

**Untersuchung der Rolle der
Hyaluronsäuresynthase 3 während des
Prozesses der phänotypischen Änderung
von glatten Muskelzellen im Atherosklerose-
Modell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Felicia Hartmann

aus Aachen

Düsseldorf, November 2021

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jens W. Fischer
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. rer. nat. Jens W. Fischer
2. Prof. Dr. rer. nat Axel Gödecke

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2022

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Atherosklerose	1
1.1.1 Pathogenese	2
1.1.2 Plaquestabilität	4
1.1.3 Glatte Muskelzellen in der Atherosklerose	5
1.1.4 Extrazelluläre Matrix in der Atherosklerose	8
1.2 Das Hyaluronsäure-System	9
1.2.1 Hyaluronsäure	9
1.2.2 Hyaluronsäuresynthesen	11
1.2.3 Hyaluronsäurerezeptoren und -bindeproteine	12
1.2.4 Abbau der Hyaluronsäure	13
1.2.5 Hyaluronsäure und Atherosklerose	14
1.2.6 Hyaluronsäure und glatte Muskelzellen	16
1.3 Ziele der Arbeit	16
2 Material und Methoden	21
2.1 Tierexperimentelle Arbeiten	21
2.1.1 Tiere	21
2.1.2 Studiendesign	22
2.1.3 Gewebepräparation nach Organentnahme	23
2.2 Validierung der SMC YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}-Maus	23
2.3 Blutanalysen	25
2.3.1 Blutglukosemessung	25
2.3.2 Triglyzerid- und Cholesteroll-Messungen	25
2.4 Histologie und Immunhistochemie	25
2.4.1 Hämatoxylin und Eosin (H&E)	27
2.4.2 Kollagen	28
2.4.3 Decorin	28
2.4.4 Hyaluronsäure	29
2.4.5 Dreifach-Färbung für YFP, LGALS3 und ACTA2	29
2.5 Aufnahme und Auswertung	30
2.5.1 Aufnahme der histologischen und immunhistologischen Färbungen	30

2.5.2	Bestimmung der Plaquegröße in der brachiocephalischen Arterie....	30
2.5.3	Quantitative Auswertungen der Färbungen	31
2.5.4	Bestimmung der Zellzusammensetzung.....	31
2.5.5	Polarisationsmikroskopie.....	32
2.5.6	LC-PolScope-Analyse	32
2.6	Einzelzell-RNA-Sequenzierung.....	33
2.6.1	Dissektion und Verdau	33
2.6.2	Zellzählung und -Sortierung	34
2.6.3	Analyse	34
2.7	Versuche an kultivierten Zellen	35
2.7.1	Kultur muriner glatter Muskelzellen	35
2.7.2	siRNA Transfektion zur Herunterregulierung von <i>Has3</i>	36
2.7.3	Die Stimulation der SMC-Dedifferenzierung zu Myofibroblasten- ähnlichen Zellen und der Einfluss von <i>Has3</i> -Defizienz und CD44- Blockierung	37
2.7.4	HA-Quantifizierung mittels HA-Immunoassay.....	38
2.8	Molekularbiologische Techniken.....	38
2.8.1	RNA-Isolation	38
2.8.2	Synthese von cDNA	38
2.8.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	38
2.9	Statistische Analysen.....	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Die Validierung der SMC <i>YFP</i>^{+/+} <i>ApoE</i>^{-/-} <i>HAS3</i>^{fl/fl}-Maus.....	41
3.1.1	Die Validierung der induzierbaren Rekombinationseffizienz von SMC- spezifischer YFP-Expression.....	42
3.1.2	Die Validierung der zellspezifischen <i>Has3</i> -Herabregulierung	43
3.1.3	Die Hyaluronsäureproduktion nach SMC-spezifischer <i>Has3</i> - Herabregulierung.....	45
3.1.4	Einfluss des humanisierten HAS3-Konstruktes auf die Läsionsentwicklung und HA-Deposition.....	46
3.2	Der Einfluss der SMC-spezifischen <i>Has3</i> auf die Plaquemorphologie der Atherosklerose.....	49
3.2.1	Körpergewicht und metabolische Parameter der Versuchstiere.....	49
3.2.2	Morphologische Charakterisierungen der atherosklerotischen Läsion	50
3.2.3	Plaquestabilitätsparameter und Extrazelluläre Matrix in der atherosklerotischen Läsion.....	52
3.3	Die Einzelzell-RNA-Sequenzierung atherosklerotischer Läsionen ..	58

3.3.1	Die Clusterung der atherosklerotischen Läsionen.....	58
3.3.2	Die Charakterisierung der 5 SMC-Populationen	60
3.3.3	Genexpressionssignaturen und <i>Gene ontology (GO) enrichment</i> - Analysen der kontraktilen und modulierten SMC	61
3.3.4	Die Charakterisierung der modulierten SMC	64
3.3.5	Die Plaquezusammensetzung nach SMC-spezifischer <i>Has3</i> - Herabregulierung.....	65
3.3.6	Zellzyklusanalysen	66
3.3.7	Genexpressionsanalysen und <i>GO-enrichment</i> -Analysen in Abhängigkeit der SMC-spezifischen <i>Has3</i> -Herabregulierung	67
3.4	Mechanistische Untersuchungen <i>in vitro</i>	69
3.4.1	Die Herabregulierung der murinen <i>Has3</i> mittels siRNA	69
4	Diskussion	74
4.1	Das HA-System als therapeutischer Ansatz in der Atherosklerose.	74
4.2	Die Effekte der SMC-<i>Has3</i> Herabregulierung auf die Atheroprogression	76
4.2.1	Der Einfluss von SMC- <i>Has3</i> auf die Läsionsgröße und die Gesamtplaquebelastung.....	77
4.2.2	SMC- <i>Has3</i> -Herabregulierung und der Einfluss auf Plaquestabilitätsparameter	78
4.2.3	Der SMC-Phänotyp nach SMC-spezifischer Deletion von <i>Has3</i>	80
4.3	Die Analyse der atherosklerotischen Läsion mittels Einzelzell-RNA- Sequenzierung	82
4.3.1	Die SMC-Populationen in der atherosklerotischen Läsion	82
4.3.2	Die Beeinflussung der SMC-Heterogenität durch SMC- <i>Has3</i> - Herabregulierung.....	84
4.4	Mechanistische Studien zur HAS3/HA/CD44-Interaktion	86
4.5	Offene Fragen und Ausblick	89
5	Zusammenfassung	91
6	Summary	92
7	Anhang	93
8	Abbildungsverzeichnis	98
9	Tabellenverzeichnis	101
10	Literaturverzeichnis	102
11	Originalarbeiten	116
12	Kongressbeiträge	117
13	Lebenslauf	118

14	Danksagung.....	119
15	Eidesstattliche Erklärung.....	120

Abkürzungsverzeichnis

4-MU	4-Methylumbelliferon
ACAN	Aggrecan
ACTA2	<i>Actin alpha2</i> , alpha-Glattmuskelaktin
ADGRE1	<i>Adhesion G protein-coupled receptor E1</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APOE	Apolipoprotein E
BCA	Brachiocephalische Arterie
BGN	<i>Biglycan</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
C3	<i>Complement 3</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDH5	Cadherin 5
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CEMIP	<i>Cell migration-inducing protein</i>
CHIL1	Chitinase 1
CHIP-Seq	<i>Chromatin immuno precipitation DNA sequencing</i>
CNN1	Calponin1
CO ₂	<i>Carbon dioxide</i>
COL	<i>Collagen</i>
CVD	<i>Cardiovascular disease</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCN	Decorin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGR1	<i>Early growth response protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ERK	Extrazellulärsignal-regulierte Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FABP4	<i>Fatty acid binding protein 4</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FC	<i>Fibrous cap</i>

FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	<i>Fluoresceinisothiocyanat</i>
FLP	<i>Flippase</i>
FMOD	Fibromodulin
FN1	Fibronektin 1
FRP	<i>Flippase recognition target</i>
FSG	<i>Fish skin gelatin</i>
FTH1	<i>Ferritin heavy chain 1</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GlcA	Glukuronsäure
GlcNAC	N-Acetylglukosamin
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GDF10	<i>Growth differentiation factor 10</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H&E	<i>Hematoxylin and eosin (histological staining)</i>
HA	<i>Hyaluronic acid</i>
HABP	Hyaluronsäure-Bindeprotein
HAPLN1	<i>Hyaluronan and proteoglycan link protein 1</i>
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HCl	Salzsäure
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HMW-HA	<i>High molecular weight HA</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HYAL	Hyaluronidase
IBSP	<i>Integrin-binding sialoprotein</i>
IL1 β	Interleukin-1 β
i.p.	Intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
JUN	<i>Jun proto oncogene</i>
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KLF4	<i>Kruppel-like factor 4</i>

KO	<i>Knockout</i>
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LBP	<i>Lipopolysaccharid binding protein</i>
LC	<i>Liquid crystal</i>
LCN2	Lipocalin 2
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LEE	Lamina elastica externa
LEI	Lamina elastica interna
LGALS3	Galectin-3
LMW-HA	<i>Low molecular weight HA</i>
loxP	<i>Locus of X-over P1</i>
LUM	Lumican
LYVE1	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor</i>
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
MAC	Makrophage
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMPs	Matrixmetalloproteinase
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MYH11	<i>Myosin heavy chain 11</i>
NaCl	Natriumchlorid
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
OCT4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
oxLDL	Oxidiertes <i>low-density lipoprotein</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCA	<i>Prinicpal component analysis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PRDX1	Peroxiredoxin 1
PTPRC	<i>Protein tyrosine phosphatase receptor type C</i>
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RBC	<i>Red blood cell</i>

RHAMM	<i>Receptor for hyaluronan-mediated motility</i>
RT	Raumtemperatur
SAA	Serumamyloid A
SD	<i>Standard deviation</i>
SEM	<i>Standard error mean</i>
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
SMC	<i>Smooth muscle cell</i>
SM-MHC	<i>Smooth Muscle Myosin Heavy Chain</i>
SPARC	Osteonectin
SPP1	Osteopontin
TAGLN	Transgelin
TCF21	<i>Transcription factor 21</i>
TER119	<i>Lymphocyte antigen 76</i>
TGF β 1	<i>Transforming growth factor-β1</i>
Th-Zelle	T Helfer Zelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNFRSF11b	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily 11b</i>
UMAP	<i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
WD	Western Diät
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp
YFP	<i>Yellow fluorescence protein</i>

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

Im Jahr 2016 verzeichnete die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) 17,9 Millionen Todesfälle weltweit aufgrund von kardiovaskulären Erkrankungen (*cardiovascular diseases*, CVD). Mit dieser Anzahl machen CVD 31% aller Todesfälle aus und sind die Haupttodesursache weltweit [1]. Die Bezeichnung CVD umfasst eine Gruppe von Erkrankungen, die alle durch Fehlfunktionen im Herzen oder im Gefäßsystem entstehen und beinhaltet unter anderem die periphere arterielle Verschlusskrankheit, die koronare Herzkrankheit und die arterielle Hypertonie. Rund 85% aller Todesfälle, welche durch kardiovaskuläre Erkrankungen verursacht sind, lassen sich auf den Myokardinfarkt oder den Schlaganfall zurückführen [1]. Als zugrundeliegende Ursache gilt die Atherosklerose, eine chronisch progressive und entzündliche Erkrankung der Arterien [2]. Verschiedene Risikofaktoren können diese auslösen und ihren Verlauf negativ beeinflussen. Dabei spielen genetische Faktoren und Alter eine Rolle, aber auch der persönliche Lebensstil. Gerade in den westlichen Industrieländern führt ein ungesunder Lebensstil häufig aufgrund von fett- und zuckerhaltigem Essen, Rauchen und geringer körperlicher Betätigung zum Metabolischen Syndrom, welches einhergeht mit Fettleibigkeit, Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörung und Insulinresistenz. Dies erhöht die Prävalenz zu atherosklerotischen Gefäßveränderungen drastisch und damit einhergehend die Gefahr für sich anschließende thromboembolische Ereignisse [3]. Zurzeit gibt es noch keine Möglichkeit Atherosklerose zu heilen. Die Therapie besteht in der Verlangsamung der Progression, was in erster Linie durch Reduktion der Risikofaktoren erzielt werden kann. Neben der Verbesserung des Lebensstils können Statine durch Normalisierung der Blutfettwerte eine gezielte Reduktion des Risikos für kardiovaskuläre Ereignisse ermöglichen [4, 5]. Aufgrund der steigenden Bedeutung des Immunsystems im Krankheitsverlauf, könnte auch eine antiinflammatorische Therapie einen neuen Ansatz darstellen. Erste klinische Studien diesbezüglich, wie die Gabe von Methotrexat oder die antiinflammatorische Therapie mit Canakinumab wurden kürzlich bereits erfolgreich durchgeführt [6-8]. Aufgrund der wenigen, bisher verfügbaren Therapieoptionen und der hohen Sterblichkeitsrate die mit den Komplikationen der Atherosklerose einhergeht, ist es ein sehr wichtiger Ansatz, die Pathogenese der Erkrankung weiter aufzuklären, um neue potentielle Therapiestrategien zu entwickeln.

1.1.1 Pathogenese

Die Progression der Atherosklerose beginnt meist schon in jungen Jahren, verläuft symptomlos und bleibt daher über Jahrzehnte unentdeckt [9]. Über die Jahre kann die Bildung von Plaques zu Gefäßverengungen führen und so den Blutfluss reduzieren, bis hin zum vollständigen Verschluss eines Gefäßes. Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung entstehen häufig Plaquerupturen oder oberflächliche Plaqueerosionen, was zur Freilegung von thrombogenen Substanzen wie Phospholipiden, Gewebefaktor und Matrixmolekülen aus dem Plaqueinneren führen kann [10]. Die sich dann bildenden Thromben können mit dem Blutfluss in koronare oder zerebrale Gefäße wandern und dort zu einem Verschluss führen. Die daraus resultierende Ischämie führt dann zur klinischen Manifestation eines Myokardinfarktes oder Schlaganfalls [11].

Um die Veränderungen in der Gefäßwand, welche zu diesen Ereignissen führen können, besser zu verstehen, muss man zunächst den histologischen Aufbau und die Zellzusammensetzung der einzelnen Gefäßwandschichten genauer betrachten. Ein gesundes Gefäß besteht aus drei verschiedenen Schichten. Die äußere Schicht ist die Adventitia, eine fibroblastenreiche Bindegewebsschicht, deren Aufgabe darin besteht, die innen liegende Media zu stützen. Sie spielt des Weiteren eine wichtige Rolle bei der Gefäßentwicklung und -reparatur [12], in der Versorgung des Gefäßes über Nervenbahnen und kleinere Gefäße sowie in der Migration von Immunzellen im fortgeschrittenen Stadium der Atherosklerose [13, 14]. Getrennt wird die Adventitia durch die *Lamina elastica externa* (LEE) von der Media, welche aus ringförmig angeordneten glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) gebildet wird. Diese halten die Stabilität des Gefäßes aufrecht und kontrollieren den Blutdruck durch Kontraktion und Dilatation [15]. Die Media wird durch die *Lamina elastica interna* (LEI) von der inneren Schicht, der Intima, getrennt. Die Intima besteht aus einer Endothelzellschicht und einer Basalmembran und grenzt die Gefäßwand zum Lumen hin ab [16].

Die Entstehung einer atherosklerotischen Läsion wird initiiert durch eine Schädigung mit sich anschließender Dysfunktion des Endothels. Dies führt zu einer vermehrten Durchlässigkeit des Endothels und erlaubt die Einlagerung und Ansammlung von Lipiden geringerer Dichte (*low density lipoprotein*, LDL) in der Gefäßwand. Diese LDL-Partikel werden modifiziert und oxidiert (oxLDL). Das angesammelte oxLDL verstärkt eine Aktivierung der Endothelzellen und fördert die Produktion proinflammatorischer Faktoren. Dadurch werden Leukozyten rekrutiert, die in die Gefäßwand infiltrieren und das oxLDL phagozytieren. Auch phänotypisch modulierte SMC migrieren aus der Media ein und können das oxLDL [17] aufnehmen. Aus den phagozytierenden Makrophagen

und SMC entwickeln sich dann Schaumzellen, welche mit der Zeit charakteristische Fettstreifen in der Gefäßwand ausbilden. Haben die Schaumzellen ihre maximale Aufnahmekapazität erreicht, durchlaufen sie die Apoptose und werden im Anschluss durch Efferozytose eliminiert [18]. Durch die genannten Prozesse werden Chemokine und Zytokine freigesetzt, die zur Rekrutierung neuer Immunzellen führen. Diese unterstützen die Inflammation und führen zu immer weiterer Progression der Atherosklerose. In fortgeschrittenen Läsionen kann keine suffiziente Entfernung der apoptotischen Zellen mehr stattfinden, so dass es zu einer sekundären Nekrose mit Ausbildung eines nekrotischen Kerns kommt, welcher überwiegend Zellbruchstücke und Cholesterolkristalle enthält. Neben Immunzellen akkumulieren auch SMC in atherosklerotischen Läsionen. Mediale SMC migrieren in die Läsion und sind oftmals im luminalen Teil der Plaques präsent. Dort produzieren sie große Mengen an extrazellulärer Matrix (EZM) und bilden eine schützende fibrotische Kappe (FC) aus, welche die Plaques zum Lumen hin abgrenzt. Es ist bekannt, dass rupturanfällige Plaques oft dünnere fibrotische Kappen und große nekrotische Kerne mit Lipideinlagerungen enthalten [19-21]. Die charakteristischen Stadien der atherosklerotischen Läsionsentwicklung sind in **Abbildung 1** dargestellt.

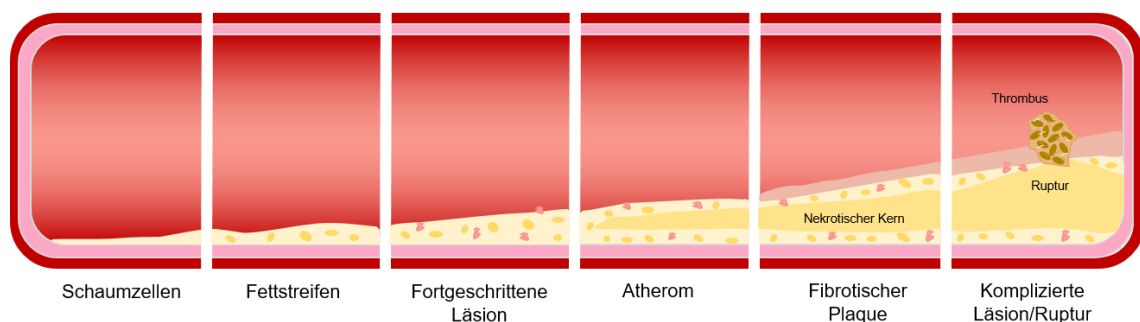


Abbildung 1: Charakteristische Stadien der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.

Die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen wird initiiert durch eine endotheliale Dysfunktion und verläuft zu Beginn asymptomatisch. In das durchlässige Endothel lagert sich LDL ein, welches durch phagozytierende Zellen aufgenommen wird. Diese Zellen werden zu Schaumzellen und bilden über die Zeit einen an die Gefäßwand angelagerten Fettstreifen. In die fortgeschrittene Läsion wandern immer mehr Immunzellen ein und fördern die Inflammation. Mit der Zeit bildet sich ein nekrotischer Kern, welcher Cholesterollipide und Zellbruchstücke enthält und das Stadium eines Atheroms definiert. SMC migrieren aus der Media und bilden oberhalb des Atheroms eine schützende, fibrotische Kappe aus. In späten Stadien der Atherosklerose und mit zunehmendem Volumen der Plaques steigt das Risiko für Rupturen, welche im Verlauf zu thromboembolischen Ereignissen führen können. Die Abbildung wurde modifiziert nach Koenig *et al.* [22].

1.1.2 Plaquestabilität

Ist eine atherosklerotische Läsion erst einmal vorhanden, spielen Beschaffenheit und Stabilität der Plaques für den weiteren Verlauf der Erkrankung eine große Rolle. Generell können Plaqueeerosionen oder Plaquerupturen zu thromboembolischen Ereignissen führen. Beide Ereignisse unterscheiden sich stark im Aufbau des Thrombus und der Zusammensetzung der Läsion. Bei der Plaqueeosion liegt meist eine stabile Läsion vor, die reich an SMC und EZM ist, eine intakte FC besitzt und häufig neutrophile extrazelluläre Fallen (*neutrophile extracellular traps*, NETs) enthält. Bei diesen handelt es sich um DNA-Strukturen aus neutrophilen Granulozyten, welche Proteine wie Myeloperoxidasen oder neutrophile Elastasen enthalten können und der Abwehr von Mikroorganismen dienen [23]. Eine endotheliale Erosion findet meist nach Schädigung des Endothels durch metabolische Effekte oder die Immunantwort statt und es kann trotz stabiler Läsion zur Thrombenbildung kommen.

Es ist jedoch bekannt, dass die Mehrheit der Myokardinfarkte durch die Ruptur der schützenden FC, welche die Plaques vom Lumen abgrenzt, entsteht [24]. Besonders anfällig für solche Plaquerupturen sind die vulnerablen Plaques. Sie sind charakterisiert durch große Lipidansammlungen, viele Makrophagen, sowie eine SMC- und Kollagenarme FC. Entzündungsmediatoren können sowohl die Überexpression von Kollagenasen fördern, als auch die Kollagensynthese reduzieren und somit die biomechanische Integrität der FC beeinträchtigen [22]. Des Weiteren können sie auch die Expression des prokoagulierenden Gewebefaktors initiieren, der im Falle einer Plaqueruptur eine Thrombose auslöst. Eine stabile Läsion wird meist definiert über eine dicke, α -Glattmuskelaktin (ACTA2)- und EZM-reiche FC, kleinere Lipidareale und eine geringe Anzahl an Makrophagen (siehe **Abbildung 2**).

Bei der Untersuchung von Plaques stützen sich viele Forschungsarbeiten darauf, dass ACTA2⁺-Zellen grundsätzlich von SMC abstammen, wohingegen CD68⁺-Zellen (Makrophagenmarker) ausschließlich myeloiden Ursprungs sind. Da diese Ergebnisse kürzlich widerlegt wurden, ist die Erforschung der genauen Zusammensetzung fortgeschrittener Läsionen in den letzten Jahren in den Vordergrund geraten.

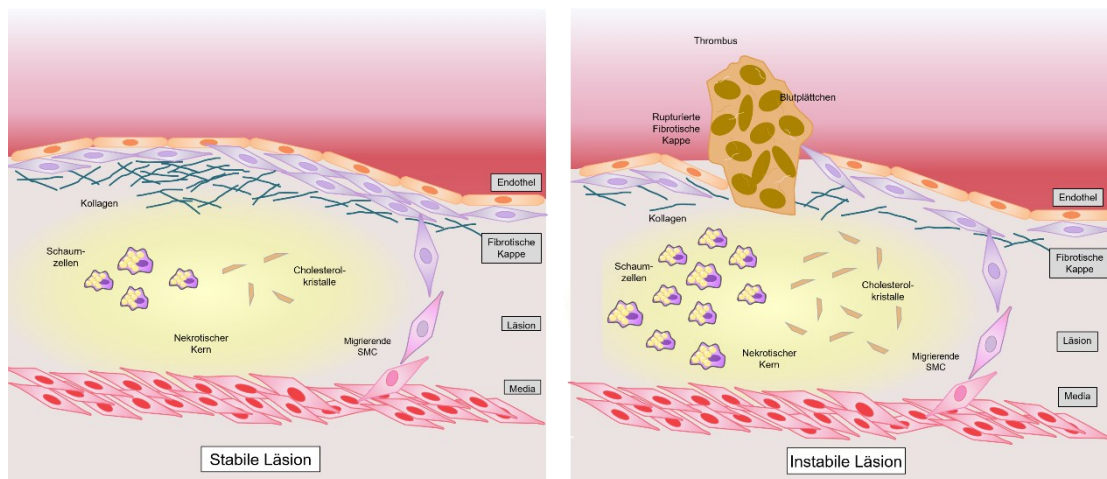


Abbildung 2: Charakterisierung der Läsionsstabilität.

Eine stabile Läsion zeichnet sich hauptsächlich durch eine ACTA2-reiche, kräftige fibrotische Kappe aus, die viel Kollagen und andere EZM-Bestandteile enthält, sowie wenige Makrophagen und Schaumzellen. Eine instabile Läsion hingegen ist charakterisiert durch eine dünne fibrotische Kappe, mit wenig ACTA2⁺-Zellen, wenig EZM-Deposition und einem hohen Anteil an CD68⁺-Zellen. Des Weiteren enthält diese meist einen großen, cholesterol- und lipidreichen Kern. Die Abbildung wurde modifiziert nach Libby, P. *et al* [10].

1.1.3 Glatte Muskelzellen in der Atherosklerose

Im gesunden Gefäß befinden sich kontraktile, vaskuläre SMC in der Media, um dort ihrer Aufgabe in der Blutdruckregulierung nachzukommen. Dieser kontraktile Phänotyp wird charakterisiert über eine geringe Proliferationsrate und EZM-Synthese. Im Laufe der Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion, wandern SMC aus der Media in die Plaques ein. Lange Zeit galten SMC in der Läsion als Hauptbestandteil der schützenden FC und durchweg als atheroprotektiv [25, 26]. Unter den pathophysiologischen Bedingungen in den Plaques können SMC jedoch ihre Eigenschaften verändern und von einem kontraktilen zu einem synthetischen Phänotyp differenzieren [27]. Dieser zeichnet sich durch vermehrte EZM-Produktion sowie gesteigerte Proliferation und Migration aus. Der Einfluss dieser Prozesse auf die Entwicklung der Atherosklerose ist noch nicht eindeutig aufgeklärt, könnte aber aufgrund der wichtigen Rolle von SMC für die Stabilisierung von Läsionen eine potentielle neue Zielstruktur in der Behandlung darstellen.

In atherosklerotischen Läsionen begünstigen proatherogene Faktoren wie oxLDL, Cholesterol, *Platelet-derived growth factor* (PDGF) oder Interleukin-1 β (IL1 β) die Differenzierung von SMC [28-30]. Diese phänotypische Veränderung geht mit dem Verlust von traditionellen, SMC-spezifischen Genen, wie ACTA2, *smooth muscle myosin heavy chain* (SM-MHC), *myosin heavy chain 11* (MYH11) oder Transgelin (TAGLN)

einher [31, 32]. Darüber hinaus sind SMC in der Lage, neben dem Verlust ihrer traditionellen Marker auch Marker anderer Zelltypen auszubilden und deren Eigenschaften anzunehmen [29, 33-36]. *Lineage Tracing*-Studien an Mäusen innerhalb der letzten Jahre, sowie Untersuchungen an menschlichen Läsionen haben gezeigt, dass bis zu 80% der SMC innerhalb der Plaques ihre traditionellen Markerproteine verlieren. Darüber hinaus stammen 30% der Zellen, die mittels immunhistochemischer Untersuchungen als Makrophagen analysiert werden, ursprünglich von SMC ab [37]. Die genauere Untersuchung dieser makrophagenmarker-exprimierenden SMC zeigte, dass diese zwar zur Anzahl der Schaumzellen in der Läsion beitragen, jedoch über schlechtere Phagozytosekapazitäten verfügen als von myeloiden Zellen abstammende Makrophagen [38]. Darüber hinaus war die Ausprägung von Makrophagenmarkern (Galectin-3, LGALS3) direkt abhängig vom Stammzellfaktor *kruppel-like factor 4* (KLF4). In einem *Klf4-knockout* (KO)-Mausmodell verzeichneten die entsprechenden *Klf4*-defizienten Tiere signifikant verringerte Läsionsgrößen sowie erhöhte Plaquestabilitätsparameter [37]. In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch der Stammzellfaktor *octamer-binding transcription factor 4* (OCT4) kritisch in die Differenzierung von SMC involviert ist. Herunterregulierung dieses Faktors führte in Apolipoprotein E (*ApoE*)-defizienten Mäusen zu signifikant vergrößerten Läsionen sowie reduzierter Plaquestabilität [39]. Alencar *et al.* konnten in Chromatinimmunopräzipitations-DNA-Sequenzierungen (CHIP-Seq) zeigen, dass KLF4 und OCT4 nahezu gegensätzliche Genexpressionsmuster kontrollieren und, dass mehr als 80% der durch KLF4/OCT4 regulierten Gene die phänotypische Modulation von SMC in atherosklerotischen Läsionen beeinflussen können [35]. Kürzlich konnten Wirka *et al.* nachweisen [34], dass auch die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors-21 (TCF21), das kausale Gen des CVD-assoziierten Locus auf Chromosom 6q23.2 [40-42], kritisch die Phänotypenmodulation von SMC beeinflusst. Einzelzell-RNA-Sequenzierungen (scRNA-Seq) zeigten, dass die *Tcf21*-Expression während der phänotypischen Modulation von SMC erhöht ist und diese ebenfalls einhergeht mit erhöhten Genexpressionen von *Lgals3* und Matrixmolekülen, inklusive Fibronektin 1 (*Fn1*), Kollagen 1 (*Col1a1*), Lumican (*Lum*), Decorin (*Dcn*) und Biglykan (*Bgn*). Sie wiesen nach, dass LGALS3 nicht wie zuvor angenommen ein Marker für Makrophagen-ähnliche SMC darstellt, sondern viel mehr ein Marker für phänotypische Modulation ist. Darüber hinaus war eine *Tcf21*-Expression in Menschen verbunden mit verringertem CVD-Risiko und in erkrankten humanen Koronararterien ebenfalls stark assoziiert mit der phänotypischen Modulation von SMC. Auch Alencar *et al.* konnten zeigen, dass

phänotypisch modulierte SMC *Lgals3* positiv sind und vermehrt Matrix produzieren können [35]. Sie wiesen außerdem nach, dass *Lgals3*⁺ SMC nicht einen einzelnen Phänotyp repräsentieren, sondern für einen Übergangszustand stehen, welchen kontraktile SMC auf dem Weg zu modulierten Phänotypen durchlaufen. In Abhängigkeit des jeweiligen Zell-Phänotyps kann vermehrt produzierte Matrix gemäß der entsprechenden Arbeit jedoch auch einen negativen Einfluss auf die Läsionsstabilität nehmen. So konnten sie einen osteogenen Zellphänotypen nachweisen, der vermutlich zu vermehrter Plauekalzifizierung und -destabilisierung führt [35]. In einem Modell einer Doppelrekombinasen-*Lineage Tracing*-Maus konnte weiterhin gezeigt werden, dass *Lgals3* eine wichtige Rolle für die Migration der SMC aus der Media in die Läsion spielt und der Großteil der Zellen in der schützenden FC einen *Lgals3*⁺-Zustand durchlaufen hat [35]. Kürzlich konnten auch Pan *et al.* in ihrer Arbeit unterschiedliche *Lgals3*⁺-Zelltypen in atherosklerotischen Läsionen von Mensch und Maus nachweisen, die von SMC abstammten. Darunter befindet sich auch ein intermediärer Zellzustand, der positiv für **Stammzell**-, **Endothelzell**- und **Makrophagenmarker** war und als SEM-Zustand bezeichnet wird. Sie zeigten ferner, dass SMC aus diesem intermediären Zustand in osteochondrogene oder fibrochondrogene Zellen differenzieren können. Auch ein Übergang von intermediären Zellzuständen zurück zu einer kontraktilen SMC ist nachgewiesenermaßen möglich [36]. Die Studien der letzten Jahre zeigen also, dass in der bisherigen Forschung der Beitrag von SMC in der Atherosklerose stark unterschätzt wurde und dass eine Charakterisierung ihrer Eigenschaften über traditionelle Marker allein nicht ausreichend ist. Des Weiteren können SMC sowohl positiv als auch negativ auf den Verlauf der Atheroprogression einwirken, abhängig von ihren Phänotypen, ihrer Herkunft und ihrer Anzahl in der Läsion. Eine Darstellung über die flexible Plastizität von SMC in atherosklerotischen Läsionen ist in **Abbildung 3** dargestellt.

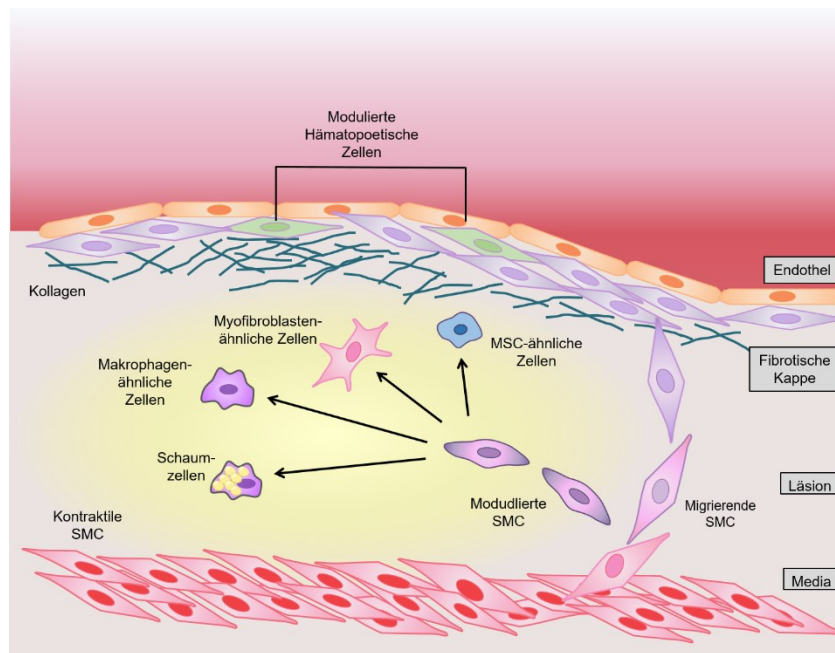


Abbildung 3: Schematische Zusammenfassung der SMC-Plastizität in atherosklerotischen Läsionen.

Die Identifikation von SMC über ihre traditionellen Marker ist lange Zeit mit ihrem Beitrag zur Plaquestabilität verbunden worden. Jüngste Studien unter Verwendung von *Lineage Tracing*-Systemen zeigen jedoch, dass SMC unter pathophysiologischen Bedingungen nicht nur ihre kontraktile Funktion verlieren, sondern auch ihre typischen Marker herabregulieren können. Darüber hinaus können SMC auch Marker von Makrophagen, mesenchymalen Stammzellen (MSC), Myofibroblasten oder anderen Zelltypen ausbilden und phagozytierende Eigenschaften entwickeln. Dieser Übergang wird unter anderem reguliert über den Stammzellfaktor KLF4. Die Abbildung wurde modifiziert nach Bennett *et al.* [17].

1.1.4 Extrazelluläre Matrix in der Atherosklerose

SMC sind Hauptproduzenten der EZM. Die EZM ist ein komplexes System und ein wesentlicher Bestandteil des menschlichen Körpers. Sie besteht aus einer Vielzahl an Molekülen wie Proteoglykanen, Kollagenen, Elastinen, Lamininen, Polysachhariden und Fibronectinen. Ihre Integrität ist wichtig für die ordnungsgemäße Funktion verschiedener Organe, eine Fehlfunktion ist häufig assoziiert mit Erkrankungen wie Atherosklerose, aber auch Restenosen und Herzinsuffizienz [43]. In gesunden Gefäßen befinden sich in der Intima Endothelzellen, welche auf einer Basalmembran sitzen, angereichert mit Laminin, Fibronectin und Kollagen Typ IV. In der Media befinden sich SMC, eingebettet in fibrilläre Kollagene I und III sowie IV und XVIII, Fibronectin und Proteoglykane. Die Adventitia wiederum ist reich an Fibroblasten, Kollagen I und III sowie Elastin [44]. Über Rezeptorbindungen können die EZM-Bestandteile extrazelluläre Signale vermitteln und darüber Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen steuern. Durch pathologische

Veränderungen des Gefäßes kann die Integrität der EZM gestört werden. Dabei sind Matrixmetalloproteinasen (MMPs) die Hauptakteure in der Umgestaltung der EZM unter pathologischen Bedingungen [45]. Durch Degradierung von EZM-Komponenten werden zuvor gebundene Substanzen freigesetzt, beispielsweise Wachstumsfaktoren oder Zytokine. Diese rufen Veränderungen im zellulären Bereich hervor, wie Migration oder Proliferation. Neben der Degradierung durch MMPs haben EZM-Komponenten aber auch direkten Einfluss auf das zelluläre Verhalten. So beeinflusst fibrilläres Kollagen I direkt den Monozyten-zu-Makrophagen-Übergang [44, 46] sowie die Proliferation und Migration von SMC im Gefäß [47-49]. Vaskuläre Verletzungen induzieren die Produktion von Kollagen VIII, ein kurzkettiges, nicht fibrilläres Kollagen [50]. Auch dieses kann die Proliferation von SMC beeinflussen [51] und wird in fortgeschrittenen, atherosklerotischen Läsionen insbesondere von SMC und Makrophagen gebildet [52]. Es wurde auch beobachtet, dass Kollagen die phänotypische Änderung von SMC vom kontraktilen zum synthetischen Typ beeinflusst [53].

Eine weitere wichtige Rolle in der Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen spielen die Glykosaminoglykane (GAG). Vor allem chondroitinsulfathaltige Proteoglykane in der Gefäßwand sind involviert in die Bindung von LDL und fördern damit die Akkumulation von Lipiden in der Läsion [54, 55]. Decorin, welches neben Chondroitinketten ebenfalls Ketten aus Dermatansulfat aufweist, hat aber auch Einflüsse auf die EZM-Synthese und -organisation. Es bindet und vernetzt unter anderem Kollagen [56] und trägt darüber zur Fibrillogenese und Reifung bei [57-59]. Zusätzlich zu einer direkten Einwirkung auf die Organisation anderer EZM-Bestandteile kann Decorin auch indirekt zelluläre Prozesse beeinflussen. So kann es beispielsweise die Aktivität von Zytokinen und Wachstumsfaktoren beeinflussen, welche an der Regulation von Zellproliferation und EZM-Produktion beteiligt sind. Studien haben gezeigt, dass Decorin *Transforming Growth Factor 1 β* (TGF β 1) bindet und inaktiviert [60-62]. Neben GAG spielt auch das Polysaccharid Hyaluronsäure (*hyaluronic acid*, HA) eine wichtige Rolle in der Atherogenese. Im folgenden Abschnitt wird ihr Einfluss näher beschrieben.

1.2 Das Hyaluronsäure-System

1.2.1 Hyaluronsäure

HA gehört zu der Gruppe der GAG und ist ein lineares Polysaccharid, bestehend aus alternierenden D-Glukuronsäure (GlcA)- und N-Acetyl-D-Glukosamin (GlcNAc)-Einheiten. Diese sind jeweils β -1,3- bzw. β -1,4-glykosidisch verknüpft (**Abbildung 4**).

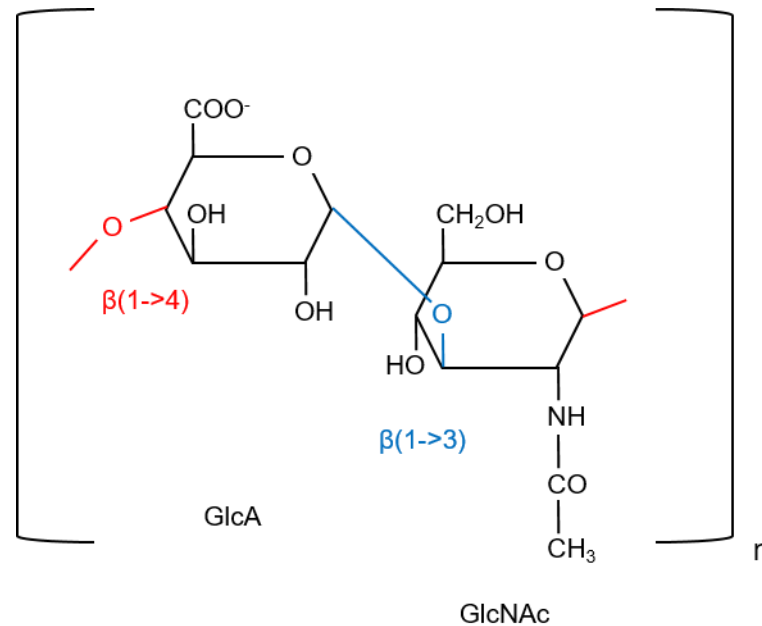


Abbildung 4: Darstellung der chemischen Struktur der Hyaluronsäure.

Die Abbildung wurde modifiziert nach Jiang *et al.* [63].

Anders als andere GAG, ist HA nicht sekundär modifiziert, beispielsweise durch Sulfatierung [64, 65]. HA-Ketten sind auch nicht an Kernproteine gebunden, so wie es bei anderen GAG der Fall ist [63].

HA besitzt sehr komplexe biologische Funktionen. Sie liegt unter physiologischen Bedingungen negativ geladen vor und ist in der Lage, große Mengen an Wasser zu binden. Damit wird ein optimales Milieu geschaffen, um Zellmigration und Proliferation zu fördern [66, 67]. Im Körper ist sie in großen Mengen insbesondere in der Haut, im Glaskörper des Auges, in der Gelenkflüssigkeit sowie der Nabelschnur vorhanden [68]. HA kommt sowohl als hochmolekulargewichtige HA (*high molecular weight* HA, HMW-HA) sowie auch als HA-Fragmente vor. Abhängig von der Größe ändern sich die Eigenschaften stark. So kommt HMW-HA überwiegend in gesundem Gewebe vor. Hier kommt sie ihrer Aufgabe als Wasserspeicher nach, beeinflusst aber auch das Zellverhalten durch die Bereitstellung einer Matrix für Zellmigration und –adhäsion [69]. Des Weiteren hat sie antiapoptotische Effekte auf verschiedene Zelltypen, unter anderem auch SMC [70]. Unter pathophysiologischen Bedingungen liegt HA in unterschiedlichen Größen vor, häufig ist mehr niedermolekulargewichtige HA (*low molecular weight* HA, LMW-HA) vorzufinden. Eine Anreicherung von HA wurde bei verschiedenen Krankheitsbildern wie vaskulären Pathologien oder Tumoren nachgewiesen [71, 72].

