg/ml	WDT	Garbsen, D	
peqGreen Farbstoff	VWR Chemicals	Erlangen, D	732-2960
Pertex®	Histolabs Products AB	Göteborg, SE	41-4011-00
Quick-Load® 2-Log DNA Ladder (0,1-10,0 kb)	New England Biolabs	Ipswich, USA	N0469 L
Smooth muscle cell growth medium 2	PromoCell	Heidelberg, D	C-22062
Smooth muscle cell growth medium 2 SupplementMix	PromoCell	Heidelberg, D	C-22062B
Silencer negative control no. 1 siRNA 5 nmol	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	AM4611
SVEP1 siRNA 5 nmol	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	HSS188311
TD.88137 Adjusted calories diet	Harlan Sprague Dawley	Indianapolis, USA	
Tissue-Tek® O.C.T	Sakura Finetek Europe	Alphen aan Rijn, NL	4583
TRIS PUFFERAN® ≥99 %	Carl Roth	Karlsruhe, D	9090.3

Trypsin-EDTA (0,05 %)	PromoCell	Heidelberg, D	T4049-100ML
Trypsin neutralising solution (0,05 % trypsin inhibitor in 0,1 % BSA)	PromoCell	Heidelberg, D	C-41210
Tween® 20 <i>BioChemica</i>	AppliChem	Darmstadt, D	A1389.0500
Universal Agarose peqGOLD	VWR Chemicals	Erlangen, D	840004
Xylol	Carl Roth	Karlsruhe, D	4436.2

1x Phosphate buffered saline (PBS)

- 100 ml 10x Gibco™ PBS (Thermo Fisher Scientific)

- ad 1.000 ml Millipore® Wasser

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

1x Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA)

- 10 ml 10x RIPA (New England Biolabs)

- ad 100 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei -20 °C

1x TRIS-borate-EDTA (TBE)

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

- ad 1000 ml Millipore® Wasser

Endkonzentration von 0,1 M TRIS, 90mM Borsäure, 1 mM EDTA und pH 8,3 bei Raumtemperatur; Lagerung bei Raumtemperatur

4x Laemmli-Puffer

- 100 µl β-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

- 900 µl 4x Laemmli (Bio-Rad)

Endkonzentration von 355 mM β-Mercaptoethanol; Lagerung bei -20 °C

1x Elektrophorese Puffer

- 100 ml 10x Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad)

- 2 ml Tween® 20 (AppliChem)

- ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

1x Transfer Puffer

- 3,03 TRIS PUFFERAN® (Carl Roth)

- 14,4 g glycine PUFFERAN® (Carl Roth)

- 200 ml Methanol (AppliChem)

- ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

1x PBS-T

- 100 ml Gibco™ PBS (Thermo Fisher Scientific)

- 2 ml Tween® 20 (AppliChem)

- ad 1000 ml Millipore® Wasser

Endkonzentration 1mM KH₂PO₄, 0,16 M NaCl, 2,97 mM Na₂PO₄-7H₂O, 0,2 % Tween® 20, pH 7,4 bei Raumtemperatur; Lagerung bei Raumtemperatur

5% Milch in PBS

- 5 g Magermilchpulver (AppliChem)

- ad 100 ml 1x PBS

Lagerung bei 4 °C, haltbar für 48 Stunden

250 mg/ml Geneticin

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

- ad 6 ml Millipore® Wasser

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

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

SMC Medium

- 500 ml smooth muscle cell growth medium 2 (PromoCell)

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

- 5 ml Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich)

Lagerung bei 4 °C

EC Medium

- 500 ml endothelial cell growth medium MV (PromoCell)

- 25 ml endothelial cell growth medium MV SupplementMix (PromoCell)

- 5 ml Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich)

Lagerung bei 4 °C

Enzymatischer FACS-Verdau

- 45 µl Kollagenase I

- 10 µl Kollagenase XI

- 5 µl Hyaluronidase

- 20 µl HEPES

- 3,7 µl DNase I

- ad 1000 µl PBS

Alle enzymatischen Komponenten wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen.

FACS-Puffer

- 500 ml PBS

- 2,5 g BSA 0,5 % in PBS

Lagerung bei 4 °C für max. 2 Tage

3.2 Assays, Enzyme, Primer und Antikörper

Tabelle 3 Assays, Enzyme und Vektoren

Assays, Enzyme und Vektoren	Hersteller	Ort	Artikelnummer
Gateway® pcDNA™-DEST40	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	12281010
pUC19 DNA	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	SD0061
OneTaq® Quick-Load® 2x Master Mix with Standard Buffer	New England Biolabs	Ipswich, USA	M0486S
TaqMan® Hs 00441242_m1 CCL2	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	#4453320
TaqMan® Hs 01302427_m1 CCL5	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	#4453320
TaqMan® Hs 04207460_m1 CXCL1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	#4453320
TaqMan® Hs 00436450_m1 CXCL2	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	#4453320
TaqMan® Hs 00516023_m1 ICAM1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	#4453320
TaqMan® Hs 00494862_m1 ICAM2	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	#4453320
TaqMan® Hs 00434228_m1 IL1B	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	#4453320
TaqMan® Hs 00446190_m1 IL6	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	#4453320
TaqMan® Hs 00441278_m1 SELE	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	#4453320
TaqMan® Hs 01178820_m1 TGFB1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	#4453320
TaqMan® Hs 01320970_m1 VCAM1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	#4453320
TaqMan® Hs Hs00225829_m1 SVEP1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	4331182
TaqMan® Hs Hs02758991_g1 GAPDH	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	4351370
TaqMan® Mm 01346914_m1 Svp1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	4448892

TaqMan® Universal Master Mix II, Thermo Fisher Scientific Waltham, USA 15724122
no UNG

Primer wurden über Eurofins Genomics (Ebersberg, D) bezogen. Diese wurden salzfrei geliefert und wie die Antikörper bei -20 °C gelagert.

Tabelle 4 Primer und Antikörper

Primer und Antikörper	Hersteller	Ort	Artikelnummer
Anti-GAPDH D16H11	Cell Signaling Technology	Danvers, USA	5174S
Anti-SVEP1 HPA020610	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA	A114326
Anti-B220	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	clone RA3-6B2
Anti-CD90	BioLegend	San Diego, USA	clone 53-2.1
Anti-CD49b	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	clone DX5
Anti-Ly6G	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	clone 1A8
Anti-NK1.1	BioLegend	San Diego, USA	clone PK136
Anti-Ter-119	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	clone TER-119
Anti-CD45.2	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	clone 104
Anti-CD11b	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	clone M1/70
Anti-CD115	BioLegend	San Diego, USA	clone AFS98
Anti-CD11c	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	clone HL3
Anti-F4/80	BioLegend	San Diego, USA	clone BM8
Anti-MHCII	BioLegend	San Diego, USA	clone M5/114.15
Anti-Ly6C	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	clone AL-21
B6N(Cg) Svep1 ^{tm1b(EUCOMM)Hmgu/J} forward primer CGG TCG CTA CCA TTA CCA GT	Eurofins Genomics	Ebersberg, D	ExEK_260416jw
B6N(Cg) Svep1 ^{tm1b(EUCOMM)Hmgu/J} reverse primer TCA GGC TTT AGC AAC CAA CC	Eurofins Genomics	Ebersberg, D	ExEK_260416jw
Svep1 forward primer 5'-ACC ATA CAC GGG AGA TGG GA-3'	Eurofins Genomics	Ebersberg, D	ExEK_260416jw
Svep1 reverse primer 5'-GGG TGT AGC CCT CTT TGC AT-3'	Eurofins Genomics	Ebersberg, D	ExEK_260416jw

3.3 Kits, Software und Geräte

Tabelle 5 Kommerziell verfügbare Kits

Kommerziell verfügbare Kits	Hersteller	Ort	Artikelnummer
ab216951 Mouse CXCL1 SimpleStep ELISA® Kit	Abcam	Cambridge, UK	ab216951
BlackPREP Rodent Tail Kit	Analytik Jena	Jena, D	845-0010250
GeneElute™ plasmid miniprep kit	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA	PLN350-1KT
Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	M1682
Mix2Seq-Smart Easy Quick Kit	Eurofins Genomics	Ebersberg, D	20170103_exek
Pierce™ ECL western blotting substrate	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	34076
Pierce™ BCA protein assay kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	23225
QIAFilter Plasmid Midi and Maxi Kit	Qiagen	Hilden, D	12245
RNEasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, D	74136

Tabelle 6 Software und Geräte

Software	Hersteller	Ort	Anwendung
BD FACSDiva Software	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	Tierversuche
GraphPad Prism® v6.0 MAC OS X	GraphPad Software	La Jolla, USA	Statistik
Image J 1.47v	National Institute of Health	Bethesda, USA	Zellkultur
ImageQuant™ LAS 4000 v1.2	GE Healthcare Life Sciences	Chicago, USA	Molekularbiologie
LAS V4.5	Leica Camera	Wetzlar, D	Tierversuche
Servier Medical Art https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/	Servier	Suresnes, FR	Abbildung
ViiA™ 7 v1.2.2	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	-
Zen lite 2012	Carl Zeiss	Oberkochen, D	Zellkultur
Applied Biosystems™ ViiA™ 7 real-time PCR-System	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	Molekularbiologie
Aesculap GT420	Aesculap Suhl	Suhl, D	Tierversuche
BD LSRFortessa™	BD Biosciences Scientific	Franklin Lakes, USA	Tierversuche
Fixed Core Wire guide, straight 0,38 mm	Cook Group	Bloomington, USA	Tierversuche
Fisherbrand™ Gewebehomogenisator	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	Tierversuche
HI_TORQUE-FLOPPY II 0,36 mm	Abbott Laboratories	North Chicago, USA	Tierversuche
ImageQuant™ LAS 4000	GE Healthcare Life Sciences	Chicago, USA	-

Infinite® M200 PRO	Tecan Group	Männerdorf, SUI	-
Leica DMRB Mikroskop	Leica Camera	Wetzlar, D	Tierversuche
Leica DFC450C Kamera	Leica Camera	Wetzlar, D	Tierversuche
Leica CM 1850 Kryostat	Leica Microsystems	Nussloch, D	Tierversuche
IVC-Käfig	Tecniplast	Hohenpeißen, D	Tierversuche
Mikro Set 1	Fine Science Tools	Heidelberg, D	Tierversuche
Paraffinierstation STP-120	MicroTec Laborgeräte	Walldorf, D	Tierversuche
Paraffinausgießstation AP 280-2	MicroTec Laborgeräte	Walldorf, D	Tierversuche
Prolene™ 7-0	Ethicon	Bridgewater, USA	Tierversuche
Rotationsmikrotom CUT 4055	MicroTec Laborgeräte	Walldorf, D	Tierversuche
Schwanenhalsl KL200 + Lichtleiter	Carl Zeiss	Jena, D	Tierversuche
ThermoLux Heizmatte	AccuLux Witte + Sutor	Murrhardt, D	Tierversuche
Tissue Cool Plate COP20	MEDITE Medical	Burgdorf, D	Tierversuche
Transpore™	3M	Neuss, D	Tierversuche
Zeiss Axiovert 100	Carl Zeiss	Oberkochen, D	Zellkultur
Zeiss AxioCam HRc	Carl Zeiss	Oberkochen, D	Zellkultur
Zellzählgerät	Merck Millipore	Billerica, USA	Zellkultur

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Alle Arbeiten erfolgten in einer mit UV-Licht sterilisierten Werkbank unter laminarem Luftstrom. Die verwendeten Medien wurden auf 37 °C in einem Wasserbad vor Beginn erwärmt. Die Zelllinien wurden in Kulturflaschen oder -schalen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und das entsprechende Medium alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Hierfür wurden die Zellen mit HEPES (Promocell, Heidelberg, D) gewaschen und eine Inkubation mit Trypsin vom Schalen- oder Flaschenboden gelöst. Dessen Wirkung wurde anschließend durch die Zugabe des gleichen Volumens einer Trypsin-Neutralisationslösung (PromoCell, Heidelberg, D) gestoppt. Nach einer Zentrifugation bei 1500 rpm für 4 Minuten wurden die Zellen in neuem Medium resuspendiert und in gewünschter Zahl auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Die Zellzahl wurde mittels eines Zellzählgerätes (Merck Millipore, Billerica, USA) festgestellt.

4.1.1 Scratch Wound Assay

Die Evaluation der Effekte von SVEP1 und der Risikovariante auf relevante Zelltypen erfolgte mit Scratch Wound Assays. Das Versuchsprinzip basiert auf der Verletzung eines konfluenten Zellrasens mit konsekutiver Beobachtung der Rekolonisation durch die Zelleinwanderung (Liang, Park, & Guan, 2007). Hierfür wurden HUVECs und HCASMCs in 24 well-Platten in einer Dichte von 100.000 Zellen/well ausgesät. Mit einer 200 µl-Pipettenspitze und einem Lineal wurde anschließend ein gerader Strich über den Boden der Zellkulturschalen gezogen und die Zellen mit PBS zur Entfernung von Detritus gewaschen. Die zellfreie Fläche wurde zum Zeitpunkt 0 (t₀) sowie nach 6, 8 und 12 Stunden mit dem Phasenkontrastmikroskop Zeiss Axiovert 100 und Zeiss AxioCam HRc (Carl Zeiss, Oberkochen, D) bei 4-facher Vergrößerung fotografiert und mit der Software Zen lite 2012 (Carl Zeiss, Oberkochen, D) gespeichert. Die Migrationsfläche (Freie Fläche t₀ minus freie Fläche t_{6/8/12}) wurde mit der Software Image J erfasst und der Mittelwert gebildet. Bei allen Experimenten wurden mindestens 3 voneinander unabhängige Versuche mit drei technischen Replikaten durchgeführt. Auf statistische Signifikanz wurde mit der Software GraphPad Prism® (GraphPad Software, La Jolla, USA) getestet.

4.1.1.1 SVEP1 Knockdown mit siRNA

Um die Expression von SVEP1 von zu reduzieren, wurden relevante Primärzellen mit small interfering RNAs (siRNAs) mittels RNAiMax (Invitrogen, Karlsruhe, D) transfiziert. Die verwendete siRNA waren gegen das Zielgen SVEP1 gerichtet, zudem wurde eine vom Hersteller empfohlene Kontroll-siRNA als Negativkontrolle eingesetzt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Endkonzentration der siRNAs betrug 10 µmol.

