

Proteomanalyse und Charakterisierung der vaskulären
extrazellulären Matrix
mit Fokus auf das KHK-Risikogen *ADAMTS7*

von Julia Werner

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Proteomanalyse und Charakterisierung der vaskulären
extrazellulären Matrix
mit Fokus auf das KHK-Risikogen *ADAMTS7*

von Julia Werner

aus Aachen

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Angefertigt am: Deutschen Herzzentrum München
Mentor: Prof. Dr. Heribert Schunkert

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner
Priv.-Doz. Dr. Maik Dahlhoff
Prof. Dr. Herbert Kaltner
Priv.-Doz. Dr. Rebecca Kenngott

Tag der Promotion: 29.07.2017

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Koronare Herzkrankheit	3
1.1. Pathophysiologie und Bedeutung	3
1.2. Traditionelle Risikofaktoren der KHK	6
1.3. Genetische Risikofaktoren der KHK.....	6
2. <i>ADAMTS7</i> als Risikogen der KHK	8
3. Rolle der extrazellulären Matrix in der Atherosklerose	11
4. Murine Tiermodelle in der Atherosklerose- und	
Restenoseforschung	14
4.1. Atherosklerose in der Tiermedizin.....	14
4.2. Atherosklerosemodelle.....	15
4.3. Restenosemodelle	15
5. Massenspektrometrie-basierte Proteomik.....	17
III. MATERIAL UND METHODEN	19
1. Versuchstiere	19
1.1. Mausstämme.....	19
1.2. Zucht und Haltungsbedingungen	20
2. Tierversuche.....	22
2.1. Tiermodelle	22
2.1.1. Atherosklerosemodell – High-Fat-Diät	22
2.1.2. Restenosemodell – Draht-induzierte Femoralisverletzung	23
2.1.2.1. Narkose.....	23
2.1.2.2. Draht-induziertes Femoralisverletzungsmodell	24
2.1.2.3. Schmerzmanagement	26
2.1.2.4. Versuchsende und Probengewinnung	27
2.1.3. Morphometrische Auswertung und statistische Analyse.....	27
2.1.3.1. Quantifizierung atherosklerotischer Plaques.....	27
2.1.3.2. Quantifizierung der Neointima.....	28

3. Histologie	29
3.1. Gefrierschnitte	29
3.2. Paraffinschnitte	29
3.3. Histologische Färbungen	29
3.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	30
3.3.2. Masson-Trichrom-Färbung.....	30
3.4. Immunfluoreszenz.....	31
4. Molekularbiologie	31
4.1. Western Blot.....	31
4.2. Durchflusszytometrie.....	32
4.3. Massenspektrometrie	34
4.3.1. Statistische Analyse der MS-Daten.....	34
4.3.1.1. Hauptkomponentenanalyse	34
4.3.1.2. Varianzanalyse und nicht-überwachte hierarchische Clusteranalyse	35
4.3.1.3. Signalweg-Analyse.....	35
4.3.1.4. Semitryptische Analyse	35
5. Zellkultur	36
5.1. Kultivierung von Zellen	36
5.2. Transfektion von Zellen.....	36
5.2.1. Überexpression von Legumain in HEK293-Zellen	36
5.2.2. Legumain Knockdown mittels siRNA	37
6. Quantitative Real Time PCR	38
7. Scratch Wound Assay	39
IV. ERGEBNISSE	40
1. Auswirkungen der <i>Adamts7</i>-Defizienz	40
1.1. Plaquebildung	40
1.2. Neointimabildung	41
2. Proteomische Veränderungen in <i>Adamts7</i>^{-/-} nach vaskulärer Schädigung	43
3. Allgemeine proteomische Veränderungen der extrazellulären Matrix	

nach vaskulärer Schädigung	50
3.1. Effekt der Femoralisverletzung auf das Gesamtproteom der Femoralarterie	50
3.2. Beteiligung regulierter Proteine an ECM-assoziierten Signalwegen	53
3.3. Akkumulation von Makrophagen nach vaskulärer Schädigung	57
3.4. Effekt der Femoralisverletzung auf das Proteom der vaskulären extrazellulären Matrix	59
3.4.1. Veränderungen der ECM	59
3.4.2. Validierung mittels Immunfluoreszenz	62
3.4.3. Hochregulation nicht-tryptischer Peptide	65
V. DISKUSSION	69
1.1. Rolle von <i>ADAMTS7</i> in der Pathogenese der Atherosklerose	69
1.2. Proteomische Veränderungen der extrazellulären Matrix nach vaskulärer Schädigung	73
VI. ZUSAMMENFASSUNG	80
VII. SUMMARY	82
VIII..... LITERATURVERZEICHNIS	83
IX. ANHANG	101
1. Material.....	101
1.1. Chemikalien	101
1.2. Puffer, Medien und Lösungen	104
1.3. Medikamente.....	110
1.4. Zelllinien	110
1.5. Bakterien	111
1.6. Antikörper.....	111
1.7. Assays und Enzyme.....	112
1.8. Kommerziell erhältliche Kits	113
1.9. Primer.....	113
1.10. Geräte	114
1.11. Software	115
X. DANKSAGUNG	116

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
2D	Zweidimensional
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
A. carotis	Arteria carotis (Halsschlagader)
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
BSA	Bovines Serum Albumin
Bzw	Beziehungsweise
cDNA	<i>engl.</i> Complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Deoxyribonukleinsäure)
COL	<i>engl.</i> Collagen (Kollagen)
COMP	<i>engl.</i> Cartilage oligomeric matrix protein
d	Tage
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>engl.</i> Dulbecco's modified eagle medium
EC	<i>engl.</i> Endothelial cells
ECM	<i>engl.</i> Extracellular matrix (Extrazelluläre Matrix)

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray Ionisation
EUCOMM	<i>engl.</i> European Conditional Mouse Mutagenesis Programm
FACS	<i>engl.</i> Fluorescence-activated cell scanning
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
HCAEC	<i>engl.</i> Human coronary artery endothelial cells
HCL	Wasserstoffchlorid
HDL	<i>engl.</i> High density lipoprotein
HEPA	<i>engl.</i> High efficiency particulate air
HFD	<i>engl.</i> High fat diet
HPLC	<i>engl.</i> High-performance liquid chromatograph
HUVEC	<i>engl.</i> Human umbilical vein endothelial cells
i.p.	intraperitoneal
IVC	Individuell ventilierte Käfige
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knockout
KOMP	<i>engl.</i> Konditional Knock Out Mouse Project
LB	<i>engl.</i> Lysogeny both
LC-MS/MS	Flüssigkeitsgekoppelte Tandem - Massenspektrometrie
LDL	<i>engl.</i> Low density lipoprotein
Ldlr	<i>engl.</i> Low density lipoprotein receptor

LGMMN	Legumain
M	Molare Masse
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI	<i>engl.</i> Matrix-assisted laser desorption/ionization (matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation)
Min	Minuten
ml	Mililiter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
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
PCA	<i>engl.</i> Principia component analysis (Hauptkomponentenanalyse)
PCI	Perkutane Koronare Intervention
PCR	<i>engl.</i> Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	Potentia hydrogenii
QDSP	<i>engl.</i> Quantitative detergent solubility profiling
qPCR	<i>engl.</i> Quantitative polymerase chain reaction
RIPA	Radioimmunopräzipitations Assay

RNA	<i>engl.</i> Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>engl.</i> rounds per minute
s.c.	subkutan
Sek.	Sekunden
SDS	<i>engl.</i> Sodium dodecyl sulfate
siRNA	<i>engl.</i> Small interfering ribonucleic acid
SMC	<i>engl.</i> Smooth muscle cells (Glatte Muskelzellen)
SNP	<i>engl.</i> Single nucleotid polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SPF	Spezifiziert Pathogen frei
Tab	Tabelle
TBE	TRIS Borate EDTA
TBS	<i>engl.</i> Tris buffered saline (Trisgepufferte Kochsalzlösung)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
THBS1	Thrombospondin 1
VLDL	<i>engl.</i> Very low density lipoprotein
vSMC	<i>engl.</i> Vascular smooth muscle cells (vaskuläre glatte Muskelzellen)
WT	Wildtyp

I. EINLEITUNG

Die koronare Herzkrankheit (KHK) stellt laut Weltgesundheitsorganisation die häufigste Todesursache weltweit dar (Libby et al., 2010; World Health Organization, 2012). Allein 2015 verstarben in Deutschland nach Angaben des statistischen Bundesamtes 50.948 Menschen an einem Myokardinfarkt, welcher die schwerwiegendste Komplikation der KHK darstellt. Insgesamt sind 38,5 % der Todesfälle in Deutschland auf Herz-Kreislaferkrankungen zurückzuführen (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2015). Primäre Ursache der KHK ist die Atherosklerose, eine Gefäßerkrankung, bei der massive Veränderungen der extrazellulären Matrix eine wichtige Rolle spielen, die letztendlich zur Neointima- und Plaquebildung führen. Bei der Entstehung der Atherosklerose sind klassische Risikofaktoren wie veränderte Lipidwerte, Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes, Fettleibigkeit und diätetische Aspekte beteiligt (Lusis, 2000; Yusuf et al., 2004). In den letzten Jahren sind genetische Risikofaktoren der KHK in den Fokus der Forschung gerückt. Mit Hilfe der Entwicklung von Hochdurchsatzverfahren zur Genotypisierung großer Kollektive und der Weiterentwicklung statistischer Methoden wurde es möglich, genomweite Assoziationsstudien (GWAS) durchzuführen (Lusis, 2012). Durch die weltweite Analyse von Populationen konnten so Gene identifiziert werden, die mit der koronaren Herzkrankheit assoziiert sind (Cardiogramplus4d Consortium et al., 2013; Erdmann et al., 2009; Reilly et al., 2011; Samani et al., 2007; Schunkert et al., 2011). Eines dieser identifizierten Gene ist *ADAMTS7*, welches für die gleichnamige extrazelluläre Matrixprotease *ADAMTS7* kodiert (Hurskainen, 1999; Somerville et al., 2004). Das Protein gehört zur *ADAMTS*-Familie, die durch ihre Beteiligung an Degradationsprozessen eine entscheidende Rolle während der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix (ECM) nach vaskulärer Schädigung spielt (Apte, 2009). Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, die Rolle von *ADAMTS7* in der Plaque- und Neointimabildung zu untersuchen und mittels differentieller Proteomanalyse neue potentielle Substrate von *ADAMTS7* zu entdecken. Zudem sollte die globale Komposition der ECM nach vaskulärer Schädigung charakterisiert und Schlüsselproteine des vaskulären Remodelings näher untersucht werden. Das Erforschen der Rolle von *ADAMTS7* während der Entwicklung und Progression der Atherosklerose und das Erstellen eines proteomischen Profils der extrazellulären Matrix nach vaskulärer Schädigung,

ermöglicht nicht nur ein besseres Verständnis der Pathogenese der KHK, sondern auch die Entwicklung neuer Ansätze zur Prävention und Therapie.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Koronare Herzkrankheit

1.1. Pathophysiologie und Bedeutung

Die koronare Herzkrankheit zeichnet sich durch die Manifestation atherosklerotischer Plaques in den Herzkranzarterien aus. Atherosklerose ist eine chronisch-inflammatorische Erkrankung der Arterienwand, in deren Krankheitsverlauf es zu einer degenerativen Verhärtung und Verdickung der Gefäßwand aufgrund der Einlagerung von Lipiden, Entzündungszellen sowie Zellproliferation und Kollagensynthese kommt (Swirski & Nahrendorf, 2013).

In den letzten Jahrzehnten hat sich hinsichtlich der Pathogenese der Atherosklerose die „response to injury“ Hypothese durchgesetzt. Durch einen initialen Reiz kommt es zu einer Dysfunktion des Endothels und einer maladaptierten Immunantwort (Ross & Glomset, 1976). Die Schädigung des Endothels verändert dessen Eigenschaften und führt zu einer erhöhten Permeabilität der Endothelbarriere. Low-density Lipoprotein (LDL) kann in die Intima eindringen und wird dort oxidiert. Akkumuliertes oxidiertes LDL (oxLDL) stimuliert wiederum Endothelzellen, in denen so die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Chemokinsekretion hochreguliert werden. Hierdurch werden zirkulierende Leukozyten aus dem Blutstrom in die Intima gelockt (Lusis, 2000). Die einwandernden Monozyten differenzieren zu Makrophagen und phagozytieren die vorhandenen oxLDL-Moleküle. Die so entstehenden Schaumzellen sind für die weitere Sekretion von proinflammatorischen Faktoren verantwortlich (Libby et al., 2010). Frühe Läsionen, bestehend aus subendothelialen Ansammlungen von Cholesterol-verdauenden Makrophagen, werden als „fatty streaks“ bezeichnet. In der weiteren Plaquereifung kommt es zu einer Anhäufung von B- und T-Lymphozyten, die durch proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren die Migration und Proliferation von Glattmuskelzellen (SMC) aus der Media vorantreiben. Proliferierende SMCs ändern ihren kontraktilen zu einem proliferativen Phänotyp und tragen dadurch zum Plaquewachstum bei. In diesem fortgeschrittenen Stadium haben die fibrösen Plaques einen typischen Aufbau: eine fibröse Kappe, bestehend aus SMCs und Extrazellulärmatrix, die einem lipidhaltigen, nekrotischen Kern aufsitzt. Die Läsionen können mit der Zeit einen zunehmend

komplexen Aufbau inklusive Kalzifikationen, Ulzerationen und Blutungen durchlaufen (Libby et al., 2010; Lüscher, 2000; Ross, 1999). Der gesamte Prozess der Umstrukturierung der Arterienwand durch Zellproliferation und -migration, dem Absterben von Zellen und der Produktion bzw. Degradation extrazellulärer Matrix, wird auch als vaskuläres Remodeling bezeichnet (Van Vark et al., 2012). Die größte klinische Gefahr der Atherosklerose besteht in einer Plaqueruptur. Hierbei kommt es zu einem Aufreißen der fibrösen Kappe mit nachfolgender Thrombusbildung, die zu einem akuten Gefäßverschluss führen und in der Folge in einem Myokardinfarkt oder Schlaganfall resultieren kann (Libby et al., 2010).

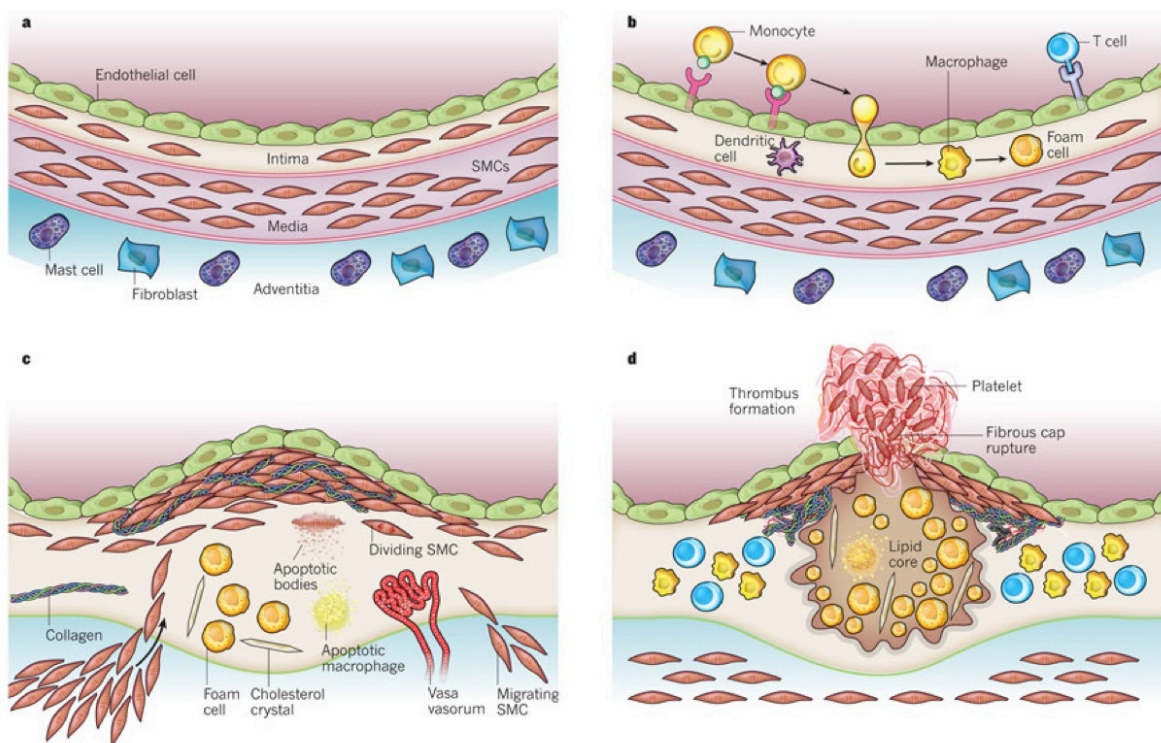


Abb. 1 Überblick über die verschiedenen Stadien der Atherosklerose.

a Aufbau einer muskulären Arterie aus drei Schichten von Innen nach Außen: Intima, Media und Adventitia. **b** Durch einen initialen Reiz wird die Endothelbarriere aktiviert, Monozyten migrieren in die Intima und differenzieren zu Makrophagen. Diese Makrophagen, auch Schaumzellen genannt, nehmen eingewanderte Lipide auf. **c** Muskelzellen migrieren aus der Media, proliferieren und produzieren extrazelluläre Matrix. **d** Der typische Aufbau eines fortgeschrittenen Plaques: eine fibröse Kappe, bestehend aus eingewanderten SMCs und ECM, die einen lipidhaltigen nekrotischen Kern umschließt. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature, 473(7347):317-325, copyright 2011(Libby et al., 2011).

Zu den Standardverfahren in der Behandlung der koronaren Herzkrankheit gehört neben der medikamentösen Therapie die perkutane koronare Intervention (PCI). Über einen in die Arteria femoralis oder Arteria radialis eingeführten Führungskatheter wird ein Ballonkatheter bis zum Herzen vorgeschoben. Auf Höhe der Gefäßverengung (Stenose) wird am distalen Ende des Katheters ein Ballon expandiert, der die Engstelle weitet (Greten et al., 2010). Im Jahre 2008 wurden bei 89 % aller Eingriffe zusätzlich Stents implantiert, um eine erneute Verengung zu verhindern (Van Buuren, 2010). Trotz der ständigen Weiterentwicklung und Verbesserung des Verfahrens ist die Restenose eine häufige Komplikation, da der Eingriff mit einer Dehnung des Gefäßes und der Verletzung des Endothels einhergeht. Eine Restenose ist definiert als eine Reduktion des Gefäßlumens nach PCI mit oder ohne Stentimplantation (Buccheri et al., 2016) und tritt bei 20 bis 50,3 % der Patienten auf (Kastrati et al., 2001). Von den Prozessen des vaskulären Remodelings spielt, aufgrund der immer häufigeren Verwendung von Stents, vor allem die neointimale Hyperplasie eine große Rolle in der Pathogenese der Restenose (Buccheri et al., 2016). Als neointimale Hyperplasie oder auch Neointima wird das innerhalb der Intima, eines durch vaskuläre Interventionen verletzten Gefäßes, neuentstehende Gewebe bezeichnet. Wie auch bei der Atherosklerose kommt es durch die vaskuläre Schädigung mit endothelialer Denudation zu einer inflammatorischen Reaktion und der Einwanderung von Entzündungszellen in das Gewebe (Mitra et al., 2006). Die Neointima charakterisiert sich vor allem durch die Migration glatter Muskelzellen in die Intima, deren Proliferation und Synthese extrazellulärer Matrix (Newby & Zaltsman, 2000). Durch den Einsatz Medikamentenbeschichteter Stents, ist es gelungen neointimale Hyperplasien zu verringern, allerdings auf Kosten einer verzögerten Wundheilung (Joner et al., 2006). Die anti-proliferativen Medikamente verhindern die Ausbildung einer Neointima und erleichtern neue atherosklerotische Vorgänge, die als Neoatherosklerose bezeichnet werden und im Gegensatz zur Atherosklerose innerhalb weniger Monate entstehen können (Nakazawa et al., 2011). Histologisch zeichnet sich die Neoatherosklerose, wie die Atherosklerose auch, durch die Ansammlung Lipid-verdauender Makrophagen in der Intima, die Bildung eines nekrotischen Kerns und gelegentlich Kalzifikationen aus (Nakazawa et al., 2011).

1.2. Traditionelle Risikofaktoren der KHK

Seit langem ist bekannt, dass gewisse Faktoren und Lebensumstände das Risiko an der koronaren Herzkrankheit zu erkranken erhöhen können. Zu diesen klassischen Risikofaktoren gehören weltweit, unabhängig von Alter und Geschlecht, veränderte Lipidwerte, Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes, Fettleibigkeit und diätetische Aspekte (Yusuf et al., 2004). So steigt zum Beispiel das Erkrankungsrisiko für Raucher im Gegensatz zu Nicht-Rauchern um das Dreifache an. Zusätzlich steigt das Risiko mit der Anzahl an gerauchten Zigaretten pro Tag (Teo et al., 2006). Darüber hinaus werden viele weitere modifizierbare Risikofaktoren mit einem erhöhten Risiko für die koronare Herzkrankheit assoziiert. Hierzu werden zum Beispiel psychosoziale Faktoren wie finanzielle Belastung, Stress am Arbeitsplatz oder familiäre Probleme gezählt (Yusuf et al., 2004).

1.3. Genetische Risikofaktoren der KHK

Obwohl jeder der oben genannten traditionellen Risikofaktoren teilweise unter genetischer Kontrolle steht, gilt eine positive familiäre Vorgeschichte als ein weiterer unabhängiger Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit. Dies spricht dafür, dass es Gene gibt, die an der Krankheitsentstehung beteiligt sind, aber bisher noch nicht mit der koronaren Herzkrankheit in Zusammenhang gebracht wurden. Um zu untersuchen inwieweit die Genetik unabhängig von Umweltfaktoren einen Einfluss auf die KHK hat, wurden Zwillingsstudien durchgeführt. Dort zeigte sich, dass die erbliche Komponente der koronaren Herzkrankheit zwischen 50 bis 60 % liegt (Mayer et al., 2007; Wienke et al., 2001; Zdravkovic et al., 2002). Eine familiäre Prädisposition besteht dann, wenn bei mindestens einem Verwandten ersten Grades ein frühzeitiger Myokardinfarkt diagnostiziert wurde. Dieser definiert sich durch das Alter bei Erstdiagnose, bei Männern <55 Jahren und bei Frauen <65 Jahren (Schildkraut et al., 1989). Angehörige eines Herzinfarktpatienten haben ein deutlich größeres Risiko selbst an einem Myokardinfarkt zu erkranken. So erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für einen Herzinfarkt bei Männern um das Doppelte und bei Frauen um 70 %, wenn ein Elternteil einen frühzeitigen Myokardinfarkt erleidet (Lloyd-Jones et al., 2004). Zudem steigt das Risiko mit jedem weiteren betroffenen Verwandten und dem Alter des ersten Ereignisses an (Nora et al., 1980). Viele weitere groß angelegte epidemiologische Studien konnten den Zusammenhang zwischen einer positiven Familienanamnese und dem Auftreten einer KHK bzw. eines Myokardinfarktes bestätigen (Bachmann et al., 2012; Chow et al., 2011; Myers

et al., 1990).

Die Erforschung genetischer Risikofaktoren ist in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Bei der KHK werden, mit Ausnahme von Geschlecht und Lipoprotein(a)-Blutspiegeln, alle Risikofaktoren von multiplen Genen beeinflusst (Lusis, 2000). Bei komplexen Erkrankungen wird davon ausgegangen, dass nicht nur, wie bei monogenen Erkrankungen, ein einzelnes Gen für die Ausbildung eines Phänotyps verantwortlich ist, sondern eine Vielzahl, die untereinander und mit Umweltfaktoren interagieren können (Mcpherson & Tybjaerg-Hansen, 2016). Jeder einzelne genetische Faktor bestimmt demnach nur einen geringen Teil des Gesamtrisikos für die Erkrankung. Um den Einfluss der Genetik auf die KHK und den Myokardinfarkt zu untersuchen, wurden in den letzten Jahren genomweite Assoziationsstudien (GWAS) durchgeführt. Das Ziel von GWAS ist Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) zu identifizieren, die mit dem Auftreten eines bestimmten Phänotyps bzw. einer Krankheit assoziiert sind. Hierzu wird eine vergleichende Analyse des Genoms von Erkrankten und gesunden Kontrollgruppen durchgeführt und berechnet, ob es Varianten gibt, die häufiger bei einer der beiden Gruppen auftreten (Pearson & Manolio, 2008). SNPs stellen mit 90 % den größten Anteil der genetischen Variation im menschlichen Genom dar (Collins et al., 1998). Sie definieren sich durch den Austausch eines einzelnen Basenpaares mit einer Mindesthäufigkeit von 1 % in einer Population und treten statistisch gesehen alle 100 bis 300 Basen auf (Lander et al., 2001). Möglich wurde diese Art der Analyse erst durch die Entschlüsselung des Humangenoms im Jahre 2003 im Rahmen des Human Genome Project und die Katalogisierung von 3,2 Milliarden Nukleotidbasenpaaren und 3 Millionen SNPs des Humangenoms durch das International HapMap Project und 1000 Genomes Project (Pearson & Manolio, 2008). Des Weiteren haben die Entwicklung von SNP-Microarrays, Hochdurchsatzverfahren und sinkende Sequenzierungskosten dazu beigetragen, dass sehr große Populationen in kürzester Zeit genotypisiert werden können. Trotz der Durchbrüche in den letzten Jahren lassen sich durch die bisher identifizierten Varianten nur weniger als 20 % der Heritabilität der KHK erklären (Dai et al., 2016). Das CARDIoGRAMplus4D Konsortium führte 2013 eine der bis dato größten GWAS-Metaanalyse mit 63746 KHK-Fällen und 130681 Kontrollen durch. Dadurch konnte die Zahl der genomweit signifikanten Loci ($P < 5 \times 10^{-8}$) auf 46 erhöht und weitere 105 KHK-assoziierte Varianten identifiziert werden (Cardiogramplus4d Consortium et al.,

2013). 2015 führte dasselbe Konsortium eine weitere GWAS-Metaanalyse mit noch größeren Fallzahlen durch (185000 Fälle und Kontrollen). Neben der Bestätigung der 46 bereits identifizierten Loci konnten zusätzlich weitere genomweit signifikante, mit der KHK assoziierte Loci identifiziert werden (Cardiogramplusc4d Consortium et al., 2015). Bisher konnten durch GWAS insgesamt 56 KHK-Risikogene identifiziert werden. Einige wenige der durch GWAS identifizierten Loci sind mit traditionellen Risikofaktoren assoziiert. Die Mehrheit der identifizierten Genregionen jedoch wurde vorher noch nicht in Zusammenhang mit der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit gebracht (Kessler et al., 2013; Schunkert et al., 2011), weshalb es unerlässlich ist diese biologisch zu validieren.

2. ***ADAMTS7* als Risikogen der KHK**

In mehreren unabhängigen genomweiten Assoziationsstudien konnte *ADAMTS7* als signifikanter Risikolokus für die KHK identifiziert werden (Cardiogramplusc4d Consortium et al., 2013; Coronary Artery Disease Genetics Consortium, 2011; Reilly et al., 2011). Dabei konnte in KHK-Patienten ein SNP (rs3825807) identifiziert werden, der mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert war. Der nicht-synonyme SNP (A zu G) führt zu einem Serin/Prolin-Aminosäureaustausch in der Prodomäne. Die Risikoallelfrequenz (A), also die relative Häufigkeit des Risikoallels in einer Population, liegt bei 57% (Schunkert et al., 2011). Ergänzend dazu konnte in der Bruneck-Studie beobachtet werden, dass der protektive G/G-Genotyp mit einer niedrigeren Prävalenz der Atherosklerose assoziiert war. Weitere *in vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass die Prodomäne von *ADAMTS7* in vSMC mit G/G Genotyp weniger stark abgespalten wird und hierdurch zu einer verminderten *ADAMTS7*-Funktion führt (Pu et al., 2013). Des Weiteren zeigten Patienten mit Risiko-Genotyp (A/A) eine niedrigere Überlebensrate nach diagnostizierter koronarer Herzkrankheit (Pereira et al., 2016). Die Bedeutung von *ADAMTS7* als Risikogen für die KHK scheint, ungeachtet der Ethnie und Herkunft, weltweit von Bedeutung zu sein (Assimes et al., 2016; Vargas et al., 2016; You et al., 2015). Zwei weitere mit der KHK assoziierte, in bzw. neben dem *ADAMTS7*-Gen liegende SNPs konnten durch GWAS identifiziert werden (Reilly et al., 2011; Schunkert et al., 2011). Die Variante rs1994016 liegt im Intron 8 des *ADAMTS7*-Gens und rs4380028 liegt 7,6 kb aufwärts von *ADAMTS7*. Noch ist nicht bekannt, ob die beiden SNPs einen direkten Einfluss auf die Funktion von *Adamts7* haben.

Das Gen *ADAMTS7* kodiert für die extrazelluläre Matrixmetalloproteinase ADAMTS7, welche zu der ADAMTS-Familie gezählt wird (Hurskainen, 1999; Somerville et al., 2004). Die ADAMTS Familie charakterisiert sich durch Zinkmetalloproteinasen mit mindestens einem sich wiederholenden Thrombospondin Typ I-Motiv und besteht mittlerweile aus 19 Mitgliedern (Kuno et al., 1997). Die Proteasen der ADAMTS-Gruppe können die ECM-Proteine Aggrecan und Versican degradieren, die vor allem in Blutgefäßen exprimiert werden (Apte, 2004; Porter et al., 2005). Das humane ADAMTS7-Protein setzt sich aus 1686 Aminosäuren zusammen und hat ein geschätztes Molekulargewicht von 181 kDa. Im Gegensatz zum humanen ist das murine ADAMTS7-Protein aufgrund einer kürzeren Pro- und Mucindomäne mit 1641 Aminosäuren etwas kleiner. Trotzdem sind beide Proteine zu 67 % identisch. ADAMTS7 setzt sich aus einem Signalpeptid, einer Prodomäne, einer katalytischen Domäne, einer Disintegrin-like Domäne, einem Thrombospondin (TS) Typ I-like repeat, einer Cystein-reichen Domäne, einer Spacerregion und sieben C-terminalen TS-Wiederholungen zusammen (Somerville et al., 2004). Durch mehrere Exosites in den C-terminalen Regionen, die die Proteinerkennung und Matrixlokalisierung beeinflussen, hat ADAMTS7 eine hohe Substratspezifität und könnte sich als sicheres therapeutisches Target eignen (Muller et al., 2016; Tortorella et al., 2009). Gesteuert wird die Expression von *Adamts7* in vSMC durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , PDGF-BB (Bauer et al., 2015; Luan et al., 2008; Wang et al., 2009) und herabreguliert durch den anti-inflammatorischen Faktor TGF- β (Wang et al., 2009).

Ein Effekt auf Gefäße konnte erstmals durch eine chinesische Arbeitsgruppe im Jahr 2009 gezeigt werden: nach Ballon-vermittelter Schädigung der Arteria carotis communis bei Ratten war eine Zunahme der *Adamts7*-Expression nachweisbar. Weitere Untersuchungen zeigten, dass *ADAMTS7* vor allem in den vSMC der neugebildeten Neointima exprimiert wird (Wang et al., 2009). Diese Beobachtung stimmt mit Daten aus humanen atherosklerotischen Läsionen, in denen *ADAMTS7* exprimiert und mit migrierenden vSMC kolokalisiert werden konnte, überein (Bauer et al., 2015). Die Vermutung, dass *ADAMTS7* einen Einfluss auf die Migrations- und Proliferationsfähigkeit von vSMC hat, konnte in weiteren Experimenten bestätigt werden. Eine Überexpression mittels Adenovirus-Infektion erhöhte die Migrations- und Proliferationsbereitschaft von vSMC, während eine Hemmung von *ADAMTS7* mit Hilfe von siRNA den gegenteiligen Effekt hatte (Wang et al., 2009). In weiteren

Gefäßschädigungsmodellen der Arteria carotis und der Femoralarterie konnte eine Reduktion der Neointimabildung bei *Adamts7*-Knockout-Mäusen beobachtet werden (Aherrahrou et al., 2011; Bauer et al., 2015). Diese Auswirkungen von *ADAMTS7* auf die Migration und Proliferation von vSMC sowie die Neointimabildung scheinen durch die Degradation von COMP vermittelt zu werden (Wang et al., 2009). Erstmals wurde COMP als potentielles Zielprotein von *ADAMTS7* im Rahmen der Untersuchung der rheumatoiden Arthritis entdeckt. COMP wird durch *ADAMTS7* zeit- und konzentrationsabhängig degradiert (Liu et al., 2006) und ist in vSMC der Gefäßwand von gesunden und atherosklerotischen Arterien zu finden (Riessen et al., 2001). Wie in Experimenten mit *Comp*^{-/-}-Mäusen gezeigt werden konnte, hat COMP nach Gefäßschädigung normalerweise einen hemmenden Effekt auf die Migration und Proliferation von vSMC. Dieser kann jedoch durch *ADAMTS7* aufgehoben werden (Kessler et al., 2015). Die Degradation von COMP durch *ADAMTS7* wiederum kann durch α 2-Makroglobulin (Luan et al., 2008) und Granulin-Epithelin-Precursor gehemmt werden (Guo et al., 2010). Nach therapeutischen Interventionen (Stent) ist ein intaktes bzw. schnell regenerierendes Endothel von großer Bedeutung, da es überschießende neointimale Hyperplasie verhindern kann und dadurch die Komplikationsgefahr reduziert wird (Otsuka et al., 2012). Eine Beteiligung von *ADAMTS7* an der Hemmung der Reendothelialisierung von Arterien konnte durch Kessler et al. gezeigt werden (Kessler et al., 2015). Nach Gefäßschädigung von *Adamts7*-defizienten Mäusen, war neben einer verminderten Neointimafläche auch eine schnellere Regeneration des Endothels zu beobachten. Kessler et al. konnten ferner zeigen, dass *ADAMTS7* *in vitro* THBS1 bindet und degradiert (Kessler et al., 2015). Ein Zusammenhang zwischen dem inhibitorischen Effekt von *ADAMTS7* auf die Reendothelialisierung und THBS1 als Substrat wird vermutet (Kessler et al., 2015). Zusammenfassend ist die pathophysiologische Bedeutung von *ADAMTS7* im Rahmen der Atherosklerose weiterhin unklar. Zwar konnten einige wenige Zielproteine von *ADAMTS7* identifiziert werden, jedoch ist die genaue Funktionsweise und Signaltransduktion von *ADAMTS7* immer noch nicht vollständig verstanden. In dieser Arbeit sollen in murinen Atherosklerosemodellen mittels vergleichender Proteomanalyse weitere Zielproteine von *ADAMTS7* identifiziert werden und dessen Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose aufgeklärt werden. Dies könnte dabei helfen neue Strategien zur Prävention und Therapie von Herz-Kreislaufkrankungen zu entwickeln.