1.2.2 Hyaluronsäuresynthasen

HA wird im Gegensatz zu den anderen GAG nicht am Golgi-Apparat oder Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, sondern von drei plasmamembranständigen Synthasen (HAS1-HAS3) gebildet [65, 73]. Diese Enzyme extrudieren die wachsenden Polymerketten direkt in den Extrazellulärraum [74]. Dies erlaubt einen hohen Polymerisierungsgrad und führt zu Molekulargewichten von 10^5 bis 10^7 Dalton. Alle drei HA-Synthasen unterscheiden sich nur sehr gering in ihrer Aminosäuresequenz und sind je nach Gewebe oder Zelltyp unterschiedlich stark exprimiert. Sie unterscheiden sich allerdings in ihrer enzymatischen Aktivität und Funktion, abhängig von ihrer Lokalisation [75, 76]. Große Unterschiede in ihren biologischen Effekten zeigen sich auch in verschiedenen Mausmodellen. So ist eine embryonale *Has2*-Defizienz von Mäusen aufgrund einer defekten Herzfunktion letal [77], wohingegen eine konstitutive *Has1*- beziehungsweise *Has3*-Defizienz ohne Fehlentwicklung des Embryos möglich ist. Eine Vielzahl von Faktoren, einschließlich Wachstumsfaktoren, Zytokinen und verschiedene metabolische Bedingungen sind dafür bekannt, die HA-Synthese zu beeinflussen [78-80]. So erhöhen beispielsweise TGF β 1, PDGF und IL1 β die HA-Synthese [81-83]. Auch der Glukosehaushalt spielt in der Synthese eine Rolle, da er die Monosaccharidbausteine UDP-GlcA und UDP-GlcNAc für die HA-Synthese liefert [84]. Im Fokus dieser Arbeit liegt ausschließlich die HAS3. Im humanen Genom liegt diese auf dem Chromosom 16q22.1, in der Maus auf Chromosom 8 [85]. Es gibt zwei verschiedene Transkriptvarianten für HAS3, die für zwei verschiedene Isoformen kodieren. HAS3v1 besteht aus 1659 Basenpaaren, HAS3v2 aus 846 [86]. Es ist jedoch nicht bekannt, ob HAS3v2 tatsächlich HA synthetisieren kann [87]. HAS3 könnte eine wichtige neue therapeutische Zielstruktur darstellen, da eine *Has3*-Deletion in Mäusen unter physiologischen Bedingungen keinen veränderten Phänotyp zeigt. Unter pathophysiologischen Bedingungen wie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung [88], der Neointimahyperplasie [89] und der Atherosklerose [83] jedoch scheint HAS3 ein wichtiger Einflussnehmer zu sein.

Wie bereits erwähnt, geht die Atherosklerose mit einer Akkumulation von Fetten und Cholesterolkristallen einher. Da die HAS-Enzyme transmembranäre Proteine sind und die Einlagerung von Transmembranproteinen durch den Cholesteringehalt der Plasmamembran beeinflusst wird, kann der Cholesteringehalt somit auch die HAS-Lokalisation in der Membran direkt beeinflussen. Hierdurch kann wiederum die Verfügbarkeit der HA im Extrazellulärraum verändert werden [90]. Auch wird die

Expression von HAS2 und HAS3 in vaskulären SMC durch LDL hochreguliert [91], was eine Progression der Atherosklerose fördern könnte.

1.2.3 Hyaluronsäurerezeptoren und -bindeproteine

Neben der strukturebenen, direkten Funktion von HA, kann diese auch über diverse Rezeptoren signalgebend agieren. So kann HA verschiedene Signalkaskaden beeinflussen, die eine Rolle bei der Zellproliferation, -migration und -adhäsion aber auch in inflammatorischen Prozessen spielen [63]. Wichtige HA-bindende Proteine sind *cluster of differentiation 44* (CD44), *receptor of HA-mediated motility* (RHAMM) [92], *lymphatic vessel endothelial HA receptor 1* (LYVE1) [93], *toll-like receptor* (TLR) [94], sowie Aggrecan oder Versikan. Ob eine Wirkung über TLR tatsächlich stattfindet, wurde kürzlich sehr kontrovers diskutiert [95]. Insbesondere für CD44 und RHAMM konnte gezeigt werden, dass sie in die HA-vermittelte Proliferation und Migration von SMC involviert sind [96, 97].

1.2.3.1 CD44

CD44 wird auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert, unter anderem auf Fibroblasten [98-100], Immunzellen [101] und SMC [102]. Multiple Formen des Rezeptors entstehen aufgrund alternativer Spleißvarianten und posttranslationaler Modifikationen wie beispielsweise Glykosylierung [103]. Diese können die Affinität des Rezeptors zu HA variieren und sind von physiologischen Stimuli abhängig. Der Rezeptor selbst besteht aus einer zytoplasmatischen und einer transmembranären Domäne sowie einem Linkermolekül, welches in die EZM ragt und HA binden kann. CD44 selbst hat keine intrinsische Kinase-Aktivität und muss daher mit anderen Rezeptoren, wie beispielsweise dem *epidermalen growth factor receptor* (EGFR) interagieren, um Signalwege zu modulieren [104]. Neben transmembranärem CD44 ist auch eine lösliche Variante von CD44 bekannt, vorkommend in Serum und Lymphe [105].

CD44 ist aufgrund seiner Diversität an einer Vielzahl von Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen beteiligt. Es steuert unter anderem Proliferation, Migration, Adhäsion und Aktivierung von Zellen. Es wurde auch gezeigt, dass es die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen negativ beeinflussen kann aufgrund von Rekrutierung von Immunzellen und vaskulärer Zellaktivierung [106]. Neben HA können auch weitere EZM-Moleküle an CD44 binden, wie Osteopontin oder Fibronectin. Es konnte jedoch gezeigt

werden, dass die meisten CD44-vermittelten Funktionen HA-abhängig sind [107], was diesen Rezeptor zu einer wichtigen Komponente in der Beeinflussung der HA-Wirkung machen könnte.

1.2.3.2 RHAMM

Der Rezeptor RHAMM bindet insbesondere an biotinyliertes HA [108, 109]. Er reguliert die HA-vermittelte Motilität von Zellen und spielt eine wichtige Rolle bei Gewebsschädigung und -reperaturprozessen [110]. RHAMM-Defizienz *in vitro* ist mit verringerter Wundheilung assoziiert [111], wohingegen *in vivo* im Kalbmodell eine Überexpression nach Gefäßverletzung in SMC festgestellt werden konnte, die einhergeht mit erhöhter Migration [112]. RHAMM spielt also eine große Rolle in der Wundheilung und Gewebereparatur und ist daher in vielen Geweben vorzufinden, insbesondere ausgeprägt während Migrations- oder Zellteilungsprozessen [108]. RHAMM kommt sowohl intrazellulär als auch an der Zelloberfläche vor. Dort kommt er in Kontakt mit HA und anderen EZM-Molekülen [108], kann aber auch Funktionen ohne die Bindung an HA ausüben [113]. Des Weiteren kann RHAMM auch als Cofaktor wirken und die Aktivität anderer Rezeptoren wie PDGF-Rezeptor, TGF β -Rezeptor 1 oder CD44 bzw. CD44/ EGFR modulieren [114, 115].

1.2.4 Abbau der Hyaluronsäure

Der Abbau von HA erfolgt über Hyaluronidasen (HYAL). Diese hydrolysieren pH-abhängig die β -1,4-glykosidische Bindung zwischen den D-GlcA- und GlcNAc-Einheiten und formen kleinere HA-Fragmente [116]. Dies geschieht meist an der Zelloberfläche oder innerhalb von Lysosomen. Das genaue Zusammenspiel zwischen HA-Synthasen und Abbau mittels HYALs ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Basierend auf *in vitro*-Untersuchungen gibt es Vermutungen, dass das Expressionsmuster der verschiedenen HAS-Isoformen verantwortlich für die HA-Fragmentgrößenverteilung ist [73]. Dies konnte *in vivo* jedoch nicht bestätigt werden. Viel eher nimmt man heute an, dass durch Substratverfügbarkeit und posttranslationale Modifikationen der HAS-Isoformen oder aber durch den Abbau von HA verschiedene Fragmentgrößen entstehen. Es sind bisher sechs HYALs in Säugetieren bekannt sowie fünf Gene, welche für die HYAL 1-4 und PH-20 Hyaluronidase sowie eine pseudogene HYALP1 kodieren [117]. Die größte Relevanz im Abbau von HA weisen HYAL1 und HYAL2 auf [118], sowie das

zellmigrations-induzierende Protein (CEMIP) [119]. Neben der enzymatischen Degradation von HA mittels HYALs wurde auch gezeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies HA degradieren, was insbesondere im Falle von Gewebsverletzungen und inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielen kann [63, 120]. Dieser Kontext wurde im Rahmen der Atherosklerose noch nicht untersucht und könnte wichtige neue Einblicke in eine potentielle Therapie liefern.

1.2.5 Hyaluronsäure und Atherosklerose

In atherosklerotischen Läsionen spielen EZM und insbesondere HA eine große Rolle. HA akkumuliert sowohl in der frühen Phase der Plaquebildung, als auch in den fortgeschrittenen Läsionen. Einen Hauptproduzenten für HA stellen dabei SMC dar.

Bereits in der frühen Phase der Plaqueentwicklung werden SMC stimuliert, erhöhen die Expression der HAS-Isoenzyme und produzieren mehr HA. So tragen sie zu einer großen Volumenexpansion der Plaques bei. Ein Blockieren der HA-bindenden Rezeptoren CD44 und RHAMM führt zu signifikant reduzierter Proliferation und Migration von SMC sowie zu einer reduzierten Neointimabildung [121-125]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass HA mit Lipiden kolokalisieren kann, was eine Beeinflussung von Lipidakkumulationen durch HA indiziert [126].

In fortgeschrittenen Phasen der Atherosklerose konnte gezeigt werden, dass eine HA- und versikanreiche EZM mit einem erhöhten Risiko für Plaquerupturen [71, 127, 128] und Thrombosen [129] einhergeht. Insbesondere im luminalen Teil erodierter Plaques konnte HA nachgewiesen werden, wohingegen Biglykan, ein kleines leucinreiches Proteoglykan, nur wenig gefunden wurde. Stabile Plaques dagegen enthalten wenig HA und eine biglykanreiche FC [71].

Weitere Effekte von HA, viele insbesondere abhängig von HA-CD44-Wechselwirkungen, wurden für die Atherosklerose beschrieben. So entwickelten *Cd44*-defiziente Mäuse bis zu 70% kleinere Läsionen als die Kontrolltiere, zurückzuführen auf eine reduzierte Anzahl an Makrophagen in der Läsion [106]. Auch eine Überexpression von *Has2* in *ApoE*^{-/-}-Mäusen zeigte, dass HA die Läsionsbildung in Abhängigkeit von *Cd44* fördert [130]. Die Ergebnisse sind zurückzuführen auf eine gesteigerte Migration von SMC durch erhöhte Stimulation von *Cd44* [131]. Auch auf die phänotypische Änderung von SMC hat die HA-CD44-Interaktion einen wichtigen Effekt. Dies wird auf eine Erhöhung des vaskulären Adhäsionsmoleküls 1 (VCAM-1) zurückgeführt [132]. Zhao *et al.* haben nachgewiesen, dass *Cd44* auf Endothelzellen, Leukozyten und SMC aufgrund von

Leukozytenrekrutierung und -adhäsion sowie SMC-Migration zur Läsionsformation beiträgt [133]. Neben SMC beeinflusst HA also auch das Verhalten anderer Zelltypen wie Endothelzellen und Leukozyten.

Einige Arbeiten befassen sich damit, dass HA-reiche Matrix proinflammatorische Eigenschaften besitzt. Sie bildet eine adhäsive Grundlage für Monozyten [134] und fördert die Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen, mittels Erhöhung von *scavenger*-Rezeptoren, welche die LDL-Aufnahme steuern [135]. Eine Untersuchung zur pharmakologischen Hemmung der gesamten HA-Synthese mittels 4-Methylumbelliferon (4-MU) resultierte in reduzierter Migration und Proliferation [136].

In der hier vorliegenden Arbeit wird insbesondere der Einfluss der HAS3 auf die Atherosklerose untersucht. Von dieser weiß man, dass die von ihr gesteuerte HA-Synthese eine Rolle in der T-Zell-Immunantwort für die Atherosklerose spielt [83]. Eine genetische Deletion von *Has3* in *ApoE*-defizienten Mäusen verringerte drastisch die Th1-Zell-Polarisierung, was sich positiv auf Läsionsentwicklung und Makrophagengehalt in den Plaques auswirkt [83]. Es wurde auch gezeigt, dass Th1-Zytokine durch eine erhöhte HA-Produktion und -akkumulation in der Immunsynapse die T-Zellbindung an antigenpräsentierende Zellen fördern [137].

HA scheint aber auch protektive Effekte in der Atherosklerose zu besitzen. Es ist gemeinsam mit Heparansulfatketten der Hauptbestandteil der Glykokalyx, welche sich luminal an das Endothel anschließt. Die Glykokalyx hat eine schützende Aufgabe und kann bis zu 500 nm dick werden [138]. Ihre Aufgabe besteht darin, die Interaktion von zirkulierenden Faktoren, Immunzellen und Blutplättchen mit dem Endothel zu steuern [139-142]. Des Weiteren schützt sie das Endothel vor der Adhäsion von Plättchen, Leukozyten-*rolling* und Extravasation, welche initiale Faktoren für die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen darstellen können [143]. Es wurde gezeigt, dass die schützende Glykokalyx durch Faktoren wie oxidativen Stress, Hyperglykämie oder inflammatorische Zytokine geschädigt werden kann. Eine Studie, in welcher *ApoE*^{-/-}-Mäuse langfristig mit 4-MU behandelt wurden, zeigte, dass die Inhibition der kompletten HA-Synthese in signifikant vergrößerten Läsionen resultierte. Dieser Effekt war auf eine Zerstörung der Glykokalyx zurückzuführen, welche zu vermehrter Adhäsion von Plättchen an das Endothel und Makrophageneinwanderung in die Läsion führte [144]. Aufgrund der umfangreichen, teils diversen Rolle von HA und der schädlichen Wirkung von 4-MU in der Langzeitbehandlung der Atherosklerose könnte es von großer Bedeutung sein, die Wirkung der einzelnen HAS-Isoformen genauer zu untersuchen.

1.2.6 Hyaluronsäure und glatte Muskelzellen

SMC sind ein Hauptproduzent für HA. Unter pathophysiologischen Bedingungen kann durch verschiedene Stimuli wie beispielsweise proatherogene Faktoren ihre HA-Synthese gesteigert werden. Dazu gehören IL1 β , oxLDL und Cholesterin, welche alle die Genexpression von HAS3 in SMC erhöhen [91]. Aber auch PDGF, *fibroblast growth factor* (FGF) und TGF β 1 erhöhen die HA-Synthese durch SMC. So bilden sich extra- und perizelluläre HA-Mäntel [145] aus, welche unter anderem die Migration und Proliferation der Zellen beeinflussen [97]. *In vivo* konnte eine starke Korrelation zwischen proliferativen SMC, HA-reicher EZM und Neointimahyperplasie nachgewiesen werden [146]. Es konnte gezeigt werden, dass eine *in vitro*-Herabregulierung von *Has3* signifikant die HA-Menge und das Migrationsverhalten von SMC in Abhängigkeit von PDGF verringerte. Eine *Has3*-Überexpression hingegen führte zu verstärktem Migrationsverhalten [89]. Untersuchungen haben gezeigt, dass durch vermehrte extra- und perizelluläre HA die Zelladhäsion verringert wird und die EZM durchlässiger wird. So können Zellen besser migrieren [147, 148]. Einen weiteren wichtigen Einfluss hat HA auf den Phänotyp von SMC, indem sie den synthetischen, proliferativen Phänotyp fördert. Dies erfolgt nicht nur über die direkten HA-abhängigen physikochemischen Eigenschaften, sondern auch über die Signalgebung mittels der HA-Rezeptoren RHAMM und CD44 [149].

1.3 Ziele der Arbeit

Die HA spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Atherosklerose. So werden bereits im frühen Stadium insbesondere SMC stimuliert, HA zu produzieren und tragen damit zu starker Volumenexpansion bei. Im Verlauf der Progression, führt die HA dann zu einer Erhöhung der SMC-Migration und -Proliferation was die Neointimabildung vorantreibt. Kürzlich konnte durch unsere Forschung gezeigt werden, dass insbesondere die Expression der HAS3 in der frühen Atherosklerose gesteigert ist [83]. Eine Deletion von *Has3* im Mausmodell hatte eine signifikante Reduktion der Läsionsgröße und reduzierte Plaquebelastung zur Folge, was zurückzuführen war auf einen verringerten Gehalt an Makrophagen in der Läsion. Mechanistisch lässt sich dies vermutlich begründen über eine verringerte Th1-Zell-Polarisierung. Über die *Has3* ist weiter bekannt, dass sie einen direkten Einfluss auf die PDGF-abhängige Migration von SMC nimmt und durch genetische Deletion die Neointimahyperplasie im Mausmodell signifikant verringert werden kann [89]. Jedoch gibt es keine Untersuchungen zur

Beeinflussung der Atheroprogession durch die SMC-spezifische *Has3*. Im Fokus dieser Arbeit liegt daher die mechanistische Aufklärung der Einflüsse der SMC-spezifischen *Has3* auf atherosklerotische Prozesse in *ApoE*^{-/-}-Mäusen, um so zum Gesamtverständnis der HA-Läsions-Matrix beizutragen. Insbesondere soll dabei untersucht werden, wie die *Has3*-Defizienz spezifisch in SMC den Phänotyp, die Funktion und Differenzierung/Transdifferenzierung von SMC beeinflusst und welche Auswirkungen dies auf die Atheroprogession zeigt.

Um dies zu untersuchen wird mit einem doppel-defizienten Mausmodell für *ApoE* und die SMC-spezifische *Has3* gearbeitet, kombiniert mit einem induzierbaren *Lineage Tracing*-System, welches die Abstammungsverfolgung der SMC über die gesamte Versuchszeit ermöglicht. In ersten Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass eine SMC-spezifische Herabregulierung von *Has3* weder zu Unterschieden in der Läsionsgröße in der *Arteria brachiocephalica* (BCA) führt, noch zu einer Veränderung der Gesamtplaquebelastung der Aorta (**Abbildungen 5 und 6**).

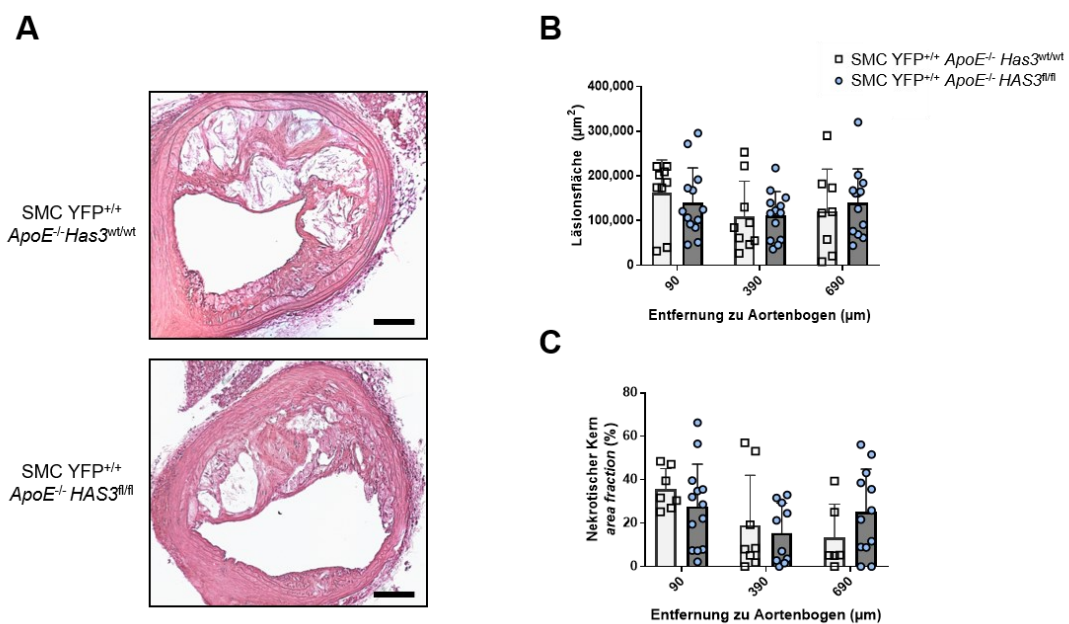


Abbildung 5: Die SMC-spezifische Herabregulierung von *Has3* zeigt keinen Effekt auf die atherosklerotische Läsionsgröße und die nekrotischen Bereiche in der BCA.

BCAs von SMC YFP^{+/+}*ApoE*^{-/-}*Has3*^{wt/wt}- und SMC YFP^{+/+}*ApoE*^{-/-}*HAS3*^{fl/fl}-Mäusen wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und histologisch analysiert. Repräsentative Bilder (**A**) und Quantifizierung der Gesamtfläche (**B**) sowie des Anteils der nekrotischen Bereiche (**C**). Der Maßstabsbalken repräsentiert 100 µm, dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n = 6-13, getestet wurde mittels *Mann-Whitney U-test*. Die Analyse wurde durchgeführt von Dr. Susanne Homann.

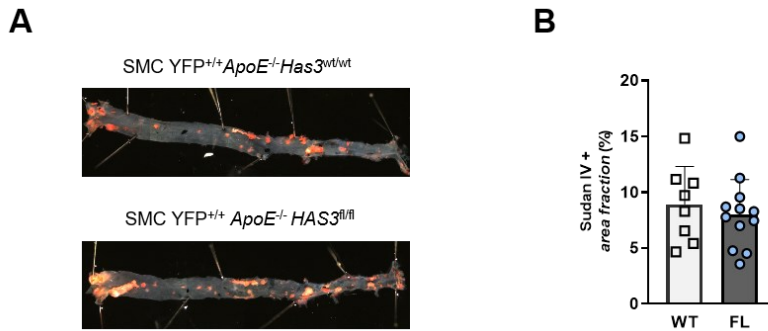


Abbildung 6: *Has3*-Defizienz in SMC beeinflusst nicht die atherosklerotische Plaquebelastung in der Aorta von SMC YFP^{+/+} ApoE^{-/-}-Mäusen.

(A) Aorten von SMC YFP^{+/+} ApoE^{-/-} Has3^{wt/wt}- und SMC YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}-Mäusen wurden entnommen und mit Sudan IV gefärbt. Repräsentative Bilder dieser Färbung und (B) quantitative Bestimmung des lipidreichen Plaqueanteils in der Aorta. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n = 8,12, getestet wurde mittels *students t-test*. Färbung und Auswertung durchgeführt von Dr. Susanne Homann.

Zur Beurteilung der Plaquestabilität können verschiedene Parameter bestimmt werden. Neben der Anzahl an ACTA2⁺-SMC und der Menge an stabilisierendem Kollagen kann die Menge an plaqueinternen Einblutungen bestimmt werden. Gemessen werden kann dies über die Menge an Läsion, welche positiv gefärbt für den Erythrozytenmarker *Lymphocyte-antigen 76* (TER119) ist.

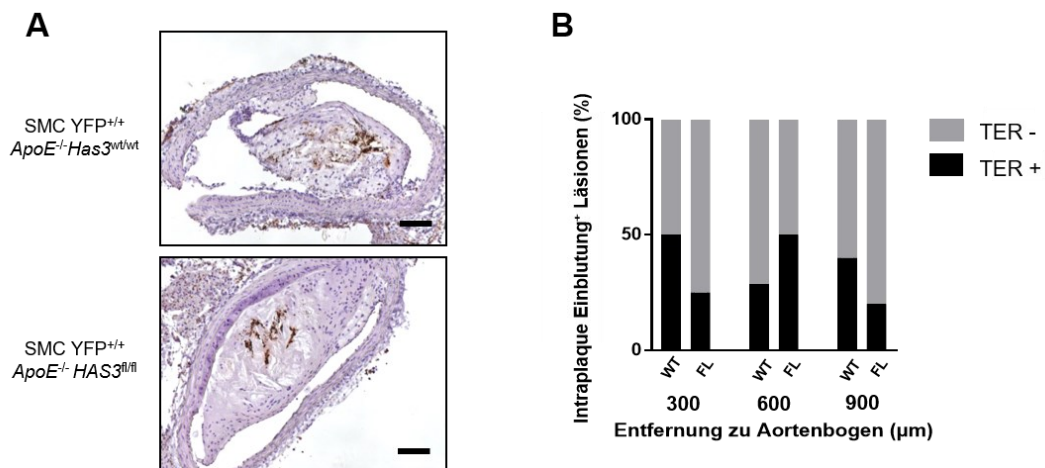


Abbildung 7: Die Einblutungen in den Plaquebereich sind nicht beeinflusst durch die Herabregulierung von *Has3* in SMC.

In Paraffin eingebettete BCAs von SMC YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}-Mäusen und den entsprechenden Kontrolltieren wurden für den Erythrozytenmarker TER119 gefärbt und analysiert. (A) Repräsentative Bilder sowie Quantifizierung (B) der Läsionen nach 15 Wochen Western Diät. Der Maßstabsbalken repräsentiert 100 µm, dargestellt sind prozentuale Anteile an Läsionen mit positivem und negativem Signal pro Lokalisation, n = 3-9, getestet wurde mittels *Fisher's exact test*. Die Analyse wurde durchgeführt von Dr. Susanne Homann.

Hier konnte nachgewiesen werden, dass eine Defizienz von *Has3* exklusive in SMC keinen Einfluss auf die Einblutungen in den Plauebereich nimmt. Dies ist gezeigt in **Abbildung 7**.

Kollagene sind Strukturproteine und wichtiger Bestandteil der EZM. In atherosklerotischen Plaques bilden sie den größten Bestandteil der EZM-Moleküle. Fibrilläres Kollagen spielt eine kritische Rolle in der Plaquestabilität. Eine zu starke Kollagenproduktion kann zu arteriellen Stenosen führen, während ein unkontrollierter Kollagenabbau in Kombination mit einer unzureichenden Synthese die Plaques instabiler gestaltet und sie damit anfälliger für Rupturen macht. In der Läsion sorgt Kollagen vor allem in der fibrotischen Kappe für Stabilität und Zugfestigkeit. Es wird vermutet, dass insbesondere Kollagen I maßgeblich zur Stabilität von atherosklerotischen Läsionen beitragen könnte. Um den Einfluss von SMC-spezifischer *Has3*-Defizienz auf die Kollagenproduktion und -zusammensetzung zu untersuchen, hat Alexandra Newman, PhD, im Rahmen dieses Projektes am *Cardiovascular Research Center* der *University of Virginia* murine Läsionen nach 15 Wochen Western Diät (WD) Fütterung untersucht (**Abbildung 8**).

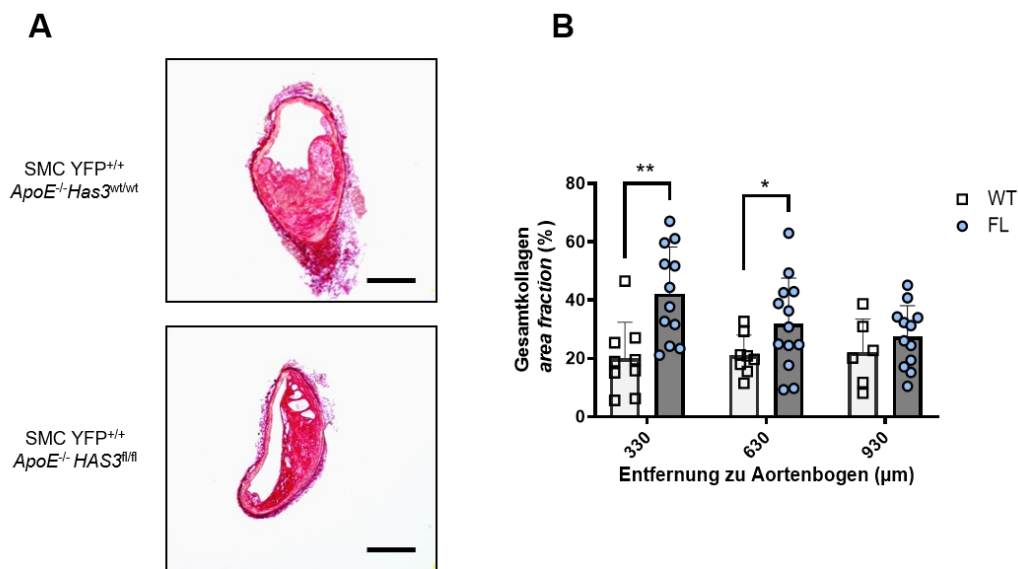


Abbildung 8: Die SMC-spezifische Deletion von *Has3* führt zu erhöhter Kollagen Deposition in der Läsion.

Nach 15 Wochen WD wurden BCAs von SMC YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}- und SMC YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}-Mäusen entnommen und mittels Pikrosiriusrot gefärbt (**A**). Die Quantifizierung (**B**) ergab eine Erhöhung von Kollagen in drei verschiedenen Lokalisationen der BCA. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n = 6-13, getestet wurden drei Einzellokalisationen entlang der BCA mittels *Mann-Whitney U-test*. * p < 0,05, ** p < 0,01, Maßstabsbalken entspricht 500 µm. Färbung und Analyse wurden von Alexandra Newman, PhD, durchgeführt.

Die histologische Analyse zeigte, dass die SMC-spezifische *Has3*-Herabregulierung zu signifikant vermehrtem Kollagengehalt innerhalb der Läsion führt.

Im Folgenden dieser Arbeit wird nun die SMC-*Has3*-Defizienz im atherosklerotischen Mausmodell weiter charakterisiert, insbesondere im Zusammenhang mit der phänotypischen Änderung von SMC.

Die Ergebnisse des Abschnitts 1.3 sind zu Teilen publiziert unter:

Felicia Hartmann, Daniel J Gorski, Alexandra A C Newman, Susanne Homann, Anne Petz, Katherine M Owsiany, Vlad Serbulea, Yu-Qing Zhou, Rebecca A Deaton, Michelle Bendeck, Gary K Owens, Jens W Fischer. *SMC derived hyaluronan modulates vascular SMC-phenotype in murine atherosclerosis*. *Circulation Research* 2021 [150].

2 Material und Methoden

2.1 Tierexperimentelle Arbeiten

2.1.1 Tiere

Für die hier zugrundeliegenden Studien wurden ausschließlich männliche Mäuse im Alter von fünf bis sieben Wochen in den Versuch genommen. Die Versuchstiere waren defizient für *ApoE*, besaßen zur Verfolgung der SMC ein induzierbares, *yellow fluorescent protein* (YFP)-vermitteltes *Lineage Tracing*-System und verfügten über eine humanisierte und gefloxe *HAS3* (nachfolgend: SMC *YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}*- sowie SMC *YFP^{+/+} ApoE^{-/-} Has3^{wt/wt}*-Mäuse). Die Rekombination wurde mittels CreER^{T2}-Rekombinase, welche unter dem *Myh11*-Promotor aktiv ist, an den loxP-Stellen von *STOP*-Codon des YFP und am *HAS3*-Konstrukt durchgeführt und mit Hilfe von Tamoxifen induziert (**Abbildung 9**). Diese Mauslinie wurde durch Kreuzung von *Myh11-CreER^{T2} ROSA26 floxed STOP eYFP^{+/+} ApoE^{-/-} Has3^{wt/wt}*- Mäusen [37, 39, 151, 152] mit *HAS3^{fl/fl}*-Mäusen [83, 89] generiert.

Myh11-CreER^{T2} ROSA26 floxedSTOP eYFP^{+/+}-Mäuse: Um die Wirkung der Cre-Rekombinase auf glatte Muskelzellen zu beschränken, enthalten die Mäuse dieser Linie ein Fusionsprotein. Es besteht aus der Cre-Rekombinase und einer modifizierten Östrogenrezeptorbindungsdomäne (ER^{T2}) unter der Kontrolle des *Myh11*-Promotors, der ausschließlich in glatter Muskulatur exprimiert wird [153] sowie von einer mikrovaskulären Perizytensubpopulation [154]. Da die Cre-Rekombinase unter dem *Myh11*-Promotor (*Myh11-CreER^{T2}*) auf dem Y-Chromosom liegt, ist dieses Transgen nur bei männlichen Tieren vorhanden. Darüber hinaus enthalten die Tiere ein *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*-Gen, welches sich im *ROSA26*-Lokus befindet. Die Expression des YFP ist blockiert aufgrund eines vorgestellten, geflochten *STOP*-Codons. Erst nach Aktivieren der Cre-Rekombinase ist das Ausschneiden der *STOP*-Sequenz möglich und damit die YFP-Expression. Die Mäuse weisen einen genetischen C57BL/6N-Hintergrund auf und wurden ursprünglich von Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen.

HAS3^{fl/fl}-Mäuse: Die *HAS3^{fl/fl}*-Mäuse wurden mit Hilfe von genOway (Lyon Cedex, France) generiert. Dafür wurde Exon 2 der murinen Sequenz, welches das Startcodon enthält, zunächst entfernt und anschließend durch die humane *HAS3 complementary desoxyribonucleic acid* (cDNA) ersetzt. Dabei war die humane cDNA-Kassette flankiert von einer FRT-neomycin-FRT-loxP-Kassette (5') und einer einzelnen loxP-Stelle (3') in dem sich anschließenden Intron. Die entsprechenden Mäuse wurden dann mit Mäusen

gekreuzt, die konstitutiv eine *Flp-Rekombinase* enthalten, um die FRT-flankierte Neomycin-Kassette auszuschneiden. Durch diesen Prozess wurden Mäuse erhalten, mit gefloxtem, humanisiertem *HAS3*-Konstrukt (*HAS3^{fl/fl}*).

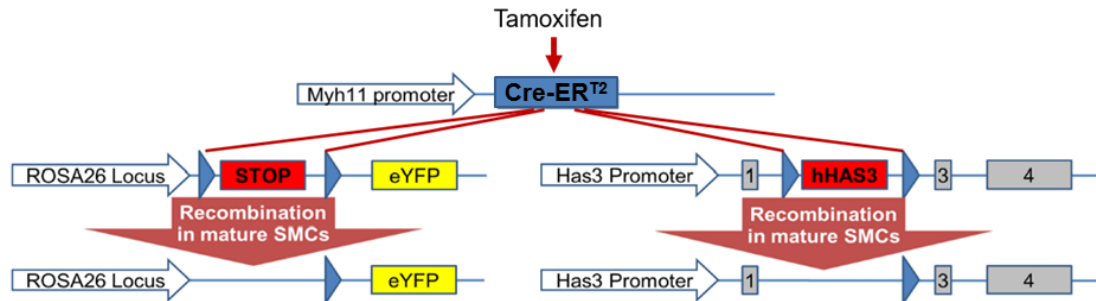


Abbildung 9: Generierung des Mausmodells.

Durch Behandlung mit Tamoxifen-Injektionen an zehn aufeinanderfolgenden Tagen (1mg/Maus/Tag) wird in diesen Mäusen eine CreER^{T2}-Rekombinase aktiviert. Diese ermöglicht unter dem *Myh11*-Promotor ein SMC-selektives Ausschneiden des *HAS3*-Konstruktes und des STOP-Codons vor dem endogenen YFP. Die Abbildung wurde modifiziert nach Gomez *et al.*[151].

Zur Kontrolle der Effekte des humanisierten Konstruktes wurden eine Kontrolllinie generiert (*ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*- und *ApoE^{-/-}Has3^{w^t/w^t}*-Mäuse). Diese Mäuse enthalten keine Cre-Rekombinase. Nach Tamoxifengabe und anschließender Western Diät nach identischem Protokoll wie dem der Versuchstiere, konnten demnach die Wirkung von humanisiertem *HAS3* Konstrukt und der regulären, murinen *Has3* direkt verglichen werden.

Die Zucht, die Haltung und die Experimente erfolgten in den Räumlichkeiten der *University of Virginia* in Charlottesville, VA, USA sowie der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Alle Tiere hatten unbegrenzt Zugang zu pathogen-freiem Trinkwasser und Futter und wurden in einem regulären zwölf-Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Die Protokolle für alle tierexperimentellen Versuche wurden durch das *University of Virginia Animal Care and Use Committee* oder das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen, Bezirksregierung Düsseldorf, entsprechend §8 des TSchG genehmigt (Aktenzeichen 84-02.04.2018.A399).

2.1.2 Studiendesign

In einem Lebensalter von fünf bis sieben Wochen wurden SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäuse und ihre Kontrollen mit zehn aufeinanderfolgenden Tamoxifen-Injektionen

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1mg/Maus/Tag in 100 µl Erdnussöl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) behandelt und im Anschluss für 15 Wochen mit einer hochkalorischen, Western Diät gefüttert. Diese Diät enthielt 21% Fett und 0,15% Cholesterin (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Nach der Fütterung wurden die Mäuse in einem Lebensalter von 22-24 Wochen euthanasiert und ihre Organe für Analysen entnommen (**Abbildung 10**).

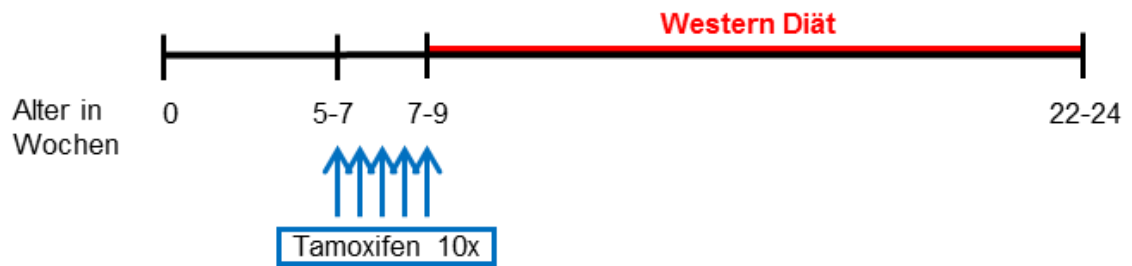


Abbildung 10: Studiendesign.

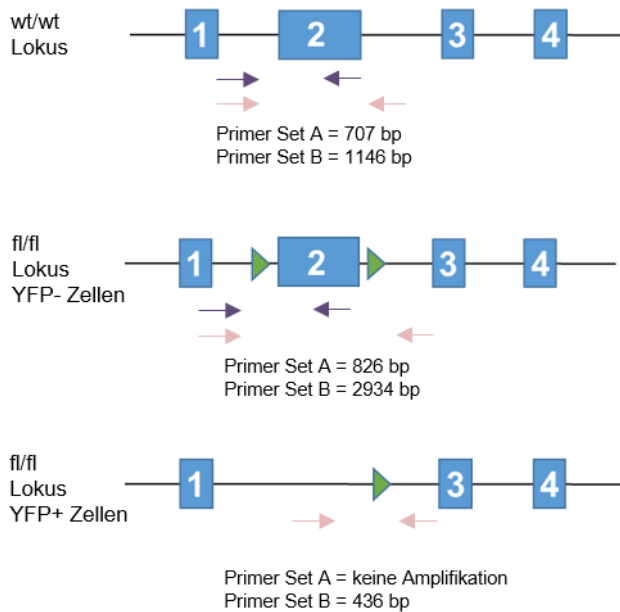
2.1.3 Gewebepreparation nach Organentnahme

Nach 15 Wochen WD-Fütterung wurden SMC $YFP^{+/+}ApoE^{-/}HAS3^{fl/fl}$ -Mäuse und ihre Kontrollen mittels CO_2 -Inhalation nach sechs Stunden Fasten euthanasiert. Nach Eröffnung des Peritoneums wurde mittels Herzpunktion im rechten Ventrikel Blut entnommen. Antikoaguliert wurde dabei mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Endkonzentration 10 mM). Im Anschluss an die kardiale Blutentnahme wurden die Mäuse mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) und 4% Paraformaldehyd (PFA) (hergestellt aus PBS und Pierce™ 16% Formaldehyd (w/v), methanolfrei, Waltham, MA, USA) perfundiert. Für die Histologie und die Immunhistochemie wurden die Organe entnommen und für 24 Stunden in 4% PFA fixiert. Im Anschluss wurden die Organe bei 4°C in PBS bis zur Einbettung gelagert.

2.2 Validierung der SMC $YFP^{+/+}ApoE^{-/}HAS3^{fl/fl}$ -Maus

Für die Validierung der Maus wurden die gesunden BCAs entnommen (n=2) und für ACTA2, YFP und DAPI gefärbt. Im Anschluss wurde die Anzahl an $YFP^{+}ACTA2^{+}/ACTA2^{+}$ -Zellen ($DAPI^{+}$) an zwei unterschiedlichen Lokalisationen, in 270 µm und 570 µm Entfernung vom Aortenbogen, bestimmt.

Um die SMC-spezifische *Has3*-Defizienz nachzuweisen, haben wir Aorten von acht Wochen alten Tieren untersucht (n=3,3, gepoolt). Diese erhielten eine Tamoxifenbehandlung wie zuvor beschrieben. Nach Ernte der Aorten wurden diese für YFP sortiert (durchgeführt von der *University of Virginia Flow Cytometry Core Facility*) und das Ausschneiden der *Has3* mittels Polymerasekettenreaktion in YFP⁺-SMC überprüft. Die Primersequenzen sind in **Abbildung 11** dargestellt.



Primer Set A:

AACTAGGACTTGAACCCCAGCAACTTAGG	CTGAGCTGAGCGAAGGCACTTGCGCAG GTATTC
-------------------------------	---------------------------------------

Primer Set B:

AACTAGGACTTGAACCCCAGCAACTTAGG	ACCTTGTTTAGGGAAGAGGACGGATAGC
-------------------------------	------------------------------

Abbildung 11: Primer zur Validierung der zellspezifischen *Has3*-Herabregulierung (Darstellung der Produkte nach erfolgreicher Tamoxifen-Injektion).

2.3 Blutanalysen

2.3.1 Blutglukosemessung

Die Blutglukosemessung erfolgte nach sechsstündiger Nahrungskarenz. Dazu wurde die Schwanzvene der Mäuse angeritzt und ein Blutstropfen durch leichte Kompression gewonnen. Gemessen wurde in Dreifachbestimmung und mit Hilfe des Blutzuckermessgerätes Germaine™ Laboratories AimStrip™ Plus *Blood Glucose Testing System*.

2.3.2 Triglyzerid- und Cholesterol-Messungen

Die Triglyzerid- und Cholesterolmessungen erfolgten aus dem entnommenen Blut der Herzpunktion. Ein Teil des Vollblutes wurde zentrifugiert und der Plasmaüberstand abgenommen. Dieses wurde im Anschluss 1:3 verdünnt und die Messung durch die *University of Virginia Clinical Pathology Laboratory* durchgeführt.

2.4 Histologie und Immunhistochemie

Für Histologie und Immunhistochemie wurden ausschließlich die BCAs verwendet, da die Plaqueentwicklung und -zusammensetzung in diesem Gefäß der humanen am meisten ähnelt. Nach der Entnahme wurden beide Gefäße für 24 Stunden bei 4°C in 4% PFA fixiert. Im Anschluss wurden die BCAs dehydratisiert und in Paraffin eingebettet. Die eingebetteten BCAs wurden dann mittels Leica Biocut 2030 Microtome (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) in 10 µm dicke Schnitte geschnitten und jeweils drei konsekutive Schnitte auf Objektträger aufgezogen. Bevor die Färbungen an diesen Schnitten durchgeführt wurden, wurden alle Schnitte für eine Stunde bei 60°C im Ofen hitzefixiert. Für das Entparaffinieren wurden die Schnitte dreimal 10 Minuten in Xylol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) inkubiert, die Schnitte für die Decorin-Färbungen wurden alternativ dreimal 10 Minuten in Roticlear® (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany) inkubiert. Anschließend erfolgte jeweils eine Inkubation für zweimal fünf Minuten in Ethanol absolut, Ethanol 95% und einmal fünf Minuten in Ethanol 70%, gefolgt von zweimal fünf Minuten Waschen in destilliertem Wasser. Eine Zusammenstellung aller verwendeten Puffer und Lösungen für histologische und immunhistologische Färbungen ist dargestellt in **Tabelle 1**.

Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen für histologische und immunhistologische Färbungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
PBS	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 1.5 mM KH ₂ PO ₄ 8.3 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4	nicht kommerziell
ABC-Puffer	1,33 g NaAcetat 3H ₂ O 0,3 g NaCl Bovines Serumalbumin (BSA) 1mg/mL 0,6 g Tris	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
H ₂ O ₂ Lösung	2 mL H ₂ O ₂ (30%) in 200 mL Methanol	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Antigendemaskierung	Zitratpuffer (pH 6,0) 3 mL in 320 mL destilliertem Wasser	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Blockierlösung	20 mM Tris-HCl 137 mM NaCl 10% (V/V) fetales Kalbserum (FCS) 1% (M/V) BSA	Gibco® Life Technologies, Paisley, UK Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
1% BSA	1 g BSA in 100 mL PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fischhautgelatinelösung (FSG)	3 g FSG in 500 mL PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Biotin-Avidin-Block	nach Herstellerangaben	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Für alle immunhistochemischen Färbungen wurden jeweils zwei konsekutive Schnitte pro Objektträger gefärbt, der dritte Schnitt diente als Negativkontrolle. Diese wurde jeweils nur mit den Sekundärantikörpern behandelt. Im Falle der Decorin-Färbung wurde die Negativkontrolle mittels Verdau durch eine Chondroitinase durchgeführt, für die HA-Färbung mittels Hyaluronidase-Verdau.

In **Tabelle 2** sind alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Verdünnungen und Hersteller gelistet.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper und Verdünnungen für immunhistologische Färbungen.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen-Anti-Maus-Decorin, LF113	1:1000	Larry Fisher
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-HRP	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
Ziege-Anti-GFP	1:250	Abcam, Cambridge, UK
Ratte-Anti-Mac2 (LGALS3)	1:500	Cedarlane, Burlington, Kanada
Esel-Anti-Ziege-IgG-Alexa Fluor® 647	1:250	Invitrogen, CA, USA
Esel-Anti-Ratte IgG- Dylite-550	1:250	Abcam, Cambridge, UK
α -Glatte Muskelaktin-FITC	1:500	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HA-Bindeprotein	1:150	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Streptavidin Alexa Fluor® 488	1:100	Invitrogen, CA, USA

2.4.1 Hämatoxylin und Eosin (H&E)

Nach der Entparaffinierung und dem anschließenden Waschen wurden die BCAs mit H&E gefärbt (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), um eine Übersicht über die Morphologie der Gewebe zu erhalten. Hämatoxylin dient dafür als Farbstoff und bindet nach Oxidation zu Hämalaun an basophile Strukturen wie beispielsweise die DNA der

Zellkerne oder Ribosome und färbt diese blau. Eosin färbt hingegen azophile Strukturen rötlich, wie Proteine im Zytoplasma, Mitochondrien oder Kollagen. Im ersten Schritt wurde die Hämatoxylin-Lösung gefiltert und die Schnitte dann dafür für 15 Sekunden inkubiert, gefolgt von einem zweiminütigen Waschschrift unter Leitungswasser. Im Anschluss wurden die Schnitte für eine Minute in eine Bläulösung (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) eingelegt und wurden dann wieder unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Dann wurden die Gewebeschnitte für weitere fünf Minuten mit Ethanol 70% behandelt. Für das folgende Färben mit Eosin wurden die Objektträger zweimal in Eosinlösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) getaucht. Für das Eindecken mussten die Schnitte dehydratisiert werden mittels dreimaliger Behandlung durch Ethanol 100% und zwei folgenden Xylol-Schritten. Diese Schritte erfolgten jeweils für fünf Minuten. Abschließend wurden die Objektträger mit Gläschen bedeckt, wofür ein xylenbasiertes Eindeckmedium verwendet wurde (Cytoseal-60, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.4.2 Kollagen

Für die Färbung von Kollagen in den BCAs wurde der Farbstoff Pikrosiriusrot (Polysciences Inc, Warrington, PA, USA) verwendet. Nach Entparaffinierung und Rehydratation wurden die Gewebsschnitte der BCAs für 90 Minuten in der Färbelösung inkubiert und im Anschluss für zwei Minuten in 0.1 N Salzsäure gewaschen. Im Anschluss erfolgten wie bereits beschrieben eine Dehydratisierung und das Eindecken.

2.4.3 Decorin

Für die Untersuchung von Decorin in den atherosklerotischen Läsionen der BCAs wurden diese nach der Aufarbeitung ebenfalls entparaffiniert und mit PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurde ein Verdau der Chondroitinketten mittels Chondroitinase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 U/100 µl, verdünnt in ABC-Puffer durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte eine Stunde bei 37°C mit der Chondroitinase behandelt. Nach dem anschließenden Waschschrift mit PBS folgte das Blockieren für eine Stunde bei Raumtemperatur. Dann wurde über Nacht bei 4°C der Erstantikörper, ein Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper gegen Decorin, inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Blockierung der endogenen Peroxidasen mittels H₂O₂-Lösung und anschließend ein weiterer Waschschrift mit PBS. Der hier verwendete Zweitantikörper wurde dann für eine

Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es handelte sich dabei um eine Ziege-Anti-Kaninchen-IgG- *Horseradish peroxidase* (HRP). Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS erfolgte die Detektion mittels 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und die Kernfärbung mittels Hämalaun, sowie das Dehydratisieren und Eindecken in Roti®Mount-Eindeckmedium (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany).

2.4.4 Hyaluronsäure

Um die Auswirkung der *Has3*-Herabregulierung auf die HA-Menge in der Läsion zu analysieren, wurde eine Fluoreszenzfärbung für HA an aufgearbeiteten BCA-Schnitten durchgeführt. Dafür wurde zunächst eine Blockierung von endogenen Biotin-Strukturen mittels Avidin-Biotin-Blockierung durchgeführt. Der Hyaluronidaseverdau zur Negativkontrolle (100 U/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) erfolgte in einer Konzentration von 1:25 bei 37°C für eine Stunde im Wasserbad. Im Anschluss wurde das HA-Bindeprotein in einer Verdünnung von 1:150 über Nacht bei 4°C inkubiert, gefolgt von einer Färbung mit dem Sekundärantikörper Streptavidin Alexa Fluor® 488 und DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Schnitte wurden mit Prolong Gold (Invitrogen, Waltham, MA, USA) eingedeckt und am nächsten Tag mikroskopiert.

2.4.5 Dreifach-Färbung für YFP, LGALS3 und ACTA2

Zur detaillierten Untersuchung der Läsionszusammensetzung wurden in der BCA YFP als Marker für eine glatte muskellabstammende Zelle, ACTA2 als traditioneller glatte Muskelzellmarker sowie LGALS3 als Makrophagenmarker gefärbt. Dafür wurden die aufgearbeiteten Schnitte nach Entparaffinieren und Hydratisieren in einem ersten Schritt für 20 Minuten in der Mikrowelle mit einer Zitrat-basierten Antigen-Demaskierung inkubiert (Vector Laboratories, San Francisco, CA, USA). Nach dem Abkühlen und einem anschließenden Waschschrift mit PBS wurden die Schnitte dann mit 1 mL PBS/FSG (0,6% w/v) und 10% Pferde Serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) für eine Stunde blockiert. Anschließend wurden die Erstantikörper gegen GFP und LGALS3 über Nacht bei 4°C in einer Verdünnung aus PBS, FSG und Pferde-Serum inkubiert. Da YFP und GFP sich in ihrer Aminosäuresequenz sehr ähnlich sind, ist es möglich YFP mit einem Anti-GFP-Antikörper zu binden. Am nächsten Tag wurden die Erstantikörper mittels PBS/FSG und Tween 20 abgewaschen (0,1% Tween 20 zu PBS/FSG-Stock pipettiert) und im Anschluss noch einmal mit PBS gewaschen. Es folgte die Behandlung

mit den Sekundärantikörpern. Verwendet wurden dabei ein Esel-Anti-Ziege-IgG-Alexa Fluor® 647 für die YFP-Färbung sowie ein Esel-Anti-Ratte-IgG-Dylite-550 für die LGALS3-Färbung. Dieser Antikörperlösung hinzugegeben wurden ein direkt gekoppelter Antikörper für ACTA2 (α -Glatte Muskelaktin-FITC) sowie eine DAPI-Färbung (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Nach erneutem Waschen mit PBS/FSG und Tween 20 und PBS wurden die Schnitte mit Prolong Gold (Invitrogen, Waltham, MA, USA) eingedeckt und am nächsten Tag analysiert. Färbung und Mikroskopie wurden von Dr. Susanne Homann durchgeführt.

2.5 Aufnahme und Auswertung

2.5.1 Aufnahme der histologischen und immunhistologischen Färbungen

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen von H&E-, Sudan IV, TER119- und Kollagen-Färbungen erfolgten mit einem Zeiss Axioskope 2-Mikroskop und einer AxioCamMR 3-Kamera. Verwendet wurde dafür die AxioVision 40-Software, Version 4.6.3.0 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Um die fibrillären Kollagenbestandteile zu bestimmen, wurden die Pikrosiriusrot-gefärbten BCAs mit Hilfe eines Polarisationsmikroskopes (Olympus BX51, Shinjuku, Tokio, Japan) aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten mit einer 10x-Vergrößerung. Digitalisierte Bilder der Aufnahmen wurden zur Auswertung verwendet, mit Hilfe von Image Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Für die Aufnahme der Immunfluoreszenzbilder wurde ein Zeiss LSM700-Konfokalmikroskop genutzt sowie die Zen 2009 Light Edition-Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Es wurden 1 μm dicke *z-stacks* erstellt, Beginn und Ende der aufgenommenen Ebenen wurde anhand des YFP-Signals definiert.

2.5.2 Bestimmung der Plaquegröße in der brachiocephalischen Arterie

Die Plaquegröße im Durchmesser der BCA wurde in der H&E-Färbung bestimmt, um das Ausmaß der Atherosklerose zu bestimmen. Dafür wurden drei verschiedene Lokalisationen entlang der BCA untersucht. Zwischen den Lokalisationen lagen jeweils 300 μm (Entfernung zu Ursprung: 90 μm , 390 μm und 690 μm). Mittels Image Pro Plus-Software wurden dann die Plaques als *regions of interest*, also definierte Bereiche die analysiert werden sollen, festgelegt und vermessen.

2.5.3 Quantitative Auswertungen der Färbungen

Für die Quantifizierung von Färbungen wurden die digitalisierten Bilder von drei verschiedenen Lokalisationen entlang der BCA in Image Pro Plus übertragen. Verwendet wurde dann die Zusatzfunktion *Colour deconvolution* (http://imagej.net/Colour_Deconvolution; as of 11/27/2016), um die Bilder in drei verschiedene Farbkanäle zu separieren. Diese Funktion wird benötigt, um verschiedene Zielstrukturen zu differenzieren. Für die HA-, DAB- und Kollagen-Auswertungen wurde jeweils der Rot-Kanal verwendet. In einem ersten Schritt wurde anhand von drei bis vier Bildern ein Schwellenwert des positiven Signals für die Färbung festgelegt, um dieses von Hintergrundsignalen zu unterscheiden. Dieser Schwellenwert wurde dann für alle Schnitte einer Färbung verwendet. Die Läsionen wurden als *regions of interest* definiert und jeweils die anteilige Fläche, die positiv für das Signal ist, berechnet. Die Darstellung erfolgte dann als *area fraction*.

2.5.4 Bestimmung der Zellzusammensetzung

Für die Bestimmung der genauen Zellzusammensetzung wurden Immunfluoreszenzfärbungen für YFP, ACTA2 und LGALS3 verwendet. So war es möglich, genau zu analysieren, ob Zellen die traditionelle SMC-Marker wie ACTA2 ausbilden, aber auch solche die diese verlieren und LGALS3 ausbilden, ursprünglich aus einer glatten Muskelzelle stammen oder aus anderem Ursprung. Um einen besseren Überblick über die Gesamtplaques zu bekommen, wurden auch hier drei verschiedene Lokalisationen entlang der BCA untersucht und jeweils *z-stacks* durch die 10 µm dicken Schnitte angefertigt und die Ebene einzeln analysiert. Dies erfolgte mittels Zen 2009 Light Edition-Software. Einzelne Zellen wurden dabei anhand ihres DAPI-Signales definiert und die Kolo-kalisation der einzelnen Marker wie auch deren Kombinationen gezählt. Dies erfolgte sowohl für die fibrotische Kappe, als auch den Läsionskern. Die verwendeten Symbole für die Zellzählung sind in **Tabelle 3** aufgeführt. Die finale Darstellung der *z-stack*-Bilder erfolgte als *maximum intensity projection*, eine Darstellung, in welcher die Intensitäten alle Ebenen gemeinsam in einer abgebildet werden. Die Darstellung der Ergebnisse der Zellzählung erfolgte als totale Anzahl an positiv gezählten Zellen oder als prozentualer Anteil an DAPI⁺-Zellen oder YFP⁺-Zellen. Eine exemplarische Darstellung zur Auswertung der Aufnahmen ist in **Abbildung 37** dargestellt.

Tabelle 3: Symbole, verwendet für die Zellzählung.

Signal	Symbol in fibrotischer Kappe	Symbol im Läsionskern
DAPI+	rotes Kreuz	dunkelrotes Kreuz
YFP+	hellgrünes Kreuz	dunkelgrünes Kreuz
ACTA2+	blaues Kreuz	hellblaues Kreuz
LGALS3+	gelbes Kreuz	oliv-farbenes Kreuz
YFP+ACTA2+	roter Kreis	dunkelroter Kreis
YFP+LGALS3+	gelbes Rechteck	oliv-farbenes Rechteck
YFP-ACTA2+LGALS3+	pinkes Rechteck	violettes Rechteck
YFP+ACTA2+LGALS3+	roter Pfeil	dunkelroter Pfeil

2.5.5 Polarisationsmikroskopie

Die Pikrosiriusrot-Färbung wurde neben der lichtmikroskopischen Auswertung auch polarisationsmikroskopisch untersucht. Im Hellfeld erscheint Kollagen rot, wohingegen es in der Polarisationsmikroskopie möglich ist, den Anteil an fibrillärem Kollagen zu bestimmen.

Dicht gepackte Kollagenfasern erscheinen in polarisiertem Licht rot. Dünnere gepackte Fasern brechen das polarisierte Licht in einem anderen Winkel und erscheinen grün. Dazwischenliegende Fasern werden als gelb-orange wahrgenommen. Die unterschiedlich gefärbten Kollagenstrukturen wurden mittels Image Pro Plus jeweils als *area fraction* der Gesamtläsion bestimmt.

2.5.6 LC-PolScope-Analyse

Zur Bestimmung der Reifung und räumlichen Orientierung des fibrillären Kollagens wurde eine LC-PolScope-Analyse (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Die LC-PolScope-Analyse basiert auf der traditionellen Polarisationsmikroskopie, wird darüber hinaus aber durch einen Kompensator auf Flüssigkristall (*Liquid crystal, LC*)-

Basis und besondere Bildverarbeitungsalgorithmen erweitert [155-157]. Durch sie ist es möglich, zeitgleich die Doppelbrechung an verschiedenen Probenpunkten mit höchster Auflösung zu detektieren [158]. Je organisierter das Kollagen ist, desto stärker ist die Doppelbrechung des Lichts. So kann eine Doppelbrechungskarte der Probe erstellt werden, für die jeder Pixel in seiner Helligkeit proportional zur lokalen optischen Anisotropie des im Gewebe vorhandenen, angefärbten Kollagens ist. Blau steht dabei für weniger, rot für mehr Doppelbrechung. Die Summe der Helligkeiten der Pixel wurde über den gesamten Querschnitt der Läsion gemessen und durch die Gesamtfläche der Läsion geteilt, um eine durchschnittliche Helligkeit pro Pixel und damit durchschnittliche Doppelbrechung innerhalb der Läsion zu erhalten. Die LC-PolScope-Aufnahmen wurden mit Hilfe von Yu-Qing Zhou, PhD, *Ted Rogers Centre for Heart Research Translational Biology & Engineering Program*, Toronto, CA durchgeführt.

2.6 Einzelzell-RNA-Sequenzierung

Für die Einzelzell-RNA-Sequenzierung wurden die BCAs aus Läsionen von fünf SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*- und sechs SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen verwendet. Der Sequenzierungsansatz wurden für YFP⁺-Zellen sortiert, die YFP⁺-Zellen wurden im Anschluss in einem Verhältnis von 1:10 zur Gesamtzellprobe zugesetzt.

2.6.1 Dissektion und Verdau

Für die Dissektion der BCA-Läsionen wurden die Mäuse jeweils eröffnet und mit 5 mL einer 1 µg/mL Actinomycin-D/PBS-Lösung perfundiert. Für die BCA-Plaques-Dissektion wurde das Gefäß dann im Anschluss von Fett gereinigt und eröffnet. Dabei wurde von der Karotid/Subklavia-Bifurkation bis hin zum Ursprung im Aortenbogen gearbeitet. Mit einer feinen Pinzette wurden dann vorsichtig die Läsionen entfernt und in ein Low-bind Eppi mit 1% FACS-Puffer und 1 µg/mL Actinomycin-D auf Eis gegeben. Im Anschluss an die Entnahme wurden 1 mL einer Liberase-Lösung (Roche, Basel, Schweiz) für den Verdau hinzugegeben und die Proben mit einer Schere zerkleinert. Die folgende Inkubation erfolgte bei 37°C für 1,5 Stunden. Der Verdau wurde mit 1 mL FACS-Puffer gestoppt und die Proben bei 1000 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet vorsichtig in 250 µl 0.04%, nicht acetyliertem BSA (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) gelöst und durch einen 30 µm-Filter auf Eis filtriert.

2.6.2 Zellzählung und -Sortierung

Für die Zellzählung wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt, bevor die Zellen von Hand gezählt und die Vitalität bestimmt wurden. Im Anschluss wurden 20 µl aliquotiert und als unsortierte Probe auf Eis gelagert. Der Rest der Probe wurde mit Sytox Blue Viability dye (1:5000 Verdünnung, Life Technologies, Paisley, UK) gefärbt und nach YFP⁺- und YFP⁻-Zellen sortiert. Die FACS-Sortierung wurde durchgeführt durch die *Flow Cytometry Core Facility, University of Virginia*. Für das Sequenzieren wurden die Proben anschließend an die *Genome Analysis and Technology Core* der *University of Virginia* übermittelt.

2.6.3 Analyse

Alle Proben wurden mit Barcodes versehen und gepoolt. Der Versuchsablauf erfolgte dabei nach Herstellerangaben (*10x Genomics Chromium*). Die Sequenzierung erfolgte an einem Illumina NextSeq™, 150 Zyklen *high output* und mittels Chromium 10x-Verfahren und Bibliotheken. Eine Qualitätskontrolle erfolgte mittels Qubit und Agilent DNA *high sensitivity tape station* nach der 10X-Bibliotheken-Präparierung und NGS-Bibliotheken-Präparierung. Für die Auswertung wurden alle *reads* der Sequenzierung einer Qualitätskontrolle mittels FastQC unterzogen, das Alignment gegen das Maus Genom mm10 erfolgte mittels *cell ranger Software (10x Genomics)*. Die bioanalytischen Vorarbeiten bis zu diesem Punkt wurden von Gabriel Alencar, PhD, vorgenommen. Alle Analysen wurden dann mit der Software R (Version 3.6.1.) und integriertem Seurat v3 (3.1.5.) [159] durchgeführt. Die Proben wurden filtriert und Zellen mit weniger als 200 Genen oder Gene exprimiert in weniger als drei Zellen eliminiert. Um apoptotische oder geschädigte Zellen auszuschließen, wurden Zellen mit mehr als 10% mitochondrialen Genen, weniger als 800 exprimierten Genen oder mehr als 5000 exprimierten Genen herausgefiltert. Erythrozyten wurden herausgefiltert durch Ausschluss von Zellen mit mehr als 5% Hämoglobin. Dies resultierte in einem Datensatz von 1600 Zellen. Alle Bibliotheken wurden normiert unter Verwendung von *SCTransform* und im Anschluss integriert unter der Verwendung von 3000 hoch variablen Eigenschaften, wie kombiniert beschrieben durch *SCTransform* und den *integration workflow* von Seurat [160, 161]. Das Clustern erfolgte mittels der Funktionen *FindNeighbors* und *FindClusters* unter Verwendung der 17 *principal component analysis (PCA)* und einer Auflösung von 0,5. Eine 2D-Visualisierung erfolgte mittels Durchführung von *uniform manifold approximation and projection (UMAP)* mit *RunUMAP* unter Verwendung der 17 PCAs.

Eine Überprüfung der verschiedenen Expressionen wurde mit den unkorrigierten Daten durchgeführt, nach log-Normierung, Skalierung und Variation. Weiterhin wurden die Tools *FindConservedMarkers*, *FindMarkers* unter Verwendung des *Wilcoxon Rank Sum Tests* und der *Bonferroni correction* durchgeführt sowie die Gensignaturen mittels *AddModuleScore* bestimmt.

Der Zellzyklus wurde mittels *CellCycleScoring* bestimmt, wobei die Anzahl der Zellen in der S-Phase und der G2M-Phase bestimmt wurden. *Gene ontology* (GO) term und *Reactome Pathway overrepresentation*-Analysen wurden unter der Verwendung von PANTHER (<http://geneontology.org/>) [162] durchgeführt mit allen detektierten Genen aus dem kombinierten Datensatz. Interaktionsnetzwerke wurden generiert unter der Verwendung von STRING v11 (<https://string-db.org/>) [163], alle Abbildungen wurden erstellt mittels ggplot2 [164, 165]. Alle Analysen mit der Software R (Version 3.6.1.) und integriertem Seurat v3 (3.1.5.) die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden von Daniel Gorski, PhD, durchgeführt.

2.7 Versuche an kultivierten Zellen

2.7.1 Kultur muriner glatter Muskelzellen

Alle *in vitro*-Versuche wurden an murinen, aortalen, glatten Muskelzellen durchgeführt. Diese wurden durch das *Owens Lab* der *University of Virginia* aus drei bis fünf Wochen alten SMC *YFP^{+/+}*-Mäusen selbst isoliert und als Zelllinie kultiviert. Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid kultiviert, verwendet wurden sie für Experimente zwischen Passage 8 und 12. Als Haltungsmedium wurde DMEM/F12 (Gibco™ Life Technologies, Paisley, UK) verwendet, ergänzt mit 10% FBS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (10.000 U/mL, Gibco™ Life Technologies, Paisley, UK) und 1,6 mM L-Glutamin (200 mM, Gibco™ Life Technologies, Paisley, UK). Für die Versuche wurden die Zellen mit 100% Konfluenz verwendet. Um den Zellzyklus vor den Versuchen zu synchronisieren, wurden die Zellen vor Beginn der Experimente für 48 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Dafür wurde ebenfalls DMEM/F12 verwendet, unter Zusatz von 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 1,6 mM L-Glutamin, 0,2 mM Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 5 µg/mL Transferrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2,8 µg/mL Insulin (20 µg, Gibco™ Life Technologies, Paisley, UK) und 6,25 ng/mL Natriumselenat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.7.2 siRNA Transfektion zur Herunterregulierung von *Has3*

Die Herunterregulierung der *Has3* in murinen, kultivierten Zellen wurde mittels RNA-Silencing erreicht. RNA-Silencing ist ein zellulärer Mechanismus, bei welchem eine *small interfering*-RNA (siRNA) verwendet wird, von welcher der antisense Strang komplementär zu einer Ziel-messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) ist. Die Bindung der siRNA an diese mRNA führt zu deren Funktionsverlust und anschließender Degradation, was eine Reduktion der Translation der entsprechenden mRNA und damit ein *gene silencing* zur Folge hat.

Tabelle 4: Transfektionsansatz: modifiziert nach Herstellerangaben

Arbeitsschritt	Substanz	Menge
Verdünnung von Lipofectamin RNAiMAX in Opti-Mem™-Medium	Opti-Mem™-Medium	50 µl
	Lipofectamine RNAiMAX	3 µl
Verdünnung der siRNA in Opti-Mem™-Medium	Opti-Mem™-Medium	50 µl
	siRNA (10 µM)	1 µl (10 pmol)
Mischung verdünntes Lipofectamin RNAiMAX mit verdünnter siRNA (1:1)	verdünnte siRNA	50 µl
	verdünntes Lipofectamine RNAiMAX	50 µl
Inkubation für fünf Minuten bei RT		
Behandlung der Zellen pro Loch	siRNA-Lipid-Komplex	50 µl
	Finale Konzentration siRNA	5 pmol
	Menge Lipofectamine RNAiMAX	1,5 µl

Die Transfektion der murinen SMC erfolgte in 24-Loch-Platten nach 48 Stunden Kultivierung in serumfreien Medium. Es wurde eine siRNA spezifisch gegen die murine *Has3* (Ambion®, Waltham, MA, USA) mit der folgenden Sequenz verwendet:

sense *Has3* siRNA: 5'-AGGUGGUCAUGGUAGUGGAtt-3'
 antisense *Has3* siRNA: 5'-UCCACUACCAUGACCACCUtg -3'

Als Kontrolle diente eine *non-target*-siRNA (Ambion®, Waltham, MA, USA), welche zu keinem murinen Gen homolog ist. Beide siRNAs wurden in einer Konzentration von 10 µM in RNase-freiem Wasser gelöst, die final verwendete Konzentration pro Loch der 24-Loch-Platte lag bei 5 pmol. Sowohl mit der *Has3*-siRNA als auch der *non-target*-siRNA wurde unter Verwendung von Lipofectamine-RNAiMAX-Transfektions-Reagenz (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) und Opti-MEM™ (Gibco™ Life Technologies, Paisley, UK) ein Transfektionsansatz erstellt (**Tabelle 4**, Herstellung für Duplikate). Die Auswirkungen auf die Genexpression von *Has3* wurden 24 Stunden nach zweimaliger Behandlung (im Abstand von jeweils 24 Stunden) untersucht.

2.7.3 Die Stimulation der SMC-Dedifferenzierung zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen und der Einfluss von *Has3*-Defizienz und CD44-Blockierung

Um den Einfluss der Herabregulierung von *Has3* auf die Kollagendeposition zu untersuchen, wurde ein Modell der Dedifferenzierung von SMC zu kollagenproduzierenden, Myofibroblasten-ähnlichen Zellen verwendet [152]. Da die *Has3*-Expression sowohl durch TGFβ1 als auch durch PDGF-BB erhöht wird und eine suffiziente Herabregulation der *Has3* im Anschluss schwierig macht, wurde eine Interventionsstudie und kein präventiver Versuch gewählt. Die Zellen wurden zweimal im Abstand von 24 Stunden mit siRNA behandelt. Dafür wurden konfluente, murine SMC in einer 24-Loch-Platte für 48 Stunden mit serumfreiem Medium versetzt und im Anschluss mit einer Kombination aus 10 ng/ml mTGFβ1 und 10 ng/ml PDGF-BB (rekombinant human, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) behandelt. Da die Verdünnung der Substanzen mittels 4 mM Salzsäure erfolgte, diente diese auch als Vehikelbehandlung in der Kontrolle. Diese Behandlung wurde nach 24 Stunden und nach 48 Stunden wiederholt, jeweils zusammen mit einer *Has3*-siRNA und/oder CD44-Blockierung mittels Antikörper (Klon KM201, SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA, 10 µg/mL). Die Kontrolle für den CD44-blocking-Antikörper stellte eine Behandlung mit IgG1κ-Isotypenkontrolle (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) dar. Vor jeder Behandlung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um noch vorhandene, sezernierte Hyaluronsäure zu entfernen. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte 24 Stunden nach der letzten Behandlung.

2.7.4 HA-Quantifizierung mittels HA-Immunoassay

Für die Quantifizierung der HA-Menge im Überstand der Zellkultur wurden 24 Stunden und 48 Stunden nach siRNA-Behandlung die Überstände der Zellkultur abgenommen und analysiert. Dafür wurde ein Analyse-Kit von Corgenix Medical Corp., Broomfield, CO, USA verwendet, welches HA mittels eines HA-bindenden Proteins (HABP) detektiert. Vor der Analyse wurden alle Proben fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Die ermittelte HA-Menge wurden auf die Zellzahl normiert.

2.8 Molekularbiologische Techniken

2.8.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolierung wurden im Anschluss an die Lyse mit dem Qiagen RNeasy Minikit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstelleranweisung gearbeitet. Es wurde dann mittels NanoDrop™ 1000 Spektrophotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) durch Messung der Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm die RNA-Konzentration und -Qualität bestimmt.

2.8.2 Synthese von cDNA

Jeweils 250 ng der isolierten RNA wurde für das Umschreiben in cDNA verwendet. Vor der cDNA Synthese, wurde die RNA nach Herstellerangaben mit einer DNase I (Invitrogen™, Waltham, MA, USA) versetzt, um genomische DNA zu verdauen. Im Anschluss wurde die RNA in einem 20 µl-Ansatz mittels des iScript cDNA-Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) nach Herstellerangaben umgeschrieben. Im Anschluss wurden 5 µl der cDNA mit 95 µl RNase-freiem Wasser verdünnt.

2.8.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitativen *Realtime*-PCRs wurden in 96-Loch-Platten mit dem SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline, London, UK) unter Verwendung eines BioRad CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System C1000 Touch Thermal Cyclers in Kombination mit dem BioRad CFX Manager 3.1 durchgeführt. Für den Ansatz wurden je 5 µl verdünnte cDNA, 10 µl Sensifast SYBR Mix, 1 µl *forward* und *reverse* Primer, sowie 3 µl RNase-freies Wasser verwendet, alle Proben wurden zweifach bestimmt. Die relative

mRNA-Expression wurde mithilfe des $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ berechnet, Beta-2-Microglobulin (B2M) diente als interne Kontrolle. Die mRNA-Sequenzen des jeweiligen Targets wurden von *NCBI-Gene* für das Designen der Primer übernommen. Es wurde die Primer3Plus-Software (<https://www.gear-genomics.com/primer3plus/>) eingesetzt für das Design sowie *NCBI primer blast* zur Überprüfung der Spezifität verwendet. Die verwendeten Primersequenzen sind in **Tabelle 5** dargestellt.

Tabelle 5: qPCR-Primersequenzen

<i>Gen</i>	<i>Symbol</i>	<i>Forward primer (5' → 3')</i>	<i>Reverse primer (5' → 3')</i>
<i>Beta-2-Microglobulin</i>	<i>B2M</i>	ATGGCTCGCTCGGTGACCCT	TTCTCCGGTGGGTGGCGTGA
<i>Hyaluronsäure-synthase 1</i>	<i>Has1</i>	TATGCTACCAAGTATACCTCG	TCTCGGAAGTAAGATTTGGAC
<i>Hyaluronsäure-synthase 2</i>	<i>Has2</i>	CAAAAATGGGGTGGAAAGAG	ACAGATGAGGCAGGGTCAAG
<i>Hyaluronsäure-synthase 3</i>	<i>Has3</i>	CTCAGTGGACTACATCCAGG	GACATCTCCTCCAACACCTC
<i>Cluster of differentiation 44</i>	<i>Cd44</i>	CTTGGCCACCAGAGAT CGAG	CACTCCACTGTCCTGGT TCG
<i>Actin alpha 2</i>	<i>Acta2</i>	CGCTGTCAGGAACCCTGAGA	CGAAGCCGGCCTTACAGA
<i>Kollagen 1a1</i>	<i>Col1a1</i>	CAGGCTGGTGTGATGGGATT	AAACCTCTCTCGCCTCTTGC
<i>Kollagen 3a1</i>	<i>Col3a1</i>	GAGAAAGGGGTCCTAGTGGC	CACCGACTTCACCCTTTGGA
<i>Kollagen 8a1</i>	<i>Col8a1</i>	GGCAAAGAGTACCCACACCTACC	GACCTTGTTCTCCGCGCAAACCTG
<i>Kollagen 15a1</i>	<i>Col15a1</i>	CTGTCCACTTTCCGAGCCTTT	AAAGCACTTGGCCCTTGAGA
<i>Fibronectin 1</i>	<i>Fn1</i>	GACCCTTACACGGTTTCCCA	ACGTTGCTTCATGGGGATCA

2.9 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung aller Analysen erfolgte mit GraphPad Prism, Version 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) und R Version 4.0.5. Der Stichprobenumfang wurde anhand früherer Ergebnisse zu vergleichbaren Experimenten geschätzt, um eine Aussagekraft von 90% bei einem Signifikanzniveau von 0,05 zu erreichen. Die Anzahl der für jede Analyse verwendeten Mäuse ist in den Legenden zu den Abbildungen angegeben. Alle *in vivo*-Daten sind biologisch und technisch unabhängige Replikate und sind als Mittelwert plus/minus Standardabweichung (SD) angegeben. Die *in vitro*-Daten unter Verwendung von aortalen SMC der Maus sind technisch unabhängige Replikate und werden als Mittelwert plus/minus SD angegeben. Es wurden keine experiment-übergreifenden Mehrfachtest-Korrekturen vorgenommen, sondern nur Korrekturen innerhalb eines Tests. Die statistische Analyse von Experimenten, die an mehreren Stellen entlang des BCA gemessen wurden, wurde aufgrund der unterschiedlichen Wirkung der Scherbelastung an den einzelnen Lokalisationen getrennt ausgewertet. Statistische Ausreißer wurden mittels *Grubb's test* ermittelt ($\alpha=0,05$) und von der Analyse ausgeschlossen. Eine Normalverteilung wurde mittels *D'Agostino&Pearson test* getestet, im Falle eines Vergleichs zweier normalverteilter, experimenteller Gruppen wurden die Datensätze mit einem ungepaarten, zweiseitigen *student's t-test* oder einer *two-way ANOVA* mit anschließender *Sidak's multiple comparisons test*-Korrektur für den Vergleich aller Einzelbedingungen analysiert. Im Falle nicht normalverteilter Daten oder für Gruppen mit $n \leq 8$ wurde der nicht parametrische, ungepaarte, zweiseitige *Mann-Whitney U-test* oder der *Kruskal-Wallis test* mit post hoc *pairwise multiple comparison* und *Dunn's correction* genutzt. Für die multifaktorielle Analyse wurde dann mittels *ANOVA of Aligned Rank Transform (ART) data* unter Verwendung der R-Implementierung von ARTool, Version 0.11.0, mit sich anschließendem *Sidak's multiple comparisons test*-Korrektur getestet. Für die **Abbildung 35** wurde eine Normalverteilung der Werte anhand der folgenden Literatur belegt: Newman, AAC *et al.* *Multiple cell types contribute to the atherosclerotic lesion fibrous cap by PDGFRbeta and bioenergetic mechanisms*, Nature Metabolism 2021 [152].

Für kategoriale Daten, wie die Analyse der intraplaque Einblutungen wurde ein exakter Test nach Fisher durchgeführt. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Die folgenden Daten wurden erhoben, um den Einfluss der SMC-spezifischen *Has3* auf die Progression der Atherosklerose im Mausmodell zu untersuchen und potentielle Mechanismen zu identifizieren.

3.1 Die Validierung der SMC $YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}$ -Maus

Für die Versuche wurden männliche *Lineage Tracing*-Mäuse mit *ApoE*- und SMC-spezifischer *Has3*-Defizienz (nachfolgend: SMC $YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}$ - sowie SMC $YFP^{+/+} ApoE^{-/-} Has3^{wt/wt}$ -Mäuse) verwendet. Bei allen verwendeten Tieren handelt es sich um Wurfgeschwister.

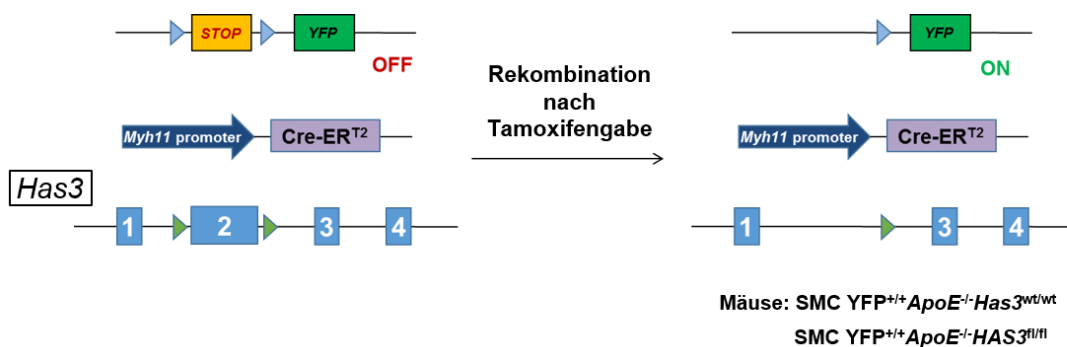


Abbildung 12: Generierung eines Mausmodells mit *ApoE*-defizientem Hintergrund, SMC-spezifischer Herabregulierung der *Has3* und zellspezifischem *Lineage Tracing*-System.

Durch Behandlung mit Tamoxifen-Injektionen an zehn aufeinanderfolgenden Tagen (1mg/Maus/Tag) wurde in diesen Mäusen eine Cre-ER^{T2}-Rekombinase aktiviert. Diese ermöglicht unter dem *Myh11*-Promotor ein selektives Ausschneiden des *Has3*-Konstruktes in glatten Muskelzellen sowie auch des STOP-Codons vor dem endogenen YFP.

Diese Mäuse wurden im Alter von fünf bis sieben Wochen mit zehn aufeinanderfolgenden Tamoxifen-Injektionen (1mg/Maus/Tag, siehe Studiendesign **Abbildung 10**) behandelt, um das YFP vermittelte *Lineage Tracing*-System sowie die SMC-spezifische *Has3*-Defizienz zu induzieren. Dies geschieht durch eine Cre-ER^{T2}-Rekombinase, die spezifisch unter dem *Myh11*-Promotor aktiv ist [151] (**Abbildung 12**). Im Anschluss wurden die Tiere für 15 Wochen mit einer hochkalorischen WD gefüttert, um fortgeschrittene, atherosklerotische Läsionen zu entwickeln.

3.1.1 Die Validierung der induzierbaren Rekombinationseffizienz von SMC-spezifischer YFP-Expression

Im Laufe der letzten Jahre hat sich gezeigt, dass SMC unter pathophysiologischen Bedingungen ihren Phänotyp variieren, dabei ihre spezifischen Oberflächenproteine verlieren und Marker anderer Zelltypen ausbilden können [34-37, 39]. Daher sind Abstammungsverfolgungssysteme unentbehrlich, um die Einflüsse von SMC im Verlauf der Atheroprogression zu analysieren. In dieser Arbeit wurde dafür mit einem YFP-basierten *Lineage Tracing*-System gearbeitet, welches die SMC vor Entwicklung der Läsion im gesunden Gefäß bereits markiert und eine Verfolgung der Zellen auch nach Verlust der typischen Marker möglich macht [153].

Um die Rekombinationseffizienz und die Spezifität der induzierbaren SMC-spezifischen YFP-Expression zu validieren, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung an gesunden BCAs für ACTA2, YFP und DAPI durchgeführt (n=2). ACTA2 diente dabei als literaturbekannter, SMC-spezifischer Marker, das DAPI-Signal als Kennzeichnung der Zellen mittels Zellkernfärbung. Die BCAs wurden aus den gesunden Tieren entnommen und in Paraffin eingebettet, in 10 µm dicke Schnitte geschnitten und gefärbt. Die Färbung erfolgte in zwei unterschiedlichen Lokalisationen, 270 µm und 570 µm entfernt vom Aortenbogen.

Zur Validierung wurde die Anzahl an YFP⁺ACTA2⁺/ACTA2⁺-Zellen (DAPI⁺) bestimmt. Dabei zeigte sich, dass 91% der Zellen in der Lokalisation 270 µm und 93% der Zellen 570 µm entfernt vom Aortenbogen positiv für YFP und ACTA2 angefärbt waren (**Abbildung 13**). Damit konnte eine Rekombinationseffizienz von im Mittel 92% nachgewiesen werden.

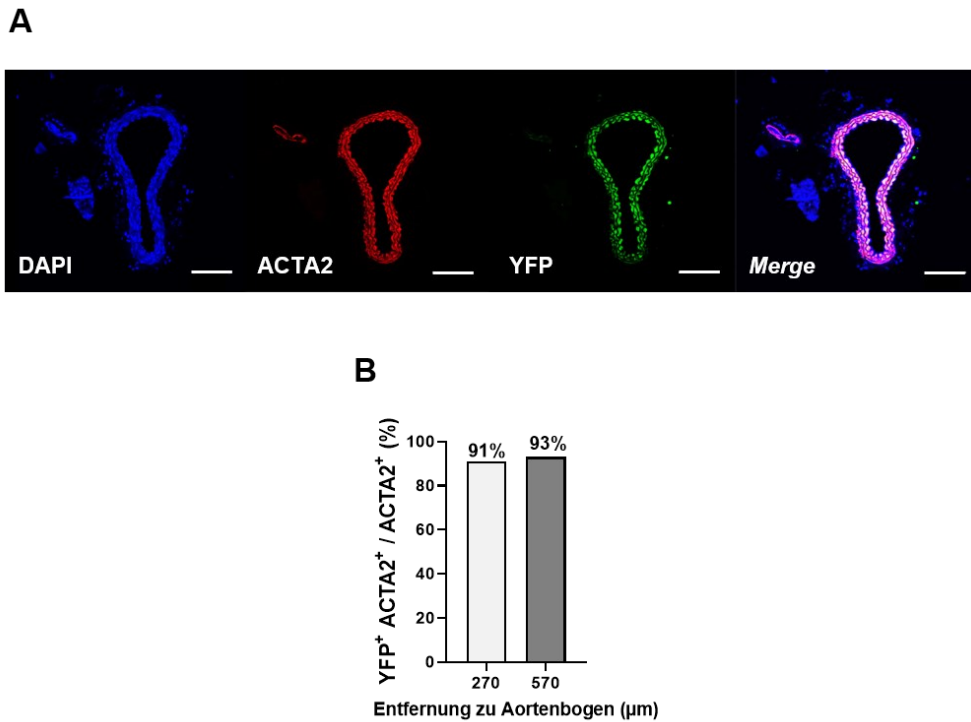


Abbildung 13: Validierung der Rekombinationseffizienz von SMC-spezifischer, endogener YFP-Expression.

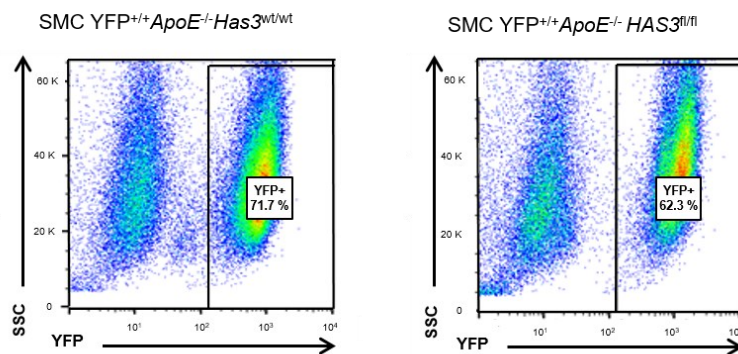
(A) Für die Markierung von glatten Muskelzellen mittels endogenem YFP wurde eine Cre-ER^{T2}-Rekombinase unter einem *Myh11*-Promoter verwendet, der spezifisch nur in glatten Muskelzellen aktiv ist [151]. Im Anschluss an die Induktion des YFP-vermittelten *Lineage Tracing*-Systems, wurde die BCA entnommen und die YFP-Expression mittels einer immunohistochemischen Färbung validiert. Die Schnitte wurden gefärbt für DAPI (blau), ACTA2 (rot) und YFP (grün). Die kombinierte Färbung (Merge) ist auf der rechten Seite dargestellt. **(B)** Die Quantifizierung mittels Zellzählung zeigte eine Rekombinationseffizienz von 92% für die endogene YFP-Expression in glatten Muskelzellen, gemessen als prozentualer Anteil der YFP⁺ACTA2⁺-Zellen pro ACTA2⁺-Zellen. (n=2, Maßstabsbalken entspricht 100 μm).

