

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
Klinik der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Steffen Massberg

# Der CCL2 abhängige Einfluss von glatten Gefäßmuskelzellen auf Makrophagen und die vaskuläre Inflammation bei Atherosklerose

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Christoph Gold

aus  
Frankfurt am Main

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Konstantin Stark
	Prof. Dr. Andreas Schober
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Oliver Söhnlein
	Prof. Dr. Jürgen Bernhagen
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Kami Pekayvaz
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	22.06.2023

## Eidesstattliche Versicherung

Gold, Christoph

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Der CCL2 abhängige Einfluss von glatten Gefäßmuskelzellen auf Makrophagen und die vaskuläre Inflammation bei Atherosklerose“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Christoph Gold, München den 26.06.2023



**Meiner Familie und meinen Freunden**



<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Atherosklerose: Eine chronisch entzündliche Erkrankung der Gefäßwand .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Konzept der Atherogenese und der Inflammation .....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Endotheliale Dysfunktion und die Ablagerung von Lipoproteinen im subendothelialen Kompartiment .....	4
1.2.2. Die wichtige Rolle von Makrophagen in der Atherogenese .....	6
1.2.3. Zytokine, Chemokine und die Rolle von CCL2 in der Atherogenese.....	14
1.2.4. Die Vielseitigkeit von glatten Muskelzellen in der Atherogenese .....	22
<b>2. ZUSAMMENFASSUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>30</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Versuchstiere.....</b>	<b>32</b>
3.1.1. Mauslinien .....	32
3.1.2. Zucht der Mauslinien .....	34
3.1.3. Kennzeichnung der Mäuse und Genotypisierung.....	35
3.1.4. Zucht und Haltung der Tiere im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung .....	35
3.1.5. Haltung der Tiere im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin .....	35
3.1.6. Verarbeitung von Tamoxifen zur intraperitonealen Injektion .....	36
3.1.7. Induktion der Cre-Rekombinase mit Tamoxifen und Beginn einer cholesterinhaltigen Diät („western type diet“) .....	36
<b>3.2. Eingriffe an der Maus.....</b>	<b>36</b>
3.2.1. Narkose .....	36
3.2.2. Gewichtsbestimmung von Maus und Organen .....	37
3.2.3. Intrakardiale Blutentnahme und Euthanasie .....	37
3.2.4. Entnahme der Organe.....	37
<b>3.3. Blutanalysen.....</b>	<b>38</b>
3.3.1. Bestimmung der Leukozytenpopulationen und Plasmaseparation.....	38
3.3.2. Durchflusszytometrische Bestimmung der Leukozyten-Subpopulationen in Milz, Knochenmark und Blut.....	38
<b>3.4. Verarbeitung der Aorten .....</b>	<b>40</b>
<b>3.5. Bulk-RNA Sequenzierung der intimalen und medialen Zellen der Aorta .....</b>	<b>42</b>
<b>3.6. Bioinformatische Analyse.....</b>	<b>42</b>
3.6.1. Analyse der bulk-RNA sequenzierten Daten .....	43
3.6.2. Datensätze von Wirka und Kollegen .....	43
3.6.3. Chemokin-Interaktom Analyse.....	43
<b>3.7. Histologische Auswertungen .....</b>	<b>44</b>
3.7.1. Verarbeitung der Organe .....	44
3.7.2. Immunfluoreszenz-Färbung für ACTA2, LGALS3, ki67 und PDGFβR .....	44
3.7.3. TUNEL-Färbung.....	46

# Inhaltsverzeichnis

---

3.7.4. Aufnahmen und Auswertungen der Immunfluoreszenz-Färbungen und der TUNEL-Färbung.....	47
3.7.5. Konfokale Aufnahmen der Läsionen von VSMC-tdT <sup>lin</sup> Cx3cr1-MΦ <sup>GFP-rep</sup> Mäusen .....	48
3.7.6. Masson-Trichrom-Färbung.....	48
3.7.7. Oil-Red-Färbung .....	49
<b>3.8. CCL2 ELISA und Cholesterin-Assay.....</b>	<b>49</b>
<b>3.9. Statistische Auswertung.....</b>	<b>49</b>
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1. VSMCs interagieren mit Makrophagen über CCL2 in der Atherosklerose .....</b>	<b>50</b>
4.1.1. Robuste Interaktionen zwischen VSMCs und deren Nachkommen mit CX3CR1 <sup>+</sup> Makrophagen in den Läsionen der VSMC-tdT <sup>lin</sup> Cx3cr1-MΦ <sup>GFP-rep</sup> Mäuse .....	50
4.1.2. VSMCs exprimieren CCL2 in der Atherosklerose und können über die CCL2-CCR2 Achse mit Makrophagen kommunizieren .....	52
<b>4.2. Die Expression von CCL2 in VSMCs ist relevant für die Positionierung der Makrophagen in den Läsionen .....</b>	<b>55</b>
4.2.1. Der genetische Knockout von CCL2 in VSMCs hat in den Läsionen auf Ebene der BCA eine Abnahme von Makrophagen an der Plaque-Oberfläche zur Folge.....	56
4.2.2. Läsionen von Ccl2 <sup>SMCA/Δ</sup> Mäusen zeigen eine unterschiedliche Verteilung der Makrophagen mit einer Akkumulation der Makrophagen im Plaque-Inneren .....	58
<b>4.3. Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Zunahme der Apoptose und Nekrose in fortgeschrittenen Läsionen.....</b>	<b>60</b>
4.3.1. Zunahme der Apoptose bei unverändertem Proliferationsverhalten der Makrophagen in Ccl2 <sup>SMCA/Δ</sup> Tieren .....	62
4.3.2. Zunahme des nekrotischen Kerns in den Läsionen von Ccl2 <sup>SMCA/Δ</sup> Tieren .....	64
<b>4.4. Der genetische Knockout von CCL2 führt zu einer Exazerbation der lokalen Inflammation in den Gefäßwänden.....</b>	<b>65</b>
4.4.1. Zunahme der atherosklerotischen Krankheitslast in Ccl2 <sup>SMCA/Δ</sup> Tieren.....	66
4.4.2. Verminderte Plaque-Stabilität durch Verlust der Expression von Ccl2 in VSCMs .....	67
4.4.3. Exazerbation der lokalen Inflammation in Aorten von Ccl2 <sup>SMCA/Δ</sup> Tieren .....	69
<b>4.5. Kein Nachweis systemischer Auswirkungen durch den spezifischen Knockout von CCL2 in VSMCs.....</b>	<b>70</b>
4.5.1. Keine signifikanten systemischen Auswirkungen auf den Lipid-Metabolismus durch CCL2 aus VSMCs .....	70
4.5.2. Keine signifikanten Auswirkungen auf die Verteilung der Leukozyten durch CCL2 aus VSMCs in Blut, Milz und Knochenmark .....	71
<b>5. DISKUSSION UND AUSBLICK.....</b>	<b>75</b>
<b>5.1. Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>75</b>
5.1.1. Intensive Interaktion von Makrophagen und VSMCs über die CCL2-CCR2 Achse in Atherosklerose .....	75
5.1.2. VSMCs beeinflussen die Positionierung von Makrophagen im Plaque über CCL2 .....	77
5.1.3. Kennzeichen einer Makrophagen-Dysfunktion in den Läsionen der Ccl2 <sup>SMCA/Δ</sup> Mäuse .....	80



# Inhaltsverzeichnis

---

5.1.4. Exazerbation der Atherosklerose mit Zunahme der lokalen Inflammation und der Plaque-Größe sowie Abnahme der Plaque-Stabilität in Ccl2 <sup>SMCA/Δ</sup> Tieren .....	81
5.1.5. Direkter Einfluss auf die Funktionalität von Makrophagen durch CCL2 aus VSMCs .....	82
<b>5.2. Ausblick.....</b>	<b>84</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>85</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>87</b>
<b>8. DANKSAGUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>9. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>92</b>
<b>11. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>93</b>
<b>12. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>96</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Atherosklerose: Eine chronisch entzündliche Erkrankung der Gefäßwand

Die Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der arteriellen Gefäßwand, bei der es charakteristisch zu einer wachsenden Läsion mit der Einengung des Lumens arterieller Gefäße kommt [1]. Klinisch verläuft die Atherosklerose über Jahre stumm. Häufig manifestiert sich die Erkrankung erst im Rahmen eines akuten Ereignisses, welches zum Großteil als Folge einer Ruptur der Läsionen mit konsekutivem thrombotischen Verschluss und Infarzierung im betroffenen arteriellen Stromgebiet auftritt [2].

Während die Atherosklerose lange Zeit als typische Krankheit der Industrienationen galt, sind die kardiovaskulären Erkrankungen mit ihren klinischen Konsequenzen wie beispielsweise dem Myokardinfarkt, der ischämischen Kardiomyopathie, dem Schlaganfall sowie der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit mittlerweile weltweit die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität [2]. Im Jahr 2017 starben global betrachtet über 17,8 Millionen Menschen im Zusammenhang mit einer kardiovaskulären Erkrankung. In Europa erliegen jedes Jahr 4 Millionen Menschen den Folgen einer kardiovaskulären Erkrankung. Davon erleiden 25 % einen Schlaganfall und 44 % eine ischämische Herzerkrankung. Aufgrund der wachsenden Bevölkerung sowie des demographischen Wandels ist die Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen zwischen 1990 und 2015 in Europa zudem stetig gestiegen [3]. Neben der hohen Mortalität stellt die Atherosklerose aufgrund der Folgeschäden zusätzlich eine enorme finanzielle Belastung für die jeweiligen Gesundheitssysteme dar. Ebenso führt die Morbidität zu einer bedeutsamen Abnahme der Lebensqualität der Betroffenen, weshalb der Prävention und Therapie der Erkrankung eine immense Bedeutung zukommt [4, 5].

Die Framingham Studie gilt als Meilenstein in der Identifizierung wichtiger Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und hat den Grundstein für das Konzept der heutigen Präventivmaßnahmen und Behandlungsmöglichkeiten gelegt [6]. Mittlerweile ist eine Vielzahl an Risikofaktoren bekannt. Darunter finden sich genetische Risikofaktoren, verhaltensbedingte Risikofaktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum, physische Inaktivität und ungesunde Ernährung, krankheitsbedingte Faktoren wie ein hoher Blutdruck, Diabetes

mellitus und eine Dyslipidämie, psychische Faktoren wie Stress und umweltbedingte Faktoren wie beispielsweise die zunehmende Luftverschmutzung [5, 7].