3. Rolle der extrazellulären Matrix in der Atherosklerose

Die extrazelluläre Matrix bildet ein strukturelles Netzwerk aus Makromolekülen, in welches Zellen eingebettet sind. Sie ist an der Formgebung und Stabilität von Geweben wesentlich beteiligt. Auch die Basalmembran, die als Verankerung und Abtrennung für Epithelien fungiert, wird durch die ECM organisiert (Hynes, 2009). Neben ihren strukturellen Aufgaben hat die extrazelluläre Matrix auch einen großen Einfluss auf die Funktion und den Phänotyp von Zellen. Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Proliferation, Adhäsion und Migration von Zellen, sowie bei der Zelldifferenzierung und dem Zelltod (Hynes, 2009). Zudem kann sie die Kommunikation zwischen Zellen vermitteln und durch die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren (Lu et al., 2011). Kollagene sind die Hauptstrukturproteine der ECM, eingeteilt in fibrilläre Kollagene (Kollagen I-III, V, IX) und nicht-fibrilläre Kollagene (Kollagen IV). Durchsetzt sind die Kollagenfasern von Proteoglykanen (Aggrecan, Versican, Perlecan), welche den Extrazellularraum ausfüllen und wichtige Hydrationsfunktionen erfüllen. An die Kollagenhelix binden zusätzlich Glykoproteine wie Laminin, Fibronectin und Tenascin, Polysaccharide und Oberflächenrezeptoren, über die mit den umliegenden Zellen kommuniziert werden kann (Bonnans et al., 2014; Theocharis et al., 2016). Die Basalmembran, eine spezialisierte Form der extrazellulären Matrix, besteht vorrangig aus Laminin, Kollagen IV, XV und XVIII und Perlecan, welches für die Stabilität der Basalmembran zuständig ist (Kalluri, 2003). Die extrazelluläre Matrix ist trotz ihrer Gerüstfunktion eine dynamische Struktur, die ständigen Umbauprozessen durch Degradation, häufig durch Proteasen wie den Matrixmetalloproteinasen (MMPs), zu denen auch die ADAMTS-Familie gehört, Synthese und Ablagerung von ECM Komponenten und weiteren Modifikationen unterliegt (Lu et al., 2011). Einerseits hat die ECM einen großen Anteil an physiologischen Prozessen in Geweben, andererseits kann sie aber auch zur Schlüsselkomponente pathologischer Vorgänge werden.

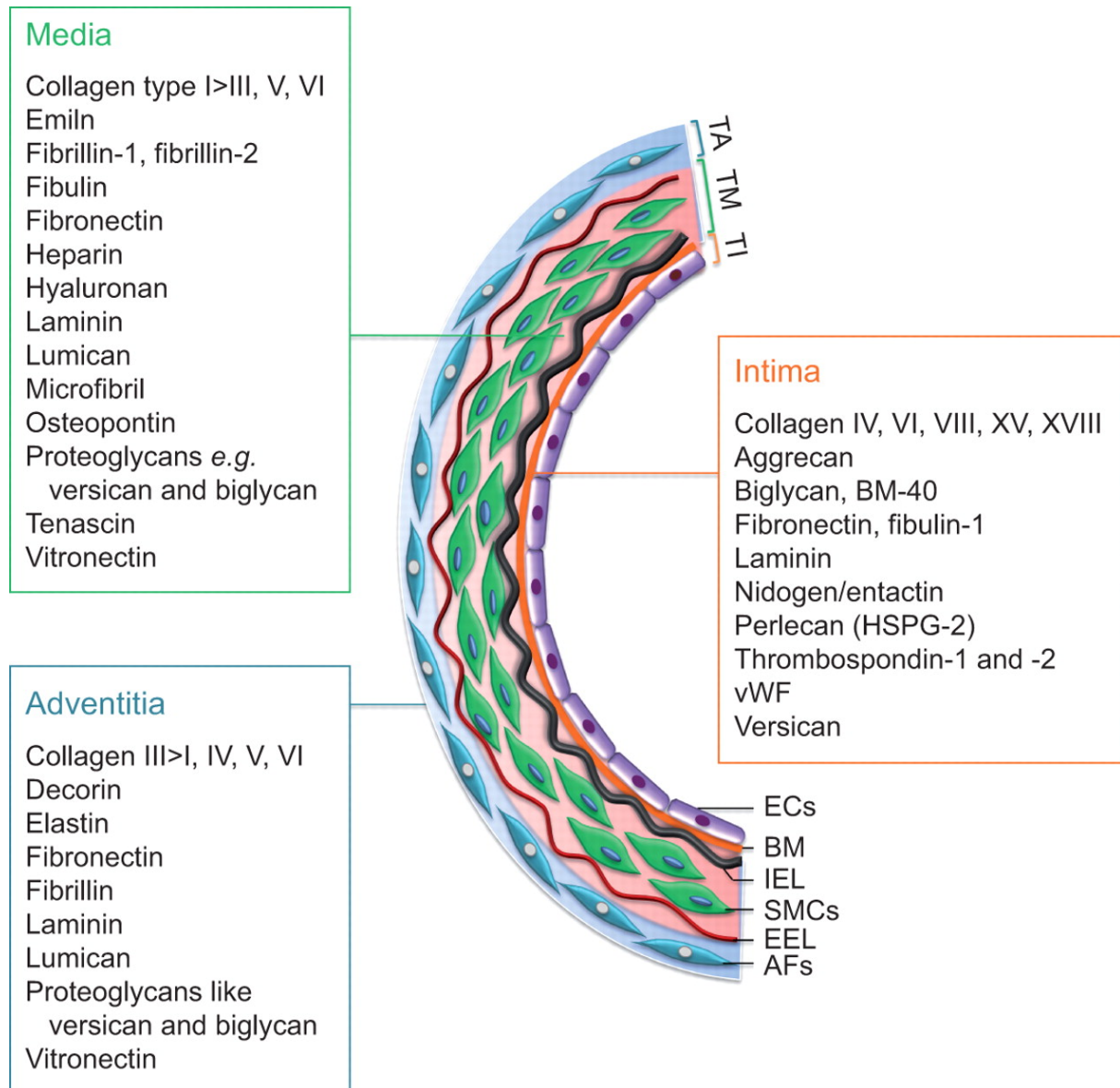


Abb. 2 Übersicht über die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in der Adventitia, Media und Intima einer Arterie.

TA= Tunica adventitia, TM= Tunica media, TI= Tunica adventitia, EC= Endothelzellen, BM= Basalamembran, IEL= Lamina elastica interna, SMCs= Glatte Muskelzellen, EEL= Lamina elastica externa, AF= Fibroblasten. Reproduced with permission of the European Respiratory Society ©. European Respiratory Journal Sep 2012, 40 (3) 766-782; DOI: 10.1183/09031936.00209911 (Chelladurai et al., 2012).

Während der Pathogenese der Atherosklerose und Restenose sind Veränderungen der extrazellulären Matrix von großer Bedeutung. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in atherosklerotischen Plaques oder in restenotischen Bereichen unterscheidet sich maßgeblich von der in gesundem Gewebe (Raines, 2000). In humanen In-Stent-Stenosen werden vor allem akkumulierende ECM-Proteine für die intimale Hyperplasie verantwortlich gemacht und nicht unbedingt proliferierende Zellen (Chung et al., 2002). Matrixproteine sind Schlüsselproteine des vaskulären Remodelings, beeinflussen die Funktion und Aktivität von Makrophagen und SMCs und sind an der Entstehung von Komplikationen, wie Plaqueruptur und Kalzifikationen, beteiligt (Newby, 2008). So führt zum Beispiel der Abbau von Kollagenen, die normalerweise für die Stabilität der Arterienwand verantwortlich sind, zu einem instabilen Plaque und somit zu einer erhöhten Gefahr der Plaqueruptur (Hansson, 2005). Bis heute sind die ECM-Veränderungen in der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit nicht völlig verstanden, sodass die Charakterisierung der extrazellulären Matrix nach vaskulärer Schädigung und die Erstellung eines proteomischen Profils von großem Nutzen für die weitere Erforschung der koronaren Herzkrankheit sein können.

4. Murine Tiermodelle in der Atherosklerose- und Restenoseforschung

4.1. Atherosklerose in der Tiermedizin

In der Tiermedizin spielt die Atherosklerose eine eher untergeordnete Rolle. Bei den meisten Fällen handelt es sich um geringgradige Veränderungen der Gefäßwand, die weder den Blutfluss noch die Versorgung des Gewebes behindern (Dahme, 1962-63). Vom klinischen Erscheinungsbild kommt die Atherosklerose des Schweines der des Menschen am nächsten (Baumgärtner & Gruber, 2010). Da Hausschweine in der landwirtschaftlichen Nutzung meist ihre physiologische Lebensdauer nicht erreichen, findet man lediglich Frühstadien der Atherosklerose, bevorzugt lokalisiert in der abdominalen Aorta und den Zerebralarterien (Dahme & Weiss, 2007). Auch bei Vögeln, vor allem Psittaciden mit hoher Lebenserwartung, kommt eine dem Menschen sehr ähnliche Form der Atherosklerose vor, die häufig zum Tode führt (Baumgärtner & Gruber, 2010). Verschiedene Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht, erhöhte Plasmacholesterol- und Triglyceridlevel sowie eine Koinfektion mit *Chlamydophilia psittaci* sind bekannt (Beaufriere et al., 2013; Beaufriere et al., 2014; Pilny et al., 2012). Eine gemäßigte Form der primären Arteriosklerose ist beim Hund zu finden, welche jedoch durch ihren milden Verlauf zu keiner klinischen Manifestation führt (Liu et al., 1986). Eine ausgeprägtere Form der Atherosklerose wird beim Hund im Zusammenhang mit sekundärer Hyperlipidämie durch Diabetes mellitus und Hypothyreoidismus beobachtet (Hess et al., 2003). Trotz der eher unwichtigen Rolle der Atherosklerose in der Tiermedizin ist ein besseres Verständnis der Prozesse des vaskulären Remodelings auch für die Tiermedizin von Nutzen. Nicht nur bei der Atherosklerose, sondern auch bei Erkrankungen in denen das Gleichgewicht zwischen Funktion und Struktur von Arterien gestört ist, wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus, chronischen Nierenerkrankungen, inflammatorischen Erkrankungen, spielt das vaskuläre Remodeling eine große Rolle (Van Varik et al., 2012).

4.2. Atherosklerosemodelle

Im Vergleich zu Großtiermodellen haben murine Atherosklerosemodelle mehrere Vorteile: einfache Haltungs- und Zuchtbedingungen, geringe Kosten sowie, durch die Entschlüsselung des Mausgenoms, die Möglichkeit der leichten genetischen Manipulation (Leong et al., 2015). Mäuse entwickeln unter normalen Umständen und auch unter Fütterung einer hochkalorischen Diät keine spontanen vaskulären Läsionen (Dolphin, 1981). Eine mögliche Erklärung ist, dass der Lipidmetabolismus von Nagern auf high-density Lipoproteinen (HDL) und nicht wie beim Menschen auf LDL basiert (Kapourchali et al., 2014). Aus diesem Grund wurden genetisch modifizierte Mausmodelle entwickelt. Eines der ersten war das *ApoE*-Knockout-Mausmodell. Den *ApoE*-defizienten Mäusen fehlt das Apolipoprotein E (ApoE), ein Glykoprotein, welches die Bindung von VLDL und Chylomikronen an LDL-Rezeptoren vermittelt. Bei fehlendem ApoE kommt es zu einer fünfmal höheren Konzentration von cholesterolreichen Stoffen im Blut und der Bildung spontaner Plaques in der Aorta (Zhang et al., 1992). Durch die Fütterung einer hochkalorischen Diät kann die Ausbildung von Plaques zusätzlich verstärkt werden (Zhang et al., 1994). Ein weiteres Modell, das in den selben Stoffwechselweg eingreift, ist die *LDL-Rezeptor*-Knockout-Maus. Im Gegensatz zu den *ApoE*-Knockout-Mäusen muss jedoch in *Ldlr*-Knockout-Mäusen die Hypercholesterinämie und Atherosklerose durch Fütterung einer cholesterinreichen Diät induziert werden (Ishibashi et al., 1993). Neben diesen zwei bekanntesten, gibt es noch zahlreiche weitere Modelle (Rigotti et al., 1997).

4.3. Restenosemodelle

Die am häufigsten verwendeten murinen Modelle zur Induktion intimaler Hyperplasie sind das Carotis-Ligations-Modell und Modelle der mechanischen Denudation des Endothels (Hui, 2008). Beim Carotis-Ligations-Modell wird der Blutfluss durch eine Ligation nahe der distalen Bifurkation unterbrochen. Dies führt zu einer Verengung des Gefäßdurchmessers und verringertem Blutfluss, sodass sich nach zwei bis vier Wochen eine Neointima bildet (Kumar & Lindner, 1997). Ein Vorteil dieses Modells ist die hohe Reproduzierbarkeit aufgrund des relativ einfachen Verfahrens. Jedoch spiegelt das Modell nicht die durch mechanische Intervention induzierten Läsionen im Menschen wieder (Hui, 2008). Ein Modell, welches diesem Kriterium gerecht wird, ist die erstmals von Linder et al. beschriebene mechanische Denudation der Carotisarterie mittels Drahteinlage (Lindner et al., 1993). Ein flexibler Führungsdraht

wird in die Arterie eingeführt und somit das Endothel abgetragen. Die Ausbildung einer Neointima kann nach zwei bis vier Wochen beobachtet werden (Lindner et al., 1993). Als weiteres Modell zur Untersuchung post-angioplastischer Restenosen ist die Draht-induzierte Dilatation der Femoralarterie zu nennen (Sata et al., 2000). Durch das Einführen eines Katheterführungsdrahtes in die Femoralarterie wird zum einen die Arterie dilatiert, zum anderen das Endothel denudiert. Vorteil dieser Methode ist, dass sie wesentlich mehr Gewebe für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung stellt und im Gegensatz zur draht-induzierten Carotisschädigung zuverlässiger die Neointimabildung provoziert (Sata et al., 2000).

5. Massenspektrometrie-basierte Proteomik

Das Proteom wird definiert als die Gesamtheit der exprimierten Proteine sowie deren Modifikationen, die von einem Gewebe oder Organismus zu einem definierten Zeitpunkt unter physiologischen (oder pathologischen) Bedingungen produziert werden (Deracinois et al., 2013). Die systematische Erforschung von Proteinen bezüglich ihrer Identität, Quantität und Funktion in Geweben wird auch als Proteomik bezeichnet (Peng & Gygi, 2001). Im Gegensatz zum statischen Genom einer Zelle ist das Proteom komplex und ständigen Veränderungen unterworfen (Peng & Gygi, 2001). So bestimmt nicht die Anzahl der Gene die Komplexität einer Zelle, sondern das Proteom. Der Phänotyp einer Zelle wird maßgeblich durch biochemische Prozesse auf Proteinebene bestimmt. Dabei wird die Expression und Konzentration eines Proteins in einer Zelle oder in Körperflüssigkeiten durch folgende vier Prozesse reguliert: Proteinsynthese, Proteinprozessierung, Proteinsekretion und Proteindegradation (Frohlich & Arnold, 2006). Die Proteomik kann in drei große Bereiche eingeteilt werden: 1) Die Proteinmikrocharakterisierung zur großangelegten Identifikation von Proteinen und ihren posttranslationalen Modifikationen 2) die differentielle Proteomik, die Expressionslevel von Proteinen vergleicht und 3) Protein-Protein-Interaktionsstudien (Pandey & Mann, 2000). Für die Erforschung der Pathogenese von Krankheiten findet vor allem die differentielle Proteomik Anwendung. Ein Ansatz ist es, gesundes und erkranktes Gewebe miteinander zu vergleichen, um unterschiedlich exprimierte Proteine zu identifizieren. Das primäre Ziel ist es, aufzudecken, welche spezifischen Funktionen die identifizierten Proteine in Bezug auf eine Erkrankung erfüllen. Zudem können Knockout-Mausmodelle genutzt werden um potentielle Zielproteine zu identifizieren, die in An- oder Abwesenheit eines Proteins von Interesse unterschiedlich exprimiert sind (Lee et al., 2012). Eine geeignete Methode zur Untersuchung von differentiell exprimierten Proteinen ist die Flüssigchromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (LC/MS) (Shen et al., 2014). In der Massenspektrometrie (MS) wird das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) von Ionen in der Gasphase gemessen (Aebersold & Mann, 2003). Dadurch ist es möglich eine Aussage über Qualität und Quantität der vorhandenen Proteine eines Analysats zu treffen. Die quantitative Proteomik kann in die absolute und relative Quantifizierung unterteilt werden. Während die absolute Quantifizierung genaue Konzentrationsänderungen einer biologischen Probe misst, zeigt die relative Quantifizierung die Hoch- bzw. Runterregulierung der Expression

eines Proteins relativ zu einer Kontrollprobe an (Elliott et al., 2009). Eine sensitive und vor allem für große Proteome geeignete Methode ist die Bottom-up-Analyse. Dabei werden die Proteine zunächst enzymatisch (meistens durch das sequenzspezifische Enzym Trypsin) in Peptide verdaut und dann massenspektrometrisch hinsichtlich ihrer Identität, Quantität und Modifikationen untersucht (Gregorich et al., 2014). Die am häufigsten verwendeten Verfahren, um Proteine in die Gasphase zu überführen und zu ionisieren, sind die Elektrospray Ionisation (ESI) und die Matrix-gestützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) (Fenn et al., 1989; Karas & Hillenkamp, 1988). MALDI sublimiert und ionisiert die Probe aus einer festen kristallinen Matrix mit Hilfe von Laserimpulsen und wird vor allem für die Analyse von relativ einfachen Peptidmischungen verwendet. ESI hingegen ionisiert das Analysat aus einer flüssigen Lösung und kann direkt an Flüssigkeitschromatographie-Systeme (LC-MS) gekoppelt werden, wodurch es möglich ist wesentlich komplexere Proben zu untersuchen (Aebersold & Mann, 2003). Ein Massenspektrometer besteht aus drei Komponenten: 1) einer Ionenquelle, 2) einem Massenanalysator, welcher die Masse-zu-Ladung-Ratio (m/z) der ionisierten Probe misst und 3) einem Detektor, der die Ionenzahl zu jedem m/z -Wert erfasst (Aebersold & Mann, 2003). Um Fragmentierungen zu studieren oder auch um die Selektivität und Sensitivität einer Quantifizierungsmethode entscheidend zu verbessern, nutzt man die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Das erste Spektrometer wählt hierbei Ionen einer bestimmten Masse aus, die dann in dem nachfolgenden Spektrometer zu weiterem Zerfall angeregt werden (Karpievitch et al., 2010). Die Quantifizierung erfolgt entweder auf Isotop-basierten Labelingmethoden oder durch Label-freie Methoden (Cox et al., 2014). Die Proteine werden letztlich anhand der detektierten Massenspektren der Peptide über Proteinsequenz-datenbanken identifiziert (Nesvizhskii et al., 2007).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

In dieser Arbeit wurde als Versuchstier die Maus verwendet. Diese stellt aufgrund ihrer kurzen Generationszeit, kostengünstigen Haltung und vor allem durch die hohe Verfügbarkeit an transgenen Mausstämmen ein ideales Tiermodell zur Erforschung genetischer Zusammenhänge dar.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden durch die Regierungen von Oberbayern und Schleswig-Holstein gemäß § 8 Abs. 1 des deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2532-17-14 und 55.2-1-55-2532-179-15, 122-4(108-9/11)).

1.1. Mausstämme

Alle verwendeten Mäuse hatten einen C57BL/6J-Hintergrund. Als Kontrolltiere wurden Wildtyp-Tiere C57BL/6J bzw. *ApoE*^{-/-} herangezogen, die bei der Zucht der heterozygoten *Adamts7*-Knockout-Maus bzw. der *Adamts7*^{-/-}/*ApoE*^{-/-} entstanden sind und parallel weitergezogen wurden.

***Adamts7*^{-/-}**

Dieser Mausstamm zeichnet sich durch den Knockout des Gens *Adamts7* aus, welches für die Expression der extrazellulären Matrixprotease *Adamts7* kodiert. Für die Generierung der Knockout-Maus wurde die embryonale Stammzelllinie (EPD0209) des European Conditional Mouse Mutagenesis Programm (EUCOMM) verwendet und im Rahmen des Knock Out Mouse Project (KOMP) durch Mikroinjektion in C57BL/6-Blastozysten eingebracht (Austin et al., 2004; Friedel et al., 2007). Somit wurde durch den Einbau einer internen ribosomalen Eintrittsstelle gefolgt von einer Beta-Galactosidase-Sequenz zwischen Exon 4 und 5 das *Adamts7*-Gen unterbrochen, wodurch nur ein verkürztes nicht funktionsfähiges Protein gebildet werden kann. Die Zucht auf einen C57BL/6J-Hintergrund fand am Institut für Integrative und experimentelle Genomik in Lübeck statt, woher die Mäuse auch bezogen wurden. Die generierte *Adamts7*^{-/-}-Maus wurde in der German Mouse Clinic in Hinblick auf Entwicklung und Phänotyp untersucht, wobei keine Anomalitäten beobachtet werden konnten (Kessler et al., 2015).

Adamts7^{-/-}/ApoE^{-/-}

Zur Beurteilung der Rolle der *Adamts7*-Defizienz bei der Plaquebildung wurde die oben beschriebene *Adamts7*-Knockout-Maus auf einen proatherogenetischen *ApoE^{-/-}*-Hintergrund gekreuzt. Das Füttern von *ApoE^{-/-}*-Mäusen mit einer hochkalorischen Diät ist ein gut charakterisiertes Modell für die Atheroskleroseforschung.

Kontrolltiere

C57BL/6J

Der C57BL/6J-Stamm ist einer der am häufigsten verwendeten Inzuchtstämme in der Forschung und wird häufig als Hintergrundstamm bei der Erzeugung transgener Mauslinien verwendet (<https://www.jax.org/strain/000664>). Als Kontrolltiere und für weitere Versuche wurden C57BL/6J-Mäuse verwendet, die aus der Zucht von heterozygoten *Adamts7*-Knockout-Mäusen entstanden sind. Die C57BL/6J-Mäuse werden im Folgenden auch als Wildtyp (WT) bezeichnet.

ApoE^{-/-}

Als Kontrolltiere für den *Adamts7^{-/-}/ApoE^{-/-}*-Stamm wurden *ApoE^{-/-}*-Mäuse verwendet, die aus der Zucht von heterozygoten *Adamts7^{+/-}* mit *ApoE^{-/-}*-Hintergrund entstanden sind. Den *ApoE*-Knockout-Mäusen fehlt das Apolipoprotein E, ein Glykoprotein, welches die Bindung von VLDL und Chylomikronen an LDL-Rezeptoren vermittelt. Bei fehlendem ApoE können diese nicht von der Leber aufgenommen werden und es kommt zu einer fünfmal höheren Konzentration von cholesterolreichen Stoffen im Blut (Zhang et al., 1992). Unterstützt durch die Fütterung mit einer cholesterinreichen Diät, entwickeln die Mäuse schnell atherosklerotische Läsionen, insbesondere in der Aorta, aber auch in anderen Gefäßbereichen.

1.2. Zucht und Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere wurden in der Tierhaltung des Deutschen Herzzentrums München und in der Tierhaltung des Instituts für Integrative und Experimentelle Genomik in Lübeck gehalten und gezüchtet.

Bei allen verwendeten Mausstämmen wurden Bruder-Schwester-Verpaarungen durchgeführt. Die Zuchttiere wurden ab einem Alter von 12 Wochen entweder in einem 1:1 Verhältnis verpaart und als Dauerverpaarung gehalten oder in einem 1:2 Verhältnis verpaart, wobei nach Feststellen der Trächtigkeit der Bock von den Weibchen getrennt wurde. Die Jungtiere wurden in einem Alter von drei bis vier Wochen von der Mutter abgesetzt und bis zum Versuchseintritt in Gruppen gehalten. Die Kennzeichnung der Tiere erfolgte durch Ohrlochmarkierung. Das ausgestanzte Gewebe wurde für die Genotypisierung verwendet. Zum Zeitpunkt des Versuchseintritts waren alle Mäuse zwischen 8 und 12 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht von über 20 Gramm.

Bei den Tierstallungen handelte es sich um spezifiziert Pathogen-freie Haltungen (SPF-Haltung) mit Trockenschleuse. Die Außenbedingungen wurden bei einer Temperatur von 24 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70 % konstant gehalten. Die Beleuchtung wurde durch einen automatischen Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden geregelt. Die Lichtintensität betrug in der Hellphase 50 bis 100 Lux. Bei den Zucht- und Haltungskäfigen handelte es sich um individuell ventilierte Käfige (IVC-Käfige) vom Typ III H, mit einer Nutzfläche von 800 cm² (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg). Die IVC-Käfige waren mit einem Deckel verschlossen und wurden über einen HEPA-Filter mit konditionierter Raumluft versorgt, sodass eine gute hygienische Abgrenzung geschaffen wurde. Die Einstreu wurde von der Firma ABEDD (ABBEDD, Wien, A) verwendet und einmal wöchentlich gewechselt. Als Beschäftigungsmaterial waren neben Holzschnitzelstreu und Unterschlupfhäuschen (Smart Haus für Mäuse, Zoonlab, Castrop-Rauxel), auch Nestlets, Holzwolle und Papierrollen (Arbocel®, J. Rettenmaier und Söhne GmbH und Co KG, Rosenberg) den Käfigen beigefügt. Um ein ausgefülltes Sozialleben zu gewährleisten, wurden die Mäuse in zweier bis sechser Gruppen gehalten. Zuchtböcke mussten aufgrund ihres aggressiven Verhaltens einzeln gehalten werden. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu pelletiertem Futter (Maus Zucht 10mm Pellets/Ratte Maus Haltung 10mm Pellets, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser.

2. Tierversuche

2.1. Tiermodelle

Es wurden zwei verschiedene Tiermodelle verwendet. Für die Untersuchung der Auswirkung der *Adamts7*-Defizienz auf die Plaquebildung und proteomischen Veränderungen im Plaque wurde ein Atherosklerosemodell verwendet, bei dem *Adamts7*^{-/-}-Mäuse mit einem ApoE^{-/-}-Hintergrund über 8 bzw. 16 Wochen eine hochkalorische Diät bekamen. Zur Analyse der Auswirkung der *Adamts7*-Defizienz auf die Neointimabildung und allgemeiner Veränderungen der ECM wurde ein Restenosemodell gewählt.

2.1.1. Atherosklerosemodell – High-Fat-Diät

Die Durchführung der Fütterungsversuche fand am Institut für Integrative und Experimentelle Genomik in Lübeck statt.

Für die Fütterungsversuche wurden nur männliche Tiere verwendet. *Adamts7*^{-/-}/*ApoE*^{-/-}- bzw. ApoE^{-/-}-Mäuse erhielten in einem Alter von 8 Wochen für 8 bzw. 16 Wochen eine hochkalorische Diät (HFD) (TD.88137 Adjusted calories diet (42 % from fat), Harlan Sprague Dawley Inc., Indianapolis, USA) ad libitum. Am Ende der Fütterungsperiode wurden die Versuchstiere (n=3 - 4) in einem Alter von 16 bzw. 24 Wochen mittels einer intraperitonealen Pentobarbitalüberdosis (600 mg/kg) (Release® 300 mg/ml, WDT, Garbsen) euthanasiert. Die Aorta wurde über die linke Herzkammer mit 20 ml isotonischer Natriumchloridlösung 0.9 % (AlleMan Pharma, Pfullingen) gespült. Für die quantitative Proteomanalyse wurden die gespülten Aorten von umliegendem Fett- und Bindegewebe befreit und freipräpariert. Danach wurde folgender Abschnitt der Aorta entnommen: von der Aorta ascendens, einschließlich den Abzweigungen der rechten und linken Arteria subclavia und Arteria carotis, bis zur Bifurkation der Arteriae renales im Bereich der Aorta descendens. Des Weiteren wurde das Herz für die histologische Aufarbeitung der Aortenklappen entnommen. Das gewonnene Gewebe wurde sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

2.1.2. Restenosemodell – Draht-induzierte Femoralisverletzung

Die Wahl zur Untersuchung der Neointimabildung in der Maus fiel auf das Modell der Schädigung der Arteria femoralis mittels Draht. Andere Modelle, wie zum Beispiel das Carotis-Ligations-Modell, liefern aufgrund der anatomischen Gegebenheiten zu wenig Ausgangsmaterial für die Proteomanalyse. Die Neointimabildung wurde nach 3, 7, 14 und 28 Tagen untersucht. Diese vier Zeitpunkte wurden gewählt, um einen detaillierten Überblick über die allgemeinen proteomischen Veränderungen während der Entstehung der intimalen Hyperplasie zu erlangen und die Auswirkungen der *Adams7*-Defizienz in den verschiedenen Entwicklungsstadien zu untersuchen.

2.1.2.1. Narkose

Alle operativen Eingriffe wurden im chirurgischen Toleranzstadium der Narkose durchgeführt. Als Anästhesie für die Maus wurde eine vollständig antagonisierbare Injektionsnarkose angewandt. Diese bestand aus der Kombination folgender Präparate: 5,0 mg/kg Midazolam (Rathiofarm GmbH, Ulm) 0,5 mg/kg Medetomidin (Zoetis, Madison, USA) und 0,05 mg/kg Fentanyl (Albrecht GmbH, Aulendorf). Die drei Injektionslösungen wurden in einer Spritze gemeinsam aufgezogen und intraperitoneal appliziert. Um die Tiere möglichst wenig zu stressen, wurden diese nach Applikation der Narkose in ihre Käfige zurückgesetzt, welche mit einem Tuch abgedunkelt waren. Das Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde durch unvollständigen Zwischenzehenreflex und das Fehlen von Reflexen bei Stimulation am äußeren Gehörgang festgestellt. Zudem wurde in regelmäßigen Abständen die Atemfrequenz und –tiefe durch visuelle Kontrolle überprüft. Aufgrund des erhöhten Hypothermierisikos in der Narkose wurden die Tiere während des Eingriffes bis zur Aufwachphase auf einer Wärmematte (Witte + Suhr, Murrhardt) gelagert. Um die Kornea vor Austrocknung zu schützen, wurde eine Dexpanthenol-haltige Augensalbe (Bayer AG, Leverkusen) in das Auge eingegeben. Nach dem operativen Eingriff erfolgte die vollständige Antagonisierung der Narkose durch die subkutane Gabe von 2,5 mg/kg Atipamezol (Orion Pharma, Espoo FI), 0,5 mg/kg Flumazenil (Hexal AG, Holzkirchen) und 1,2 mg/kg Naloxon (Rathiofarm GmbH, Ulm) in einer Mischspritze.

2.1.2.2. Draht-induziertes Femoralisverletzungsmodell

Das Draht-induzierte Femoralisverletzungsmodell wurde erstmals von Sata et al. beschrieben und von unserer Arbeitsgruppe in einigen Punkten modifiziert (Sata et al., 2000). Die gesamte Operation erfolgte mit Hilfe eines Zeiss-Operationsmikroskops (Stemi200C, Zeiss, Jena). Die Ausleuchtung des Operationsfeldes wurde durch eine externe Lichtquelle (Schwanenhalslampe Schott-Kaltlichtquelle KL200 und Schwanenhalslichtleiter, Zeiss, Jena) gewährleistet. Als Operationsbesteck wurde mikrochirurgisches Instrumentarium von FST verwendet (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg). Nach Erreichen des Toleranzstadiums, wurden die Tiere für die Operation vorbereitet. Das Fell wurde an der Innenseite der linken Hintergliedmaße mit einem Rasierer (Aesculap Suhl, Suhl) entfernt und die Haut mit einem Antiseptikum (Schülke, Norderstedt) desinfiziert. Danach wurde die Maus in Rückenlage auf einer Wärmematte (Witte+Sutor, Murrhardt) positioniert und alle vier Gliedmaßen mittels Tapeband (Transpore™, 3M, Neuss) fixiert. Zu Beginn wurde die Haut mit einer kleinen Schere auf Höhe des Kniegelenks inzidiert und der Schnitt nach proximal erweitert. Um das Gewebe während der Operation vor Austrocknung zu schützen, wurde es während des Eingriffes in regelmäßigen Abständen mit isotonischer Natriumchloridlösung 0,9 % (AlleMan Pharma, Pfullingen) befeuchtet. Die freie Sicht auf das Gefäßnervenbündel, bestehend aus Arteria, Vena und Nervus femoralis, wird durch Drüsengewebe der Mamma inguinalis verdeckt. Dieses wurde mit Pinzetten stumpf durchtrennt und zur Seite verlagert. Anschließend erfolgte, mit Hilfe von feinen Pinzetten, das stumpfe Auftrennen von Faszien und die Freilegung des Gefäßnervenbündels. Um eine Verletzung des Nervus femoralis zu vermeiden, wurde dieser freipräpariert und medial verlagert. Dadurch konnte im weiteren Verlauf der Operation der Nerv geschont werden. Anschließend wurden die Arteria femoralis und die Vena femoralis unterhalb ihres Austritts aus der Lacuna vasorum freipräpariert und mit einem 7/0 Polypropylenfaden (Prolene, Ethicon, Livingston, SCO) umschlungen (Faden A), der später als temporäre Blutsperre fungierte. Die Ligatur wurde zunächst lateral der rechten Hintergliedmaße mit einer Klemme locker fixiert, um eine vorzeitige Ischämie zu verhindern. Im Gefäßverlauf der Arteria femoralis zieht die Arteria femoralis profunda als Abzweigung zwischen den Musculus pectineus und Musculus adductor longus in die Tiefe. Dieser Seitenast der Arteria femoralis diente als Zugang für den Draht. Die Arteria femoralis profunda wurde freipräpariert. Danach wurde proximal

vor der Bifurkation ein Faden unter der Arterie durchgeführt und locker fixiert. Eine weitere Ligatur (Faden C) wurde weiter distal gesetzt und durch einen einfachen Knoten angezogen. Durch das Anziehen des Fadens A mit einer Klemme wurde eine reversible Ligatur erwirkt, die den Blutfluss der A.femoralis für kurze Zeit unterbrach.