3.1.2 Die Validierung der zellspezifischen *Has3*-Herabregulierung

Um neben der Rekombinationseffizienz für das YFP-Reportergen auch die zellspezifische *Has3*-Defizienz zu validieren, wurden Aorten von acht Wochen alten Tiere untersucht (n=3, 3). Diese erhielten Tamoxifen, wie zuvor beschreiben zur Aktivierung der Cre-Rekombinase. Nach Entnahme der Aorten wurden diese zu einer Einzelzellsuspension verdaut, gepoolt und dann für YFP⁺ und YFP⁻ sortiert (**Abbildung 14 A**). Dabei konnten 71,7% der Zellen in der SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*-Probe als positiv für YFP detektiert werden sowie 62,3% in der SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Probe. Im Anschluss wurde die DNA aus den YFP⁻- und YFP⁺-Zellen extrahiert und mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt. Mit Hilfe einer Gelelektrophorese konnte das Ausschneiden der *Has3* in YFP⁺-SMC überprüft werden (Primersequenzen dargestellt

in **Abbildung 11**). Dabei zeigte sich, dass eine erfolgreiche Rekombination, wie gewünscht ausschließlich in den YFP⁺-Zellen der SMC-*Has3* defizienten Tiere stattfand (Signal von 436 bp). Die YFP⁻-Zellen in SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Tieren, sowie die YFP⁺- und YFP⁻-Zellen der SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*-Tiere zeigten keine Bande, welche das Ausschneiden der *Has3* nachweisen würde (**Abbildung 14 B**).

A



B

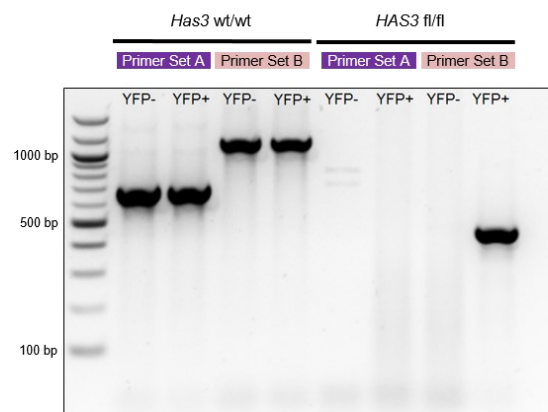


Abbildung 14: Validierung der zellspezifischen *Has3*-Herabregulierung für glatte Muskelzellen.

(**A**) Um die Herabregulierung der *Has3* spezifisch in glatten Muskelzellen zu untersuchen, wurden Aorten aus Wildtyp- und transgenen Mäusen entnommen, die zehn Tamoxifen-Injektionen erhalten haben. Diese Aorten wurden nach YFP⁻- und YFP⁺- Zellen mittels Cell Sorter/FACS aufgeteilt und jeweils die DNA isoliert. (**B**) Mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion und zwei verschiedenen Primer-Ansätzen wurde diese DNA vervielfältigt und mittels Gelelektrophorese untersucht. Das Signal von 436 bp indiziert ein erfolgreiches Ausschneiden des markierten *Has3*-Konstruktes.

Die erfolgreiche Validierung der Rekombinationseffizienz für das induzierbare *Lineage Tracing*-System sowie die zellspezifische *Has3*-Defizienz ermöglichte die weitere Analyse der Funktionen von SMC-*Has3* in der Atheroprogression, insbesondere in Zusammenhang mit der phänotypischen Änderung von SMC.

3.1.3 Die Hyaluronsäureproduktion nach SMC-spezifischer *Has3*-Herabregulierung

Aus der Literatur ist bekannt, dass die *Has3* insbesondere in der frühen atherosklerotischen Läsionsentwicklung am stärksten von den drei Synthasen exprimiert wird [83]. Während die HA im gesunden Gefäß vor allem in der Adventitia von Fibroblasten und SMC produziert wird, akkumuliert sie bei atherosklerotischen Gefäßveränderungen in der Läsion und trägt dort maßgeblich zur Volumenexpansion bei. Hier hat sich gezeigt, dass neben Fibroblasten und SMC viele verschiedene Immunzellen wie T-Zellen, Makrophagen und auch Endothelzellen zur vaskulären HA-Matrix beitragen.

Um zu untersuchen, wie sich die Defizienz der SMC-spezifischen *Has3* auf die Deposition von HA in fortgeschrittenen Läsionen, nach 15 Wochen WD auswirkt, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mittels HABP durchgeführt.

Abbildung 15 A zeigt die HABP-Färbung einer repräsentativen atherosklerotischen Läsion für SMC YFP^{+/+} *ApoE*^{-/-} *Has3*^{wt/wt}- und SMC YFP^{+/+} *ApoE*^{-/-} *HAS3*^{fl/fl}- Mäuse. Hier war die HA-Akkumulation (rot) in Tieren mit einer genetischen Deletion von SMC-*Has3* (FL) vermindert, verglichen mit den entsprechenden SMC-*Has3*-Wildtypen (WT). Die Quantifizierung des HA-Signals als anteilige Fläche der Gesamtläsion (*area fraction*) zeigte, dass in den WT-Tieren 25% der Läsionsfläche ein positives HA-Signal aufwies. Die SMC-spezifische Deletion von *Has3* zeigte demgegenüber eine signifikante Verringerung von mehr als 50% (**Abbildung 15 B**).

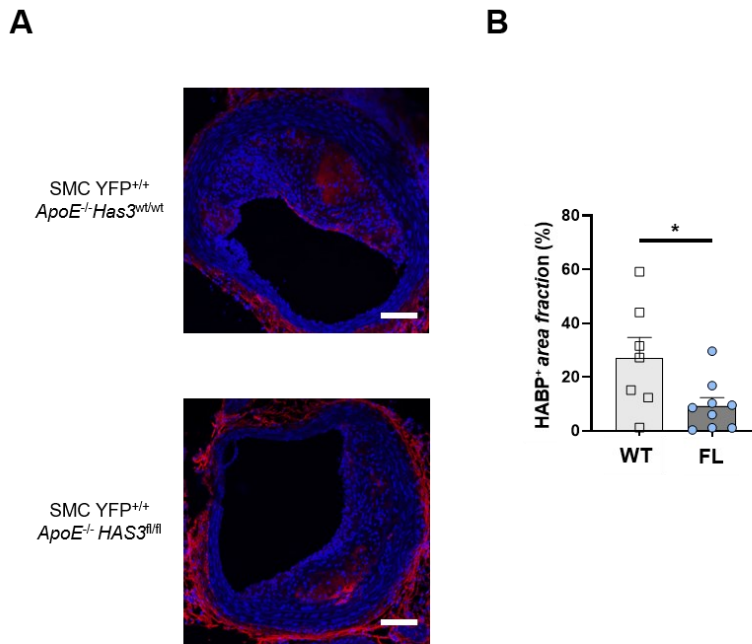


Abbildung 15: Die Herabregulierung von *Has3* in SMC führt zu einer signifikanten Verringerung von HA in der Läsion.

(A) Repräsentative Schnitte einer Immunfluoreszenzfärbung für DAPI (blau) und HABP (rot) in Paraffinschnitten von SMC YFP^{+/+} *ApoE*^{-/-} *Has3*^{wt/wt} und SMC YFP^{+/+} *ApoE*^{-/-} *HAS3*^{fl/fl}-Mäusen. **(B)** Die Quantifizierung der HABP-positiven Fläche pro Gesamtfläche (*area fraction*) innerhalb der Läsion ergab eine signifikante Verringerung der HA-Menge nach Herabregulierung der SMC-spezifischen *Has3*. Der Maßstabsbalken repräsentiert 100 μ m, dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, $n = 7,9$, * $p < 0,05$, statistische Signifikanzen wurden ermittelt mit dem *Mann-Whitney U-test*.

3.1.4 Einfluss des humanisierten *HAS3*-Konstruktes auf die Läsionsentwicklung und HA-Deposition

Wie bereits unter Abschnitt 2.1.1 beschrieben, enthält die *HAS3*^{-/-}-Maus, welche zur Generierung des hier verwendeten Mausmodells verwendet wurde, anstelle der murinen Sequenz des Exon 2 die humane *HAS3*-cDNA. Dies führt zu einer größeren Vergleichbarkeit zwischen den Beobachtungen im Tiermodell und der Vorhersage von möglichen Effekten im Menschen. Nach Tamoxifengabe wird SMC-selektiv das *HAS3*-Konstrukt ausgeschnitten, befindet sich jedoch über den gesamten Versuchsablauf weiterhin in allen anderen Zellen des Körpers. Um für die folgenden Ergebnisse auszuschließen, dass das humanisierte *HAS3*-Konstrukt der Versuchstiere, welche mit Kontrolltieren mit muriner *Has3* verglichen wurden, einen Einfluss auf die Studie nimmt, wurde eine Kontrolllinie generiert (*ApoE*^{-/-} *Has3*^{wt/wt} vs. *ApoE*^{-/-} *HAS3*^{fl/fl}-Mäuse). Diese verfügt nicht über eine Cre-Rekombinase, so dass eine Tamoxifengabe nach Protokoll

möglich war, ohne die *Has3* auszuschneiden. Die Mäuse wurden vergleichbar zu den Versuchstieren für 15 Wochen mit einer WD gefüttert und im Anschluss analysiert. Dafür wurden BCAs entnommen (n=4,4), in Paraffin eingebettet, in 10 µm dicke Schnitte geschnitten und mit H&E gefärbt (**Abbildung 16 A**).

Für diese Analyse wurde ein Schnitt verwendet, der in 390 µm Entfernung zum BCA Ursprung am Aortenbogen lag, um das Ergebnis mit den Daten aus den *Lineage Tracing*-Versuchstieren vergleichen zu können, von denen für diese Untersuchung die Lokalisationen 90 µm, 390 µm und 690 µm verwendet wurden. Im Anschluss wurde die Läsionsgröße bestimmt. Dabei zeigten *ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*-Mäuse keine Unterschiede in der Läsionsfläche im Vergleich zu den *ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen (**Abbildung 16 B**). Auch im Vergleich zur Läsionsfläche der Versuchsgruppe aus den Vorarbeiten (**Abbildung 6**) gab es keine signifikanten Unterschiede (nicht gezeigt).

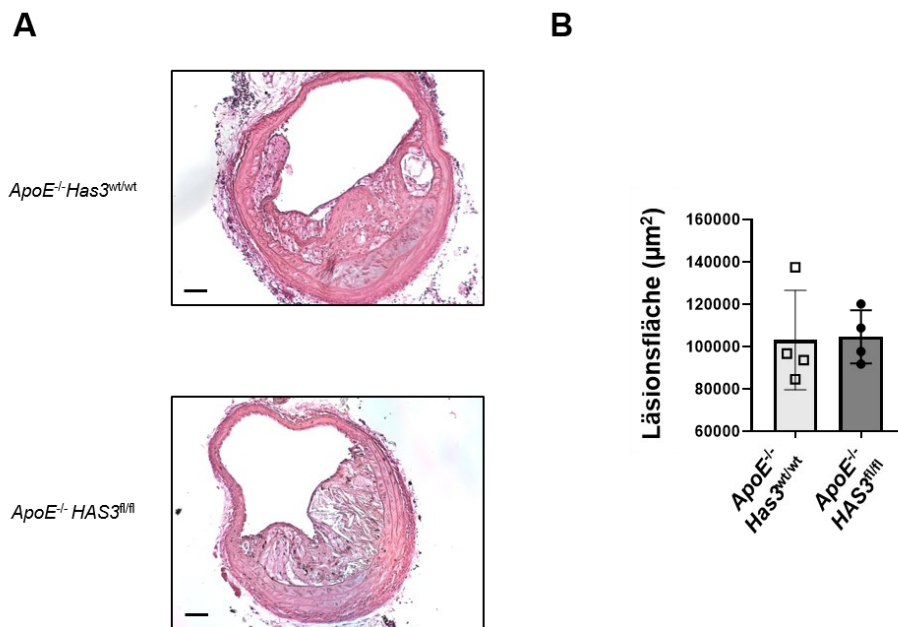


Abbildung 16: Analyse der Läsionsfläche in *ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*- und *ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen. (A) Repräsentative Bilder der Auswertung und (B) quantitative Bestimmung der Läsionsfläche für *ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*- und *ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäuse. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n = 4,4, statistische Signifikanzen wurden ermittelt mit dem *Mann-Whitney U-test*. Der Maßstabsbalken repräsentiert 100 µm.

In einem zweiten Schritt wurde die HA-Menge in den Läsionen der Kontrollgruppe untersucht. Dafür wurde an Paraffinschnitten eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem HABP durchgeführt.

Der Anteil an HA an der Gesamtplaquefläche wurde im Anschluss bestimmt (**Abbildung 17**).

Hier zeigte sich, dass ca. 20% der Plauefläche nach 15 Wochen WD-Fütterung HABP-positiv gefärbt war (rot). Dabei gab es keine Unterschiede zwischen *ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*- und *ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen, auch war der Wert vergleichbar mit der HABP-positiven Fläche in den SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*-Tieren (**Abbildung 15**). Anhand der erhobenen Daten zur Kontrolllinie wurde im weiteren Verlauf der Experimente davon ausgegangen, dass das humanisierte *HAS3*-Konstrukt keinen entscheidenden Einfluss auf die Atheroprogession zeigt und ein Vergleich zu den WT-Tieren mit murinem Konstrukt möglich ist.

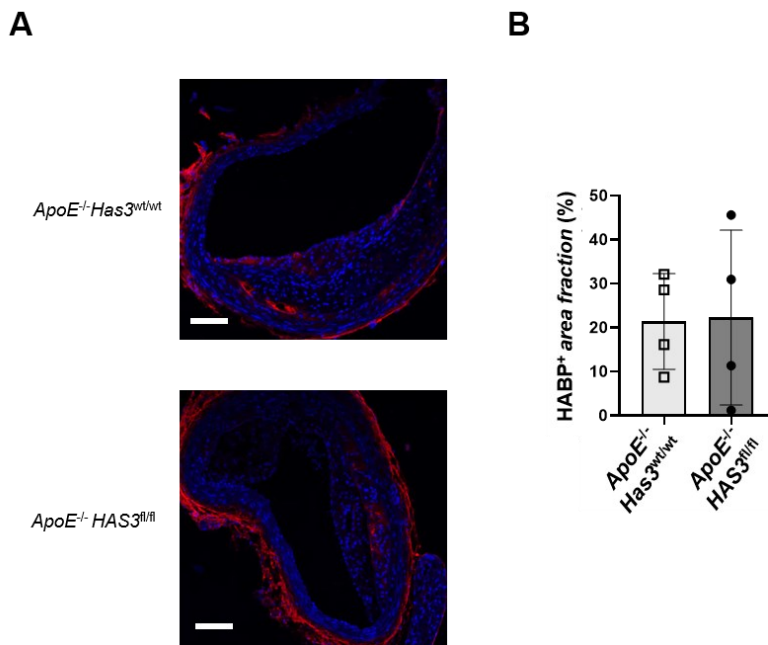


Abbildung 17: Bestimmung des HA-positiven Anteils in Läsionen von *ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*- und *ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen.

(A) Repräsentative Abbildungen und (B) Analyse der HABP⁺ *area fraction* als Anteil an der Gesamtplauefläche für *ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*- und *ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*-Mäuse zeigten keinen Einfluss auf die HA-Depositionen durch das humanisierte *HAS3*-Konstrukt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, $n = 4,4$, statistische Signifikanzen wurden ermittelt mit dem *Mann-Whitney U-tests*. Der Maßstabsbalken repräsentiert 100 μm .

3.2 Der Einfluss der SMC-spezifischen *Has3* auf die Plaquemorphologie der Atherosklerose

Blutfluss und Scherstress beeinflussen entscheidend die Lokalisierung und das Fortschreiten von atherosklerotischen Läsionen [166]. Folglich entwickeln sich Plaques schneller an Stellen wie der Aortenwurzel, an welcher starke Blutflussvariationen herrschen. An anderen Stellen wie der BCA erfordert die Entwicklung atherosklerotischer Plaques mehr Zeit [167]. Die BCA-Läsionen ähneln jedoch den humanen Plaques in ihrer Lokalisation und Zusammensetzung mehr [168], weshalb ausschließlich diese zu den folgenden Untersuchungen herangezogen wurde. In den Vorarbeiten konnte durch Dr. Susanne Homann bereits gezeigt werden, dass die SMC-spezifische *Has3*-Defizienz keinen Einfluss auf die Gesamtplaquebelastung der Aorta oder die Läsionsfläche in der BCA nimmt (**Abbildungen 5 und 6**).

3.2.1 Körpergewicht und metabolische Parameter der Versuchstiere

Um den Einfluss der SMC-spezifischen *Has3*-Defizienz nun auf die Plaquemorphologie in der Atherosklerose zu untersuchen, wurden SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*- und SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäuse nach 15 Wochen WD in einem Alter von 22-24 Wochen analysiert. Dabei zeigte sich, dass die zellspezifische Defizienz keinen Einfluss auf das Körpergewicht der Tiere hatte (**Abbildung 18 A**).

Mehrere epidemiologische Studien zeigen eine positive Korrelation zwischen Serum-Cholesterinspiegel und der Häufigkeit von Todesfällen, induziert durch kardiovaskuläre Herzerkrankungen [169-171]. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass eine globale *Has3*-Deletion zu signifikant verringertem *high density lipoprotein* (HDL) führt, wohingegen LDL nicht beeinflusst wird [83]. Um beurteilen zu können, welchen Einfluss die SMC-*Has3* auf Cholesterol- und Triglyzeridspiegel hat, wurden Serumproben von SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*- und SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen untersucht (n=9,13). Dabei konnte gezeigt werden, dass die SMC-spezifische *Has3*-Deletion keinen Einfluss auf diese metabolischen Parameter hatte (**Abbildung 18 B-C**).

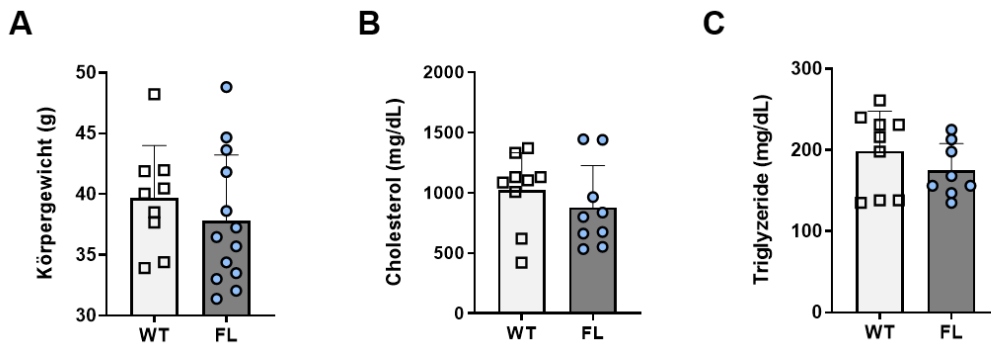


Abbildung 18: Die Herabregulierung von *Has3* in SMC hat keinen Einfluss auf das Körpergewicht oder metabolische Parameter in *ApoE*-defizienten Mäusen nach 15 Wochen Western Diät.

Nach 15 Wochen WD wurden Körpergewicht (A), sowie Cholesterol (B) und Triglyzeride (C) im Blut der Mäuse bestimmt. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen SMC YFP^{+/+}*ApoE*^{-/-} *Has3*^{wt/wt}- und SMC YFP^{+/+}*ApoE*^{-/-} *HAS3*^{fl/fl}- Mäusen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n = 9, 13, statistische Signifikanzen wurden ermittelt mit dem *students t-test*.

3.2.2 Morphologische Charakterisierungen der atherosklerotischen Läsion

Nachdem die Herabregulierung von *Has3* spezifisch in SMC zu keiner Veränderung in der Läsionsgröße innerhalb der BCA (Abbildung 5) sowie auch der totalen Plaquebelastung der Aorta (Abbildung 6) führte, sollte die genaue Plaquezusammensetzung analysiert werden. Studien an *Lineage Tracing*-Mäusen und humanen Proben in den letzten Jahren haben gezeigt, dass bis zu 80% der SMC in atherosklerotischen Läsionen ihre spezifischen Markerproteine verlieren. Des Weiteren sind 30% dieser SMC positiv für LGALS3, ein Marker der bisher überwiegend mit Makrophagen in Verbindung gebracht wurde [37, 39, 151]. Kürzlich veröffentlichte Arbeiten zeigen, dass LGALS3 in phänotypisch modulierte SMC exprimiert wird [34-36]. Diese SMC dedifferenzieren in der atherosklerotischen Läsion und können unter anderem inflammatorische, matrix-produzierende sowie osteogene Eigenschaften annehmen. Ausdifferenziert können diese modifizierten SMC dann proatherogene oder vorteilhafte Einflüsse auf die Läsion nehmen [35] in Abhängigkeit von ihrem Phänotyp, ihrer Anzahl und Lage in der Läsion.

Zur Untersuchung, welchen Einfluss eine SMC-spezifische Herabregulierung von *Has3* auf die Plaquemorphologie hat, wurde eine Dreifachfärbung für YFP als Abstammungsmarker von SMC, ACTA2 als kontraktiler SMC-Marker und LGALS3 als Marker für phänotypisch modulierte SMC durchgeführt (Abbildung 19). Aufgrund von

veröffentlichten Studien der letzten Jahre ist bekannt, dass die beiden letztgenannten Marker nicht mehr ausreichend geeignet sind, um die unterschiedlichen SMC-abgeleiteten Läsionsphänotypen ausführlich zu definieren. Dennoch stellen sie kritische SMC-abgeleitete Zellpopulationen dar und ermöglichen es, unsere Ergebnisse mit denen aus vorangehenden Publikationen [34-37] zu vergleichen und den Einfluss der *Has3* auf mögliche Veränderungen innerhalb der Läsionszusammensetzung zu untersuchen.

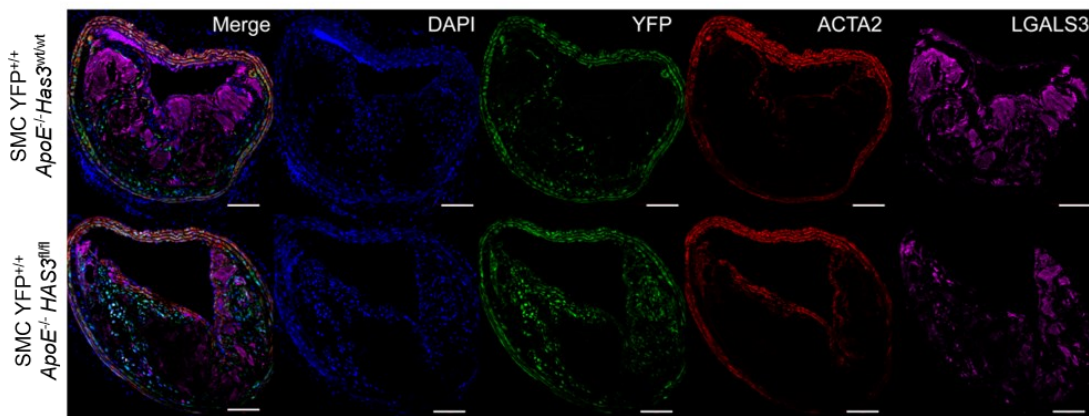


Abbildung 19: SMC-spezifische Defizienz von *Has3* resultiert in morphologischen Veränderungen der Läsionszusammensetzung innerhalb atherosklerotischer Plaques.

Repräsentative Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen für DAPI (blau), YFP (grün), ACTA2 (rot) und LGALS3 (magenta) von Paraffinschnitten aus SMC $YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}$ - und SMC $YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}$ -Mäusen. Der Maßstabsbalken repräsentiert 100 μ m.

Die Quantifizierung erfolgte durch Zellzählung (DAPI⁺) von ACTA2⁺YFP⁺- und LGALS3⁺YFP⁺-doppelpositiven Zellen in drei verschiedenen Lokalisationen der BCA, 150 μ m, 450 μ m und 750 μ m vom Aortenbogen entfernt.

Die Zählung wurde im Verhältnis zu der Gesamtzahl an SMC (YFP⁺) analysiert, welche sich zwischen beiden Genotypen nicht signifikant unterschied. Das Ergebnis zeigte, dass die Defizienz von *Has3* in SMC zu signifikant verringerten Mengen an kontraktile ACTA2⁺-SMC führte. Gleichzeitig war die Zahl an LGALS3⁺-SMC signifikant erhöht in SMC $YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}$ -Mäusen im Vergleich zu SMC $YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}$ -Mäusen. Dieses Ergebnis konnte sowohl in der Gesamtläsion (n=7,7, **Abbildung 20 A**), als auch in der fibrotischen Kappe (FC, n=4-7, **Abbildung 20 B**) beobachtet werden. Die Differenz in den n-Zahlen zwischen Gesamtläsion und fibrotischer Kappe kam zustande, da nicht alle Tiere eine fibrotische Kappe ausgebildet hatten.

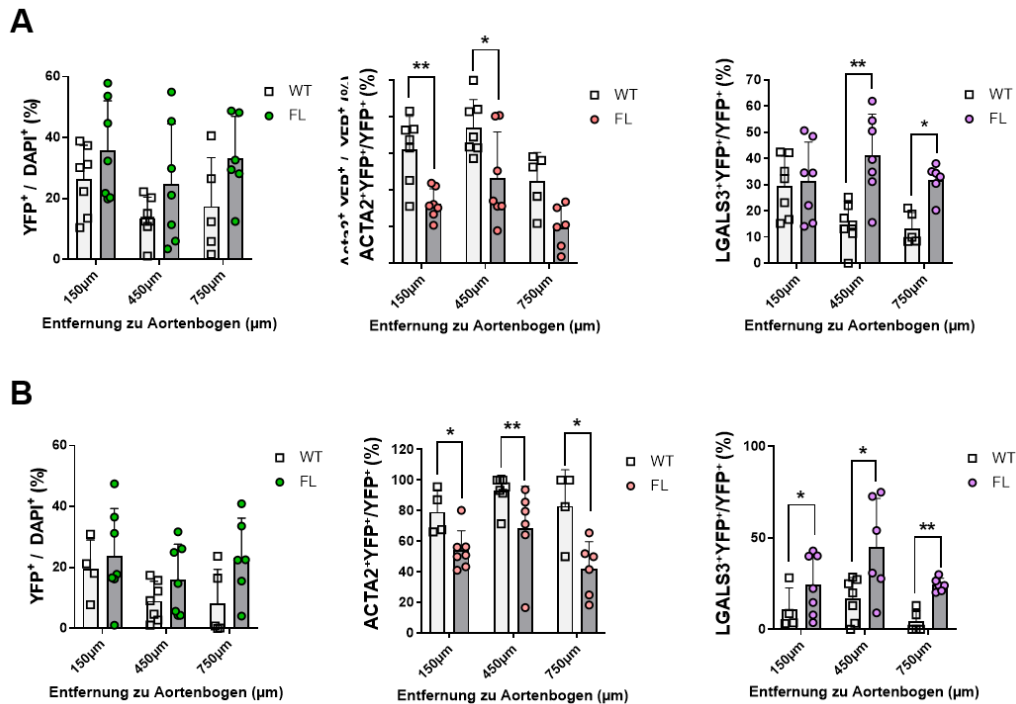


Abbildung 20: Die Herabregulierung von *Has3* in SMC führt zu signifikant veränderten Zusammensetzungen in den ACTA2⁺ YFP⁺- und LGALS3⁺ YFP⁺-Zellen.

Die Quantifizierung von YFP⁺-Zellen pro Gesamtzellzahl und die Bestimmung der prozentualen Anteile von ACTA2⁺ YFP⁺/YFP⁺- und LGALS3⁺ YFP⁺/YFP⁺-Zellen in der Gesamtläsion (A) sowie der fibrotischen Kappe (B). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n = 4-7, statistische Signifikanzen wurden für drei Einzellokalisationen entlang der BCA ermittelt mit dem *Mann-Whitney U-test*. * p < 0,05, ** p < 0,01.

3.2.3 Plaquestabilitätsparameter und Extrazelluläre Matrix in der atherosklerotischen Läsion

Die EZM spielt eine wichtige Rolle für die Stabilität von Plaques und die damit verbundene Resistenz gegen Rupturen. Stabile Plaques sind gekennzeichnet durch eine dicke, ACTA2⁺- und matrixreiche FC, einen kleinen nekrotischen Kern und wenige Immunzellen. Eine instabile Läsion zeigt meist eine dünne FC mit wenig EZM, große lipidreiche und nekrotische Bereiche sowie viele Immunzellen [10, 11].

Auch der Erythrozytenmarker TER119 ist ein Parameter, der Aussagen über die Plaquestabilität trifft. Er kann gefärbt werden und gibt Aufschluss über Einblutungen in die Plaqueregion, welche als Indiez für instabile Plaques gelten. Im Rahmen der Vorarbeiten wurde bereits eine immunhistochemische Analyse für TER119 durchgeführt um zu analysieren, welche Einflüsse die SMC-*Has3* auf die Plaquestabilität nimmt. Hier konnten keine Unterschiede zwischen in SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*- und SMC *YFP^{+/+}*

ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}-Mäusen (n=1-9) festgestellt werden (**Abbildung 7**). Es wurde auch die Fläche des nekrotischen Kerns bestimmt (**Abbildung 6**). Auch dieser Stabilitätsparameter unterscheidet sich nicht in Abhängigkeit von SMC-spezifischer *Has3* Defizienz.

3.2.3.1 Kollagen: Deposition, Reifung und Organisation

Neben der TER119-Analyse und der Bestimmung des nekrotischen Kerns wurde auch eine Pikrosiriusrot-Färbung durchgeführt, um die Effekte der SMC-*Has3* auf die Kollagenmenge in den Läsionen zu bestimmen (**Abbildung 8 A**). Kollagene sind ein Hauptbestandteil der FC, welche der atherosklerotischen Läsion mechanische Stabilität verleiht [172, 173]. Die entsprechende Auswertung der Färbung erfolgte als Flächenanteil der Gesamtläsionsfläche in drei verschiedenen Lokalisationen entlang der BCA, 330 µm, 630 µm und 930 µm entfernt vom Aortenbogen, um die Eigenschaften der Gesamtläsion abzubilden.

Dabei zeigte sich mittels Durchlichtmikroskopie, dass die Defizienz von *Has3* in SMC zu stark vermehrter Kollagendeposition innerhalb der Läsion führt (n=6-13, **Abbildung 8 B**). Um diesen wesentlichen Effekt zu validieren und einen Einfluss durch das humane *HAS3*-Konstrukt auf die Kollagenbildung auszuschließen, wurde auch für die Kontrollgruppe (*ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*- und *ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*-Mäuse) eine Pikrosiriusrot-Färbung durchgeführt (**Abbildung 21**). Die Ergebnisse zeigten, dass das humanisierte *HAS3*-Konstrukt in den *ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*- Mäusen keinen Einfluss auf die Menge der Kollagen-Deposition nimmt, verglichen zu den *ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*- Mäusen. Auch im Vergleich zu den Wildtypen der *Lineage Tracing*-Versuchstiere, gab es keinen Unterschied in der Kollagenmenge der Läsion, was dafürspricht, dass dieser Effekt rein durch das SMC-spezifische Herabregulieren der *Has3* induziert wird (Daten nicht gezeigt).

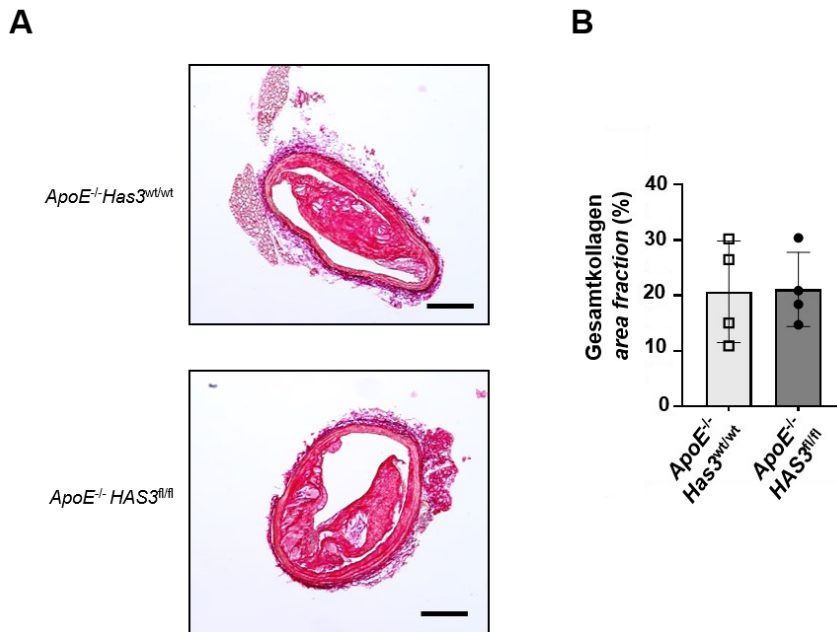


Abbildung 21: Überprüfung der Kollagenstruktur in *ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*- und *ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen.

Um einen Effekt durch das humane *HAS3*-Konstrukt auf die Kollagenmenge in der Läsion auszuschließen, wurde die Kollagenmenge nach 15 Wochen Western Diät-Fütterung in Läsionen von *ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*- und *ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen bestimmt. Die Mäuse erhielten zwar Tamoxifen, besitzen jedoch keine Cre-Rekombinase, die das gefloخته *HAS3*-Konstrukt ausschneidet. **(A)** Repräsentative Bilder der Auswertung und **(B)** Quantifizierung der Gesamtkollagenmenge in der Läsion zeigten keinen Einfluss durch das humane *HAS3*-Konstrukt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, $n = 4/4$, statistische Signifikanzen wurden für drei Einzellokalisationen entlang der BCA ermittelt mit dem *Mann-Whitney U-test*, Maßstabsbalken entspricht 500 μm .

Um den Effekt der erhöhten Kollagenproduktion durch die SMC-spezifische *Has3*-Deletion und den Einfluss auf die einzelnen Kollagenreifestufen besser zu definieren, wurde die Pikrosiriusrot-Färbung (**Abbildung 8**) auch unter dem Polarisationsmikroskop analysiert. Dabei erscheinen kräftige, gereifte Kollagenfasern rot, mittelstark gereifte Fasern gelb-orange sowie dünne, wenig gereifte Kollagenfasern grün. Für alle drei Lokalisationen wurde auch hier der Flächenanteil an der Gesamtläsion bestimmt (**Abbildung 22**).

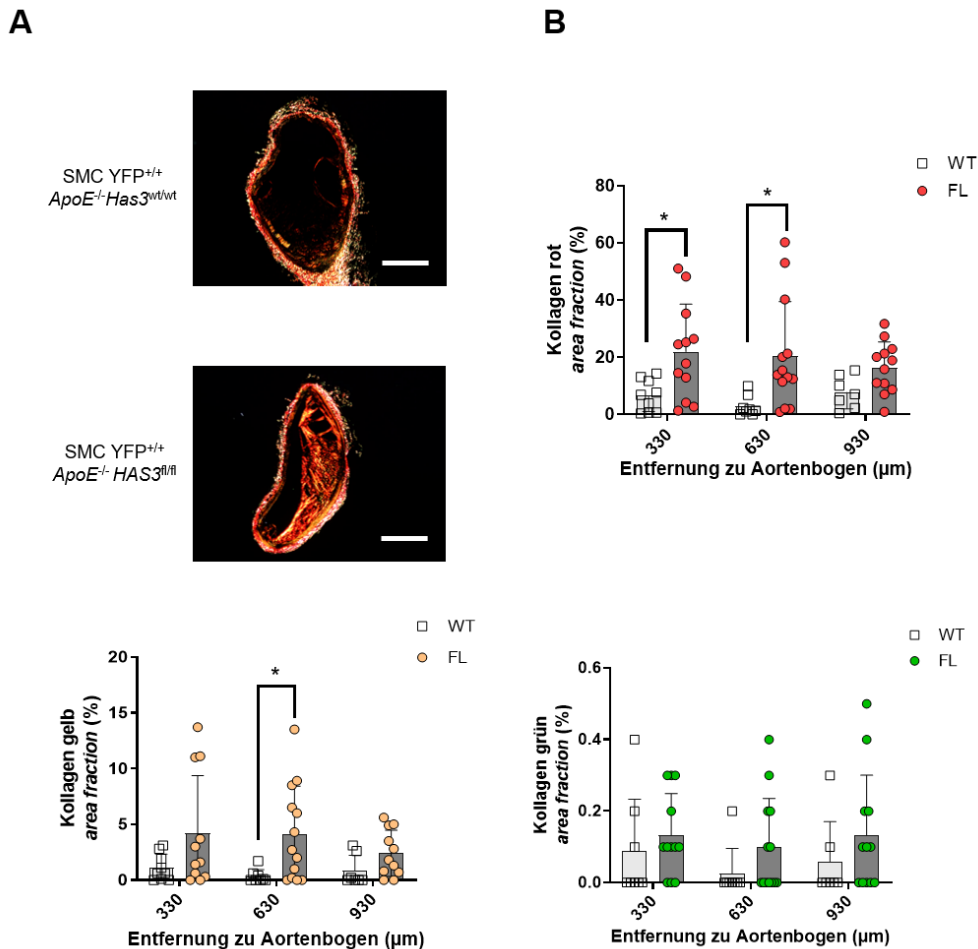


Abbildung 22: Die Charakterisierung verschiedener Kollagenreifegrade in der Läsion zeigt insbesondere Effekte auf die gereiften Kollagenfasern, hingegen keine auf die weniger gereiften Fasern.

(A) Repräsentative, polarisationsmikroskopische Aufnahmen einer Pikrosiriusrot-Färbung und (B) Quantifizierung der Menge unterschiedlich gereifter Kollagenfasern. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, $n = 6-13$, statistische Signifikanzen wurden für drei Einzellokalisierungen entlang der BCA ermittelt mit dem *Mann-Whitney U-test*. * $p < 0,05$. Maßstabsbalken entspricht 500 μm .

Es zeigte sich, dass in den SMC YFP^{+/+} *ApoE*^{-/-} *HAS3*^{fl/fl}-Mäusen insbesondere die roten, gereiften Fasern signifikant vermehrt waren im Vergleich zu den SMC YFP^{+/+} *ApoE*^{-/-} *Has3*^{wt/wt}-Mäusen. Die ungereiften Fasern hingegen waren unverändert zwischen den beiden Genotypen.

Um die Auswirkung dieses Effektes auf die Plaquestabilität besser einschätzen zu können, wurde in Kooperation mit der Forschungsgruppe von Michelle Bendeck, PhD, *University of Toronto, Kanada*, eine *LC-PolScope*-Analyse durchgeführt [155-158]. Diese ermöglicht die genaue Bestimmung der räumlichen Orientierung des fibrillären Kollagens. Je organisierter das Kollagen ist, desto stärker erfolgt die Doppelbrechung

des Lichts und desto stabiler sind die Kollagenfasern. So kann eine Doppelbrechungskarte der Probe erstellt werden, bei welcher jede Pixelhelligkeit proportional zur lokalen optischen Anisotropie des im Gewebe vorhandenen, angefärbten Kollagens ist. Blau steht dabei für weniger, rot für mehr Doppelbrechung (**Abbildung 23 A**).

Die Summe der Helligkeiten der Pixel wurde über den gesamten Querschnitt der Läsion gemessen und durch die Gesamtfläche der Läsion geteilt, um eine durchschnittliche Helligkeit pro Pixel und damit durchschnittliche Doppelbrechung innerhalb der Läsion zu erhalten.

Hierbei zeigte sich, dass SMC $YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}$ -Mäuse nicht nur signifikant mehr und gereifteres Kollagen besitzen, sondern dieses auch noch wesentlich stärker organisiert ist (**Abbildung 23 B**). Diese Eigenschaft ist bekannt dafür, zu mehr Plaquestabilität beizutragen [174].

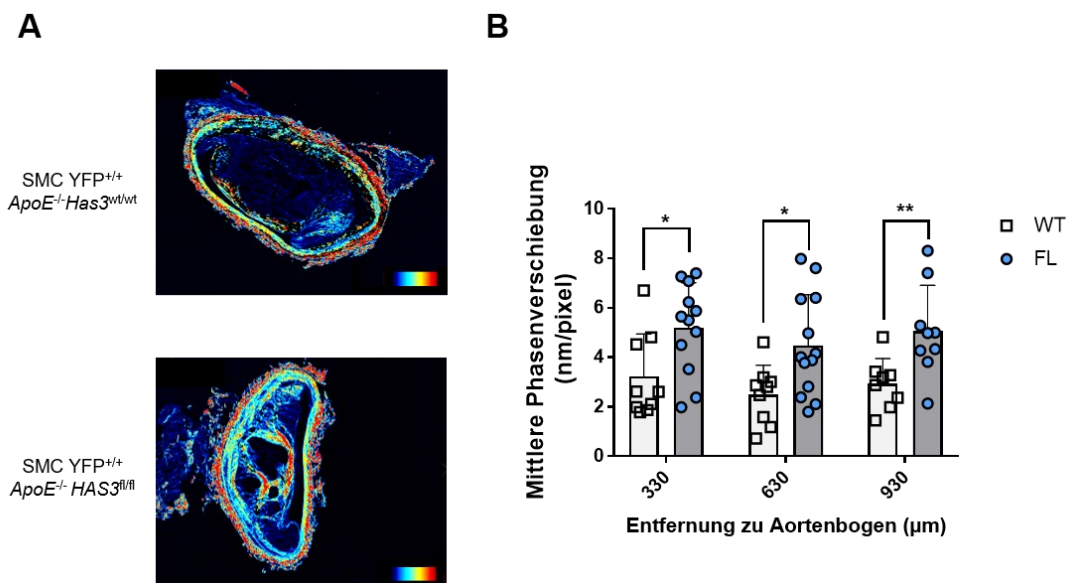


Abbildung 23: Die Analyse der Kollagenorganisation mittels LC-PolScope-Analyse zeigt, dass SMC $YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}$ -Mäuse in ihren Plaques stärker organisiertes Kollagen enthalten.