Tabelle 7 Transfektionsansatz siRNA Knockdown

Ansatz pro Well einer 24-well Platte			
Ansatz A		Ansatz B	
Opti-MEM	25 µl	Opti-MEM	25 µl
Lipofectamine	1,5 µl	siRNA	0,5 µl

Ansatz A und B wurden vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 µl behutsam auf die ausgesäten Primärzellen einer 24-well Platte pipettiert und die Zellen damit für 24 Stunden unter den normalen Kultivierungsbedingungen inkubiert. Nach der Beurteilung der Zellmigration per *Scratch Wound Assay* wurde die Knockdown-Effizienz auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Real Time PCR bestimmt. Zudem wurde der *Knockdown* auf Protein-Ebene nach Proteinextraktion der Überstände in HEK293-Zellen mittels Western Blotting beurteilt.

4.1.1.2 Überexpression von SVEP1

Die Überexpression von SVEP1 und der Risikovariante p.D2702G wurde mit der Transfektion von Plasmid-DNA mithilfe eines DEST40-Vektors (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) realisiert. Diese wurden mit dem GeneElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nach den Herstellerangaben aus rekombinanten *E. coli*-Kulturen isoliert. Aufgrund der Notwendigkeit größerer DNA-Mengen wurde die weitere Plasmid-Gewinnung mit dem QIAfilter Plasmid Midi and Maxi Kit (Qiagen, Hilden, D) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte über Eurofins Genomics (Ebersberg, D) mithilfe des Mix2Seq-Smart Easy Quick Kits (Eurofins Genomics, Ebersberg, D).

HEK293-Zellen wurden in 10 cm Schalen in einer Zahl von 1×10^6 ausgesät. Mithilfe der Transfektionsreagenz FuGENE® (Promega, Madison, USA) wurden 5 µg der Plasmid-DNA in 80-90 % konfluente Zellen eingebracht, nachdem das bestehende Medium gegen ein serumfreies ausgetauscht wurde. Die Ernte des Überstandes von 13 ml pro Schale wurde nach 48 Stunden durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde die Transfektion der Zellen mit der gleichen Menge eines unbesetzten pUC19-Vektors (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet.

Tabelle 8 Transfektionsansatz Überexpression

Ansatz pro 10 cm Schale	
FuGENE	20 µl
Plasmid-DNA	5 µg
Opti-MEM	ad 800 µl

Die Überstände wurden jeweils in Amicon Ultra-15 100 kDA-Filtrationssäulen (Merck Millipore, USA) aufgereinigt und konzentriert. Hierfür wurde ein erster Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 4.000 g für 30 Minuten mit dem Verwerfen des wegfiltrierten Überschusses durchgeführt. Nach der Zugabe von 13 ml HEPES wurde mit einer zweiten Zentrifugation bei 4 °C und 4.000 g für 14 Minuten eine Konzentrierung des Überstandes erzielt. Für einen ausreichenden Proteingehalt wurden die aufgereinigten Überstände von 2 Schalen für einen Ansatz mit drei technischen Replikaten verwendet. Zur quantitativen Kontrolle wurde die Menge von SVEP1 und der Variante p.D2702G im Western Blot analysiert.

Der Einfluss der überexprimierten Proteine auf relevante Primärzellen wurde in einem *Scratch Wound Assay* untersucht. Hierfür wurden nach dem *Scratch* und Mediumwechsel vorsichtig 30 µl pro Well einer 24-well Platte des entsprechenden Überstandes auf die ausgesäten Zellen pipettiert. Nach der Dokumentation der Migration wurde die Expression von für die Atherosklerose relevanten proinflammatorischen Zytokinen auf mRNA-Ebene mittels quantitativer *Real Time PCR* (qPCR) bestimmt.

4.2 Molekularbiologie

4.2.1 Genexpression

4.2.1.1 RNA-Aufbereitung aus Primärzellen

Die Zellen zur RNA-Isolierung wurden doppelt mit 500 µl eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis geerntet. Die Isolation wurde mit dem RNEasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, D) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit 350 µl des beinhaltenen RLT-Puffers versetzt und dann bei -80 °C für 2 Stunden weggefroren. Die weiteren Schritte erfolgten nach Herstellerangaben.

4.2.1.2 RNA-Aufbereitung aus Mausgewebe

Die RNA-Extraktion erfolgte aus den Organen Herz, Lunge, Niere, Milz, Leber, Pankreas, Ösophagus, Magen, Darm und Aorta. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Mausorgane bei -80 °C gelagert. Zunächst wurden vergleichbar große Gewebestückchen mithilfe eines Homogenisators (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in 900 µl Trizol homogenisiert und diese dann bei -80 °C für eine Stunde weggefroren. Die weitere RNA-Isolation erfolgte mit dem RNEasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Hilden, D) nach den Herstellerangaben, das Trizol wurde ebenso aus dem Kit bezogen.

4.2.1.3 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde auf Reinheit und Menge mit dem Infinite® M200 PRO (Tecan Group, Männerdorf, SUI) analysiert und bis zur längerfristigen Unterbringung bei -20 °C ständig auf Eis gelagert. Die Synthese von cDNA wurde den Herstellerangaben entsprechend mit dem Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit with dsDNase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Hierfür wurden 1 µg RNA in 16 µl DNase/RNase-freiem Wasser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingesetzt und daraus in einer RT-PCR gemäß dem Herstellerprotokoll 40 µl cDNA mit einer Konzentration von 25 ng/µl synthetisiert. Als Negativkontrolle wurde substratfreies Wasser verwendet. Die cDNA wurde ebenfalls bei -20 °C gelagert.

4.2.1.4 Quantitative Real Time PCR

Im Gegensatz zur konventionellen Endpunkt-PCR erlaubt die qPCR eine Fluoreszenz-basierte Quantifizierung des amplifizierten Nukleotids. Hierfür wurden der TaqMan® Universal Master Mix II und entsprechende TaqMan® Sonden zur Detektion von *SVEP1* sowie anderen Zielgenen eingesetzt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Tabelle 9 qPCR-Ansatz

Ansatz pro well in einer 96-well Platte	
TaqMan® Universal Master Mix II	10 µl
Sonde Zielgen (<i>SVEP1</i> etc.)	1 µl
Sonde GAPDH	1 µl
cDNA 25 ng/µl	1 µl
Nuclease-freies Wasser	ad 20 µl

Der Ansatz wurde in 96-well Reaktionsplatten pipettiert und mit dem ViiA™ 7 real-time PCR-System mit entsprechender Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ausgewertet. Als Negativkontrolle wurden das substratfreie Wasser aus der cDNA-Synthese sowie eine zusätzliche Wasserprobe aus dem qPCR-Ansatz selbst verwendet. Alle Proben wurden auf die Expression von *GAPDH* normalisiert und als technische Triplikate gemessen. Die relative Expression der Zielgene wurde mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode mithilfe der Software GraphPad Prism® (GraphPad Software, La Jolla, USA) ausgewertet und auf statistische Signifikanz mit und einem Mann-Whitney-U-Test auf ein Signifikanzniveau von 0,05 getestet. Absolute mRNA-Mengen wurden mit der $2^{-\Delta C_t}$ -Methode ermittelt.

4.2.2 Proteinexpression

4.2.2.1 Proteinaufbereitung aus Mausgewebe und Primärzellen

Die Proteinaufreinigung der Tierversuche erfolgte aus den Organen Herz, Niere, Milz, Leber, Pankreas, Ösophagus, Magen, Darm und insbesondere Aorta und Lunge. Zunächst wurden vergleichbar große Organstückchen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit einem Gewebehomogenisator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zerkleinert. In der Zellkultur wurden die Primärzellen und Überstände ohne vorherige Schritte lysiert. Die Zellen oder Überstände wurden hierfür jeweils in 100 µl RIPA bei -80 °C für 15 Minuten lysiert und konsekutiv dreimal für 30 Sekunden mit im Ultraschallbad beschallt. Anschließend wurden die Lysate bei 4 °C und 16.000 g für 30 Minuten zentrifugiert und das entstandene Pellet verworfen. Die Konzentration der Proteinlysate wurde mithilfe eines BCA-Proteinstandard-Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und des Infinite® M200 PRO (Tecan Group, Männerdorf, SUI) ermittelt. Als Negativkontrolle wurde leerer RIPA verwendet.

4.2.2.2 Western Blotting

Western Blotting bezeichnet eine semiquantitative Methode zur Detektion spezifischer Proteine. Sie basiert auf dem Übertragen der Größe nach aufgetrennter Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, dem Bilden von spezifischen und immobilisierten Antikörper-Protein-Komplexen und der Detektion der gebundenen Antikörper über Sekundäntikörper mithilfe von Chemilumineszenz (Burnette, 1981; De Blas & Cherwinski, 1983). Vorbereitend wurden die isolierten Proteine mit 12,5 µl 4x Laemmli Puffer und RIPA auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl pipettiert und bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Als nächstes wurden die Proteine anhand ihres Molekulargewichtes in einem vorgefertigten 4-20%igen Gradienten-Polyacrylamidgel (Bio-Rad, Hercules, USA) mittels Elektrophorese bei 280 V für 20 Minuten in einer Kammer mit 1x Elektrophorese Puffer aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine bei 100 V für 60 Minuten auf eine Nitrozellulosemembran (Merck Millipore, Billerica, USA) in einer Kammer mit 1x Transfer Puffer geblottet. Um das unspezifische Binden der Antikörper an die Membran zu vermeiden, wurde die Membran 60 min lang mit 5%iger Milch in PBS geblockt. Danach wurde die Membran 3-mal für 5 Minuten in 1x PBS-T gewaschen und im Anschluss in 5 %iger Milch mit einem Primäntikörper bei 4 °C über Nacht schwenkend inkubiert. Als nächstes wurde die Membran erneut 3-mal für 5 Minuten in 1x PBS-T gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundäntikörper inkubiert. Als Primäntikörper wurde ein Anti-SVEP1-Antikörper (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) im Verdünnungsverhältnis 1:1.000 und ein Anti-GAPDH-Antikörper (Cell Signaling Technologies, Danvers, USA) im Verhältnis 1:50.000 verwendet. Die Entwicklung der Membran wurde mit einem ECL-Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und die folgende Belichtung und

Fotodokumentation im ImageQuant LAS 4000 mit entsprechender Software (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) durchgeführt.

4.3 Tierversuche

Als Versuchstiere wurden in dieser Arbeit Mäuse verwendet, da sie aufgrund ihrer kurzen Generationszeit, ökonomischen Haltungsbedingungen und der hohen Verfügbarkeit transgener Stämme ein sehr gut geeignetes Kleintiermodell zur funktionellen Charakterisierung von *Svep1* darstellen. Alle durchgeführten Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern nach § 8 Abs. 1 des deutschen Tierschutzgesetzes (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-49-2016) genehmigt. Alle verwendeten Mäuse wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen, hatten einen C57BL/6-Hintergrund und wurden in der Tierhaltung des Deutschen Herzzentrums München gezüchtet und gehalten. Der C57BL/6-Stamm ist einer der am meisten verwendeten Inzuchtstämme in der Mausmodellforschung und wird entsprechend oft als Hintergrundstamm transgener Mauslinien verwendet. Bei allen Stämmen wurden Bruder-Schwester-Verpaarungen durchgeführt, die Jungtiere im Alter von 4 Wochen von der Mutter abgesetzt und in Gruppen gehalten. Zuchtböcke wurden aufgrund ihres aggressiven Verhaltens einzeln gehalten und mit stetigem Sicht- und Geruchskontakt zu anderen Artgenossen versehen. Die Kennzeichnung der Versuchstiere erfolgte durch eine Ohrlochmarkierung, wobei das ausgestanzte Gewebe zur Genotypisierung verwendet wurde. Zum Versuchseintritt waren alle Mäuse 8 Wochen alt und wiesen ein Körpergewicht von über 20 Gramm auf. Als Tierstallungen wurden spezifiziert Pathogen-freie Haltungen mit konstanten Außenbedingungen, einem automatischen Hell-Dunkel-Rhythmus, Beschäftigungsmaterial, ausgefülltem Sozialleben sowie individuell ventilierte (IVC) Käfige mit HEPA-Filter (Tecniplast Deutschland, Hohenpeißenberg, D) mitsamt freiem Zugang zu pelletiertem Futter (Ssniff Spezialdiäten, Soest, D) verwendet.

4.3.1 Genotypisierung

4.3.1.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA zur Genotypisierung der Versuchstiere wurde mit dem BlackPREP Rodent Tail DNA Kit (Analytik Jena, Jena, D) durchgeführt. Als Ausgangsgewebe hierfür wurden die Ohrstanzen der Mäuse verwendet. Zunächst wurden die verwendeten Proben bei 50 °C für 90 Minuten unter Schütteln inkubiert und die DNA in den folgenden Arbeitsschritten nach den Herstellerangaben isoliert. Die isolierte DNA wurde auf Reinheit und Menge mit dem Infinite® M200 PRO (Tecan Group, Männedorf, SUI) analysiert und längerfristig bei -20 °C gelagert. Zur Amplifizierung wurde die DNA auf 10 ng/µl verdünnt.

4.3.1.2 PCR

Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) erlaubt die exponentielle Amplifizierung einer vordefinierten DNA-Sequenz *in vitro* (Mullis et al., 1986). Der Prozess verläuft in drei Schritten, die von verschiedenen Reaktionstemperaturen vorgegeben werden. Während des Denaturierungs-Schrittes bewirkt eine Temperatur von 94-98 °C die Trennung der Wasserstoffbrücken von komplementären Basenpaaren, was in einer einzelsträngigen DNA resultiert. Während des Hybridisierungs-Schrittes bewirkt eine Reduktion der Temperatur auf 50-65° C eine Anlagerung spezifischer Oligonukleotide, genannt Primer, an die DNA. Während des Elongations- oder Amplifizierungsschrittes wird die Temperatur je nach verwendeter Polymerase auf 68-72 °C erhöht. Die Polymerase synthetisiert mit passenden und ausreichenden Substraten einen neuen, zur Ziel-DNA komplementären DNA-Strang. Alle drei Schritte werden 25- bis 40-mal wiederholt.

Die Amplifizierung der genomischen DNA wurde mit dem OneTaq® Quick-Load® 2x Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, USA) und einem für die Knockout-Kassette spezifischem Primer nach folgendem Ansatz und Protokoll durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde nukleasefreies Wasser sowie ein Reaktionsansatz ohne DNA und als Positivkontrolle die Detektion des Svp1-Wildtyps mit einem spezifischem Primer verwendet. Die Primer wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, D) bezogen.