Zur Verdeutlichung der anatomischen Strukturen und angebrachten Ligaturen dient folgende Skizze:

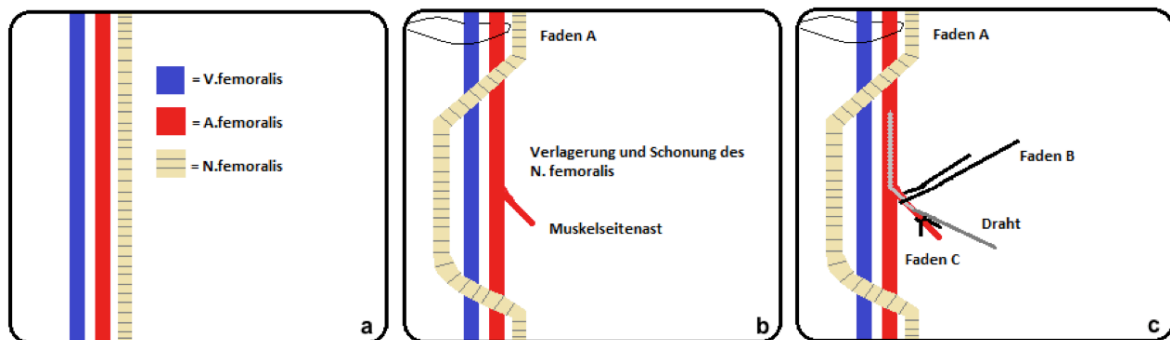


Abb. 3 Übersicht über die Position der Ligaturen A, B und C

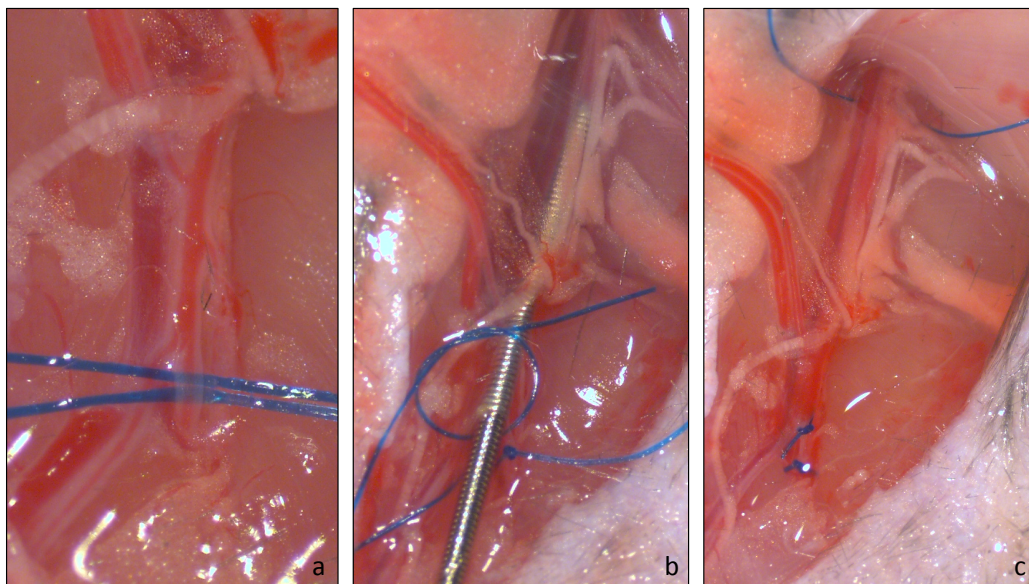


Abb. 4 Intraoperative Übersicht des Femoralisverletzungsmodells.

a Freipräparierte A. femoralis profunda mit angelegten Ligaturen B und C **b** Draht eingeführt in die A. femoralis **c** A. femoralis nach Entfernung des Drahtes und Anziehen der permanenten Ligaturen B und C. Oben im Bild ist die temporäre Ligatur A zu sehen, die vor dem Wundverschluss wieder entfernt wird.

Nach erfolgreicher Unterbindung des Blutflusses, wurde mit einer kleinen Schere die Arteria femoralis profunda eröffnet und die Inzision mit einem angespitzten 0,36 mm Katheterführungsdraht (HI_TORQUE-FLOPPY II, 0,014", Abbott Vascular, Abbott Park, USA) vergrößert. Danach wurde ein 0,38 mm dicker Katheterführungsdraht (Fixed Core Wire guide, straight, Cook Inc., Bloomington, USA) eingeführt und in die Arteria femoralis vorgeschoben. Der Draht wurde für eine Minute in der Arteria femoralis belassen, um das Gefäß zu dehnen und zu denudieren. Anschließend wurde der Draht wieder entfernt und die Arteria femoralis profunda durch Zuziehen der proximalen Fadenschlinge (Faden B) permanent ligiert. Die Ligatur (Faden A) um die Vasa femorales wurde entfernt und der Sitz der restlichen Ligaturen überprüft. Nach Reposition des geschonten Nervs und des Drüsengewebes in ihre physiologische Position, erfolgte der Wundverschluss per primam intentionem durch einfache Knopfhefte mit einem 7/0 Polypropylenfaden (Prolene, Ethicon, Livingston, SCO).

2.1.2.3. Schmerzmanagement

Zur optimalen postoperativen Schmerzbehandlung wurde den Tieren alle 8 Stunden über einen Zeitraum von bis zu 72 Stunden Buprenorphin (0,05 mg/kg KG) (RB Pharmaceuticals Limited, Berkshire, UK) subkutan injiziert. Die erste Injektion erfolgte perioperativ 30 Minuten vor Erwachen aus der Narkose, da die Wirkung von Buprenorphin verzögert eintritt. Um die postoperative Überwachung und die Versorgung mit Analgetika zu vereinfachen, wurden die Tiere in einem ventilierten Käfigschrank gehalten (Tecniplast, Hohenpeißenberg). Da für den Versuch männliche Tiere verwendet wurden, konnten die Böcke nach dem operativen Eingriff nur einzeln gehalten werden. Hierfür wurden kleine Käfige des Typs I lang (Tecniplast, Hohenpeißenberg) verwendet. Diese waren mit Beschäftigungsmaterial (Nestlets und Papierrolle) und Unterschlupfhäuschen ausgestattet. Futter und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Tiere hatten zu jeder Zeit Sicht- und Geruchskontakt zu anderen Artgenossen. Die Mäuse wurden in den ersten drei Tagen drei Mal täglich und an allen weiteren Tagen zwei Mal täglich nach einem etablierten Scoringsystem untersucht. Hierbei lag der Fokus neben allgemeinen Parametern wie Allgemeinbefinden, Bewegungsaktivität, Verhalten, Kot- und Urinabsatz und Nahrungsaufnahme, auf operationsbedingten Komplikationen. Zu möglichen Komplikationen des Femoralisverletzungsmodells gehörte, neben Blutungen, vor allem die Parese der Hintergliedmaße. Vor Versuchsbeginn wurden

Abbruchkriterien festgelegt, bei deren Auftreten die Versuchstiere euthanasiert werden mussten.

2.1.2.4. Versuchsende und Probengewinnung

Nach 3, 7, 14 oder 28 Tagen wurden die Mäuse mittels einer intraperitonealen Pentobarbitalüberdosis (600 mg/kg) (WDT, Garbsen) euthanasiert. Zunächst wurde über die linke Herzkammer mit 20 ml isotonischer Natriumchloridlösung 0.9 % (AlleMan Pharma, Pfullingen) gespült. Um eine völlige Blutleere der Femoralarterie zu gewährleisten, wurde nochmals über die Aorta descendens gespült. Hierzu wurde entweder mit 2 ml Natriumchloridlösung für die Proteomanalyse und Gefrierschnitte oder mit 2 ml 4 % gepuffertem Formaldehyd (Applichem GmbH, Darmstadt) zur Anfertigung von Paraffinschnitten gespült. Die A. femoralis wurde über eine Länge von 10 mm proximal des ligierten Seitenastes entnommen. Arterien, die in die Proteomanalyse eingingen, wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

2.1.3. Morphometrische Auswertung und statistische Analyse

Für die Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen und der Neointima wurden histologische Gefrierschnitte angefertigt (siehe 3 Histologie). Diese wurden bei 5x bzw. 10x Vergrößerung unter einem Leica-Mikroskop (Leica DMRB, Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar) mit einer Kamera (Leica DFC450C, Leica, Wetzlar) abfotografiert. Die Ausmessung der Schnitte erfolgte mit der Leica-Software LAS V4.5.

2.1.3.1. Quantifizierung atherosklerotischer Plaques

Es wurden je vier Serienschnitte (im Abstand von 25 µm) mit einer Schnittdicke von 3 µm pro Tier ausgewertet. Als Startpunkt der Serie wurde der erste Schnitt gewählt auf dem alle drei Aortensegel vollständig abgebildet waren. Die Gesamtfläche der Plaques wurde aus der Summe der Plaqueflächen bestimmt und für jedes Tier in den seriellen Schnitten der Mittelwert berechnet. Die Fläche der Läsionen wurde gegen die Fläche der Gesamtaorta normalisiert und in Prozent angegeben. Die Unterschiede wurden mittels ungepaartem t-Test auf ein Signifikanzniveau von 0.05 untersucht.

2.1.3.2. Quantifizierung der Neointima

Für die Auswahl der Schnittebenen zur statistischen Analyse der Neointimabildung wurden die Serienschnitte (alle 100 μm) eines Gefäßes ausgemessen und die Neointima/Media-Ratio (NI/M-Ratio) berechnet. Anhand der NI/M-Ratio wurden die vier Schnittebenen mit dem höchsten Wert ausgewählt, um einen Verdünnungseffekt zu vermeiden. Für folgende Parameter wurde ein Mittelwert aus den 4 gemessenen Ebenen gebildet: Neointimafläche in μm^2 , Mediafläche in μm^2 und Neointima/Media-Verhältnis. Die statistische Auswertung erfolgte mit Prism (GraphPad Prism® software version 6.0 version 6.0 for Mac OS X, La Jolla, USA). Hierbei wurden die Unterschiede der Mittelwerte mittels ungepaartem t-Test auf ein Signifikanzniveau von 0.05 hin untersucht.

3. Histologie

3.1. Gefrierschnitte

Nach der Entnahme wurde das Gewebe in Tissue-Tek® O.C.T (Sakura Finetek Europe B.V, Alphen aan den Rijn, NL) in einer Einbettschale (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NL) eingebettet und bis zur weiteren Bearbeitung bei - 80 °C gelagert. Die Gefrierschnitte wurden bei einer Temperatur von - 21 °C an einem Kryostat (CM 1850, Leica, Nussloch) angefertigt. Ausgehend von der distalen Ligatur an der A. femoralis, die als topographische Markierung diente, wurden Serienschnitte angefertigt und jeweils 5 Schnitte mit einer Schnittdicke von 3 µm auf einen Objektträger (Thermo Scientific, Braunschweig) aufgezogen. Die gewählten Schnittebenen lagen in einem Abstand von 100 µm. Die Aortenwurzeln wurden ausgehend vom Aortenbogen in einem durchgeschnitten. Von den 3 µm dicken Schnitten wurden jeweils zwei pro Objektträger aufgezogen.

3.2. Paraffinschnitte

Das Teilstück der Femoralarterie wurde über Nacht in 4 % gepuffertem Formaldehyd (Applichem GmbH, Darmstadt) immersionsfixiert. Die Entwässerung und Paraffinierung des Gewebes wurde automatisch durchgeführt (STP-120, Microm, Walldorf). Mit Hilfe einer Paraffinausgießstation (AP 280-2, Microm, Walldorf) wurden die Femoralarterien in Paraffin eingebettet und auf einer Kälteplatte (Tissue Cool Plate COP20, Medite, Burgdorf) abgekühlt. Ausgehend von der distalen Ligatur wurde die A. femoralis an einem Rotationsmikroskop in 2 µm dicke Schnitte geschnitten und je zwei Schnitte pro Objektträger aufgezogen.

3.3. Histologische Färbungen

Vor der histochemischen Färbung wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert und rehydriert. Dazu wurden die Objektträger für jeweils 1 Min. in einer absteigenden Alkoholreihe (2x Xylol, 2x Ethanol 100 %, 1x Ethanol 96 %, 1x Ethanol 70 %) und danach in Aqua dest. für 2 Min. geschwenkt. Bis zu Beginn der histologischen Färbung wurden die Schnitte in Aqua dest. gelagert.

Vor dem Eindecken mit Pertex (Histolabs Products AB, Göteborg, SE) wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Aqua dest, 1x Ethanol 70 %, 1x Ethanol 96 %, 2x Ethanol 100 %, 2x Xylol) entwässert.

3.3.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung(HE)-Färbung ist eine Standardfärbung in der Histologie, die einen guten Überblick über die Struktur eines Gewebes liefert. Die Zellkerne werden durch das Hämatoxylin dunkelblau bis schwarz gefärbt, während Zytoplasma, Kollagen, Keratin und Erythrozyten durch das Eosin rot dargestellt werden.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- | | |
|---|---------|
| 1. Färben mit Mayers Hämalaun | 3 Min. |
| 2. Spülen mit 0,1 % HCl-Lösung | 2 Sec. |
| 3. Differenzieren unter fließendem Leitungswasser | 5 Min. |
| 4. Färben in Eosin-G-Lösung 0,5 % wässrig | 3 Min. |
| 5. Spülen Leitungswasser | 30 Sec. |
| 6. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe | |
| 7. Eindecken mit Pertex | |

3.3.2. Masson-Trichrom-Färbung

Bei der Masson-Trichrom-Färbung stellen sich Keratin und Muskelfasern rot, Kollagen und Knochen blau, Zytoplasma rosa und die Zellkerne braun-schwarz dar.

Die Masson-Trichrom-Färbung wurde nach folgendem Protokoll angefertigt:

- | | |
|--|--------|
| 1. Färben in Hämatoxylin-Lösung | 5 Min. |
| 2. Spülen unter Leitungswasser | 5 Min. |
| 3. Spülen mit deionisiertem Wasser | 2 Sec. |
| 4. Färben Biebrich Scarlet-Säure-Fuchsin | 5 Min. |
| 5. Spülen mit deionisiertem Wasser | 2 Sec. |
| 6. Färben in Wolframatophosphor/Molybdätosphor
Säure-Lösung | 5 Min. |
| 7. Färben in Anilin-Blaulösung | 2 Min. |
| 8. Spülen in 1 % Essigsäure | 2 Min. |

3.4. Immunfluoreszenz

Zunächst wurden die Schnitte bei Raumtemperatur luftgetrocknet und anschließend in PBS rehydriert. Um die Schnitte vor Austrocknung zu schützen, wurden alle nachfolgenden Inkubationsschritte in einer Feuchtkammer durchgeführt. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte für 10 Min. mit 0,1 % Triton-X. Danach wurden die Schnitte dreimal für 5 Min. mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Objektträger in 10 %-Serum in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Als Nächstes wurden die Schnitte dreimal für 5 Min. mit PBS gespült und der Primärantikörper, in der oben angegebenen Verdünnung, aufgetragen. Die Schnitte wurden dann zur Inkubation über Nacht bei 4° C im Kühlschrank gelagert. Am nächsten Tag wurde nach drei Waschschritten mit PBS für 5 Min. der Sekundärantikörper auf die Objektträger pipettiert. Dieser wurde in PBS verdünnt und die Präparate für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte gründlich mit PBS gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen, mit DAPI-Mounting-Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingedeckt und mit klarem Nagellack versiegelt. Die Schnitte wurden bis zur Auswertung lichtgeschützt bei 4° C gelagert. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar) und dem Softwareprogramm LAS V4.5 (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar).

4. Molekularbiologie

4.1. Western Blot

Western Blot ist eine semiquantitative Methode zum Nachweis von spezifischen Proteinen. Sie wurde verwendet um die mit Hilfe der LC-MS/MS identifizierten Proteine zu validieren.

Für die Proteinisolation aus den Femoralarterien wurde das Gewebe zunächst mit einem Homogenisator manuell (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zerkleinert. Danach erfolgte der Zellaufschluss und die Freisetzung der Proteine durch Zugabe von 40 µl RIPA und einer Ultraschallbehandlung für 3 x 30 sec. Die Proteinisolation aus Zellen erfolgte auf Eis. Zunächst wurden die Zellen mit einer kalten phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gespült. Danach wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert und zusätzlich für 3 x 30 sec mit Ultraschall beschallt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe eines BCA-Kits (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, USA) und dem Infinite® M200 PRO (Tecan Group, Männerdorf, SUI) bestimmt. Die Proben wurden mit 12,5 µl 4x Laemmli und RIPA auf ein Volumen von 50 µl gebracht und bei 95 °C für 5 Min. im Thermocycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgeköcht. Danach wurden die Proteine anhand ihrer Ladung und ihres Molekulargewichtes mittels Elektrophorese auf Gradientenpolyacrylamidgelen (4-20 %) (Biorad, Hercules, USA) aufgetrennt (18 Min., 300 V) und mittels *Wet-Blotting*-Verfahren in einer Kammer (Biorad, Hercules, USA) auf eine Nitrozellulosemembran (Merck Millipore, Billerica, USA) transferiert (1,5 h, 100 V). Um das unspezifische Binden von Antikörpern an die Probe zu verhindern, wurde die Membran für eine Stunde mit 5 % gepufferter Milch geblockt. Danach wurde die Membran 3 mal für 5 Min. in PBS-T 20 % gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit einem primären Antikörper inkubiert. Vor der Inkubation des sekundären Antikörpers (1 Stunde bei Raumtemperatur), wurde die Membran wieder für 3 mal 10 Min. in PBS-T gewaschen. Die Membran wurde mit einem ECL-Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) entwickelt und im LAS (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA) belichtet und abfotografiert. Die semiquantitative Analyse der Banden erfolgte mit ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA).

4.2. Durchflusszytometrie

Um die Beobachtung aus der massenspektrometrischen Analyse, dass Makrophagen nach vaskulärer Schädigung vermehrt in der Gefäßwand akkumulieren zu verifizieren, wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie, auch bekannt als FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting), können Zellen auf der Grundlage ihrer Größe und Fluoreszenzeigenschaften typisiert werden. Dazu werden Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper, die gegen Oberflächenproteine eines bestimmten Zelltyps gerichtet sind, mit der Probe inkubiert und mit Hilfe des Durchflusszytometers detektiert und gemessen.

Zunächst wurden die entnommenen Femoralarterien manuell zerkleinert und für eine Stunde bei 37 °C und 750 rpm enzymatisch verdaut. Nach dem Verdau wurde die Probe mehrmals mit FACS-Puffer bis auf ein Endvolumen von 40 ml gespült und in ein 50 ml Reaktionsgefäß gefiltert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 8 Min. bei 400 g und 4 °C. Der Überstand wurde entnommen und das Zellpellet mit 300 µl Puffer resuspendiert, nochmals gefiltert und in FACS-Röhrchen pipettiert. Für die spätere Zellzahlbestimmung wurden 10 µl aliquotiert.

Tab. 1 Antikörperkonzentrationen für die FACS-Analyse

Antikörper	Konjugat	µl	Antikörper	Konjugat	µl
Master Mix I			Master Mix II		
B220	PE	0,5	Ly6C	Brilliant Violet 421	0,5
CD49b	PE	0,5	CD45.2	PerCP / Cy5.5	1
CD90.2	PE	0,25	F4/80	PE / Cy7	0,5
NK1.1	PE	0,1	Cd11b	APC / Cy7	0,5
Ter119	PE	0,5			
Ly6G	PE	0,5			
FACS Puffer		ad 50	FACS Puffer		ad 50

Je 50 µl des ersten Antikörper-Master-Mix wurden zu jeder Probe zugegeben, diese für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und mit 1 ml Puffer aufgefüllt. Danach wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand entnommen und das Zellpellet mit 300 µl Puffer aufgefüllt. Die Schritte wurden nach Zugabe des zweiten Antikörper-Gemisches wiederholt. Für die Kontrollproben zur Kompensation des Gerätes wurden 300 µl Puffer zu 20 µl Beads hinzugefügt und jeweils 1 µl des Antikörpers auf die Kontrolle gegeben. Danach wurde 1 ml Puffer zugegeben und wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand entnommen und mit 600 µl Puffer resuspendiert. Um die Gesamtzellzahl der Probe zu bestimmen und die Prozentzahlen der enthaltenen Zellen auszurechnen, wurden die Zellen in einer Zählkammer gezählt. Zur Differenzierung von toten und lebenden Zellen wurde ein 10 µl Aliquot der Probe 1:2 mit Trypanblau gemischt. Die Zählkammer wurde mit 10 µl gefüllt und jeweils vier Quadranten ausgezählt. Die Messung erfolgte am FACS Gerät (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) und der BD FACSDiva Software. Die Auswertung wurde mit FlowJo vorgenommen. Die Leukozytenpopulationen wurden gemäß *forward scatter* (FSC-A) (Zellgröße) und *side scatter* (SSC-A) (interzelluläre Granularität) begrenzt. Die Kompensation wurde manuell durchgeführt.

4.3. Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse wurde im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten e:AtheroSysMed-Konsortiums in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Matthias Mann am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Die Mäuse wurden euthanasiert, die Aorten bzw. Femoralarterien entnommen, mit NaCl gespült und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Da die weitere Probenverarbeitung und Proteomanalyse am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt wurden, werden im Folgenden nur die wichtigsten Schritte beschrieben. Eine ausführliche Beschreibung der Methodik für das Profiling der Aorten kann in der Veröffentlichung von Schiller et al. nachgelesen werden (Schiller et al., 2015). Das Gewebe wurde mit Hilfe eines Gewebehomogenisators (Thermo, Braunschweig) in einem EDTA-Protease-Inhibitor-Gemisch zerkleinert. Die Aorta wurde zusätzlich durch mehrere Zentrifugationsschritte und Zugabe von verschiedenen Puffern in Fraktionen aufgetrennt. Bis zu 2 µg der Peptide wurden über eine Reverse-Phase-Säule (50 cm Länge, 75 µm Durchmesser) gepackt mit ReproSil-Pur aufgetrennt. Die Reverse-Phase-Chromatographie wurde mit einem EASY-nLC 1000 Flüssigchromatograph (Thermo Fisher Scientific), gekoppelt an ein Q-Exactive Massenspektrometer (Thermo Scientific) durchgeführt (Scheltema et al., 2014). Die Analyse der MS-Rohdaten und die weitere statistische Auswertung der Daten wurden am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

4.3.1. Statistische Analyse der MS-Daten

4.3.1.1. Hauptkomponentenanalyse

Eine weitverbreitete Methode um multivariate Datensätze zu strukturieren und übersichtlicher zu gestalten ist die Hauptkomponentenanalyse (PCA). Diese Methode reduziert eine große Datenvielfalt zu einem kleineren Set an neuen Variablen, sodass sich komplexe Datensätze vereinfacht darstellen lassen (IVOSEV et al. 2008). Die neuen Variablen, auch Hauptkomponenten genannt, sind Linearkombinationen der originalen Variablen und werden nach dem Grad der Datenvarianz, den sie erklären, gegliedert. Die Ergebnisse der PCA wurden in zweidimensionalen Grafiken und die Beteiligung der Hauptkomponenten an der Datenvarianz in Prozent dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hauptkomponentenanalyse verwendet, um proteomische Variationen zwischen

Adams7-KO-Mäusen und Kontrolltieren bzw. geschädigten und nicht-geschädigten Femoralarterien von C57BL/6 nach MS-Analyse zu detektieren.

4.3.1.2. Varianzanalyse und nicht-überwachte hierarchische Clusteranalyse

Zur Bestimmung von signifikant regulierten Proteinen wurde eine Varianzanalyse (ANOVA, Analysis of variance) mit Permutations-basierter „False Discovery Rate“ (FDR) über die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen angewandt. Dazu wurden zuvor die Intensitätswerte nicht detektierter Proteine per Gaußscher Verteilung imputiert, so dass sie Werte in der Nähe des Detektionslimits darstellten. Zur Visualisierung der Expressionslevel über verschiedene experimentelle Bedingungen und Replikate wurden die LFQ (label free quantification) basierten Intensitätswerte signifikanter Proteine Z-transformiert und das Ergebnis der nicht-überwachten hierarchischen Clusteranalyse als Heatmap dargestellt.

4.3.1.3. Signalweg-Analyse

Die Signalweg-Analyse wurde von Ingrid Braenne am Institut für Integrative und Experimentelle Genomik in Lübeck durchgeführt. Mit der Signalweg-Analyse können Proteine einzelnen Signalwegen zugeordnet werden. Dadurch erhält man einen Überblick über die vorherrschenden biologischen Vorgänge und Protein-Protein-Interaktionen während der Neointimabildung. Die Analyse wurde mit Consensus Path durchgeführt (Kamburov et al., 2013).

4.3.1.4. Semitryptische Analyse

Durch die Analyse nicht-tryptischer Peptide, also Peptide, die nicht durch den enzymatischen Verdau mit Trypsin entstanden sind, ist es möglich Proteasen zu identifizieren, die schon *in vivo* aktiv waren und identifizierte Proteine degradiert haben. Proteasen haben eine hohe Substratspezifität und schneiden nach spezifischen Aminosäuremotiven. Das Substrat einer Protease wird normalerweise als ..+P5, +P4, +P3, +P2, +P1, -P1, -P2, -P3, -P4, -P5.. bezeichnet, wobei die Schnittstelle meistens zwischen +P1 und -P1 liegt (Gupta et al., 2010).

5. Zellkultur

5.1. Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen bzw. -schalen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage ausgetauscht. Die Passagierung erfolgte nach visueller Beurteilung alle 2 bis 3 Tage. Zunächst wurden die Zellen mit HEPES (Promocell, Heidelberg) gewaschen und durch die Inkubation mit Trypsin vom Boden der Zellkulturschale gelöst. Die Wirkung des Trypsins wurde durch Zugabe des gleichen Volumens 0,05 % Trypsin Neutralisationslösung (Promocell, Heidelberg) gestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm für 4 Min., wurden die Zellen in neuem Medium resuspendiert und in gewünschter Zellzahl auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Zellzählgerätes (Merck Millipore, Billerica, USA) bestimmt.

5.2. Transfektion von Zellen

5.2.1. Überexpression von Legumain in HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden in 10 cm Schalen in einer Dichte von 1×10^6 ausgesät. Es wurden 5 µg der Plasmid-DNA in 80 % konfluente Zellen mit Hilfe des Transfektionsreagenz FuGENE (Promega, Madison, USA) in die Zellen eingebracht. Vor Zugabe des Transfektionsansatzes, wurde das Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht. Die Ernte erfolgte nach 48 Stunden. Als Negativkontrolle wurden HEK-Zellen mit der gleichen Konzentration an leeren pUC19 Vektoren transfiziert.

Tab. 2 Transfektionsansatz Überexpression

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

Plasmidpräparation

Um Plasmid-DNA aus rekombinanten E.coli-Kulturen zu gewinnen, wurde das GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. 4 ml der Übernachtskulturen wurden bei maximaler rpm zentrifugiert und die Zellen in

200 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lysis Solution hinzugeben und die Proben 8x vorsichtig invertiert. Zur Neutralisierung der Zelllyse wurden 350 µl Neutralisationslösung hinzugefügt und die Proben 6x vorsichtig invertiert. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei max. rpm, wurden je 500 µl Säulen-Preparations-Lösung auf jede Säule geben und 1 Min. bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Lysat auf die Säule geben und für 1 Min. bei max. rpm zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl Waschlösung und 750 µl Waschlösung mit nachfolgender Zentrifugation. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen in 1,5 ml Reaktionsgefäße gestellt. Die Plasmid DNA wurde in 80 µl H₂O eluiert und für 1 Min. bei max. rpm zentrifugiert.

Die Plasmid-DNA wurde zur Sequenzierung zu Eurofins Genomics geschickt. Dazu wurde das Mix2Seq-Smart Easy Quick (Eurofins Genomics) verwendet.

Für die Transfektion der Legumain-DNA wurden größere DNA Mengen benötigt, sodass die Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen Maxi-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

5.2.2. Legumain Knockdown mittels siRNA

Um die Expression von Legumain zu verringern, wurden Zellen mit small interfering RNAs mit Hilfe von RNAiMax (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert. Verwendet wurde eine siRNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), die gegen das gewünschte Zielgen (LGMN) gerichtet war und die vom Hersteller empfohlene Kontroll-siRNA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). siRNAs wurden in einer Endkonzentration von 10 µmol eingesetzt.

Tab. 3 Transfektionsansatz siRNA

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 gemischt und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 50 µl vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Die Knock Down-Effizienz wurde mittels quantitativer Real Time PCR bestimmt.

6. Quantitative Real Time PCR

Zur Bestimmung der Knock-Down Effizienz wurde die quantitative Real Time PCR (qPCR) verwendet. Dazu wurde zunächst RNA isoliert, diese in cDNA synthetisiert und anschließend mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Genexpressionsassays in der qPCR analysiert. Die Zellen zur RNA-Isolierung wurden auf Eis geerntet und zweimal mit 500 μ l eiskaltem PBS gewaschen. Es wurden 350 μ l RLT-Puffer des RNeasy Mini Kits (Quiagen, Hilden) auf die Zellen gegeben und diese bei - 80 °C weggefroren. Die weitere Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die quantitative PCR musste die RNA mit Hilfe des cDNA First-Strand-Synthesis-Kits (Thermoscript, Invitrogen) in cDNA synthetisiert werden. Hierzu wurden 40 ng der isolierten Gesamt-RNA aus Zellen mit 1 μ g Oligo dT, 1 μ l Random Hexamers, 2 μ l dNTP (10mM) versetzt und auf 12 μ l mit nucleasefreiem Wasser aufgefüllt. Um Sekundärstrukturen zu lösen wurde der Reaktionsansatz für 5 Min. auf 65 °C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 4 μ l cDNA Synthese Puffer und je ein μ l 0,1 M DTT, Rnase OUT, ThermoScript RT hinzugefügt und mit nukelasefreiem Wasser auf ein Endvolumen von 20 μ l aufgefüllt. Die Reaktionsmischung wurde für 10 Min. auf 25 °C, 50 Min. auf 50 °C und dann für 5 Min. auf 85 °C erhitzt und wieder auf 4 °C gekühlt. Zum Schluss wurde noch 1 μ l Rnase H hinzugegeben, das Ganze für 20 Min. auf 37 °C erhitzt und danach bei - 20 °C weggefroren und gelagert. Es wurden 2 μ l der synthetisierten cDNA in die qPCR eingesetzt. Für die quantitative Real-time PCR wurden pro Reaktion 1 μ l TaqMan® gene expression assay, 2 μ l cDNA, 7 μ l H₂O und 10 μ l TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG in 96 well Reaktionsplatten zusammen pipettiert und mit Hilfe des ViiA™ 7 real-time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und der dazugehörigen Software analysiert. Eine Wasserkontrolle aus der cDNA-Synthese und eine zusätzliche Wasserkontrolle aus dem qPCR-Ansatz dienten als Negativkontrollen. Alle Proben wurden als Triplikate gemessen und gegen GAPDH normalisiert. Alle verwendeten Chemikalien wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen.

7. Scratch Wound Assay

Um die Migrationsfähigkeit von Zellen unter bestimmten Konditionen zu testen, wurden Scratch Wound Assays durchgeführt. Das Prinzip des Scratch Wound Assays beruht auf der Verletzung eines konfluenten Zellrasens und der nachfolgenden Beobachtung der Rekolonisation des verletzten Areals durch die Einwanderung von Zellen (Liang et al., 2007). Dazu wurden HCAECs in einer Dichte von 100.000 Zellen/well in 24-well Platten ausgesät. Mit Hilfe einer 200 µl Pipettenspitze und einem Lineal wurde ein Strich über den Boden der Zellkulturschale gezogen. Der Knockdown von Legumain fand 48 Stunden vor ziehen des Striches statt und wurde wie oben beschrieben durchgeführt (siehe 5.2.2). Für die Untersuchung der Migration von Zellen in Anwesenheit von Legumain wurden die Zellen mit PBS gewaschen und kurz bevor der Strich gezogen wurde mit 250 µl Überstand von LGMN überexprimierenden HEK293-Zellen (siehe 5.2.1) inkubiert. Um das Einwandern der Zellen in das verletzte Areal zu beurteilen, wurde der Scratch mit dem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Axiovert 100 und Zeiss AxioCam HRc, Zeiss) bei 4-facher Vergrößerung zum Zeitpunkt 0 und nach einer festgelegten Beobachtungsphase fotografiert. Das Abspeichern der Bilder erfolgte mit der Zen lite 2012 Software von Zeiss. Es wurden mindestens 3 unabhängige Experimente mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Migrationsfläche (freie Fläche T0 minus freie Fläche T16/T24) wurde in Pixeln mit der Image J Software ausgemessen und der Mittelwert aus den technischen Replikaten gebildet. Auf Signifikanz wurde mit einem Mann-Whitney-U-Test getestet (GraphPad Prism Software).

IV. ERGEBNISSE

1. Auswirkungen der *Adamts7*-Defizienz

1.1. Plaquebildung

Um die Auswirkungen der *Adamts7*-Defizienz auf atherosklerotische Läsionen zu untersuchen wurden *Adamts7^{-/-}ApoE^{-/-}* und als Kontrolle *ApoE^{-/-}* 8 bzw. 16 Wochen mit einer High-Fat-Diät (HFD) gefüttert und Gefrierschnitte der Aortenwurzeln angefertigt. Zur morphometrischen Auswertung wurden diese mittels Masson-Trichrom-Färbung angefärbt und analysiert. Zu beiden Zeitpunkten, 8 Wochen HFD (frühe Läsionen) und 16 Wochen HFD (fortgeschrittene Läsionen), konnte kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen hinsichtlich der Plaquegröße beobachtet werden.