Die Bestimmung der Kollagenorganisation erfolgte anhand einer polarisationsmikroskopisch erstellten Doppelbrechungs-Karte, in welcher die Pixelintensität proportional zur optischen Anisotropie von organisiertem, gereiftem Kollagen dargestellt wurde. Dabei entspricht eine schwarze Färbung einer Phasenverschiebung von 0, rot entspricht einer starken Phasenverschiebung. (**A**) Repräsentative Bilder der Auswertung und (**B**) Quantifizierung der mittleren Phasenverschiebung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, $n = 6-13$, statistische Signifikanzen wurden für drei Einzellokalisationen entlang der BCA ermittelt mit dem *Mann-Whitney U-test*, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Die Aufnahmen wurden von Yu-Quing Zhou, PhD, *Ted Rogers Centre for Heart Research*, Toronto, durchgeführt,

3.2.3.2 Decorin

Um die weiteren Auswirkungen der SMC-*Has3* Herabregulierung auf EZM-Reifung und -Organisation in atherosklerotischen Läsionen zu untersuchen, wurde in einem nächsten Schritt die Decorindeposition bestimmt. Decorin ist ein GAG und besteht aus einem Proteinteil und einem Glykosaminoglykananteil. Im Falle von Decorin ist der Glykosaminoglykananteil Chondroitin- oder Keratansulfat. Decorin spielt eine wichtige Rolle in der EZM-Bildung, in dem es Kollagene insbesondere vom Typ 1 quervernetzt und so die fibrilläre Anordnung fördert [57, 175].

Für die Untersuchung von Decorin in den atherosklerotischen Läsionen der BCAs wurden diese in drei verschiedenen Lokalisationen (240 μm , 540 μm und 840 μm Entfernung zum Aortenbogen) analysiert. Dafür wurden die Paraffinschnitte der Versuchstiere gefärbt und das Signal mittels 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht (**Abbildung 24 A**).

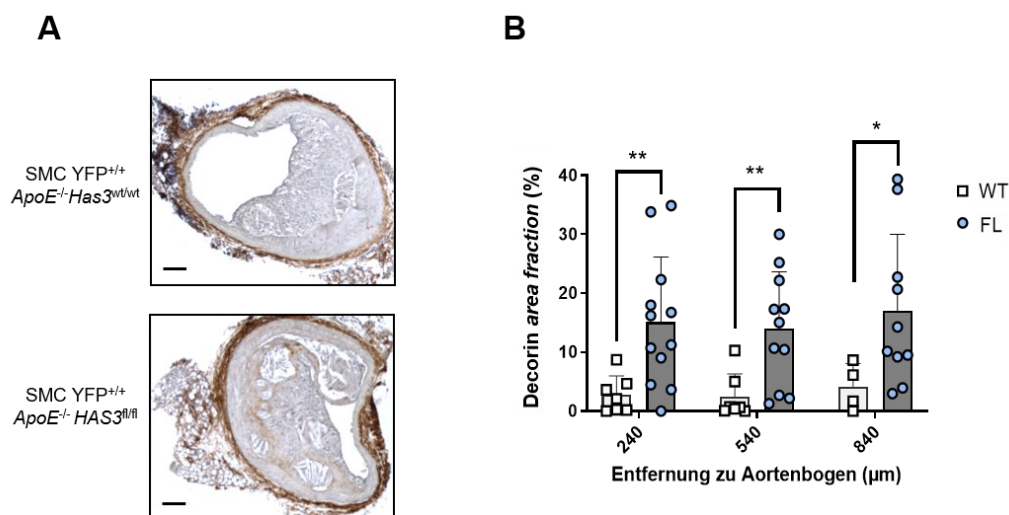


Abbildung 24: Die Herabregulierung von *Has3* in glatten Muskelzellen führt zu vermehrter Ansammlung von Decorin in der Läsion.

Querschnitte brachiocephalischer Arterien wurden nach 15 Wochen WD-Fütterung immunohistochemisch gefärbt und analysiert. Repräsentative Bilder (**A**) und die Quantifizierung mittels Flächenbestimmung als Teil der Gesamtfläche (**B**) zeigten eine erhöhte Decorin-Ansammlung in den SMC-*Has3*-defizienten Mäusen, im Vergleich zu den Kontrolltieren. Der Maßstabsbalken repräsentiert 100 μm . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, $n = 5-11$, statistische Signifikanzen wurden für drei Einzellokalisationen entlang der BCA ermittelt mit dem *students t-test*, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Die Quantifizierung (**Abbildung 24 B**) ergab, dass in Läsionen von SMC $YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}$ -Mäusen signifikant mehr Decorin akkumulierte als in SMC $YFP^{+/+} ApoE^{-/-} Has3^{wt/wt}$ -Mäusen. Dies untermauerte die vorherigen Ergebnisse, dass das vermehrte Kollagen durch SMC-*Has3*-Defizienz auch stärker gereift und quervernetzt ist.

3.3 Die Einzelzell-RNA-Sequenzierung atherosklerotischer Läsionen

Um einen tieferen Einblick in die Rolle der SMC-*Has3* für die Progression der Atherosklerose und die phänotypische Änderung von SMC zu gewinnen, wurde eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung an BCA-Läsionen von fünf SMC $YFP^{+/+} ApoE^{-/-} Has3^{wt/wt}$ -Mäusen und sechs SMC $YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}$ -Mäusen nach 15 Wochen Western Diät-Fütterung durchgeführt. Diese ermöglicht eine intensivere Analyse der Heterogenität der verschiedenen SMC-Phänotypen. Im Gegensatz zu den meisten bislang durchgeführten Einzelzell-RNA-Sequenzierungen [34, 36] wurde unsere Untersuchung an BCA-Läsionen und nicht an Aorten oder Aortenursprungsgeweben durchgeführt, da diese sich in Aufbau und Zusammensetzung den menschlichen Plaques am meisten ähneln [168]. Außerdem wurde ausschließlich die entnommene Läsion untersucht und nicht die zugehörige Media und Adventitia. Dadurch konnte die Sensitivität für plaqueständige SMC deutlich gesteigert und Nebeneffekte durch mediale SMC ausgeschlossen werden. Die entnommenen Läsionen wurden hierfür jeweils mit einem Barcode markiert, gepoolt und eine Einzelzellsuspension aus den kombinierten 11 Proben hergestellt. Die Sequenzierung erfolgte an einem Illumina NextSeq™, 150 Zyklen *high output* und mittels *Chromium 10x*-Verfahren und Bibliotheken. Es wurden die Transkriptome von 1.600 Zellen (WT: 489, KO: 1111) nach Aufarbeitung der Daten und der Qualitätskontrolle analysiert.

3.3.1 Die Clusterung der atherosklerotischen Läsionen

Nach Normierung und Integration führte die Clusterung der Daten der Einzelzell-RNA-Sequenzierung zu sieben verschiedenen, transkriptionell unabhängigen Zellpopulationen (**Abbildung 25 A**). Diese wurden in Form eines UMAP-Plots (*Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction*) dargestellt, in welcher jeder Datenpunkt das Transkriptom einer einzelnen sequenzierten Zelle darstellt. Die

UMAP fasst Populationen in Cluster zusammen, welche eine hohe transkriptionelle Ähnlichkeit aufweisen.

Die erstellten Cluster beinhalteten Endothelzellen, definiert mittels der folgenden Marker: *Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (Pecam1⁺)* und *Cadherin 5 (Cdh5⁺)*. Des Weiteren Makrophagen (MAC), definiert mittels *Protein tyrosine phosphatase receptor type C (Ptprc⁺)*, *Cluster of differentiation 68 (Cd68⁺)*, *Adhesion G Protein-Coupled Receptor E1 (Adgre1⁺)* sowie kontraktile SMC (SMC-Con), definiert mittels *eyfp⁺* als Abstammungsverfolgungsmarker, *Myosin heavy chain 11 (Myh11⁺)*, *Actin alpha 2 (Acta2⁺)* und *Transgelin (Tagln⁺)*, welche klassische, kontraktile SMC Marker darstellen. Des Weiteren konnten vier modulierte SMC-Cluster (SMC-Mod1-4) definiert werden, positiv für *eyfp⁺* sowie ebenfalls für den modulierten SMC-Marker *Galectin-3 (Lgals3⁺)*. LGALS3 wurde im Laufe der letzten Jahre bereits mehrfach auch in anderen Arbeiten zu Einzelzellsequenzierungen als Marker für phänotypisch veränderte SMC genutzt und beschreibt einen im Verlauf der Atheroprogression auftretenden Übergangszustand, aus dem SMC in mindestens vier bis fünf weitere Phänotypen ausdifferenzieren können, wie etwa in osteochondrogene oder myofibroblasten-ähnliche Zellen [34-37].

Sowohl der SMC-Con-Cluster sowie auch die Cluster SMC-Mod 1-4 waren alle positiv für die *eyfp*-mRNA-Expression (**Abbildung 25 B**). So konnte gezeigt werden, dass diese Zellen alle ursprünglich von SMC abstammten, jedoch fünf verschiedene Cluster bilden. Die *eyfp*-mRNA-Expression konnte hingegen nicht in den Endothelzell- und Makrophagen-Clustern nachgewiesen werden. Die Clusterung der jeweiligen Zellpopulationen erfolgte anhand der Expression der Top-10-Markergene für jede Zellpopulation und wurde für beide Genotypen (**Abbildung 25 C**) durchgeführt.

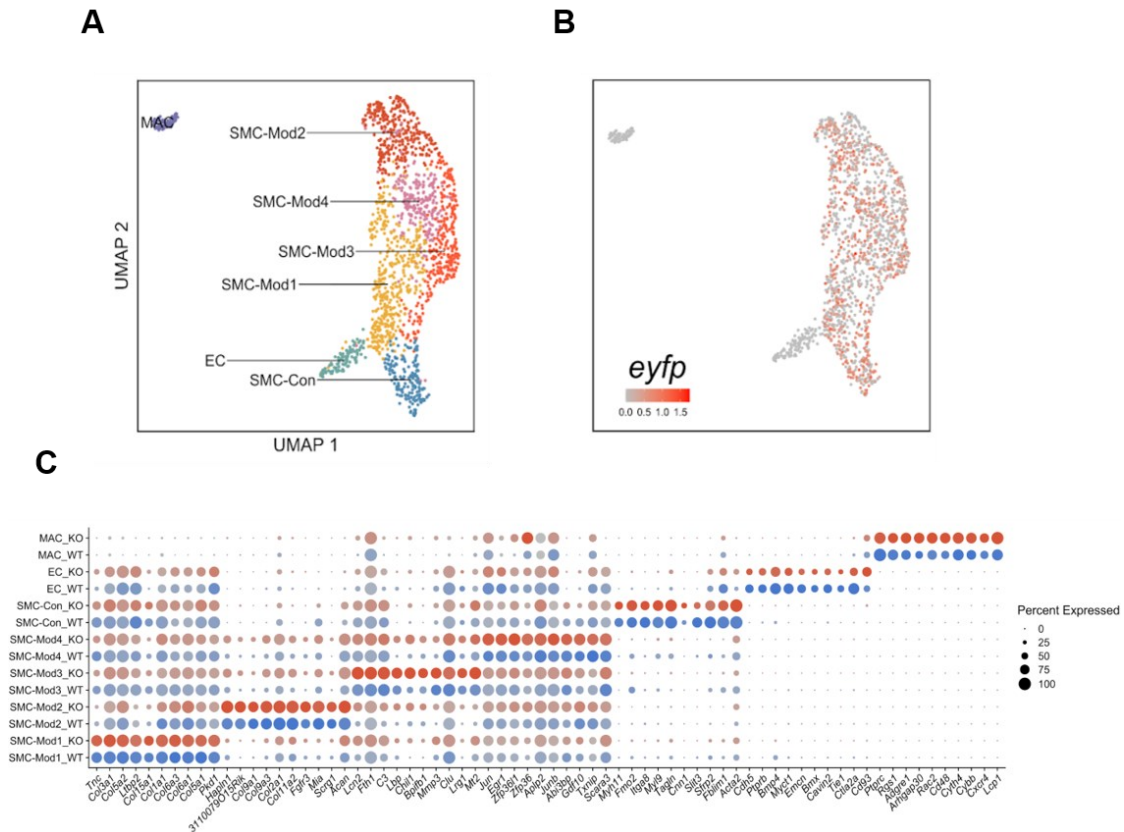


Abbildung 25: Die Einzelzell- RNA-Sequenzierung von fortgeschrittenen BCA-Läsionen definiert sieben unabhängige Zellpopulationen, fünf von diesen stammen von glatten Muskelzellen ab.

Die Zellen für die Einzelzell-RNA-Sequenzierung wurden aus BCA-Plaques von fünf SMC YFP^{+/+} *ApoE*^{-/-} *Has3*^{wt/wt}- und sechs SMC YFP^{+/+} *ApoE*^{-/-} *HAS3*^{fl/fl}-Mäusen nach 15 Wochen Western Diät-Fütterung isoliert, dargestellt sind die Ergebnisse als UMAP. Jede Farbe steht für eine unabhängige Zellidentität. Die mRNA-Expression des YFP-Reportergens erlaubte die Abstammungsverfolgung und Definition als ursprüngliche, glatte Muskelzelle. Der Punkteplot zeigt die Top-10-Markergene für jede Zellpopulation, anhand derer die Zell-Cluster definiert wurden. Die bioanalytische Auswertung wurde von Daniel Gorski, PhD, durchgeführt.

3.3.2 Die Charakterisierung der fünf SMC-Populationen

Bei der näheren Betrachtung der SMC-Phänotypen und der Analyse literaturbekannter Marker [34-36] konnte festgestellt werden, dass die Mehrheit der SMC zu den phänotypisch modulierten Clustern gehörte. Des Weiteren zeigten die SMC eine stark verringerte bis keine Expression der klassischen, kontraktilen SMC-Marker, wie *Myh11*, *Tagln*, *Acta2*, und *Calponin1* (*Cnn1*), dargestellt in **Abbildung 26 A**. Die modulierten Cluster zeigten jedoch Expressionen von verschiedenen Markern, die auch mit phänotypischer Modulation assoziiert sind. Dazu gehörten neben *Lgals3* auch *Osteoprotegrin* (*Tnfrsf11b*), *Lumican* (*Lum*), *Osteopontin* (*Spp1*) und *Fibronektin* (*Fn1*)

(**Abbildung 26 B**). Die Expression dieser modulierten SMC-Marker war zwar auch im Bereich des SMS-Con-Clusters zu finden, jedoch in sehr viel geringerer Stärke.

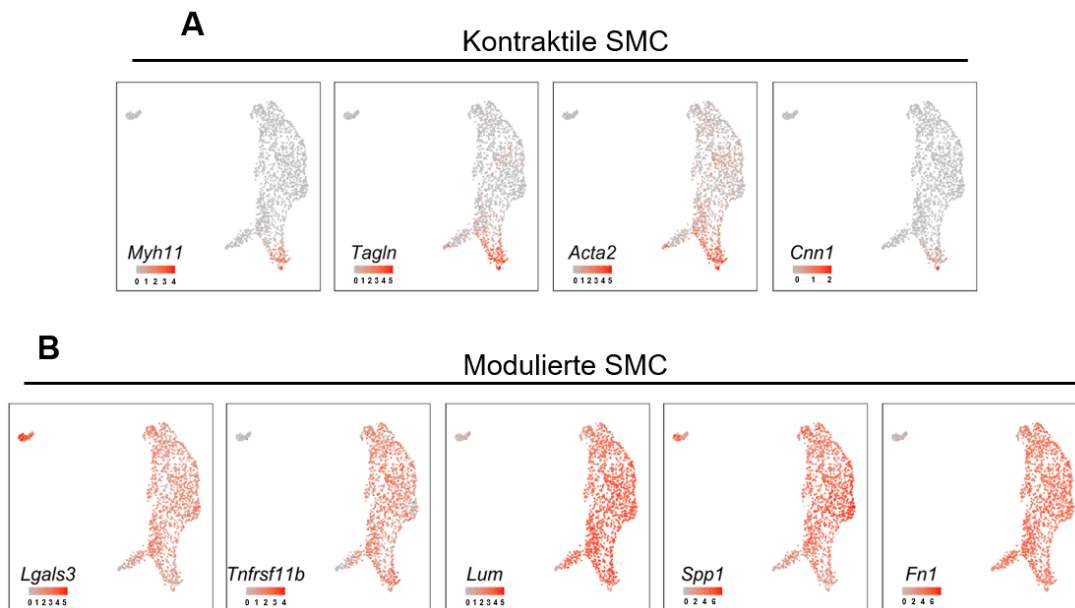


Abbildung 26: Die Charakterisierung der SMC-Populationen mittels literaturbekannter Marker zeigt neben der Population der kontraktile SMC auch modulierte SMC.

(**A**) Feature-Plots für die SMC-Marker *Myh11*, *Tagln*, *Acta2* und *Cnn1* definierten nur eine SMC-Population als kontraktile. (**B**) Alle weiteren SMC-Populationen waren positiv für Marker, die assoziiert sind mit modulatorischen Prozessen (*Lgals3*, *Tnfrsf11b*, *Lum*, *Spp1*, *Fn1*). Kontraktile Marker waren hier kaum vorhanden. Die Stärke der Expression jedes Gens ist im unteren Bildrand in Rot indiziert, graue Färbung bedeutet keine Expression, dunkelrot eine sehr starke Expression. Die bioanalytische Auswertung wurde von Daniel Gorski, PhD, durchgeführt.

3.3.3 Genexpressionssignaturen und Gene ontology enrichment-Analysen der kontraktile und modulierten SMC

In einem nächsten Schritt wurden die Genexpressionssignaturen von fibrillären Kollagenen und kleinen, leucinreichen Proteoglykanen (*small leucin-rich proteoglycans*, SLRPs) analysiert, um zu untersuchen, wie es zu den signifikant erhöhten Depositionen von Kollagen und Decorin in SMC $YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}$ -Mäusen kommt. Hierbei waren in den modulierten SMC-Clustern im Vergleich zum SMC-Con-Cluster verstärkte Genexpressionsmuster für beides zu erkennen (**Abbildung 27 A**). Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die modulierten SMC-Cluster vermehrt Gene, assoziiert mit Kollagen- und Kollagenfibrillogenese, exprimierten. Dies weist darauf hin, dass die SMC in diesen Clustern zu vermehrter EZM-Synthese beitragen könnten.

Die differentielle Genexpressionsanalyse von modulierten SMC im Vergleich zu kontraktiven SMC zeigte, dass in den modulierten SMC-Clustern insbesondere EZM-Moleküle signifikant erhöht waren. Diese beinhalteten *Aggrecan*, (*Acan*), *Kollagen2a1* (*Col2a1*), *Hyaluronan And Proteoglycan Link Protein 1* (*Hapln1*), *Kollagen27a1* (*Col27a1*), *Kollagen11a2* (*Col11a2*), *Kollagen6a1* (*Col6a1*), *Osteonektin* (*Sparc*), *Fibromodulin* (*Fmod*) und *Decorin* (*Dcn*) (**Abbildung 27 B**).

In einem nächsten Schritt wurden *Gene Ontologie* (GO)-Analysen der signifikant verschiedenen regulierten Gene in Kombination mit den veränderten Genexpressionsmustern durchgeführt, um die vier modulierten SMC-Cluster besser charakterisieren zu können sowie vorliegende Unterschiede zu analysieren. Diese Untersuchungen zeigten, dass die modulierten SMC-Cluster 1-4 wie folgt einzuteilen waren (**Abbildung 27 C**, Anhang **Abbildung 38**): Der SMC-Mod1-Cluster zeigte eine Überrepräsentation von Genen, die zu EZM-bezogenen GO-Termen gehörten, beispielsweise "extrazelluläre Matrixorganisation" und "endochondrales Knochenwachstum". SMC-Mod2 wies eine Anreicherung von Genen auf, die mit den GO-Termen „Knorpelentwicklung“, „Chondrozytendifferenzierung“ und „Knochenmineralisierung“ assoziiert waren. In Cluster SMC-Mod3 konnte eine Überrepräsentation von Genen, die zu den GO-Termen "Entzündungsreaktion" und "Abwehrreaktion" gehörten nachgewiesen werden.

SMC-Mod4 abschließend zeigte eine erhöhte Ansprechbarkeit gegenüber Wachstumsfaktoren. Dazu gehörten Genexpressionsmuster, die zu GO-Termen gehörten, welche sich auf die Differenzierung, die Reaktion auf Transkriptionsfaktoren sowie Zytokine beziehen. Anhand dieser Charakteristika wurden die Cluster als kollagenproduzierend (SMC-Mod1), osteochondrogen (SMC-Mod2), inflammatorisch (SMC-Mod3) und ansprechbar auf Wachstumsfaktoren (SMC-Mod4) definiert.

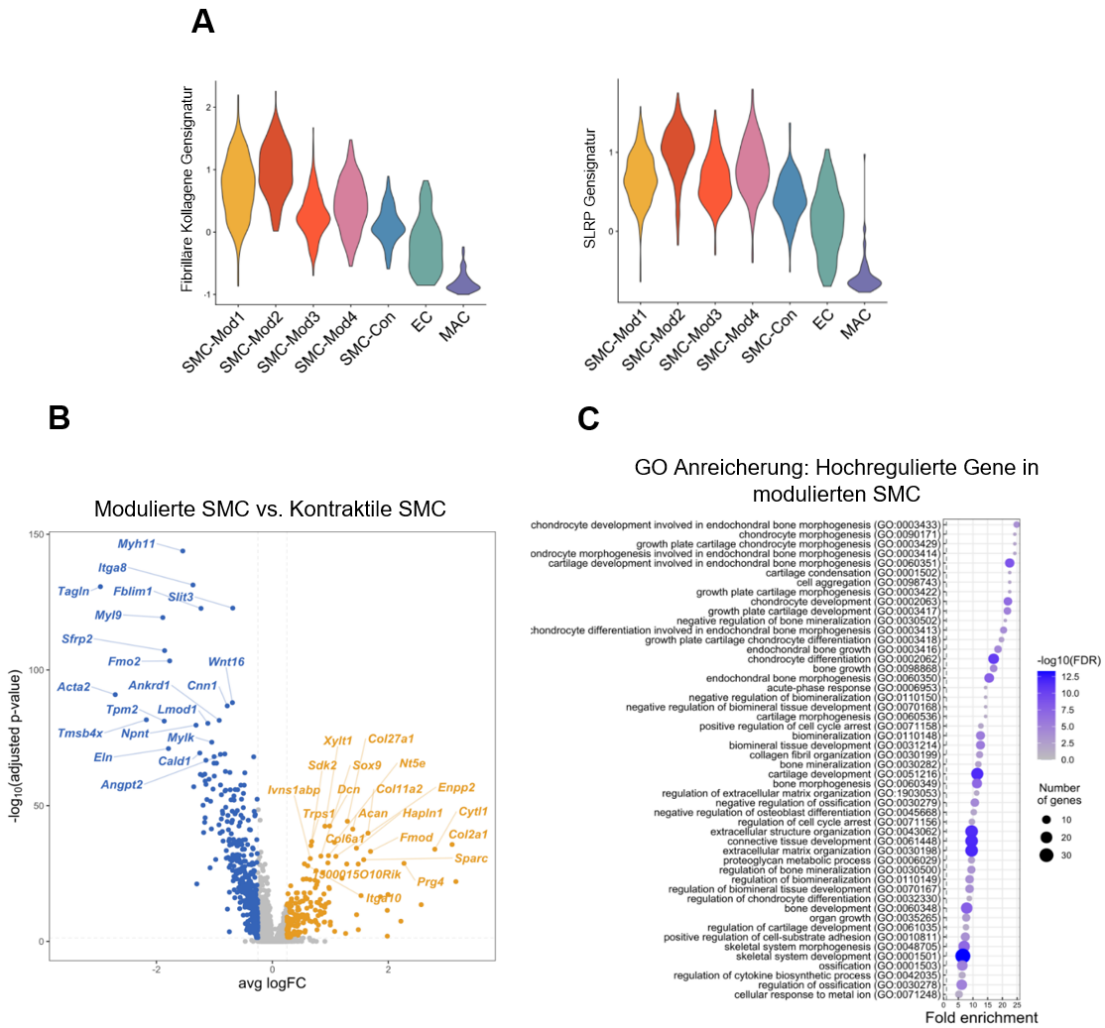


Abbildung 27: Genexpressionsanalysen und GO *enrichment*-Analysen der kontraktile und der modulierten SMC zeigen, dass die modulierten SMC-Populationen vier unabhängige, subpopulatorische Gruppen umfassen.

(A) Genexpressionsanalysen zwischen kontraktile und modulierten SMC zeigten, dass die modulierten SMC in vier unabhängige Untergruppen unterteilbar sind und alle vermehrt Gensignaturen besitzen, die mit fibrillären Kollagenen und SLRPs assoziiert sind. (B) Untersuchungen in den Genexpressionsmustern zeigten auch, dass die modulierten SMC einen EZM-sekretorischen Phänotyp darstellen mit heraufregulierten Genen wie *Acan*, *Col2a1*, *Hapln1*, *Col27a1*, *Col11a2*, *Col6a1*, *Sparc*, *Fmod* und *Dcn* (dargestellt in orange). Dagegen waren unter anderem kontraktile SMC Marker, wie *Myh11*, *Acta2* und *Tagln* signifikant herabreguliert (dargestellt in blau). (C) GO *enrichment*-Analysen definierten in Kombination mit den Genexpressionsanalysen die modulierten SMC-Unterpopulationen als Kollagenproduzierend-(SMC-Mod1), Osteochondrogen- (SMC-Mod2), Inflammatorisch- (SMC-Mod3) und ansprechbar auf Wachstumsfaktoren (SMC-Mod4). Die bioanalytische Auswertung wurde von Daniel Gorski, PhD, durchgeführt.

3.3.4 Die Charakterisierung der modulierten SMC

Um die vorangegangenen GO-Analysen zu unterstützen, wurden die vier SMC-Mod-Cluster anhand von signifikant exprimierten Markern tiefergehend charakterisiert (**Abbildung 28**). Dabei zeigte der kollagenproduzierende SMC-Mod1-Cluster insbesondere eine hohe Expression von *Kollagen 1a1 (Col1a1)*, *Kollagen 3a1 (Col3a1)*, *Kollagen 5a2 (Col5a2)*, *Kollagen 6a1 (Col6a1)* und *Kollagen 6a3 (Col6a3)*. Diese deuten allesamt auf eine vermehrte Kollagenbildung hin. Für den osteochondrogenen SMC-Mod2-Cluster wurden die chondrogenen Markergene *Hapln1*, *Acan* und *Col2a1* als signifikant stark ausgeprägt nachgewiesen, was auf eine vermehrte chondrogene EZM hindeutet. Dies wurde ergänzt durch eine sehr hohe Expression von *Integrin Binding Sialoprotein (Ibsp)*, welches einen Hauptbestandteil der Knochenmatrix ausmacht. SMC-Mod3, der inflammatorische Cluster, beinhaltete eine entzündliche SMC-Population mit hohen Expressionsleveln von *Lipocalin2 (Lcn2)*, *Complement 3 (C3)* und *Lipopolysaccharide Binding Protein (Lbp)*. Die entsprechenden Gene sind alle Bestandteile der angeborenen Immunantwort. Schließlich zeigte der Cluster SMC-Mod4, welcher sich vermehrt ansprechbar auf Wachstumsfaktoren zeigte, eine hohe Expression von Transkriptions- und Wachstumsfaktoren wie *Jun Proto-Oncogene (Jun)*, *Epidermal growth receptor 1 (Egr1)* und *Growth differentiation factor 10 (Gdf10)*.

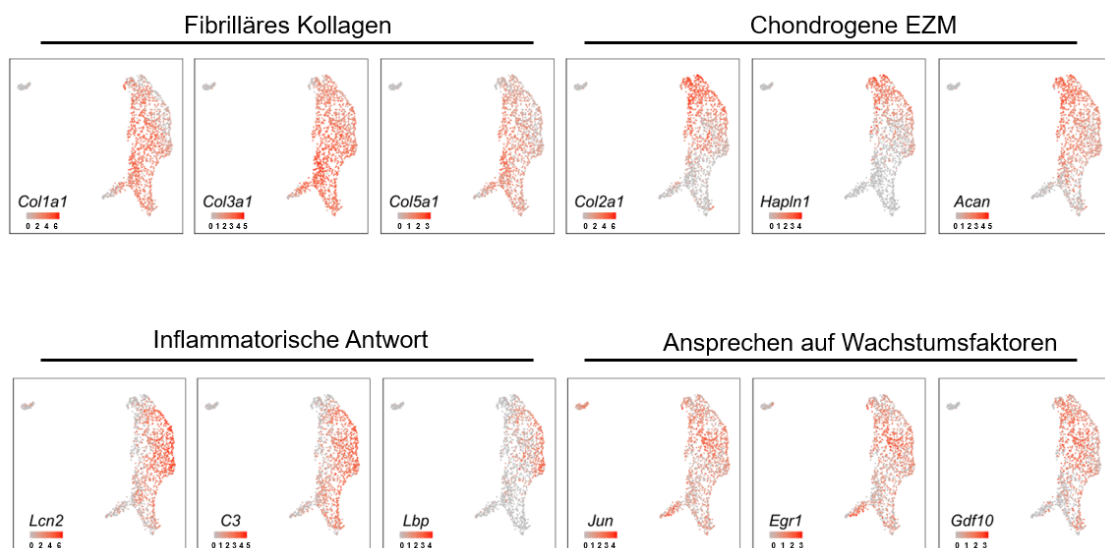


Abbildung 28: Repräsentative Feature-Plots für stark exprimierte Gene in den vier SMC Subpopulationen.

Unterstützend zu den vorangegangenen GO-Analysen zeigte auch die Genexpressionsanalyse der signifikant exprimierten Gene, dass die modulierten SMC sich in vier unterschiedliche Populationen einteilen lassen. Die bioanalytische Auswertung wurde von Daniel Gorski, PhD, durchgeführt.

3.3.5 Die Plaquezusammensetzung nach SMC-spezifischer *Has3*-Herabregulierung

Um in einem nächsten Schritt die Unterschiede zwischen den atherosklerotischen Läsionen von SMC *YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}*- und SMC *YFP^{+/+} ApoE^{-/-} Has3^{wt/wt}*-Mäusen zu analysieren, wurden die Anteile der Zelltranskriptome an der jeweiligen Population für jeden Genotyp bestimmt. Dabei wurden der WT jeweils in blau dargestellt und die Datenpunkte und Analysen der SMC-*Has3*-defizienten Tiere in Rot (**Abbildung 29 A**). Die Analyse ergab, dass in Läsionen von SMC *YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}*-Mäusen 50% weniger kontraktile SMC nachzuweisen waren, als in den Läsionen von SMC *YFP^{+/+} ApoE^{-/-} Has3^{wt/wt}*-Mäusen. Dafür waren vermehrt modulierte SMC in den Clustern SMC-Mod1, SMC-Mod3 und SMC-Mod4 zu finden (**Abbildung 29 B**). Die Zellpopulation in SMC-Mod2 schien unverändert.

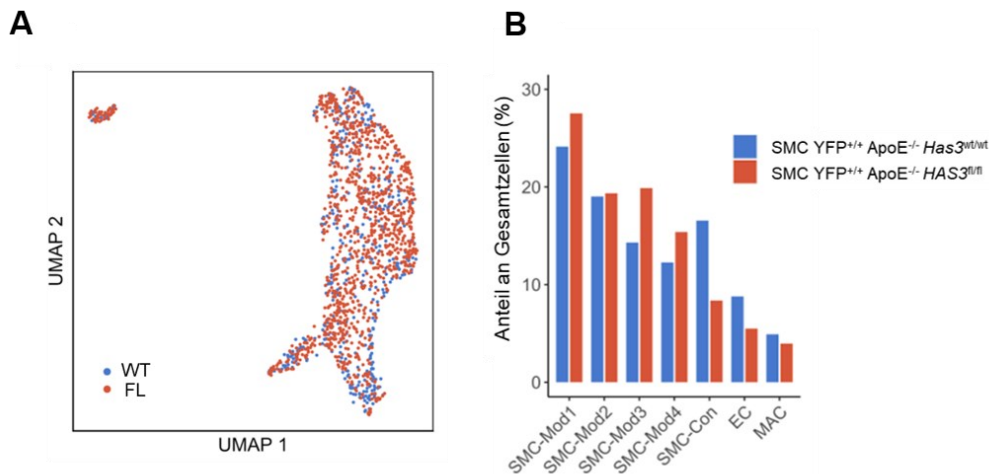


Abbildung 29: Einzelzell-RNA-Sequenzierungs-Untersuchungen von fortgeschrittenen BCA-Läsionen zeigen ein vermehrtes Vorhandensein von modulierten SMC in Plaques von SMC-*Has3*-defizienten Mäusen sowie weniger kontraktile SMC, im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe.

(A) Darstellung der Zellen von SMC *YFP^{+/+} ApoE^{-/-} Has3^{wt/wt}*-Mäusen (1111) SMC *YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}*-Mäusen (489) mittels *UMAP*. (B) Anteile in Prozent für jede Zellpopulation an der Gesamtzahl der Zellen für SMC *YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}* - (rot) und SMC *YFP^{+/+} ApoE^{-/-} Has3^{wt/wt}* - (blau) Mäuse. Die bioanalytische Auswertung wurde von Daniel Gorski, PhD, durchgeführt.

Diese Beobachtung geht einher mit den Immunofluoreszenz-Färbungen für YFP, ACTA2 und LGALS3, welche eine größere Anzahl an ACTA2⁻ LGALS3⁺-SMC in den Läsionen der SMC-*Has3*-defizienten Tieren zeigte (**Abbildung 19 und 20**).

3.3.6 Zellzyklusanalysen

Um näher zu charakterisieren, weshalb die Anzahl an LGALS3⁺-SMC in den Läsionen von SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen signifikant erhöht ist, wurden mit Hilfe der Einzelzell-RNA-Sequenzierung im Folgenden Zellzyklusanalysen durchgeführt (**Abbildung 30**).

Dabei zeigte sich, dass die SMC der modulierten SMC-Populationen innerhalb der Läsionen von SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen eine signifikant erhöhte Anzahl an Zellen in der S- oder G2M-Phase besaßen, wohingegen weniger Zellen in der G1-Phase zu messen waren. Für die SMC in SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*-Mäuse ließ sich dieser Effekt hingegen nicht beobachten.

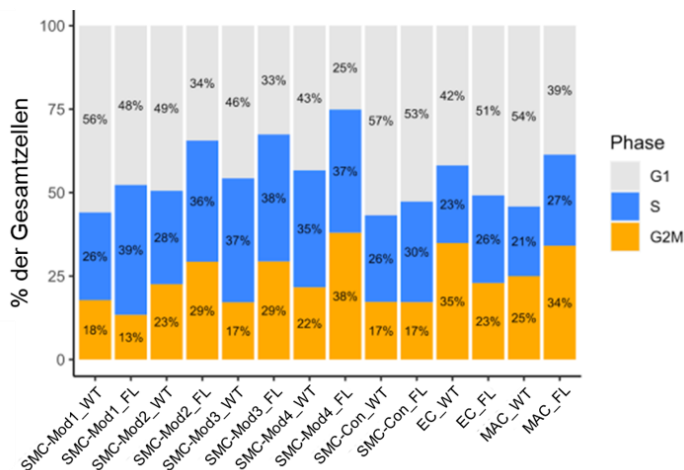


Abbildung 30: Die Zellzyklus-Phasen-Analyse von allen Zellpopulationen der SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*- und SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäuse zeigt eine erhöhte Proliferation in den SMC-*Has3*-defizienten Läsionen.

Die Zellzyklus-Phasen-Analyse wurde mit Hilfe der Einzelzell-RNA-Sequenzierung durchgeführt. Sie zeigte, dass in allen modulierten SMC-Populationen der SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäuse der Anteil an Zellen in der S- oder G2M-Phase erhöht war im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Dies traf nicht für die kontraktile SMC-Population zu. Die bioanalytische Auswertung wurde von Daniel Gorski, PhD, durchgeführt.

3.3.7 Genexpressionsanalysen und GO-enrichment-Analysen in Abhängigkeit der SMC-spezifischen *Has3*-Herabregulierung

Um den Einfluss der SMC-spezifischen *Has3* auf die phänotypische Änderung der SMC weiter zu analysieren, wurden anschließend Genexpressions- und GO-Analysen vergleichend für die beiden Genotypen durchgeführt.

Signifikant erhöht zeigten sich unter anderem viele inflammatorisch-assoziierte Gene wie *Fatty acid binding protein 4* (*Fabp4*), *Chitinase-like 1* (*Chil1*), *Lipocalin 2* (*Lcn2*), *Ferritin heavy chain 1* (*Fth1*) und *Serum amyloid A* (*Saa3*) (**Abbildung 31 A**).

Mit Hilfe der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse wurden auch hier GO-Analysen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass insbesondere Terme zugehörig zu inflammatorischen Genexpressionsmustern in SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen im Vergleich zu den SMC in SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*-Mäusen erhöht waren. Dazu gehörten unter anderem die Akut-Phasen-Immunantwort, die inflammatorische Antwort sowie die Metallionenhomeostase (**Abbildung 31 B**).

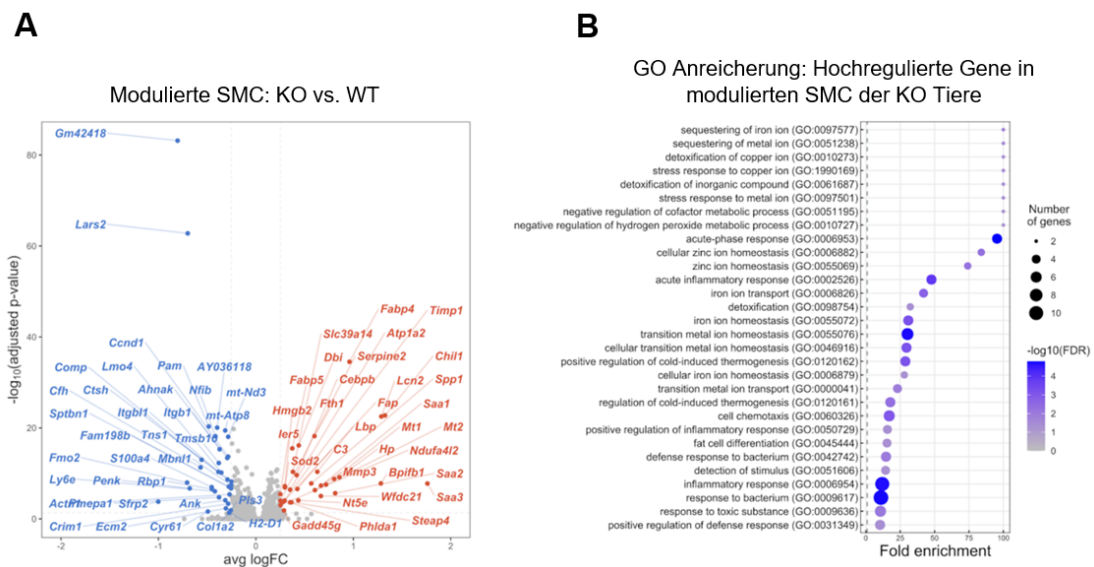


Abbildung 31: Genexpressionsanalysen und GO-enrichment-Analysen zwischen SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*- und SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen zeigen, dass insbesondere inflammatorische Prozesse durch die SMC-*Has3*-Defizienz induziert wurden.

(A) Die Untersuchung von Genexpressionsmustern in allen modulierten SMC bei SMC-*Has3*-Herabregulierung ergab insbesondere signifikante Erhöhungen von inflammatorisch-assoziierten Genen wie beispielsweise *Fabp4*, *Chil1*, *Lcn2*, *Fth1* und *Saa3* (rot). Signifikante Verringerungen gab es dagegen in den blau dargestellten Genen. (B) *Gene ontology enrichment*-Analysen zeigten damit einhergehend hochregulierte inflammatorische Prozesse, unter anderem die Entzündungsantwort und die Akut-Phase-Antwort. Die bioanalytische Auswertung wurde von Daniel Gorski, PhD, durchgeführt.

Bei der genaueren Betrachtung der einzelnen Zellpopulationen zeigte sich, dass die größten Unterschiede in der Anzahl der unterschiedlich exprimierten Gene zwischen den beiden Genotypen im inflammatorischen Cluster SMC-Mod3 lag (**Abbildung 32**).

Im Anschluss wurden diese signifikant hochregulierten Gene analysiert sowie Netzwerksinteraktionsanalysen für jede einzelne SMC-Zellpopulation in den SMC-*Has3*-defizienten Zellen durchgeführt (siehe Anhang, **Abbildung 39**). Dabei zeigte sich, dass die Zellpopulationscluster SMC-Mod1 und SMC-Mod2 nach SMC-spezifischer *Has3*-Defizienz eine vermehrte Expression von Immunabwehr-assoziierten Genen aufwies. Dazu gehörten unter anderem *Chil1*, *Lcn2*, *Lbp*, *C3* und *Peroxiredoxin 1 (Prdx1)*. SMC-Mod3, welche die inflammatorische Subpopulation darstellt, hatte die meisten hochregulierten Gene zu verzeichnen. Hierzu gehörten neben weiteren *Saa1*, *Saa2*, *Saa3* und *Lbp*.

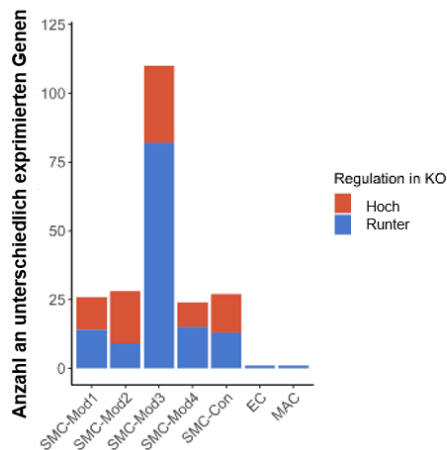


Abbildung 32: Analyse der Anzahl an unterschiedlich exprimierten Gene für die sieben verschiedenen gefundenen Zellpopulationen in den Zellen der SMC YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}-Mäusen.

Die Analyse der Anzahl an unterschiedlich exprimierten Gene in den SMC YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}-Mäusen zeigte Veränderungen für alle SMC-Cluster. Die Anzahl der herunterregulierten Gene ist in blau dargestellt, die Anzahl der hochregulierten Gene in rot. Die bioanalytische Auswertung wurde von Daniel Gorski, PhD, durchgeführt.

3.4 Mechanistische Untersuchungen *in vitro*

3.4.1 Die Herabregulierung der murinen *Has3* mittels siRNA

Der kollagenproduzierende, myofibroblasten-ähnliche *Lgals3*⁺ SMC-Phänotyp ist in der Literatur als atheroprotektiv beschrieben worden [34]. In vorausgehenden Arbeiten [176] konnte nachgewiesen werden, dass *Has2*^{-/-}-Mäuse durch eine reduzierte HA-Synthese nach kardialer Ischämie und Reperfusion eine verringerte Myofibroblasten-Differenzierung aufwiesen. *In vitro* zeigte sich in der genannten Studie, dass die TGFβ1-abhängige kardiale Myofibroblasten-Aktivierung durch die verringerte *Cluster of differentiation-44* (CD44)/HA-Interaktion inhibiert war.

Um den kollagenproduzierenden Phänotypen dieser Studien näher zu analysieren, wurden mechanistische Untersuchungen an murinen, aortalen SMC-Kulturen durchgeführt. *In vivo* konnte beobachtet werden, dass die SMC-spezifische Herabregulierung der *Has3* in atherosklerotischen Läsionen von Mäusen ebenfalls zu einer reduzierten HA-Menge führte. Der daraus resultierende verringerte Einfluss der CD44/HA-Interaktion auf den Phänotyp von SMC sollte nun untersucht werden.