Die Kontrolle der traditionellen Risikofaktoren durch primäre und sekundäre Präventivmaßnahmen sowie innovative Therapiemöglichkeiten haben dazu geführt, dass die Mortalität in Europa über einen längeren Zeitraum deutlich gesenkt werden konnte [4]. In den aktuellen Leitlinien gehören Antihypertonika, thrombozytenaggregationshemmende und antikoagulative Medikamente sowie insbesondere Lipidsenker zu den Grundpfeilern der modernen medikamentösen Therapie der kardiovaskulären Erkrankungen [7, 8]. Dagegen spielen die zunehmende Übergewichtigkeit, häufig im Zusammenhang mit einem metabolischen Syndrom, sowie umweltbedingte Risikofaktoren wie Luftverschmutzung und Stress eine immer bedeutsamere Rolle in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen [2]. Interessanterweise ist die Abnahme der Mortalitätsrate kardiovaskulärer Erkrankungen in den letzten Jahren zunehmend langsamer geworden [4]. Sowohl die traditionellen als auch die neu auftretenden Risikofaktoren aktivieren über verschiedene Mechanismen inflammatorische Signalwege in der Gefäßwand. Die lokale Inflammation, die durch die Risikofaktoren verursacht wird, ist essenziell für die Progression sowie die Destabilisierung der Läsionen [2, 9]. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass Statine neben der lipidsenkenden Wirkung zusätzlich anti-inflammatorische Effekte aufweisen, wird die Inflammation mit den aktuell verfügbaren Medikamenten nicht ausreichend adressiert [8, 10]. Daher ist die gezielte anti-inflammatorische Therapie ein vielversprechender Therapieansatz [9].

So konnte in der CANTOS Studie im Jahr 2017 erstmalig das Konzept der Inflammation in der humanen Atherosklerose bewiesen und das Potential anti-inflammatorischer Therapieansätze in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen demonstriert werden [8]. Nach einem Myokardinfarkt wurden Patienten mit einer persistierenden Inflammation (Plasmawerte des hochsensitiven C-reaktiven Proteins über 2mg/l) entweder mit Canakinumab oder mit einem Placebo behandelt. Canakinumab ist ein Antikörper gegen Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), der ursprünglich aus der anti-rheumatischen Therapie stammt. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten, die Canakinumab erhielten, nach einem Myokardinfarkt ein signifikant geringeres Risiko für ein kardiovaskuläres Rezidivereignis hatten [11]. Dieses Konzept der sekundärpräventiven anti-inflammatorischen Therapie in der akuten Phase nach einem kardiovaskulären Ereignis konnte in der darauffolgenden COLCOT-Studie bestätigt werden.

Das relative Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse nahm für Patienten, die mit einer geringen Dosis des anti-inflammatorisch wirksamen Colchicin nach erlittenem Herzinfarkt behandelt wurden, signifikant ab [12]. Im Anschluss an die COLCOT Studie konnte mit der LoDoCo2 Studie demonstriert werden, dass die anti-inflammatorische Therapie auch als präventive Maßnahme vor kardiovaskulären Ereignissen und damit zur Behandlung einer chronischen koronaren Herzerkrankung (KHK) in Betracht gezogen werden sollte. Patienten mit einer bestätigten KHK, die mit derselben Dosis Colchicin wie in der COLCOT-Studie behandelt wurden, erlitten signifikant weniger kardiovaskuläre Ereignisse als die Vergleichsgruppe [13]. Neben diesen vielversprechenden Ereignissen wurde in der CANTOS-Studie jedoch eine Zunahme fataler Infektionen bei Patienten, die Canakinumab erhielten, beobachtet [11]. In der COLCOT-Studie kam es zu einer erhöhten Rate schwerer Pneumonien, während in der LoDoCo2-Studie eine Zunahme der nicht kardiovaskulär bedingten Todesfälle bei Patienten, die Colchicin erhielten, dokumentiert wurde [12, 13]. Weiterhin zeigte sich in keiner der Studien eine Senkung der Gesamtmortalität [11-13]. Mit der CIRT-Studie konnte verdeutlicht werden, dass nicht jede Form der Immunsuppression vor kardiovaskulären Ereignissen schützt. In dieser Studie wurde Patienten mit einer Mehrgefäßerkrankung oder nach einem Herzinfarkt das Immunsuppressivum Methotrexat in niedriger Dosierung verabreicht. Während bei Patienten, die Methotrexat erhielten, ein Anstieg unerwünschter Nebenwirkungen wie erhöhte Leberwerte und verringerte Leukozytenzahlen dokumentiert wurde, zeigte sich keine Abnahme der kardiovaskulären Ereignisse im Vergleich zur Placebo-Gruppe [14].

Zusammenfassend konnte mit den genannten klinischen Studien das Konzept der Inflammation als wichtige Komponente in der humanen Atherosklerose wissenschaftlich bestätigt werden und das Potential anti-inflammatorischer Medikamente in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen unter Beweis gestellt werden. Nicht zuletzt wegen der zahlreichen unerwünschten Nebenwirkungen, die eine systemische immunmodulierende Therapie verursachen kann, sowie aufgrund der bisherigen fehlenden Senkung der Gesamtmortalität, bedarf es eines besseren Verständnisses der zugrundeliegenden inflammatorischen Mechanismen in der Atherosklerose, um in Zukunft neben den bekannten Therapieansätzen über die spezifische Inhibition einzelner inflammatorischer Signalwege das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse weiter reduzieren zu können [15].

## 1.2. Konzept der Atherogenese und der Inflammation

Die Läsionen der Atherosklerose bestehen aus verschiedenen extrazellulären Komponenten wie Lipiden und einer spezifischen extrazellulären Matrix sowie aus Immunzellen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen [16]. Der Prozess der Atherogenese ist komplex und wird intensiv in der Literatur diskutiert. Dabei konnten sich zwei führende Hypothesen etablieren [17]. Während in der „response-to-injury“ Hypothese eine dysfunktionale Endothelschicht zu Beginn der Atherogenese vorausgesetzt wird, ist die Akkumulation und Oxidation von Lipiden in der Gefäßwand in der „response-to-retention“ Hypothese unabhängig von einer endothelialen Dysfunktion das zentrale Ereignis der Atherogenese [17, 18]. Oxidiertes LDL aktiviert eine inflammatorische Kaskade, über die es im Verlauf insbesondere zur Rekrutierung von Monozyten in die wachsende Läsion sowie zur Akkumulation von glatten Muskelzellen in der Intima kommt [19].

### 1.2.1. Endotheliale Dysfunktion und die Ablagerung von Lipoproteinen im subendothelialen Kompartiment

Endothelzellen verfügen über ein äußerst dynamisches und vielfältiges Repertoire an Funktionen, die der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase dienen [19].

Zu diesen basalen Funktionen gesunder Endothelzellen gehören unter anderem die Inhibition der Blutgerinnung, die Regulation des Blutflusses und die Kontrolle der Gefäßpermeabilität [20]. Zudem sind Endothelzellen maßgeblich an der Initiierung und Regulation inflammatorischer Prozesse, insbesondere über die Rekrutierung und Diapedese von Leukozyten, beteiligt [21]. In seiner „response-to-injury“ Hypothese postulierte Ross, dass Schäden am Endothel (injury) maßgeblich zur Entwicklung atherosklerotischer Läsionen beitragen (response) [18]. So finden sich an Prädilektionsstellen für atherosklerotische Läsionen dysfunktionale Endothelzellen mit einem pro-inflammatorischen und prothrombotischen Phänotyp sowie mit einer gestörten Permeabilität [19].

Die Dysbalance endothelialer vasokonstriktiver und vasodilatierender Mediatoren ist als wesentliches Merkmal einer endothelialen Dysfunktion allgemein anerkannt [20, 22]. Der wichtigste vasodilatierende Faktor endothelialen Ursprungs ist Stickstoffmonoxid (NO), welcher durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) gebildet wird [20]. Neben der Vasodilatation inhibiert NO zudem die Plättchen- und Leukozytenadhäsion, die Leukozyteninfiltration sowie die Proliferation glatter Muskelzellen. Außerdem trägt NO über regulatorische Mechanismen entscheidend zu einem Gleichgewicht der endothelial

gebildeten vasodilatierenden und vaskonstruktiven Mediatoren bei [20, 22, 23]. Ist die Bildung von NO im Rahmen der endothelialen Dysfunktion beeinträchtigt, kommt es im Gegenzug zu proatherogenen Ereignissen [20, 22, 24].

Eine Vielzahl von anerkannten kardiovaskulären Faktoren verringert die Bioverfügbarkeit von NO [25, 26]. Als wichtiger endogener Inhibitor der eNOS konnte „asymmetric dimethylarginine“ (ADMA) identifiziert werden [27]. Bemerkenswerterweise scheinen Erkrankungen und kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonie [28, 29], Diabetes mellitus [30, 31] und Rauchen [22] über eine gesteigerte Expression von ADMA und von „reactive oxygen species“ (ROS) zu einer verringerten Bildung von NO zu führen [32, 33]. Eine endotheliale Dysfunktion sowie eine erhöhte Permeabilität des Endothels führen im Verlauf zur vermehrten subendothelialen Akkumulation von Lipoproteinen [34, 35].

Mit der Ablagerung von Lipoproteinen im subendothelialen Kompartiment wird die konsekutive inflammatorische Reaktion im Rahmen der Atherogenese eingeleitet [36, 37]. Neben der erhöhten Permeabilität der Endothelbarriere ist dieser Prozess insbesondere abhängig von der Plasmakonzentration der Apolipoprotein-B beinhaltenden Lipoproteine [38].

Im subendothelialen Kompartiment werden Lipoproteine durch die Bindung zellgebundener und frei löslicher Proteoglykane der extrazellulären Matrix zurückgehalten, welche durch glatte Muskelzellen, Makrophagen und Endothelzellen gebildet werden [39, 40]. Dies hat zur Folge, dass die Lipoproteine vermehrt Oxidantien, Lipasen und Proteasen ausgesetzt sind, welche diese modifizieren und insbesondere oxidieren können [41]. Die Blockade dieser Bindung von Lipoproteinen führte in tierexperimentellen Studien zu atheroprotektiven Effekten [42].

Oxidiertes LDL (oxLDL) ist eine der zentralen Ursachen für die Entstehung einer chronischen Entzündung in den Gefäßwänden und damit entscheidend an der Atherogenese beteiligt [35, 43-45]. Die oxidationsspezifischen Epitope von oxLDL repräsentieren dabei sogenannte „damage associated molecular patterns“ (DAMPs), die wiederum von zellgebundenen und löslichen „pattern recognition receptors“ (PRRs) wie beispielsweise Scavenger Rezeptoren (insbesondere CD36 und scavenger receptor A (SR-A)), toll-like Rezeptoren (TLR) und Antikörpern erkannt werden [43]. Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Zellen des

Immunsystems exprimieren diese Rezeptoren und sind damit in der Lage, nach Kontakt mit oxLDL die inflammatorische Reaktion zu potenzieren [43, 46].

Bemerkenswerterweise finden sich Modifikationen von Lipoproteinen in arteriellen Proben humaner Feten noch bevor Zeichen einer Inflammation festzustellen sind [47]. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Ablagerung von Lipoproteinen zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Pathogenese der Atherosklerose stattfindet und kausal die konsekutive Inflammation initiiert [44].

### 1.2.2. Die wichtige Rolle von Makrophagen in der Atherogenese

Die zelluläre Komposition atherosklerotischer Plaques ist sehr dynamisch und unterscheidet sich nicht nur in humanen und murinen Läsionen, sondern auch hinsichtlich der verwendeten Mausmodelle [48]. Sowohl im Mausmodell als auch beim Menschen sind Makrophagen jedoch die am häufigsten vorkommenden Immunzellen im Plaque [49-52]. Dabei scheint der Anteil der Makrophagen, gemessen an der absoluten Leukozytenpopulation im Plaque, mit Fortschreiten der Atherosklerose zuzunehmen [51]. Die Sequenz an Prozessen, die letztendlich zur Akkumulation der Makrophagen im Plaque führt, sowie die Differenzierung in unterschiedliche Phänotypen und deren verschiedenen Funktionen in der Atherosklerose sind komplex, von multiplen Faktoren abhängig und teilweise noch nicht ausreichend verstanden [37, 51, 53].