Tabelle 10 PCR-Ansatz der murinen genomischen DNA

Ansatz pro PCR	
OneTaq® 2x Master Mix	12,5 µl
Forward Primer 1:10	0,5 µl
Reverse Primer 1:10	0,5 µl
cDNA 10 ng/l	2 µl
Nuclease-freies Wasser	ad 25 µl

Tabelle 11 Thermozykler-Protokoll für OneTaq® 2x Master Mix

Reaktionsschritt / Temperatur / Dauer		
Initiale Denaturierung	94 °C	30 Sekunden
40 Zyklen	94 °C	20 Sekunden
	60 °C	20 Sekunden
	68 °C	1 Minute
	68 °C	1 Minute
Finale Elongation	68 °C	1 Minute
Kühlung	4 °C	unbegrenzt

4.3.1.3 Gelelektrophorese

Die Darstellung der amplifizierten DNA wurde mit einer Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde mittels 1x TBE eine 1%iges Agarosegel (VWR Chemicals, Erlangen, D) hergestellt und diesem den DNA/RNA-Farbstoff peqGreen (beide VWR Chemicals, Erlangen, D) im Verhältnis 1:2.000 beigesetzt. Als Puffer wurde weiterhin 1x TBE verwendet. Jede Probe wurde vor dem Einpipettieren mit 6x Purple Loading Dye entsprechend auf 20 µl vermischt und eine Quick-Load® 2-Log DNA Ladder (0,1-10,0 kb) (beide New England Biolabs, Ipswich, USA) als Referenz der Molekülgröße verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 130 V für 45 Minuten durchgeführt. Das Amplifikationsprodukt des Knockouts wurde mit einer Größe von 540 kb und des Wildtyps mit 389 kb dargestellt. Die qualitative Auswertung erfolgte unter UV-Licht mithilfe des ImageQuant™ LAS 4000 und entsprechender Software (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA).

4.3.2 Restenose-Modell

Zur Evaluation der *Svep1*-Defizienz auf die Neointima-Bildung wurde die drahtinduzierte Verletzung der Arteria femoralis (Femoralsinjury-Modell) ausgewählt und in einigen Punkten modifiziert (Sata et al., 2000). Die intimale Hyperplasie wurde hierbei nach 14 und 28 Tagen untersucht, um Auswirkungen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien differenzieren zu können. Als Versuchstiere wurden B6N(Cg)-*Svep1*^{tm1b(EUCOMM)Hmg^u/J} (*Svep1*^{+/-}) Mäuse und als Kontrolltiere C57/BL/6 Mäuse (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) verwendet.

Am Operationstag wurden die Mäuse in ihren IVCs in die OP-Räume transportiert. Zur Stressminimierung wurde eine Abdunkelung der Käfige vorgenommen. Alle Eingriffe wurden unter einer intraperitonealen Vollnarkose, bestehend aus einer Mischinjektion mit 0,05 mg/kg Fentanyl (Albrecht, Aulendorf, D), 5,0 mg/kg Midazolam (Ratiopharm, Ulm, D) und 0,5 mg/kg Medetomidin (Zoetis, Madison, USA), durchgeführt. Die entsprechende Narkosetiefe wurde durch einen fehlenden Zwischenzehenreflex sowie einen fehlenden Schmerzreflex bei Stimulation am äußeren Gehörgang festgestellt. Die perioperative Lagerung erfolgte auf einer Heizmatte (AccuLux Witte + Sutor, Murrhardt, D), mit der die rektal gemessene Körpertemperatur konstant auf 37-38 °C gehalten werden konnte. Die Augen wurden durch eine Dexpanthenol-haltige Salbe (Bayer, Leverkusen, D) geschützt, das Fell im Bereich der Leiste mit einem Rasierer (Aesculap Suhl, Suhl, D) entfernt und die Haut ebendort mit einem Antiseptikum (Schülke, Norderstedt, D) desinfiziert. Die Fixierung der Gliedmaßen wurde mit einer Transpore™ (3M, Neuss, D) durchgeführt. Unter einem Operationsmikroskop mit externer Ausleuchtung (Carl Zeiss, Jena, D) wurde die Operation mithilfe eines mikrochirurgischen Instrumentariums (Fine Science Tools, Heidelberg, D) und einem 7-0 Polypropylenfaden (Ethicon, Bridgewater, USA) durchgeführt. Nach dem Hautschnitt auf der

Höhe des Kniegelenks erfolgte das stumpfe Freipräparieren des Gefäß-Nerven-Bündels. Einer Austrocknung des Gewebes wurde mit regelmäßiger Befeuchtung mithilfe einer isotonen Natriumchlorid-Lösung (AlleMan Pharma, Pfullingen, D) entgegengewirkt. Der Nervus femoralis wurde separat freipräpariert und zur Schonung nach medial verlagert. Anschließend wurden die Arteria und Vena femoralis distal der Leistenregion freipräpariert und angeschlungen (Faden A), was später als passagere Blutsperre dienen soll. Als Nächstes wurde die Arteria profunda femoris, ein im Verlauf abgehender Seitenast der Femoralarterie, freipräpariert und direkt nach dem Abgang eine zweite Ligatur (Faden B) locker um diesen Seitenast geschlungen. Eine dritte Ligatur (Faden C) wurde weiter distal gesetzt und durch einen einfachen Knoten angezogen. Danach wurde der Faden A temporär angezogen und damit der Blutfluss in der Arteria femoralis kurzfristig unterbrochen. Währenddessen wurde die Arteria profunda femoris inzidiert und der Schnitt durch einen angespitzten 0,36 mm HI_TORQUE-FLOPPY II Katheterführungsdraht (Abbott Laboratories, North Chicago, USA) dilatiert. Als nächstes wurde ein 0,38 mm Fixed Core Wire guide, straight (Cook Group, Bloomington, USA) in die Arteria femoralis eingebracht und für 1 Minute belassen, um das Gefäß aufzudehnen und zu denudieren. Anschließend wurde die Arteria femoris profunda mit dem Faden B permanent ligiert und der Faden A wieder entfernt. Die Versorgung des nun verschlossenen Astes wurde durch Kollateralen erwartet und durch die kurze Stauung der Femoralarterie keine relevante Ischämie riskiert. Nach Reposition des Nervus femoralis wurde der Wundverschluss per primam intentionem durch Einzelknopfnähte vorgenommen. Zur optimalen postoperativen Analgesie wurde eine 72-stündige subkutane Buprenorphingabe (RB Pharmaceuticals, Berkshire, UK) alle 8 Stunden und initial 30 Minuten vor dem Narkoseende verabreicht. Nach dem Eingriff erfolgte eine Antagonisierung der Narkose durch eine subkutane Mischinjektion, bestehend aus 2,5 mg/kg Atipamezol (Orion Pharma, Espoo, FI), 0,5 mg/kg Flumazenil (Hexal, Holzkirchen, D) und 1,2 mg/kg Naloxon (Ratiopharm, Ulm, D). Alle Mäuse wurden innerhalb der ersten 72 Stunden 3-mal täglich und an allen weiteren Tagen 2 Mal täglich anhand eines etablierten Scoring-Systems untersucht, wobei der Fokus insbesondere auf Allgemeinzustand, Verhalten, Ausscheidung und Aufnahme sowie postoperative Komplikationen wie die Beinparese gerichtet wurde. Vor Versuchsbeginn wurden Abbruchkriterien definiert, bei deren Auftreten die Tiere zum Schutz vor höherer Belastung sofort euthanasiert wurden.

Am Versuchsende wurden die Mäuse mit einer intraperitonealen Pentobarbitalüberdosis von 600 mg/kg (WDT, Garbsen, D) euthanasiert. Zunächst wurde aus der rechten Herzkammer Blut entnommen und direkt im Anschluss die Aorta und der Systemkreislauf über die linke Herzkammer mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung (AlleMan Pharma, Pfullingen, D) gespült. Zudem wurde über die infrarenale Aorta separat die Femoralarterie mit dieser Lösung sowie

mit 4 % gepuffertem Formaldehyd (AppliChem, Darmstadt, D) gespült, um eine völlige Blutleere in dem verletzten Gefäß zu gewährleisten. Die Arteria femoralis wurde über eine Länge von 10 mm proximal der Stelle des ligierten Seitenastes entnommen. Anschließend wurden neben der Aorta und dem Herzen noch Teile von Lunge, Leber, Niere, Ösophagus, Magen und Darm entnommen und nach dem sofortigen Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

Das entnommene Stück der *Arteria femoralis* wurde über Nacht in dem 4 % gepuffertem Formaldehyd (AppliChem, Darmstadt, D) immersionsfixiert, automatisch dehydriert und paraffiniert (MicroTec Laborgeräte, Walldorf, D). Mithilfe einer Ausgießstation (MicroTec Laborgeräte, Walldorf, D) wurden sie nachfolgend in Paraffin eingebettet und auf einer Kühlplatte (MEDITE Medical, Burgdorf, D) abgekühlt. Als Startpunkt der Schnitte wurde die Stelle der distalen Ligatur gewählt und davon ausgehend nach proximal an einem Rotationsmikrotom (MicroTec Laborgeräte, Walldorf, D) in einer Dicke von 2 µm geschnitten und zwei Schnitte pro Objektträger aufgezogen. Die Paraffinschnitte wurden bis zur Färbung bei Raumtemperatur gelagert.

4.3.3 Atherosklerose-Modell

Zur Evaluation der *Svep1*-Defizienz auf die Atherogenese wurde eine heterozygote *Svep1*-Knockout-Maus (*Svep1*^{+/-}) auf einen proatherogenetischen *ApoE*-Knockout-Hintergrund (*ApoE*^{-/-}) gekreuzt. Den *ApoE*^{-/-} Mäusen fehlt das Apolipoprotein E, das die Bindung von cholesterinreichen Lipoproteinen wie VLDL und Chylomikronen aus dem Blut an die LDL-Rezeptoren der Leber vermittelt. Dieser Umstand führt zu einer 5-fach erhöhten Konzentration cholesterinreicher Stoffe (Zhang, Reddick, Piedrahita, & Maeda, 1992). Unterstützt durch eine cholesterinreiche Ernährung oder high-fat diet (HFD) (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, USA) entwickeln diese Mäuse insbesondere im Bereich der Aorta schnell atherosklerotische Läsionen, womit sie ein gut charakterisiertes Atherosklerose-Modell darstellen. B6N(Cg)-*Svep1*^{tm1b(EUCOMM)Hmgu/J} (*Svep1*^{+/-}) Mäuse und B6.129P2-*ApoE*^{tm1Unc/J} (*ApoE*^{-/-}) Mäuse (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) wurden über mindestens 4 Generationen gekreuzt, um *ApoE*^{-/-} *Svep1*^{+/-} sowie *ApoE*^{-/-} *Svep1*^{+/+} im Verhältnis 1:1 zu erhalten. Es wurden Mäuse beider Geschlechter verwendet. Im Alter von 8 Wochen wurde eine 12-wöchige Fütterungsperiode durchgeführt, wobei zu Beginn und zum Ende die Körpergewichte der Tiere erfasst wurden. Am Versuchsende wurden die Mäuse mit einer intraperitonealen Pentobarbitalüberdosis (600 mg/kg) euthanasiert. Zunächst wurde aus der rechten Herzkammer Blut entnommen. Ein Teil dessen wurde in 50 mM EDTA-Lösung aliquotiert, um damit die Blutcholesterinkonzentration mittels Routineverfahren im Institut für Laboratoriumsmedizin am Deutschen Herzzentrum München durchzuführen. Nach der Blutentnahme wurde die Aorta und der Systemkreislauf über die linke Herzkammer mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung (AlleMan Pharma,

Pfullingen, D) gespült, die Aorta von Fett- und Bindegewebe freipräpariert und ab der Aorta ascendens bis zum Abgang der Nierenarterien abgesetzt. Das Herz mitsamt Aortenwurzel wurde als nächstes und im Anschluss neben der Lunge noch Teile von Nieren, Leber, Ösophagus, Magen sowie Darm entnommen und nach sofortigem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

4.3.3.1 Gefrierschnitte

Nach der Entnahme der Aortenwurzeln wurden diese in einer Einbettschale in Tissue-Tek® O.C.T. (Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn) eingebettet und bis zur Bearbeitung bei -80 °C gelagert. Die Schnitte wurden mithilfe eines Kryostat-Mikrotom (Leica, Nussloch, D) bei einer Betriebstemperatur von -21 °C angefertigt. Die Aortenwurzeln wurden ab der Klappenebene in einer Dicke von 3 µm geschnitten und zwei Schnitte pro Objektträger aufgezogen. Bis zur Färbung wurden die Schnitte wieder bei -80 °C gelagert.

4.3.3.2 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie (*Flow Cytometry*, FC) können Zellen nach ihrer Größe und Fluoreszenzeigenschaften charakterisiert werden. Dazu werden Epitop-spezifische Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper mit den Zellproben inkubiert und mithilfe eines Durchflusszytometers quantifiziert. Zur Beurteilung der Leukozyten-Akkumulation in atherosklerotischen Mausplaques wurden die entnommenen Aorten initial mehrfach mit PBS gespült, um eine Kontamination mit Blutzellen zu minimieren. Perivaskuläres Gewebe wurde sorgfältig mikroskopisch entfernt. Anschließend wurden die Aorten mit Scheren zerkleinert und bei 37 °C und 750 rpm in einem enzymatischen Verdau (alle enzymatischen Komponenten Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 60 Minuten inkubiert. Als nächstes wurden die Proben mehrfach mit FACS-Puffer gespült und bei 4 °C mit 400 g für 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Zellpellet in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert, gefiltert und in ein FACS-Röhrchen übertragen. Hierbei wurden 10 µl für die Zellzahlbestimmung verwendet. Alle Antikörper des Master Mix I basieren auf Phycoerythrin. Die Inkubation mit den Antikörpern sowie die konsekutive Auswertung wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt.

Tabelle 12 FACS-Antikörperansätze

Antikörper		Antikörper	
Master Mix I		Master Mix II	
B220	0,5 µl	CD45.2	0,5 µl
CD49b	0,25 µl	CD11b	0,5 µl
CD90.2	0,1 µl	CD115	0,5 µl
NK1.1	0,5 µl	CD11c	0,5 µl
Ter119	0,5 µl	F4/80	0,5 µl
Ly6G	0,5 µl	MHCII	0,5 µl
		Ly6C	0,5 µl
FACS-Puffer	ad 50 µl	FACS-Puffer	ad 50 µl

Zunächst wurde jede Probe mit 50 µl des Master Mix I versetzt, bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert und mit 1000 µl FACS-Puffer aufgefüllt. Danach wurde das Gemisch wieder bei 4 °C mit 400 g für 8 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Diese Schritte wurden ebenso nach Zugabe von 50 µl des Master Mix II wiederholt. Für die Kontrollproben zur Gerätekompensation wurden zu 20 µl Beads 300 µl FACS-Puffer und jeweils 1 µl Antikörper hinzugefügt. Anschließend wurde 1 ml FACS-Puffer hinzupipettiert und die Probe erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 600 µl resuspendiert. Zur Differenzierung der lebenden Zellen erfolgte eine Mischung des initial pipettierten Aliquots mit Trypanblau (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) im Verhältnis 1:2. Die Zählung erfolgte in einer Zählkammer. Die Messung wurde am FC-Gerät mit entsprechender Software (BD BioSciences, Franklin Lakes, USA) durchgeführt. Zur Viabilitätstestung wurden die Leukozyten-Populationen mithilfe der Zellgröße (forward scatter, FSC-A) und interzellulärer Granularität (side scatter, SSC-A) begrenzt und die Kompensation manuell durchgeführt. Neutrophile Granulozyten wurden als CD90/B220/CD49b/ NK1.1/Ter119^{low} CD45.2/CD11b^{high} CD115^{low} Ly6G^{high}, Monozyten als CD90/B220/CD49b/ NK1.1/Ter119^{low} CD11b^{high} F4/80/CD11c^{low} oder CD45.2/CD11b^{high} Ly6G^{low} CD115^{high} und Makrophagen als CD90/B220/CD49b/NK1.1/Ter119^{low} CD11b^{high} Ly6C^{low/int} Ly6G^{low} F4/80^{high} identifiziert. Auf statistische Signifikanz wurde mit der Software GraphPad Prism® (GraphPad Software, La Jolla, USA) und einem ungepaarten t-Test auf ein Signifikanzniveau von 0,05 getestet.