Die *Acta2*-mRNA-Expression diente in diesen Experimenten als Marker für kontraktile SMC. Die SMC-Kultur wurde vor den Experimenten für 48 Stunden mit 10 ng/ml rekombinantem humanen (rh) PDGF-BB und 10 ng/ml murinen (m) TGFβ1 behandelt, um einen aktivierten, matrixproduzierenden myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp [152] zu induzieren. Nach der Inkubation wurden die Kulturen zweimal im Abstand von 24 Stunden entweder mit *siHas3*/si non target (NT)- oder antiCD44-Antikörpern/IgG-Kontrolle oder einer Kombination von beidem behandelt.

3.4.1.1 Die Untersuchung der mRNA-Expression der Hyaluronsäuresynthasen

24 Stunden nach der zweiten *siHas3*/siNT- und/oder antiCD44-Antikörper/IgG-Kontrolle-Behandlung wurden mikroskopische Aufnahmen der Zellkultur vorgenommen (**Abbildung 33 A**). Dabei konnten keine sichtbaren morphologischen Unterschiede beobachtet werden.

Um die *Has3*-Herabregulierung und die Regulierung von *Has1* und *Has2* nach siRNA-Behandlung zu validieren, wurde die mRNA-Expression der drei HA-Synthasen bestimmt (**Abbildung 33 B**). Die erfolgreiche *Has3*- Herabregulierung lag bei 70%. Eine Behandlung mit anti-CD44-Antikörper hatte eine Erhöhung der *Has3*-mRNA auf das 1,5-

fache zur Folge. Auch unter dieser Bedingung ließ sich eine Herabregulierung der mRNA um 60% beobachten. In der mRNA-Expression von *Has1* und *Has2* ließen sich unter keinen Bedingungen signifikante Änderungen oder kompensatorische Effekte beobachten.

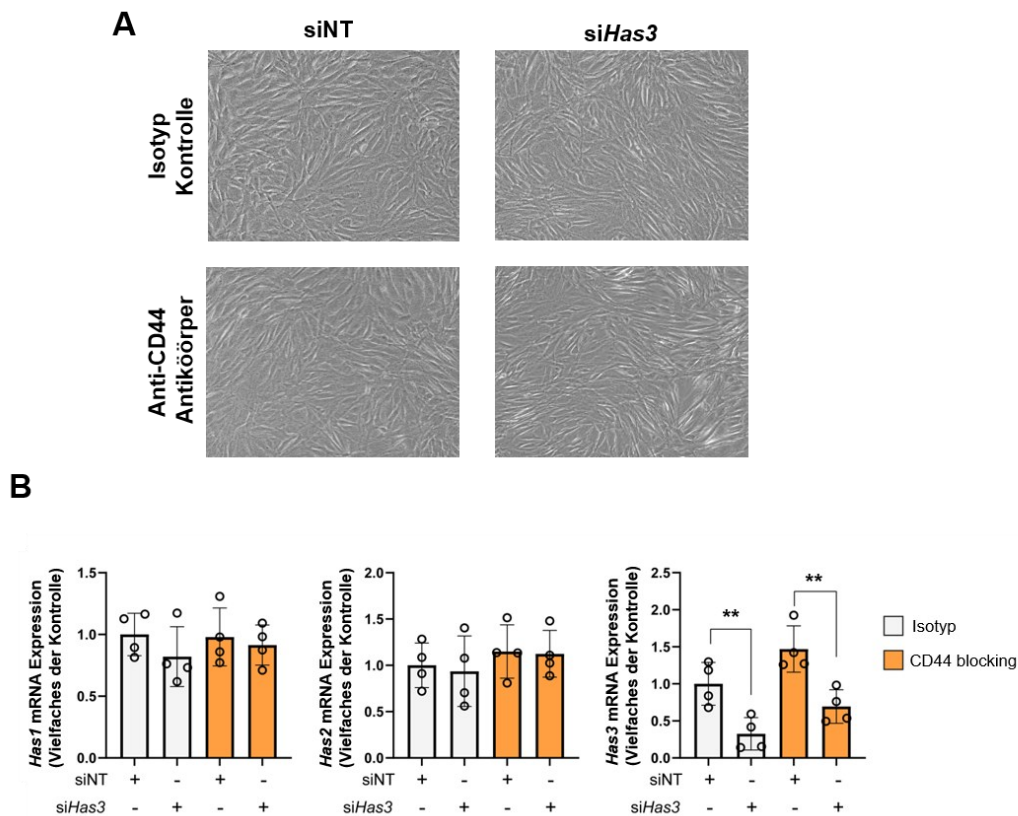


Abbildung 33: Die Behandlung mit siRNA gegen die murine *Has3* senkt die *Has3*-mRNA-Expression in der Isotypen-Kontrolle um 70% (weiß) und in der CD44-blocking-Antikörper Behandlung um 60% (orange).

(A) Mit TGFβ1 und PDGF-BB aktivierte, murine aortale SMC wurden in Zellkultur jeweils zweimal mit *siHas3* oder einem Anti-CD44 Antikörper oder einer kombinierten Gabe behandelt. 24 Stunden nach der Gesamtbehandlung gab es keine sichtbaren Unterschiede in der Zellmorphologie. (B) Quantifizierung der mRNA-Expression der *Has1*, *Has2* und *Has3* ergab eine Herabregulierung der *Has3* in der Isotypen-Kontrolle um 70% (weiß) und in der CD44-blocking-Antikörper Behandlung um 60% (orange). Es gab keine kompensatorischen Effekte durch *Has1* und *Has2*. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n= 4,4, getestet wurden vier zeitlich unabhängige Proben mittels ANOVA of ART data mit sich anschließendem Sidak's multiple comparisons test, ** p < 0,01.

3.4.1.2 Die *in vitro*-Hyaluronsäureproduktion

In einem nächsten Untersuchungsschritt wurde die Auswirkung der *Has3*-Herabregulierung auf die sezernierte HA-Menge im Zellkulturmedium von murinen

aortalen SMC bestimmt. Die Messung erfolgte mittels Immunoassays auf Basis eines HABP für die Zeitpunkte 24 Stunden und 48 Stunden nach der ersten siRNA-Behandlung (**Abbildung 34**).

Dabei zeigte sich, dass eine Herabregulierung der SMC-*Has3* *in vitro* eine signifikante Verringerung der sezernierten HA-Menge mit sich brachte. Dies galt für beide Zeitpunkte und auch jeweils für die anti-CD44-Antikörper behandelten Proben.

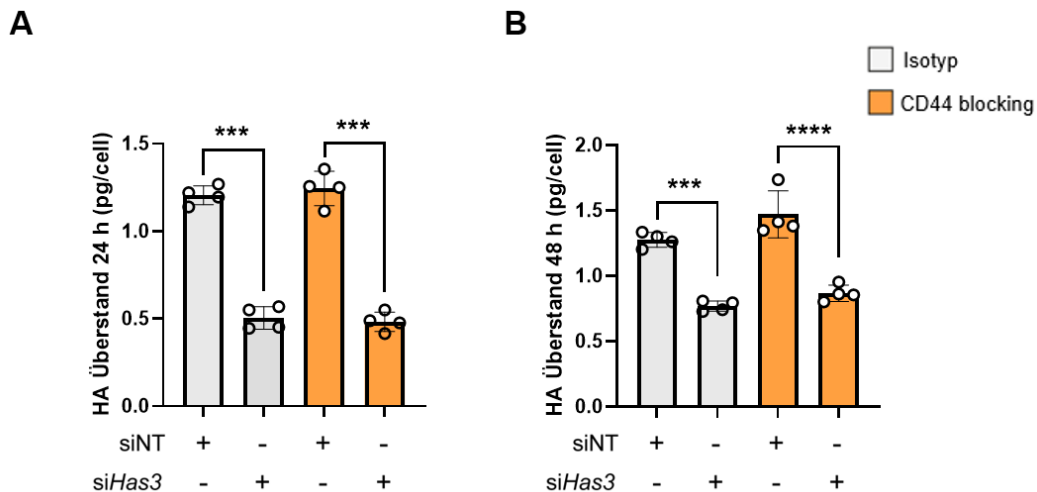


Abbildung 34: Die HA-Quantifizierung im Zellüberstand mittels HABP-Immunoassay.

Die Bestimmung der HA-Menge im Überstand der behandelten Zellen ergab eine Verringerung der sezernierten HA durch Herabregulierung der *Has3* nach 24 (**A**) und 48 (**B**) Stunden Kultivierung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, $n = 4,4$, getestet wurden vier technisch unabhängige Proben mittels ANOVA of ART data mit sich anschließendem Sidak's multiple comparisons test, *** $p < 0,001$, **** $p < 0.0001$.

3.4.1.3 Die Untersuchung der mRNA-Expression nach Herabregulierung der murinen *Has3* und Blockierung von CD44 mittels Antikörper

Um die Beeinflussung des SMC-Phänotyps durch Herabregulierung von *Has3* sowie die CD44-*signaling*-Blockade zu analysieren, wurde die *Acta2*-mRNA-Expression als Marker für den kontraktile SMC-Phänotyp gewählt. Um den myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp genauer zu beschreiben, wurden die EZM-Moleküle *Col1a1*, *Col3a1* [36], *Col8a1* [177], *Col15a1* [174] und *Fn1* [36] gewählt.

48 Stunden nach der initialen Induktion der *Has3*-Herabregulierung wurde die mRNA der kultivierten SMC isoliert und mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) analysiert (**Abbildung 35**). Es zeigte sich, dass die mRNA-Expression des kontraktile

SMC-Markern *Acta2* durch *Has3*-Herabregulierung und anti-CD44-Antikörper-Behandlung signifikant reduziert war. Dies ging einher mit den zuvor beobachteten *in vivo*-Ergebnissen, bei denen eine SMC-*Has3*-Defizienz zu verringerter Menge an ACTA2⁺-SMC in der atherosklerotischen Läsion führte (**Abbildung 19, 20, 29**).

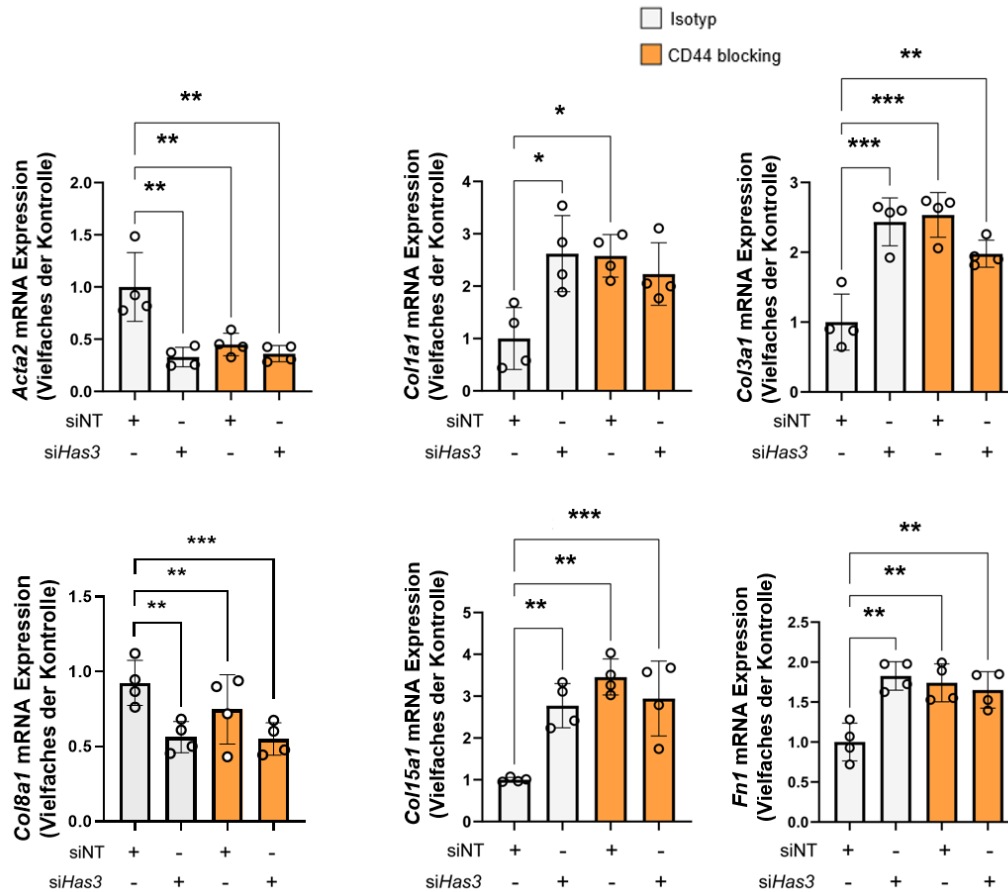


Abbildung 35: Die Herabregulierung der *Has3* in aktivierten aortalen SMC führt zu signifikant veränderter Genexpression von verschiedenen Kollagenen und *Acta2*. Die Behandlung mit einem Anti-CD44-Antikörper imitiert den gleichen Effekt.

Nach der Herabregulierung von *Has3* mittels siRNA war eine signifikante Abnahme der *Acta2*-Expression zu verzeichnen. Diese ging einher mit signifikanter Erhöhung von *Col1a1* und *Col3a1*, *Col15a1* sowie *Fn1*. Die mRNA-Expression von *Col8a1*, ein kleines und unverzweigtes Kollagen hingegen, war signifikant reduziert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, $n=4,4$, getestet wurden vier technisch unabhängige Proben mittels two-way ANOVA mit sich anschließendem Sidak's multiple comparisons test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die parallele Untersuchung der Marker *Col1a1*, *Col3a1*, *Col15a1* und *Fn1*, welche mit dem myofibroblasten-ähnlichen SMC-Phänotyp assoziiert sind, ergab, dass die matrixorganisierenden Kollagene *Col1a1* und *Col15a1* signifikant hochreguliert waren nach Induktion der *Has3*-Herabregulierung. Die Behandlung mittels anti-CD44-Antikörper zeigte die gleiche signifikante Herabregulierung auf. *Col8a1* hingegen, ein

kleines und unverzweigtes Kollagen, war durch alle Behandlungen herabreguliert. *Col3a1* und *, welche beide bereits in der Literatur herangezogen wurden um einen modulierten EZM-produzierenden SMC-Phänotyp zu beschreiben [34-36] und welche in den *in vivo*-Einzelzell-RNA-Sequenzierungen dieser Arbeit durch SMC-*Has3*-Defizienz heraufreguliert waren, wurden ebenfalls zur Bewertung hinzugezogen. Auch hier konnte beobachtet werden, dass diese Markergene nach *Has3*-Herabregulierung signifikant erhöht waren und sich die Effekte durch eine Blockierung von CD44 imitieren ließen. Durch die kombinierte Behandlung mit *siHas3* und anti-CD44-Antikörper ließen sich unter keiner Bedingung additive Effekte erkennen.*

Die Ergebnisse des Abschnitts 3 sind zu Teilen publiziert unter:

Felicia Hartmann, Daniel J Gorski, Alexandra A C Newman, Susanne Homann, Anne Petz, Katherine M Owsiany, Vlad Serbulea, Yu-Qing Zhou, Rebecca A Deaton, Michelle Bendeck, Gary K Owens, Jens W Fischer. *SMC derived hyaluronan modulates vascular SMC-phenotype in murine atherosclerosis*. *Circulation Research* 2021 [150].

4 Diskussion

4.1 Das HA-System als therapeutischer Ansatz in der Atherosklerose

Die EZM spielt eine bedeutsame Rolle für die Funktionalität des Gefäßsystems. So sind vaskuläre Pathologien häufig auf strukturelle EZM-Veränderungen zurückzuführen. Ein wichtiger Bestandteil der EZM ist HA. HA spielt eine entscheidende Rolle in der Progression der Atherosklerose, ist aber auch wichtig für die Stabilisierung von bereits vorhandenen Läsionen. Als Bestandteil des direkten Umgebungsmilieus nimmt HA starken Einfluss auf das zelluläre Verhalten. Sie kann jedoch auch als direkter Signalvermittler über Rezeptorbindungen agieren. Veränderungen im HA-Metabolismus sind assoziiert mit verschiedensten pathophysiologischen Prozessen. Im gesunden Gewebe liegt HA als lange Polymerketten vor und besitzt antiinflammatorische Funktionen. Unter entzündlichen Bedingungen wird HA jedoch häufig mit proinflammatorischen Eigenschaften verbunden. Es wurde nachgewiesen, dass in entzündlicher Umgebung die langen HA-Polymerketten zu LMW-HA-Stücken degradiert werden. Diese HA-Fragmente spielen eine wichtige Rolle für die Entzündungsreaktion, da sie Zellmigration, -proliferation und -adhäsion fördern [178].

Es ist auch bekannt, dass eine HA-Anreicherung in der Neointima stattfindet, welche sich im Rahmen von Restenosen nach Gefäßinterventionen bildet [128, 145, 146, 179]. HA nimmt Einfluss, da sie einerseits durch vermehrte Akkumulation zur direkten Volumenexpansion beiträgt, andererseits aber auch Zellfunktionen wie Migration und Proliferation von SMC beeinflusst [97, 146, 180]. HA ist auch bekannt, den Phänotyp von SMC direkt zu beeinflussen. So liegen bei gesteigertem HA/CD44-Signaling vermehrt synthetische SMC-Phänotypen vor [132].

Auch in der atherosklerotischen Läsionsentwicklung trägt die HA-Ansammlung maßgebliche zur Volumenvergrößerung der Plaques bei, wobei SMC als ein Hauptproduzent gelten. Studien der letzten Jahre haben ergeben, dass insbesondere in der frühen atherosklerotischen Läsionsentwicklung die HAS3-vermittelte HA-Synthese induziert wird [83].

Ebenso sind Effekte auf Immunzellen durch HA bekannt [83, 144]. Durch die HA kann die T-Zell-Antwort auf der Grundlage ihrer modulatorischen Funktionen in der T-Zell-Immunsynapse verändert werden, was eine veränderte Th1-Zell-Polarisation mit sich führt. Es konnte eine verringerte Th1-Zell-Polarisation nach der ubiquitären, konstitutiven Deletion von *Has3* in *ApoE*^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden, was wiederum zu einer

verringerten makrophagengesteuerten Inflammation und Atheroprogression führte [83]. Zudem konnte nach Myokardinfarkt gezeigt werden, dass HA die Makrophagen-Überlebensrate und die Myofibroblasten-Aktivierung bei Mäusen erhöht [176]. Die HA-Matrix hat also bekanntermaßen diverse, teils auch entgegengesetzte Effekte auf vaskuläre Pathologien.

Derzeit gibt es keine Möglichkeit vaskuläre Erkrankungen wie die Atherosklerose zu heilen. Der Hauptfokus der Pharmakotherapie liegt auf der Reduktion der Risikofaktoren des metabolischen Syndroms. Dies kann beispielsweise erfolgen über eine adäquate Blutdruckregulation oder die Beeinflussung von Blutfettwerten mittels Statintherapie. Neuere Therapieansätze zielen auf die immunologische Beteiligung an der Progression kardiovaskulärer Erkrankungen ab. So werden derzeit entzündungshemmende Maßnahmen wie die Gabe von Methotrexat in klinischen Studien untersucht [6, 181, 182]. Eine weitere vielversprechende klinische Studie erfolgte in Hinblick auf Canakinumab, einem monoklonalen IL1 β -Antikörper. Hier konnte eine signifikante Verringerung von schweren kardiovaskulären Komplikationen nachgewiesen werden [7]. Eine weitere Möglichkeit der Immunmodulation stellen Impfungen dar. Hierbei bildet der Körper aufgrund von injizierten Antigenen eine protektive Autoimmunreaktion, welche nützlich für die Präventionstherapie der Atherosklerose sein könnte [183, 184].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern das HA-System einen vielversprechenden Ansatz in der Therapie der Atherosklerose darstellen könnte. Die HA-Matrix stellt ein sehr komplexes System dar, welches aus 3 Synthesen, verschiedenen HA-Fragmentgrößen sowie unterschiedlichen Binderezeptoren/molekülen und abbauenden Enzymen besteht. Dies birgt eine Vielzahl an Möglichkeiten für eine therapeutische Intervention, macht eine Intervention jedoch auch sehr anspruchsvoll. In der klinischen Anwendung hat die pharmakologische Inhibition der gesamten HA-Synthese mittels 4-MU als Choleretikum und Spasmolytikum Einsatz gefunden. Allerdings wirkte sich 4-MU im Mausmodell nachteilig auf das kardiovaskuläre System aus [144]. So konnte unter der dauerhaften Blockade der HA-Synthese mittels 4-MU eine Zunahme der Atherosklerose beobachtet werden. Dies war zurückzuführen auf den Verlust der Endothel-schützenden Glykokalyx. Für die komplexe Behandlung in der kardiovaskulären Therapie könnte dies heißen, dass eine Hemmung der gesamten HA-Synthese zwar schädliche Effekte mit sich führt, die individuelle Modulation der einzelnen HAS-Enzyme jedoch einen Therapieansatz darstellen könnte.

Insbesondere die HAS3-vermittelte HA-Produktion spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen. Nach ubiquitärer *Has3*-Deletion in Mäusen

konnte beobachtet werden, dass diese lebensfähig sind und unter physiologischen Bedingungen keinen veränderten Phänotyp aufweisen. Daraus lässt sich schließen, dass die *Has3*-Deletion keine wesentlichen Störungen in Entwicklung und Reproduktion verursacht, was sie zu einer interessanten Zielstruktur für die Pharmakotherapie machen könnte. In vorangehenden Arbeiten konnte des Weiteren gezeigt werden, dass eine globale Herabregulierung von *Has3* zu signifikant reduzierter atherosklerotischer Plaquebelastung führt [83]. In einem Modell der Carotisligatur zeigte sich weiter, dass die *Has3*-Defizienz einen protektiven Einfluss auf die Neointimabildung der Restenose hatte. Dies war zurückzuführen auf eine reduzierte, PDGF-BB vermittelte SMC-Migration [89].

SMC gelten als Hauptproduzent der HA in atherosklerotischen Läsionen. Daher lag im Fokus der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der Auswirkung von HA, produziert durch die SMC-spezifische HAS3, auf die atherosklerotische Läsionsentwicklung. In diesem Zusammenhang wurde insbesondere die phänotypische Änderung von SMC und ihr Beitrag zur Plaquestabilität untersucht.

4.2 Die Effekte der SMC-*Has3* Herabregulierung auf die Atheroprogession

Um die Effekte der SMC-*Has3*-Herabregulierung auf die Entwicklung und das Fortschreiten der Atherosklerose zu untersuchen, wurde ein Mausmodell generiert, welches ein induzierbares, kombiniertes SMC-*Lineage Tracing*-System mit zellspezifischer *Has3*-Defizienz besitzt. Diese Maus hat für die Ausprägung fortgeschrittener Läsionen einen *ApoE*^{-/-}-Hintergrund (**Abbildung 9**). Dies ist notwendig, da sich der murine Fettstoffwechsel von dem des Menschen stark unterscheidet. In der Maus wird Cholesterin überwiegend mittels HDL transportiert und nicht wie beim Menschen über LDL [185]. Daher würden Mäuse unter physiologischen Bedingungen keine Atherosklerose entwickeln können. Mit Hilfe genetischer Deletion des *ApoE* verändert man den Cholesterinstoffwechsel jedoch so, dass pro-atherosklerotische Bedingungen hergestellt werden [185]. VLDL und Chylomikronen werden beide für den Abbau mittels *ApoE* vom Blut in die Leber transportiert, was in *ApoE*-defizienten Tieren nicht möglich ist und eine Akkumulation im Blut erzeugt [186]. In Abhängigkeit der Lokalisation im Gefäß und dem dort jeweilig vorhandenen Scherstress können sich dann atherosklerotische Läsionen ausbilden, welche denen des Menschen teilweise in der Zusammensetzung und Aufbau teilweise stark ähneln [166]. Zur Beschleunigung der

Läsionsentwicklung wurden die Mäuse nach Induktion des *Lineage Tracing*-Systems und der SMC-*Has3*-Defizienz für 15 Wochen mit WD gefüttert, bevor die Plaques der BCA analysiert wurden (**Abbildung 10**).

4.2.1 Der Einfluss von SMC-*Has3* auf die Läsionsgröße und die Gesamtplaquebelastung

In einem ersten Schritt wurde zur Charakterisierung der Einflüsse einer SMC-spezifischen *Has3*-Herabregulierung die Gesamtplaquebelastung der Aorta und die Läsionsgröße in der BCA bestimmt (**Abbildung 5 und 6**). Die BCA wurde für die genaue Analyse der Plaquemorphologie gewählt, da diese den humanen Bedingungen in der Atheroprogression am ähnlichsten ist [168]. Um repräsentative Aussagen treffen zu können, wurden innerhalb der BCA jeweils drei verschiedene Lokalisationen untersucht. Interessanterweise konnten keine Unterschiede zwischen SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen und den entsprechenden SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*-Wurfgeschwistern festgestellt werden. Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen verschiedener metabolischer Parameter unterstützt, die zeigten, dass SMC-*Has3* auch keinen Einfluss auf das Gewicht oder die Cholesterol- und Triglyzeridwerte nimmt (**Abbildung 18**). Das Ergebnis war allerdings überraschend, denn SMC gelten als Hauptproduzenten von HA, welche dafür bekannt ist, maßgeblich zur Volumenexpansion atherosklerotischer Läsionen beizutragen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass *Has2^{-/-}*-Mäuse aufgrund stark verringerter HA/CD44-Interaktion signifikant kleinere Plaques ausbildeten [130]. Auch in einer kürzlich durchgeführten Untersuchung von *ApoE^{-/-}*-Mäusen mit globaler *Has3*-Defizienz zeigte sich eine signifikante Reduktion der Plaques innerhalb der BCA [83]. Dies war vermutlich zurückzuführen auf eine *Has3^{-/-}*-vermittelte, reduzierte Th1-Zell-Polarisierung, welche im weiteren Verlauf die Makrophageninvasion in die Läsion verringerte und somit zu reduzierten inflammatorischen Prozessen und kleineren Läsionen führte. Da in der hier vorliegenden Arbeit jedoch mit einer zellspezifischen Deletion gearbeitet wurde, konnten *Has3*-abhängige Effekte, vermittelt über andere Zelltypen wie T-Zellen ausgeschlossen werden. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedliche Beeinflussung der Läsionsgröße zwischen globalem und SMC-spezifischem KO der *Has3* sein.

Signifikante kompensatorische Effekte in der HA-Produktion durch die HA-produzierenden Enzyme *Has1* und *Has2* ließen sich ausschließen, da zum Zeitpunkt der

Untersuchungen auch die HA-Menge der Läsion bestimmt wurde und diese erheblich reduziert war nach der Deletion der *Has3* spezifisch in SMC (**Abbildung 15**).

Abschließend lässt sich sagen, dass die *Has3*-Deletion in SMC keinen Einfluss auf die Entwicklung der Plaquestabilität und Läsionsgröße nimmt.

4.2.2 SMC-*Has3*-Herabregulierung und der Einfluss auf Plaquestabilitätsparameter

In den letzten Jahrzehnten hat sich gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit für schwere kardiovaskuläre Komplikationen wie den Myokardinfarkt oder Schlaganfall nicht von der Größe der atherosklerotischen Läsionen abhängt, sondern von Zusammensetzung und Stabilität der Plaques. Im Folgenden wurde also auch untersucht, welchen Einfluss die SMC-spezifische *Has3* auf die Plaquestabilität nimmt. Stabile Plaques zeichnen sich durch einen kleinen nekrotischen Kern aus, eine Kollagen- und SMC-reiche FC sowie eine geringe Anzahl an Immunzellen. Auf der anderen Seite sind ein ausgeprägter, lipidreicher nekrotischer Kern, geringe EZM-Deposition, wenig ACTA2⁺-Zellen und viele Makrophagen ein Anzeichen für eine rupturanfällige Läsion [10, 11].

Für eine aussagekräftige Analyse wurden die Intraplaqueeinblutungen, die Größe des nekrotischen Kerns, die Dicke der FC und die Menge der EZM-Deposition als Stabilitätsindizes bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Menge der Intraplaqueeinblutungen in SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen verglichen zu den SMC in SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*-Mäusen keinen Unterschied aufwies (**Abbildung 7**). Bestimmt wurde dieser Wert, wie aus der gängigen Literatur bekannt mittels Messung des positiven TER119-Signals, ein spezifischer Erythrozytenmarker [39, 187]. Auch die Größe des nekrotischen Kerns (**Abbildung 6**) und die Dicke der FC (Daten nicht gezeigt) unterschieden sich nicht zwischen den beiden Genotypen.

Jedoch konnte beobachtet werden, dass durch die SMC-*Has3*-Herabregulierung in den Läsionen von SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen signifikant mehr Kollagen vorhanden war (**Abbildung 8**). In den Läsionen der SMC-*Has3*-KO-Tiere machte die Kollagenmenge im Durchschnitt 35% der Läsionsgröße aus, in den entsprechenden WT nur 20%. Bei der näheren Untersuchung zeigte sich, dass dabei insbesondere die unter polarisiertem Licht rot erscheinenden, dickeren und verzweigten Fasern vermehrt vorlagen (**Abbildung 8 und 22**). Um weitere Aussagen über den Beitrag der vermehrten Kollagendeposition auf die Plaquestabilität treffen zu können, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Michelle Bendeck, *Ted Rogers Centre for Heart Research*,

University of Toronto, eine LC-PolScope-Analyse durchgeführt. Diese zeigte, dass der SMC-*Has3*-KO nicht nur zu vermehrtem Kollagen in der Läsion führte, sondern dieses auch signifikant gereifter und organisierter vorlag (**Abbildung 23**). In der atherosklerotischen Läsion bildet Kollagen den größten Anteil an der EZM [188]. Vor allem in der FC spielen reife und organisierte Kollagenfasern des Typ 1 eine wichtige Rolle. Sie erhöhen den Schutz vor Rupturen durch Steigerung der mechanischen Zugfestigkeit und Stabilität [189, 190]. In rupturanfälligen, vulnerablen Plaques fehlt es häufig an organisiertem und stabilisierendem Kollagen aufgrund von reduzierter Synthese und vermehrtem Abbau durch MMP's [191, 192].

Um einen tieferen Einblick in die veränderte EZM-Deposition zu erlangen, wurde in einem nächsten Schritt die Menge an Decorin bestimmt. Decorin ist ein kleines, leucinreiches Proteoglykan und spielt eine wichtige Rolle für die Verknüpfung von Kollagen-Typ 1-Fibrillen in der Kollagenfibrillogenese [57, 175]. Hier zeigte sich, dass durch die SMC-spezifische *Has3*-Deletion auch die Menge an Decorin in der Läsion um ein Vielfaches erhöht war. So wiesen die Plaques von SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen eine bis zu 6-fach höhere Menge an Decorin auf als die Plaques von SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*-Mäusen (**Abbildung 24**).

Dieses Ergebnis ist sehr überraschend, insbesondere vor dem Hintergrund, dass eine vermehrte EZM-Deposition in der Regel mit einer Erhöhung der Menge an ACTA⁺-Zellen einhergeht [10], wohingegen in dieser Arbeit eine Erhöhung der LGALS3⁺-Zellen zu Ungunsten der ACTA2⁺-Zellen vorliegt (**Abbildung 20**). Studien der letzten Jahre konnten jedoch zeigen, dass sich diese Aussagen darauf stützen, dass ACTA2⁺-Zellen zumeist für SMC-abstammende Zellen stehen sowie LGALS3⁺-Zellen myeloiden Ursprungs sind. Es konnte kürzlich jedoch in mehreren Arbeiten nachgewiesen werden, dass auch SMC unter pathophysiologischen Bedingungen ihre kontraktile Markerproteine verlieren und LGALS3 exprimieren können. Diese modulierten LGALS3⁺-SMC bilden einen phänotypischen Übergangszustand aus, von welchem sie in verschiedene terminale Zustände ausdifferenzieren können. Von diesen sind einige Phänotypen bekannt, die zu erhöhter Matrixdeposition beitragen [34-37, 151].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Herabregulierung von *Has3* spezifisch in SMC einen protektiven Einfluss auf die Plaquestabilität der atherosklerotischen Läsion nehmen könnte aufgrund von erhöhter Kollagenproduktion, -reifung und -organisation.

4.2.3 Der SMC-Phänotyp nach SMC-spezifischer Deletion von *Has3*

Im gesunden Gefäß befinden sich SMC in einem ausdifferenzierten, kontraktilem Zustand und kommen ihrer Aufgabe in der Blutdruckregulation nach. Dieser ist gekennzeichnet durch eine niedrige Migrations- und Proliferationsrate sowie geringe synthetische Funktionen. Diese SMC exprimieren typische kontraktile Markerproteine wie ACTA2, TAGLN oder MYH11 [31, 32, 193]. Werden SMC nun atherogenen Stimuli ausgesetzt wie beispielsweise Wachstumsfaktoren oder Lipiden, dann können sie dedifferenzieren und verschiedene neue Charakteristika ausbilden [28-30]. Dieses Phänomen wird Phänotypenswitch genannt und wurde in den vergangenen Jahren intensiv untersucht [17, 25, 29, 30, 32, 37, 39, 151, 194, 195].

Dabei konnten insbesondere *in vitro*-Studien die phänotypische Änderung mit einer Herabregulation von SMC-spezifischen Markern, erhöhter Migration, Proliferation und Matrixsynthese in Verbindung bringen. Phänotypisch modulierte SMC zeigten zudem häufig eine erhöhte Regulation von inflammatorischen Zytokinen [196] und Makrophagenmarkern, assoziiert mit vermehrter Phagozytoseaktivität [29, 38]. *In vivo* gestaltete sich die Untersuchung der phänotypischen Änderung jedoch lange Zeit als schwierig, da SMC aufgrund der Herabregulation ihrer Markerproteine nicht eindeutig definierbar waren. Darüber hinaus sind auch andere Zellen in der Lage, die Expressionsmuster spezifischer Proteine zu variieren und können neben anderen, auch kontraktile SMC-Marker ausbilden und so fälschlicherweise als SMC identifiziert werden. Dies erschwert die Untersuchung und zeigt, dass die bisherige Zellcharakterisierung mittels Oberflächenmarkern nicht mehr ausreichend ist.

Im Jahre 2015 konnten Shankman *et al.* mit Hilfe eines Reporter-gen-basierten Abstammungsverfolgungssystems einen Ansatz etablieren, SMC auch über den gesamten Verlauf der Atheroprogression im Gefäßsystem zu verfolgen [37]. Basierend auf dieser und sich anschließenden Studien konnte gezeigt werden, dass SMC von einem kontraktilem Status ausgehend verschiedene modulierte Phänotypen annehmen können. Dazu gehört ein proinflammatorischer, makrophagenähnlicher Phänotyp, charakterisiert durch die Expression von LGALS3 [17, 25, 29, 37, 38], ein matrixproduzierender, myofibroblastenähnlicher Phänotyp, welcher zur Ausbildung der protektiven FC beiträgt [17, 25, 37] sowie ein Phänotyp mit mesenchymalen, stammzell-ähnlichen Eigenschaften [17, 25, 37]. Aufgrund dieser komplexen phänotypischen Plastizität ist es aktuell noch schwer zu beurteilen, welcher genaue SMC-Phänotyp unter bestimmten Bedingungen vorliegt und ob er schädlichen oder vorteilhaften Einfluss auf die Atheroprogression und die Plaquestabilität nimmt.

Es ist bekannt, dass die die HA-Matrix verschiedenste Zellfunktionen moduliert. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass sie die Modulation zu einem synthetischen SMC-Phänotyp fördern kann [132]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit in einem nächsten Schritt der Einfluss durch die SMC-spezifische Deletion der *Has3* auf die exakte SMC-Zusammensetzung der Läsion untersucht. Dafür wurde eine Immunfluoreszenzfärbung für YFP als *Lineage Tracing*-Marker, ACTA2 als kontraktiver SMC-Marker und LGALS3 als Marker für die phänotypische Modulation durchgeführt. Obwohl bekannt ist, dass ACTA2 und LGALS3 als Oberflächenmarker keine ausreichend detaillierte Beschreibung mehr für die unterschiedlichen SMC-Modulationen darstellen, so ermöglichen sie dennoch eine erste Einteilung in kritische Subpopulationen und stellen einen Vergleich zur aktuellen Literatur her [34-37]. Die Färbungen wurden mittels konfokaler Mikroskopie analysiert und zeigten, dass eine SMC-*Has3*-Defizienz auf die Gesamtzahl der YFP⁺-SMC keinen Einfluss nimmt, welche für beide Genotypen in der Gesamtläsion bei ca 30% lag, was mit aktuellen Studien aus der Literatur übereinstimmt [35, 37, 39, 151]. Auch in der FC zeigte sich kein Unterschied, hier lag die durchschnittliche Anzahl der SMC bei 18% (**Abbildung 20**).

Dass die Herabregulierung der SMC-*Has3* keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl der SMC in der Läsion nimmt, ist überraschend, da eine Vielzahl an Arbeiten einen Zusammenhang zwischen HA-Matrix und vermehrter Zellmigration beschreibt. So ist die zelluläre Adhäsion durch perizelluläre und extrazelluläre HA vermindert, was ein Migrieren durch die EZM erleichtert [82, 97]. Des Weiteren kann HA über direkte, zellulär vermittelte Signale die Migration fördern. Hier spielen insbesondere die Rezeptoren CD44 und RHAMM eine große Rolle, welche als migrationsfördernd gelten [112, 122-124]. Aus einem Neointimahyperplasie-Modell ist bekannt, dass SMC in *Has3*^{-/-}-Mäusen vermindert aus der Media in die Intima migrieren, vermutlich in Abhängigkeit von PDGF-BB [89]. Die SMC-spezifische *Has3*-Herabregulierung in der vorliegenden Arbeit scheint den migrationsreduzierenden Effekt nicht mit sich zu bringen, obwohl sie zu einer verringerten HA-Deposition in der Läsion führte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass es Unterschiede in den Zeitpunkten der Migrationsstimulation und der verminderten HA-Synthese durch SMC in der Läsion gibt. Über die *Has3*-vermittelte HA-Synthese ist bekannt, dass sie insbesondere während der frühen Atherosklerose induziert wird [83]. Alencar *et al.* konnten nachweisen, dass die Migration von SMC in die Läsion nach etwa 10 Wochen WD-Fütterung zum ersten Mal beobachtet werden kann. Sie konnten auch zeigen, dass ein Eintritt in die Läsion vermutlich über die fibrotische Kappe stattfindet [35, 197]. In diesem Fall würden die SMC nicht beeinflusst durch eine veränderte HA-

Matrix innerhalb des Läsionskerns, was eine unveränderte SMC-Anzahl nach SMC-*Has3*-Deletion erklären könnte.

Neben der Bestimmung der YFP⁺-SMC wurde auch die Anzahl an ACTA2⁺- und LGALS3⁺-SMC analysiert (**Abbildung 19 und 20**). Hierbei zeigte sich, dass durch eine SMC-spezifische *Has3*-Defizienz die Anzahl an kontraktilen ACTA2⁺-SMC um 50% reduziert wurde. Parallel konnten signifikant vermehrte LGALS3⁺-SMC detektiert werden. Dies konnte sowohl für die Gesamtläsion als auch für die FC beobachtet werden. Lange Zeit galten die ACTA2⁺-SMC als Hauptproduzent der stabilisierenden EZM in der Läsion und die LGALS3⁺-SMC als makrophagen-ähnliche, phagozytierende Zellen, welche einen negativen Einfluss auf die Plaquestabilität nehmen können [33, 37, 198-201]. Zahlreiche Studien der letzten Jahre konnten jedoch nachweisen, dass LGALS3⁺-SMC eher einen Zwischenzustand darstellen, als einen terminalen Status mit makrophagen-ähnlichen Eigenschaften [34-36]. In Abhängigkeit von Umgebungseinflüssen und der weiteren Ausdifferenzierung kann dieser modulierte Zwischenzustand sich dann in eine progressionsfördernde Richtung entwickeln, aber auch protektive Eigenschaften für die Gesamtstabilität entwickeln.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die *Has3* spezifisch in SMC eine entscheidende Rolle für die phänotypische Änderung der SMC zu spielen scheint und darüber maßgeblich die Plaquezusammensetzung beeinflussen kann.

4.3 Die Analyse der atherosklerotischen Läsion mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung

4.3.1 Die SMC-Populationen in der atherosklerotischen Läsion

Um ein größeres Verständnis über die genaue Zellzusammensetzung der atherosklerotischen Läsion sowie die Beeinflussung der Heterogenität der SMC durch die SMC-*Has3* zu erhalten, wurde eine Einzelzell-RNA-Sequenzierung an isolierten Plaques nach 15 Wochen WD-Fütterung durchgeführt. Bereits seit mehreren Jahren beschäftigten sich die Arbeiten von Wirka *et al.* [34], Pan *et al.* [36] sowie Alencar *et al.* [35] mit der Sequenzierung der Heterogenität von SMC in Atherosklerose. Bis auf die Arbeit von Alencar *et al.* fanden die Analysen jedoch alle an Aortenursprung oder isolierten Aorten statt, was mediales Gewebe sowie Herzgewebe und die Adventitia teilweise miteinschließt. In der vorliegenden Arbeit jedoch wurde nach dem Protokoll von Alencar *et al.* gearbeitet und ausschließlich die isolierte atherosklerotische Läsion aus

BCAs analysiert. Dies erhöht zum einen die Sensitivität für Plaque-SMC-Phänotypen, des Weiteren repräsentiert die BCA-Läsion auch um ein Vielfaches besser die humanen Gegebenheiten als dies der Aortenursprung tut.

Für die näheren Untersuchungen wurden die entnommenen Läsionen von fünf SMC *YFP^{+/+} ApoE^{-/-} Has3^{wt/wt}*-Mäusen und sechs SMC *YFP^{+/+} ApoE^{-/-} HAS3^{fl/fl}*-Mäusen gepoolt und analysiert. Nach Integration und Normierung der Daten ergab sich, dass die Läsionen insgesamt sieben voneinander unabhängige, eigenständige Zellpopulationen aufwiesen. Mit Hilfe der *eyfp*-mRNA-Expression konnte nachgewiesen werden, dass sich neben Makrophagen und Endothelzellen fünf dieser Zellpopulationen ganz klar von SMC ableiteten (**Abbildung 25**). In den vorangegangenen Arbeiten konnten jeweils drei SMC-Populationen unter Verwendung von Aortenursprungsgewebe [34] sowie vier Populationen in Analysen der Aorta nachgewiesen werden [36]. In einem größeren Datenset von isolierten BCA-Läsionen aus 23 Tieren konnten Alencar *et al.* insgesamt sieben SMC-Cluster definieren [35]. Zur Detektion dieser beiden zusätzlichen Populationen könnten in der hier vorliegenden Arbeit aufgrund der geringeren Tieranzahl (11) zu wenig Zellen vorhanden gewesen sein, um sie als eigenständige Cluster zu definieren oder der Endzeitpunkt nach 15 Wochen WD zu früh gewählt worden sein.