#### Die Akkumulation von Makrophagen im atherosklerotischen Plaque

Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen stammen von wandständigen (residenten) Makrophagen sowie insbesondere von rekrutierten Monozyten ab [53, 54]. Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus können reife Monozyten durch zwei charakteristische, sich funktionell unterscheidende Subtypen beschrieben werden [49, 55].

Die nichtklassischen Monozyten (in der Maus  $Ly6C^{low}$  oder beim Menschen  $CD14^{dim} CD16^{+}$  Monozyten) patrouillieren in den Gefäßen entlang der endothelialen Barriere und scheinen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Homöostase von Endothelzellen zu übernehmen [49, 56]. Störungen der endothelialen Barriere führten in tierexperimentellen Studien zur Zunahme der patrouillierenden Monozyten am Endothel, was die protektive Funktion der  $Ly6C^{low}$  Monozyten unterstreicht [56]. Eine Infiltration der Läsionen scheint dabei nicht typisch für diesen Subtyp zu sein [49].

Während einer inflammatorischen Reaktion sind dagegen insbesondere die klassischen Monozyten (in der Maus Ly6C<sup>high</sup> oder beim Menschen CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> Monozyten) relevant [49, 55]. Ly6C<sup>high</sup> Monozyten infiltrieren während einer Infektion das betroffene Gewebe und differenzieren zu Makrophagen oder dendritischen Zellen, die in Abhängigkeit von Mediatoren des lokalen Mikromilieus die Inflammation fördern oder inhibieren können [55]. Die experimentell induzierte Hypercholesterinämie führt durch eine gesteigerte Proliferation von Ly6C<sup>high</sup> Monozyten im Knochenmark sowie extramedullär in der Milz zu einer Monozytose [54, 57]. Zirkulierende Ly6C<sup>high</sup> Monozyten infiltrieren die atherosklerotischen Läsionen und differenzieren im subendothelialen Kompartiment hauptsächlich zu Makrophagen [54, 58]. Die Akkumulation von Monozyten im atherosklerotischen Plaque nimmt dabei im Verlauf proportional mit dem Ausmaß der Atherosklerose zu, was zu einem stetigen Plaque-Wachstum beiträgt [59].

Durch einen „Fate-Mapping“ Ansatz konnten Ensan und Kollegen für weiteren Aufschluss über die heterogene Abstammung von Makrophagen im Plaque sorgen. So stammen murine arterielle Makrophagen unter anderem von embryonalen CX3CR1<sup>+</sup> Vorläuferzellen ab. Direkt postnatal scheinen zusätzlich zirkulierende Monozyten rekrutiert zu werden, welche zu Makrophagen differenzieren [53]. Während der so entstandene Zellpool der Makrophagen im „steady state“ hauptsächlich durch Proliferation aufrechterhalten wird, scheint die Expansion der Makrophagen im Plaque zu Beginn der Atherogenese maßgeblich durch die Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut begründet zu sein [53, 60]. Die rekrutierten Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen und verdrängen die residenten Makrophagen, deren Phänotyp sie annehmen [60]. Interessanterweise scheint im Verlauf der Atheroprogression wieder die Proliferation der lokalen Makrophagen und weniger die Rekrutierung von Monozyten für die Akkumulation von Makrophagen in der Intima relevant zu sein [61]. Passend zu diesen Ergebnissen führte die Inhibition der Makrophagen-Proliferation durch lokal administrierte Simvastatin-HDL-Nanopartikel im Mausmodell in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen zu einer signifikanten Abnahme des Makrophagen-Anteils und der Plaque-Größe [62].

Die Abfolge der Akkumulation von Makrophagen im Plaque im Mausmodell lässt sich wie folgt zusammenfassen: Hämatopoetische Stammzellen proliferieren im Knochenmark und in der Milz und führen zur Monozytose. Die Monozyten zirkulieren im Blutsystem und infiltrieren die



Gefäßwand, wo sie zu Makrophagen differenzieren. Während in frühen Plaques die Rekrutierung von Monozyten für die Progression der atherosklerotischen Plaques verantwortlich ist, scheint in fortgeschrittenen Plaques dagegen die Proliferation lokaler Makrophagen hauptsächlich dazu beizutragen [60, 61].

#### Der Phänotyp und die Heterogenität von Makrophagen

Makrophagen haben eine hohe Plastizität und können eine Vielzahl an Phänotypen annehmen, die in ihren Extremformen auf der einen Seite entweder stark pro-inflammatorisch wirken oder auf der anderen Seite wichtige anti-inflammatorische regulatorische Funktionen übernehmen [63, 64]. Dieses dichotome Konzept stammt aus *in vitro* Versuchen, in denen sich Makrophagen über verschiedene Mediatoren in einen pro-inflammatorischen M1-Phänotyp oder in einen anti-inflammatorischen M2-Phänotyp differenzieren lassen [65]. M1-Makrophagen lassen sich hauptsächlich durch Mediatoren aktivierter Th1-Zellen induzieren und übernehmen wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung der inflammatorischen Reaktion, beispielsweise im Rahmen einer Infektion [66]. So kann die chronische Aktivierung von M1-Makrophagen zu Gewebeschäden und Wundheilungsstörung beitragen [66, 67]. M2-Makrophagen, die über Produkte von Th2-Zellen aktiviert werden können, scheinen dagegen im Anschluss an die inflammatorische Reaktion hauptsächlich im Rahmen der Gewebs- und Wundheilung relevant zu sein und übernehmen damit wichtige Funktionen in der Regulation der Immunantwort [63].

*In vivo* dient diese vereinfachte Klassifikation von Makrophagen zur Orientierung in einem sehr viel komplexeren Sachverhalt [65, 67]. Die phänotypische Heterogenität von Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen scheint dabei durch verschiedene Faktoren wie den Ursprung der Makrophagen oder das Mikroumfeld beeinflusst zu werden und kann sich im Krankheitsverlauf verändern [64, 68].

Mit modernen Hochdurchsatzmethoden zur Transkriptom-Analyse auf Einzelzellebene (single-cell RNA sequencing (scRNA seq)) konnten drei charakteristische Makrophagen-Populationen in der Atherosklerose von LDLR<sup>-/-</sup> und ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen identifiziert werden [51]:

1. Resident-like Makrophagen
2. TREM2<sup>hi</sup> Makrophagen
3. Inflammatorische Makrophagen

Resident-like Makrophagen exprimieren Gene, die eine Assoziation zu wandständigen „residenten“ Makrophagen und gleichzeitig zu M2-Makrophagen zulassen, weshalb von einem anti-inflammatorischen Phänotyp ausgegangen werden kann [51, 69]. Diese Zellen finden sich sowohl in gesunden als auch in atherosklerotisch veränderten Aorten, insbesondere in der Adventitia [51]. Dagegen finden sich TREM2<sup>hi</sup> Makrophagen genauso wie inflammatorische Makrophagen ausschließlich im Plaque und nicht in der gesunden Aortenwand [51]. TREM2<sup>hi</sup> Makrophagen exprimieren Gene, die typischerweise von Schaumzellen exprimiert werden [52, 69]. Weiterhin haben TREM2<sup>hi</sup> Makrophagen einen anti-inflammatorischen Phänotyp, der ebenfalls mit M2-Makrophagen assoziiert werden kann [51]. Inflammatorische Makrophagen sind die am häufigsten vorkommenden Makrophagen im Plaque und können aufgrund des Gen-Expressionprofils mit M1-Makrophagen assoziiert werden [51]. Diese Zellen scheinen entscheidend an der Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung beteiligt zu sein [51, 69].

#### Makrophagen: Protektiv oder atherogen?

Vieles deutet daraufhin, dass Makrophagen einerseits über pro-inflammatorische Kaskaden die Progression der Atherosklerose begünstigen und andererseits gleichzeitig wichtige protektive Funktionen übernehmen können, die zur Regression und Plaquestabilisierung der Atherosklerose beitragen [70, 71].

Pro-inflammatorische Makrophagen potenzieren die Entzündung dabei über die Sekretion inflammatorischer Mediatoren und führen in atherosklerotischen Läsionen charakteristischerweise zu einem hohen Anteil an nekrotischem Zelldebris im sogenannten nekrotischen Kern sowie über die Sekretion von Metalloproteasen zu einer dünnen fibrösen Kappe [71, 72]. Diese Eigenschaften wiederum sind Kennzeichen der progressiven Destabilisierung des Plaques mit zunehmend erhöhter Gefahr der Plaque-Ruptur und konsekutivem thromboembolischen Verschluss des jeweiligen Gefäßes [73].

Auf der anderen Seite sind Makrophagen über die Efferozytose, die Synthese von Kollagen und über die Sekretion anti-inflammatorischer Mediatoren ebenso entscheidend an der Regulierung der Inflammation und an der Stabilisierung der Läsionen beteiligt [70].

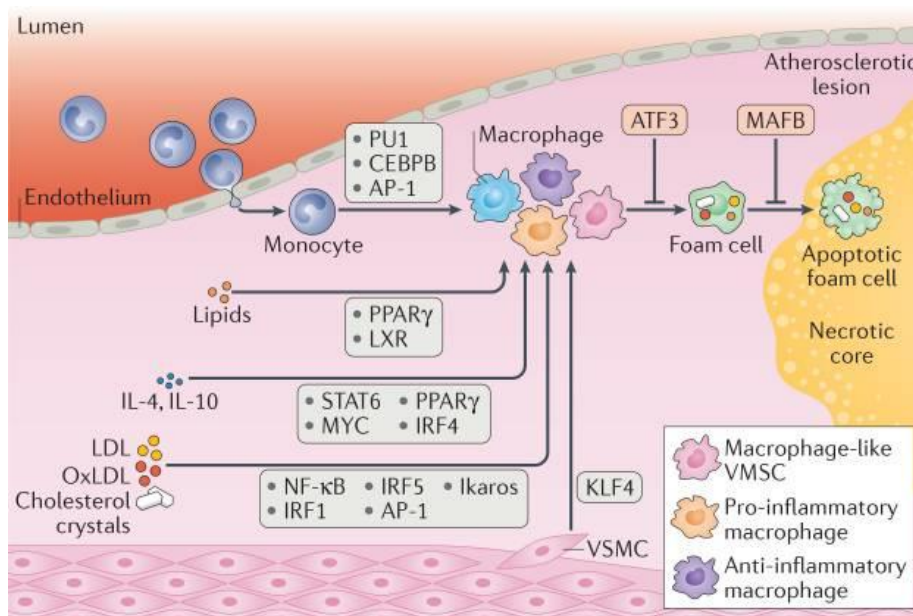
Efferozytose beschreibt die Erkennung, Aufnahme und Entfernung apoptotischer Zellen durch Makrophagen und ist ein essenzieller Prozess für die Regulierung einer entzündlichen Reaktion. Dabei wird insbesondere die Akkumulation nekrotischer Zellen verzögert [74].