4.3.3.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet ein Verfahren, bei dem ein Antigen mit einem Erstantikörper gebunden und über einen Detektionsantikörper, der eine enzymatische Farbstoffreaktion katalysiert, nachgewiesen wird (Engvall & Perlmann, 1971). Das Zielprotein hierbei war das murine CXCL1, das im Mausplasma der beiden Versuchskohorten mit dem Mouse CXCL1 SimpleStep ELISA® Kit (Abcam, Cambridge, UK)

quantifiziert werden konnte. Auf statistische Signifikanz wurde mit der Software GraphPad Prism® (GraphPad Software, La Jolla, USA) und einem ungepaarten t-Test auf ein Signifikanzniveau von 0,05 getestet.

4.3.4 Histologie und morphometrische Auswertung

Die histologische Aufarbeitung der aufbereiteten murinen Gefäße erfolgte mithilfe der Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung. Diese stellt eine Standardfärbung dar, in der Zellkerne durch das Hämatoxylin dunkelblau und Kollagen, Keratin, Zytoplasma und Erythrozyten durch das Eosin rot dargestellt werden (Trenchev & Konopka, 1980). Paraffinschnitte wurden vorbereitend in einer absteigenden Alkoholreihe (2x Xylol, 2x Ethanol 100 %, 1x Ethanol 96 %, 1x Ethanol 70 %) jeweils für 1 Minute und abschließend in Millipore® Wasser für 2 Minuten geschwenkt und bis zur Färbung darin gelagert.

Zu Beginn wurden die Schnitte mit Mayers Hämalaun für 3 Minuten gefärbt, dann für 2 Sekunden mit 0,1 % HCl-Lösung gespült und danach für 5 Minuten unter fließendem Leitungswasser differenziert. Anschließend wurde der nächste Färbeschritt mit Eosin-G-Lösung 0,5 % wässrig für 3 Minuten durchgeführt und die Schnitte als nächstes für 30 Sekunden erneut in Leitungswasser gespült. Die gefärbten Schnitte wurden für 2 Minuten in Millipore® Wasser geschwenkt und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1x Ethanol 70 %, 1x Ethanol 96 %, 2x Ethanol 100 %, 2x Xylol) dehydriert. Zur langfristigen Lagerung wurden die Schnitte abschließend in Pertex (Histolabs Products AB, Göteborg, SE) eingedeckt und mit einem zusätzlichen Objektträger versehen.

Die Quantifizierung der Neointima wurde bei 10-facher Vergrößerung unter einem Mikroskop mit entsprechender Kamera und Software (Leica Camera, Wetzlar, D) durchgeführt. Hierfür wurden serielle Schnitte im Abstand von 100 µm ausgemessen und die Neointima/Media-Ratio berechnet. Anhand dieser wurden die vier Schnitte mit den höchsten Werten ausgewählt und die auf die Media normalisierte Neointimafläche ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) berechnet. Aus der Summe der normalisierten Neointimaflächen wurde für jedes Tier ein Mittelwert gebildet.

Die Quantifizierung atherosklerotischer Plaques wurde analog bei 5-facher Vergrößerung durchgeführt. Hierfür wurden vier serielle Schnitte im Abstand von 25 µm ausgewertet. Als Startpunkt wurde der Schnitt gewählt, auf dem alle Aortenklappentaschen vollständig angeschnitten waren. Aus der Summe aller Plaquesflächen wurde für jedes Tier der Mittelwert berechnet.

Insgesamt wurden die Mittelwerte von Neointima und Atherosklerose der Kontrolltiere mit denen der heterozygoten *Svep1*-Knockouts verglichen und auf statistische Signifikanz mit der Software GraphPad Prism® (GraphPad Software, La Jolla, USA) und einem ungepaarten t-Test auf ein Signifikanzniveau von 0,05 getestet.

5 Ergebnisse

5.1 Der Einfluss von SVEP1 in humanen Zelllinien

Um den Einfluss von *SVEP1* auf Atherosklerose-relevante Zellarten zu charakterisieren, wurden zunächst HCASMCs und HUVECs einem *SVEP1*-Knockdown auf mRNA-Ebene unter Nutzung von siRNAs mithilfe von RNA-Interferenz unterzogen. Die Genexpression wurde auf *GAPDH* als *Housekeeping*-Gen normalisiert. Exemplarisch sind die Ergebnisse des Knockdowns in HUVECs dargestellt. Im Vergleich zu einer Kontroll siRNA (scramble) wurde eine *SVEP1* Knockdown-Effizienz von $75,17 \pm 2,89$ % auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Abbildung 2).

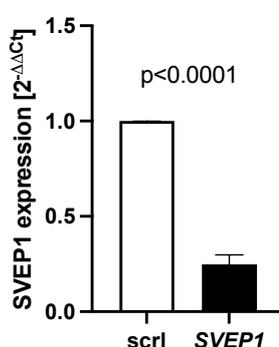


Abbildung 2 SVEP1 Knockdown-Effizienz. Die relative *SVEP1* Knockdown-Effizienz auf mRNA-Ebene wurde nach Umrechnung zu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werten als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Aus allen unabhängigen Versuchen wurden technische Triplikate zusammengefasst ($n=3$) und mit einem Einstichproben t-Test auf ein Signifikanzniveau von 0,05 getestet. *Scr1*, scramble.

Zudem wurden die Effekte des *SVEP1* Knockdowns auf Protein-Ebene untersucht. Hier wurde im Western Blot des Überstandes beider Zelltypen 96 Stunden nach dem *SVEP1*-Knockdown kein qualitativ klar erkennbarer Unterschied gezeigt, hierfür sind ebenso exemplarisch die Ergebnisse des Knockdowns in HUVECs dargestellt (Abbildung 3).

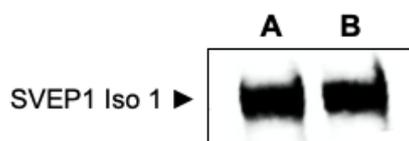


Abbildung 3 Auswirkungen des SVEP1-Knockdowns auf Proteinebene. In A ist die *SVEP1*-Expression im Überstand von HUVECs 96 Stunden der Negativkontrolle abgebildet. In B wurde in den Zellen mit dem *SVEP1* Knockdown kein nachweisbarer Unterschied festgestellt ($n=3$).

Die Migration beider Zellarten wurde nach einem 24-stündigem *SVEP1* Knockdown mithilfe eines Scratch Wound Assays nach 6, 8 und 12 Stunden untersucht und die Ergebnisse nach 8 Stunden dargestellt. Bei den SMCs wurde in der Knockdown-Gruppe mit $110\,264 \pm 9\,126$ Pixel verglichen mit der Kontrollgruppe mit $132\,092 \pm 9\,286$ Pixel kein signifikanter Unterschied beobachtet ($p=0,17$). Bei den HUVECs wurde mit $78\,089 \pm 10\,429$ Pixel in der Knockdown-Gruppe verglichen mit $95\,021 \pm 13\,346$ Pixel in der Kontrollgruppe ebenso kein signifikanter Unterschied festgestellt ($p=0,65$) (Abbildung 5).

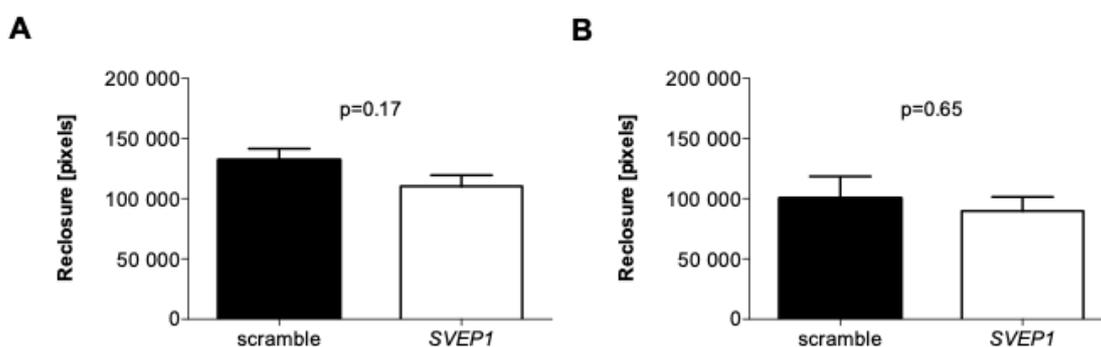


Abbildung 4 Zellmigration nach *SVEP1* Knockdown. In dieser Abbildung sind exemplarisch die Ergebnisse nach 8-stündiger Migration abgebildet. In A ist die Migration von SMCs und in B die von HUVECs in Pixel als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt. Aus allen unabhängigen Versuchen wurden technische Triplikate zusammengefasst ($n_{SMC}=3$, $n_{HUVEC}=5$) mit einem ungepaarten zweiseitigen t-Test auf ein Signifikanzniveau von 0,05 getestet.

5.2 Der Einfluss der Risikovariante von *SVEP1*

Neben den Effekten des *SVEP1*-Wildtyp-Proteins auf relevante Zellarten wurde der Einfluss der Risikovariante p.D2702G auf die Zellmigration untersucht. Hierfür wurden zunächst der Wildtyp und die Risikovariante in HEK-Zellen überexprimiert, deren Überstände nach 48 Stunden geerntet und konzentriert wurden. Eine semiquantitative Mengenkontrolle wurde mithilfe eines Western Blots nach der Einkonzentrierung durchgeführt. Anschließend wurden SMCs und HUVECs mit den konzentrierten Überständen inkubiert und deren Migration in einem Scratch Wound Assay nach 6, 8 und 12 Stunden beurteilt. Exemplarisch sind hier die Ergebnisse von HUVECs ausführlicher dargestellt. Bei SMCs wurde mit $108\,230 \pm 6\,320$ Pixel in der Gruppe mit Wildtyp-*SVEP1* verglichen mit $107\,011 \pm 3\,607$ Pixel in der Gruppe mit *SVEP1*-p.D2702G kein signifikanter Unterschied beobachtet ($p=0,88$). Bei HUVECs wurde mit $153\,364 \pm 3\,980$ Pixel mit Wildtyp-*SVEP1* verglichen mit $133\,392 \pm 6\,087$ eine signifikant geringere Migration in der *SVEP1*-p.D2702G Gruppe gezeigt ($p=0,02$). Die Unterschiede bei den HUVECs waren mit $125\,745 \pm 5\,804$ vs. $109\,051 \pm 7\,225$ Pixel auch nach 6 ($p<0,01$) und

mit $173\,983 \pm 4\,090$ vs. $155\,950 \pm 6\,197$ ($p < 0,001$) auch nach 12 Stunden statistisch signifikant geringer (Abbildung 5).

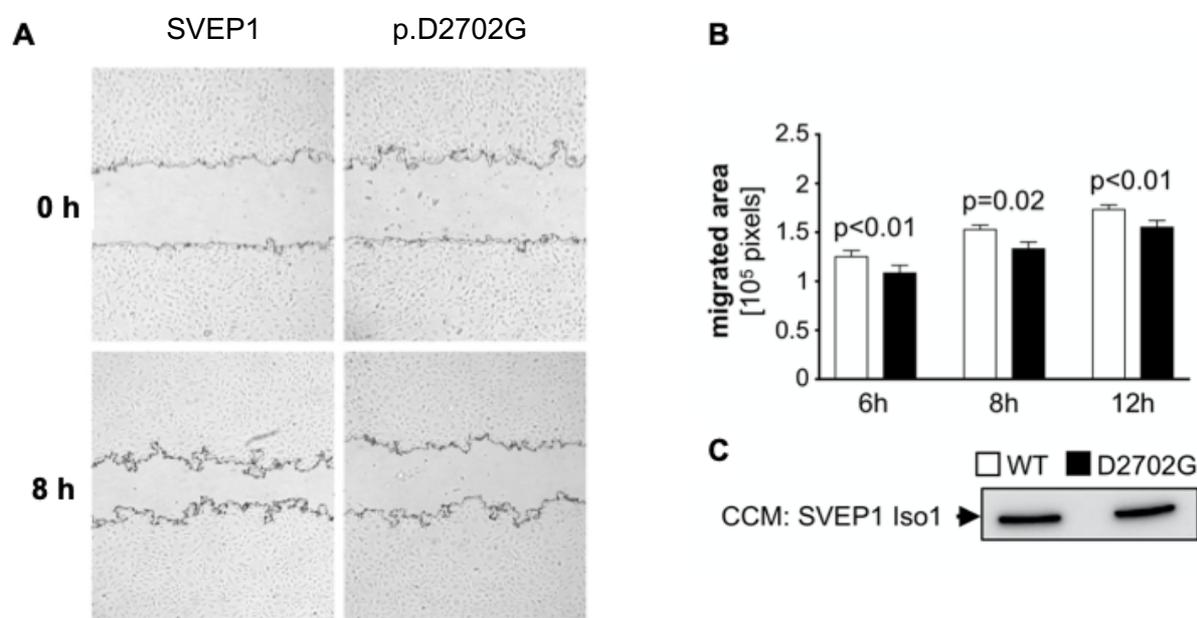


Abbildung 5 Zellmigration nach Stimulation mit SVEP1 und der Risikovariante p.D2702G. In **A** ist exemplarisch die Migrationsfläche von HUVECs zu Beginn und nach 8 Stunden abgebildet. Rechts ist die Risikovarianten-stimulierte Gruppe dargestellt. In **B** ist die migrierte Fläche der HUVECs in Pixel als Mittelwert mit Standardfehler zu den verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen. Aus allen Versuchen wurden technische Triplikate zusammengefasst und mit einem ungepaarten zweiseitigen t-Test auf ein Signifikanzniveau von 0,05 getestet. In **C** ist die Mengenkontrolle der überexprimierten Überstände abgebildet (n=6).