Die hier erhobenen Daten zeigten weiterhin, dass von den fünf vorhandenen SMC-Populationen nur eine über die kontraktile SMC-Marker *Myh11*, *Acta2* oder *Tagln* nachweisbar gewesen wäre. Im Einklang mit der Literatur waren die vier weiteren SMC-Cluster positiv für Marker wie *Lgals3*, *Lum*, *Fn1* oder *Spp1* [34-36]. Dies sind repräsentative Marker für einen phänotypischen Übergangszustand, aus welchem SMC in verschiedene Subpopulationen ausdifferenzieren können. Interessanterweise waren auch die Zellen im kontraktile SMC-Cluster positiv für diese Marker, wenn auch in geringerem Maße. Dies könnte daran liegen, dass sich diese Zellen bereits in einen Übergangszustand entwickeln oder aber eine Differenzierung zurück in einen kontraktile Zustand noch nicht final abgeschlossen haben [36].

Genexpressionsanalysen von fibrillären Kollagenstrukturen und SLRP-Gensignaturen ergaben, dass die modulierten SMC-Populationen signifikant erhöhte Genexpressionsmuster in diesen Bereichen aufwiesen, was das Vorliegen von EZM-produzierenden Phänotypen unterstützte (**Abbildung 26**). Daneben zeigte sich im direkten Vergleich zwischen SMC-Con- und SMC-Mod-Clustern, dass in den modulierten Zellpopulationen signifikant vermehrt EZM-assoziierte Gene exprimiert wurden. Unter Zuhilfenahme von GO-Analysen konnten die vier modulierten SMC-Cluster in kollagenproduzierend (SMC-Mod1), osteochondrogen (SMC-Mod2),

inflammatorisch (SMC-Mod3) und ansprechbar auf Wachstumsfaktoren (SMC-Mod4) eingeteilt werden (**Abbildung 27 B, C und 28**). Dies geht einher mit der Einteilung der SMC-Populationen die Alencar *et al.* vorgenommen haben, welche unter den modulierten zwei verschiedene immunregulatorische Cluster, einen EZM-reichen Cluster und eine Population mit osteogenen Eigenschaften definierten [35].

4.3.2 Die Beeinflussung der SMC-Heterogenität durch SMC-*Has3*-Herabregulierung

In der Untersuchung zu den Einflüssen, die die SMC-*Has3*-Herabregulierung mit sich bringt, konnte dann gezeigt werden, dass SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäuse eine Verringerung von 50% für die kontraktile SMC aufwiesen (**Abbildung 29**). Des Weiteren waren die modulierten SMC-Populationen 1, 3 und 4 signifikant erhöht, wobei der größte Anstieg im inflammatorischen Cluster 3 zu sehen war. Diese Beobachtungen wurden gestützt durch die zuvor beschriebenen *in vivo*-Ergebnisse, die eine signifikante Reduktion der ACTA2⁺-SMC sowie eine starke Zunahme an LGALS3⁺ modulierten SMC in der Läsion von SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen nachwies. Eine Erklärung für die signifikante Zunahme der SMC in den modulierten Zellpopulationen könnte ein gesteigerter Proliferationsindex in den SMC-Mod-Clustern sein (**Abbildung 30**). So befanden sich in den SMC-Mod-Clustern verstärkt Zellen in der S- oder G2M-Phase, verglichen mit den Zellen des SMC-Con-Clusters. Diese beobachtete erhöhte Proliferationsrate in den SMC-Mod-Populationen nach SMC-*Has3*-Deletion war überraschend, denn es ist bekannt, dass die HAS3-vermittelte HA-Matrix proliferationsfördernde Eigenschaften besitzt [97, 125, 129, 202, 203]. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch ein pro-proliferativer Effekt für die SMC-*Has3*-Herabregulation beobachtet. Dies könnte sich durch das stark erhöhte inflammatorische Milieu erklären lassen, welches die direkte Kommunikation zwischen SMC und inflammatorischen Zellen beeinflussen könnte. Neben weiteren Genen waren insbesondere die Akut-Phase-Modulatoren *Lipocalin-2* und *Serum Amyloid A* signifikant erhöht in den modulierten SMC-Clustern, welche dafür bekannt sind, die phänotypische Veränderung von SMC zu fördern [204, 205].

Die ausführliche Untersuchung der Unterschiede zwischen SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}Has3^{wt/wt}*- und SMC *YFP^{+/+}ApoE^{-/-}HAS3^{fl/fl}*-Mäusen in den modulierten Zellpopulationen mittels GO- und Genexpressionsanalyse ergab, dass zahlreiche inflammatorische Genexpressionsmuster induziert waren (**Abbildung 31**). Daraus lässt sich schließen,

dass die SMC-spezifische Herabregulation den größten Einfluss auf inflammatorische Prozesse hat und einen proinflammatorischen und profibrotischen Einfluss auf die SMC nimmt. Inflammation spielt eine wichtige Rolle in Reparaturprozessen von verletztem Gewebe und der Pathogenresistenz. In der Atherosklerose ist Inflammation jedoch meistens negativ assoziiert, insbesondere in Bezug auf die Plaquestabilität. Jedoch konnten Studien in den letzten Jahren zeigen, dass Inflammation auch eine wichtige Rolle in der Atheroprogression spielen kann. So konnte eine Studie zur Rolle von IL1- und IL1R1-*Signaling* zeigen, dass das IL1R1-*Signaling* in SMC zwar die Entwicklung der Atherosklerose fördert, aber auch eine kritische Rolle in der Bildung der schützenden FC einnimmt [187]. Ein SMC-*Il1r1*-KO resultierte in einer FC, welche so gut wie keine SMC und kein ACTA⁺-Signal aufwies. Des Weiteren resultierte eine anti-IL1-Antikörper-Behandlung in *ApoE*^{-/-}-Mäusen in einer 50%-igen Reduktion von SMC und Kollagen in der Läsion. Dies zeigt also die Bedeutung von inflammatorischen Prozessen für entscheidende Stabilitätsparameter wie die Kollagenproduktion [187].

Vergleicht man den Anstieg der SMC in der inflammatorischen Zellpopulation dieser Arbeit und den daraus resultierenden atheroprotektiven und synthetischen Phänotyp mit den Ergebnissen von Alencar *et al.*, so resultierte in deren Arbeit die Zunahme der modulierten *Lgals3*⁺ SMC-Cluster durch einen *Klf4*-KO in einem schädlichen Phänotyp für die Atheroprogression. Dieser definierte sich über signifikant vergrößerte Läsionen, ausgelöst durch vermehrte Kalzifizierung. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass sie die größte Zunahme der SMC im osteogenen Cluster vorfanden. Die in dieser vorliegenden Arbeit beobachtete Steigerung an SMC im inflammatorischen SMC-Mod-Cluster könnte auf den unterschiedlichen Analysezeitpunkt der Studien und die daraus resultierende Ausprägung der Atherosklerose zurückzuführen sein. Während die Tiere in der Arbeit von Alencar *et al.* nach 26 Wochen Fütterung untersucht wurden, fanden die Analysen in dieser Arbeit bereits nach 15 Wochen WD statt, um eine Vergleichbarkeit zu den Arbeiten im globalen *Has3*-Defizienz-Modell herzustellen. Auf der anderen Seite ist KLF4 ein Stammzellfaktor und bekannt dafür, die phänotypische Änderung von SMC direkt zu beeinflussen [37]. Für *Has3* hingegen ist zur direkten Beeinflussung der phänotypischen Änderung von SMC nichts bekannt. Hier könnte eher die Veränderung der EZM-Umgebung der SMC durch die SMC-*Has3*-Deletion einen Einfluss auf den Phänotyp nehmen. Übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit definierten Wirka *et al.* die vorgefundenen modulierten SMC-Phänotypen anhand ihrer gesteigerten EZM-Produktion ebenfalls als atheroprotektiv [34]. Sie konnten jedoch nur drei verschiedene

SMC-Phänotypen definieren, was andere, unter Umständen schädliche Phänotypen ausschließen könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die SMC-spezifische Herabregulierung der *Has3* zu einer erhöhten Plaquestabilität beitragen könnte, zurückzuführen auf eine signifikant gesteigerte Kollagenproduktion, welche durch vermehrt vorhandene phänotypisch modulierte SMC in der Läsion ausgelöst wird.

4.4 Mechanistische Studien zur HAS3/HA/CD44-Interaktion

Zur Aufklärung der mechanistischen Hintergründe, inwiefern die SMC-spezifische *Has3*-Deletion zu vermehrter phänotypischer Änderung und damit verbundener EZM-Bildung führt, wurde *in vitro* die Rolle des HA-Rezeptors CD44 untersucht. Aus der Literatur ist bekannt [176], dass die Inhibition von CD44 *in vitro* die TGF β 1-abhängige Aktivierung kardialer Myofibroblasten reduziert. Die Myofibroblastenaktivierung wurde dabei über den Anstieg des kontraktiven Markers ACTA2 definiert. In *Has2*^{-/-}-Mäusen führten nach Ischämie und Reperfusion geringere Level an HA und damit assoziierte verringerte HA/CD44-Interaktionen zu einem reduzierten ACTA2-Signal im Herzen. Auch eine Untersuchung der kompletten Inhibition der HA-Synthese mittels 4-MU führte zu ähnlichen Ergebnissen: Die HA/CD44-Interaktion scheint erforderlich für die Dedifferenzierung von Fibroblasten zu einem ACTA2⁺-Phänotypen zu sein. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte untersucht werden, welchen Einfluss die HAS3/HA/CD44-Achse auf die ACTA2-Expression und den Phänotyp von SMC nimmt.

Hier konnte beobachtet werden, dass eine *Has3*-Herabregulierung eine signifikante Reduktion der HA-Menge im überstehenden Zellkulturmedium mit sich führte (**Abbildung 34**). Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich, dass die *Acta2*-Expression 48 Stunden nach Deletion von *Has3* signifikant reduziert war. Gleiche Effekte ließen sich nach der Blockierung von CD44 beobachten. Parallel fand eine Hochregulierung von EZM-assoziierten Genen wie *Col1a1*, *Col3a1*, *Col15a1* und *Fn1* statt. Diese wurden in der Literatur bereits mit phänotypisch modulierten SMC in Verbindung gebracht [34-36] (**Abbildung 35**). Die Inhibition von CD44 simulierte jeweils die Effekte der *Has3*-Deletion für die Messung von *Acta2* und alle weiteren untersuchten, EZM-assoziierten Gene. Dies spricht dafür, dass die *in vivo* beobachtete Steigerung der phänotypischen Änderung und die damit verbundene erhöhte EZM-Deposition in direkter Abhängigkeit zur HAS3/HA/CD44-Achse stehen könnten. Um kompensatorische Effekt der beiden Isoenzyme *Has1* und *Has2* auszuschließen, wurde auch deren mRNA-Expression

gemessen. Diese zeigte sich über alle Phasen des Versuches unverändert (**Abbildung 33**). Es ist also festzuhalten, dass die *Has3*-abhängige HA-CD44-Wechselwirkung vermutlich eine entscheidende Rolle auf die Atheroprogression nimmt.

CD44 ist einer der Hauptrezeptoren für HA und bekannt, bei verstärktem Ansprechen proatherogen zu wirken [130]. In Einem Versuch mit *Cd44*^{-/-}-Mäusen zeigte sich, dass die Tiere ohne den schädlichen Einfluss von CD44 70% weniger atherosklerotische Läsionen ausbildeten. In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch die SMC-*Has3* Deletion zwar keine Reduktion in der Läsionsbildung beobachtet werden, jedoch scheint ein verringertes HAS3/HA/CD44-Signaling ein möglicher Mechanismus zu sein, der über die Erhöhung phänotypisch modulierter SMC erheblich zur Verbesserung der Plaquestabilität beitragen könnte. Über die HA/CD44-Interaktion ist bekannt, dass sie die TGFβ1-abhängige Aktivierung der Signalkaskade der Mitogenaktivierenden Proteinkinase (MAPK) und der Extrazellulärsignal-regulierten Kinase (ERK) fördert. Dies geschieht durch die erhöhte Wechselwirkung von CD44 mit dem EGFR und führt zu vermehrter Proliferation, nachgewiesen in Fibroblasten [206]. Dies steht in Kontrast mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, die eine verstärkte Proliferation der modulierten SMC nach Hemmung der HAS3/HA/CD44-Achse zeigte. Daneben sind auch proinflammatorische Faktoren wie *Saa1-3* und *Lcn2* bekannt dafür, den Phänotyp von SMC zu modulieren [204, 205]. Diese waren nach SMC-spezifischem *Has3*-KO signifikant erhöht und könnten einen Anstieg der LGALS3⁺-SMC erklären.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass die SMC-spezifische *Has3*-Herabregulierung eine signifikante Steigerung der phänotypischen Änderung von SMC mit sich führt. Diese Korrelation führt zu einem Anstieg an LGALS3⁺-SMC, welche profibrotische und proinflammatorische Charakteristika aufweisen und bringt eine signifikant gesteigerte Kollagenproduktion mit sich. Dieses Kollagen ist zusätzlich organisierter und gereifter und könnte maßgeblich zu vermehrter Plaquestabilität beitragen. Ein möglicher Mechanismus könnte das reduzierte HAS3/HA-vermittelte CD44-Signaling darstellen (**Abbildung 36**).

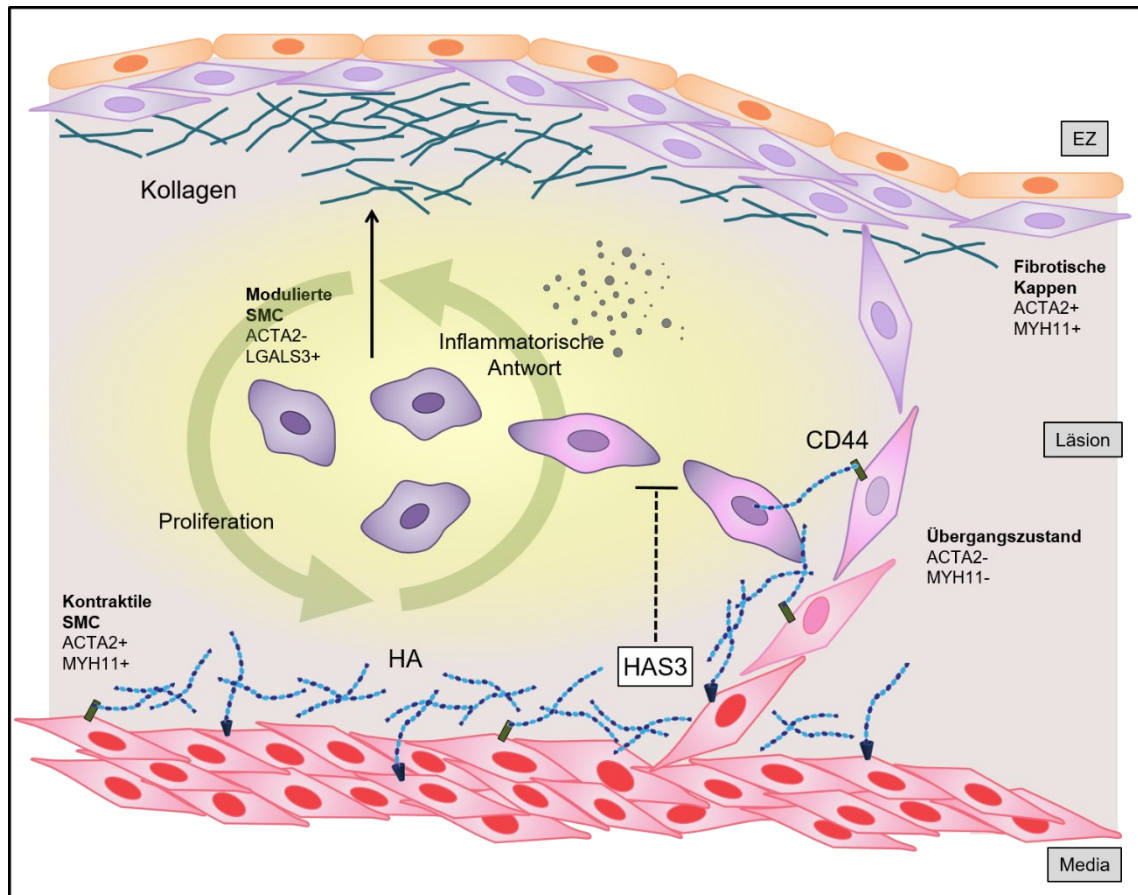


Abbildung 36: Übersicht über die mechanistische Hypothese der Beeinflussung der phänotypischen Änderung von SMC durch die SMC-Has3 in der Atherosklerose.

Es ist bekannt, dass HA einen kritischen Einfluss auf die Volumenexpansion in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen nimmt und auch die SMC-Migration und -Proliferation beeinflussen kann. Dabei trägt die HAS3-Expression insbesondere in der frühen Atherosklerose maßgeblich zur HA-Deposition bei. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der SMC-spezifischen *Has3* auf die Atheroprogression hinsichtlich der phänotypischen Änderung von SMC untersucht. Immunfluoreszenzfärbungen in SMC-*Has3*-defizienten Mäusen zeigten, dass die Anzahl an LGALS3⁺-SMC signifikant anstieg nach der SMC-spezifischen *Has3*-Deletion und zu einer verstärkten Kollagendeposition, -organisation und -reifung führte. In sich anschließenden scRNA-Seq-Untersuchungen konnten insbesondere Erhöhungen der Zellzahlen in inflammatorischen SMC-Clustern beobachtet werden, einhergehend mit signifikant hochregulierten Markern der Akut-Phase-Immunantwort wie beispielsweise *Lcn2* und *Saa1-3*. Auch war der Proliferationsindex der modulierten SMC signifikant erhöht, gegenüber der kontraktile SMC. In sich anschließenden *in vitro*-Arbeiten konnte ein reduziertes HA/CD44-Signaling nach SMC-*Has3*-knockdown als möglicher Mechanismus für die beobachteten Effekte definiert werden, da die siRNA-induzierte phänotypische Veränderung der Zellen mittels CD44-blockierendem-Antikörper imitiert wurde. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Herabregulierung der SMC-*Has3* eine entscheidende Rolle für die Erhöhung der Plaquestabilität in atherosklerotischen Läsionen spielen könnte und dass eine Involvierung der HAS3/HA/CD44-Achse wahrscheinlich ist.

4.5 Offene Fragen und Ausblick

Die hier dargestellten Ergebnisse im Kontext aktueller Literatur lassen darauf schließen, dass die SMC-spezifische *Has3* eine kritische Rolle für die Plaquestabilität atherosklerotischer Läsionen spielt. So führte eine SMC-*Has3*-Deletion zu signifikant erhöhter Kollagendeposition, -organisation und -reifung. Dies lässt sich zurückführen auf eine gesteigerte phänotypische Änderung von SMC von einem kontraktilem Phänotyp hin zu einem modulierten, charakterisiert über die Expression von LGALS3. Einzelzell-RNA-Sequenzierungen unterstützen diese Ergebnisse und zeigen, dass dieser veränderte SMC-Phänotyp charakterisiert wird durch proinflammatorische und profibrotische Eigenschaften. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch keine genaueren Untersuchungen durchgeführt, inwiefern diese proinflammatorischen Eigenschaften mit einer gesteigerten Matrixsynthese zusammenhängen. So ist nicht auszuschließen, dass eine gesteigerte Matrixsynthese möglicherweise auch begründet ist durch eine veränderte Kommunikation zwischen SMC und Immunzellen. Um dies genauer aufzuklären, wären weitere Untersuchungen notwendig, wie beispielsweise die durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellkomposition in Läsion und Blutzirkulation.

Ebenfalls nicht abschließend beantwortet ist die Frage, ob die beobachteten Effekte durch die reduzierte HAS3-vermittelte HA-Menge entstehen, oder ob das HAS3-Protein eine HA-unabhängige Funktion ausübt. Da jedoch der Verlust der *Has3 in vivo* sowie *in vitro* mit einer reduzierten HA-Deposition einherging, lässt sich vermuten, dass die reduzierte HA-Matrix direkt Einfluss auf die Effekte nimmt.

Als mögliche mechanistische Erklärung wurde anhand von *in vitro*-Untersuchungen eine Einflussnahme über das HAS3/HA/CD44-System vorgeschlagen. Um diesen Effekt sicher nachzuweisen, müssten weitere *in vivo*-Arbeiten folgen, welche die Involvierung von CD44 belegen. Dies könnte beispielsweise eine CD44-Antikörperbehandlung im Atherosklerosemodell der Maus beinhalten. Einen ersten Hinweis, um eine Beeinflussung über CD44 nachzuweisen, könnte auch die Messung der CD44-Menge in der atherosklerotischen Läsion in Abhängigkeit der SMC-*Has3*-Deletion geben. Dies wäre insbesondere interessant, da vorangehende Studien zeigen, dass ein gesteigertes CD44-Signaling die phänotypische Änderung von SMC auch hin zu vermehrtem Vorkommen von synthetischen Phänotypen beeinflussen kann [134]. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch die Hypothese aufgestellt, dass ein reduziertes CD44-Signaling zu einer Zunahme der Anzahl synthetischer Phänotypen führt.

Im Zuge der Einzelzell-RNA-Sequenzierung hat sich auch gezeigt, dass die phänotypisch modulierten SMC vermehrt proliferieren. Auch dieser Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit nicht eingehend untersucht. Jedoch ist sowohl über HAS3 selbst, als auch über CD44 bekannt, dass ihre gesteigerte Expression einhergeht mit einer erhöhten Proliferationsrate. Dies widerspricht den hier vorliegenden Ergebnissen, welche eine gesteigerte Proliferation von modulierten SMC bei reduzierter HAS3/HA/CD44-Interaktion zeigen. Um diesen Widerspruch aufzuklären, wären weitere *in vitro*-Proliferationsstudien sowie *in vivo*-Untersuchungen beispielsweise mit Bromdesoxyuridin-Inkooperation notwendig. Neben CD44 nimmt auch der Rezeptor RHAMM einen großen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Zellen. Seine Involvierung wurde jedoch im Zuge dieser Arbeit nicht untersucht.

Abschließend lässt sich sagen, dass es sich bei der hier beschriebenen Arbeit ausschließlich um präklinische Daten handelt. Alle Ergebnisse wurden im Mausmodell und an isolierten Mauszellen gewonnen. Dies repräsentiert nicht die Bedingungen im Menschen. Eine eindeutige Übertragbarkeit ist leider nach wie vor nicht möglich. Jedoch könnten Untersuchungen in einem dem Menschen genetisch näherstehenden Tiermodell oder an isoliertem humanen Gewebe weitere interessante Aufschlüsse über die phänotypische Änderung von SMC in atherosklerotischen Läsionen und die Auswirkungen auf die Plaquestabilität im Menschen ergeben.

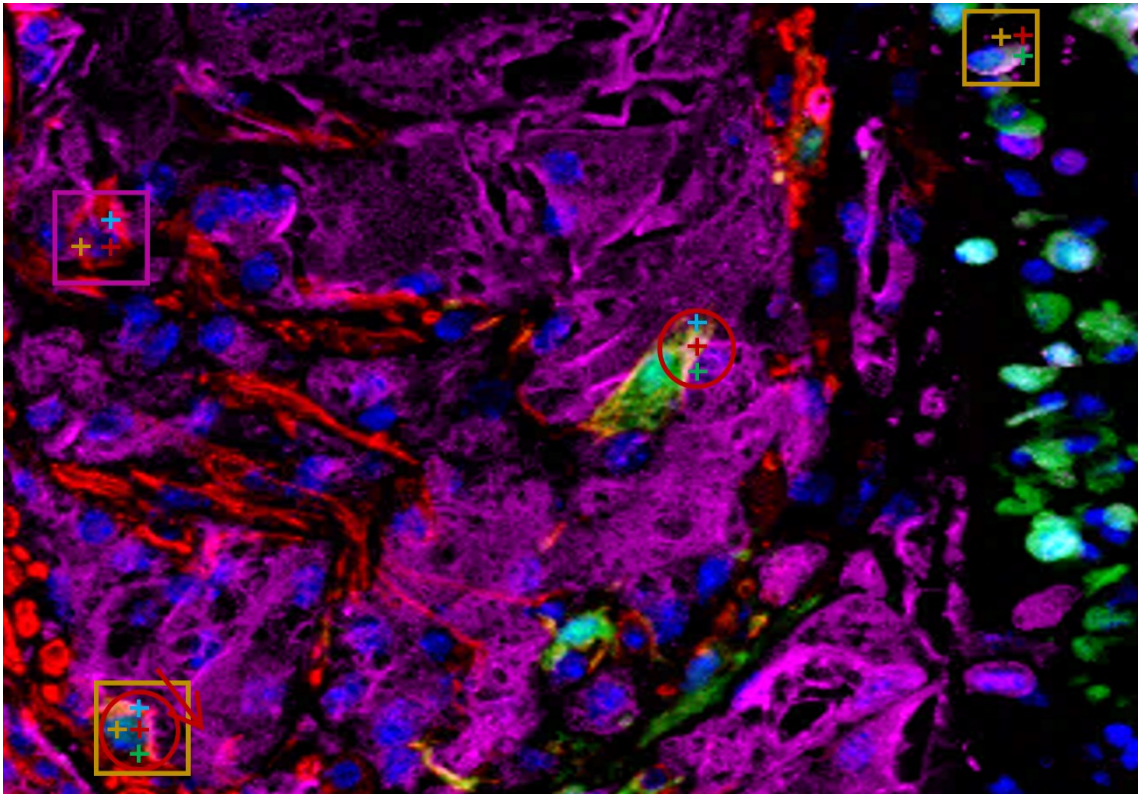
5 Zusammenfassung

Trotz jahrzehntelanger Forschung im Bereich der Atherosklerose ist das Wissen über die Reduktion von Plaqueruptur-induzierten, kardiovaskulären Ereignissen wie dem Myokardinfarkt vergleichsweise gering. Kürzlich veröffentlichte Studien indizieren eine wichtige Rolle von glatten Muskelzellen (SMC), SMC-Phänotypen und der Extrazellulären Matrix (EZM). Es konnte gezeigt werden, dass SMC eine hohe Plastizität in ihren Eigenschaften in Abhängigkeit ihres Phänotyps entwickeln und somit sowohl nützlichen als auch schädlichen Einfluss auf die Stabilität von Plaques nehmen können. Sie sind des Weiteren ein wichtiger Produzent des EZM-Moleküls Hyaluronsäure (HA), welche durch drei Synthesen produziert wird, die HA-Synthesen 1-3 (HAS1-3). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass in der frühen Plaqueeentwicklung insbesondere die *Has3* mit vermehrter HA-Deposition und Makrophageninfiltration in Verbindung steht. Es ist jedoch nur wenig bekannt über die Interaktion zwischen SMC-Phänotyp, EZM und Plaquestabilität. Im Kontext der bereits bekannten Ergebnisse wollten wir uns in dieser Arbeit mit der Rolle der *Has3* und ihren Einflüssen auf die phänotypische Änderung von SMC auseinandersetzen. Dafür wurden männliche Apolipoprotein E (*ApoE*)^{-/-}-Mäuse generiert, die sowohl ein *Lineage Tracing*-System für SMC besitzen als auch eine SMC-spezifische, induzierbare *Has3*-Defizienz. Diese Mäuse wurden für 15 Wochen mit einer Western Diät gefüttert und im Anschluss analysiert. Hierbei konnten wir feststellen, dass eine Defizienz der *Has3* in SMC zu signifikant verringerter HA-Menge in der Läsion führte. Dies hatte keine Auswirkungen auf die Läsionsgrößen oder Gesamtplaquebelastungen. Jedoch zeigten diese Mäuse eine Erhöhung an phänotypisch modulierten, Galectin-3 (LGALS3)⁺-SMC, einhergehend mit einer Zunahme von Kollagenmenge, -reifung und -organisation in den Läsionen. Einzelzell-RNA-Sequenzierungen konnten diesen Effekt bekräftigen und gaben Hinweise auf eine vermehrte Proliferation und inflammatorische Immunantwort dieser modulierten SMC. Auch *in vitro* konnten wir einen Einfluss der *Has3* auf den Phänotyp von SMC nachweisen, der mit Veränderungen in der Kollagenzusammensetzung einherging. Dieser Effekt konnte durch Blockierung des HA-bindenden Rezeptors CD44 imitiert werden, was eine Involvierung seinerseits in den Mechanismus wahrscheinlich macht. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen daher nahe, dass die SMC-spezifische *Has3* einen schädlichen Einfluss auf die atherosklerotische Plaquestabilität nimmt, durch Hemmung der phänotypischen Änderung von glatten Muskelzellen und damit verbundene Kollagenproduktion und -organisation, vermittelt über die HA/HAS3/CD44-Achse.

6 Summary

Despite decades of research in the field of atherosclerosis, it remains poorly understood how to significantly reduce the prevalence of plaque rupture-induced cardiovascular diseases as myocardial infarctions. Recent studies have suggested an important role of smooth muscle cells (SMC), SMC-phenotype and extracellular matrix (ECM) environment. SMC has been shown to exacerbate a high plasticity of properties in dependency of their phenotype and can thereby either contribute beneficial or detrimental to plaque stability. Furthermore, SMC are an important producer of the ECM molecule hyaluronic acid (HA) which is produced by three synthases, HA-synthase 1-3 (HAS1-3). In a mouse model of atherosclerosis, *Has3* was found to be induced together with increases in HA deposition and macrophage infiltration in early plaque development. However, little is known about the exact mechanisms of direct interaction between SMC phenotype, ECM and plaque stability. In context of the previous results, the aim of the present study was to investigate the role of *Has3* and its influence on SMC phenotypic switching. For this purpose, we generated male Apolipoprotein E (*ApoE*)^{-/-}-mice with SMC lineage tracing system and a SMC specific, inducible *Has3* deficiency. These mice were fed a western type diet for 15 weeks prior to analysis. We could show that SMC-*Has3* deficiency leads to significant less HA deposition within the lesion. This seems not to affect lesion size or overall plaque burden. But notably, these mice showed a higher amount of phenotypic modulated Galectin-3 (LGALS3)⁺ SMC and increases in collagen deposition, maturation and organization. This effect was supported by scRNA-Seq analysis, which further revealed a hint to extended proliferation as well as inflammatory immune response of the modulated SMC. In *in vitro* studies we could confirm these results by observing regulatory effects of *Has3* knockdown on SMC phenotype and changes in collagen composition. These effects could be mimicked by blocking HA binding receptor CD44 which could therefore play a crucial role for the mechanism. These results provide evidence that SMC-*Has3* has a detrimental role for atherosclerotic plaque stability by reducing SMC phenotypic switching and thereby affects collagen synthesis and organization, driven by the HA/HAS3/CD44 axis.

7 Anhang



Signal	Symbol in fibrotischer Kappe	Symbol im Läsionskern
DAPI+ (blau)	rotes Kreuz	dunkelrotes Kreuz
YFP+ (grün)	hellgrünes Kreuz	dunkelgrünes Kreuz
ACTA2+ (rot)	blaues Kreuz	hellblaues Kreuz
LGALS3+ (violett)	gelbes Kreuz	oliv-farbenes Kreuz
YFP+ACTA2+	roter Kreis	dunkelroter Kreis
YFP+LGALS3+	gelbes Rechteck	oliv-farbenes Rechteck
YFP-ACTA2+LGALS3+	pinkes Rechteck	violettes Rechteck
YFP+ACTA2+LGALS3+	roter Pfeil	dunkelroter Pfeil

Abbildung 37: Repräsentative Darstellung der Analyse der Zellzusammensetzung in der Läsion.

Dargestellt ist die Auswertung für den Läsionskern.

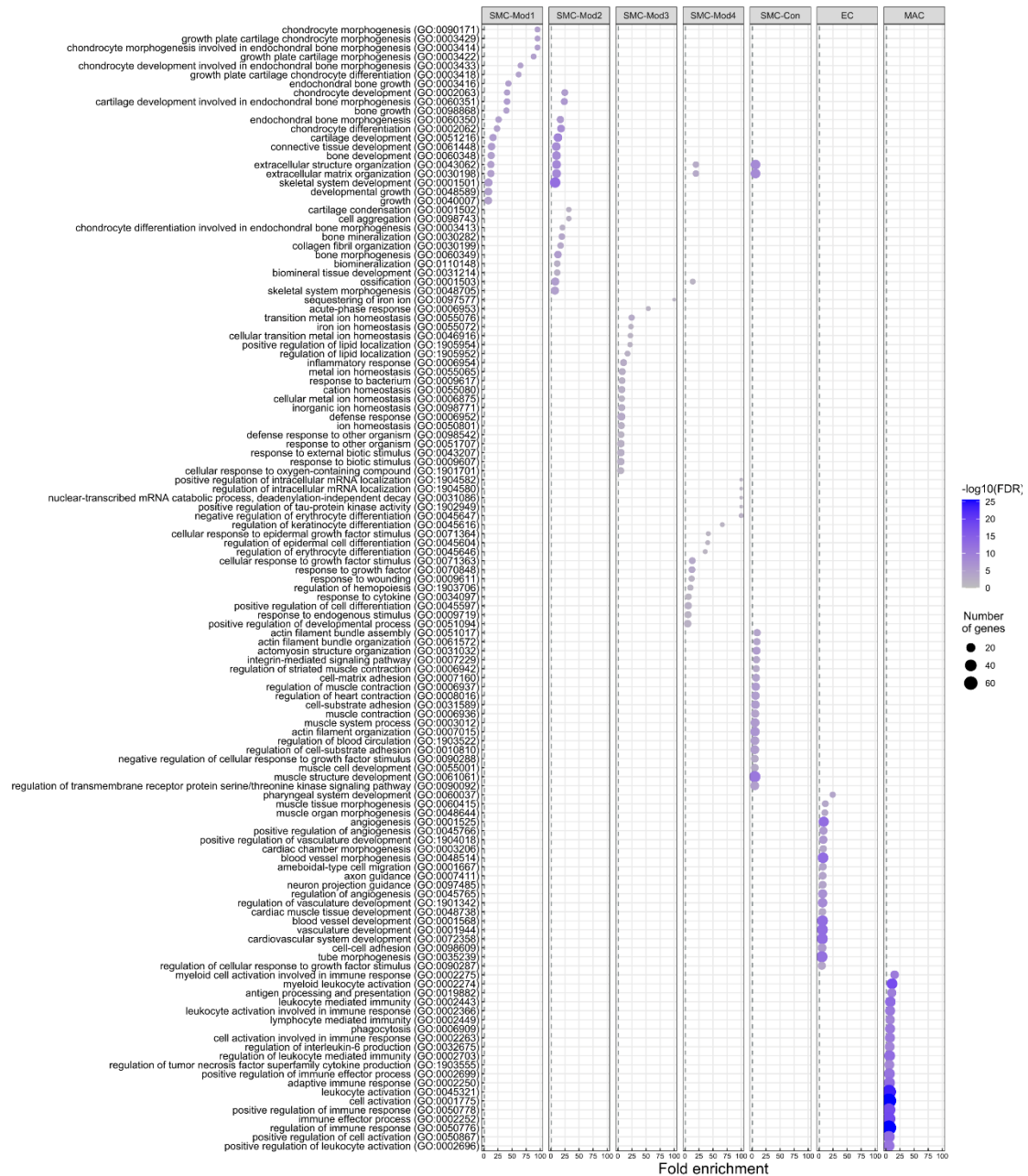
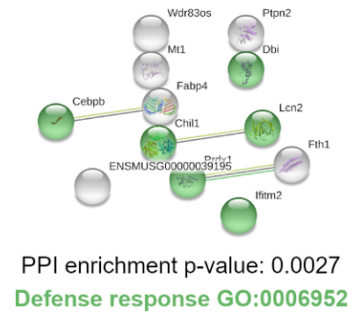
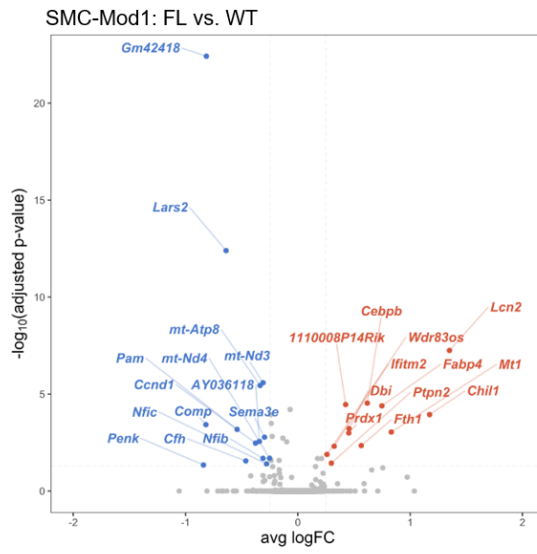


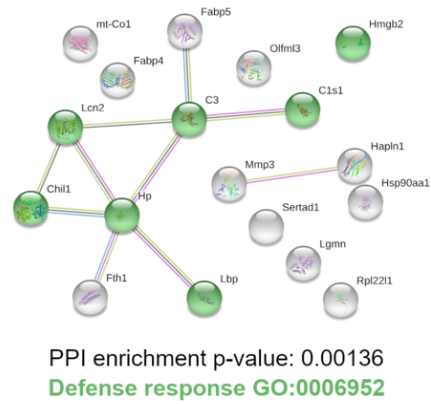
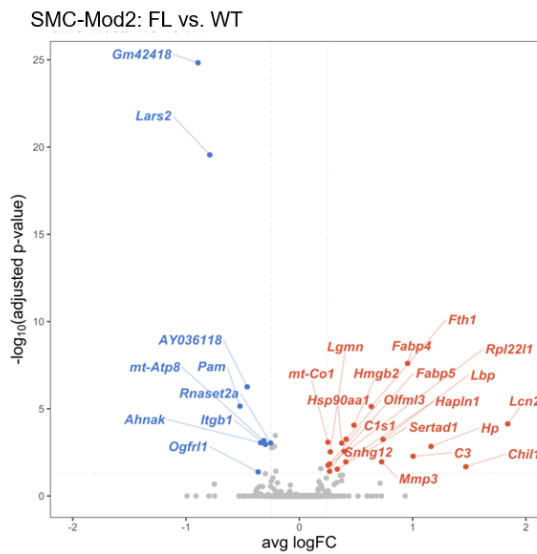
Abbildung 38: Gene ontology enrichment Analysen von Zellpopulationsmarkergenen für die vorliegenden Zellpopulation.

Die bioanalytische Auswertung wurde von Daniel Gorski, PhD, durchgeführt.

A

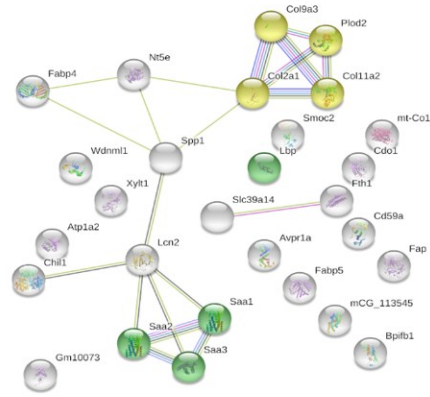
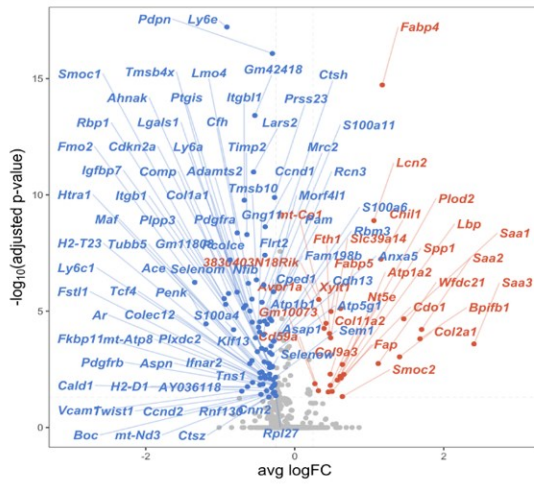


B



C

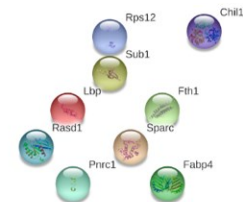
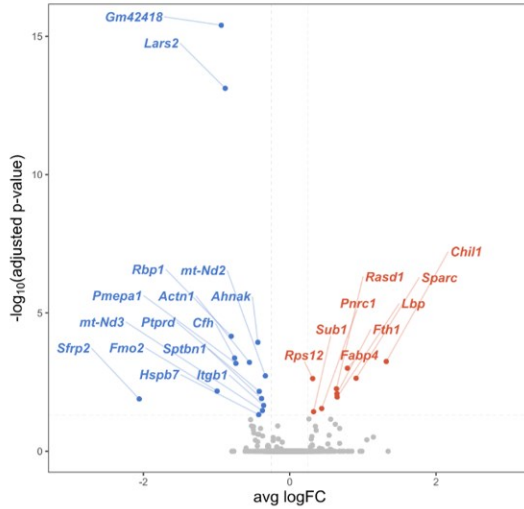
SMC-Mod3: FL vs. WT



PPI enrichment p-value: 1.51e-10
Acute-phase response GO:0006953
Collagen biosynthesis and modifying enzymes R-MMU-1650814

D

SMC-Mod4: FL vs. WT



PPI enrichment p-value: 1

E

- SMC-Con: FL vs. WT

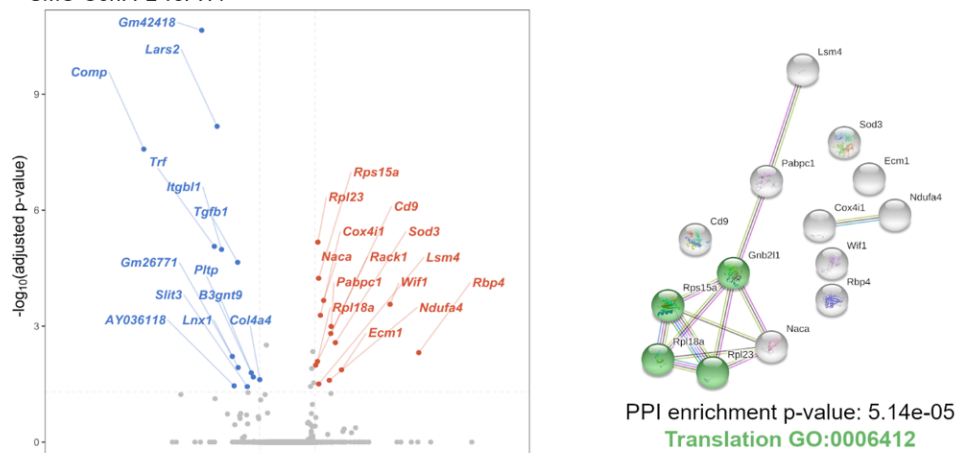


Abbildung 39: Genexpressionsanalysen der SMC-Zellpopulationen SMC-Con und SMC-Mod1-4.

Die bioanalytische Auswertung wurde von Daniel Gorski, PhD, durchgeführt.

Die Ergebnisse des Abschnitts 7 sind zu Teilen publiziert unter:

Felicia Hartmann, Daniel J Gorski, Alexandra A C Newman, Susanne Homann, Anne Petz, Katherine M Owsiany, Vlad Serbulea, Yu-Qing Zhou, Rebecca A Deaton, Michelle Bendeck, Gary K Owens, Jens W Fischer. *SMC derived hyaluronan modulates vascular SMC-phenotype in murine atherosclerosis*. *Circulation Research* 2021 [150].