Störungen der Efferozytose führen im Umkehrschluss zu einer mangelhaften Regulierung einer Entzündung. Hierbei kommt es zur Akkumulation apoptotischer Zellen im Plaque, die über die Sekretion inflammatorischer Mediatoren die Entstehung und Progression einer chronisch entzündlichen Erkrankung wie Atherosklerose fördern [75-77]. Scavenger Rezeptoren wie CD36 und SR-A auf Makrophagen führen zur Erkennung oxidations-spezifischer Epitope an der Oberfläche apoptotischer Zellen und sind damit sehr wichtig für die Efferozytose [43]. Apoptotische Zellen werden in frühen atherosklerotischen Läsionen durch Makrophagen über Efferozytose effizient entfernt [76]. Dagegen scheint die Efferozytose in fortgeschrittenen Plaques eingeschränkt zu sein, was die Akkumulation apoptotischer Makrophagen und die konsekutive Formierung eines nekrotischen Kerns zur Folge hat [78]. Passend zu diesen Beobachtungen wird eine vermehrte Apoptose von Makrophagen in frühen atherosklerotischen Läsionen mit der Abnahme der Plaque-Größe in Verbindung gebracht, während eine Zunahme der Apoptose von Makrophagen in fortgeschrittenen Läsionen mit einer Zunahme des nekrotischen Kerns und damit der Exazerbation der Atherosklerose assoziiert wird [79, 80]. Weiterhin scheint eine dysfunktionale Efferozytose zu einem gestörten Cholesterin-Metabolismus und zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp in Makrophagen zu führen [74].

Die Plaque-Progression korreliert im Mausmodell mit einem relativ erhöhten Anteil von M1-Makrophagen [81]. Konsistent dazu nimmt der Anteil von M1-Makrophagen in experimentellen Regressionsversuchen ab, während M2-Makrophagen in der Auflösung atherosklerotischer Läsionen überwiegen [82]. Überraschenderweise scheinen M2-Makrophagen dabei von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten abzustammen, welche während der Regression weiterhin rekrutiert werden und alternativ einen M2-ähnlichen Phänotyp annehmen [83]. In humanen atherosklerotischen Läsionen zeigt sich zudem eine spezifische räumliche Organisation der Makrophagen. Dabei finden sich M1-Makrophagen vor allem in der rupturgefährdeten Schulterregion, während sich M1- und M2-Makrophagen gleichermaßen in der fibrösen Kappe nachweisen lassen [84]. Allgemein muss in der zeitlichen und räumlichen Organisation von Makrophagen dennoch eine phänotypische Heterogenität angenommen werden, die über die vereinfachte Assoziation von M1 Makrophagen mit der Plaque-Progression und erhöhter Plaque-Vulnerabilität einerseits und die Assoziation von M2-Makrophagen mit der Plaque-Regression und Plaque-Stabilität andererseits hinausgeht [85].

### Die Beeinflussung des jeweiligen Makrophagen-Phänotyps durch verschiedene Faktoren

Spezifische Transkriptionsfaktoren, sogenannte „lineage-determining transcription factors“ (LDTFs), regulieren die Zelldifferenzierung der Monozyten zu Makrophagen, indem sie über komplexe epigenetische Modifizierungen spezifische Genprogramme aktivieren und für die Transkription zugänglich machen. In einem weiteren Schritt können „signal-dependent-transcription-factors“ (SDTFs) als Reaktion auf spezifische Stimuli dann dynamisch und gezielt an die durch LDTF vorbereiteten Elemente binden und die Transkription der jeweiligen Gene initiieren. So kann der Phänotyp durch das Gen-Expressionsprofil der Makrophagen dynamisch bestimmt werden [86]. Zu den Stimuli, die über Transkriptionsfaktoren Einfluss auf den Phänotyp von Makrophagen in den atherosklerotischen Läsionen nehmen, gehören insbesondere Lipide und Mediatoren wie Zytokine und Chemokine [64, 86].



Nature Reviews | Cardiology

Abbildung 1: Das Mikromilieu beeinflusst den Phänotyp von Makrophagen in Atherosklerose

In Atherosklerose stammen Makrophagen hauptsächlich von rekrutierten Monozyten sowie von residenten Makrophagen und dedifferenzierten vaskulären glatten Muskelzellen (ab hier als VSMCs bezeichnet) ab. In den Läsionen können anti-inflammatorische Makrophagen wichtige protektive Funktionen wie die Efferozytose übernehmen. Gleichzeitig führen pro-inflammatorische Makrophagen zu einer konsekutiven Exazerbation der lokalen Inflammation mit einer Zunahme der Apoptose und Nekrose und somit zu einer vermehrten Plaque-Instabilität. Das unmittelbare Mikromilieu der Makrophagen innerhalb der Läsionen beeinflusst den Phänotyp und die Funktionalität der Makrophagen über komplexe epigenetische Modifizierungen. Dazu gehören insbesondere modifizierte Lipide und Lipoproteine sowie Zytokine und Chemokine.

Aus Kuznetsova, T., et al., *Transcriptional and epigenetic regulation of macrophages in atherosclerosis*. Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(4): p. 216-228 [86]. Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Nature Reviews Cardiology, Copyright © 2019.

### Der Einfluss von oxLDL auf Makrophagen und deren Phänotyp

Makrophagen besitzen die höchste Rezeptordichte für PRRs [43]. Die Aufnahme von modifiziertem LDL durch Makrophagen im subendotheliale Kompartiment mit konsekutiver Bildung von Schaumzellen und dessen Relevanz für die Initiierung der Atherogenese werden in der Literatur intensiv diskutiert [49, 52, 87].

Goldstein und Brown konnten *in vitro* erstmalig spezifische Bindestellen an Makrophagen identifizieren, welche die Aufnahme von modifiziertem LDL in Makrophagen begünstigen [88, 89]. Im Verlauf kristallisierten sich insbesondere CD36 und SR-A als wichtige Rezeptoren für die Aufnahme von oxidiertem LDL durch Makrophagen heraus [90, 91]. Darüber hinaus gibt es jedoch eine Vielzahl weiterer Scavenger Rezeptoren, die in der Lage sind, mit oxLDL zu interagieren [92]. So führt beispielsweise die Erkennung von modifizierten Lipiden durch „Toll-like Rezeptoren“ (TLR) über das Adapterprotein Myd88 zur Translokation wichtiger Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und zur Produktion pro-inflammatorischer Chemokine und Zytokine [93-95]. Zudem haben Makrophagen die Möglichkeit, Lipoproteine unabhängig von PRRs zu internalisieren [87]. So scheint die Aufnahme von nativem nicht modifiziertem LDL durch Pinozytose (ein Prozess, der die Aufnahme von extrazellulärer Flüssigkeit beschreibt) ebenso zur Bildung von Schaumzellen beizutragen [96, 97].

In Makrophagen werden die aufgenommenen Cholesterinester der Lipoproteine lysosomal hydrolysiert, was zur Akkumulation von intrazellulärem freiem Cholesterin führt [98]. Freies Cholesterin ist in hohen Mengen zytotoxisch, pro-inflammatorisch und proatherogen [64, 98]. Zudem schädigen Cholesterinkristalle in Makrophagen das Lysosom, was wiederum die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms mit konsekutiver Bildung inflammatorischer Mediatoren zur Folge haben kann [99]. Das NLRP3-Inflammasom ist ein Multi-Proteinkomplex, dessen Zusammensetzung durch PRRs nach Bindung von DAMPs initiiert werden kann. Über spezifische Proteasen (Caspasen) können im Anschluss Mediatoren wie Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-18 aktiviert werden [100]. Um das NLRP3-Inflammasom zu aktivieren, müssen Makrophagen vorbereitet werden („priming“), was zu einer gesteigerten Expression von NLRP3 führt, welches dann in einem zweiten Schritt aktiviert werden kann [101]. Sheedy und Kollegen demonstrierten, dass oxLDL und CD36 entscheidend in der Exekutive dieser beiden

Schritte zur vollständigen Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms beitragen. Die Bindung von oxLDL durch CD36 und die konsekutive Bildung eines Heterodimers, bestehend aus TLR4/TLR6/CD36, führen zur vermehrten Expression des NLRP3-Inflammasoms. Gleichzeitig führt die Aufnahme von oxLDL durch CD36 zur Bildung intrazellulärer Cholesterinkristalle, welche in der Lage sind, das NLRP3-Inflammasom zu aktivieren [101]. Um eine Exazerbation der inflammatorischen Reaktion zu verhindern, muss das freie intrazelluläre Cholesterin in Makrophagen deshalb weiter prozessiert werden [64].

In Makrophagen kann freies Cholesterin über Efflux-Mechanismen aus der Zelle transportiert werden oder zum Schutz der Zelle erneut verestert werden, was die Bildung von Schaumzellen zur Folge hat [64, 92, 98].

Die Akkumulation von Cholesterin in Makrophagen führt zu einer vermehrten Expression von „ATP-binding cassette transporter“ (ABC Transporter) [86, 94]. ABC Transporter fördern den Efflux von Cholesterin aus Makrophagen, welches über HDL Partikel oder Apolipoprotein A1 (APOA1) aus der Gefäßwand entfernt werden kann [94, 102]. Der gestörte Efflux von freiem Cholesterin aus Makrophagen hat einen pro-inflammatorischen Effekt auf Makrophagen und führt zur Exazerbation der Atherosklerose im Mausmodell [103].

Kim und Kollegen konnten zudem demonstrieren, dass lipidbeladene Makrophagen weniger inflammatorische Gene exprimieren, während wichtige Gene mit Beteiligung an der Efferozytose und anderen plaquestabilisierenden Prozessen vermehrt exprimiert werden. Dagegen zeigten insbesondere Makrophagen, die nicht Schaumzellen zugeordnet werden konnten, einen inflammatorischen Phänotyp. Somit scheinen Schaumzellen, die LDL aufnehmen und prozessieren, im teilweisen Widerspruch zu vorherigen Studien eine wichtige protektive Funktion zu übernehmen [52]. Ein ausgeglichener Metabolismus von Cholesterin in Makrophagen ist somit wichtig für die Integrität der Makrophagen. Eine Imbalance in der Aufnahme, der intrazellulären Prozessierung und dem Efflux von Lipiden begünstigt dagegen im Verlauf die Progression der Atherosklerose [64].

Zusammengefasst sind Makrophagen die häufigsten Immunzellen in atherosklerotischen Läsionen [49-52]. Zu Beginn der Atherogenese kommt es insbesondere durch die Rekrutierung von Monozyten zur Expansion der Makrophagen im Plaque, in fortgeschrittenen Läsionen proliferieren Makrophagen dagegen vermehrt [60, 61]. Funktionell können Makrophagen

über die Sekretion inflammatorischer Mediatoren und Metalloproteasen zur Instabilität der atherosklerotischen Läsionen führen. Gleichzeitig sind Makrophagen aber auch an einer Vielzahl wichtiger anti-inflammatorischer Prozesse wie der Efferozytose beteiligt [70, 71]. Das unmittelbare Mikromilieu der Makrophagen scheint den Phänotyp und die Funktionalität der Makrophagen dabei maßgeblich beeinflussen zu können. Neben modifizierten Lipiden sind dabei hauptsächlich Zytokine und Chemokine relevant [64].