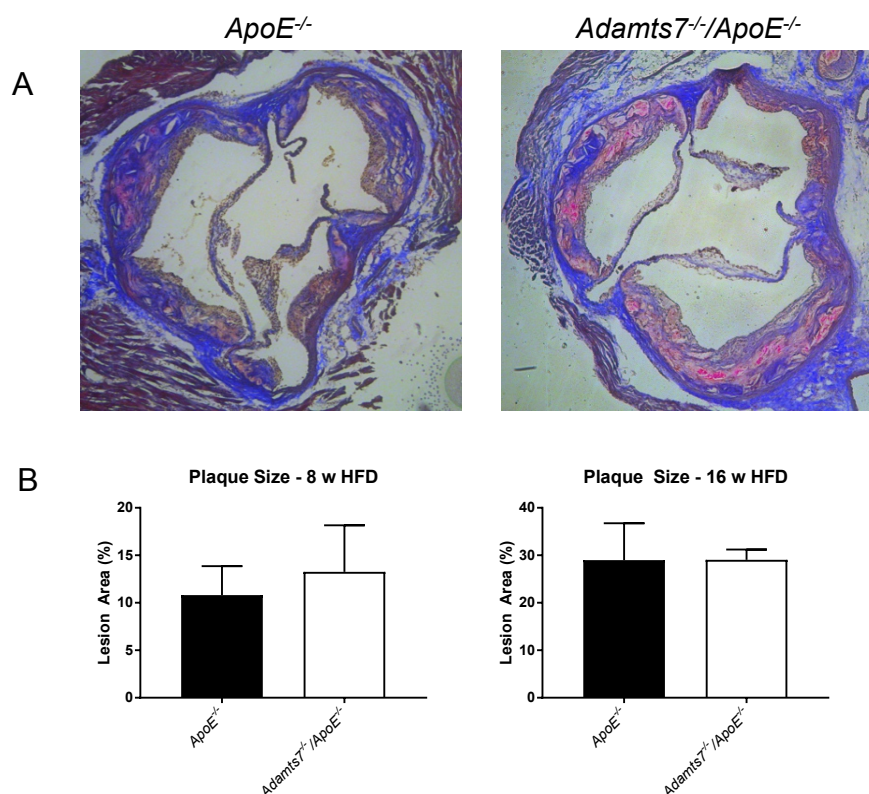


Abb. 5 Plaquebildung in der Aortenwurzel von *Adamts7^{-/-}ApoE^{-/-}* im Vergleich zu *ApoE^{-/-}*-Kontrollen

A Masson-Trichrom-Färbung von repräsentativen Gefrierschnitten der Aortenwurzel von *Adamts7^{-/-}ApoE^{-/-}* und *ApoE^{-/-}* nach 16 Wochen HFD (10x Vergrößerung) **B** Quantifizierung der Plaquegrößen nach 8- und 16-wöchiger hochkalorischer Diät (n=3, ungepaarter t-Test, ±SEM).

1.2. Neointimabildung

Draht-induzierte neointimale Proliferation

Zunächst wurde überprüft, ob und in welchem Maße es nach Draht-induzierter Schädigung der Arteria femoralis zu einer Neointimabildung kommt bzw. ab welchem Zeitpunkt eine Reaktion des Gefäßes zu beobachten ist. Dazu wurden die Zeitpunkte 3, 7 und 14 Tage nach Schädigung seriell untersucht und jeweils 6 Tiere (n=6) pro Zeitpunkt ausgewertet. Innerhalb der ersten Woche war vor allem eine erhöhte Zellularität des Gewebes zu beobachten und noch keine solide Neointimabildung nachweisbar. Am Tag drei nach vaskulärer Schädigung war die Einwanderung von Zellen in die Adventitia prominent. Nach 7 Tagen nahm die Einwanderung inflammatorischer Zellen zu und es wurden zusätzlich lose Zellaggregate, angelagert an das geschädigte Endothel, vorgefunden. Zwei Wochen nach Verletzung der A. femoralis war eine deutliche Neointimabildung zu erkennen.

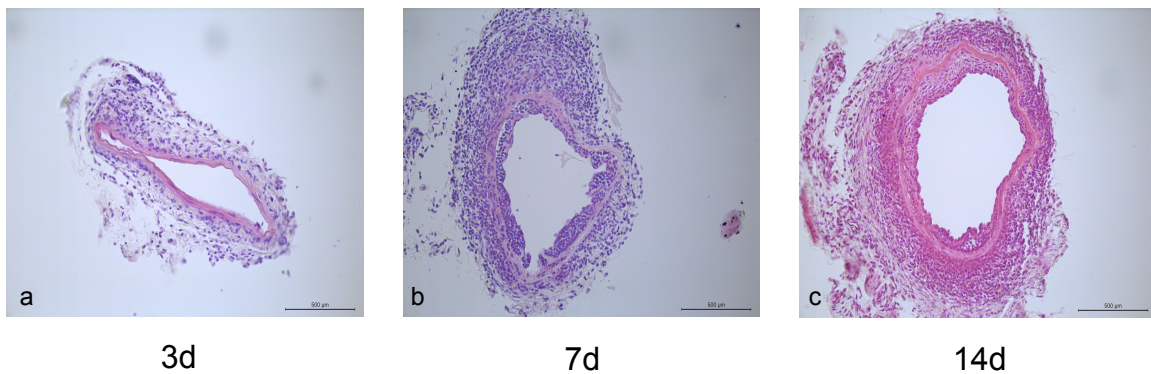


Abb. 6 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung der A.femoralis zu den Zeitpunkten 3, 7 und 14 Tage nach draht-induzierter Schädigung

An Tag 3 **a** ist vor allem eine Zellzunahme in der Adventitia zu beobachten, an Tag 7 **b** sind vor allem Zellen in der Adventitia und angelagert an das Endothel zu finden, während an Tag 14 **c** eine solide Neointimabildung zu sehen ist (10x Vergrößerung).

Adamts7-Defizienz reduziert Neointimabildung nach vaskulärer Schädigung

Vorangegangene Studien wiesen darauf hin, dass eine *Adamts7*-Defizienz einen hemmenden Effekt auf die Ausbildung einer Neointima nach vaskulärer Schädigung hat (Bauer et al., 2015; Kessler et al., 2015). Femoralarterien von *Adamts7*-KO-Mäusen und Wildtyp-Mäusen wurden mittels Draht geschädigt und die Neointimabildung nach 28 Tagen analysiert. *Adamts7*^{-/-} zeigten signifikant weniger Neointimabildung ($p = 0,0107$) und eine signifikante Reduktion in der Neointima/Media-Ratio ($p = <0,0001$). In der Mediafläche war kein Unterschied zu beobachten.

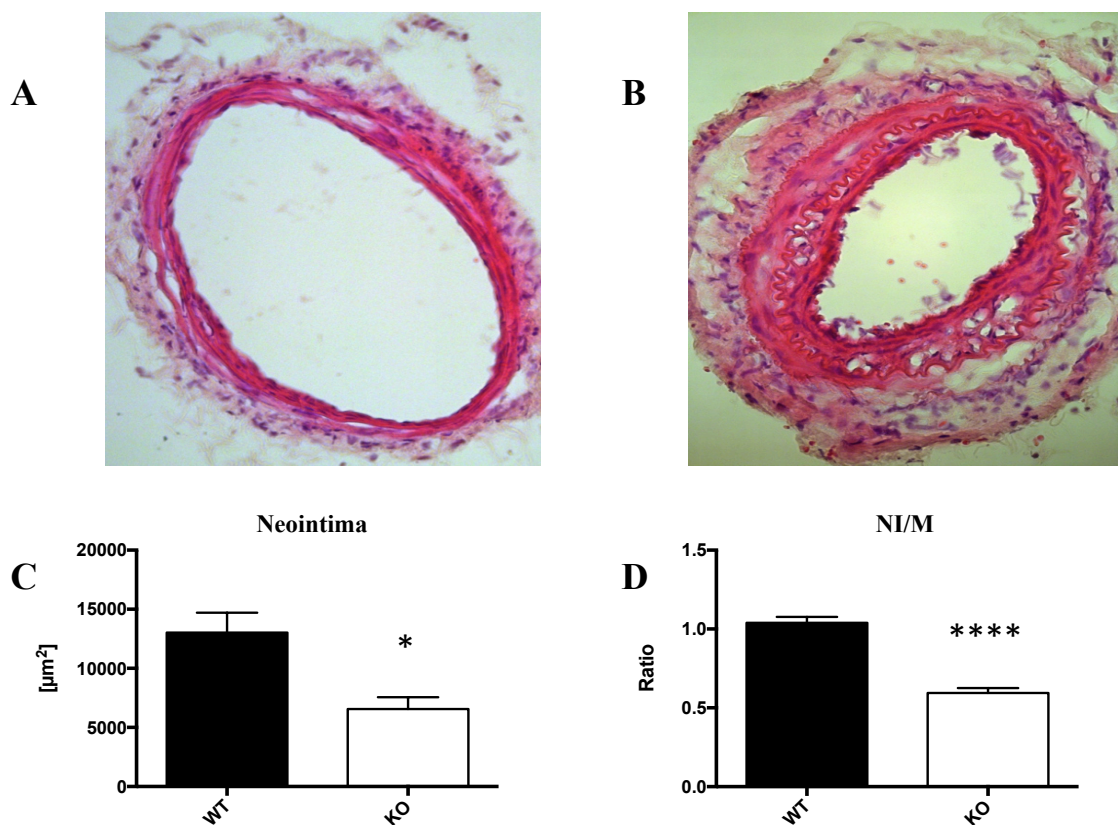


Abb. 7 reduzierte Neointimabildung in *Adamts7*^{-/-} nach draht-induzierter Schädigung der A. femoralis. Repräsentative Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbungen von Femoralarterien 28 Tage nach Schädigung von **A** *Adamts7*^{-/-} mit reduzierter Neointimabildung und **B** Wildtyp mit deutlicher Neointimabildung (Gefrierschnitt, 20x Vergrößerung). Quantifizierung der **C** Neointimabildung ($p = 0,0107$) und **D** des Neointima-zu-Media Verhältnisses ($p = <0,0001$) ($n=5$, ungepaarter t-Test, \pm SEM).

2. Proteomische Veränderungen in *Adamts7*^{-/-} nach vaskulärer Schädigung

Mit Hilfe der Massenspektrometrie und anschließender vergleichender Proteomanalyse wurden Aorten von 8 Wochen alten *Adamts7*^{-/-}/*ApoE*^{-/-} unter Standarddiät und *Adamts7*^{-/-}/*ApoE*^{-/-} nach 8- bzw. 16-wöchiger hochkalorischer Diät untersucht. In einer weiteren Versuchsreihe wurden Femoralarterien von *Adamts7*^{-/-} 14 und 28 Tage nach Draht-vermittelter Schädigung analysiert. Als Kontrollen dienten Aorten von über den gleichen Zeitraum gefütterten *ApoE*^{-/-} bzw. geschädigte Femoralarterien von Wildtypen (C57BL/6). Ziel war es differentiell exprimierte Proteine zu finden und somit neue potentielle Substrate von *ADAMTS7* zu identifizieren. Die Proteomanalyse der atherosklerotischen Aorten konnte keinen signifikanten Unterschied in der Proteinexpression zwischen *Adamts7*^{-/-}/*ApoE*^{-/-} und *ApoE*^{-/-} aufzeigen. In den Aorten konnten 6870 Proteine quantifiziert werden. Nach Filtern für mindestens zwei gültige Werte in jeder experimentellen Gruppe, verringerte sich die Anzahl auf 5612 Proteine. Den Genotyp außer Acht lassend, war eine deutliche Trennung der unterschiedlichen Versuchsgruppen in der Hauptkomponentenanalyse (PCA) möglich und 433 Proteine zeigten nach ANOVA Analyse signifikante Expressionsänderungen (Abbildung 8 und 10). In der Gruppe, die 16 Wochen mit einer hochkalorischen Diät gefüttert wurde, war bei einigen ECM-Proteinen ein Trend zu einer höheren Expression in den Knockout-Tieren zu beobachten, der jedoch nicht FDR signifikant war (Abbildung 12). Möglicherweise könnten diese Proteine potentielle *Adamts7*-Targets darstellen oder aber die fehlende Funktion von *Adamts7* kompensieren. Unter den ECM-Proteinen befanden sich auch Comp und Thbs-1, welche als identifizierte Substrate von *Adamts7* gelten (Kessler et al., 2015; Liu et al., 2006).

Insgesamt konnten in den Femoralarterien 5434 bzw. nach Filtern für mindestens 6 gültige Werte 3879 Proteine identifiziert werden. Auch im Femoralis-Verletzungsmodell konnten keine signifikanten Proteomveränderungen in den *Adamts7*^{-/-} identifiziert werden und in der ANOVA Analyse und der Hauptkomponentenanalyse war kein sichtbarer Effekt von *Adamts7* auf die Zusammensetzung der Neointima zu sehen. Jedoch konnten in beiden statistischen Tests die geschädigten und nicht geschädigten Femoralarterien, unabhängig ihres Genotyps, deutlich voneinander getrennt werden (Abbildung 9 und 11). Hier konnten

1308 signifikant regulierte Proteine (ANOVA, $s_0=1$, $FDR<0,01$) gefunden werden. Unter den signifikant regulierten Proteinen befanden sich auch Comp und Thbs-1 (auch als Tsp-1 bekannt), zwei in der Literatur beschriebene Substrate von ADAMTS7. Beide Proteine zeigten in geschädigten Femoralarterien von *Adamts7*^{-/-} und WT-Mäusen eine Hochregulation, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abbildung 13B). Thbs-1 erfährt vor allem zwei Wochen nach Schädigung eine deutliche Hochregulation, während Comp in den geschädigten Arterien konstant hochreguliert war und in den Kontrollarterien nicht detektiert werden konnte. Nachdem die Proteomanalyse der Femoralarterien 14 und 28 Tage nach Verletzung keine signifikanten Unterschiede aufzeigen konnte, wurden in einem weiteren Versuchsansatz Femoralarterien 3 und 7 Tage nach Schädigung untersucht. Die Idee war, dass sich die phänotypischen Unterschiede an Tag 28 möglicherweise durch eine *Adamts7*-Aktivität in der akuten Phase nach vaskulärer Schädigung erklären lassen. Auch zu den Zeitpunkten 3 und 7 Tage nach Schädigung konnten keine signifikanten Proteinexpressionsunterschiede zwischen den KO und WT gefunden werden.

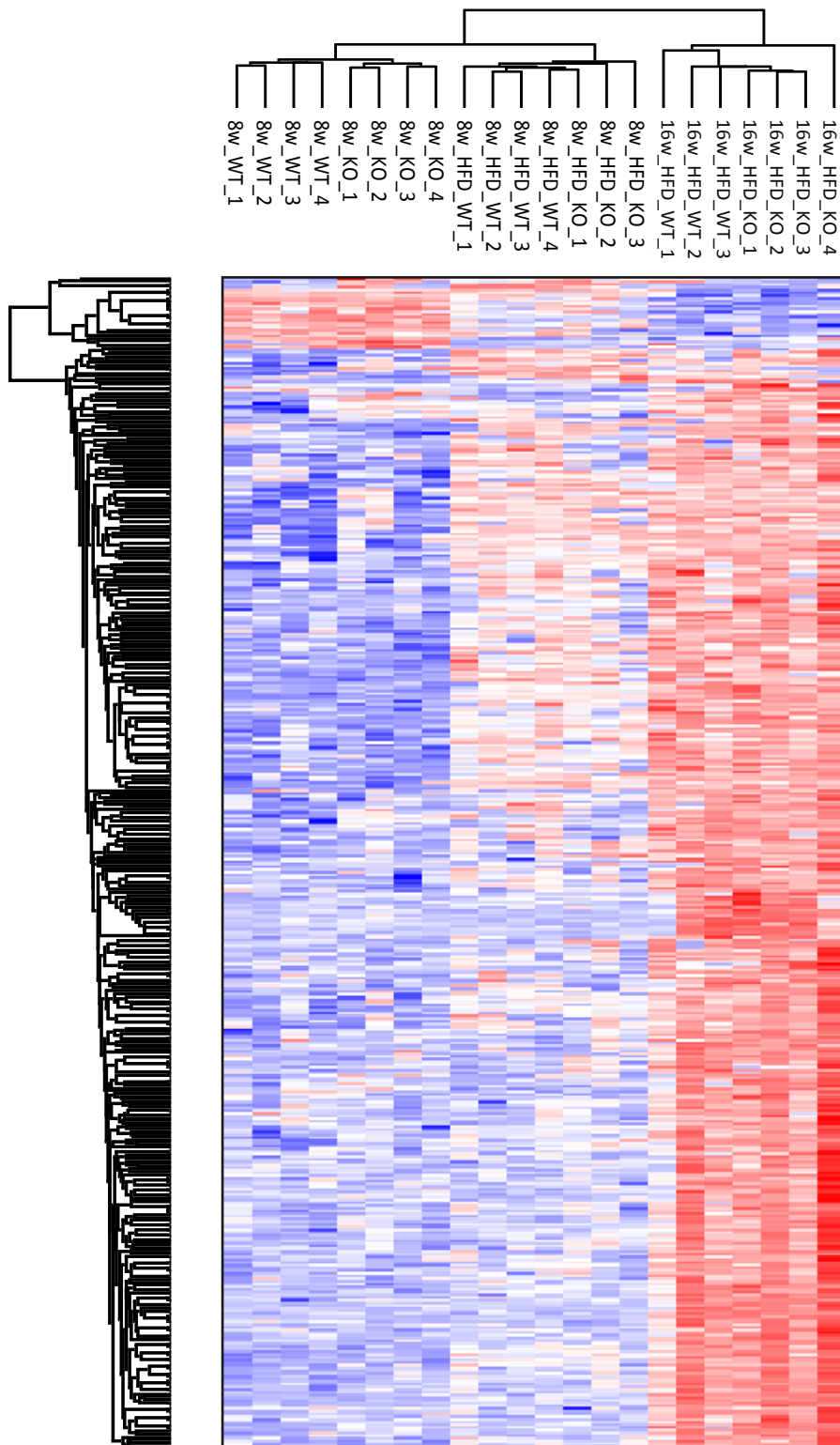


Abb. 8 Heatmap Aorten *Adamts7^{-/-}/ApoE^{-/-}* vs. *ApoE^{-/-}*

Heatmap zeigt Proteine mit signifikanten Expressionsänderungen (FDR < 0.05, $s_0 = 1$) atherosklerotischer Aorten von *Adamts7^{-/-}/ApoE^{-/-}* vs. *ApoE^{-/-}* nach ANOVA. Dargestellt sind LFQ-Werte (Proteine) nach z-score Normalisierung und hierarchischer Clusteranalyse.

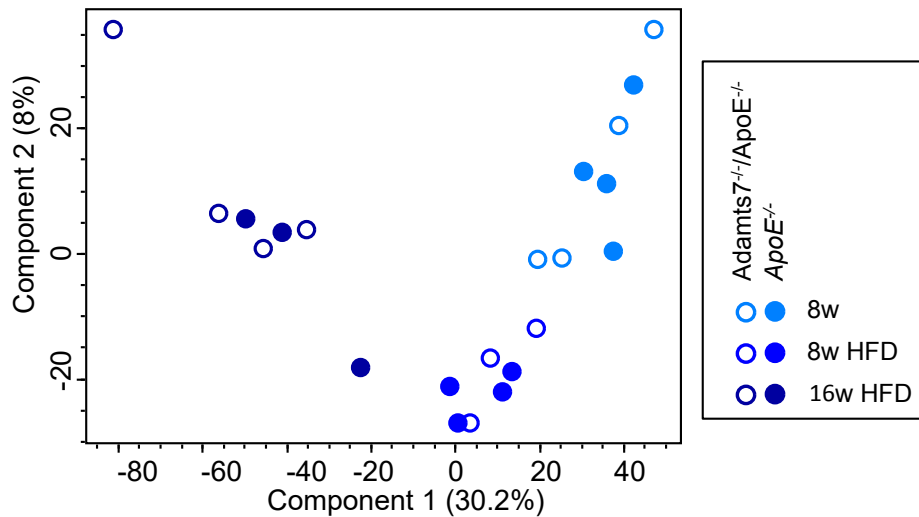


Abb. 10 Hauptkomponentenanalyse Aorten *Adamts7^{-/-}/ApoE^{-/-}* vs. *ApoE^{-/-}*

PCA der Proteinprofile von Aorten der *Adamts7^{-/-}/ApoE^{-/-}* und *ApoE^{-/-}*-Kontrollen. Zusammengefasst sind die Ergebnisse der drei Gruppen: 8 Wochen alt und Standarddiät, 8 Wochen HFD und 16 Wochen HFD. Komponente 1 und 2 entsprechen den Hauptkomponenten mit der größten Varianz der untersuchten Datensätze.

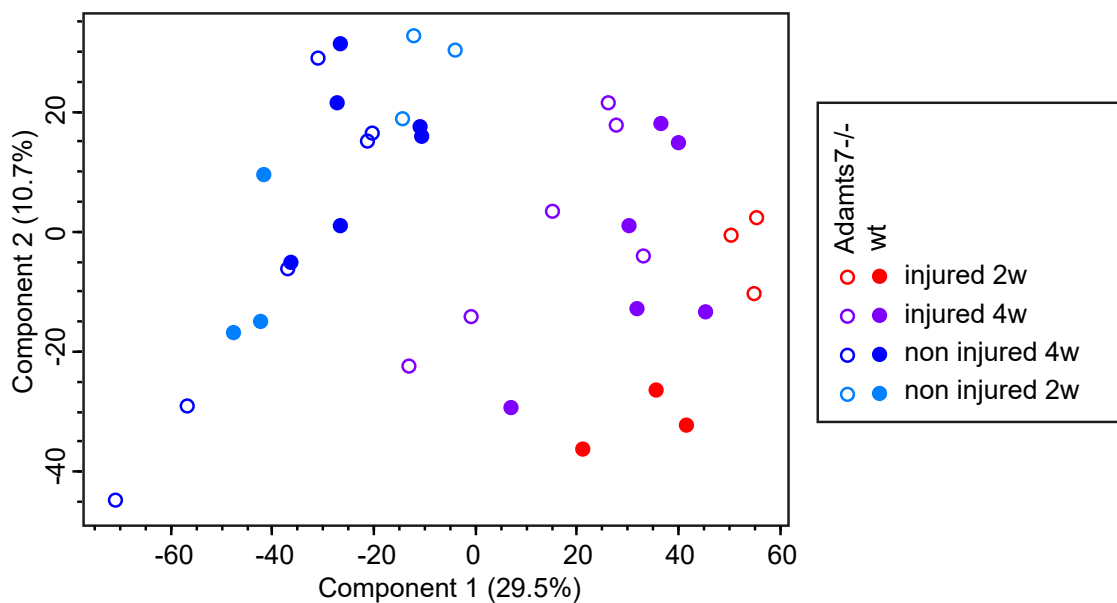


Abb. 11 Hauptkomponentenanalyse *Adamts7^{-/-}* vs. WT

Hauptkomponentenanalyse der Proteinprofile von geschädigten (injured) und nicht-geschädigten (NI) Femoralarterien von *Adamts7^{-/-}* und WT. Zusammengefasst sind die Ergebnisse nach 14 und 28 Tagen. Komponente 1 und 2 entsprechen den Hauptkomponenten mit der größten Varianz der untersuchten Datensätze.

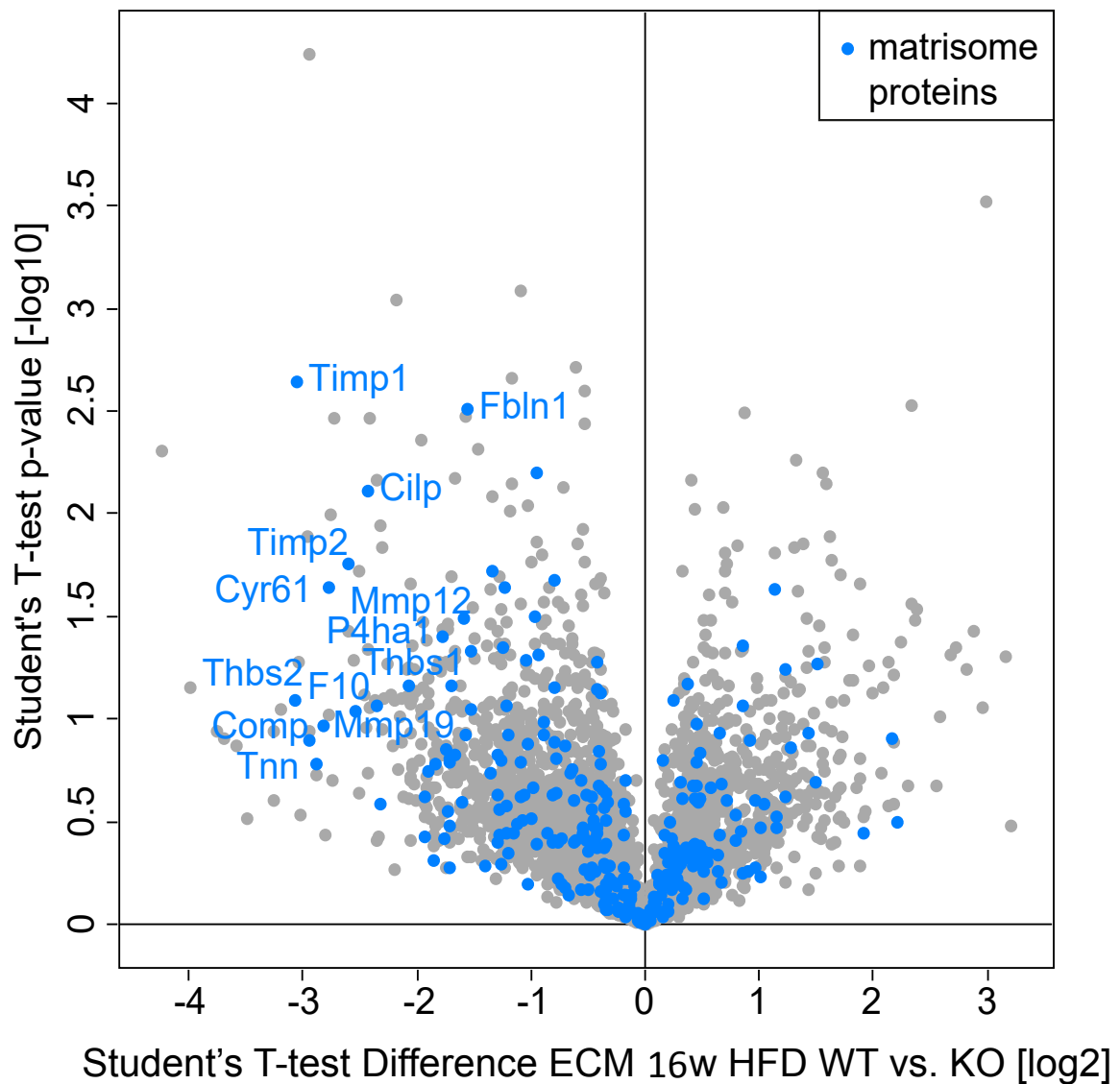


Abb. 12 potentielle Adamts7 Targets

Volcano Plot der identifizierten Proteine der Aorta von *Adamst7^{-/-}/ApoE^{-/-}* (KO) und *ApoE^{-/-}* (WT) nach 16 Wochen hochkalorischer Diät. Dargestellt ist die Verteilung der identifizierten Proteine nach fold change und p-Wert. Proteine der ECM sind blau dargestellt, wobei die annotierten Proteinennamen die am stärksten regulierten Proteine markieren.

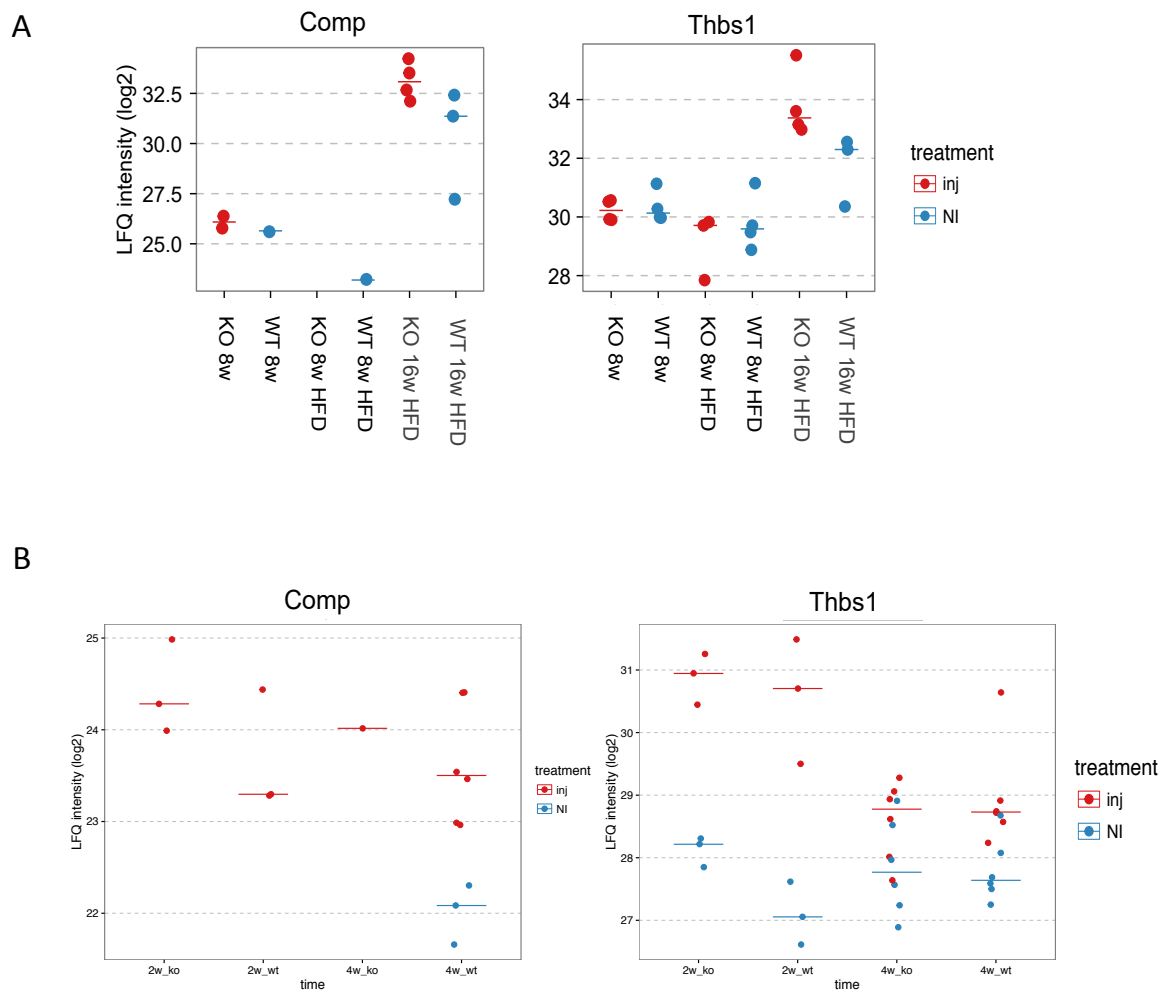


Abb. 13 relative Proteinexpressionslevel von Comp und Thbs1 14 und 28 d nach Schädigung in *Adams7*^{-/-} und WT

A Dargestellt sind individuelle Proteinexpressionslevel (MaxLFQ Werte) von Aorten nach 8- und 16-wöchiger HFD der *Adams7* Substrate Comp und Thbs1. Ein Datenpunkt gibt jeweils die individuelle Proteinexpression einer Aorta wieder (n=3-4). **B** Dargestellt sind individuelle Proteinexpressionslevel (MaxLFQ Werte) von Femoralarterien 14 und 28 Tage nach drahtvermittelter Schädigung der *Adams7* Substrate Comp und Thbs1. Ein Datenpunkt gibt jeweils die individuelle Proteinexpression einer Femoralarterie wieder (14 Tage n= 3, 28 Tage n= 6).

3. Allgemeine proteomische Veränderungen der extrazellulären Matrix nach vaskulärer Schädigung

3.1. Effekt der Femoralisverletzung auf das Gesamtproteom der Femoralarterie

Die mechanische Verletzung von Femoralarterien führt zu einer ausgeprägten Neointimabildung nach 14 und 28 Tagen (Abbildung 14). Um die Veränderungen der extrazellulären Matrix nach vaskulärer Schädigung zu untersuchen, wurden Drahtgeschädigte Femoralarterien von C57BL/6-Mäusen massenspektrometrisch analysiert. Die differentielle Proteomanalyse wurde an geschädigten Femoralarterien und an nicht-geschädigten Kontrollarterien aus denselben Tieren 14 und 28 Tage nach Verletzung der A. femoralis durchgeführt. Insgesamt konnten 5434 Proteine quantifiziert werden. Nach Festlegung der Filterkriterien, mindestens 6 gültige Werte, verringerte sich die Zahl auf 3879 Proteine. Nach statistischer Analyse mittels ANOVA ($\alpha=0,05$, FDR $<0,05$) zeigten 1205 Proteine signifikante Expressionsänderungen, wobei die Mehrzahl der Proteine nach Schädigung hochreguliert war. Eine Methode um Variationen zwischen unterschiedlichen Konditionen zu identifizieren ist die Hauptkomponentenanalyse mit der Ähnlichkeiten oder Dissimilaritäten entlang des Expressionsmusters von Proteinen detektiert werden können. In der PCA konnte eine deutliche Trennung von geschädigten Femoralarterien und Kontrollen in der PC1 gesehen werden (Abbildung 11). Demnach kommt es zu einer Veränderung des Proteinprofils von Arterien nach vaskulärer Verletzung. Auch in der Heatmap konnten zu allen Zeitpunkten deutliche Unterschiede in der Proteinexpression beobachtet werden, wobei der Hauptanteil der Proteine in den geschädigten Gefäßen hochreguliert war (Abbildung 15).