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Charakteristische Stadien der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen.....	3
Abbildung 2: Charakterisierung der Läsionsstabilität.....	5
Abbildung 3: Schematische Zusammenfassung der SMC-Plastizität in atherosklerotischen Läsionen.	8
Abbildung 4: Darstellung der chemischen Struktur der Hyaluronsäure.	10
Abbildung 5: Die SMC-spezifische Herabregulierung von <i>Has3</i> zeigt keinen Effekt auf die atherosklerotische Läsionsgröße und die nekrotischen Bereiche in der BCA.	17
Abbildung 6: <i>Has3</i> -Defizienz in SMC beeinflusst nicht die atherosklerotische Plaquebelastung in der Aorta von SMC YFP ^{+/+} <i>ApoE</i> ^{-/-} -Mäusen.....	18
Abbildung 7: Die Einblutungen in den Plaquebereich sind nicht beeinflusst durch die Herabregulierung von <i>Has3</i> in SMC.....	18
Abbildung 8: Die SMC-spezifische Deletion von <i>Has3</i> führt zu erhöhter Kollagen Deposition in der Läsion.	19
Abbildung 9: Generierung des Mausmodells.....	22
Abbildung 10: Studiendesign.....	23
Abbildung 11: Primer zur Validierung der zellspezifischen <i>Has3</i> -Herabregulierung (Darstellung der Produkte nach erfolgreicher Tamoxifen-Injektion).....	24
Abbildung 12: Generierung eines Mausmodells mit <i>ApoE</i> -defizientem Hintergrund, SMC-spezifischer Herabregulierung der <i>Has3</i> und zellspezifischem <i>Lineage Tracing</i> -System.....	41
Abbildung 13: Validierung der Rekombinationseffizienz von SMC-spezifischer, endogener YFP-Expression.....	43
Abbildung 14: Validierung der zellspezifischen <i>Has3</i> -Herabregulierung für glatte Muskelzellen.	44
Abbildung 15: Die Herabregulierung von <i>Has3</i> in SMC führt zu einer signifikanten Verringerung von HA in der Läsion.	46
Abbildung 16: Analyse der Läsionsfläche in <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>Has3</i> ^{wt/wt} - und <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>HAS3</i> ^{fl/fl} -Mäusen.	47
Abbildung 17: Bestimmung des HA-positiven Anteils in Läsionen von <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>Has3</i> ^{wt/wt} - und <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>HAS3</i> ^{fl/fl} -Mäusen.	48
Abbildung 18: Die Herabregulierung von <i>Has3</i> in SMC hat keinen Einfluss auf das Körpergewicht oder metabolische Parameter in <i>ApoE</i> -defizienten Mäusen nach 15 Wochen Western Diät.....	50
Abbildung 19: SMC-spezifische Defizienz von <i>Has3</i> resultiert in morphologischen Veränderungen der Läsionszusammensetzung innerhalb atherosklerotischer Plaques.	51

Abbildung 20: Die Herabregulierung von <i>Has3</i> in SMC führt zu signifikant veränderten Zusammensetzungen in den ACTA2 ⁺ YFP ⁺ - und LGALS3 ⁺ YFP ⁺ -Zellen.....	52
Abbildung 21: Überprüfung der Kollagenstruktur in <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>Has3</i> ^{wt/wt} - und <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>HAS3</i> ^{fl/fl} -Mäusen.....	54
Abbildung 22: Die Charakterisierung verschiedener Kollagenreifegrade in der Läsion zeigt insbesondere Effekte auf die gereiften Kollagenfasern, hingegen keine auf die weniger gereiften Fasern.	55
Abbildung 23: Die Analyse der Kollagenorganisation mittels <i>LC-PolScope</i> -Analyse zeigt, dass SMC YFP ^{+/+} <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>HAS3</i> ^{fl/fl} -Mäuse in ihren Plaques stärker organisiertes Kollagen enthalten.....	56
Abbildung 24: Die Herabregulierung von <i>Has3</i> in glatten Muskelzellen führt zu vermehrter Ansammlung von Decorin in der Läsion.	57
Abbildung 25: Die Einzelzell- RNA-Sequenzierung von fortgeschrittenen BCA-Läsionen definiert sieben unabhängige Zellpopulationen, fünf von diesen stammen von glatten Muskelzellen ab.....	60
Abbildung 26: Die Charakterisierung der SMC-Populationen mittels literaturbekanntem Markern zeigt neben der Population der kontraktilen SMC auch modulierte SMC.....	61
Abbildung 27: Genexpressionsanalysen und <i>GO enrichment</i> -Analysen der kontraktilen und der modulierten SMC zeigen, dass die modulierten SMC-Populationen vier unabhängige, subpopulatorische Gruppen umfassen.....	63
Abbildung 28: Repräsentative <i>Feature-Plots</i> für stark exprimierte Gene in den vier SMC Subpopulationen.	64
Abbildung 29: Einzelzell-RNA-Sequenzierungs-Untersuchungen von fortgeschrittenen BCA-Läsionen zeigen ein vermehrtes Vorhandensein von modulierten SMC in Plaques von <i>SMC-Has3</i> -defizienten Mäusen sowie weniger kontraktile SMC, im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe.	65
Abbildung 30: Die Zellzyklus-Phasen-Analyse von allen Zellpopulationen der SMC YFP ^{+/+} <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>Has3</i> ^{wt/wt} - und SMC YFP ^{+/+} <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>HAS3</i> ^{fl/fl} -Mäuse zeigt eine erhöhte Proliferation in den <i>SMC-Has3</i> -defizienten Läsionen.....	66
Abbildung 31: Genexpressionsanalysen und <i>GO-enrichment</i> -Analysen zwischen SMC YFP ^{+/+} <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>Has3</i> ^{wt/wt} - und SMC YFP ^{+/+} <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>HAS3</i> ^{fl/fl} -Mäusen zeigen, dass insbesondere inflammatorische Prozesse durch die <i>SMC-Has3</i> -Defizienz induziert wurden.	67
Abbildung 32: Analyse der Anzahl an unterschiedlich exprimierten Genen für die sieben verschiedenen gefundenen Zellpopulationen in den Zellen der SMC YFP ^{+/+} <i>ApoE</i> ^{-/-} <i>HAS3</i> ^{fl/fl} - Mäusen.....	68
Abbildung 33: Die Behandlung mit siRNA gegen die murine <i>Has3</i> senkt die <i>Has3</i> -mRNA-Expression in der Isotypen-Kontrolle um 70% (weiß) und in der CD44-blocking-Antikörper Behandlung um 60% (orange).	70

Abbildung 34: Die HA-Quantifizierung im Zellüberstand mittels HABP-Immunoassay.....	71
Abbildung 35: Die Herabregulierung der <i>Has3</i> in aktivierten aortalen SMC führt zu signifikant veränderter Genexpression von verschiedenen Kollagenen und <i>Acta2</i>. Die Behandlung mit einem Anti-CD44-Antikörper imitiert den gleichen Effekt.	72
Abbildung 36: Übersicht über die mechanistische Hypothese der Beeinflussung der phänotypischen Änderung von SMC durch die SMC-<i>Has3</i> in der Atherosklerose.....	88
Abbildung 37: Repräsentative Darstellung der Analyse der Zellzusammensetzung in der Läsion. Dargestellt ist die Auswertung für den Läsionskern.....	93
Abbildung 38: <i>Gene ontology enrichment</i> Analysen von Zellpopulationsmarkergenen für die vorliegenden Zellpopulation. Die bioanalytische Auswertung wurde von Daniel Gorski, PhD, durchgeführt.	94
Abbildung 39: Genexpressionsanalysen der SMC-Zellpopulationen SMC-Con und SMC-Mod1-4. Die bioanalytische Auswertung wurde von Daniel Gorski, PhD, durchgeführt.	97

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen für histologische und immunhistologische Färbungen.....	26
Tabelle 2: Verwendete Antikörper und Verdünnungen für immunhistologische Färbungen.....	27
Tabelle 3: Symbole, verwendet für die Zellzählung.	32
Tabelle 4: Transfektionsansatz: modifiziert nach Herstellerangaben	36
Tabelle 5: qPCR-Primersequenzen	39

10 Literaturverzeichnis

1. WHO. 2016; Available from: <https://www.who.int/nmh/publications/ncd-profiles-2018/en/>.
2. Sanchis-Gomar, F., et al., *Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome*. Ann Transl Med, 2016. **4**(13): p. 256.
3. Insull, W., Jr., *The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment*. Am J Med, 2009. **122**(1 Suppl): p. S3-S14.
4. Gorelick, P.B., L.B. Goldstein, and B. Ovbiagele, *New guidelines to reduce risk of atherosclerotic cardiovascular disease: implications for stroke prevention in 2014*. Stroke, 2014. **45**(4): p. 945-7.
5. Bibbins-Domingo, K., et al., *Statin Use for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease in Adults: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement*. JAMA, 2016. **316**(19): p. 1997-2007.
6. Ridker, P.M., et al., *Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events*. N Engl J Med, 2019. **380**(8): p. 752-762.
7. Ridker, P.M., et al., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. N Engl J Med, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.
8. Bevilacqua, M.P., et al., *Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines*. J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 2003-11.
9. Viola, J. and O. Soehnlein, *Atherosclerosis - A matter of unresolved inflammation*. Semin Immunol, 2015. **27**(3): p. 184-93.
10. Libby, P., P.M. Ridker, and G.K. Hansson, *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 317-25.
11. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
12. Stenmark, K.R., et al., *The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function*. Annu Rev Physiol, 2013. **75**: p. 23-47.
13. Hansson, G.K. and A. Hermansson, *The immune system in atherosclerosis*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 204-12.
14. Moos, M.P., et al., *The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(11): p. 2386-91.
15. Wang, G., et al., *Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells*. J Physiol, 2015. **593**(14): p. 3013-30.
16. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(7): p. 369-77.

17. Bennett, M.R., S. Sinha, and G.K. Owens, *Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis*. *Circ Res*, 2016. **118**(4): p. 692-702.
18. Liao, X., et al., *Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis*. *Cell Metab*, 2012. **15**(4): p. 545-53.
19. Davies, M.J. and A.C. Thomas, *Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina*. *Br Heart J*, 1985. **53**(4): p. 363-73.
20. Falk, E., P.K. Shah, and V. Fuster, *Coronary plaque disruption*. *Circulation*, 1995. **92**(3): p. 657-71.
21. Constantinides, P., *The role of arterial wall injury in atherogenesis and arterial thrombogenesis*. *Zentralbl Allg Pathol*, 1989. **135**(6): p. 517-30.
22. Koenig, W. and N. Khuseyinova, *Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(1): p. 15-26.
23. Franck, G., et al., *Roles of PAD4 and NETosis in Experimental Atherosclerosis and Arterial Injury: Implications for Superficial Erosion*. *Circ Res*, 2018. **123**(1): p. 33-42.
24. Davies, M.J. and A. Thomas, *Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death*. *N Engl J Med*, 1984. **310**(18): p. 1137-40.
25. Gomez, D. and G.K. Owens, *Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis*. *Cardiovasc Res*, 2012. **95**(2): p. 156-64.
26. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead*. *Cell*, 2001. **104**(4): p. 503-16.
27. Glukhova, M.A., et al., *Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: a study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(24): p. 9542-6.
28. Liu, J., et al., *Oxidized low-density lipoprotein increases the proliferation and migration of human coronary artery smooth muscle cells through the upregulation of osteopontin*. *Int J Mol Med*, 2014. **33**(5): p. 1341-7.
29. Rong, J.X., et al., *Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(23): p. 13531-6.
30. Dandre, F. and G.K. Owens, *Platelet-derived growth factor-BB and Ets-1 transcription factor negatively regulate transcription of multiple smooth muscle cell differentiation marker genes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **286**(6): p. H2042-51.
31. Owens, G.K., S.M. Vernon, and C.S. Madsen, *Molecular regulation of smooth muscle cell differentiation*. *J Hypertens Suppl*, 1996. **14**(5): p. S55-64.

32. Alexander, M.R. and G.K. Owens, *Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease*. *Annu Rev Physiol*, 2012. **74**: p. 13-40.
33. Feil, S., et al., *Transdifferentiation of vascular smooth muscle cells to macrophage-like cells during atherogenesis*. *Circ Res*, 2014. **115**(7): p. 662-7.
34. Wirka, R.C., et al., *Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis*. *Nat Med*, 2019. **25**(8): p. 1280-1289.
35. Alencar, G.F., et al., *The Stem Cell Pluripotency Genes Klf4 and Oct4 Regulate Complex SMC Phenotypic Changes Critical in Late-Stage Atherosclerotic Lesion Pathogenesis*. *Circulation*, 2020.
36. Pan, H., et al., *Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human*. *Circulation*, 2020.
37. Shankman, L.S., et al., *KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis*. *Nat Med*, 2015. **21**(6): p. 628-37.
38. Vengrenyuk, Y., et al., *Cholesterol loading reprograms the microRNA-143/145-myocardin axis to convert aortic smooth muscle cells to a dysfunctional macrophage-like phenotype*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. **35**(3): p. 535-46.
39. Cherepanova, O.A., et al., *Activation of the pluripotency factor OCT4 in smooth muscle cells is atheroprotective*. *Nat Med*, 2016. **22**(6): p. 657-65.
40. Schunkert, H., et al., *Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease*. *Nat Genet*, 2011. **43**(4): p. 333-8.
41. Miller, C.L., et al., *Disease-related growth factor and embryonic signaling pathways modulate an enhancer of TCF21 expression at the 6q23.2 coronary heart disease locus*. *PLoS Genet*, 2013. **9**(7): p. e1003652.
42. Miller, C.L., et al., *Coronary heart disease-associated variation in TCF21 disrupts a miR-224 binding site and miRNA-mediated regulation*. *PLoS Genet*, 2014. **10**(3): p. e1004263.
43. Newby, A.C., *Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(12): p. 2108-14.
44. Chistiakov, D.A., I.A. Sobenin, and A.N. Orekhov, *Vascular extracellular matrix in atherosclerosis*. *Cardiol Rev*, 2013. **21**(6): p. 270-88.
45. Siasos, G., et al., *Inflammatory mechanisms in atherosclerosis: the impact of matrix metalloproteinases*. *Curr Top Med Chem*, 2012. **12**(10): p. 1132-48.

46. Wesley, R.B., 2nd, et al., *Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(3): p. 432-40.
47. Adiguzel, E., et al., *Migration and growth are attenuated in vascular smooth muscle cells with type VIII collagen-null alleles*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(1): p. 56-61.
48. Koyama, H., et al., *Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors*. *Cell*, 1996. **87**(6): p. 1069-78.
49. Li, S., et al., *Genomic analysis of smooth muscle cells in 3-dimensional collagen matrix*. *FASEB J*, 2003. **17**(1): p. 97-9.
50. Sibinga, N.E., et al., *Collagen VIII is expressed by vascular smooth muscle cells in response to vascular injury*. *Circ Res*, 1997. **80**(4): p. 532-41.
51. Hou, G., et al., *Type VIII collagen stimulates smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase synthesis after arterial injury*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(2): p. 467-76.
52. Plenz, G.A., et al., *Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis*. *Atherosclerosis*, 2003. **166**(1): p. 1-11.
53. Liu, S.Q., et al., *Elastic laminae in vascular development and disease*. *Mol Cell Biomech*, 2010. **7**(2): p. 59-76.
54. Olsson, U., G. Ostergren-Lunden, and J. Moses, *Glycosaminoglycan-lipoprotein interaction*. *Glycoconj J*, 2001. **18**(10): p. 789-97.
55. Karangelis, D.E., et al., *Glycosaminoglycans as key molecules in atherosclerosis: the role of versican and hyaluronan*. *Curr Med Chem*, 2010. **17**(33): p. 4018-26.
56. Svensson, L., D. Heinegard, and A. Oldberg, *Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(35): p. 20712-6.
57. Danielson, K.G., et al., *Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility*. *J Cell Biol*, 1997. **136**(3): p. 729-43.
58. Weber, I.T., R.W. Harrison, and R.V. Iozzo, *Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(50): p. 31767-70.
59. Kinsella, M.G., et al., *Retrovirally mediated expression of decorin by macrovascular endothelial cells. Effects on cellular migration and fibronectin fibrillogenesis in vitro*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(18): p. 13924-32.
60. Hildebrand, A., et al., *Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta*. *Biochem J*, 1994. **302** (Pt 2): p. 527-34.

61. Schonherr, E., et al., *Decorin core protein fragment Leu155-Val260 interacts with TGF-beta but does not compete for decorin binding to type I collagen*. Arch Biochem Biophys, 1998. **355**(2): p. 241-8.
62. Hausser, H., et al., *Selective inactivity of TGF-beta/decorin complexes*. FEBS Lett, 1994. **353**(3): p. 243-5.
63. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan as an immune regulator in human diseases*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 221-64.
64. Hascall, V.C., et al., *The dynamic metabolism of hyaluronan regulates the cytosolic concentration of UDP-GlcNAc*. Matrix Biol, 2014. **35**: p. 14-7.
65. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
66. Vigetti, D., et al., *Hyaluronan: biosynthesis and signaling*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(8): p. 2452-9.
67. Moustakas, A. and P. Heldin, *TGFbeta and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1840**(8): p. 2621-34.
68. Fraser, J.R., T.C. Laurent, and U.B. Laurent, *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*. J Intern Med, 1997. **242**(1): p. 27-33.
69. Laurent, T.C. and J.R. Fraser, *The properties and turnover of hyaluronan*. Ciba Found Symp, 1986. **124**: p. 9-29.
70. Vigetti, D., et al., *Hyaluronan synthesis is inhibited by adenosine monophosphate-activated protein kinase through the regulation of HAS2 activity in human aortic smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2011. **286**(10): p. 7917-24.
71. Kolodgie, F.D., et al., *Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(10): p. 1642-8.
72. Toole, B.P., *Hyaluronan promotes the malignant phenotype*. Glycobiology, 2002. **12**(3): p. 37R-42R.
73. Itano, N., et al., *Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 25085-92.
74. Hubbard, C., et al., *The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan*. J Mol Biol, 2012. **418**(1-2): p. 21-31.
75. Torronen, K., et al., *Tissue distribution and subcellular localization of hyaluronan synthase isoenzymes*. Histochem Cell Biol, 2014. **141**(1): p. 17-31.
76. Tien, J.Y. and A.P. Spicer, *Three vertebrate hyaluronan synthases are expressed during mouse development in distinct spatial and temporal patterns*. Dev Dyn, 2005. **233**(1): p. 130-41.

77. Camenisch, T.D., et al., *Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme*. J Clin Invest, 2000. **106**(3): p. 349-60.
78. Wight, T.N., *Provisional matrix: A role for versican and hyaluronan*. Matrix Biol, 2017. **60-61**: p. 38-56.
79. Moretto, P., et al., *Regulation of hyaluronan synthesis in vascular diseases and diabetes*. J Diabetes Res, 2015. **2015**: p. 167283.
80. Fischer, J.W. and K. Schror, *Regulation of hyaluronan synthesis by vasodilatory prostaglandins. Implications for atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2007. **98**(2): p. 287-95.
81. Nataatmadja, M., J. West, and M. West, *Overexpression of transforming growth factor-beta is associated with increased hyaluronan content and impairment of repair in Marfan syndrome aortic aneurysm*. Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I371-7.
82. Evanko, S.P., et al., *Platelet-derived growth factor stimulates the formation of versican-hyaluronan aggregates and pericellular matrix expansion in arterial smooth muscle cells*. Arch Biochem Biophys, 2001. **394**(1): p. 29-38.
83. Homann, S., et al., *Hyaluronan synthase 3 promotes plaque inflammation and atheroprogession*. Matrix Biol, 2018. **66**: p. 67-80.
84. Kakizaki, I., et al., *A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33281-9.
85. Spicer, A.P., et al., *Chromosomal localization of the human and mouse hyaluronan synthase genes*. Genomics, 1997. **41**(3): p. 493-7.
86. Monslow, J., et al., *The human hyaluronan synthase genes: genomic structures, proximal promoters and polymorphic microsatellite markers*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(8): p. 1272-83.
87. Spicer, A.P. and J.A. McDonald, *Characterization and molecular evolution of a vertebrate hyaluronan synthase gene family*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 1923-32.
88. Kessler, S.P., D.R. Obery, and C. de la Motte, *Hyaluronan Synthase 3 Null Mice Exhibit Decreased Intestinal Inflammation and Tissue Damage in the DSS-Induced Colitis Model*. Int J Cell Biol, 2015. **2015**: p. 745237.
89. Kiene, L.S., et al., *Deletion of Hyaluronan Synthase 3 Inhibits Neointimal Hyperplasia in Mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. **36**(2): p. e9-16.
90. Sakr, S.W., et al., *Hyaluronan accumulation is elevated in cultures of low density lipoprotein receptor-deficient cells and is altered by manipulation of cell cholesterol content*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36195-204.

91. Viola, M., et al., *Oxidized low density lipoprotein (LDL) affects hyaluronan synthesis in human aortic smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2013. **288**(41): p. 29595-603.
92. Yang, B., et al., *Identification of a common hyaluronan binding motif in the hyaluronan binding proteins RHAMM, CD44 and link protein*. EMBO J, 1994. **13**(2): p. 286-96.
93. Banerji, S., et al., *LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan*. J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 789-801.
94. Jiang, D., et al., *Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan*. Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1173-9.
95. Dong, Y., et al., *Endotoxin free hyaluronan and hyaluronan fragments do not stimulate TNF-alpha, interleukin-12 or upregulate co-stimulatory molecules in dendritic cells or macrophages*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 36928.
96. Jain, M., et al., *Role of CD44 in the reaction of vascular smooth muscle cells to arterial wall injury*. J Clin Invest, 1996. **97**(3): p. 596-603.
97. Evanko, S.P., J.C. Angello, and T.N. Wight, *Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(4): p. 1004-13.
98. Aruffo, A., et al., *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate*. Cell, 1990. **61**(7): p. 1303-13.
99. McDonald, B. and P. Kubes, *Interactions between CD44 and Hyaluronan in Leukocyte Trafficking*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 68.
100. Foster, L.C., et al., *Regulation of CD44 gene expression by the proinflammatory cytokine interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20341-6.
101. Zhang, G., et al., *CD44 clustering is involved in monocyte differentiation*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014. **46**(7): p. 540-7.
102. Jain, M., et al., *Role of CD44 in the reaction of vascular smooth muscle cells to arterial wall injury*. J Clin Invest, 1996. **98**(3): p. 877.
103. Misra, S., et al., *Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 201.
104. Orian-Rousseau, V., *CD44 Acts as a Signaling Platform Controlling Tumor Progression and Metastasis*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 154.
105. Katoh, S., J.B. McCarthy, and P.W. Kincade, *Characterization of soluble CD44 in the circulation of mice. Levels are affected by immune activity and tumor growth*. J Immunol, 1994. **153**(8): p. 3440-9.

106. Cuff, C.A., et al., *The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation*. J Clin Invest, 2001. **108**(7): p. 1031-40.
107. Sherman, L., et al., *Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(5): p. 726-33.
108. Hardwick, C., et al., *Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor that mediates tumor cell motility*. J Cell Biol, 1992. **117**(6): p. 1343-50.
109. Yang, B., L. Zhang, and E.A. Turley, *Identification of two hyaluronan-binding domains in the hyaluronan receptor RHAMM*. J Biol Chem, 1993. **268**(12): p. 8617-23.
110. Zaman, A., et al., *Expression and role of the hyaluronan receptor RHAMM in inflammation after bleomycin injury*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(5): p. 447-54.
111. Tolg, C., et al., *Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair*. J Cell Biol, 2006. **175**(6): p. 1017-28.
112. Savani, R.C., et al., *Migration of bovine aortic smooth muscle cells after wounding injury. The role of hyaluronan and RHAMM*. J Clin Invest, 1995. **95**(3): p. 1158-68.
113. Tolg, C., et al., *Hyaluronan and RHAMM in wound repair and the "cancerization" of stromal tissues*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 103923.
114. Park, D., et al., *Hyaluronic acid promotes angiogenesis by inducing RHAMM-TGFbeta receptor interaction via CD44-PKCdelta*. Mol Cells, 2012. **33**(6): p. 563-74.
115. Zhang, S., et al., *The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase*. J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 11342-8.
116. Hofinger, E.S., et al., *Isoenzyme-specific differences in the degradation of hyaluronic acid by mammalian-type hyaluronidases*. Glycoconj J, 2008. **25**(2): p. 101-9.
117. Csoka, A.B., G.I. Frost, and R. Stern, *The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes*. Matrix Biol, 2001. **20**(8): p. 499-508.
118. Bourguignon, V. and B. Flamion, *Respective roles of hyaluronidases 1 and 2 in endogenous hyaluronan turnover*. FASEB J, 2016. **30**(6): p. 2108-14.
119. Dokoshi, T., et al., *Hyaluronan Degradation by Cemip Regulates Host Defense against Staphylococcus aureus Skin Infection*. Cell Rep, 2020. **30**(1): p. 61-68 e4.
120. Cowman, M.K., *Hyaluronan and Hyaluronan Fragments*. Adv Carbohydr Chem Biochem, 2017. **74**: p. 1-59.
121. Hall, C.L. and E.A. Turley, *Hyaluronan: RHAMM mediated cell locomotion and signaling in tumorigenesis*. J Neurooncol, 1995. **26**(3): p. 221-9.

122. Goueffic, Y., et al., *Hyaluronan induces vascular smooth muscle cell migration through RHAMM-mediated PI3K-dependent Rac activation*. Cardiovasc Res, 2006. **72**(2): p. 339-48.
123. Hamilton, S.R., et al., *The hyaluronan receptors CD44 and Rhamm (CD168) form complexes with ERK1,2 that sustain high basal motility in breast cancer cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(22): p. 16667-80.
124. Vigetti, D., et al., *Hyaluronan-CD44-ERK1/2 regulate human aortic smooth muscle cell motility during aging*. J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 4448-58.
125. Evanko, S.P., et al., *Hyaluronan-dependent pericellular matrix*. Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(13): p. 1351-65.
126. Srinivasan, S.R., et al., *Lipoprotein-hyaluronate associations in human aorta fibrous plaque lesions*. Atherosclerosis, 1980. **36**(1): p. 25-37.
127. Kolodgie, F.D., et al., *The accumulation of specific types of proteoglycans in eroded plaques: a role in coronary thrombosis in the absence of rupture*. Curr Opin Lipidol, 2004. **15**(5): p. 575-82.
128. Farb, A., et al., *Extracellular matrix changes in stented human coronary arteries*. Circulation, 2004. **110**(8): p. 940-7.
129. van den Boom, M., et al., *Differential regulation of hyaluronic acid synthase isoforms in human saphenous vein smooth muscle cells: possible implications for vein graft stenosis*. Circ Res, 2006. **98**(1): p. 36-44.
130. Chai, S., et al., *Overexpression of hyaluronan in the tunica media promotes the development of atherosclerosis*. Circ Res, 2005. **96**(5): p. 583-91.
131. Papakonstantinou, E., et al., *The differential distribution of hyaluronic acid in the layers of human atheromatic aortas is associated with vascular smooth muscle cell proliferation and migration*. Atherosclerosis, 1998. **138**(1): p. 79-89.
132. Braun, M., et al., *Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(2): p. 395-401.
133. Zhao, L., et al., *CD44 expressed on both bone marrow-derived and non-bone marrow-derived cells promotes atherogenesis in ApoE-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(7): p. 1283-9.
134. Wilkinson, T.S., et al., *Overexpression of hyaluronan synthases alters vascular smooth muscle cell phenotype and promotes monocyte adhesion*. J Cell Physiol, 2006. **206**(2): p. 378-85.
135. Tabata, T., et al., *Low molecular weight hyaluronan increases the Uptaking of oxidized LDL into monocytes*. Endocr J, 2007. **54**(5): p. 685-93.
136. Vigetti, D., et al., *The effects of 4-methylumbelliferone on hyaluronan synthesis, MMP2 activity, proliferation, and motility of human aortic smooth muscle cells*. Glycobiology, 2009. **19**(5): p. 537-46.

137. Bollyky, P.L., et al., *Th1 cytokines promote T-cell binding to antigen-presenting cells via enhanced hyaluronan production and accumulation at the immune synapse*. Cell Mol Immunol, 2010. **7**(3): p. 211-20.
138. Nieuwdorp, M., et al., *Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability*. J Appl Physiol (1985), 2008. **104**(3): p. 845-52.
139. Mulivor, A.W. and H.H. Lipowsky, *Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(4): p. H1282-91.
140. Vink, H., A.A. Constantinescu, and J.A. Spaan, *Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer : implications for platelet-endothelial cell adhesion*. Circulation, 2000. **101**(13): p. 1500-2.
141. Florian, J.A., et al., *Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells*. Circ Res, 2003. **93**(10): p. e136-42.
142. Constantinescu, A.A., H. Vink, and J.A. Spaan, *Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(9): p. 1541-7.
143. Nieuwdorp, M., et al., *The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease*. Curr Opin Lipidol, 2005. **16**(5): p. 507-11.
144. Nagy, N., et al., *Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis*. Circulation, 2010. **122**(22): p. 2313-22.
145. Sussmann, M., et al., *Induction of hyaluronic acid synthase 2 (HAS2) in human vascular smooth muscle cells by vasodilatory prostaglandins*. Circ Res, 2004. **94**(5): p. 592-600.
146. Riessen, R., et al., *Distribution of hyaluronan during extracellular matrix remodeling in human restenotic arteries and balloon-injured rat carotid arteries*. Circulation, 1996. **93**(6): p. 1141-7.
147. Goldberg, R.L. and B.P. Toole, *Hyaluronate inhibition of cell proliferation*. Arthritis Rheum, 1987. **30**(7): p. 769-78.
148. Chajara, A., et al., *Hyaluronan and hyaluronectin production in injured rat thoracic aorta*. Atherosclerosis, 1996. **125**(2): p. 193-207.
149. Kashima, Y., et al., *Crucial role of hyaluronan in neointimal formation after vascular injury*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58760.
150. Hartmann, F., et al., *SMC Derived Hyaluronan Modulates Vascular SMC-Phenotype in Murine Atherosclerosis*. Circ Res, 2021.
151. Gomez, D., et al., *Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections*. Nat Methods, 2013. **10**(2): p. 171-7.

152. Newman, A.A.C., et al., *Multiple cell types contribute to the atherosclerotic lesion fibrous cap by PDGFRbeta and bioenergetic mechanisms*. Nat Metab, 2021. **3**(2): p. 166-181.
153. Wirth, A., et al., *G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension*. Nat Med, 2008. **14**(1): p. 64-8.
154. Hess, D.L., et al., *Perivascular cell-specific knockout of the stem cell pluripotency gene Oct4 inhibits angiogenesis*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 967.
155. Shribak, M. and R. Oldenbourg, *Techniques for fast and sensitive measurements of two-dimensional birefringence distributions*. Appl Opt, 2003. **42**(16): p. 3009-17.
156. Oldenbourg, R., *A new view on polarization microscopy*. Nature, 1996. **381**(6585): p. 811-2.
157. Oldenbourg, R. and G. Mei, *New polarized light microscope with precision universal compensator*. J Microsc, 1995. **180**(Pt 2): p. 140-7.
158. Keikhosravi, A., et al., *Quantification of collagen organization in histopathology samples using liquid crystal based polarization microscopy*. Biomed Opt Express, 2017. **8**(9): p. 4243-4256.
159. Butler, A., et al., *Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species*. Nat Biotechnol, 2018. **36**(5): p. 411-420.
160. Stuart, T., et al., *Comprehensive Integration of Single-Cell Data*. Cell, 2019. **177**(7): p. 1888-1902 e21.
161. Hafemeister, C. and R. Satija, *Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression*. Genome Biol, 2019. **20**(1): p. 296.
162. Mi, H., et al., *PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D183-D189.
163. Szklarczyk, D., et al., *STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets*. Nucleic Acids Res, 2019. **47**(D1): p. D607-D613.
164. Wickham, H., *ggplot2*. 2009.
165. Bonnot, T., M. Gillard, and D. Nagel, *A Simple Protocol for Informative Visualization of Enriched Gene Ontology Terms*. Bio-Protocol, 2019. **9**(22).
166. Conway, D.E. and M.A. Schwartz, *Flow-dependent cellular mechanotransduction in atherosclerosis*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 22): p. 5101-9.
167. Rosenfeld, M.E., et al., *Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(12): p. 2587-92.

168. VanderLaan, P.A., C.A. Reardon, and G.S. Getz, *Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(1): p. 12-22.
169. Pekkanen, J., et al., *Short- and long-term association of serum cholesterol with mortality. The 25-year follow-up of the Finnish cohorts of the seven countries study*. *Am J Epidemiol*, 1992. **135**(11): p. 1251-8.
170. Menotti, A., et al., *Short and long term association of a single serum cholesterol measurement in middle-aged men in prediction of fatal coronary and other cardiovascular events: a cross-cultural comparison through Europe*. *Eur J Epidemiol*, 2005. **20**(7): p. 597-604.
171. Menotti, A., et al., *Forty-year mortality from cardiovascular diseases and all causes of death in the US Railroad cohort of the Seven Countries Study*. *Eur J Epidemiol*, 2004. **19**(5): p. 417-24.
172. Adiguzel, E., et al., *Collagens in the progression and complications of atherosclerosis*. *Vasc Med*, 2009. **14**(1): p. 73-89.
173. Finn, A.V., et al., *Concept of vulnerable/unstable plaque*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(7): p. 1282-92.
174. Durgin, B.G., et al., *Smooth muscle cell-specific deletion of Col15a1 unexpectedly leads to impaired development of advanced atherosclerotic lesions*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017. **312**(5): p. H943-H958.
175. Hocking, A.M., T. Shinomura, and D.J. McQuillan, *Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix*. *Matrix Biol*, 1998. **17**(1): p. 1-19.
176. Petz, A., et al., *Cardiac Hyaluronan Synthesis Is Critically Involved in the Cardiac Macrophage Response and Promotes Healing After Ischemia Reperfusion Injury*. *Circ Res*, 2019. **124**(10): p. 1433-1447.
177. Cherepanova, O.A., et al., *Oxidized phospholipids induce type VIII collagen expression and vascular smooth muscle cell migration*. *Circ Res*, 2009. **104**(5): p. 609-18.
178. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan in tissue injury and repair*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. **23**: p. 435-61.
179. Wight, T.N. and M.J. Merrilees, *Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican*. *Circ Res*, 2004. **94**(9): p. 1158-67.
180. Grandoch, M., et al., *Novel effects of adenosine receptors on pericellular hyaluronan matrix: implications for human smooth muscle cell phenotype and interactions with monocytes during atherosclerosis*. *Basic Res Cardiol*, 2013. **108**(2): p. 340.
181. Everett, B.M., et al., *Rationale and design of the Cardiovascular Inflammation Reduction Trial: a test of the inflammatory hypothesis of atherothrombosis*. *Am Heart J*, 2013. **166**(2): p. 199-207 e15.

182. Ridker, P.M., et al., *Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS)*. Am Heart J, 2011. **162**(4): p. 597-605.
183. Kimura, T., et al., *Vaccination to modulate atherosclerosis*. Autoimmunity, 2015. **48**(3): p. 152-60.
184. Ley, K., *2015 Russell Ross Memorial Lecture in Vascular Biology: Protective Autoimmunity in Atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. **36**(3): p. 429-38.
185. Kennedy, A.J., et al., *Mouse models of the metabolic syndrome*. Dis Model Mech, 2010. **3**(3-4): p. 156-66.
186. Plump, A.S., et al., *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells*. Cell, 1992. **71**(2): p. 343-53.
187. Gomez, D., et al., *Interleukin-1beta has atheroprotective effects in advanced atherosclerotic lesions of mice*. Nat Med, 2018. **24**(9): p. 1418-1429.
188. McCullagh, K.A. and G. Balian, *Collagen characterisation and cell transformation in human atherosclerosis*. Nature, 1975. **258**(5530): p. 73-5.
189. Lee, R.T. and P. Libby, *The unstable atheroma*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(10): p. 1859-67.
190. Rekhter, M.D., et al., *Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions*. Am J Pathol, 1993. **143**(6): p. 1634-48.
191. Libby, P., *Collagenases and cracks in the plaque*. J Clin Invest, 2013. **123**(8): p. 3201-3.
192. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
193. Chamley-Campbell, J., G.R. Campbell, and R. Ross, *The smooth muscle cell in culture*. Physiol Rev, 1979. **59**(1): p. 1-61.
194. Clement, N., et al., *Notch3 and IL-1beta exert opposing effects on a vascular smooth muscle cell inflammatory pathway in which NF-kappaB drives crosstalk*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 19): p. 3352-61.
195. Pidkovka, N.A., et al., *Oxidized phospholipids induce phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro*. Circ Res, 2007. **101**(8): p. 792-801.
196. Rong, J.X., et al., *Lysophosphatidylcholine stimulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(10): p. 1617-23.

197. Durham, A.L., et al., *Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness*. *Cardiovasc Res*, 2018. **114**(4): p. 590-600.
198. Misra, A., et al., *Integrin beta3 regulates clonality and fate of smooth muscle-derived atherosclerotic plaque cells*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 2073.
199. Dobnikar, L., et al., *Disease-relevant transcriptional signatures identified in individual smooth muscle cells from healthy mouse vessels*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 4567.
200. Allahverdian, S., et al., *Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis*. *Circulation*, 2014. **129**(15): p. 1551-9.
201. Wang, Y., et al., *Smooth Muscle Cells Contribute the Majority of Foam Cells in ApoE (Apolipoprotein E)-Deficient Mouse Atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019. **39**(5): p. 876-887.
202. Deudon, E., et al., *Growth-related production of proteoglycans and hyaluronic acid in synchronous arterial smooth muscle cells*. *Int J Biochem*, 1992. **24**(3): p. 465-70.
203. Liu, N., et al., *Hyaluronan synthase 3 overexpression promotes the growth of TSU prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(13): p. 5207-14.
204. Zhang, X., J. Chen, and S. Wang, *Serum Amyloid A Induces a Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Switch through the p38 MAPK Signaling Pathway*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 4941379.
205. Shibata, K., et al., *Lipocalin-2 exerts pro-atherosclerotic effects as evidenced by in vitro and in vivo experiments*. *Heart Vessels*, 2020. **35**(7): p. 1012-1024.
206. Meran, S., et al., *Hyaluronan facilitates transforming growth factor-beta1-dependent proliferation via CD44 and epidermal growth factor receptor interaction*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(20): p. 17618-30.

11 Originalarbeiten

Felicia Hartmann, Daniel J Gorski, Alexandra A C Newman, Susanne Homann, Anne Petz, Katherine M Owsiany, Vlad Serbulea, Yu-Qing Zhou, Rebecca A Deaton, Michelle Bendeck, Gary K Owens, Jens W Fischer. *SMC derived hyaluronan modulates vascular SMC-phenotype in murine atherosclerosis.*

Circulation Research 2021

Impact factor 2020 Journal Citation Reports (Clarivate Analytics, 2021): 17.367

Anteile der Daten aus den Abbildungen 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 38 und 39 der Dissertation sind Bestandteil in der oben genannten Originalarbeit oder dem dazugehörigen Supplement und dürfen nur nach vorheriger Genehmigung des Verlags verwendet werden. Der Eigenanteil in der oben genannten Originalarbeit bestand aus den folgenden Aspekten:

- Planung und Durchführung der überwiegenden Versuche
- Analyse der überwiegenden Daten
- Beteiligung an der Interpretation der Daten
- Erstellung und Prüfung des Manuskripts

12 Kongressbeiträge

FASEB: The Smooth Muscle Conference, 14.-19. Juli 2019, West Palm Beach, Florida

Vortrag, Titel: "Smooth muscle cell (SMC)-specific knockout of *Hyaluronan synthase 3* in Western diet-fed *Apoe*^{-/-} mice promotes SMC transition to an LGALS3⁺ extracellular matrix producing state"

Vascular Discovery: From Genes to Medicine, 05.-07. Mai 2020, Chicago, Illinois

Vortrag, Titel: "Smooth muscle cell (SMC) derived *Hyaluronan synthase 3* (*Has3*) impairs the SMC transition to an LGALS3⁺, extracellular matrix (ECM) producing state"

13 Lebenslauf

Persönliches

Name	Felicia Katharina Hartmann
Geburtsdatum	02. Juli 1990
Geburtsort	Aachen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Promotion

12/2017 - heute	Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
Doktorvater	Prof. Dr. Jens W. Fischer
Thema	„Die Untersuchung der Rolle der Hyaluronsäuresynthase 3 während des Prozesses der phänotypischen Änderung von glatten Muskelzellen im Atherosklerose-Modell “
02/2019 – 07/2019 und 11/2019 – 12/2019	Forschungsaufenthalt im Labor von Gary Owens, Ph.D., Division of Molecular Physiology and Biological Physics, University of Virginia, Charlottesville, USA

Studium

04/2012 – 09/2017	Studium der Pharmazie, Universität des Saarlandes
12/2018	Approbation zur Apothekerin

Schule

09/ 2001- 06/2009	Albertus-Magnus-Gymnasium, Sankt Ingbert
-------------------	---

Düsseldorf, den 03.11.2021

14 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Jens W. Fischer für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Betreuung dieser Arbeit danken. Die regelmäßigen und konstruktiven Gespräche haben stets neue Denkansätze und Sichtweisen ermöglicht und maßgeblich zum Erfolg dieses Projektes beigetragen. Im Rahmen des IRTG 1902, durfte ich zu einer jungen Wissenschaftlerin heranwachsen und in dieser Zeit mehrfach an internationalen Konferenzen teilnehmen und unsere Forschung präsentieren. Herzlichen Dank!

Ebenso möchte ich Frau Prof. Maria Grandoch danken, welche mich mit viel Zeit und wissenschaftlicher Erfahrung begleitet hat. Vielen lieben Dank für die konstruktive Zusammenarbeit und Unterstützung. Darüber hinaus möchte ich insbesondere Gary Owens, PhD, danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, zwei sehr lehrreiche Aufenthalte in seinem Labor an der UVA in Charlottesville, VA, USA zu verbringen. In dieser Zeit konnte ich wissenschaftlich und persönlich enorm wachsen. Herrn Prof. Axel Gödecke danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferates. Annika Zimmermann, Peggy Marra-Mann, Irmhild Tibbe, Beate Weyrauther und Kerstin Freidel gilt ein besonderer Dank. Sie waren mir im Labor stets wichtige Ansprechpartner. Ich danke auch allen Kolleginnen und Kollegen für das konstruktive Miteinander und die große Hilfsbereitschaft. Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Dr. Susanne Homann, Katja Wegener, Marco Piroth, Dr. Christian Hundhausen, Dr. Anne Petz und Aggelina Misiou, die mir zu wahren Freunden geworden sind. Auch im Owens Lab danke ich den Kollegen, insbesondere Alex Newman, Becca Deaton, Katie Owsiany und Vlad Serbulea für ihr alle Zeit offenes Ohr und ihre Unterstützung. Ein Dankeschön auch an die vielen weiteren Kooperationspartner. Sie alle haben dazu beigetragen, dieses Projekt erfolgreich umzusetzen.

Einen herzlichen Dank auch an Dr. Sandra Berger, Janett Schindler, Petra Pieres und Ramona Quednau für die organisatorische Unterstützung in allen Belangen. Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie. Ich danke euch von Herzen für euren Rückhalt, eure Unterstützung und euren bedingungslosen Beistand.

15 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgelegt habe.

Düsseldorf, den 03.11.2021

Felicia Hartmann