### 1.2.3. Zytokine, Chemokine und die Rolle von CCL2 in der Atherogenese

Eine Vielzahl an Zytokinen und Chemokinen mit entscheidender Beteiligung an der Atherogenese konnte bereits identifiziert werden [64]. Initial orchestrieren Zytokine und Chemokine zusammen mit Adhäsionsmolekülen die Leukozyteninfiltration, welche kaskadenartig abläuft [1, 104]. Die Kaskade beginnt mit dem Abbremsen der Leukozyten durch Adhäsionsmoleküle (tethering) und setzt sich mit dem Rollen der Leukozyten am Endothel fort, was über Selektine vermittelt wird (rolling). Im nächsten Schritt aktivieren Chemokine die Leukozyten, welche über Integrine fest am Endothel haften bleiben (arrest), woraufhin die Leukozyten in das subendotheliale Kompartiment übertreten können (transmigration) [105, 106]. Chemokine können von verschiedenen Zellen wie aktivierten Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Leukozyten und Plättchen sezerniert werden [107]. In der Atherosklerose können Chemokine über die chemotaktische und aktivierende Wirkung auf Leukozyten hinaus das Überleben von Monozyten, die Schaumzellformation, die Proliferation von glatten Muskelzellen sowie die Bildung von Thromben beeinflussen [108, 109].

Anhand der Konfiguration der N-terminalen Cystein-Aminosäure lassen sich Chemokine in jeweils vier Untergruppen unterteilen [110]. Chemokine der CC Untergruppe sind durch N-terminale Cysteinreste gekennzeichnet, die direkt aneinander liegen. Dagegen werden die N-terminalen Cysteinreste der Chemokine der Untergruppe CXC durch eine Aminosäure und die Cysteine der Chemokine der CX3C Untergruppe durch drei Aminosäuren getrennt. Statt der üblichen vier Cysteinreste haben C Chemokine ausschließlich zwei konservierte Cystein-Aminosäuren [111]. Chemokine binden an die korrespondierenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und können so wichtige intrazelluläre Signalwege initiieren [104].

Das System der Chemokine zeichnet sich dabei durch seine umfassende Vielseitigkeit aus: Verschiedene Chemokine können über die zellspezifisch exprimierten Chemokin-Rezeptoren

gezielt auf Leukozyten einwirken. Weiterhin tragen während der Atherogenese, in Abhängigkeit von der Lokalisation und des jeweiligen zeitlichen Stadiums, unterschiedliche Chemokine zur Organisation der atherosklerotischen Läsion bei. Nicht zuletzt können Chemokine zudem untereinander interagieren und integrativ eine wichtige Funktion übernehmen [112].

Während der gesamten Atherogenese und Atheroprogression sind Chemokine verantwortlich für die Mobilisierung von Immunzellen aus dem Knochenmark, deren Rekrutierung zu den atherosklerotischen Läsionen, die Infiltration in das subendotheliale Kompartiment, sowie die Differenzierung, Phänotypisierung und das Überleben der Immunzellen. Damit sind Chemokine an den entscheidenden Abläufen sowohl an der Initiierung als auch an der Progression der Atherosklerose maßgeblich beteiligt [1, 107, 109, 113, 114]. Schlussfolgernd kann durch die gezielte Antagonisierung einzelner Chemokine die Akkumulation und Funktion von Leukozyten differentiell auf verschiedenen Ebenen und über unterschiedliche Mechanismen reguliert werden [114]. Deshalb stehen Chemokine als potenzieller Angriffspunkt einer anti-inflammatorischen Therapie, im Sinne einer gezielten pharmakologischen Antagonisierung zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen, im Zentrum der Aufmerksamkeit vieler klinischen Studien [109].

#### Die Relevanz der CCL2-CCR2 Achse in der Atherosklerose

Das erste Chemokin, dessen Relevanz für die Atherosklerose beschrieben wurde, war CCL2 [115, 116]. Aufgrund der stark chemotaktischen Wirkung auf Monozyten, ist CCL2 auch unter der Bezeichnung „Monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP1) bekannt geworden [117]. CCL2 wirkt hauptsächlich über den Rezeptor CCR2, welcher umgekehrt neben CCL2 auch für weitere Chemokine wie CCL7 als Rezeptor dienen kann [118, 119]. Darüber hinaus kann CCL2 mit weiteren Chemokinrezeptoren wie CCR1 und CCR4 interagieren sowie an atypische Chemokinrezeptoren und an Proteoglykane binden [120, 121]. Vaskuläre Zellen wie Endothelzellen oder glatte Muskelzellen sowie Makrophagen sind in der Lage, auf verschiedene Stimuli vermehrt CCL2 zu bilden [122-125]. Auch modifiziertes LDL führt in vaskulären Zellen, vor allem in Endothelzellen, zu einer vermehrten Expression von CCL2. Deshalb wird eine wichtige Rolle von CCL2 in der Mobilisierung und Rekrutierung von Leukozyten, darunter insbesondere von Monozyten, zu atherosklerotischen Läsionen vermutet [126, 127].



### Mobilisierung von Leukozyten durch CCL2

Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten werden sowohl im steady state als auch während einer inflammatorischen Reaktion über CCR2 aus dem Knochenmark mobilisiert [128, 129]. Die kurzfristige Applikation von CCL2 führt bei C57Bl/6 Mäusen zu einem Anstieg der Monozyten-Anzahl sowohl im Knochenmark als auch im Blut. Die genetische Deletion von CCL2 in ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen hatte dagegen eine Abnahme von Ly6C<sup>hi</sup> und Ly6C<sup>low</sup> Monozyten zur Folge [130]. Die gezielte Inhibition der CCL2 Expression in knochenmarksspezifischen Endothelzellen durch in Nanopartikel verpackte „short interfering RNA“ (siRNA) führte zu einer Abnahme der Freisetzung von Vorläuferzellen und Leukozyten aus dem Knochenmark [131]. Diese Studien konnten die Bedeutsamkeit der CCL2-CCR2 Achse sowohl für die Homöostase von Monozyten im steady-state als auch für die Mobilisierung von Leukozyten aus dem Knochenmark im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion demonstrieren.

### Rekrutierung und Infiltration von Leukozyten durch CCL2

Auch bei der Infiltration der Leukozyten aus dem Blutkreislauf in das subendotheliale Kompartiment scheint die CCL2-CCR2 Achse wichtig zu sein. Während Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten über die Rezeptoren CCR2, CX3CR1 und CCR5 in die Läsionen rekrutiert werden, scheint bei der deutlich seltener stattfindenden Infiltration von Ly6C<sup>low</sup> Monozyten CCR5 eine entscheidende Rolle zu spielen [58]. Interessanterweise konnte in experimentellen Regressionsversuchen der Atherosklerose gezeigt werden, dass die Rekrutierung von Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten ebenso über den CCR2 Rezeptor stattfindet, bevor diese zu Makrophagen differenzieren und einen M2 ähnlichen Phänotyp annehmen [83]. Die spezifische pharmakologische Inhibition der CCR2 Expression in Leukozyten durch siRNA führte im Mausmodell in fortgeschrittenen Läsionen zu einer Abnahme des Makrophagen- und Monozytenanteils im Plaque [132]. Ebenso konnte in einem ähnlichen Ansatz durch die gezielte Inhibition von CCR2 nach Herzinfarkten in ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen eine reduzierte Infiltration von Monozyten in das infarzierte Areal und eine bessere Heilung der infarzierten Herzen beobachtet werden [133]. Neben Monozyten können auch Neutrophile über CCR2 zusammen mit CCR1, CCR5 und CXCR2 die Gefäßwand infiltrieren [134].

CCL2 sorgt bei der Extravasation von Leukozyten insbesondere für eine adäquate Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen [135, 136]. Die Adhäsion von Monozyten am Endothel atherosklerotischer Läsionen scheint in einem zirkadianen Rhythmus stattzufinden. Dieser

wird durch die rhythmische Sekretion von CCL2 durch myeloide Zellen und die konsekutive Ablagerung von CCL2 am Endothel in der Makrozirkulation aufrechterhalten [137]. Dagegen wird die unmittelbare Rolle von CCR2 bei der Transmigration der Monozyten aus dem Blutkreislauf in das subendotheliale Kompartiment kontrovers diskutiert [128, 138]. Unter anderem konnte demonstriert werden, dass die Rezeptoren CCR1, CCR5 und deren Ligand CCL5 bei der Transmigration von Monozyten in frühen Stadien der Atherosklerose beteiligt sind [138].

Unabhängig davon, über welche Mechanismen und auf welchen Ebenen die CCL2-CCR2 Achse an der Akkumulation von Immunzellen in der Atherogenese beteiligt ist, konnte die Relevanz von CCL2 und CCR2 in der Atherosklerose in multiplen tierexperimentellen Studien unter Beweis gestellt werden. So führt der vollständige genetische Knockout von CCR2 oder CCL2 sowie die pharmakologische Inhibition der CCL2-CCR2 Achse in verschiedenen Mausmodellen zu einem geringeren Wachstum des Plaques, einer verminderten Rekrutierung von CCR2 positiven Ly6C<sup>hi</sup> Monozyten und zu stabileren Plaque-Eigenschaften [116, 130, 132, 137, 139-141]. Die kombinierte Hemmung von CCL2, CX3CR1 und CCR5 führte in hyperlipidämischen ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer fast vollständigen Inhibition der Atherosklerose. Es konnte gezeigt werden, dass die Größe der Plaques dabei mit der Anzahl zirkulierender Monozyten korrelierte [130].

#### Relevanz von CCL2 in der humanen Atherosklerose

Auch im Menschen wird eine entscheidende Beteiligung von CCL2 in der Genese und Progression atherosklerotischer Läsionen vermutet. Dabei besteht eine positive Korrelation zwischen erhöhten Plasmakonzentrationen von CCL2 und dem Risiko für einen Schlaganfall sowie für eine koronare Herzerkrankung [142, 143]. In humanen Gefäßen mit Atherosklerose konnte eine erhöhte Expression von CCL2 festgestellt werden. Dabei scheint CCL2 besonders in Bereichen, in denen ein hoher Anteil an Makrophagen zu finden ist, sowie in thrombotischen Auflagerungen vermehrt vorhanden zu sein [125]. Im Einklang mit diesen Erkenntnissen konnte eine Korrelation zwischen histopathologischen Kennzeichen einer vermehrten Plaque-Vulnerabilität und hohen Konzentrationen von CCL2 in diesen Läsionen demonstriert werden [144].