Neben den Migrationsunterschieden wurde in HUVECs auch die Expression von inflammatorischen und für die Pathogenese der Atherosklerose relevanten Zytokinen in einem untersucht. Die Genexpressionen der mit der Risikovariante im Vergleich zum SVEP1-Wildtyp stimulierten HUVECs wurden auf GAPDH als *Housekeeping*-Gen normalisiert und als relative Expressionen in einem explorativem Versuchsansatz dargestellt (Abbildung 6).

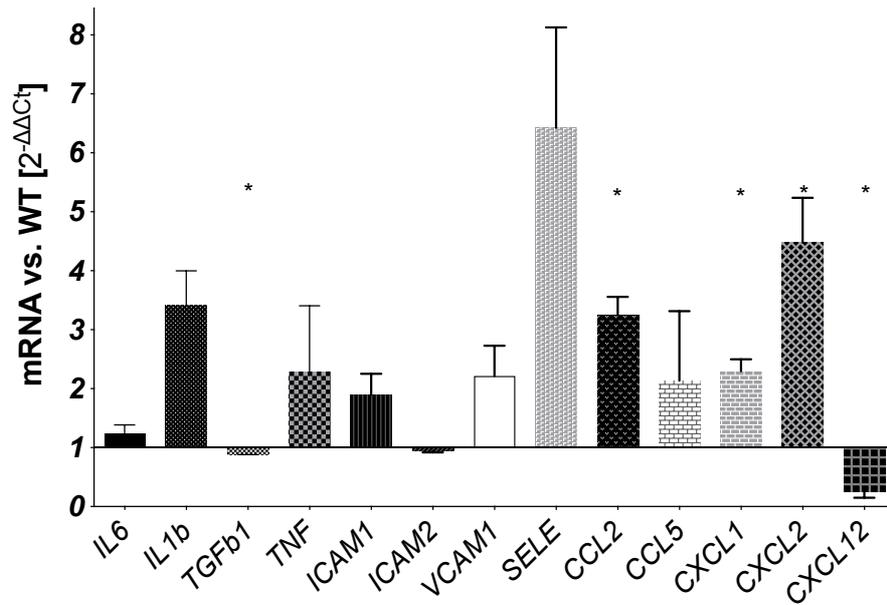


Abbildung 6 Zytokinexpression nach Inkubation mit SVEP1 und Risikovariante. Die Zytokinexpression von HUVECs, die mit konzentriertem SVEP1-Wildtyp-Überstand inkubiert wurden, ist als Baseline mit 1 abgebildet. Die relative Genexpression der Zellen, die mit konzentriertem SVEP1-p.D2702G-Überstand inkubiert wurden, ist als $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Mittelwert mit Standardfehler aufgetragen (n=4 unabhängige Experimente) und mit einem ungepaarten zweiseitigen t-Test auf ein Signifikanzniveau von 0,05 getestet.

5.3 Der Einfluss der *Svep1*-Defizienz im Mausmodell

Um den Einfluss von *Svep1* in der vaskulären Biologie zu charakterisieren, wurde initial untersucht, ob *Svep1* in relevanten Geweben exprimiert wird. Der qualitative Nachweis wurde mit konventioneller Endpunkt-PCR in Wildtyp-Mäusen (*Svep1*^{+/+}) durchgeführt (Abbildung 7).

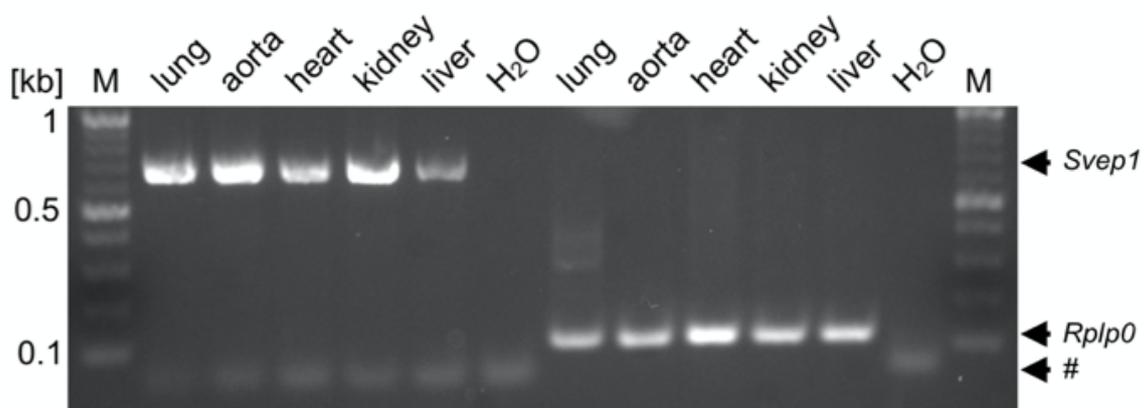


Abbildung 7 Expression von *Svep1* in verschiedenen murinen Geweben. In dieser Abbildung ist die qualitative Expression von *Svep1* in diversen Mausgeweben aufgetragen. *Rplp0* wurde als Mengenkontrolle verwendet. Unter # sind unspezifische Primerbanden mitabgebildet.

Zur Beurteilung des Einflusses der *Svep1*-Defizienz auf Atherosklerose-relevante Phänotypen wurden heterozygote Knockout-Mäuse (*Svep1*^{+/-}) verwendet. Zur Quantifizierung des Knockouts auf Transkript- und Proteinebene wurden als repräsentative Gewebe Aorten und Lungen verwendet. In *Svep1*^{+/-} Mäusen wurde mit $52,2 \pm 7,7 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$ in der Lunge und $27,5 \pm 2,7 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$ und in der Aorta im Vergleich zu *Svep1*^{+/+} Mäusen mit $104,2 \pm 9,6$ und $70,4 \pm 4,0 \cdot 2^{-\Delta\Delta Ct}$ eine deutlich erniedrigte Expression von *Svep1* auf mRNA-Ebene gezeigt ($p < 0,001$). Zudem wurde die Reduktion der *Svep1*-Proteinmenge semiquantitativ in denselben Geweben sowie im Ösophagus per Western Blotting für beide Isoformen nachgewiesen. Als Mengenkontrolle wurde hierfür ebenso GAPDH verwendet (Abbildung 8).

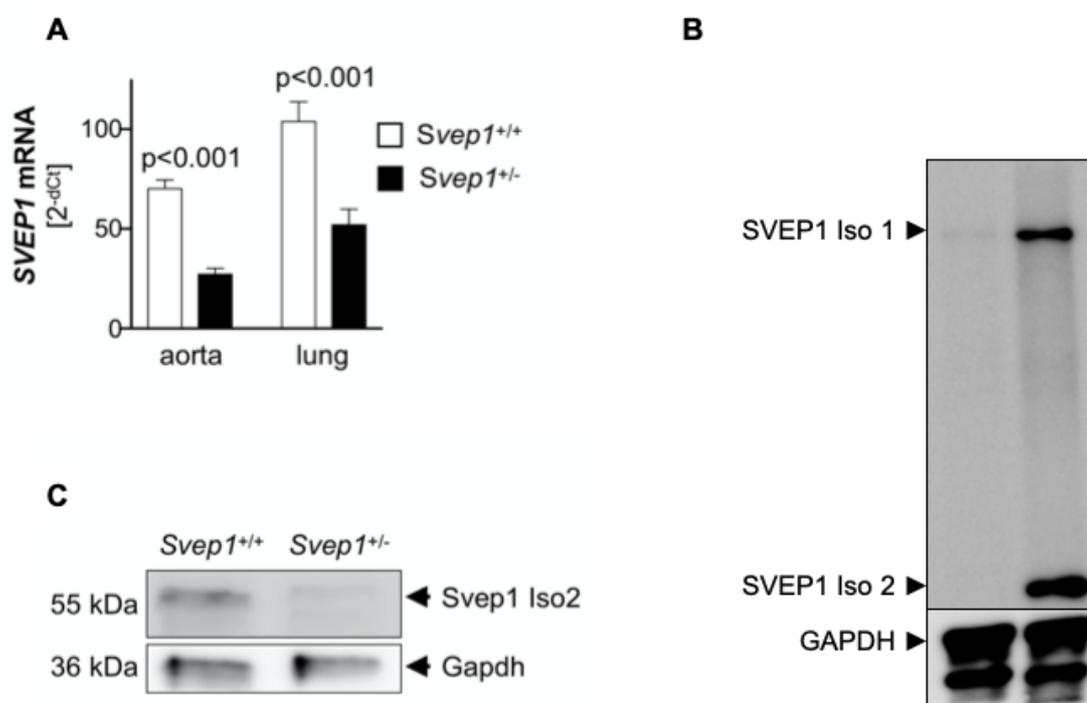


Abbildung 8 *Svep1*-Haploinsuffizienz. In A ist die Expression von *Svep1* von Wildtyp und Knockdown-Maus in $2^{-\Delta\Delta Ct}$ als Mittelwert mit Standardfehler aufgetragen ($n=4$) und mit einem Mann-Whitney-U-Test auf ein Signifikanzniveau von 0,05 getestet. In B ist die reduzierte *Svep1*-Proteinmenge im Ösophagus und unter C in der Aorta abgebildet. Modifiziert unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution 4.0 International License: A ist Teil der Abbildung 3 der Referenz (Winkler et al., 2020).

5.3.1 *Svep1*-Defizienz im vaskulären Remodeling

Zur Beurteilung des Einflusses der *Svep1*-Defizienz auf das vaskuläre Remodeling wurde ein Femoralis-injury-Modell ausgewählt und die intimale Hyperplasie nach 14 und 28 Tagen in *Svep1*^{+/-} Mäusen im Vergleich zu *Svep1*^{+/+} Mäusen beurteilt. Die auf den Media-Umfang normalisierte Neointimafläche wurde in allen Tieren jeweils in den vier Schnitten mit der höchsten Neointima/Media-Ratio beurteilt, um Verdünnungseffekte zu vermeiden. 14 Tage nach der Verletzung der Femoralarterie wurde mit $1,816 \pm 0,2279 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ in heterozygoten

Svep1 Knockdown-Mäusen im Vergleich zu $1,866 \pm 0,3834 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ in Wildtyp-Mäusen keine vermehrte Neointimabildung beobachtet ($p=0,93$). Auch 28 Tage nach der Gefäßverletzung konnte mit $2,635 \pm 0,3557$ vs. $1,837 \pm 0,3042 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden ($p=0,13$) (Abbildung 9).

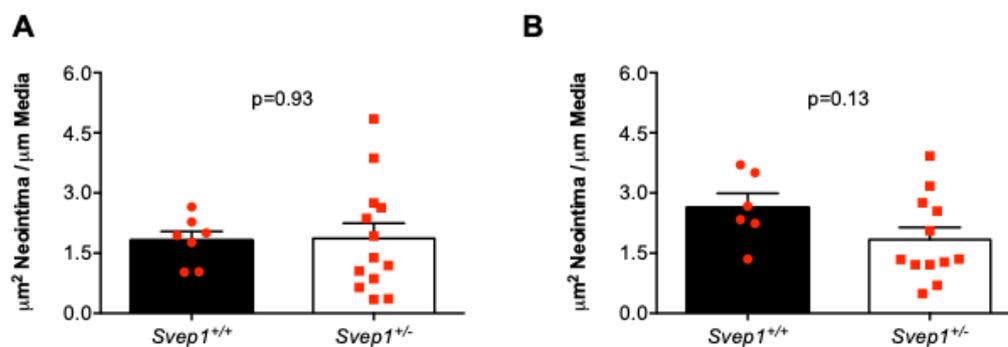


Abbildung 9 Neointimaformation bei *Svep1*-Defizienz. In A ist die auf den Media-Umfang normalisierte Neointima-Bildung nach 14 Tagen und in B nach 28 Tagen als in $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ als Mittelwert mit Standardfehler aufgetragen und mit einem ungepaarten zweiseitigen t-Test auf ein Signifikanzniveau von 0,05 getestet. Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier ($n_{\text{min}}=6$).

5.3.2 *Svep1*-Defizienz in der Atherogenese

Zur Beurteilung der *Svep1*-Defizienz wurde ein Atherosklerosemodell bei Mäusen mit *Apoe*^{-/-} Hintergrund gewählt. *Svep1*^{+/-}*Apoe*^{-/-} und *Svep1*^{+/+}*Apoe*^{-/-} Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen einer 12-wöchigen Western Diet (WD) zugeführt, die einen substantiellen Anstieg des Körpergewichts in beiden Gruppen erbrachte. Hierbei wurde zu Beginn mit $25,4 \pm 1,5$ g in der *Svep1*^{+/-}*Apoe*^{-/-} Gruppe im Vergleich zu $24,5 \pm 0,7$ g in der *Svep1*^{+/+}*Apoe*^{-/-} Gruppe kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt ($p=0,68$). Auch nach 12 Wochen wurde mit $35,7 \pm 2,7$ vs. $35,9 \pm 1,7$ g kein signifikanter Unterschied beobachtet ($p=0,93$). Zudem wurde als weitere Vergleichbarkeitskontrolle zu Versuchsende die Gesamtcholesterinkonzentration im Blutplasma beider Gruppen gemessen, wobei auch bei diesem Parameter mit $1.404 \pm 130,2$ vs. $1.401 \pm 61,5$ mg/dl kein signifikanter Unterschied beobachtet wurde ($p=0,98$) (Abbildung 10).

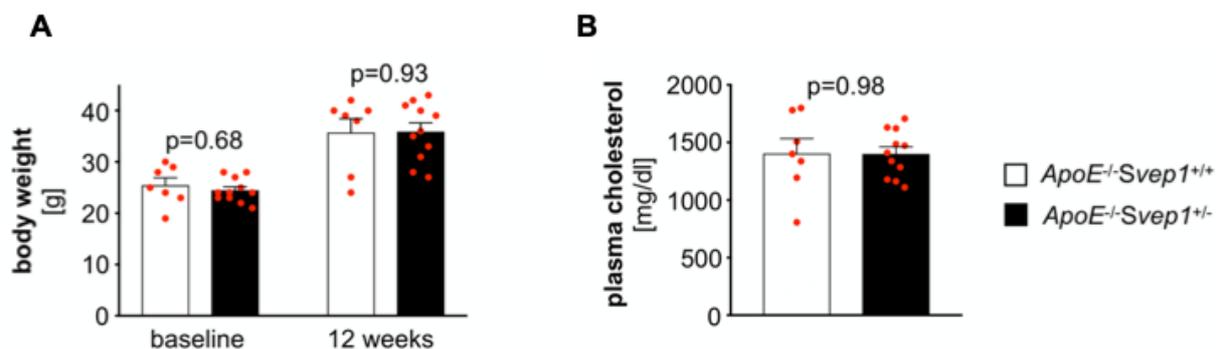


Abbildung 10 Relevante Parameter unter HFD. In A ist das Körpergewicht zu Versuchsbeginn und nach 12 Wochen in g und in B ist die Gesamtcholesterinkonzentration zu Versuchsende in mg/dl als Mittelwert mit Standardfehler abgebildet und mit einem ungepaarten zweiseitigen t-Test auf ein Signifikanzniveau von 0,05 getestet. Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier ($n_{\min}=7$). Verwendet unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution 4.0 International License: Abbildung 3 der Referenz (Winkler et al., 2020).