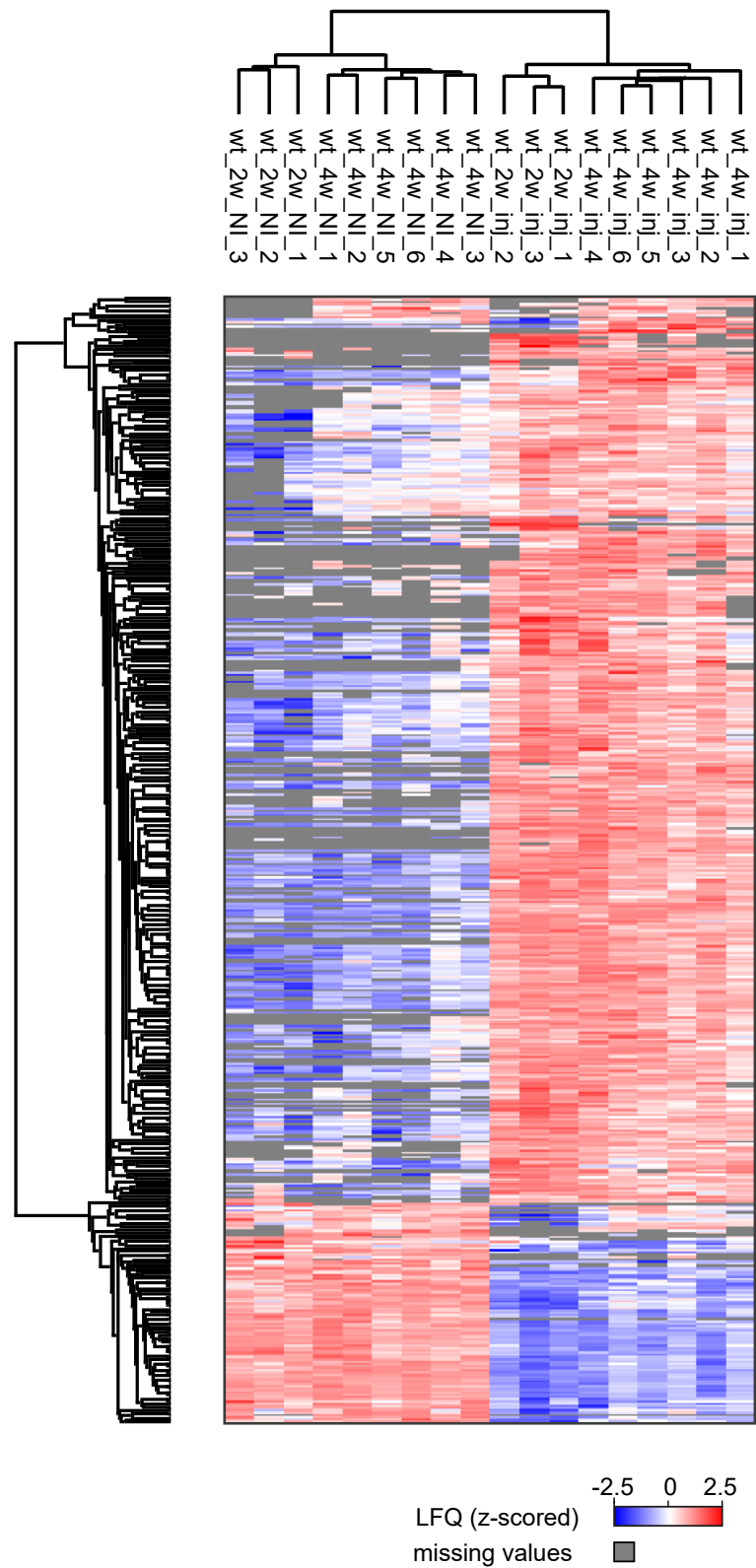


Abb. 15 Heatmap WT injured / NI

Heat map zeigt Proteine mit signifikanten Expressionsänderungen ($FDR < 0.01$, $s_0 = 1$) zwischen geschädigten und Kontroll-Femoralarterien nach ANOVA. Dargestellt sind LFQ-Werte (Proteine) nach z-score Normalisierung und hierarchischer Clusteranalyse.

3.2. Beteiligung regulierter Proteine an ECM-assoziierten Signalwegen

Zur Erstellung einer Übersicht über Protein-Protein-Interaktionen und deren Beteiligung an biologischen Vorgängen wurde eine Signalweg-Analyse durchgeführt. Die Suche inkludierte alle regulierten Proteine zu den Zeitpunkten 14 und 28 Tage nach vaskulärer Schädigung. Insgesamt konnten 439 signifikante Gen-Signalwege identifiziert werden, wobei 174 Signalwege einen p-Wert von $<10^{-4}$ hatten. Mit einem p-Wert von $4,31E-22$ war interessanterweise die „extrazelluläre Matrix Organisation“ der mit Abstand signifikanteste Signalweg. Diesem Signalweg konnten insgesamt 80 Proteine zugeordnet werden, welche vorrangig aus der Reihe der Kollagene (Col4a1, Col4a2, Col12a1, Col6a6, Col4a2, Col3a1, Colgalt1, Col5a2, Col5a3, Col14a1, Col15a1, Col2a1, Col8a1, Col6a5, Col19a1) Integrine und Metalloproteinasen kamen. Eine Übersicht über funktionelle Assoziationen von Proteinen des Signalwegs „Extrazelluläre Matrix Organisation“ wurde mit der Software STRING erstellt und ist in Abbildung 16 dargestellt. Hierbei war generell eine enge Verknüpfung vieler ECM-Proteine und vor allem eine enge Interaktion der Gruppe der Kollagene zu beobachten. Weitere hoch signifikante ECM-assoziierte Signalwege waren „Focal adhesion“ ($3,7E-10$), „Integrin cell surface interactions“ ($5E-10$), „Collagen formation“ ($7,2E-10$), „ECM-receptor interaction“ ($7,3E-10$), „Beta1 integrin cell surface interactions“ ($2,9E-9$), „Collagen biosynthesis and modifying enzymes“ ($4,4E-8$), „Non-integrin membrane-ECM interactions“ ($9,6E-8$) und „ECM proteoglycans“ ($3,3E-7$) (siehe Tabelle 4). Des Weiteren zeigten vor allem Signalwege der mRNA Prozessierung und des Splicings eine Überrepräsentation unter den Top 20 aller regulierten Signalwege (p-Wert $<E-10$): „Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA“, „Spliceosome-Homo sapiens (human)“, „mRNA Splicing-Major Pathway, mRNA Splicing“, „Translation“, „mRNA Processing“, welche auf die Wichtigkeit von posttranskriptionalen Regulationsprozessen nach Verletzungen hindeuten.

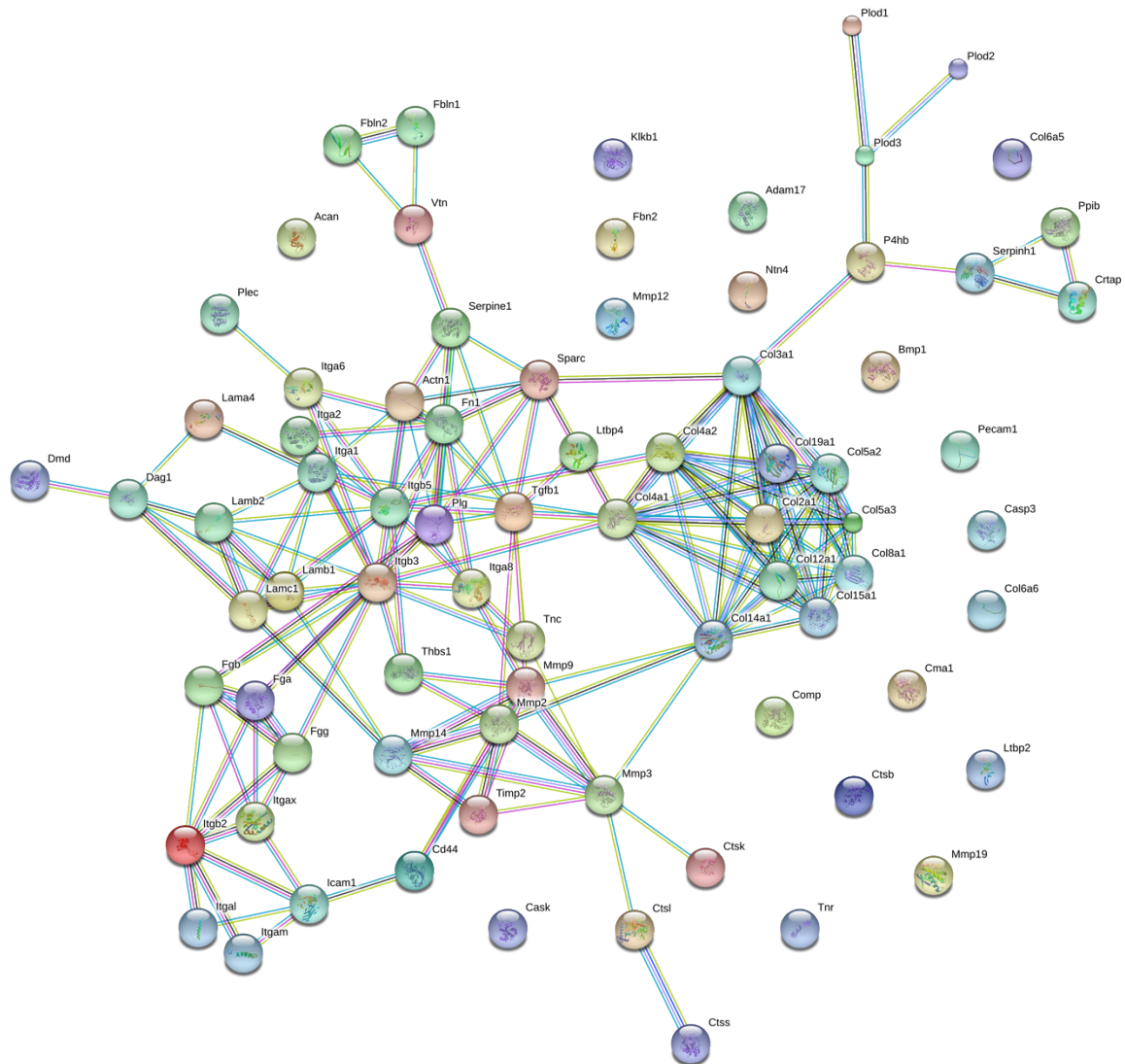


Abb. 16 Übersicht über die Assoziation von Proteinen der Extrazellulären Matrix Organisation

Erstellt mit STRING: functional protein association networks. Die farbigen Linien stehen für: Rot – Fusion von Genen, Grün – enge Gennachbarschaft, Blau - Konkurrenz, Lila – bestätigt durch Experimente, Gelb – Text Mining, Hellblau - Datenbank, Schwarz - Koexpression. Femoralarterien 14 und 28 Tage nach Schädigung

Tab. 4 Top 8 der regulierten ECM Signalwege nach vaskulärer Schädigung

p-Wert	Signalweg	Quelle	Proteine
4.3171008844E-22	Extracellular matrix organization	Reactome	MMP14; TGFB1; COL4A2; COLGALT1; DMD; TNC; MMP12; ITGA1; ITGA8; MMP19; ITGA6; ITGA2; ITGB3; CTSL; ITGB2; FGA; ADAM17; LAMB1; FBLN2; FBLN1; LAMB2; COL2A1; SERPINE1; TIMP2; ACAN; PECAM1; LAMC1; PLOD2; PLOD3; PLOD1; CASK; THBS1; SPARC; ICAM1; CD44; COL3A1; NTN4; FGG; P4HB; FGB; COL8A1; LTBP4; ITGB5; LTBP2; KLKB1; TNR; LAMA4; COMP; CTSB; FBN2; COL19A1; VTN; COL5A2; COL5A3; CMA1; PLEC; DAG1; COL4A1; CTSS; CASP3; ITGAX; COL15A1; ACTN1; FN1; BMP1; COL6A5; CTSK; COL14A1; ITGA2B; MMP3; PLG; ITGAL; ITGAM; MMP9; SERPINH1; CRTAP; MMP2; PPIB; COL12A1; COL6A6
3.70356697716E-10	Focal adhesion - Homo sapiens (human)	KEGG	ITGA8; TNC; ITGA1; ITGA2; ITGA6; ROCK1; MYLPP; COL3A1; LAMB1; RAC2; LAMB2; COL2A1; ZYX; MYL9; ITGA2B; THBS2; THBS1; MAPK1; PPP1R12A; PPP1R12B; PPP1R12C; PARVA; ITGB3; ITGB5; TNR; LAMA4; COMP; PRKCB; VCL; VTN; COL5A2; COL5A3; COL4A2; COL4A1; LAMC1; ACTN3; ACTN1; PPP1CC; FN1; ACTN4; VAV1; PPP1CA; MYLK; PIP5K1C; CDC42; FLNA; FLNB; FLNC; COL6A5; COL6A6
5.00123755866E-10	Integrin cell surface interactions	Reactome	ITGA8; COL4A1; ITGA1; ITGA2; ITGA6; PECAM1; ITGA2B; THBS1; ICAM1; COMP; FGG; FGA; FGB; ITGB3; ITGB2; ITGB5; CD44; VTN; COL4A2; TNC; ITGAX; FN1; ITGAL; ITGAM; DAG1

					MMP9; SERPINH1; CRTAP; COL6A5; MMP3; COL12A1; COL6A6
7.26173130838E-10	ECM-receptor interaction - Homo sapiens (human)	KEGG			ITGA8; COL4A2; TNC; ITGA1; ITGA2; ITGA6; COL3A1; LAMB1; LAMA4; LAMB2; COL2A1; ITGA2B; THBS2; THBS1; CD44; ITGB3; ITGB5; TNFR; COMP; CD36; VTN; COL5A2; COL5A3; DAG1; COL4A1; LAMC1; FN1; COL6A5; COL6A6
2.92198147945E-9	Beta1 integrin cell surface interactions	PID			ITGA8; TGM2; COL4A1; ITGA1; ITGA2; ITGA6; F13A1; LAMB1; COL3A1; LAMB2; COL2A1; THBS2; THBS1; FGG; FGA; FGB; LAMA4; VTN; COL5A2; TNC; LAMC1; FN1; CD14; TGFB1
9.61298479705E-8	Non-integrin membrane-ECM interaction	Reactome			TGFB1; ACTN1; LAMC1; DMD; VTN; ITGA2; ITGB5; NTN4; ITGB3; CASK; THBS1; ITGA6; DAG1; TNC; LAMB1; LAMA4; LAMB2
3.32093136131E-7	ECM proteoglycans	Reactome			ITGAX; TGFB1; ITGB3; LAMC1; LAMA4; TNFR; ITGA2B; ITGA8; VTN; SPARC; ITGA2; DAG1; TNC; ACAN; LAMB1; ITGB5; LAMB2; SERPINE1; COMP

Großbuchstaben der Proteinsymbole repräsentieren humane Orthologie.

3.3. Akkumulation von Makrophagen nach vaskulärer Schädigung

Nach vaskulären Verletzungen kommt es, getriggert durch Adhäsionsmoleküle und Zytokine, zu einem massiven Einstrom von Leukozyten in das geschädigte Gewebe (Lusis, 2000). Angesichts der wichtigen Bedeutung von Makrophagen während der Atherogenese, wurde die differentielle Expression gut charakterisierter Makrophagenmarker aus der Literatur untersucht (Gautier et al., 2012; Jojic et al., 2013). Interessanterweise war eine Überexpression von Makrophagenmarkern in den Femoralarterien 14 und 28 Tage nach vaskulärer Schädigung zu beobachten. Wie in Abbildung 17A im Volcano-Plot dargestellt, waren in der Expressionsanalyse spezifische Makrophagenmarker in Arterien mit Neointimabildung signifikant überrepräsentiert. Um die Beobachtung aus der Proteomanalyse zu validieren und die Leukozytenpopulation nach vaskulärer Schädigung in der Gefäßwand zu charakterisieren, wurden 14 Tage nach Durchführung des Femoralisverletzungsmodells geschädigte und nicht-geschädigte Arterien mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Wie zu erwarten waren in den gesunden Kontroll-Femoralarterien keine Leukozyten vorzufinden. In den geschädigten Femoralarterien kam es zu einer Akkumulation von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten (Abbildung 17B). Mehr als die Hälfte (58 %) der vorgefundenen Zellen waren CD11b positiv und konnten somit als myeloische Zellen identifiziert werden. F4/80 und Ly6c^{high}, mit deren Hilfe Makrophagen und Monozyten unterschieden werden können, waren deutlich erhöht und machten circa 28 % der gesamten vorgefundenen Zellen aus.

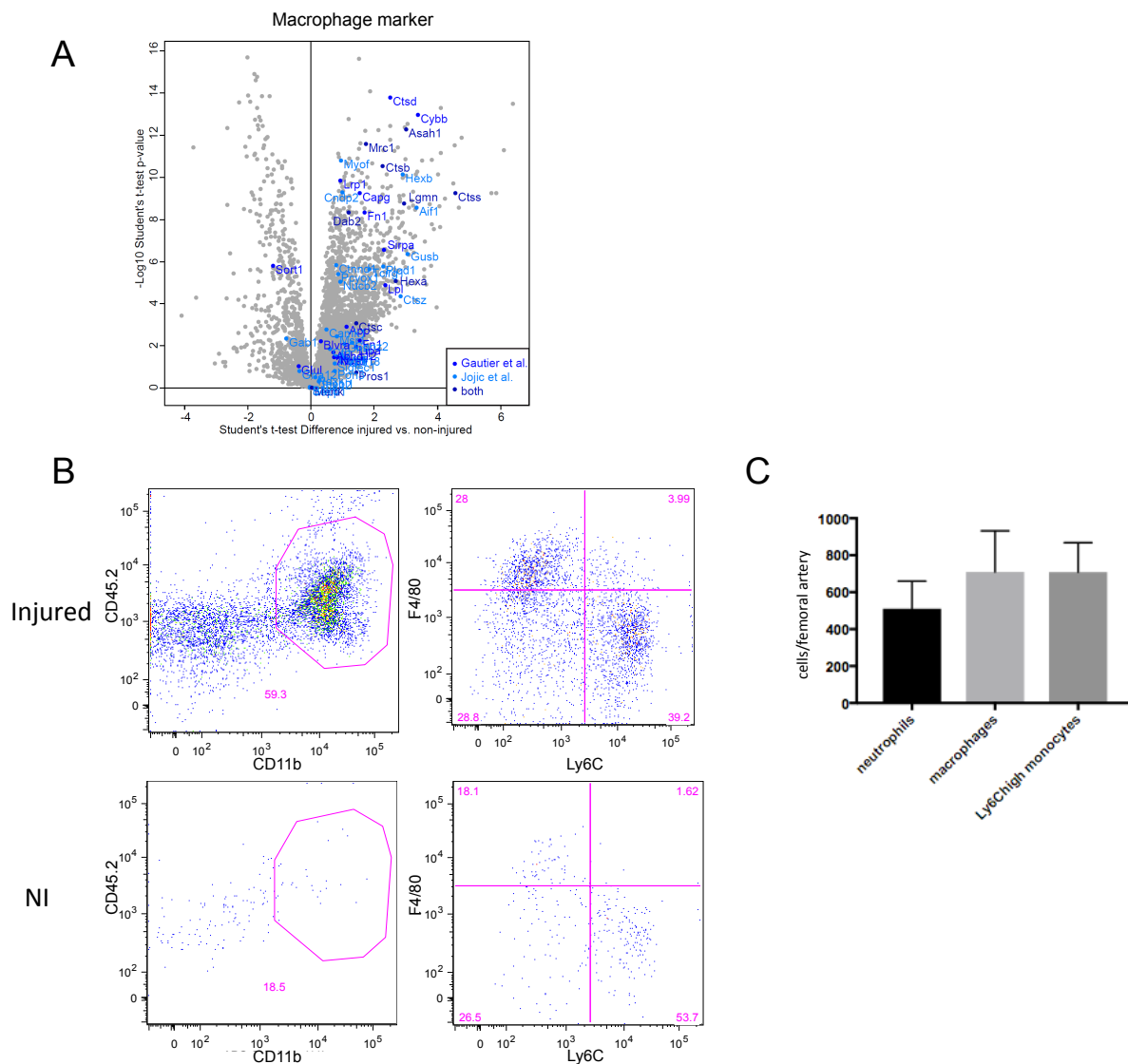


Abb. 17 Akkumulation von Makrophagen in der Neointima

A Im Volcano Plot sind Makrophagen spezifische Marker in geschädigten Femoralarterien deutlich überrepräsentiert. **B** Gating und Quantifizierung von myeloiden Zellen durch die Marker CD45.2 und Cd11b, von Makrophagen (F4/80) und Monozyten (Ly6C^{high}) in Femoralarterien 14 Tage nach vaskulärer Schädigung und in Kontrollen (NI), n= 6 **C** Gesamtzellzahlen der vorgefundenen Zellen in geschädigten Femoralarterien.

3.4. Effekt der Femoralisverletzung auf das Proteom der vaskulären extrazellulären Matrix

3.4.1. Veränderungen der ECM

In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus besonders auf Veränderungen der extrazellulären Matrix, weshalb vor allem die Expressionsprofile regulierter Proteine der Basalmembran, von Strukturproteinen und Matrix-assoziierten Proteinen genauer untersucht wurden. In Abbildung 18 sind die log₂ transformierten LFQ-Intensitäten von geschädigten und nicht-geschädigten Femoralarterien dargestellt. Jeder Punkt steht für eine analysierte Arterie (n=9), wobei blau als Farbe für die nicht-geschädigten (NI) und rot für die geschädigten (I) gewählt wurde. Kollagene sind wichtige Strukturproteine der extrazellulären Matrix (Theocharis et al., 2016). Nach vaskulärer Schädigung kommt es auf der einen Seite durch Degradationsprozesse zu einem Abbau von Kollagenen auf der anderen Seite ist auch eine Akkumulation einzelner Kollagene zu beobachten. Kollagen I und IV waren nach vaskulärer Schädigung in der Proteomanalyse herunterreguliert, wohingegen die Kollagene Col6a5 (p= 1,8E-5), Col12a1 (p= 1,2E-5), Col14a1 (p=3,8E-11), Col15a1 (P=0,00084) eine signifikante Hochregulation zeigten. Weitere Veränderungen der Expressionsprofile waren bei Proteinen der Basalmembran zu beobachten. Die Familie der Laminine ist Bestandteil der Basalmembran und besteht aus 16 bekannten Isoformen, die sich aus jeweils einer α -, β - und einer γ -Kette zusammensetzen (Pozzi et al., 2016). Die Laminin-Untereinheiten Lamc1 (p= 9,8E-7), Lamb2 (p=0,00039), Lama4 (p= 6,8E-6) zeigten eine niedrigere Expression als in nicht-geschädigten Arterien wohingegen Lamb1 (p= 1E-8) eine erhöhte Expression zeigte. Außerdem waren die Basalmembranproteine Fibronectin 1 (p= 7,5E-6), Tenascin-C (p= 1,9E-7), Transformin growth Factor Beta induced (p= 6,9E-6) und Aggrecan (p= 0,12) in geschädigten Femoralarterien hochreguliert. Interessant war die Beobachtung, dass einzelne Proteine, wie Kollagene der Gruppe VI (Col6a6 und Col6a2), zeitspezifische Expressionsprofile nach vaskulärer Schädigung zeigten. Zum Beispiel war das Expressionsmuster von Col6a6 14 Tage nach Durchführung der Femoralisverletzung im Vergleich zu Kontrollarterien unverändert. Erst 28 Tage nach Draht-vermittelter Verletzung war eine Hochregulation der Expression zu beobachten. Umgekehrt war bei Col6a2 eine signifikante Herabregulierung an Tag 14 zu sehen, wohingegen an Tag 28 die Expression in geschädigten und nicht-

geschädigten Arterien gleich hoch war. Weitere Proteine, die zu den zwei Zeitpunkten unterschiedlich reguliert waren: waren Thrombospondin1 (Thb1), Laminin, alpha 5 (Lama5), Osteoglycin (Ogn) und Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase2 (Plod2).

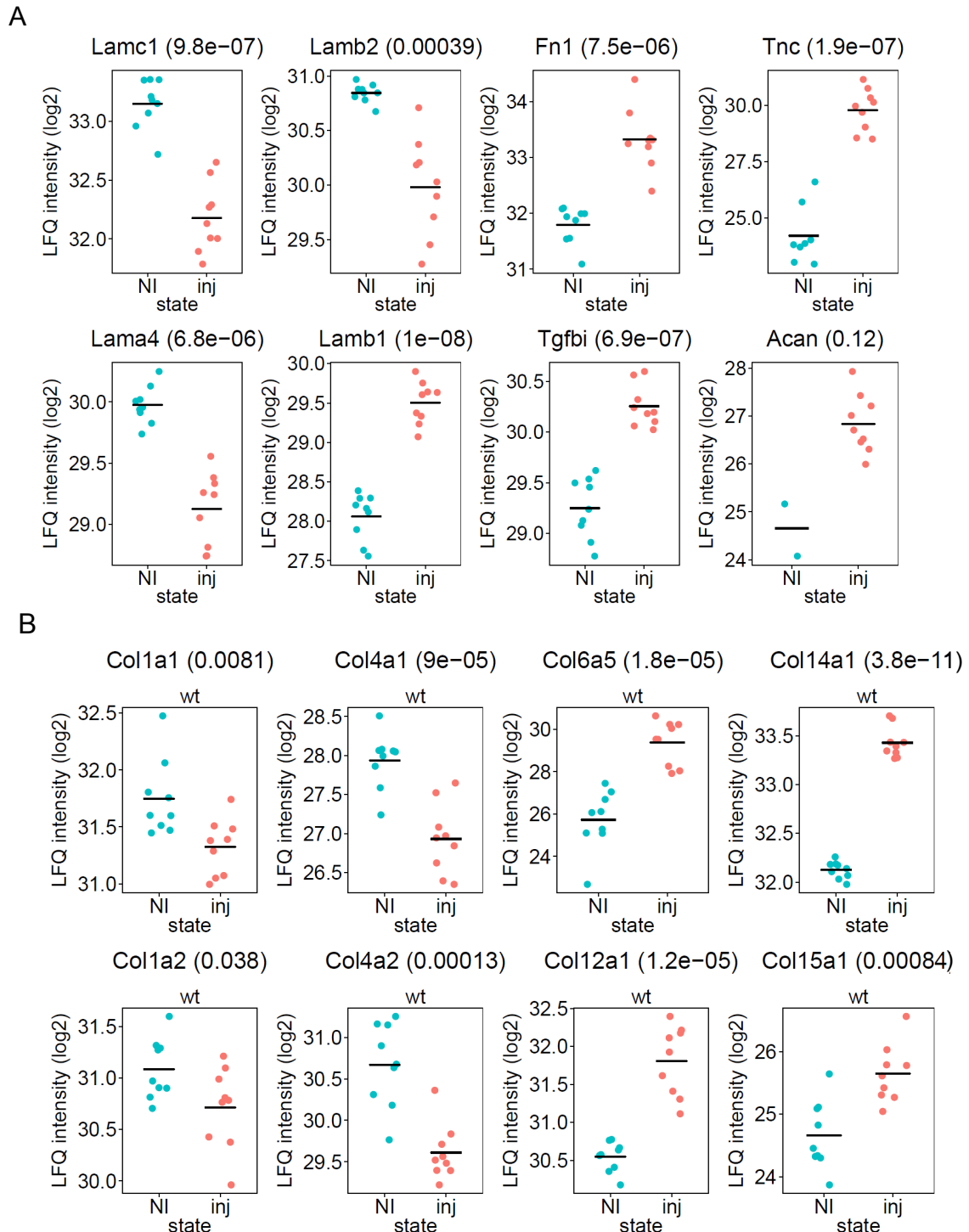


Abb. 18 Übersicht über ausgewählte regulierte Proteine nach vaskulärer Schädigung

Differenziell regulierte ECM-Proteine der **A** Basalmembran und **B** Strukturproteine in geschädigten Femoralarterien und nicht-geschädigten Kontrollen (MaxLFQ Werte, log₂, ungepaarter t-Test).

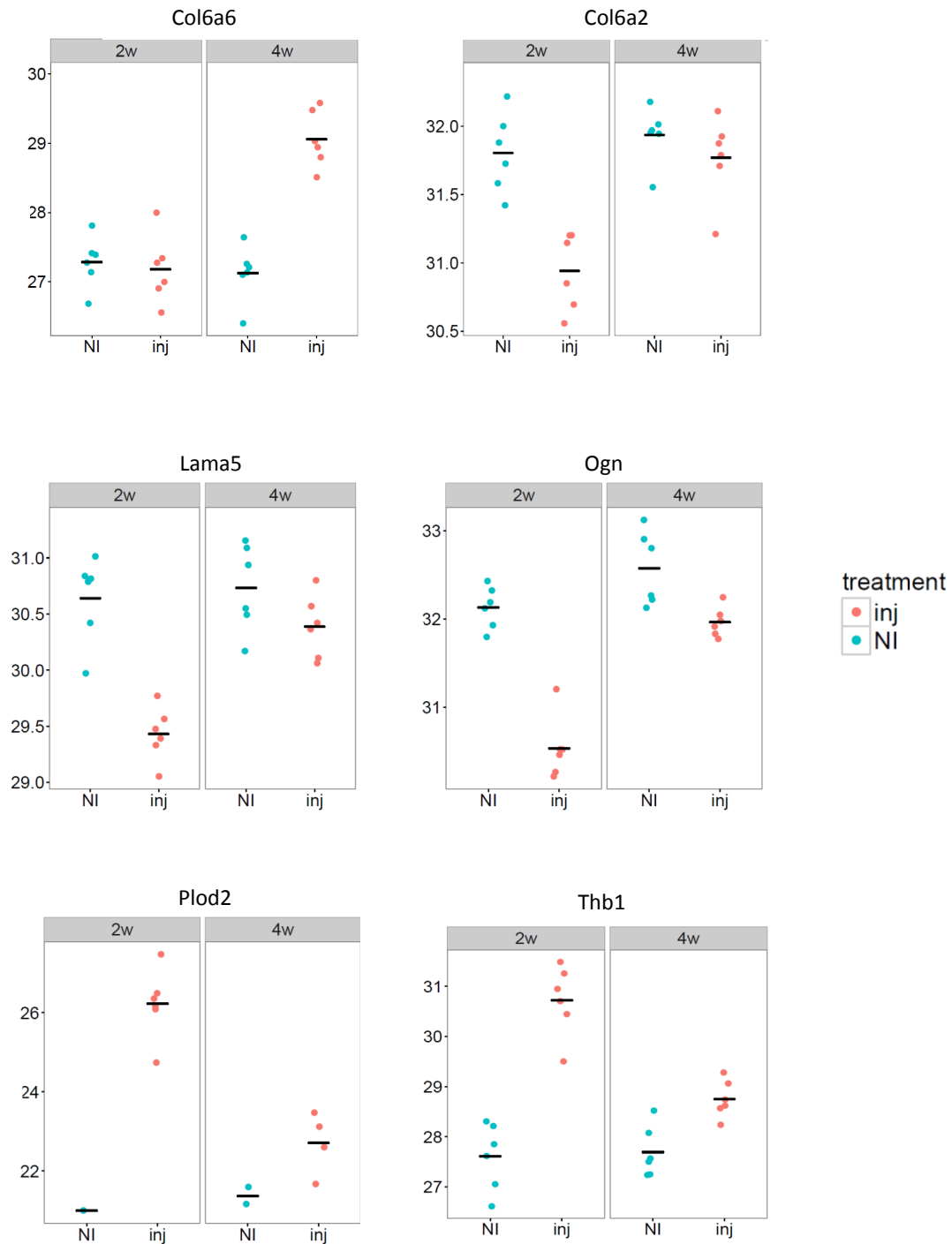


Abb. 19 zeitspezifische Expressionsänderungen von ECM Proteinen

Dargestellt sind individuelle Expressionslevel (MaxLFQ Werte, log₂) von Proteinen aus geschädigten und nicht-geschädigten Femoralarterien zu den Zeitpunkten 14 und 28 Tage (n=6). Zu erkennen ist eine Veränderung der Expressionslevel in den geschädigten Femoralarterien zu den zwei untersuchten Zeitpunkten. Die roten Datenpunkte geben die individuellen Proteinlevel der geschädigten Femoralarterien und die blauen der nicht-geschädigten Kontrollarterien wieder.

3.4.2. Validierung mittels Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz sollten einzelne regulierte ECM-Proteine der Proteomanalyse validiert werden. Da die Proteomanalyse eine sehr hohe Zahl an ECM-Proteinen identifizieren konnte und nicht alle mittels Immunfluoreszenz ausgewertet werden konnten, konzentrierte sich die Validierung vor allem auf Proteine des Signalweges der ECM-Organisation. Die Auswertung umfasste Fibronectin, welches in der Proteomanalyse in geschädigten Arterien überexprimiert war. Fibronectin ist ein Glykoprotein und vor allem in der Basalmembran von Arterien vorzufinden (Theocharis et al., 2016). Für Fibronectin konnte eine deutliche Immunfluoreszenz in geschädigten Femoralarterien nachgewiesen werden. Die Immunfluoreszenz war insbesondere in der Neointima und Adventitia zu beobachten. In den nicht-geschädigten Arterien war in der Intima keine und in der Adventitia eine geringe Immunfluoreszenz zu beobachten. Des Weiteren wurde MMP2 validiert. MMP2, eine Matrixmetalloproteinase, zeigte in der Immunfluoreszenz 14 Tage nach vaskulärer Schädigung eine deutliche Akkumulation in der Media. In Kontrollgefäßen konnte nur eine sehr schwache Fluoreszenz von MMP2 beobachtet werden.