In einem klinischen Ansatz wurde der Einfluss einer gezielten CCL2-Inhibition mit dem Inhibitor „Bindarit“ auf die Restenosierung von Stents in Patienten nach einer perkutanen Koronarintervention (PCI) untersucht. Dabei wurde der primäre Endpunkt, bestehend aus einer Abnahme des „in-segment late loss“, nicht erreicht. Die Bestimmung des „in-segment late loss“ dient der Quantifizierung einer Restenose nach Stent-Implantation. Ebenso konnte keine signifikante Abnahme schwerer kardialer Ereignisse (MACE) durch die Inhibition von CCL2 beobachtet werden [145]. Aufgrund der vermuteten Involvierung der CCL2-CCR2 Achse in der Pathogenese multipler weiterer inflammatorischer Erkrankungen (insbesondere Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises) gibt es eine Vielzahl an klinischen Studien, die eine gezielte Hemmung dieser Achse untersucht haben [146]. Keine dieser klinischen Studien konnte jedoch einen eindeutigen protektiven Effekt der systemischen Hemmung von CCL2 oder CCR2 auf die jeweiligen Erkrankungen demonstrieren [108, 120, 121]. Die allgemeine Komplexität von Chemokinen mit kontextabhängiger, teilweise gegensätzlicher Funktion eines einzelnen Chemokins, liefert einen möglichen Erklärungsansatz für diese negativen Studienergebnisse [147]. CCL2 scheint eine Vielzahl weiterer Funktionen von Immunzellen beeinflussen zu können, die weit über die chemotaktische Wirkung auf diese hinauszugehen scheinen und teilweise noch nicht ausreichend verstanden sind [120].

#### CCL2 beeinflusst das Proliferations- und Apoptoseverhalten, das Transkriptom und die Oberflächenzusammensetzung sowie die Funktionalität von Immunzellen

Neben seiner wichtigen chemotaktischen Wirkung auf Leukozyten scheint CCL2 über multiple Mechanismen die Homöostase von Immunzellen beeinflussen zu können. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass CCL2 nicht ausschließlich über die Rekrutierung zu einer Akkumulation von Immunzellen in inflammatorischen Herden führt, sondern auch über den Einfluss auf das Überleben sowie die Proliferation myeloider Zellen [120]. *In vitro* führte die Applikation von CCL2 in humanen CD11b<sup>+</sup> PBMCs zu einer vermehrten Expression anti-apoptotischer Proteine [148]. Dagegen führte die Inhibition von CCL2 *in vitro* zur vermehrten Apoptose muriner Makrophagen [149]. *In vivo* konnte ein stimulierender Effekt von CCL2 auf die Proliferation von Makrophagen im Fettgewebe demonstriert werden [150].

Ebenso scheint CCL2 den Phänotyp und die Funktionalität insbesondere von Makrophagen beeinflussen zu können. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte ein kausaler Zusammenhang

zwischen CCL2 und der Polarisierung von Makrophagen beobachtet werden. Interessanterweise scheint CCL2 dabei in Abhängigkeit des jeweiligen Krankheits- und Mausmodells sowohl einen inflammatorischen M1-Phänotyp als auch einen anti-inflammatorischen M2-Phänotyp von Makrophagen induzieren zu können [120].

*In vivo* schien CCL2 in Makrophagen aus dem Fettgewebe von Mäusen, welche eine fettreiche Ernährung erhielten, einen pro-inflammatorischen M1-Phänotyp zu induzieren [151]. Sierra-Filardi und Kollegen zeigten dagegen in mehreren Ansätzen anti-inflammatorische Effekte von CCL2 sowohl auf humane als auch auf murine Makrophagen. Zunächst demonstrierten die Autoren eine erhöhte Genexpression von CCL2 in humanen M-CSF polarisierten anti-inflammatorischen M2-Makrophagen im Vergleich zu GM-CSF polarisierten inflammatorischen M1-Makrophagen, welche im Kontrast dazu eine erhöhte CCR2 Expression aufwiesen. Im Anschluss zeigten die Autoren, dass die Inhibition von CCL2 während der Polarisierung von CCR2<sup>+</sup> Monozyten mit M-CSF zu einem veränderten Genexpressionsprofil mit hochregulierten inflammatorischen Zytokinen und einem M1-typischen Genexpressionsprofil führt. Der genetische Knockout von CCR2 führte zu einem starken quantitativen Abfall von M2-typischen peritonealen Makrophagen und GM-CSF stimulierte Makrophagen aus dem Knochenmark von CCR2<sup>-/-</sup> Mäusen reagierten auf die Stimulation mit LPS mit einer gesteigerten Expression inflammatorischer Zytokine. Diese Studie demonstrierte damit eine wichtige regulierende Wirkung der CCL2-CCR2 Achse auf Makrophagen, die dazu beitragen könnte, eine überschießende inflammatorische Reaktion zu verhindern [152].

Neben der Polarisierung von Makrophagen scheint CCL2 wichtig für die Efferozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen zu sein. *In vitro* führte die Präsenz von CCL2 zur vermehrten Efferozytose apoptotischer Zellen durch murine alveolar und peritoneal abstammende Makrophagen. Interessanterweise konnten dieses Resultat auch *in vivo* demonstriert werden. Alveolare Makrophagen aus Mäusen, die zuvor mit CCL2 behandelt worden waren, waren in der Lage, mehr apoptotische Zellen zu phagozytieren, welche intratracheal injiziert worden waren, als Mäuse, die kein CCL2 erhalten hatten [153].

Weiterhin wird eine mögliche Rolle von CCL2 im Metabolismus von Lipiden diskutiert. In LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen führte der simultane genetische Knockout von CCL2 zu höheren Plasmakonzentrationen von Cholesterol. Interessanterweise konnte dieser Effekt mit einer

fettreichen Ernährung relativiert und sogar umgekehrt werden. Dabei fand der Anstieg der Plasmakonzentration von Cholesterol schneller in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen statt, als in CCL2<sup>-/-</sup> LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, dass CCL2 kontextabhängig eine wichtige regulatorische Rolle im Lipid-Metabolismus übernehmen könnte [154].

Bei Patienten mit einer familiären Hypercholesterinämie konnte zudem eine positive Korrelation zwischen der Plasmakonzentration von LDL und der CCR2 Expression von Monozyten beobachtet werden [155]. Die aus dieser Beobachtung entstandene Hypothese einer pro-inflammatorischen Wirkung durch LDL auf Zellen des Immunsystems, im Sinne einer erhöhten CCR2-Expression humaner Monozyten, konnte durch *in vitro* Versuche teilweise bestätigt werden [156]. Funktionelle Analysen von Monozyten aus dem Blut von Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie zeigten, dass Monozyten, die viel CCR2 exprimieren, mehr Lipidtropfen aufnehmen können als Monozyten mit einer geringeren CCR2 Expression. Die medikamentöse Senkung der Plasma-Lipidspiegel führte zu einer effektiven Abnahme von CCR2 auf den Monozyten [155].

Übereinstimmend mit diesen Erkenntnissen führte CCL2 *in vitro* zusätzlich zu einer vermehrten Expression wichtiger Scavenger Rezeptoren wie CD36 auf Monozyten. Ebenso konnte eine vermehrte Inkorporation von oxLDL unter CCL2 Stimulation beobachtet werden. Damit scheint CCL2 in atherosklerotischen Läsionen maßgeblich die Entwicklung von Makrophagen zu Schaumzellen beeinflussen zu können [157].

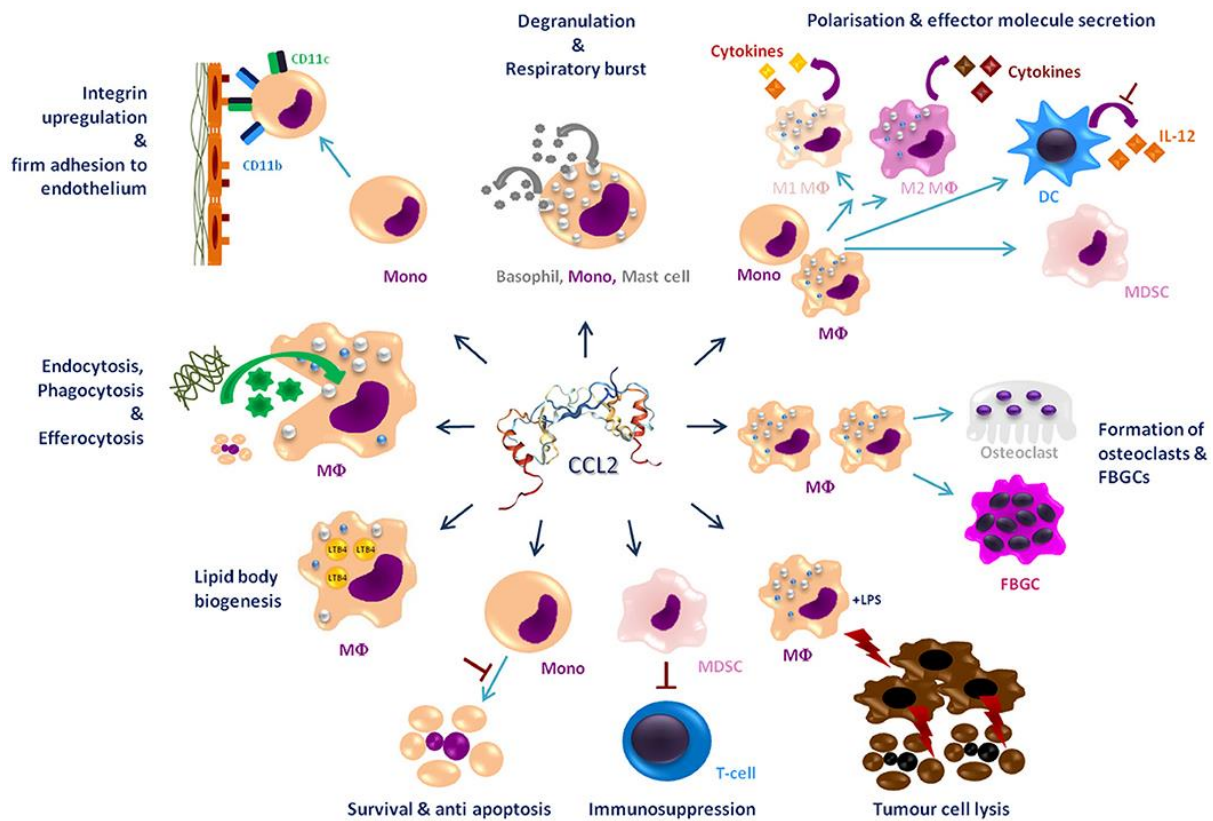


Abbildung 2: Die Vielseitigkeit von CCL2

CCL2 ist ein Chemokin, welches aufgrund seiner stark chemotaktischen Wirkung auf Monozyten auch unter der Bezeichnung „Monocyte chemotactic protein-1“ (MCP1) bekannt geworden ist. Neben seiner wichtigen Rolle in der Mobilisierung und Rekrutierung von Immunzellen scheint CCL2 darüber hinaus Einfluss auf deren Aktivierung, Polarisierung, Verhalten und Überleben während einer inflammatorischen Reaktion zu nehmen. So finden sich in der Literatur Hinweise, dass CCL2 die Aktivierung myeloider Zellen mit anschließender Sekretion inflammatorischer Mediatoren, das Apoptose- und Proliferationsverhalten von Leukozyten, die Efferozytose durch Makrophagen sowie den Lipid-Metabolismus beeinflussen kann. Ebenso scheint CCL2 die Polarisierung von Makrophagen zu regulieren und dabei kontextabhängig sowohl zu einem pro-inflammatorischen M1 als auch zu einem anti-inflammatorischen M2 Phänotyp beitragen zu können. Auch im Rahmen von Neoplasien scheint CCL2 eine wichtige Rolle zu spielen. Diese kontext- und zeitabhängigen, zellspezifischen und zum Teil dichotomen Eigenschaften von CCL2 müssen in Betracht gezogen werden, wenn die CCL2-CCR2 Achse als möglicher Angriffspunkt einer pharmakologischen Inhibition in klinischen Studien in Frage kommt.