5.3.2.1 Auswirkungen auf die Bildung atherosklerotischer Plaques

Die Quantifizierung der Atherosklerose von *Svep1*^{+/-}*ApoE*^{-/-} im Vergleich zu *Svep1*^{+/+}*ApoE*^{-/-} Mäusen wurde in den Aortenwurzeln mithilfe von histologischen Schnittbildern und Hämatoxylin-Eosin-Färbungen vorgenommen. Hinsichtlich des Umfangs der Aortenwurzeln wurde mit $4.700 \pm 90,1$ in *Svep1*^{+/+}*ApoE*^{-/-} Mäusen verglichen mit $4.790 \pm 93,5$ in *Svep1*^{+/-}*ApoE*^{-/-} Mäusen kein relevanter Unterschied festgestellt ($p=0,34$). Im Vergleich zu den *Svep1*^{+/+}*ApoE*^{-/-} Mäusen mit $325,1 \pm 22,0 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ wurden bei den *Svep1*^{+/-}*ApoE*^{-/-} Mäusen mit $411,8 \pm 22,9 \cdot 10^3 \mu\text{m}^2$ größere atherosklerotische Plaques beobachtet ($p=0,03$) (Abbildung 11).

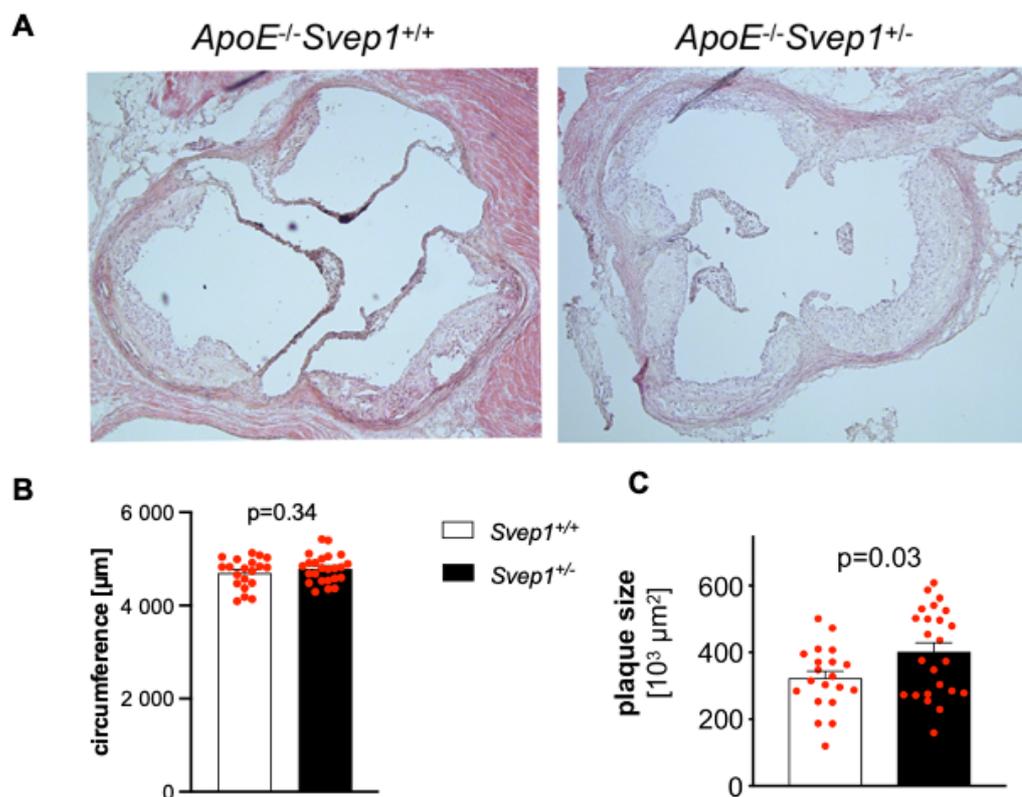


Abbildung 11 Atherogenese bei *Svep1*-Defizienz. In A sind repräsentative Schnitte der Aortenwurzeln mit den atherosklerotischen Plaques abgebildet. In B ist der Umfang der Aortenwurzel in μm und unter C die Plaquesfläche in $10^3 \mu\text{m}^2$ als Mittelwert mit Standardfehler aufgetragen ($n=20$) und mit einem ungepaarten zweiseitigen t-Test auf ein Signifikanzniveau von 0,05 getestet.

5.3.2.2 Leukozyten-Akkumulation in atherosklerotischen Plaques

Da vaskuläre Inflammation maßgeblich zur Entstehung und dem Progress atherosklerotischer Läsionen beiträgt, wurde die Akkumulation von Leukozyten in den Aorten von *Svep1^{+/+}ApoE^{-/-}* und *Svep1^{+/-}ApoE^{-/-}* Mäusen durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei wurde im Vergleich zu *Svep1^{+/+}ApoE^{-/-}* in den *Svep1^{+/-}ApoE^{-/-}* Mäusen mit 5.439 ± 635 vs. 10.573 ± 1.110 ($p<0,01$) Makrophagen, 736 ± 199 vs. 1.735 ± 219 ($p<0,01$) Ly6C^{high} Monozyten und 429 ± 79 vs. 933 ± 161 ($p<0,01$) neutrophile Granulozyten eine signifikante Zunahme der beobachteten proinflammatorischen Leukozyten-Populationen beobachtet (Abbildung 12).

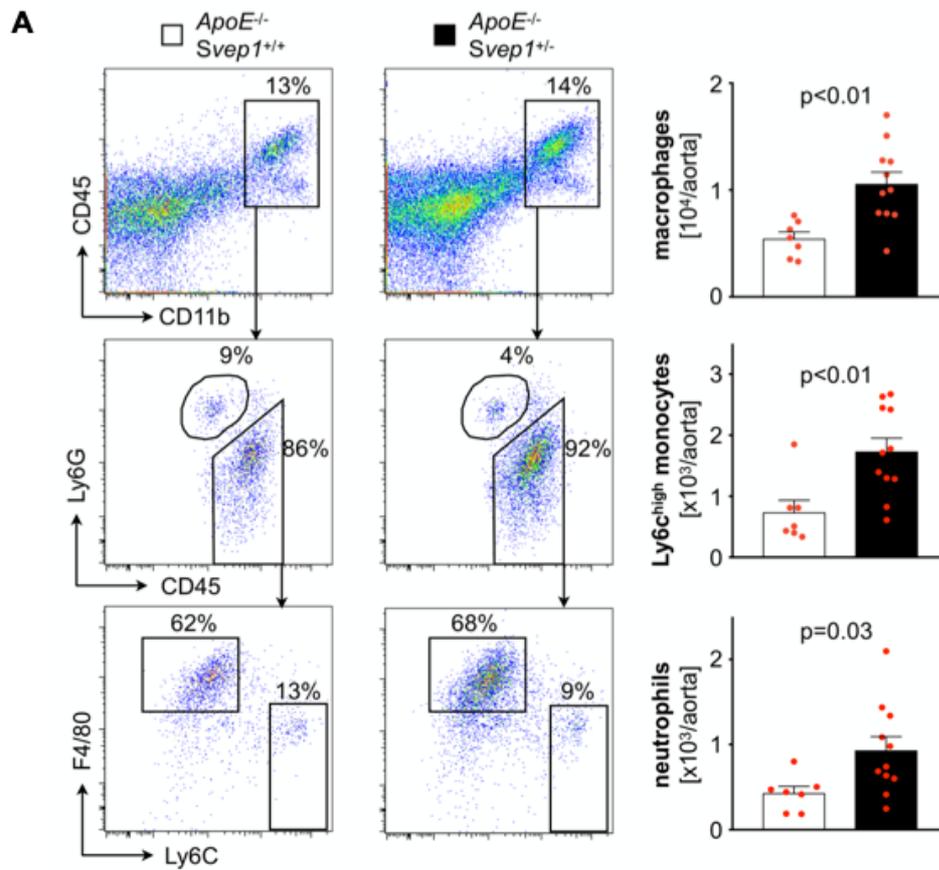


Abbildung 12 Inflammatorische Veränderungen bei *Svep1*-Defizienz. Unter A sind die durchflusszytometrisch identifizierten Leukozyten-Subpopulationen abgebildet und in absoluten Zahlen ($\cdot 10^3$ Zellen) als Mittelwerte mit Standardfehler aufgetragen, und mit einem ungepaarten zweiseitigen t-Test auf ein Signifikanzniveau von 0,05 getestet. Verwendet unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution 4.0 International License: Abbildung 4 der Referenz (Winkler et al., 2020).

6 Diskussion

SVEP1 in der Pathogenese der Atherosklerose

Das Wissen über die molekularen und zellulären Funktionen von SVEP1 ist weiterhin limitiert. Der Umstand, dass eine vollständige Svp1-Defizienz schon embryonal tödlich verläuft, spricht für eine essenzielle Rolle in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen (Korhonen et al., 2016; Morooka et al., 2017). Zudem ist SVEP1 der einzig bekannte hochaffine Ligand von Integrin $\alpha 9\beta 1$ und vermittelt eine davon abhängige zelluläre Adhäsion in der extrazellulären Matrix (Sato-Nishiuchi et al., 2012). Diese Arbeit sollte eine erste funktionelle Charakterisierung von SVEP1 und der mit der KHK genomweit signifikant assoziierten Risikovariante p.D2702G im Kontext der Atherosklerose darstellen.

SVEP1-Defizienz fördert Atherosklerose und Leukozyten-Rekrutierung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Svp1-defiziente Apoe^{-/-} Mäuse größere atherosklerotische Plaques als Apoe^{-/-} Mäuse mit normaler Expression von Svp1 entwickeln. Analog dazu konnten aus der Stockholm–Tartu Atherosclerosis Reverse Networks Engineering Task study (STARNET) in relevanten Geweben von KHK-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erniedrigte Expressionen von SVEP1 beobachtet werden (Winkler et al., 2020). Außerdem zeigten die Svp1-haploinsuffizienten Apoe^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Svp1-Wildtyp Apoe^{-/-} Mäusen in dieser Arbeit eine höhere Anzahl an plaqueständigen Makrophagen, proinflammatorischen Ly6Chigh Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Unter proatherogenen Bedingungen sind vaskuläre Endothelzellen maßgeblich an der Rekrutierung peripherer Leukozyten aus dem Blut beteiligt (Gerhardt & Ley, 2015; Swirski & Nahrendorf, 2013). So konnten im Rahmen weiterer Versuche in *Adoptive Transfer*-Experimenten nachvollzogen werden, dass die Expansion atherosklerotischer Leukozyten unter der Svp1-Defizienz auf eine erhöhte Rekrutierung aus dem Blut zurückzuführen ist und dass SVEP1 in humanen atherosklerotischen Plaques insbesondere in vaskulären Glattmuskelzellen und Endothelzellen lokalisiert ist (Winkler et al., 2020).

Einfluss von Svp1-Defizienz auf vaskuläres Remodeling

Neben dem Einfluss auf die Atherogenese wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen der Svp1-Defizienz auf das vaskuläre Remodeling untersucht. Unter *in vitro* Bedingungen wurde hierbei sowohl in humanen vaskulären Glattmuskel- als auch Endothelzellen nach einem SVEP1-Knockdown kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Migrationsfähigkeit beobachtet. Dies dürfte allerdings auch auf die lange Halbwertszeit von SVEP1 zurückzuführen sein, da trotz signifikanter Reduktion der SVEP1-Expression in den Zellüberständen kein Unterschied in den Proteinkonzentrationen sichtbar war. Zudem wurde in Svp1-haploinsuffizienten Mäusen *in vivo* kein signifikanter Unterschied bezüglich einer

drahtinduzierten vaskulären Neointimabildung beobachtet. In Abgrenzung zur Atherogenese lässt sich somit der Einfluss von SVEP1 auf die Neointima-Formation nicht klar einordnen. Die komplexe Pathophysiologie der neointimalen Hyperplasie wird in hohem Maße durch die Extrazellulärmatrix (ECM) beeinflusst. Ein relevantes ECM-Protein stellt die Matrix-Metalloproteinase ADAMTS-7 dar, als deren Ziel SVEP1 identifiziert werden konnte (Kessler et al., 2015). Das *ADAMTS7*-Gen konnte robust und replizierbar mit einem erhöhten KHK-Risiko assoziiert werden (International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association et al., 2011; Reilly et al., 2011; Schunkert et al., 2011). Die Mechanismen, inwieweit ADAMTS-7 zur Atherosklerose beiträgt, sind noch nicht abschließend geklärt. Eine Degradation von SVEP1 könnte involviert sein und ist Gegenstand künftiger Forschung.