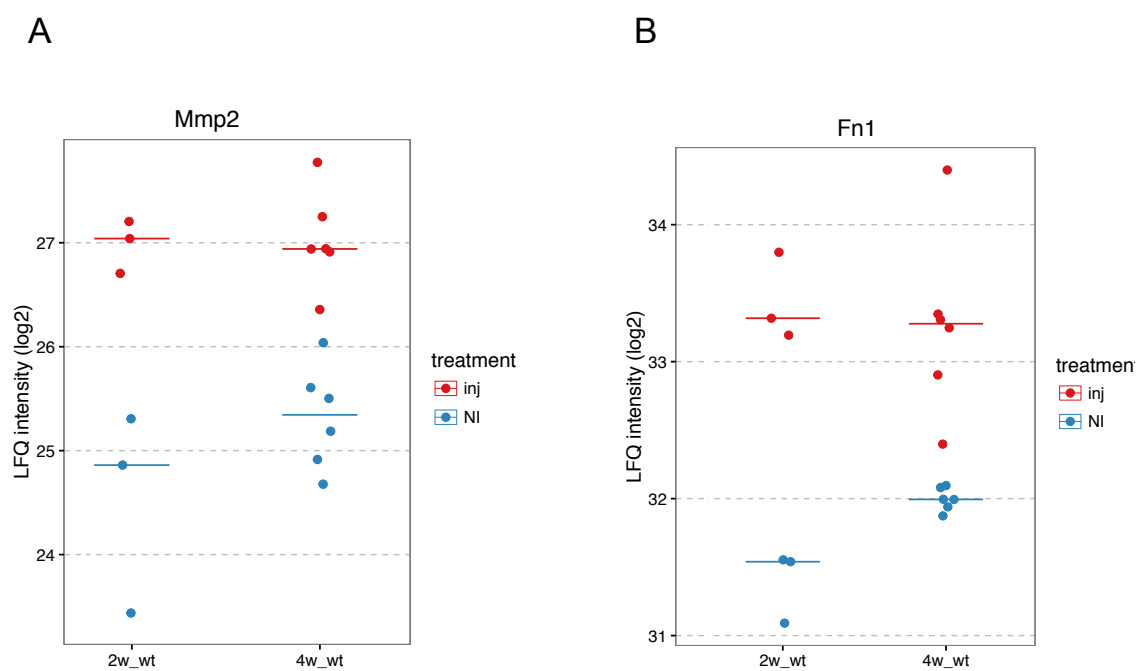


Abb. 20 Mmp2 und Fn1 Expression in Femoralrterien

A und **B** individuelle Expressionslevel (MaxLFQ Werte, log 2) von Mmp2 und Fn1 zu den Zeitpunkten 14 und 28 d nach Schädigung. Die roten Datenpunkte geben die individuellen Proteinlevel der geschädigten Femoralarterien und die blauen der nicht-geschädigten Kontrollarterien wieder.

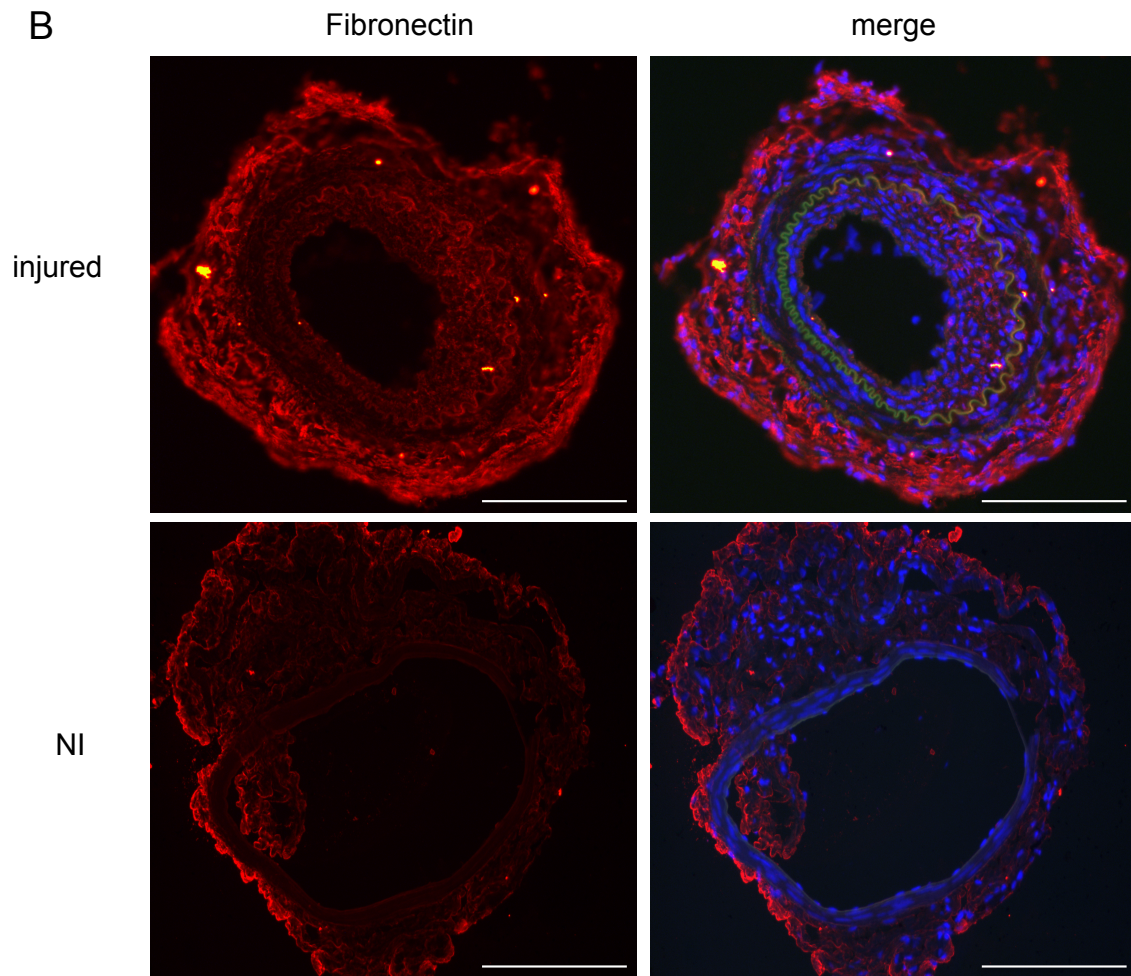


Abb. 21 Validierung von Fibronectin mittels Immunfluoreszenz 28d nach Schädigung

Fibronectin (rot) ist vor allem in der Neointima und Adventitia hochreguliert. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt und die autofluoreszierende Lamina elastica externa und interna sind in grün abgebildet (20x Vergrößerung, Maßstab = 100 μ m).

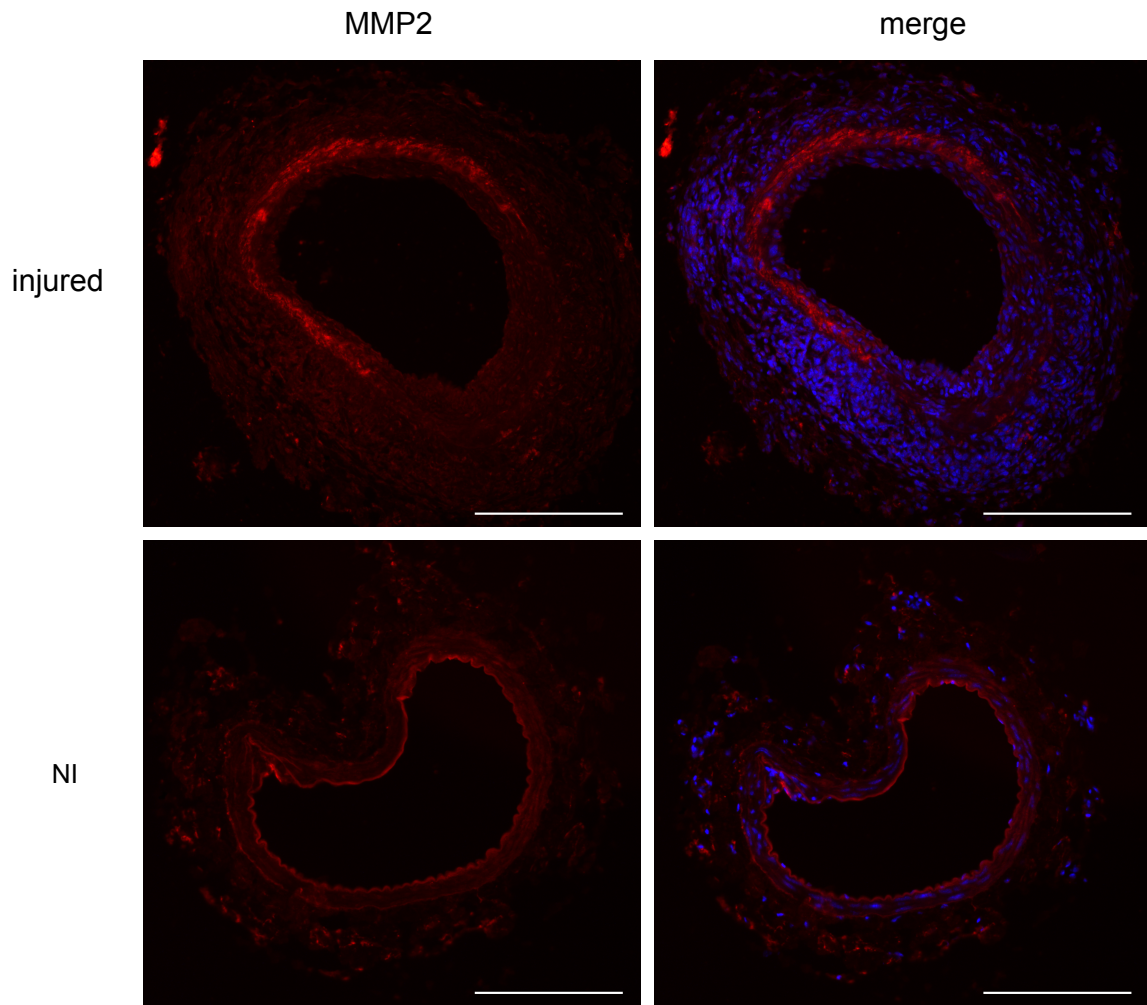


Abb. 22 Validierung von MMP2 mittels Immunfluoreszenz 14d nach Schädigung

MMP 2 (rot) akkumuliert in der Media 14 d nach Schädigung. Immunfluoreszenzfärbung mit primärem anti-MMP2 Antikörper (1:300) und Sekundärantikörper (AlexaFluor495, 1:500). Die Zellkerne sind mit DAPI angefärbt und in blau dargestellt (20x Vergrößerung, Maßstab= 100µm).

3.4.3. Hochregulation nicht-tryptischer Peptide

Die extrazelluläre Matrix unterliegt ständigen Umbauprozessen, die hauptsächlich durch degradierende Proteasen reguliert werden. Um wichtige Proteasen, die *in vivo* nach vaskulärer Schädigung aktiv sind, zu identifizieren, wurde eine semi-tryptische Peptidsuche durchgeführt. Über die Anreicherung spezifischer Aminosäuren nahe der Schnittstellen von nicht-tryptischen Peptiden, kann auf die degradierende Protease geschlossen werden. Wie in Abbildung 23A schematisch aufgeführt, konnten insgesamt 38938 tryptische Peptide gefunden werden. Nach Ausschluss tryptischer und semi-tryptischer Peptide, die den N- oder C-Terminus eines Proteins enthielten, verblieben noch 5611 N-terminale und 1420 C-terminale nicht-tryptische Peptide. Durch die Zuordnung der Peptide zu Proteinen konnten 2887 Proteine mit tryptischen Peptiden und 1329 mit semi-tryptischen Peptiden gefunden werden (Abbildung 23B). Mittels Fisher-Test wurde geprüft, welche Signalwege besonders viele nicht-tryptische Proteine enthielten. Interessant war, dass vor allem in der extrazellulären Matrix zugehörigen Gruppen die Anzahl der nicht-tryptischen Peptide erhöht war, was vermuten lässt, dass dort die meisten Degradationsprozesse während der Atherogenese stattfinden.

Die Analyse hochregulierter, N-terminaler, nicht-tryptischer Peptide ergab, dass an Position P-1 der Schnittstellen vermehrt Cystein und Asparagin vorkamen. Eine Suche nach signifikant regulierten Proteasen mit diesen spezifischen Spaltmotiven in den Daten der Proteomanalyse deutete auf Legumain hin. Legumain war die einzige gefundene regulierte Protease, die spezifisch nach Asparagin schneidet (Ishii, 1993). In der LC-MS/MS-Analyse war Legumain in Femoralarterien an Tag 14 und 28 nach vaskulärer Schädigung hochreguliert. Um die in der Proteomanalyse sichtbare hohe Abundanz von Legumain zu validieren, wurden Western Blots durchgeführt. Zur Messung der Expressionslevel wurde ein gegen murines Legumain gerichteter polyklonaler Antikörper verwendet. Die Legumainexpression war nach 14 Tagen in geschädigten Femoralarterien signifikant erhöht ($p < 0,0039$) (Abbildung 24 C, D).

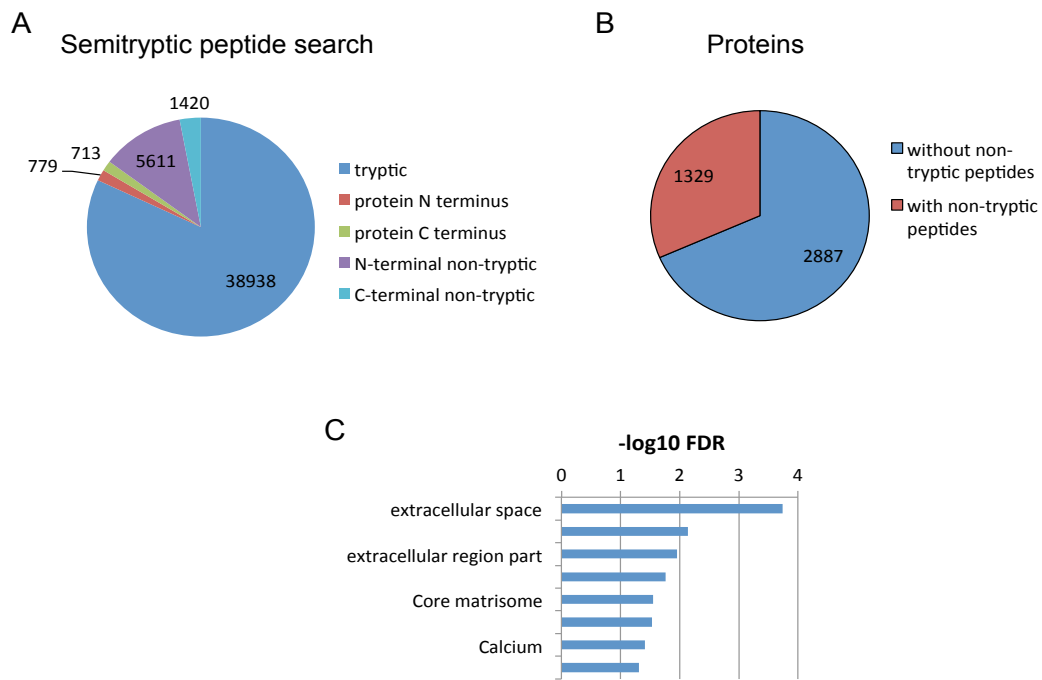


Abb. 23 Analyse nicht-tryptischer Peptide

A Übersicht über die identifizierten tryptischen und semitryptischen Peptide in der Massenspektrometrie. B Zuordnung der identifizierten Peptide zu Proteinen C Vor allem Proteine der ECM enthalten Proteine mit nicht-tryptischen Peptiden. Fisher-Test, Proteine mit nicht-tryptischen Peptiden vs. alle Proteine.

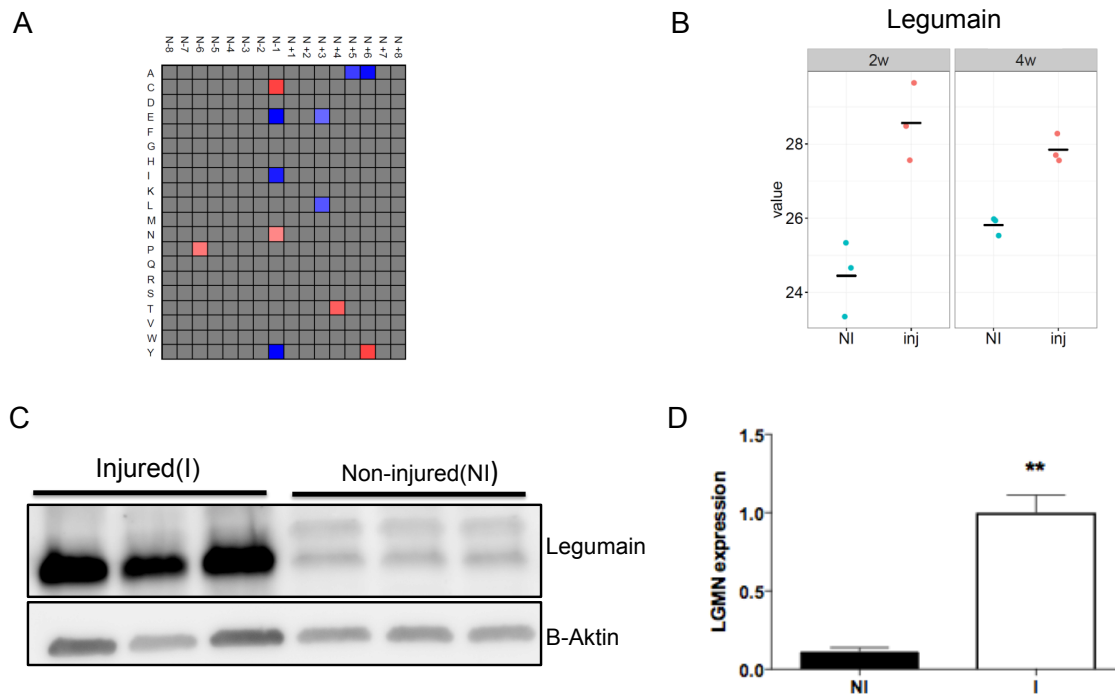


Abb. 24 Hochregulation von Legumain während des vaskulären Remodelings

A Schnittstellen hochregulierter, n-terminaler nicht-tryptischer Peptide enthalten an P-1 vermehrt Cystein und Asparagin **B** Die Legumain Expression ist nach massenspektrometrischer Analyse und auch im Western Blot **C, D** in geschädigten Femoralarterien hochreguliert, ** $p < 0,01$, \pm SEM, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

Frühere Studien konnten Legumain in atherosklerotischen Plaques identifizieren und eine durch Legumain induzierte Migration von Monozyten und HUVECs zeigen (Clerin et al., 2008). Ob Legumain auch einen Einfluss auf die Migration von Endothelzellen (HCAECs) hat, sollte mittels Migrationsassays untersucht werden. Es wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Die Migration von HCAEC wurde einerseits nach Knockdown von LGMN mittels siRNA, andererseits nach Inkubation mit dem Überstand von Legumain überexprimierenden HEK293 Zellen untersucht. Die Knockdowneffizienz wurde mittels qPCR überprüft und die Überexpression von Legumain im Überstand mit Hilfe von Western Blot Analysen verifiziert. Als Negativkontrollen dienten eine scrambled siRNA und die Überexpression eines leeren Puc 19 Vektors im Überstand von HEK-Zellen. Die Migration wurde 16 h nach Überexpression bzw. 24 h nach Knockdown beurteilt. Es konnte kein Unterschied in der Migration von HCAEC durch den Knockdown bzw. die Überexpression von Legumain beobachtet werden.

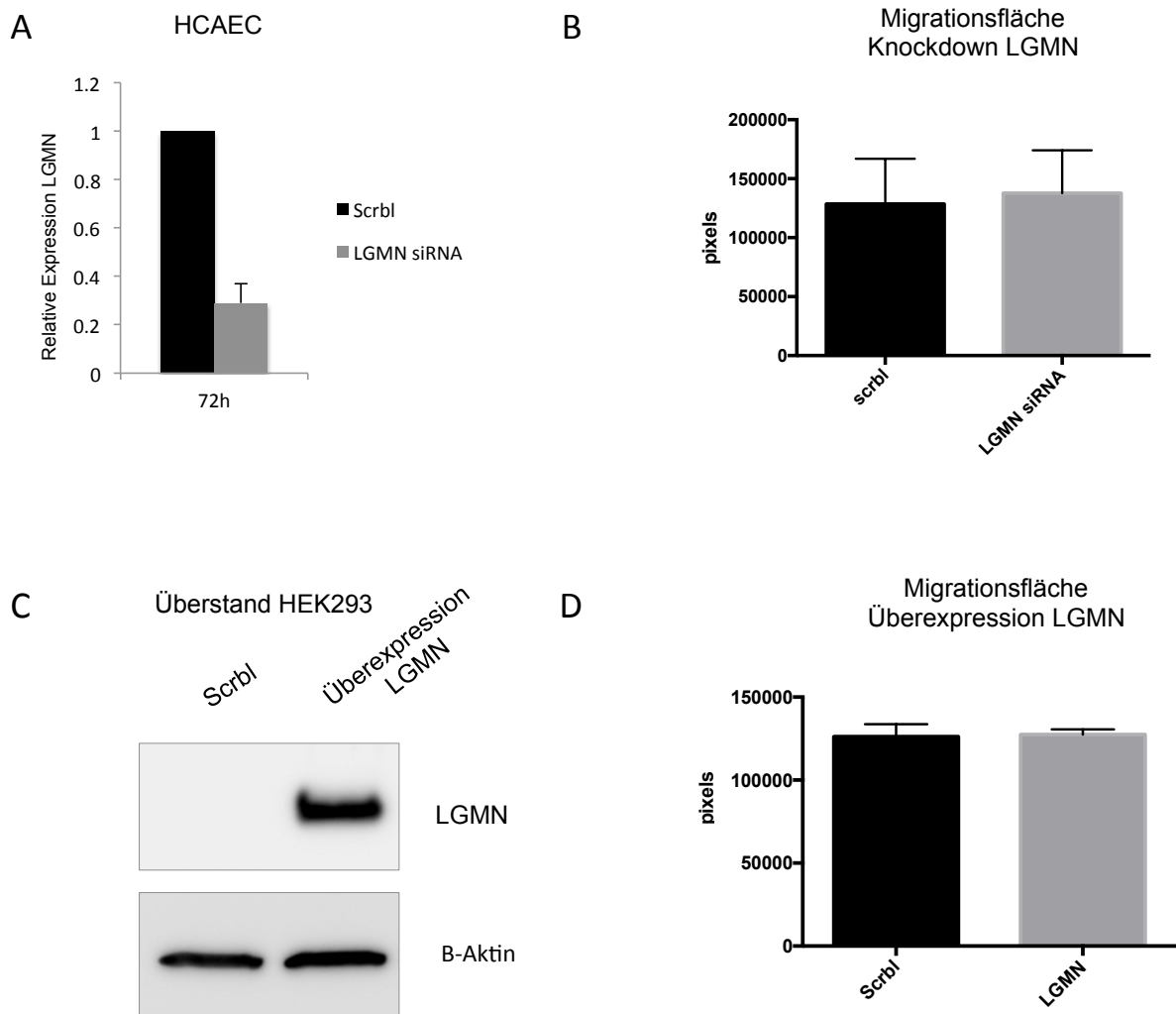


Abb. 25 Knockdown und Überexpression von LGMN haben keinen Einfluss auf die Migration von HCAEC

A HCAECs wurden mit LGMN siRNA oder einer scrambled siRNA als Negativkontrolle transfiziert. Die Knockdown Effizienz wurde mittels qPCR ermittelt. **C** Western Blot: Überexpression von LGMN im Überstand von HEK293 Zellen. Als Negativkontrolle wurden HEK293 Zellen mit einem leeren Puc19 Vektor transfiziert. Scratch wound assay **B** Migration von HCAEC nach LGMN Knockdown mit siRNA **D** Migration von HCAEC nach Inkubation mit überexprimiertem LGMN. Die Migration der HCAEC ist angegeben als Anzahl der Pixel der wiederbesiedelten Wundfläche (mind. 3 unabhängige Versuche, jeweils Triplikate, \pm SEM).

V. DISKUSSION

1.1. Rolle von *ADAMTS7* in der Pathogenese der Atherosklerose

Die koronare Herzkrankheit ist eine komplexe Erkrankung, die durch modifizierbare, klassische Risikofaktoren und genetische Prädisposition beeinflusst wird. Ein, durch mehrere unabhängige, genomweite Assoziationsstudien identifizierter, Risikolokus für die koronare Herzkrankheit (KHK) ist *ADAMTS7* (Cardiogramplusc4d Consortium et al., 2013; Coronary Artery Disease Genetics Consortium, 2011; Reilly et al., 2011; Schunkert et al., 2011). Das *ADAMTS7*-Gen kodiert für die gleichnamige extrazelluläre Metallomatrixprotease, die zur ADAMTS-Familie gehört. Diese Familie spielt, durch ihre Interaktion mit Adhäsionsliganden, Wachstumsfaktoren und ECM-Proteinen während des ECM-Remodelings eine entscheidende Rolle in der Phänotypregulation (Apte, 2009). Bisher konnte der genaue Mechanismus, durch den *ADAMTS7* an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt ist, nicht vollständig geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte in einem Femoralisverletzungsmodell der Effekt einer *Adamts7*-Defizienz auf die Neointimabildung untersucht werden. Hierzu wurden Femoralarterien von *Adamts7^{-/-}*-Mäusen und Wildtypen mittels Drahteinlage denudiert und eine Neointimabildung provoziert. Es konnte gezeigt werden, dass eine *Adamts7*-Defizienz einen positiven Effekt auf die Neointimabildung hat. An Tag 28 nach Schädigung zeigten *Adamts7^{-/-}* signifikant weniger Neointima und ein geringeres Neointima/Media-Verhältnis. Dies steht in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien, in denen *Adamts7^{-/-}* nach Draht-vermittelter Femoralisschädigung und auch im Carotis-Ligations-Modell eine reduzierte Neointimabildung verglichen mit Wildtypen zeigten (Bauer et al., 2015; Kessler et al., 2015). Erstmals konnte dieser Effekt von *Adamts7* auf Gefäße in einem Rattenmodell in Ballon-dilatierten Carotidararterien gezeigt werden (Wang et al., 2009). Die adenovirale Überexpression von *Adamts7* führte zu einer vermehrten Neointimabildung. Gegenteilig konnte gezeigt werden, dass nach *Adamts7* Knockdown durch siRNA die Neointima deutlich verringert war. Vermutet wird, dass *Adamts7*, als Antwort auf die inflammatorische Reaktion nach vaskulärer Schädigung, über einen COMP-vermittelten Mechanismus an der Phänotyp-Änderung von vaskulären SMCs beteiligt ist und deren Migration vorantreibt (Wang

et al., 2009). Nicht nur in murinen Tiermodellen, sondern auch in humanen atherosklerotischen Läsionen konnte eine vermehrte *ADAMTS7*-Expression beobachtet und mit migrierenden vSMC kolokalisiert werden (Bauer et al., 2015). Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit zusätzlich der Einfluss von *Adamts7* auf die Ausbildung atherosklerotischer Plaques überprüft werden. Dazu wurden, nach Fütterung einer High-Fat-Diät für 8 bzw. 16 Wochen, Plaques in Aorten von *Adamts7^{-/-}/ApoE^{-/-}* und *ApoE^{-/-}* ausgewertet. Nach morphometrischer Analyse war kein Unterschied in der Plaquegröße zwischen beiden Gruppen und Zeitpunkten zu erkennen. In einer Studie von Bauer et al. in der *Adamts7^{-/-}* auf einem *ApoE^{-/-}*-Hintergrund für 10 Wochen eine HFD gefüttert wurde, konnte gezeigt werden, dass eine *Adamts7*-Defizienz zu einer reduzierten Ausbildung atherosklerotischer Plaques in der Aortenwurzel führt (Bauer et al., 2015). Eine mögliche Erklärung dafür, dass in der vorliegenden Arbeit dieser Effekt durch die *Adamts7*-Defizienz nicht reproduziert werden konnte, könnte die geringe Gruppengröße sein. Zudem wurden männliche Tiere untersucht, die bei Bauer et al. verglichen mit Weibchen eine geringere Effektstärke zeigten. Eine Untersuchung hinsichtlich des Phänotyps der Plaques zum Beispiel anhand des Kollagengehalts und Lipideinlagerungen etc. wäre denkbar. Allerdings sprechen die Ergebnisse aus der Proteomanalyse nicht unbedingt für eine veränderte Plaquekomposition in den Knockout-Mäusen, da hier kein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression gesehen werden konnte. Ein weiteres Ziel war, neue Substrate von *Adamts7* mittels quantitativer Proteomanalyse in einem Atherosklerose- und Restenosemodell zu identifizieren. Die Identifikation bisher unbekannter Zielproteine von *Adamts7* könnte die Entwicklung neuer Therapieansätze ermöglichen. Fest steht, dass *ADAMTS7*, durch die Degradation von COMP, die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und die Neointimabildung vorantreibt (Kessler et al., 2015; Liu et al., 2006). So war zwar in der Proteomanalyse der Aorten und der Femoralarterien kein signifikanter Unterschied zwischen KO und Kontrollen zu beobachten, jedoch ein Trend zu einer erhöhten Expression von Comp in den KO-Mäusen zu sehen. Einige weitere ECM-Proteine zeigten eine erhöhte Expression in den Aorten der 16 Wochen gefütterten *Adamts7*-Knockouts, erreichten jedoch keine FDR Signifikanz. Dies könnte eventuell an der niedrigen Probenanzahl liegen. Da sich unter den Proteinen, mit der Tendenz einer Hochregulation in den KO, zwei beschriebene Zielproteine von *ADAMTS7* befanden, besteht die Chance, dass weitere Interaktionspartner unter den gefunden

Proteinen sind. So gehört z.B. Beispiel THBS2 zur selben Familie wie COMP (THBS5) und THBS1 (Adams & Lawler, 2011). Weiterführende Analysen, wie Degradationsassays, könnten Aufschluss geben, ob es sich tatsächlich um neue Zielproteine von ADAMTS7 handelt. Eine weitere Erklärung für die Hochregulation einiger Proteine in den KO-Mäusen, vor allem der Matrixmetalloproteasen Mmp12 und Mmp19, könnte die Kompensation der fehlenden Funktion von Adamts7 sein.

Ein hemmender Einfluss von *ADAMTS7* auf die Reendothelialisierung nach vaskulärer Schädigung wird durch die Regulation eines weiteren potentiellen Targets, THBS1, vermutet (Kessler et al., 2015). Nach Gefäßschädigung in *Adamts7*-defizienten Mäusen war, neben einer verminderten Neointimafläche, auch eine schnellere Regeneration des Endothels zu beobachten. Weitere Untersuchungen zeigten, dass ADAMTS7 auch die Proliferation und Migration von Endothelzellen *in vivo* und *in vitro* hemmt (Kessler et al., 2015). Interessanterweise konnte dieser Effekt nicht durch einen COMP-abhängigen Mechanismus erklärt werden. Durch Sekretomanalyse stießen die Forscher auf ein potentiell neues Substrat: THBS1 (Kessler et al., 2015). THBS1 wird derselben Familie wie COMP zugeordnet und konnte in humanen atherosklerotischen Schnitten nachgewiesen werden (Riessen et al., 1998). Zudem konnte in einem Ballon-Dilatations-Modell in Ratten gezeigt werden, dass ein Antikörper-vermittelter Knockdown von Thbs1 nach zwei Wochen zu einer schnelleren Reendothelialisierung und reduzierter Neointimabildung führt (Chen et al., 1999). In *in vitro* Assays konnte gezeigt werden, dass THBS1 durch ADAMTS7 degradiert wird. Ein Zusammenhang zwischen dem inhibitorischen Effekt von ADAMTS7 auf die Reendothelialisierung und THBS1 als Substrat wird vermutet (Kessler et al., 2015). In der Proteomanalyse war Thbs1 in den Aorten von KO- Mäusen nach 16-wöchiger HFD erhöht. Im Rahmen der Pathogenese der Leberfibrose konnte mit Hilfe des *Yeast-two-Hybrid*-Verfahrens Adamts7 als Protease für den Connective Tissue Growth Factor (CTGF) identifiziert werden (Pi et al., 2015). Ob dieser Mechanismus auch eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielt, ist allerdings noch nicht untersucht worden. Weitere pathophysiologische Mechanismen oder Angriffspunkte von ADAMTS7 sind bislang nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden atherosklerotische Aorten (8 und 16 Wochen HFD) und geschädigte Femoralarterien von *Adamts7*-Knockout und Wildtypen massenspektrometrisch analysiert. Die Idee war, über differentiell exprimierte

Proteine, auf potentielle neue Zielproteine von *Adamts7* schließen zu können. Untersucht wurden Femoralarterien zu den Zeitpunkten 3, 7, 14 und 28 Tage nach vaskulärer Schädigung. Die frühen Zeitpunkte wurden gewählt, da aus der Literatur zu entnehmen ist, dass die *Adamts7*-Expression in Femoralarterien von Mäusen in der akuten Phase nach Schädigung am höchsten ist. Direkt nach Schädigung steigt die *Adamts7* Expression moderat an, erreicht an Tag 7 ihren Höhepunkt und ist zu späteren Zeitpunkten nicht mehr detektierbar (Bauer et al., 2015). Auch in Carotiden von Ratten war eine Induktion der *Adamts7* Expression nach vaskulärer Schädigung zum selben Zeitpunkt zu beobachten (Wang et al., 2009). Zu den späteren Zeitpunkten (14 und 28 d) waren die größten morphologischen Veränderungen zu erwarten, so dass hier die Unterschiede in der Komposition der Neointima bedingt durch die An- bzw. Abwesenheit von *Adamts7* analysiert werden sollten. In den untersuchten Aorten und Femoralarterien konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein Unterschied in der Proteinexpression gefunden werden. Es stellt sich die Frage warum trotz des starken Phänotyps der *Adamts7*^{-/-} im Femoralisverletzungsmodell keine Veränderungen in der Proteinexpression gefunden werden konnten. Eine Erklärung hierfür ist, dass sich zwar die Menge der gebildeten Neointima in *Adamts7*^{-/-} und Wildtypen unterscheidet, jedoch nicht die Zusammensetzung. Oder aber die phänotypischen Veränderungen sind durch Enzymaktivität, aber nicht Enzymlevel bedingt. Ein Vorteil der Massenspektrometrie ist, dass ohne Vorselektion tausende von Proteinen aus einer komplexen biologischen Probe verlässlich identifiziert werden können (Gillette & Carr, 2013). Dass *Adamts7* in keiner der untersuchten Proben von Wildtypen identifiziert werden konnte, könnte an der extrem hohen Abundanz vieler ECM-Proteine, die weniger abundante Proteine überlagern und dadurch deren Identifizierung und Quantifizierung erschweren, liegen (Millioni et al., 2011). Allerdings ist die Ausbeute von über 5000 Proteinen, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden konnten, sehr gut. Eine Möglichkeit, weitere Proteine identifizieren zu können, ist die Lockerung der recht strengen Filterkriterien. Hierdurch steigt jedoch die Gefahr, falsch positive Kandidatenpeptide mit niedrigen Werten in die Analyse mit einzubeziehen.