Aus Gschwandtner, M., R. Derler, and K.S. Midwood, More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front Immunol*, 2019. 10: p. 2759 [120].

Zusammengefasst spielt CCL2 während der gesamten Atherogenese und Atheroprogression eine fundamentale Rolle. Zahlreiche Studien haben in der Vergangenheit interessante Erkenntnisse über die Mobilisierung, Rekrutierung und Infiltration von Monozyten durch die CCL2-CCR2 Achse geliefert [116, 130, 132, 137, 139-141]. Der Einfluss von CCL2 auf die Funktion und den Phänotyp myeloider Zellen während einer chronischen Entzündung ist

dagegen noch nicht ausreichend untersucht worden [120]. Klinische Studien, in denen die Hemmung der CCL2-CCR2 Achse in Erkrankungen mit inflammatorischer Komponente untersucht wurde, blieben bisher meist hinter den Erwartungen zurück. Erste *in vitro* Daten demonstrierten passend dazu, dass CCL2 neben den bekannten pro-inflammatorischen Effekten auch wichtige anti-inflammatorische Funktionen in der Organisation einer Inflammation übernehmen könnte [120]. Eine Beeinflussung von Immunzellen im subendothelialen Milieu atherosklerotischer Läsionen durch CCL2 ist anzunehmen. Neben Makrophagen scheinen insbesondere glatte Muskelzellen die Quelle für CCL2 im Plaque zu sein [144].

#### 1.2.4. Die Vielseitigkeit von glatten Muskelzellen in der Atherogenese

VSMCs bilden die Media arterieller Gefäße und ermöglichen deren Kontraktion [158]. In der Atherosklerose wurde die Funktion von VSMCs lange Zeit unterschätzt [159]. Historisch wurde insbesondere eine protektive und stabilisierende Funktion von VSMCs in der Atherosklerose vermutet [16]. Eine Ruptur der Plaque-Oberfläche ist der häufigste Grund für die Bildung eines Thrombus mit konsekutiver Ischämie im jeweiligen Stromgebiet des betroffenen Gefäßes. Diese Ruptur entsteht besonders an Lokalisationen an denen die fibröse Kappe, welche sich maßgeblich aus VSMCs selbst und den von VSMCs synthetisierten Komponenten der extrazellulären Matrix zusammensetzt, ausgedünnt ist [160]. Darüber hinaus scheinen VSMCs jedoch eine Vielzahl weiterer Funktionen in der Atherosklerose übernehmen zu können [158].

#### Die Akkumulation von VSMCs in der Atherosklerose und die klonale Proliferation

In der humanen Atherosklerose werden sogenannte „diffuse intimal thickenings“ (DIT) als der wahrscheinlichste Vorläufer atherosklerotischer Läsionen vermutet. DITs bestehen aus VSMCs und den von VSMCs sezernierten Proteoglykanen, die wiederum zur Retention von Lipoproteinen führen. Makrophagen sind nicht Bestandteil von DITs, sondern finden sich erst in „pathological intimal thickenings“ (PIT), die sich aus DITs im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion entwickeln [158]. Bemerkenswerterweise sind DITs spezifisch für humane Atherosklerose. Die meisten Wirbeltiere inklusive Mäuse entwickeln dagegen keine DITs [158, 161]. Damit sind VSMCs während der gesamten Atherogenese die überwiegende Zellpopulation in humanen Läsionen und entscheidend an der Initiierung und dem Progress der inflammatorischen Reaktion beteiligt [161].

Im Zeitverlauf der Atherogenese bestehen Plaques von ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen dagegen nach fünf Wochen hauptsächlich aus Makrophagen. Die ersten VSMCs scheinen über die Schulterregion der fibrösen Kappe nach fünf bis sechs Wochen in die Läsion zu gelangen und dabei einen kontraktilen Phänotyp zu haben [162]. Studien mit VSMC spezifischem „Lineage Tracing“ und „Multicolour Rekombinationsmarkern“ (Confetti oder Rainbow) demonstrierten eindrücklich, dass VSMCs in atherosklerotischen Läsionen einen oligoklonalen Ursprung haben [162-164]. Auch in humanen Läsionen kann eine Klonalität der VSMCs im Plaque angenommen werden [165]. Die Mechanismen, die dabei zur Dominanz einzelner VSMCs führen, sind weitestgehend unklar. Insbesondere ist ungeklärt, ob die Akkumulation klonaler VSMCs durch klonale Expansion, klonale Selektion, oder eine Kombination der Beiden geschieht [166]. In der Gefäßwand gesunder muriner Arterien zeigen VSMCs eine ausgeprägte Heterogenität mit Untergruppen, die verschiedene Genexpressionsprofile besitzen. VSMCs, die den Stammzellmarker Sca1 exprimieren, konnten dabei als besonders plastische VSMCs identifiziert werden, die sehr sensitiv auf inflammatorische Signale reagieren und möglicherweise für eine klonale Expansion „vorbereitet“ worden sind [167]. Eine weitere Möglichkeit ist, dass mehrere VSMCs klonal proliferieren können, von denen jedoch nur wenige VSMCs eine robuste klonale Selektion aufgrund von Selektionsvorteilen überstehen [168]. Dabei scheinen auch mehrere kompartimentspezifische Faktoren im Plaque die Klonalität von VSMCs im Plaque beeinflussen zu können [166].

#### Die Bedeutung der embryonalen Abstammung von VSMCs für die Atherosklerose

Um das Überleben des Embryos zu sichern und die Organogenese zu ermöglichen, findet die Vaskulogenese und Angiogenese schon sehr früh in der Embryogenese statt [169]. In multiplen Studien konnte gezeigt werden, dass VSMCs dabei von verschiedenen Vorläuferzellen abstammen. Interessanterweise haben sowohl VSMCs unterschiedlicher Gefäße als auch VSMCs unterschiedlicher Segmente desselben Gefäßes einen unterschiedlichen embryonalen Ursprung [170]. Vorläuferzellen von VSMCs in den Koronararterien stammen aus dem Proepikard ab, während sich VSMCs in der Aorta ascendens inklusive der aus dem Aortenbogen abgehenden Gefäße aus der Neuralleiste entwickeln [171, 172]. Weiterhin stammen VSMCs der Aortenwurzel von Vorläuferzellen des sekundären Herzfeldes ab. VSMCs in der Aorta descendens differenzieren sich aus Vorläuferzellen der Somiten [173, 174]. Zudem wird vermutet, dass VSMCs in der



Mikrozirkulation sowie Perizyten von denselben Progenitorzellen abstammen wie VSMCs der benachbarten Gefäße der Makrozirkulation [170].

Interessanterweise haben VSMCs in Abhängigkeit von der Lokalisation ein spezifisches Gen-Expressionsprofil, weshalb sich VSMCs aus verschiedenen Lokalisationen funktionell unterscheiden [167, 175]. Dabei zeigen VSMCs insbesondere ein abstammungsspezifisches Verhalten auf lokale Signalmoleküle. Dies könnte ursächlich für die unterschiedlich stark ausgeprägte lokale Prädisposition für Atherosklerose an spezifischen Lokalisationen im vaskulären System sein [158, 170, 176]. In humanen Gefäßen treten DITs mit anschließender Atherosklerose gehäuft an Lokalisationen wie den Koronarterien, den Karotiden, sowie in der Aorta auf. Lokale hämodynamische Unterschiede des Blutflusses wie geringere Scherkräfte sowie ein oszillierender oder turbulenter Blutfluss scheinen relevant für diese Disposition zu sein [177]. Interessanterweise konnte in Transplantationsversuchen jedoch gezeigt werden, dass die Disposition einzelner Gefäße besonders von der entwicklungsgeschichtlichen Herkunft des jeweiligen Gefäßes abhängig ist und nicht von der Lokalisation und dem dort herrschenden Blutfluss [178]. Thorakale Aortentransplantate entwickeln unabhängig davon, ob thorakal oder abdominal transplantiert, wenig Atherosklerose. Dagegen entwickeln abdominelle Aortentransplantate viel Atherosklerose, auch wenn sie in das thorakale Aortensegment transplantiert werden [179-181]. Die Herkunft der Gefäße und damit auch die Herkunft der VSMCs scheint somit relevant für die Disposition einzelner Gefäßabschnitte für vermehrte Atherosklerose zu sein, was die Bedeutung lokaler Gefäßzellen wie VSMCs in der Atherogenese unterstreicht.

#### Phänotyp und Dedifferenzierung von glatten Muskelzellen

In gesunden Gefäßen exprimieren VSMCs kontraktile Proteine wie  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) und smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC, bekannt als Myh11) [158]. Diese kontraktile VSMCs proliferieren nur selten und führen über die Sekretion von Kollagen, Proteoglykanen und Elastin zur Stabilisierung der Gefäßwand [182].

In Atherosklerose besitzen VSMCs dagegen eine ausgeprägte Plastizität, welche durch eine Dedifferenzierung der VSMCs mit abgeschwächter Expression kontraktiler Gene sowie eine vermehrte Proliferation und Migration insbesondere zu Beginn der Atherogenese gekennzeichnet ist [182-184]. Eine Studie mit VSMC spezifischem „lineage tracing“ Ansatz konnte in Mäusen mit ApoE<sup>-/-</sup> Hintergrund zeigen, dass über 80 % der von VSMCs

abstammenden Zellen im Plaque ACTA2 negativ sind und damit nicht über klassische Marker für VSMCs identifiziert werden können. Stattdessen scheinen diese dedifferenzierten VSMCs multipotent zu sein und dabei Proteine zu exprimieren, die typischerweise von Makrophagen oder mesenchymalen Stammzellen exprimiert werden [185]. So dient beispielsweise LGALS3 in multiplen Studien der Identifizierung von Makrophagen [182]. Über 35 % aller LGALS3<sup>+</sup> Zellen stammen in fortgeschrittenen Plaques von Mäusen mit ApoE<sup>-/-</sup> Hintergrund jedoch von VSMCs ab und über 60 % aller VSMCs im Plaque exprimieren LGALS3, wenn teilweise auch nur transient [185, 186].