Die KHK-Risikovariante fördert vaskuläre Inflammation

Analog zu *Svep1*-haploinsuffizienten Mäusen weisen Träger der Missense-Variante einen Mangel des SVEP1-Wildtyp-Proteins auf. Nach einer Inkubation mit der p.D2702G-Risikovariante zeigten Endothelzellen im Vergleich zu einer Inkubation mit dem SVEP1-Wildtyp-Protein eine verminderte Migration. Dieser Effekt konnte für vaskuläre Glattmuskelzellen nicht beobachtet werden. Diese Befunde sowie die vaskuläre Rekrutierung von Leukozyten unter *Svep1*-Defizienz *in vivo* lassen einen Einfluss insbesondere auf den Phänotyp von Endothelzellen vermuten. Zudem konnte in dieser Arbeit für Endothelzellen nach der Inkubation mit der p.D2702G-Risikovariante im Vergleich zum SVEP1-Wildtyp neben einer verminderten Migrationskapazität *in vitro* ebenso eine erhöhte Expression von für die Atherosklerose relevanten Zytokinen beobachtet werden. In darauffolgenden Versuchen wurde insbesondere eine erhöhte endotheliale Expression des Chemokins CXCL1 und des Adhäsionsmoleküls SELE durch die Inkubation mit der Risikovariante gezeigt (Winkler et al., 2020). CXCL1 und SELE vermitteln Leukozyten-Rekrutierung in atherosklerotische Plaques (Galkina & Ley, 2007; Korbecki, Barczak, Gutowska, Chlubek, & Baranowska-Bosiacka, 2022), wobei insbesondere CXCL1 endothelialer Genese die Leukozyten-Akkumulation unter proatherogenen Bedingungen fördert (Zhou et al., 2011). In weiteren Versuchen wurde zudem eine geringere endotheliale Sezernierung von CXCL1 in der Anwesenheit von SVEP1 gezeigt. Hierbei spricht ein dosis-abhängiger Abfall der CXCL1-Konzentration für eine SVEP1-vermittelte Regulation von Endothelzellen. Diese Hypothese wird durch den Befund untermauert, dass *Svep1*-defiziente Mäuse unter proatherogenen Bedingungen höhere Blutplasmakonzentrationen von *Cxcl1* aufweisen (Winkler et al., 2020). Darüber hinaus entsprechen die vermehrte atherosklerotische Plaqueformation, die höhere Zahl an endothelial rekrutierten Leukozyten innerhalb der Plaques von *Svep1*^{+/-} *ApoE*^{-/-} im Vergleich zu *Svep1*^{+/-} *ApoE*^{-/-} Mäusen den vermittelten Downstream-Effekten von CXCL1 und SELE in der Atherosklerose (Gerhardt & Ley, 2015; Zhou et al., 2011).

Potenzielle Effekte einer therapeutischen Intervention

Prinzipiell weisen therapeutische Zielstrukturen, die mithilfe genetischer Analysen identifiziert wurden, höhere Erfolgswahrscheinlichkeiten in der Entwicklung auf (Nelson et al., 2015). Um der Frage nachzugehen, inwieweit eine Erhöhung der SVEP1-Spiegel wie z.B. eine Degradations-Inhibierung sich auf andere Erkrankungen und Phänotypen auswirkt, wurde im Nachgang durch Kolleg:innen der Arbeitsgruppe eine phänomweite Assoziationsstudie mit Daten der UK-Biobank durchgeführt. Hierbei zeigte sich neben der replizierten Assoziation der Risikovariante mit KHK und arterieller Hypertonie ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Leistenhernie und einen Trend zur Leukämie. Zur Abschätzung potenzieller schädlicher Effekte einer solchen therapeutischen Strategie zeigte die Risikovariante eine signifikante Assoziation zu Uterusmyomen und einem Trend zu uterinen Karzinomen (Winkler et al., 2020). Uterusmyome stellen benigne Erkrankungen dar, allerdings kann eine familiäre Häufung mit einem erhöhten Risiko uteriner Karzinome einhergehen, wenngleich die Datenlage hierfür noch etwas rar ist (Okolo, Gentry, Perrett, & Maclean, 2005). Insgesamt stellt die Modulation von SVEP1 eine mögliche therapeutische Strategie dar, bei der mögliche unerwünschte Effekte noch eingehender Evaluation bedürfen.

Limitationen und kritische Würdigung

Evolutionär konservierte Rolle von SVEP1 als essenzielles ECM-Protein

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterliegen einigen Einschränkungen. Zunächst sind die Mechanismen der Effekte von SVEP1 im Kontext der Atherosklerose noch unklar. Nachdem eine vollständige Defizienz des für die lymphovaskuläre Differenzierung und Proliferierung essenziellen Proteins letal verläuft, stellt SVEP1 ein essenzielles und hochkonserviertes ECM-Protein dar (Korhonen et al., 2016; Morooka et al., 2017).

Die Herkunft von SVEP1 und die pathophysiologische Bedeutung

Für die KHK-Risikovariante p.D2702G wurde unlängst eine erhöhte Blutplasmakonzentration von SVEP1 beschrieben (Jung et al., 2021). Die zelluläre Herkunft sowie die pathophysiologische Relevanz von zirkulierendem SVEP1 sind allerdings noch unklar. Zudem wurde in diesem Kontext ein mit SVEP1 assoziiertes erhöhtes Risiko für einen Diabetes mellitus beobachtet, welches in der genomweiten Assoziationsstudie nicht vorhanden war (Stitzel et al., 2016). Dieser Effekt scheint also fraglich, insbesondere im Hinblick darauf, dass in den STARNET-Daten eine reduzierte Expression von gewebeständigem SVEP1 in atherosklerotischen Plaques im Vergleich zu gesunden Aorten beobachtet wurde und zudem in Folgeversuchen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass SVEP1 von vaskulären Glattmuskel- und Endothelzellen exprimiert wird (Winkler et al., 2020).

Die funktionelle Einordnung von Svep1 in der Atherosklerose

Prinzipiell können ECM-Proteine im Allgemeinen verschiedene Effekte auf unterschiedliche Zellarten ausüben. So wurde zwar kürzlich eine erhöhte murine Svep1-Expression von vaskulären Glattmuskelzellen unter proatherogenen Bedingungen beschrieben, ein glattmuskelzellspezifischer Svep1-Knockout konnte über mehrere Zeiträume hinweg jedoch keine konsistente Reduktion atherosklerotischer Läsionen oder inflammatorischer Zytokine demonstrieren (Jung et al., 2021). Der in dieser Arbeit verwendete heterozygote Knockout stellt nur eine Annäherung an den durch die p.D2702G Variante vermittelten Verlust an Wildtyp-SVEP1 dar, der jedoch durchaus der reduzierten SVEP1-Expression in vaskulären Geweben atherosklerotisch Erkrankter mit konsekutiv vermehrter Atherosklerose entspricht. In dieser Arbeit zeigt sich das Bild einer atheroprotektiven Rolle auf Endothelzellen von Svep1, wobei weitere Funktionen und differenzierte Wirkungen auf andere Zelltypen, insbesondere Glattmuskelzellen anzunehmen sind und der funktionelle Beitrag zur Atherosklerose noch nicht abschließend geklärt ist (Jung et al., 2021).

Die mechanistische Charakterisierung von SVEP1 und der Variante p.D2702G

Neben den vermittelten Effekten von SVEP1 ist auch der molekulare Mechanismus der KHK-Risikovariante p.D2702G nicht abschließend geklärt und Gegenstand aktueller Forschung. In murinen Tiermodellen konnte im Vergleich zum Wildtyp kein signifikanter Effekt auf die Entwicklung atherosklerotischer Plaques, die Proliferation oder Adhäsion von vaskulären Glattmuskelzellen sowie die Bindung zu Integrin $\alpha 9\beta 1$ gezeigt werden. Allerdings konnte *in vitro* eine erhöhte Expression des proinflammatorischen FGF-Proteins beobachtet werden (Jung et al., 2021).

Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass SVEP1 die Rekrutierung und Differenzierung von Monozyten über einen Integrin $\alpha 4\beta 1/\alpha 9\beta 1$ -abhängigen Mechanismus reguliert. Durch einen Knockout der monozytären SVEP1-Expression oder der Integrin $\alpha 4\beta 1/\alpha 9\beta 1$ -Signalkaskade zeigte sich neben einer reduzierten Rho/Rac-Signalaktivität eine verminderte monozytäre Adhäsions- und Migrationsfähigkeit (Andrews et al., 2023).

Erkenntnisse aus den *in vitro*-Untersuchungen reflektieren insbesondere aufgrund des Fehlens der zentralen Extrazellulärmatrix nicht die tatsächlichen Bedingungen *in vivo*, wobei im Falle von CXCL1 die Expression sich bei vermindertem SVEP1-Wildtyp in beiden Bedingungen erhöht zeigte. Dennoch kann die Möglichkeit weiterer Effekte von in ECM befindlichem SVEP1 nicht ausgeschlossen werden, die in dieser Arbeit nicht untersucht worden sind.

Die SVEP1-Missense-Variante ist mit einem erhöhten arteriellen Blutdruck assoziiert. Das KHK-Risiko lässt sich zwar durch den genetisch bedingten Blutdruckanstieg allein nicht hinreichend erklären und die zellulären Experimente zur Migration und CXCL1-Expression wurden unter statischen Bedingungen durchgeführt, doch können weitere atheroprotektive Effekte wie ein geringerer Blutdruck durch den SVEP1-Wildtyp nicht ausgeschlossen werden. Durch die Bindung an die Integrine $\alpha 9\beta 1$ und $\alpha 4\beta 1$ von vaskulären Glattmuskelzellen konnte über spannungs-gesteuerte Kalziumkanäle, Proteinkinase C und Rho-Kinasen eine Kontraktions-vermindernde Wirkung von SVEP1 gezeigt werden (Morris et al., 2022). Eine Depletion von Integrin $\alpha 9\beta 1$ in Glattmuskel- oder Myeloidzellen allein zeigte jedoch keinen relevanten Unterschied in der Formation und der Komplexität atherosklerotischer Plaques (Jung et al., 2022). Des Weiteren konnte SVEP1 als endogener Ligand des Rezeptors PEAR1 mit konsekutiver Phosphorylierung, AKT/mTOR-Signalaktivierung sowie der Beeinflussung des Phänotyps von vaskulären Zellen und Thrombozyten identifiziert werden (Elenbaas et al., 2023).

Die Rolle von SVEP1 in der Atherosklerose

In Zusammenschau der Befunde generieren wir die Hypothese, dass SVEP1 von vaskulären Zellen in die Extrazellulärmatrix exprimiert wird und auf Endothelzellen als ein Inhibitor von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen wie CXCL1 fungiert. Die Reduktion des SVEP1-Wildtyps per Matrixmetalloproteinasen oder der Missense-Variante p.D2702G führt über die Hochregulation proinflammatorischer Moleküle wie CXCL1 zu einem subendothelialen Leukozyten-Einstrom, was letztlich in einem Progress der atherosklerotischen Plaques mündet (Abbildung 13).

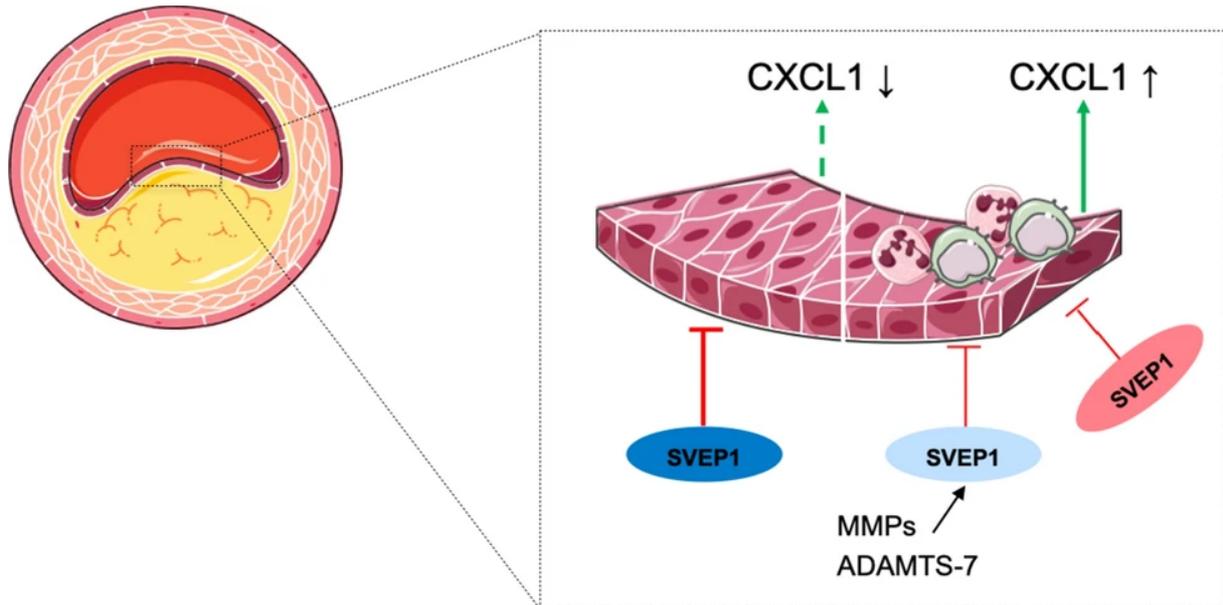


Abbildung 13 SVEP1 in der Atherosklerose. Schematische Darstellung der möglichen Rolle von SVEP1 in der Atherosklerose. In der Anwesenheit von SVEP1 (dunkelblau) ist die CXCL1-Expression reduziert. Nach der Degradation (hellblau) bzw. in Anwesenheit der Risikovariante (rot), ist die Expression bzw. Sezernierung von CXCL1 mit konsekutiver subendothelialer Leukozyten-Akkumulation erhöht. Verwendet unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution 4.0 International License: Abbildung 7 der Referenz (Winkler et al., 2020).

7 Publikation und Literaturverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden als *Original Research Article* peer-reviewed veröffentlicht:

Winkler MJ*, Müller P*, Sharifi AM, Wobst J, Winter H, Mokry M, Ma L, van der Laan SW, Pang S, Miritsch B, Hinterdobler J, Werner J, Stiller B, Güldener U, Webb TR, Asselbergs FW, Björkegren JLM, Maegdefessel L, Schunkert H, Sager HB, Kessler T. Functional investigation of the coronary artery disease gene SVEP1. *Basic Res Cardiol.* 2020 Nov 13;115(6):67. doi: 10.1007/s00395-020-00828-6. PMID: 33185739; PMCID: PMC7666586.

Posterpräsentationen:

Winkler MJ*, Müller P*, Sharifi AM, Wobst J, Winter H, Miritsch B, Hinterdobler J, Schreiber J, Werner J, Stiller B, Webb TR, Maegdefessel L, Schunkert H, Sager HB, Kessler T. Lack of SVEP1 Promotes Vascular Inflammation and Atherosclerotic Plaque Formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2020 Jun 29; 40. Jg., Nr. Suppl_1, S. A325-A325.