Der in dieser Arbeit bestätigte proatherogene Effekt von *Adamts7* lässt in Betracht ziehen, ADAMTS7 als potentielles therapeutisches Target für die koronare Herzkrankheit zu nutzen. Ein möglicher Ansatz zur Verhinderung oder Verringerung

der Atherosklerose bzw. Restenose könnte die pharmakologische Inhibition von ADAMTS7 sein. Ein Vorteil ist, dass ADAMTS7-Bindungsstellen im Gegensatz zu anderen ADAMTS strukturelle Unterschiede aufweisen und somit potentielle Targets für selektive Inhibitoren sein könnte (Muller et al., 2016). Aus diesem Grund sind weitere Studien nötig, welche die genauen Mechanismen von ADAMTS7 während des vaskulären Remodelings und spezifische Zielstrukturen weiter aufklären, bevor eine therapeutische Intervention beim Menschen in Betracht gezogen werden kann.

1.2. Proteomische Veränderungen der extrazellulären Matrix nach vaskulärer Schädigung

Die Restenose ist eine der häufigsten klinischen Komplikationen nach perkutanen koronaren Interventionen zur Therapie der KHK. Das Aufdehnen von Gefäßverengungen führt in einem gewissen Maße immer zu einer Schädigung des Endothels, was die Ausbildung einer intimalen Hyperplasie zur Folge haben kann. Neointimale Läsionen bestehen hauptsächlich aus vaskulären SMCs und ECM-Ablagerungen (Newby & Zaltsman, 2000). Es ist bekannt, dass sich die Zusammensetzung der ECM in vaskulären Läsionen von der in gesunden Gefäßen unterscheidet. Nach vaskulärer Schädigung kommt es nicht nur zu einer Zunahme der ECM, sondern durch Um- und Abbauprozesse auch zu einer Umstrukturierung (Raines, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden Femoralarterien von C57BL/6-Mäusen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (14 und 28 Tage) nach Drahtverletzung mittels Label-freier LC-MS/MS untersucht. Ziel war die Charakterisierung extrazellulärer Matrixveränderungen nach vaskulärer Gefäßverletzung. Ein besseres Verständnis der Pathogenese der Restenose und die Aufdeckung beteiligter Proteine könnte eine Grundlage für die Prävention und Therapie der KHK liefern. Antikörperbasierte Techniken zur Charakterisierung der ECM sind sehr aufwendig und können aufgrund der Maskierung von Epitopen durch alternatives Spleißen oder posttranslationale Modifikationen eine Herausforderung darstellen (Lynch et al., 2016). In der Massenspektrometrie hingegen stellen diese Veränderungen kein Hindernis dar und es ist sogar möglich, alternative Splicevarianten und posttranslationale Modifikationen aufzudecken (Mayr et al., 2007). Ein weiterer Vorteil ist die geringe Menge an Ausgangsmaterial, die erforderlich ist und trotzdem die Analyse einer Vielzahl von Proteinen erlaubt. In den letzten Jahren wurden viele MS-basierte Studien, die sich auf die Analyse des Gesamtproteoms bzw. Sekretoms von atherosklerotischen Veränderungen konzentriert haben, durchgeführt. Hierbei

konnten in Tiermodellen (Mayr et al., 2005) und in humanen Proben (De La Cuesta et al., 2012; Hao et al., 2014) eine Vielzahl an differentiell exprimierten Proteinen identifiziert werden. Nur eine Handvoll der Studien konzentrierte sich dabei auf die Analyse des Proteoms der extrazellulären Matrix.

Insgesamt konnten nach der massenspektrometrischen Analyse der Femoralarterien zu beiden Zeitpunkten über 5434 Proteine identifiziert werden. Von den 1205 signifikant regulierten Proteinen war der Großteil hochreguliert. Da als Kontrollen die kontralateralen, nicht-geschädigten Femoralarterien verwendet wurden, unterlagen die Arterien den gleichen Umwelteinflüssen. Bei weiteren Versuchen wäre zu überlegen zusätzlich noch eine Kontrollgruppe von Arterien aus Tieren, die gar keiner Manipulation unterlagen, mitzuführen, da das Proteom der kontralateralen Femoralarterie möglicherweise über die Blutbahn von der massiven Reaktion der geschädigten Arterie beeinflusst werden könnte. Nach der massenspektrometrischen Analyse und Proteinidentifikation konnte mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse gezeigt werden, dass es sichtbare Unterschiede in den Proteinprofilen geschädigter und nicht geschädigter Femoralarterien gab. Es war zu allen analysierten Zeitpunkten eine deutliche Trennung geschädigter und nicht geschädigter Arterien möglich. Dies weist darauf hin, dass molekulare Veränderungen nach initialer Gefäßschädigung fortwährend in allen Entwicklungsstadien der Neointima anhalten. Die große Anzahl der identifizierten Proteine stellt eine Herausforderung an die Selektion von Proteinen dar, die von besonderem Interesse sein könnten. Um die Auswahl zu erleichtern wurde eine Signalweg-Analyse durchgeführt, die einen guten Überblick über die molekularen Prozesse, an denen die identifizierten Proteine beteiligt sind, liefert. In der Signalweg-Analyse konnten die differentiell exprimierten Proteine vielen extrazellulären Matrix-Prozessen zugeordnet werden und so war der mit Abstand signifikanteste Signalweg mit einem p-Wert von 4.31E-22 die „Extrazelluläre Matrix Organisation“.

Durch die mechanische Verletzung der Arterienwand während perkutaner koronarer Interventionen wird der Einstrom von Entzündungszellen provoziert. Schon lange ist bekannt, dass die Akkumulation von Monozyten und Makrophagen eine wichtige Rolle im vaskulären Remodeling spielt. Makrophagen sezernieren Metalloproteinasen (Newby, 2008), inflammatorische Zytokine (Tedgui & Mallat, 2006) und Wachstumsfaktoren, die für die Migration und Proliferation von Zellen von großer Bedeutung sind. In der Proteomanalyse waren Makrophagenmarker nach

vaskulärer Schädigung deutlich überrepräsentiert. Auch die FACS-Analyse konnte diese Beobachtung bestätigen und die Sensitivität der Proteomanalyse aufzeigen. In der Durchflusszytometrie war eine deutliche Einwanderung von Monozyten und Makrophagen nach vaskulärer Schädigung in die Arterie zu sehen. Die Einwanderung von Makrophagen in die Gefäßwand führt zu einer erhöhten MMP-Produktion, welche den Abbau von Kollagen und Elastin nach sich zieht und in der Folge die ECM destabilisiert (Yamashita et al., 2008). In der Proteomanalyse waren viele Metalloproteinasen, wie z.B. Mmp2 und Mmp14, in geschädigten Arterien überexprimiert. Interessanterweise wird MMP2 als Proenzym in die ECM sezerniert und durch MMP14 aktiviert (Strongin et al., 1995). MMP2 ist ein Enzym, welches mit am häufigsten in vaskulären Geweben vorgefunden wird und dafür bekannt ist, an der Formation und Progression von atherosklerotischen Läsionen beteiligt zu sein (Li et al., 1996; Wagsater et al., 2011). In der Immunfluoreszenz konnte MMP2 vor allem in geschädigten Arterien in der Media lokalisiert werden. Ein direkter Zusammenhang zwischen Monozyteneinwanderung, Transformation in Makrophagen und der daraus resultierenden MMP-Überproduktion in stenotischen Femoralarterien muss allerdings noch gezeigt werden. Überraschenderweise wurden auch vermehrt neutrophile Granulozyten in den geschädigten Arterien vorgefunden, da hauptsächlich Makrophagen den vorherrschenden inflammatorischen Zelltyp in atherosklerotischen Läsionen darstellen (Moore & Tabas, 2011). Das Vorfinden von neutrophilen Granulozyten muss allerdings mit Vorsicht betrachtet werden, da mit der verwendeten Methode keine Aussage über die Lokalisation der identifizierten Zellen getroffen werden kann. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass trotz sorgfältigen Spülens der Arterien Blutzellen im Lumen verblieben und mit in die Analyse eingeflossen sind. Weiteren Aufschluss über die Lokalisation der identifizierten Zellen könnte die immunhistochemische Aufarbeitung von Gefäßschnitten geben.

Die in dieser Studie detektierte erhöhte Expression von Fibronectin in geschädigten Femoralarterien reiht sich sehr gut in die Erkenntnisse vorangegangener Studien ein. Fibronectin gilt schon länger als wichtiger Mediator des vaskulären Remodelings aufgrund seiner regulatorischen Eigenschaften auf Migration, Differenzierung und des Wachstums von Zellen. Fibronectin ist in humanen und murinen Plaques vorzufinden. Besonders eine Spleißvariante von Fibronectin, die Extra-Domain A (EDA), erfährt eine Hochregulation im erkrankten Gewebe und ist in adulten

Gewebe selten vorhanden (Doddapattar et al., 2015). Des Weiteren ist beschrieben, dass hohe EDA-Level in humanen genauso wie in murinen Plaques zu einem stabilen Plaquephänotyp beitragen (Pulakazhi Venu et al., 2015; Van Keulen et al., 2007). Abgesehen von zellulärem Fibronectin, kann Fibronectin auch in löslicher Form von der Leber produziert und ins Plasma abgegeben werden. Kontrovers diskutiert wird hier eine Assoziation zwischen erhöhten Fibronectin Plasmaleveln und der KHK (Orem et al., 2003; Vavalle et al., 2007).

Eine weitere Gruppe von ECM-Proteinen, die einer enormen Regulation während des vaskulären Remodelings unterlag, waren Laminine. Laminine sind Glykoproteine mit hohem Molekulargewicht und setzten sich jeweils aus einer alpha-, beta- und gamma-Untereinheit zusammen (Pozzi et al., 2016). In einer Analyse von Aorten eines murinen Atherosklerosemodells konnten Unterschiede in der Komposition von Laminin-Isoformen in gesunden und atherosklerotischen Gefäßwänden nachgewiesen werden (Rauch et al., 2011). Die erhöhte Laminin beta-1 und erniedrigte Laminin beta-2 Expression in der Proteomanalyse sind im Einklang mit weiteren Studien, die die Lamininexpression von aus humanen Plaques isolierten vSMC analysiert haben (Nyström, 2016; Zhang et al., 2002).

Als Hauptkomponenten der vaskulären ECM und als Substrate von Metalloproteinasen sind Kollagene wichtige Mitspieler bei der Entstehung der Atherosklerose. Durch ihre Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren und anderen ECM-Komponenten sind sie in der Lage, auf viele Zelltypen der Gefäßwand, zum Beispiel auf die Migration und Proliferation von vSMC und Makrophagen, Einfluss zu nehmen (Adiguzel et al., 2009). Expressionsarrays konnten 17 verschiedene Kollagentypen in Mauseorten identifizieren, wovon Kollagen I, III, IV, V und VI die höchste Expression zeigten (Kelleher et al., 2004). Die differentielle Regulation vieler Kollagene in der vorliegenden Proteomanalyse lässt auf die Wichtigkeit dieser Proteingruppe während des vaskulären Remodelings schließen. In dieser Arbeit konnte in geschädigten Femoralarterien eine reduzierte Expression von Col4a1 und Col4a2 in der Proteomanalyse beobachtet werden. Interessanterweise ist ein durch GWAS identifizierter SNP in *COL4A2* beschrieben, der mit einem erhöhten Risiko an der KHK zu erkranken assoziiert ist (Cardiogramplusc4d Consortium et al., 2013; Schunkert et al., 2011) und zu niedrigeren Expressionsspiegeln von *COL4A1* und *COL4A2* führt. Der Knockdown von *COL4A1* und *COL4A2* war in Zellkulturexperimenten mit einer erhöhten Apoptoserate von SMC und EC verbunden

und konnte in histologischen Schnitten mit einem instabilen Plaquephänotyp assoziiert werden (Yang et al., 2016). Ein weiteres Kollagen, welches auffallend hochreguliert war, war Kollagen Typ XIV, alpha 1. Kollagen Typ XIV, alpha 1 wurde bisher kaum mit der Atherosklerose in Zusammenhang gebracht. Nur in einer Studie in der eine vergleichende Transkriptomanalyse von humanen atherosklerotischen Läsionen und gesundem Kontrollgewebe durchgeführt wurde, ist COL14A1 als Kandidatengen beschrieben (Timofeeva et al., 2009). COL14A1 gehört zu der Gruppe der Kollagenfibrillen-assoziierten Kollagene, die Kollagenfibrillen mit anderen ECM-Komponenten verbinden (Gogiel & Bankowski, 2001). Die Hochregulation während des arteriellen Remodelings könnte zu einer erhöhten Stabilität der Arterienwand führen, jedoch ist ebenfalls eine negative Auswirkung wie die verringerte Elastizität der Arterienwand denkbar.

Kollagene, die keiner einheitlichen Regulierung nach vaskulärem Remodeling unterlagen, waren Kollagene vom Typ XI. Das Vorfinden zeitspezifischer Expressionsmuster einzelner Proteine weist auf die Komplexität des Matrisoms (Gesamtheit der Proteine der extrazellulären Matrix) und die schnellen Veränderungen, denen die extrazelluläre Matrix unterliegt, hin. Die zeitabhängige Expression nach Verletzung kann Schlussfolgerungen auf die Funktion einzelner Proteine erlauben. So wäre es denkbar, dass Proteine, die zu späteren Zeitpunkten hochreguliert werden, kompensatorische Funktionen übernehmen. Dazu wäre es interessant, noch frühere Zeitpunkte nach Gefäßverletzung zu untersuchen, um eine komplette Zeitkurve der proteomischen Veränderungen, ausgehend vom initialen Reiz bis hin zur ausgereiften Neointima zu erhalten. Dies könnte ein wichtiger Beitrag für die Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze der KHK sein.

Ein wichtiger Mechanismus des ECM-Remodelings sind Degradationsprozesse durch Proteasen. Um aktive Proteasen in der Neointima zu identifizieren wurde eine semitryptische Peptidsuche durchgeführt. Anhand der Anreicherung bestimmter Aminosäuren in der Nähe von Schnittstellen kann auf Aminosäure-spezifische Proteasen geschlossen werden. In der Peptidanalyse war eine signifikante Anreicherung von Asparagin an P-1 zu verzeichnen, woraufhin Legumain als potentiell aktive Protease während des vaskulären Remodelings identifiziert werden konnte. Legumain ist eine Endopeptidase mit hoher Substratspezifität, die zur

Hydrolyse Asparagin an P1 der Substratsequenz benötigt (Chen et al., 1997). Ein weiterer Hinweis auf Legumain als aktive Protease nach Gefäßschädigung war, dass Legumain in der differentiellen Proteomanalyse in neointimalen Arterien hochreguliert war und dies mittels Western Blot verifiziert werden konnte. In Patienten mit einer Carotisstenose wurden erhöhte Legumain-Expressionslevel im Plasma und in Plaques festgestellt (Lunde et al., 2016). Außerdem konnte in einer weiteren klinischen Studie eine hohe Expression von *LGMN* mit einer erhöhten Plaqueinstabilität assoziiert werden (Mattock et al., 2010). Es wird vermutet, dass die Expression von Legumain durch die inflammatorische Reaktion der Gefäßwand vermittelt wird, da die Legumainexpression durch proinflammatorische Zytokine induziert wird und vorrangig durch Monozyten und Makrophagen stattfindet (Clerin et al., 2008; Papaspyridonos et al., 2006). Interessanterweise sind bekannte Zielproteine von Legumain ECM-Proteine wie Fibronectin (Morita et al., 2007) und MMP2 (Chen et al., 2001), die auch in der Proteomanalyse dieser Arbeit detektiert werden konnten und signifikant reguliert waren. Eine schnelle Regeneration des Endothels nach Verletzungen der Gefäßwand ist ein wesentlicher Faktor für die Reduktion von Komplikationen (Otsuka et al., 2012). Ein Einfluss von Legumain auf die Migrationsfähigkeit von Monozyten und HUVECs konnte in Zellkulturexperimenten schon gezeigt werden. Nach Inkubation mit humanem Legumain konnte eine erhöhte Migration von HUVECs in einem *in vitro* Migrationsassay beobachtet werden (Clerin et al., 2008). HUVECs werden aus der Umbilicalvene von immun-naiven Föten gewonnen und stellen somit nicht unbedingt das ideale Gewebe dar das Verhalten von Endothelzellen im Prozess der Atherosklerose zu studieren. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob Legumain auch einen Phänotyp in Bezug auf die Migrationsfähigkeit von humanen Endothelzellen der Koronararterie zeigt. Dieser Fragestellung wurde mit Hilfe von Scratch Wound Assays nachgegangen. In den Migrationsassays konnte weder durch einen Knockdown noch durch eine Überexpression von Legumain ein Unterschied in der Migrationsfähigkeit von HCAECs beobachtet werden. Ein Nachteil von *in vitro* Assays ist, dass sie sehr artifiziell sind und das vorhandene Milieu, das *in vivo* durch das Zusammenspiel von Zellen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen etc. gebildet wird, nicht nachbilden können. Zudem bleibt zu klären, ob Endothelzellen tatsächlich zu den Zielzellen von Legumain zählen, oder ob möglicherweise auch weitere Zelltypen, wie vSMCs beeinflusst werden. Weitere Analysen sind nötig um die Rolle von

Legumain während der Atherogenese aufzuklären.

Die große Datenmenge, die in dieser Arbeit mittels der massenspektrometrischen Untersuchung gewonnen wurde, zeigt die Komplexität der Vorgänge während des vaskulären Remodelings auf und stellt eine Herausforderung an die Selektion interessanter Mitspieler im Krankheitsgeschehen der KHK dar. Ein nächster Schritt zur Aufarbeitung des Datensatzes stellt die Validierung weiterer regulierter Proteine mittels immunhistochemischen Verfahren oder Western Blot dar. Nicht alle differentiell regulierten Proteine müssen unbedingt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese einer Erkrankung spielen, so dass es wichtig ist, die biologischen Funktionen einzelner Proteine in weiterführenden Experimenten wie zum Beispiel Knockout-Modellen zu studieren. Der in dieser Arbeit generierte deskriptive Datensatz des vaskulären Remodelings stellt daher eine wertvolle Grundlage für die funktionelle Analyse spezifischer Proteine während der Pathogenese der Atherosklerose und Restenose dar.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Proteomanalyse und Charakterisierung der vaskulären extrazellulären Matrix mit Fokus auf das KHK-Risikogen *ADAMTS7*

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist eine Erkrankung der Herzkranzgefäße und zählt, zusammen mit ihren verschiedenen Ausprägungsformen, zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Während der Atherogenese spielen Veränderungen der extrazellulären Matrix eine große Rolle. So können Matrixproteine Funktion und Aktivität vaskulärer Zellen maßgeblich beeinflussen und es kommt zu massiven Umstrukturierungsprozessen. Genomweite Assoziationsstudien konnten das *Adamts7*-Gen, welches für die extrazelluläre Matrixprotease ADAMTS7 kodiert, als Risikolokus für die KHK identifizieren. Der Wirkmechanismus von *ADAMTS7* ist bisher nicht völlig verstanden und nur wenige Zielproteine bekannt. Ein besseres Verständnis des Wirkmechanismus von *Adamts7* und auch der Zusammensetzung der ECM während des vaskulären Remodelings, ist ein wichtiger Schritt in Hinblick auf die Identifizierung neuer therapeutischer Targets. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde anhand von *Adamts7*-KO-Mäusen der Einfluss von *Adamts7* auf die Plaque- und Neointimabildung untersucht und zudem, mittels markierungsfreier LC-MS/MS, neue potentielle Zielproteine von *Adamts7* gesucht. Außerdem wurde mit Hilfe markierungsfreier LC-MS/MS und einer nachfolgenden differentiellen Proteomanalyse in einem murinen Restenosemodell die Komposition der extrazellulären Matrix im Zeitverlauf (14 und 28) nach vaskulärer Schädigung charakterisiert. Bezüglich der Plaquebildung konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten *Adamts7*^{-/-}-Mäuse nach Draht-vermittelter Schädigung der Arteria femoralis im Vergleich zu Wildtypen eine geringere Neointimabildung. In der Proteomanalyse waren bei einigen Proteinen, z.B. Comp und Thbs1, Trends in Richtung erhöhter Expression in den KO-Mäusen zu beobachten. Hinsichtlich der allgemeinen ECM-Veränderungen nach vaskulärer Schädigung konnten nach draht-vermittelter Femoralisschädigung von C57BL/6 in der Proteomanalyse 1205 differentiell regulierte Proteine identifiziert werden, wobei die Mehrzahl der regulierten Proteine erhöhte Expressionslevel zeigten. Vor allem Proteine der extrazellulären Matrix, wie Kollagene, Laminine und Metalloproteinasen zeigten eine veränderte Expression während des vaskulären

Remodelings. Besonders interessant war Legumain, eine Protease, die in geschädigten Arterien hochreguliert war und aufgrund ihres spezifischen Spaltmotives identifiziert werden konnte. Mittels weiterführender Analysen wie der Durchflusszytometrie, der Immunfluoreszenz und Western Blot ist es gelungen, bereits massenspektrometrisch identifizierte, veränderte Expressionen einzelner Proteine zu validieren. Der in dieser Arbeit generierte Datensatz der extrazellulären Matrix Veränderungen nach vaskulärer Schädigung liefert eine solide Grundlage für weitere funktionelle Analysen zur Aufklärung der Pathogenese der Atherosklerose und Restenose.

VII. SUMMARY

Proteome analysis and characterization of vascular extracellular matrix changes focusing the CAD risk gene *ADAMTS7*

Coronary artery disease (CAD), caused by the formation of atherosclerotic lesions, is one of the leading causes of death worldwide. During atherogenesis extracellular matrix changes play an important role. Matrix proteins are able to alter function and activity of vascular cells and are involved in arterial remodeling after vascular injury. Using genome-wide association studies, *ADAMTS7* was identified as a risk locus for CAD. *ADAMTS7* encodes for ADAMTS7, an extracellular matrix protease. It is not fully understood through which mechanisms ADAMTS7 is working and just a few targets are known. A better understanding of the mechanisms of ADAMTS7 and the characterization of the ECM composition during vascular remodeling could be an important step towards identifying new therapeutically targets. The aim of this work was to identify the role of *Adamts7* on plaque and neointima formation and to find new targets of *Adamts7* by label-free LC-MS/MS. In addition, using a murine restenosis model extracellular matrix changes were characterized 14 and 28 days after vascular injury by mass spectrometry. *Adamts7*^{-/-} mice compared to WT showed significantly reduced neointima formation after femoral injury. Feeding a high-fat diet for 8 and 16 weeks no difference in plaque size of *Adamts7*^{-/-} was observed. Proteome analysis of *Adamts7*^{-/-} and wild type mice revealed no significantly differentially expressed proteins in both models, but some proteins, like Comp and Thbs1, showed a trend to higher expression in knockout mice. Concerning the characterization of ECM composition after vascular injury, proteome analysis identified 1205 differentially regulated proteins where most of the proteins showed higher expression levels. Especially proteins of the vascular extracellular matrix as collagens, laminins and matrix metalloproteinases showed differences in their regulation during vascular remodeling. For the first time an increased legumain expression in murine arteries after vascular injury could be shown. Proteins identified by mass spectrometry could be further validated and characterized by flow cytometry, immunofluorescence and western blotting. This study generated a dataset of extracellular matrix changes after vascular injury that could be the basis for further functional analysis to reveal the pathogenesis of atherosclerosis and restenosis.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Adams JC, Lawler J. The thrombospondins. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2011; 3: a009712.

Adiguzel E, Ahmad PJ, Franco C, Bendeck MP. Collagens in the progression and complications of atherosclerosis. Vasc. Med. 2009; 14: 73-89.

Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature 2003; 422: 198-207.

Aherrahrou Z, Kessler T, Schmidt K, de Wit C, Schunkert H, Erdmann J. Knockout of the Coronary Artery Disease Risk Gene Adamts-7 Inhibits Neointima Formation and Stenosis of Arteries. Circulation 2011; 124: A15199.

Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2004; 36: 981-5.

Apte SS. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. The Journal of biological chemistry 2009; 284: 31493-7.

Assimes TL, Lee IT, Juang JM, Guo X, Wang TD, Kim ET, Lee WJ, Absher D, Chiu YF, Hsu CC, *et al.* Genetics of Coronary Artery Disease in Taiwan: A Cardiometabochip Study by the Taichi Consortium. PLoS ONE 2016; 11: e0138014.

Austin CP, Battey JF, Bradley A, Bucan M, Capecchi M, Collins FS, Dove WF, Duyk G, Dymecki S, Eppig JT, *et al.* The knockout mouse project. Nature genetics 2004; 36: 921-4.

Bachmann JM, Willis BL, Ayers CR, Khera A, Berry JD. Association between family history and coronary heart disease death across long-term follow-up in men: the

Cooper Center Longitudinal Study. *Circulation* 2012; 125: 3092-8.

Bauer RC, Tohyama J, Cui J, Cheng L, Yang J, Zhang X, Ou K, Paschos GK, Zheng XL, Parmacek MS, *et al.* Knockout of Adamts7, A Novel CAD Locus in Humans, Reduces Atherosclerosis in Mice. 2015;

Baumgärtner W, Gruber AD (2010) *Allgemeine Pathologie für die Tiermedizin*

Beaufre H, Ammersbach M, Reavill DR, Garner MM, Heatley JJ, Wakamatsu N, Nevarez JG, Tully TN. Prevalence of and risk factors associated with atherosclerosis in psittacine birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2013; 242: 1696-704.

Beaufre H, Vet DM, Cray C, Ammersbach M, Tully TN, Jr. Association of plasma lipid levels with atherosclerosis prevalence in psittaciformes. *J Avian Med Surg* 2014; 28: 225-31.

Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 15: 786-801.

Buccheri D, Piraino D, Andolina G, Cortese B. Understanding and managing in-stent restenosis: a review of clinical data, from pathogenesis to treatment. *J Thorac Dis* 2016; 8: E1150-E62.

CARDIoGRAMplusC4D Consortium, Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, Ingelsson E, Saleheen D, Erdmann J, *et al.* Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nature genetics* 2013; 45: 25-33.

CARDIoGRAMplusC4D Consortium, Nikpay M, Goel A, Won HH, Hall LM, Willenborg C, Kanoni S, Saleheen D, Kyriakou T, Nelson CP, *et al.* A comprehensive 1,000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. *Nature genetics* 2015; 47: 1121-30.

Chelladurai P, Seeger W, Pullamsetti SS. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 2012; 40: 766-82.

Chen D, Asahara T, Krasinski K, Witzenbichler B, Yang J, Magner M, Kearney M, Frazier WA, Isner JM, Andres V. Antibody blockade of thrombospondin accelerates reendothelialization and reduces neointima formation in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 1999; 100: 849-54.

Chen JM, Dando PM, Rawlings ND, Brown MA, Young NE, Stevens RA, Hewitt E, Watts C, Barrett AJ. Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase. *The Journal of biological chemistry* 1997; 272: 8090-8.

Chen JM, Fortunato M, Stevens RA, Barrett AJ. Activation of progelatinase A by mammalian legumain, a recently discovered cysteine proteinase. *Biol. Chem.* 2001; 382: 777-83.

Chow CK, Islam S, Bautista L, Rumboldt Z, Yusufali A, Xie C, Anand SS, Engert JC, Rangarajan S, Yusuf S. Parental history and myocardial infarction risk across the world: the INTERHEART Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011; 57: 619-27.

Chung IM, Gold HK, Schwartz SM, Ikari Y, Reidy MA, Wight TN. Enhanced extracellular matrix accumulation in restenosis of coronary arteries after stent deployment. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 40: 2072-81.

Clerin V, Shih HH, Deng N, Hebert G, Resmini C, Shields KM, Feldman JL, Winkler A, Albert L, Maganti V, *et al.* Expression of the cysteine protease legumain in vascular lesions and functional implications in atherogenesis. *Atherosclerosis* 2008; 201: 53-66.

Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res.* 1998; 8: 1229-31.

Coronary Artery Disease Genetics Consortium. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nature genetics* 2011; 43: 339-44.

Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. MaxLFQ allows accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction. *Mol Cell Proteomics* 2014;

Dahme E (1962-63) *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*, 3 edn

Dahme E, Weiss E (2007) *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*

Dai X, Wiernek S, Evans JP, Runge MS. Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction. *World J Cardiol* 2016; 8: 1-23.

de la Cuesta F, Barderas MG, Calvo E, Zubiri I, Maroto AS, Darde VM, Martin-Rojas T, Gil-Dones F, Posada-Ayala M, Tejerina T, *et al.* Secretome analysis of atherosclerotic and non-atherosclerotic arteries reveals dynamic extracellular remodeling during pathogenesis. *J Proteomics* 2012; 75: 2960-71.

Deracinois B, Flahaut C, Duban-Deweere S, Karamanos Y. Comparative and Quantitative Global Proteomics Approaches: An Overview. *Proteomes* 2013; 1: 180.

Doddapattar P, Gandhi C, Prakash P, Dhanesha N, Grumbach IM, Dailey ME, Lentz SR, Chauhan AK. Fibronectin Splicing Variants Containing Extra Domain A Promote Atherosclerosis in Mice Through Toll-Like Receptor 4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; 35: 2391-400.

Dolphin PJ. Serum and hepatic nascent lipoproteins in normal and hypercholesterolemic rats. *J. Lipid Res.* 1981; 22: 971-89.

Elliott MH, Smith DS, Parker CE, Borchers C. Current trends in quantitative proteomics. *J. Mass Spectrom.* 2009; 44: 1637-60.

Erdmann J, Grosshennig A, Braund PS, Konig IR, Hengstenberg C, Hall AS, Linsel-Nitschke P, Kathiresan S, Wright B, Tregouet DA, *et al.* New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nature genetics* 2009; 41: 280-2.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; 246: 64-71.

Friedel RH, Seisenberger C, Kaloff C, Wurst W. EUCOMM--the European conditional mouse mutagenesis program. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 2007; 6: 180-5.

Frohlich T, Arnold GJ. Proteome research based on modern liquid chromatography--tandem mass spectrometry: separation, identification and quantification. *J Neural Transm (Vienna)* 2006; 113: 973-94.

Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, *et al.* Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* 2012; 13: 1118-28.

Gillette MA, Carr SA. Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nat. Methods* 2013; 10: 28-34.

Gogiel T, Bankowski E. [New collagenous proteins: FACIT collagens, transmembrane collagens and multiplexins]. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2001; 55: 133-56.

Gregorich ZR, Chang YH, Ge Y. Proteomics in heart failure: top-down or bottom-up? *Pflugers Arch.* 2014; 466: 1199-209.

Greten H, Rinninger F, Greten T, Amling M, Andrassy K (2010) *Innere Medizin.*

Thieme. 1272

Guo F, Lai Y, Tian Q, Lin EA, Kong L, Liu C. Granulin-epithelin precursor binds directly to ADAMTS-7 and ADAMTS-12 and inhibits their degradation of cartilage oligomeric matrix protein. *Arthritis and rheumatism* 2010; 62: 2023-36.

Gupta N, Hixson KK, Culley DE, Smith RD, Pevzner PA. Analyzing protease specificity and detecting in vivo proteolytic events using tandem mass spectrometry. *Proteomics* 2010; 10: 2833-44.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine* 2005; 352: 1685-95.

Hao P, Ren Y, Pasterkamp G, Moll FL, de Kleijn DP, Sze SK. Deep proteomic profiling of human carotid atherosclerotic plaques using multidimensional LC-MS/MS. *Proteomics Clin. Appl.* 2014; 8: 631-5.

Hess RS, Kass PH, Van Winkle TJ. Association between diabetes mellitus, hypothyroidism or hyperadrenocorticism, and atherosclerosis in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 2003; 17: 489-94.

Hui DY. Intimal hyperplasia in murine models. *Current drug targets* 2008; 9: 251-60.

Hurskainen TL. ADAM-TS5, ADAM-TS6, and ADAM-TS7, Novel Members of a New Family of Zinc Metalloproteases. GENERAL FEATURES AND GENOMIC DISTRIBUTION OF THE ADAM-TS FAMILY. *Journal of biological chemistry* 1999; 274: 25555-63.

Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009; 326: 1216-9.

Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 883-93.

Ishii S. [Asparaginylendopeptidase: an enzyme probably responsible to post-translational proteolysis and transpeptidation of proconcanavalin A]. *Seikagaku* 1993; 65: 185-9.

Jojic V, Shay T, Sylvia K, Zuk O, Sun X, Kang J, Regev A, Koller D, Immunological Genome Project C, Best AJ, *et al.* Identification of transcriptional regulators in the mouse immune system. *Nat. Immunol.* 2013; 14: 633-43.

Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, Kutys R, Skorija K, Gold HK, Virmani R. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006; 48: 193-202.

Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 422-33.

Kamburov A, Stelzl U, Lehrach H, Herwig R. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: D793-800.

Kapourchali FR, Surendiran G, Chen L, Uitz E, Bahadori B, Moghadasian MH. Animal models of atherosclerosis. *World J Clin Cases* 2014; 2: 126-32.

Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 1988; 60: 2299-301.

Karpievitch YV, Polpitiya AD, Anderson GA, Smith RD, Dabney AR. Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspects. *Ann Appl Stat* 2010; 4: 1797-823.

Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, Pache J, Ulm K, Schühlen H, Seyfarth M, Schmitt C, Blasini R, Neumann FJ, Schomig A. Restenosis after coronary placement of various stent types. *Am. J. Cardiol.* 2001; 87: 34-9.

Kelleher CM, McLean SE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and aortic

development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2004; 62: 153-88.

Kessler T, Erdmann J, Schunkert H. Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction--2013. *Current cardiology reports* 2013; 15: 368.

Kessler T, Zhang L, Liu Z, Yin X, Huang Y, Wang Y, Fu Y, Mayr M, Ge Q, Xu Q, *et al.* ADAMTS-7 Inhibits Re-Endothelialization of Injured Arteries and Promotes Vascular Remodeling Via Cleavage of Thrombospondin-1. *Circulation* 2015;

Kumar A, Lindner V. Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2238-44.

Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *The Journal of biological chemistry* 1997; 272: 556-62.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.

Lee AR, Lamb RR, Chang JH, Erdmann-Gilmore P, Lichti CF, Rohrs HW, Malone JP, Wairkar YP, DiAntonio A, Townsend RR, Culican SM. Identification of potential mediators of retinotopic mapping: a comparative proteomic analysis of optic nerve from WT and *Phr1* retinal knockout mice. *J. Proteome Res.* 2012; 11: 5515-26.

Leong XF, Ng CY, Jaarin K. Animal Models in Cardiovascular Research: Hypertension and Atherosclerosis. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 528757.

Li Z, Li L, Zielke HR, Cheng L, Xiao R, Crow MT, Stetler-Stevenson WG, Froehlich J, Lakatta EG. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* 1996; 148: 121-8.

Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* 2007; 2: 329-33.

Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in Atherosclerosis. *Circulation Journal* 2010; 74: 213-20.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473: 317-25.

Lindner V, Fingerle J, Reidy MA. Mouse model of arterial injury. *Circulation Research* 1993; 73: 792-6.

Liu CJ, Kong W, Ilalov K, Yu S, Xu K, Prazak L, Fajardo M, Sehgal B, Di Cesare PE. ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2006; 20: 988-90.

Liu SK, Tilley LP, Tappe JP, Fox PR. Clinical and pathologic findings in dogs with atherosclerosis: 21 cases (1970-1983). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1986; 189: 227-32.

Lloyd-Jones DM, Nam BH, D'Agostino RB, Sr., Levy D, Murabito JM, Wang TJ, Wilson PW, O'Donnell CJ. Parental cardiovascular disease as a risk factor for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring. *JAMA* 2004; 291: 2204-11.

Lu P, Takai K, Weaver VM, Werb Z. Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011; 3

Luan Y, Kong L, Howell DR, Ilalov K, Fajardo M, Bai XH, Di Cesare PE, Goldring MB, Abramson SB, Liu CJ. Inhibition of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 degradation of cartilage oligomeric matrix protein by alpha-2-macroglobulin. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2008; 16: 1413-20.

Lunde NN, Holm S, Dahl TB, Elyouncha I, Sporsheim B, Gregersen I, Abbas A, Skjelland M, Espevik T, Solberg R, *et al.* Increased levels of legumain in plasma and plaques from patients with carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2016;

Lusis AJ. *Atherosclerosis*. *Nature* 2000; 407: 233-41.

Lusis AJ. Genetics of atherosclerosis. *Trends in genetics : TIG* 2012; 28: 267-75.

Lynch M, Barallobre-Barreiro J, Jahangiri M, Mayr M. Vascular proteomics in metabolic and cardiovascular diseases. *J. Intern. Med.* 2016; 280: 325-38.

Mattock KL, Gough PJ, Humphries J, Burnand K, Patel L, Suckling KE, Cuello F, Watts C, Gautel M, Avkiran M, Smith A. Legumain and cathepsin-L expression in human unstable carotid plaque. *Atherosclerosis* 2010; 208: 83-9.

Mayer B, Erdmann J, Schunkert H. Genetics and heritability of coronary artery disease and myocardial infarction. *Clin. Res. Cardiol.* 2007; 96: 1-7.

Mayr M, Chung YL, Mayr U, Yin X, Ly L, Troy H, Fredericks S, Hu Y, Griffiths JR, Xu Q. Proteomic and metabolomic analyses of atherosclerotic vessels from apolipoprotein E-deficient mice reveal alterations in inflammation, oxidative stress, and energy metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2135-42.

Mayr M, Madhu B, Xu Q. Proteomics and metabolomics combined in cardiovascular research. *Trends Cardiovasc. Med.* 2007; 17: 43-8.

McPherson R, Tybjaerg-Hansen A. Genetics of Coronary Artery Disease. *Circ. Res.* 2016; 118: 564-78.

Millioni R, Tolin S, Puricelli L, Sbrignadello S, Fadini GP, Tessari P, Arrighi G. High abundance proteins depletion vs low abundance proteins enrichment: comparison of methods to reduce the plasma proteome complexity. *PLoS ONE* 2011; 6: e19603.

Mitra AK, Gangahar DM, Agrawal DK. Cellular, molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. *Immunol. Cell Biol.* 2006; 84: 115-24.

Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011; 145: 341-55.

Morita Y, Araki H, Sugimoto T, Takeuchi K, Yamane T, Maeda T, Yamamoto Y, Nishi K, Asano M, Shirahama-Noda K, *et al.* Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells. *FEBS Lett.* 2007; 581: 1417-24.

Muller M, Kessler T, Schunkert H, Erdmann J, Tennstedt S. Classification of ADAMTS binding sites: The first step toward selective ADAMTS7 inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016; 471: 380-5.

Myers RH, Kiely DK, Cupples LA, Kannel WB. Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham Study. *Am. Heart J.* 1990; 120: 963-9.

Nakazawa G, Otsuka F, Nakano M, Vorpahl M, Yazdani SK, Ladich E, Kolodgie FD, Finn AV, Virmani R. The pathology of neoatherosclerosis in human coronary implants bare-metal and drug-eluting stents. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2011; 57: 1314-22.

Nesvizhskii AI, Vitek O, Aebersold R. Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. *Nat. Methods* 2007; 4: 787-97.

Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *The Journal of pathology* 2000; 190: 300-9.

Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 2108-14.

Nora JJ, Lortscher RH, Spangler RD, Nora AH, Kimberling WJ. Genetic--epidemiologic study of early-onset ischemic heart disease. *Circulation* 1980; 61: 503-8.

Nyström A (2016) Laminins in blood vessel development and disease -functional aspects in angiogenesis, atherosclerosis, and muscular dystrophy. In: Department of Experimental Medical Science. Lund University Experimental Science

Orem C, Durmus I, Kilinc K, Baykan M, Gokce M, Orem A, Topbas M. Plasma fibronectin level and its association with coronary artery disease and carotid intima-media thickness. *Coron. Artery Dis.* 2003; 14: 219-24.

Otsuka F, Finn AV, Yazdani SK, Nakano M, Kolodgie FD, Virmani R. The importance of the endothelium in atherothrombosis and coronary stenting. *Nat. Rev. Cardiol.* 2012; 9: 439-53.

Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405: 837-46.

Papaspyridonos M, Smith A, Burnand KG, Taylor P, Padayachee S, Suckling KE, James CH, Greaves DR, Patel L. Novel candidate genes in unstable areas of human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1837-44.

Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA* 2008; 299: 1335-44.

Peng J, Gygi SP. Proteomics: the move to mixtures. *J. Mass Spectrom.* 2001; 36: 1083-91.

Pereira A, Palma Dos Reis R, Rodrigues R, Sousa AC, Gomes S, Borges S, Ornelas I, Freitas AI, Guerra G, Henriques E, *et al.* Association of ADAMTS7 gene polymorphism with cardiovascular survival in coronary artery disease. *Physiol. Genomics* 2016; 48: 810-5.

Pi L, Jorgensen M, Oh SH, Protopapadakis Y, Gjymishka A, Brown A, Robinson P, Liu C, Scott EW, Schultz GS, Petersen BE. A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin Type I Motif 7: A New Protease for Connective Tissue Growth Factor in Hepatic Progenitor/Oval Cell Niche. *Am. J. Pathol.* 2015;

Pilny AA, Quesenberry KE, Bartick-Sedrish TE, Latimer KS, Berghaus RD. Evaluation of *Chlamydophila psittaci* infection and other risk factors for atherosclerosis in pet psittacine birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2012; 240: 1474-80.

Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem. J.* 2005; 386: 15-27.

Pozzi A, Yurchenco PD, Iozzo RV. The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biol.* 2016;

Pu X, Xiao Q, Kiechl S, Chan K, Ng FL, Gor S, Poston RN, Fang C, Patel A, Senver EC, *et al.* ADAMTS7 cleavage and vascular smooth muscle cell migration is affected by a coronary-artery-disease-associated variant. *American journal of human genetics* 2013; 92: 366-74.

Pulakazhi Venu VK, Uboldi P, Dhyani A, Patrini A, Baetta R, Ferri N, Corsini A, Muro AF, Catapano AL, Norata GD. Fibronectin extra domain A stabilises atherosclerotic plaques in apolipoprotein E and in LDL-receptor-deficient mice. *Thromb. Haemost.* 2015; 114: 186-97.

Raines EW. The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 2000; 81: 173-82.

Rauch U, Saxena A, Lorkowski S, Rauterberg J, Bjorkbacka H, Durbeej M, Hultgardh-Nilsson A. Laminin isoforms in atherosclerotic arteries from mice and man. *Histol. Histopathol.* 2011; 26: 711-24.

Reilly MP, Li M, He J, Ferguson JF, Stylianou IM, Mehta NN, Burnett MS, Devaney JM, Knouff CW, Thompson JR, *et al.* 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. *The Lancet* 2011; 377: 383-92.

Riessen R, Kearney M, Lawler J, Isner JM. Immunolocalization of thrombospondin-1 in human atherosclerotic and restenotic arteries. *Am. Heart J.* 1998; 135: 357-64.

Riessen R, Fenchel M, Chen H, Axel DI, Karsch KR, Lawler J. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (Thrombospondin-5) Is Expressed by Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 47-54.

Rigotti A, Trigatti BL, Penman M, Rayburn H, Herz J, Krieger M. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997; 94: 12610-5.

Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *The New England journal of medicine* 1976; 295: 420-5.

Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* 1999; 340: 115-26.

Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann HE, *et al.* Genomewide association analysis of coronary artery disease. *The New England journal of medicine* 2007; 357: 443-53.

Sata M, Maejima Y, Adachi F, Fukino K, Saiura A, Sugiura S, Aoyagi T, Imai Y, Kurihara H, Kimura K, *et al.* A mouse model of vascular injury that induces rapid onset of medial cell apoptosis followed by reproducible neointimal hyperplasia. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2000; 32: 2097-104.

Scheltema RA, Hauschild JP, Lange O, Hornburg D, Denisov E, Damoc E, Kuehn A, Makarov A, Mann M. The Q Exactive HF, a Benchtop mass spectrometer with a pre-filter, high-performance quadrupole and an ultra-high-field Orbitrap analyzer. *Mol. Cell. Proteomics* 2014; 13: 3698-708.

Schildkraut JM, Myers RH, Cupples LA, Kiely DK, Kannel WB. Coronary risk associated with age and sex of parental heart disease in the Framingham Study. *Am. J. Cardiol.* 1989; 64: 555-9.

Schiller HB, Fernandez IE, Burgstaller G, Schaab C, Scheltema RA, Schwarzmayr T, Strom TM, Eickelberg O, Mann M. Time- and compartment-resolved proteome profiling of the extracellular niche in lung injury and repair. *Mol. Syst. Biol.* 2015; 11: 819.

Schunkert H, König IR, Kathiresan S, Reilly MP, Assimes TL, Holm H, Preuss M, Stewart AF, Barbalic M, Gieger C, *et al.* Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nature genetics* 2011; 43: 333-8.

Shen X, Young R, Canty JM, Qu J. Quantitative proteomics in cardiovascular research: global and targeted strategies. *Proteomics Clin. Appl.* 2014; 8: 488-505.

Somerville RP, Longpre JM, Apel ED, Lewis RM, Wang LW, Sanes JR, Leduc R, Apte SS. ADAMTS7B, the full-length product of the ADAMTS7 gene, is a chondroitin sulfate proteoglycan containing a mucin domain. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279: 35159-75.

statistisches Bundesamt (Destatis). häufigste Todesursache 2015

. 2015:

Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *The Journal of biological chemistry* 1995;

270: 5331-8.

Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science* 2013; 339: 161-6.

Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological reviews* 2006; 86: 515-81.

Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, Pandey MR, Valentin V, Hunt D, Diaz R, Rashed W, Freeman R, Jiang L, *et al.* Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet* 2006; 368: 647-58.

Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 97: 4-27.

Timofeeva AV, Goriunova LE, Khaspekov GL, Il'inskaia OP, Sirotkin VN, Andreeva ER, Tararak EM, Bulkina OS, Buza VV, Britareva VV, *et al.* [Comparative transcriptome analysis of human aorta atherosclerotic lesions and peripheral blood leukocytes from essential hypertension patients]. *Kardiologija* 2009; 49: 27-38.

Tortorella MD, Malfait F, Barve RA, Shieh HS, Malfait AM. A review of the ADAMTS family, pharmaceutical targets of the future. *Curr. Pharm. Des.* 2009; 15: 2359-74.

van Buuren F. 25th Report of performance figures of the heart catheterization laboratories in Germany. *Der Kardiologe* 2010; 4: 502-8.

van Keulen JK, de Kleijn DP, Nijhuis MM, Busser E, Velema E, Fijnheer R, van der Graaf Y, Moll FL, de Vries JP, Pasterkamp G. Levels of extra domain A containing fibronectin in human atherosclerotic plaques are associated with a stable plaque phenotype. *Atherosclerosis* 2007; 195: e83-91.

van Varik BJ, Rennenberg RJ, Reutelingsperger CP, Kroon AA, de Leeuw PW,

Schurgers LJ. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. *Frontiers in genetics* 2012; 3: 290.

Vargas JD, Manichaikul A, Wang XQ, Rich SS, Rotter JI, Post WS, Polak JF, Budoff MJ, Bluemke DA. Common genetic variants and subclinical atherosclerosis: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* 2016; 245: 230-6.

Vavalle JP, Wu SS, Hughey R, Madamanchi NR, Stouffer GA. Plasma fibronectin levels and coronary artery disease. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5: 864-6.

Wagsater D, Zhu C, Bjorkegren J, Skogsberg J, Eriksson P. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(-/-)Apob(100/100) mouse. *Int. J. Mol. Med.* 2011; 28: 247-53.

Wang L, Zheng J, Bai X, Liu B, Liu CJ, Xu Q, Zhu Y, Wang N, Kong W, Wang X. ADAMTS-7 mediates vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in balloon-injured rat arteries. *Circ. Res.* 2009; 104: 688-98.

Wienke A, Holm NV, Skytthe A, Yashin AI. The heritability of mortality due to heart diseases: a correlated frailty model applied to Danish twins. *Twin Res.* 2001; 4: 266-74.

World Health Organization. The top 10 causes of death. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>: World Health Organization 2012:

Yamashita A, Shoji K, Tsuruda T, Furukoji E, Takahashi M, Nishihira K, Tamura S, Asada Y. Medial and adventitial macrophages are associated with expansive atherosclerotic remodeling in rabbit femoral artery. *Histol. Histopathol.* 2008; 23: 127-36.

Yang W, Ng FL, Chan K, Pu X, Poston RN, Ren M, An W, Zhang R, Wu J, Yan S, *et al.* Coronary-Heart-Disease-Associated Genetic Variant at the COL4A1/COL4A2

Locus Affects COL4A1/COL4A2 Expression, Vascular Cell Survival, Atherosclerotic Plaque Stability and Risk of Myocardial Infarction. *PLoS Genet.* 2016; 12: e1006127.

You L, Tan L, Liu L, Shen R, Chaugai S, Wang DW, Cui W. ADAMTS7 locus confers high cross-race risk for development of coronary atheromatous plaque. *Mol. Genet. Genomics* 2015;

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364: 937-52.

Zdravkovic S, Wienke A, Pedersen NL, Marenberg ME, Yashin AI, De Faire U. Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20 966 Swedish twins. *J. Intern. Med.* 2002; 252: 247-54.

Zhang QJ, Goddard M, Shanahan C, Shapiro L, Bennett M. Differential gene expression in vascular smooth muscle cells in primary atherosclerosis and in stent stenosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 2030-6.

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992; 258: 468-71.

Zhang SH, Reddick RL, Burkey B, Maeda N. Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *J. Clin. Invest.* 1994; 94: 937-45.

IX. ANHANG

1. Material

1.1. Chemikalien

Tab. 5 verwendete Chemikalien

Chemikalie	Firma	Hauptsitz	Katalognummer
1X super optimal broth with catabolite repression (SOC) outgrowth medium	New England Biolabs	Ipswich, USA	B9020S
10X RIPA	New England Biolabs	Ipswich, USA	9806S
10X TRIS/glycine/SDS	Bio-Rad	Hercules, CA, USA	161-0772
2X laemmli	Bio-Rad	Hercules, CA, USA	1610737
2-propanol ROTIPURAN® ≥99.8 %	Carl Roth	Karlsruhe	6752
4X laemmli	Bio-Rad	Hercules, CA, USA	1610747
Antibody Diluent, Dako REAL	Agilent Technologies	St. Clara, USA	S202230-2
Amphotericin B solution (250 µg/mL in deionized water)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	A2942
β-mercaptoethanol	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	M3148
Color prestained protein standard, broad range (11-245 kDa)	New England Biolabs	Ipswich, USA	P7712S
cOplete, EDTA-free, EASYpack	Roche Life Science	Penzberg	4693159001
DMEM 4.5 g/l glucose w/ UltraGlutamine	Lonza	Basel, SUI	BE12-604F
Dulbecco's PBS solution without Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Merk Millipore/Biochrom	Billerica, USA	L 1825
EMPURA® ethanol absolute	Merck Millipore	Billerica, USA	1070172511
Endothelial cell growth medium MV	PromoCell	Heidelberg	C-22020

Endothelial cell growth medium MV SupplementMix	PromoCell	Heidelberg	C-39225
Ethanol denatured ≥ 96 %	Carl Roth	Karlsruhe	T171
Fetal bovine serum (FBS) superior	Merk Millipore/Biochrom	Billerica, USA	S 0615
FuGENE® HD transfection reagent		Madison, WI, USA	E2312
Formaldehyd - Lösung 4 % phosphatgepuffert für die Histologie	Appllichem GmbH	Darmstadt)	A3697
Gibco™ Geneticin® selective antibiotic (G418 Sulfate)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	11811031
Gibco™ Opti-MEM® I reduced serum medium	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	31985062
Gibco™ PBS (10X), pH 7.4	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	70011044
Gibco™ trypan blue solution, 0.4 %	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	15250061
Glycine PUFFERAN® ≥ 99 %	Carl Roth	Karlsruhe	3908
Goat Serum	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	G9023-10ML
Hämatoxylinlösung A nach Weigert	Carl Roth	Karlsruhe	X906.1
Hämatoxylinlösung B nach Weigert	Carl Roth	Karlsruhe	X907.1
HEPES buffered saline solution	PromoCell	Heidelberg	C-40020
Hydrochloric acid (HCl), 6 mol/l - 6 N	Carl Roth	Karlsruhe	281
Invitrogen™ Lipofectamine® RNAiMAX™ transfection reagent	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	13778150
Invitrogen™ UltraPure™ DNase/RNase-free distilled Water	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	10977035

Invitrogen™ UltraPure™ TRIS-borate-EDTA (TBE) buffer, 10X	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	15581028
Legumain siRNA (16542) 5 nmol	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	AM51331
Methanol (MeOH)	AppliChem	Darmstadt	131091
Natriumcitrat-Dihydrat	Carl Roth	Karlsruhe	4088.1
Nonfat dry milk powder <i>BioChemica</i>	AppliChem	Darmstadt	A0830
Novex™ MagicMark™ XP Western protein standard	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	LC5602
Penicillin-streptomycin (10,000 units penicillin/ml, 10 mg streptomycin/ml)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	P4333
Pertex®	Histolabs Products AB	Göteborg, SE	00814
PeqGREEN	VWR	Erlangen	37-5010
ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	P36935
Quick-Load® 2-Log DNA ladder (0.1-10.0 kb)	New England Biolabs	Ipswich, USA	N04695
Silencer Negative control No. 1 siRNA 5 nmol	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	AM4611
Thermo Scientific™ BupH™ phosphate buffered saline packs	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	87785
Tissue- Tek®, O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe B.V	Alphen aan den Rijn, NL	4583
TRIS hydrochloride (TRIS- HCl) PUFFERAN® ≥99 %	Carl Roth	Karlsruhe	9090
TRIS PUFFERAN® ≥99.9 %	Carl Roth	Karlsruhe	4855
Triton™-X-100	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	T8787
Trypsin neutralising solution (0.05 % trypsin inhibitor in 0.1 % BSA)	PromoCell	Heidelberg	C-41120

Trypsin-EDTA (0.04 %/0.03 %)	PromoCell	Heidelberg	C-41020
Tween® 20 <i>BioChemica</i>	AppliChem	Darmstadt	A1389
Universal agarose, peqGOLD	VWR	Erlangen	732-2789
Van Gieson-Lösung	Carl Roth	Karlsruhe	3925.2
Xylol	Carl Roth	Karlsruhe	9713.3
Zitronensäure	Sigma Aldrich	St. Louis	C-7254

1.2. Puffer, Medien und Lösungen

Standardpuffer und -lösungen

1X phosphate buffered saline (PBS)

Endkonzentration von 1 mM KH_2PO_4 , 0,16 M NaCl, 2,97 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4 bei Raumtemperatur

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

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

1X TRIS-borate-EDTA (TBE)

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

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

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

70 % v/v Ethanol

35 ml EMPURA® ethanol absolute (Merck Millipore)

ad 50 ml DNase/RNase-free water

Lagerung bei Raumtemperatur

Lösungen und Puffer für die Histologie0,1 % HCL-Lösung

15 ml HCL (2 mol)

ad 1000 Millipore Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

0,1 M Zitronensäure-Lösung

21,01g Zitronensäure (Sigma Aldrich, St. Louis,C-7254)

1000 ml Millipore Wasser

Lagerung bei 4 °C

0,1 M Natriumcitrat-Lösung

29,41g Natriumcitrat-Dihydrat(Carl Roth, Karlsruhe)

1000 ml Millipore Wasser

Lagerung bei 4 °C

Citratpuffer 500 ml

9 ml 0,1 M Zitronensäure-Lösung

41 ml 0,1 M Natriumcitrat-Lösung

450 ml Millipore Wasser

Lagerung bei 4 °C

0,1 % Triton-X Lösung

10 µl Triton-X

ad 10 ml PBS

Lagerung bei 4 °C

Puffer zum Blocken 10 %

1 ml Ziegen Serum (Sigma Aldrich)

9 ml PBS

Lösungen und Medien - Kultivierung von Zellen250 mg/ml Geneticin

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

ad 6 ml Millipore® Wasser

Die Geneticin-Lösung wurde mit Hilfe von 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

vSMC 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

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

Puffer und Lösungen – Western Blot1X radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer

10 ml 10X RIPA (New England Biolabs)

ad 100 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei -20 °C

2X Laemmli Puffer

Mit einer Endkonzentration von 355 mM β -mercaptoethanol

50 μ l β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

950 μ l 2X Laemmli (Bio-Rad)

Lagerung bei -20 °C

4X Laemmli Puffer

Mit einer Endkonzentration von 355 mM β -Mercaptoethanol

100 μ l β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

900 μ l 4X Laemmli (Bio-Rad)

Lagerung bei -20 °C

1X Elektrophorese Puffer

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

2 ml Tween® 20 (AppliChem)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

1X Transfer Puffer

3,03 g TRIS PUFFERAN® (Carl Roth)

14,4 g glycine PUFFERAN® (Carl Roth)

0,2 l methanol (AppliChem)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Lagerung bei Raumtemperatur

1X PBS-T

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

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

2 ml Tween® 20 (AppliChem)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

5 % w/v Milch in PBS

5 g Magermilchpulver (AppliChem)

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

Lagerung bei 4 °C für maximal 2 Tage

2.5 % w/v Milch in PBS-T

2,5 g Magermilchpulver (AppliChem)

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

Lagerung bei 4 °C für maximal 2 Tage

3 % w/v BSA in PBS

3 g Albumin Fraktion V (pH 7,0) (AppliChem)

ad 100 ml 1X PBS (siehe oben)

Lagerung bei 4 °C für maximal 2 Tage

nach Zugabe des Primärantiköpers: Lagerung bei -20 °C. Verwendung bis zu 5 mal.

Puffer und Lösungen – DurchflusszytometrieEnzymatischer Verdau (Gesamtvolumen 1ml/Probe):

45 µl Collagenase I

10 µl Collagenase XI

5 µl Hyaluronidase

20 µl HEPES Puffer

3,7 µl DNase I

916µl PBS

Puffer für die Durchflusszytometrie

500 ml PBS

2,5 g BSA 0,5 %

1.3. Medikamente

Tab. 6 verwendete Medikamente

Wirkstoff	Konzentration	Dosierung	Name	Firma	Hauptsitz
Atipamezol	5 mg/ml	2,5 mg/kg	Antisedan®	Orion Pharma	Espoo, FI
Buprenorphin	0,3 mg/ml	0,05 mg/kg	Temgesic®	RB Pharmaceuticals Limited	Berkshire, UK
Dexpanthenol	5 %		Bepanthen®, Augen- und Nasensalbe	Bayer AG	Leverkusen, D
Fentanyl	50 µl/ml	0,05 mg/kg	Fentadon®	Albrecht GmbH	Aulendorf, D
Flumazenil	0,5 mg/5ml	0,5 mg/kg	Flumazenil HEXAL®	Hexal AG	Holzkir-chen, D
Naloxon	0,4 mg/ml	1,2 mg/kg	Naloxon- rathiopharm®	Rathiopharm GmbH	Ulm, D
Natriumchlorid	0.9 %		isotonische Natriumchloridlö- sung 0.9 %	AlleMan Pharma	Pfullingen, D
Medetomidin	1 mg/ml	0,5 mg/kg	Dorbene vet	Zoetis	Madison, USA
Midazolam	15 mg/3ml	5,0 mg/kg	Midazolam- Ratiopharm	Rathiopharm GmbH	Ulm, D
Pentobarbital- Natrium	300 mg/ml	600 mg/kg	Release®	WDT	Garbsen, D

1.4. Zelllinien

Human embryonic kidney (HEK) 293 cells wurden freundlicherweise von Steffen Massberg (Medizinische Klinik und Poliklinik I, Ludwig-Maximilians-University München) zur Verfügung gestellt. HCAEC-c wurden von PromoCell (Heidelberg, D, C12221) bezogen.

1.5. Bakterien

Tab. 7 verwendete Bakterien

Plasmid/Vektor	Firma	Ort	Artikelnummer
Gateway® DEST40	pcDNA™- Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	12274015
HsCD00040833 Homo Sapiens	Legumain Harvard Medical School	Boston	HsCD00040833

1.6. Antikörper

Tab. 8 verwendete Antikörper

Primärantikörper	Firma	Ort	Artikelnummer
FACS Master Mix I			
PE anti-mouse Cd49b (pan-NK cells) Antibody	Biolegend	San Diego, USA	108908
PE-anti-mouse CD90.2 (Thy1.2) Antibody	Biolegend	San Diego, USA	140308
PE anti-mouse/human CD45/b220 Antibody	Biolegend	San Diego, USA	103208
PE anti-mouse NK 1.1 Antibody	Biolegend	San Diego, USA	108708
PE anti-mouse TER-119/Erythroid Cells Antibody	Biolegend	San Diego, USA	116208
PE anti-mouse Ly-6G Antibody	Biolegend	San Diego, USA	127608
FACS Master Mix II			
perCP/Cy5.5 anti-mouse CD45.2 Antibody	Biolegend	San Diego, USA	109828
Brilliant Violet 421 anti-mouse Ly-6C Antibody	Biolegend	San Diego, USA	128032
APC/Cy7 anti mouse/human Cd11b Antibody	Biolegend	San Diego, USA	101226
Pe/Cy7 anti-mouse F4/80Antibody	Biolegend	San Diego, USA	123114
Western Blot			
Legumain / Asparaginyl Endopeptidase Antibody 100µg	Thermo Fisher Scientific	Walstham, USA	PA5-47244
Immunfluoreszenz			

Fibronectin (H-300)	Santa Cruz Technology	Dallas, USA	Sc-9068
MMP2 antibody	Abcam	Cambridge, UK	Ab37150

1.7. Assays und Enzyme

Tab. 9 verwendete Assays/Enzyme

Assay/Enzym	Hersteller	Ort	Artikelnummer
Sekundärantikörper	Firma	Ort	Artikelnummer
Donkey anti-Sheep secondary antibody HRP	Thermo Fisher Scientific	Walstham, USA	A24561
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific	Walstham, USA	R37117
Invitrogen™ Gateway® BP Clonase® II enzyme mix (incl. Proteinase K, 2 µg/µl)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	11789020
Invitrogen™ Gateway® LR Clonase® II enzyme mix (incl. Proteinase K, 2 µg/µl)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	11791100
TaqMan® gene expression assay Hs00271599_m1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	4331182
TaqMan® gene expression assay Hs02758991_g1	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	4331182
TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA	4440040
OneTaq® Quick-Load® 2X Master Mix with Standard Buffer	New England Biolabs	Ipswich, MA, USA	M0486L

1.8. Kommerziell erhältliche Kits

Tab. 10 verwendete kommerziell erhältliche Kits

Kit	Hersteller	Ort	Artikelnummer
BlackPREP Rodent Tail DNA Kit	Analytik Jena	Jena, D	845-BP-0010250
CompactPrep Plasmid Maxi Kit	Quiagen	Hilden, D	27106
GeneElute™ plasmid miniprep kit	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA	PLN350-1KT
Mix2Seq kit	Eurofins Genomics	Ebersberg, D	
Pierce™ BCA protein assay kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	23225
Pierce™ ECL Western blotting substrate	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	32106
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, D	74106
ThermoScript™ RT-PCR system for first-strand cDNA synthesis	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	11146016
Trichorme Stain (Masson)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA	HT15-1KT
QIAshredder™	Qiagen	Hilden, D	79656
QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit	Agilent Genomics	Santa Clara, USA	200522

1.9. Primer

Salz-freie Primer wurden über Eurofins Genomics (Ebersberg Deutschland) bezogen. Diese wurden in einer Konzentration von 100 µM geliefert und mit DNase/RNase-freiem Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt und bei -20 °C gelagert.

1.10. Geräte

Tab. 11 verwendete Geräte

Geräte	Firma	Ort
Aesculap GT420	Aesculap Suhl	Suhl
AP 280-2 Paraffin Wax Cool/Heat PARTS	Microm	Walldorf
Applied Biosystems™ ViiA™ 7 real-time PCR system	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
BD LSRFortessa™	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Veriti® 96-Well Thermal Cycler	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
HM 340E Elektronisches Rotationsmikrotom	Thermo Fisher Scientific	Waltham , USA
Infinite® M200 PRO	Tecan Group	Männedorf, SUI
ImageQuant™ LAS 4000	GE Healthcare Life Sciences	Chicago, IL, USA
Kühlplatte COP 30	Medite GmbH	Burgdorf, D
Leica DMRB	Leica Mikroskopie& Systeme GmbH	Wetzlar, D
Leica DFC450C	Leica Mikroskopie& Systeme GmbH	Wetzlar, D
Leica CM1850 Kryostat	Leica Biosystems	Nussloch, D
Milli-Q® Reference	Merck Millipore	Billerica, USA
Mini-PROTEAN® tetra cell	Bio-Rad	Hercules, USA
Mini Trans-Blot® electrophoretic transfer cell	Bio-Rad	Hercules, USA
PowerPac™ Basic Power Supply	Bior-Rad	Hercules, USA
Stemi200C	Zeiss	Jena, D
Schwanenhalslampe Schott-Kaltlichtquelle KL200	Zeiss	Jena, D
Schwanenhalslichtleiter	Zeiss	Jena, D
Objekträger-Streichtisch OTS 40	Medite GmbH	Burgdorf, D
Paraffin-Streckbad TFB 45	Medite GmbH	Burgdorf, D
Scepter™	Merck Millipore	Billerica, USA
STP-120 Gewebeeinbettautomat	Microm	Walldorf, D
ThermoLuxWärmeunterlage	Wiite+Sutor	Murrhardt, D

Wheaton™ Micro Tissue Grinder With Cap, PTFE Pestle and Cap Liner	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Zeiss Axiovert 100	Carl Zeiss AG	Oberkochen, D
Zeiss AxioCam HRc	Carl Zeiss AG	Oberkochen, D

1.11. Software

Tab. 12 verwendete Software

Software	Hersteller	Ort	Anwendung
BD FACSDiva Software	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	FACS
CLC Main Workbench	CLC bio	Arhus, DK	Klonierung Sequenzanalyse
FlowJo	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA	FACS
GraphPad Software	GraphPad Prism® software version 6.0 version 6.0 for Mac OS X	La Jolla, USA	Statistische Analyse
ImageJ 1.47v	National Institutes of Health	Bethesda, USA	Scratch Wound Assay
ImageQuant™ LAS 4000 v1.2	GE Healthcare Life Sciences	Chicago, USA	Western Blot
ImageQuant™ TL 1D v8.1	GE Healthcare Life Sciences	Chicago, USA	Western Blot
LAS V4.5	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH,	Wetzlar	Morphometrische Analyse
STRING	STRING Konsortium 2016		Protein-Protein- Interaktionen
ViiA™ 7 software v1.2.2	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	qPCR
Zen lite 2012	Carl Zeiss AG	Oberkochen	Zellkultur

X. DANKSAGUNG

Bei der Durchführung meiner Doktorarbeit habe ich wertvolle Unterstützung erfahren. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Schunkert für die Überlassung des Forschungsthemas und seine stetige Unterstützung bedanken. Besonders seine neuen Ideen und die zahlreichen Diskussionen haben diese Arbeit vorangebracht.

Mein weiterer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Göbel für die Betreuung meiner Doktorarbeit, die konstruktiven Treffen und die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Thorsten Keßler, der immer ein offenes Ohr für mich hatte. Seine intensive Betreuung und aufmunternden Worte haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Michael Wierer aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried für seine Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung bei proteomischen und massenspektrometrischen Fragestellungen und die Durchsicht meines Manuskripts bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich beim Institut für Integrative und Experimentelle Genomik in Lübeck bedanken. Ganz besonders gilt mein Dank Dr. Zouhair Aherrahrou für die enge Zusammenarbeit und Betreuung bei meinen Aufenthalten in Lübeck.

Ein riesiges Dankeschön geht an meinen lieben Kollegen und Kolleginnen am Deutschen Herzzentrum. Ohne die vielen Kaffeepausen, die Klatsch- und Tratschgeschichten und eure Freundschaft wären die letzten Jahre nur halb so schön gewesen.

Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung bedanken. Danke, dass ihr immer für mich da seid!