Literaturverzeichnis

Andrews, S. L., Ghaderi-Najafabadi, M., Gong, P., Shamkhi, N., Carleton, L., Schofield, C., . . . Morris, G. E. (2023). SVEP1 influences monocyte to macrophage differentiation via integrin alpha4beta1/alpha9beta1 and Rho/Rac signalling. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1870(6), 119479. doi:10.1016/j.bbamcr.2023.119479

Aragam, K. G., Jiang, T., Goel, A., Kanoni, S., Wolford, B. N., Atri, D. S., . . . Consortium, C. A. D. (2022). Discovery and systematic characterization of risk variants and genes for coronary artery disease in over a million participants. *Nat Genet*, 54(12), 1803-1815. doi:10.1038/s41588-022-01233-6

Bazigou, E., Xie, S., Chen, C., Weston, A., Miura, N., Sorokin, L., . . . Makinen, T. (2009). Integrin-alpha9 is required for fibronectin matrix assembly during lymphatic valve morphogenesis. *Dev Cell*, 17(2), 175-186. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.017

Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., . . . Stroke Statistics, S. (2019). Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A

Report From the American Heart Association. *Circulation*, 139(10), e56-e528.
doi:10.1161/CIR.0000000000000659

Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(12), 786-801. doi:10.1038/nrm3904

Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112(2), 195-203. doi:10.1016/0003-2697(81)90281-5

Chen, Z., & Schunkert, H. (2021). Genetics of coronary artery disease in the post-GWAS era. *J Intern Med*, 290(5), 980-992. doi:10.1111/joim.13362

De Blas, A. L., & Cherwinski, H. M. (1983). Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal Biochem*, 133(1), 214-219. doi:10.1016/0003-2697(83)90245-2

Elenbaas, J. S., Pudupakkam, U., Ashworth, K. J., Kang, C. J., Patel, V., Santana, K., . . . Stitzel, N. O. (2023). SVEP1 is an endogenous ligand for the orphan receptor PEAR1. *Nat Commun*, 14(1), 850. doi:10.1038/s41467-023-36486-0

Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874. doi:10.1016/0019-2791(71)90454-x

Erdmann, J., Grosshennig, A., Braund, P. S., Konig, I. R., Hengstenberg, C., Hall, A. S., . . . Schunkert, H. (2009). New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nat Genet*, 41(3), 280-282. doi:10.1038/ng.307

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. doi:10.1093/cvr/cvy084

-
- Forstermann, U., Xia, N., & Li, H. (2017). Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res*, 120(4), 713-735. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309326
- Galkina, E., & Ley, K. (2007). Leukocyte influx in atherosclerosis. *Curr Drug Targets*, 8(12), 1239-1248. doi:10.2174/138945007783220650
- Gerhardt, T., & Ley, K. (2015). Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc Res*, 107(3), 321-330. doi:10.1093/cvr/cvv147
- Gerrity, R. G. (1981). The role of the monocyte in atherogenesis: I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol*, 103(2), 181-190. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7234961>
- Global Cardiovascular Risk, C., Magnussen, C., Ojeda, F. M., Leong, D. P., Alegre-Diaz, J., Amouyel, P., . . . Blankenberg, S. (2023). Global Effect of Modifiable Risk Factors on Cardiovascular Disease and Mortality. *N Engl J Med*, 389(14), 1273-1285. doi:10.1056/NEJMoa2206916
- Hynes, R. O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*, 326(5957), 1216-1219. doi:10.1126/science.1176009
- International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association, S., Ehret, G. B., Munroe, P. B., Rice, K. M., Bochud, M., Johnson, A. D., . . . Johnson, T. (2011). Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature*, 478(7367), 103-109. doi:10.1038/nature10405
- Jung, I. H., Elenbaas, J. S., Alisio, A., Santana, K., Young, E. P., Kang, C. J., . . . Stitzel, N. O. (2021). SVEP1 is a human coronary artery disease locus that promotes atherosclerosis. *Sci Transl Med*, 13(586). doi:10.1126/scitranslmed.abe0357
- Jung, I. H., Elenbaas, J. S., Burks, K. H., Amrute, J. M., Xiangyu, Z., Alisio, A., & Stitzel, N. O. (2022). Vascular smooth muscle- and myeloid cell-derived integrin alpha9beta1 does not directly mediate the development of atherosclerosis in mice. *Atherosclerosis*, 360, 15-20. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2022.09.015

-
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 3(6), 422-433. doi:10.1038/nrc1094
- Karpanen, T., Padberg, Y., van de Pavert, S. A., Dierkes, C., Morooka, N., Peterson-Maduro, J., . . . Schulte-Merker, S. (2017). An Evolutionarily Conserved Role for Polydom/Svep1 During Lymphatic Vessel Formation. *Circ Res*, 120(8), 1263-1275. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308813
- Kessler, T., Zhang, L., Liu, Z., Yin, X., Huang, Y., Wang, Y., . . . 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. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014072
- Kim, K., Shim, D., Lee, J. S., Zaitsev, K., Williams, J. W., Kim, K. W., . . . Choi, J. H. (2018). Transcriptome Analysis Reveals Nonfoamy Rather Than Foamy Plaque Macrophages Are Proinflammatory in Atherosclerotic Murine Models. *Circ Res*, 123(10), 1127-1142. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.312804
- Korbecki, J., Barczak, K., Gutowska, I., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2022). CXCL1: Gene, Promoter, Regulation of Expression, mRNA Stability, Regulation of Activity in the Intercellular Space. *Int J Mol Sci*, 23(2). doi:10.3390/ijms23020792
- Korhonen, E. A., Lampinen, A., Giri, H., Anisimov, A., Kim, M., Allen, B., . . . Saharinen, P. (2016). Tie1 controls angiopoietin function in vascular remodeling and inflammation. *J Clin Invest*, 126(9), 3495-3510. doi:10.1172/JCI84923
- Li, L., Pang, S., Zeng, L., Guldener, U., & Schunkert, H. (2021). Genetically determined intelligence and coronary artery disease risk. *Clin Res Cardiol*, 110(2), 211-219. doi:10.1007/s00392-020-01721-x
- Liang, C. C., Park, A. Y., & Guan, J. L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, 2(2), 329-333. doi:10.1038/nprot.2007.30

-
- Libby, P. (2021). Inflammation during the life cycle of the atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Res*, 117(13), 2525-2536. doi:10.1093/cvr/cvab303
- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., . . . Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 56. doi:10.1038/s41572-019-0106-z
- Libby, P., Okamoto, Y., Rocha, V. Z., & Folco, E. (2010). Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J*, 74(2), 213-220. doi:10.1253/circj.cj-09-0706
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(12). doi:10.1101/cshperspect.a005058
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801), 233-241. doi:10.1038/35025203
- Lusis, A. J. (2012). Genetics of atherosclerosis. *Trends Genet*, 28(6), 267-275. doi:10.1016/j.tig.2012.03.001
- Marchini, T., Mitre, L. S., & Wolf, D. (2021). Inflammatory Cell Recruitment in Cardiovascular Disease. *Front Cell Dev Biol*, 9, 635527. doi:10.3389/fcell.2021.635527
- McPherson, R., & Tybjaerg-Hansen, A. (2016). Genetics of Coronary Artery Disease. *Circ Res*, 118(4), 564-578. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306566
- Morooka, N., Futaki, S., Sato-Nishiuchi, R., Nishino, M., Totani, Y., Shimono, C., . . . Sekiguchi, K. (2017). Polydom Is an Extracellular Matrix Protein Involved in Lymphatic Vessel Remodeling. *Circ Res*, 120(8), 1276-1288. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308825
- Morris, G. E., Denniff, M. J., Karamanavi, E., Andrews, S. A., Kostogrys, R. B., Bountziouka, V., . . . Webb, T. R. (2022). The integrin ligand SVEP1 regulates GPCR-mediated vasoconstriction via integrins alpha9beta1 and alpha4beta1. *Br J Pharmacol*, 179(21), 4958-4973. doi:10.1111/bph.15921

-
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-273. doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032
- Nelson, M. R., Tipney, H., Painter, J. L., Shen, J., Nicoletti, P., Shen, Y., . . . Sanseau, P. (2015). The support of human genetic evidence for approved drug indications. *Nat Genet*, 47(8), 856-860. doi:10.1038/ng.3314
- Newby, A. C. (2008). Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(12), 2108-2114. doi:10.1161/ATVBAHA.108.173898
- Okolo, S. O., Gentry, C. C., Perrett, C. W., & Maclean, A. B. (2005). Familial prevalence of uterine fibroids is associated with distinct clinical and molecular features. *Hum Reprod*, 20(8), 2321-2324. doi:10.1093/humrep/dei049
- Pearson, T. A., & Manolio, T. A. (2008). How to interpret a genome-wide association study. *JAMA*, 299(11), 1335-1344. doi:10.1001/jama.299.11.1335
- Poznyak, A. V., Nikiforov, N. G., Markin, A. M., Kashirskikh, D. A., Myasoedova, V. A., Gerasimova, E. V., & Orekhov, A. N. (2020). Overview of OxLDL and Its Impact on Cardiovascular Health: Focus on Atherosclerosis. *Front Pharmacol*, 11, 613780. doi:10.3389/fphar.2020.613780
- Reilly, M. P., Li, M., He, J., Ferguson, J. F., Stylianou, I. M., Mehta, N. N., . . . Rader, D. J. (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. doi:10.1016/S0140-6736(10)61996-4
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340(2), 115-126. doi:10.1056/NEJM199901143400207
- Ross, R., & Glomset, J. A. (1976). The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*, 295(7), 369-377. doi:10.1056/NEJM197608122950707

-
- Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., . . . Group, G.-N.-J. G. B. o. C. D. W. (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*, 76(25), 2982-3021. doi:10.1016/j.jacc.2020.11.010
- Samani, N. J., Erdmann, J., Hall, A. S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., . . . the Cardiogenics, C. (2007). Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*, 357(5), 443-453. doi:10.1056/NEJMoa072366
- Sata, M., Maejima, Y., Adachi, F., Fukino, K., Saiura, A., Sugiura, S., . . . Nagai, R. (2000). A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol*, 32(11), 2097-2104. doi:10.1006/jmcc.2000.1238
- Sato-Nishiuchi, R., Nakano, I., Ozawa, A., Sato, Y., Takeichi, M., Kiyozumi, D., . . . Sekiguchi, K. (2012). Polydom/SVEP1 is a ligand for integrin alpha9beta1. *J Biol Chem*, 287(30), 25615-25630. doi:10.1074/jbc.M112.355016
- Schildkraut, J. M., Myers, R. H., Cupples, L. A., Kiely, D. K., & Kannel, W. B. (1989). Coronary risk associated with age and sex of parental heart disease in the Framingham Study. *Am J Cardiol*, 64(10), 555-559. doi:10.1016/0002-9149(89)90477-3
- Schunkert, H., Konig, I. R., Kathiresan, S., Reilly, M. P., Assimes, T. L., Holm, H., . . . Samani, N. J. (2011). Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet*, 43(4), 333-338. doi:10.1038/ng.784
- Shankman, L. S., Gomez, D., Cherepanova, O. A., Salmon, M., Alencar, G. F., Haskins, R. M., . . . Owens, G. K. (2015). KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat Med*, 21(6), 628-637. doi:10.1038/nm.3866
- Silvestre-Roig, C., Braster, Q., Ortega-Gomez, A., & Soehnlein, O. (2020). Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat Rev Cardiol*, 17(6), 327-340. doi:10.1038/s41569-019-0326-7

-
- Stitzel, N. O., Stirrups, K. E., Masca, N. G., Erdmann, J., Ferrario, P. G., König, I. R., . . . Schunkert, H. (2016). Coding Variation in ANGPTL4, LPL, and SVEP1 and the Risk of Coronary Disease. *N Engl J Med*, 374(12), 1134-1144. doi:10.1056/NEJMoa1507652
- Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2013). Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*, 339(6116), 161-166. doi:10.1126/science.1230719
- Timmis, A., Vardas, P., Townsend, N., Torbica, A., Katus, H., De Smedt, D., . . . Achenbach, S. (2022). European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021: Executive Summary. *Eur Heart J Qual Care Clin Outcomes*, 8(4), 377-382. doi:10.1093/ehjqcco/qcac014
- Trenchev, P., & Konopka, M. (1980). Combined haematoxylin, eosin and fluorescent stain for paraffin sections. *Pathology*, 12(1), 79-81. doi:10.3109/00313028009060056
- van Varik, B. J., Rennenberg, R. J., Reutelingsperger, C. P., Kroon, A. A., de Leeuw, P. W., & Schurgers, L. J. (2012). Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Front Genet*, 3, 290. doi:10.3389/fgene.2012.00290
- Wierer, M., Prestel, M., Schiller, H. B., Yan, G., Schaab, C., Azghandi, S., . . . 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. doi:10.1074/mcp.RA117.000315
- Williams, J. W., Zaitsev, K., Kim, K. W., Ivanov, S., Saunders, B. T., Schrank, P. R., . . . Randolph, G. J. (2020). Limited proliferation capacity of aortic intima resident macrophages requires monocyte recruitment for atherosclerotic plaque progression. *Nat Immunol*, 21(10), 1194-1204. doi:10.1038/s41590-020-0768-4
- Winkler, M. J., Müller, P., Sharifi, A. M., Wobst, J., Winter, H., Mokry, M., . . . Kessler, T. (2020). Functional investigation of the coronary artery disease gene SVEP1. *Basic Res Cardiol*, 115(6), 67. doi:10.1007/s00395-020-00828-6

Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., . . . Investigators, I. S. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 364(9438), 937-952. doi:10.1016/S0140-6736(04)17018-9

Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A., & Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 258(5081), 468-471. doi:10.1126/science.1411543

Zhou, Z., Subramanian, P., Sevilimis, G., Globke, B., Soehnlein, O., Karshovska, E., . . . Schober, A. (2011). Lipoprotein-derived lysophosphatidic acid promotes atherosclerosis by releasing CXCL1 from the endothelium. *Cell Metab*, 13(5), 592-600. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.016

Danksagung

An allererster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Heribert Schunkert für die Überlassung des Forschungsthemas, die konstruktiven Diskussionen und die einmalige Möglichkeit zur Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe bedanken.

Mein tief empfundener Dank gilt Prof. Dr. Thorsten Kessler für seine langjährige Unterstützung, ein stetiges offenes Ohr und dafür, ein wirklich inspirierender und auf vielen Ebenen vorbildhafter Mentor zu sein!

Ein sehr großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Hendrik Sager für die tatkräftige Unterstützung und zur Erschließung neuer Perspektiven. An dieser Stelle möchte ich mich zudem bei meinen weiteren tollen Kollegen Dr. Julia Werner, Dr. Tan An Dang, Philipp Müller, Amin Sharifi, Dr. Jana Wobst, Benedikt Miritsch, Dr. Carina Mauersberger, Dr. Julia Hinterdobler, Dr. Barbara Stiller, Ann-Marie Kahlert, Marion Cranmore und Christopher Wolf, die auf mannigfaltige Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an Georg und Martin, die mir so treue und verständnisvolle Vertraute geworden sind, wie man es sich nur wünschen kann.

Bei meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich mich von ganzem Herzen für die liebevolle und durchschlagende Unterstützung bedanken. Dank euch konnte ich mich zu dem entwickeln, der ich heute bin.

Meine Anna, dein Glaube und immerwährender Beistand haben mich immer aufs Neue über hinaus wachsen lassen. Ich bin ich zutiefst und für immer für deine bedingungslose Hingabe von ganzem Herzen dankbar.