Mit modernen Hochdurchsatzmethoden zur Transkriptom-Analyse auf Einzelzellebene (single-cell RNA sequencing) konnte in drei wichtigen Studien das Konzept der Transition von kontraktile VSMCs zu plaquespezifischen VSMCs sowohl in humaner als auch in muriner Atherosklerose gezeigt werden [186-188]. Dabei scheinen VSMCs während der Atherogenese einen transienten Phänotyp anzunehmen, der neben anderen Markern positiv für LGALS3 ist. Diese Übergangszellen exprimieren LGALS3 jedoch nicht als terminalen Marker im Sinne eines vollzogenen Phänotyp-Wechsels zu Makrophagen-ähnlichen Zellen. Stattdessen scheinen diese transienten und multipotenten „pioneer cells“ [186] oder SEM-Zellen (benannt aufgrund der Expression von Markern für Stammzellen, Endothelzellen und Makrophagen) [188] im Verlauf der Atheroprogression eine Vielzahl an Phänotypen annehmen zu können [186, 188]. Wirka und Kollegen identifizierten plaquestabilisierende Fibrozyten [187], Alencar und Kollegen beschrieben drei charakteristische Zellpopulationen mit „inflammatorischen“, „EZM-reichen“ und „osteogenetischen“ Eigenschaften [186], während Pan und Kollegen Fibrochondrozyten-ähnliche und Makrophagen-ähnliche VSMCs beobachteten [188]. Bemerkenswerterweise scheinen die Übergangszellen auch das Potential zu haben, wieder einen VSMC ähnlichen kontraktile Phänotyp anzunehmen [188]. Die von VSMCs abstammenden Zellen können damit sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Funktionen in der Atherosklerose übernehmen [183].

Arbeitsgruppen aus dem Owens-Labor konnten „Krüppel-like factor 4“ (KLF4) und „octamer-binding transcriptional factor 4“ (OCT4) als wichtige Pluripotenzfaktoren identifizieren, die in der Atheroprogression über komplementäre Gen-Programme die Dedifferenzierung der VSMCs maßgeblich regulieren und den Phänotyp der VSMCs beeinflussen [159, 185, 186]. Ein konditioneller Knockout der genkodierenden Region für KLF4 in VSMCs führte dabei zu einem eher atheroprotektiven Phänotyp der VSMCs bei gleichbleibender Anzahl der VSMCs im

Plaque. Insbesondere war eine Abnahme des pro-inflammatorischen Makrophagen-ähnlichen Phänotyps der VSMCs, eine Abnahme der Plaque-Größe sowie eine Zunahme der Plaque-Stabilität zu beobachten. Diese Daten konnten die Relevanz von KLF4 für die Dedifferenzierung der VSMCs in Richtung eines atherogenen Phänotyps zeigen [185]. Dagegen scheint OCT4 zu einem atheroprotektiven Phänotyp von VSMCs beizutragen. Mäuse mit einem VSMC-spezifischen Knockout von OCT4 entwickelten größere Läsionen mit reduzierter Anzahl von VSMCs und vulnerablen Plaque-Charakteristika. OCT4 scheint dabei insbesondere für die Migration von VSMCs in den Plaque und den Aufbau der fibrösen Kappe relevant zu sein [159]. Pan und Kollegen konnten darüber hinaus zeigen, dass über Retinsäure vermittelte Signalwege die Transition von VSMCs zu SEM-Zellen regulieren. Die Aktivierung solcher Signalwege über all-trans-Retinsäure (ATRA) hemmte die Transition von VSMCs zu SEM-Zellen, reduzierte die Atheroprogression und führte zu stabileren Läsionen [188]. Zudem konnten Wirka und Kollegen Tcf21 als wichtigen, atheroprotektiven Transkriptionsfaktor identifizieren, welcher relevant für die Differenzierung von VSMCs zu plaquestabilisierenden Fibromyozyten zu sein scheint [187]. Bemerkenswerterweise korrelieren Zielgene, die über KLF4, OCT4 und Retinsäure beeinflusst werden, sowie Tcf21 und KLF4 selbst mit dem KHK-Risiko von Patienten [186-188].

#### Die Beteiligung von VSMCs an der inflammatorischen Kaskade

VSMCs exprimieren ähnlich wie Makrophagen verschiedene PRRs, über die DAMPs im subendothelialen Kompartiment detektiert werden können, noch bevor es zur Rekrutierung von Monozyten gekommen ist. Die Inkubation von VSMCs mit oxLDL führt *in vitro* zu einer vermehrten Expression unterschiedlicher PRRs wie TLR4, SR-A und CD36 [46, 189, 190]. Dabei sind VSMCs, ähnlich wie Makrophagen, in der Lage, Lipide aufzunehmen [182]. *In vitro* führt die Aufnahme von Cholesterin durch VSMCs zu einem Wechsel des Phänotyps mit einer vermehrten Expression von LGALS3 und der Sekretion inflammatorischer Signalmoleküle, darunter insbesondere CCL2 [185]. Bemerkenswerterweise beobachteten Wang und Kollegen, dass bis zu 70 % aller Schaumzellen im Plaque von VSMCs und nicht wie vorher angenommen von Makrophagen abstammen. Dabei scheinen VSMCs im Vergleich zu Makrophagen weniger ABC-Transporter für einen suffizienten Cholesterin-Efflux aus der Zelle zu exprimieren, was die vermehrte Akkumulation von Lipiden in VSMCs zur Folge hat [191]. Ebenso konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet werden, dass VSMCs in der Lage sind, apoptotische Zellen über Efferozytose zu entfernen [192, 193].

In Bezug auf die Efferozytose und Lipidaufnahme verfügen VSMCs jedoch nicht über dieselben Kapazitäten wie klassische Monozyten und Makrophagen. Die mangelhafte Entfernung von Lipiden und apoptotischen Zellen führt indirekt zur Zunahme des nekrotischen Kerns [194]. Die Akkumulation von Lipiden in VSMCs führt darüber hinaus zur gesteigerten Apoptose und Nekrose der schaumzellartigen VSMCs, was wiederum direkt das Wachstum des nekrotischen Kerns fördert [195]. Die Relevanz der Apoptose von VSMCs in der Atherosklerose konnte *in vivo* bestätigt werden. Während die experimentell induzierte Apoptose von VSMCs in gesunden Gefäßen keine pathologischen Konsequenzen zur Folge hat, führt die experimentell induzierte Apoptose von VSMCs im Plaque zur Plaque-Instabilität und zur Exazerbation der lokalen und systemischen Inflammation [192, 193].

#### Die gegenseitige Beeinflussung von glatten Muskelzellen und Zellen des Immunsystems

Der Dialog zwischen Immunzellen und VSMCs ist sowohl für die Initiierung und Progression der Atherosklerose als auch für die Plaque-Stabilität von großer Bedeutung. In mehreren Studien konnte der Einfluss von Immunzellen auf das Verhalten von VSMCs im Plaque demonstriert werden. Dieser Einfluss auf VSMCs wird hauptsächlich über verschiedene Signalmoleküle vermittelt [194].

Über Integrin  $\beta 3$  (Itgb3) können Makrophagen die Rekrutierung von VSMCs in den Plaque regulieren. Itgb3 scheint dabei insbesondere die Migration und Proliferation verschiedener VSMCs zu hemmen [162].

Monozyten und Makrophagen können weiterhin über IL-1 $\beta$  mit VSMCs kommunizieren [194]. In fortgeschrittenen Läsionen scheint IL-1 $\beta$  wichtige protektive Mechanismen in VSMCs zu aktivieren, die zu dem Aufbau und Erhalt einer VSMCs- und kollagenreichen fibrösen Kappe führen. Die Hemmung von IL-1 $\beta$  in Mäusen mit fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen führte im Mausmodell zu einer Abnahme proliferierender kontraktile VSMCs in der fibrösen Kappe. Ebenso führte der VSMC-spezifische Knockout des korrespondierenden Rezeptors IL-1R1 zu instabileren Läsionen [196].

Neben dem Einfluss von Makrophagen auf VSMCs konnte eine direkte Interaktion zwischen VSMCs und Neutrophilen beschrieben werden. Aktivierte VSMCs können Neutrophile anlocken und die Bildung von „Neutrophil extracellular traps“ (NETs) induzieren. Dabei werden Bestandteile der DNA und Proteine des Zellkerns der Neutrophilen freigesetzt. Eines

davon, Histon H4, induziert die Lyse der Zellmembran von VSMCs und führt damit zur Instabilität von atherosklerotischen Läsionen [197].

Umgekehrt nehmen VSMCs unter anderem über die Sekretion inflammatorischer Signalmoleküle Einfluss auf die Inflammation in den Gefäßwänden [198].

Perizyten sind das mikrovaskuläre Äquivalent von VSMCs [199]. 2013 zeigten Stark und Kollegen erstmalig, dass NG2<sup>+</sup> Perizyten in der Mikrozirkulation über das Adhäsionsmolekül ICAM-1 und das atypische Chemokin MIF mit Leukozyten interagieren können und dabei entscheidend das Verhalten der Immunzellen im Rahmen einer Inflammation modifizieren. Nach der Extravasation der Immunzellen sind Perizyten, die im subendothelialen Kompartiment schon sehr früh mit DAMPs in Kontakt kommen, wichtig für die Aktivierung und das Überleben einzelner Leukozyten-Subpopulationen sowie für eine schnelle und zielgerichtete Direktion der Immunzellen zu den Entzündungsherden [200].

In der Makrozirkulation wird NG2 ebenso von VSMCs exprimiert [201]. Nach der Induktion von Atherosklerose durch eine cholesterinreiche „western type diet“ (WTD) bei NG2-Reporter Mäusen, wird CCL2 in NG2<sup>+</sup> Zellen signifikant hochreguliert. *In vivo* Experimente zeigten zudem, dass NG2<sup>+</sup> VSMCs in der Atherosklerose stark mit Immunzellen interagieren und dass diese Interaktion verstärkt in der fibrösen Kappe sowie in der Schulterregion des Plaques zu finden sind. Die spezifische genetische Ausschaltung von CCL2 in NG2<sup>+</sup> wandständigen Zellen führte zu einer signifikanten Zunahme der Atherosklerose [202]. In einer weiteren Arbeit konnte dieser atheroprotektive Einfluss durch CCL2 aus VSMCs bestätigt werden. Der heterozygote Knockout von CCL2 in Myh11<sup>+</sup> VSMCs führte zur vermehrten Akkumulation von Makrophagen in der Intima sowie zu einer Zunahme der Plaque-Größe. Interessanterweise wurde in derselben Arbeit gezeigt, dass CCL2 aus LGALS3<sup>+</sup> transienten Übergangszellen, die von VSMCs abstammen, dagegen pro-inflammatorische Auswirkungen auf die Atherogenese hat [203].

Zusammengefasst bestehen atherosklerotische Läsionen zu einem Großteil aus VSMCs, die in Abhängigkeit des jeweiligen Phänotyps sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Effekte auf die Plaque-Eigenschaften haben können [158]. Dabei verfügen VSMCs über ein vielfältiges Repertoire an PRRs, worüber VSMCs schon frühzeitig DAMPs wie oxLDL im subendothelialen Kompartiment detektieren können [46, 190, 191]. In humanen Gefäßen finden sich VSMCs in DITs, die in Atherosklerose übergehen können, noch bevor Immunzellen

rekrutiert werden. Damit sind VSMCs während der gesamten Atherogenese wesentlich an der inflammatorischen Reaktion beteiligt [158]. Im Verlauf der Atheroprogression ist die Akkumulation von VSMCs einerseits durch ein klonales Verhalten und andererseits durch einen starken Verlust kontraktiver Eigenschaften mit der Annahme verschiedener Phänotypen gekennzeichnet [182-184]. Das Verhalten von VSMCs in der Atherogenese scheint dabei von Zellen des Immunsystems entscheidend beeinflusst werden zu können [194]. Welchen genauen Einfluss VSMCs dabei umgekehrt auf das Verhalten von Immunzellen in der Atherosklerose haben, soll in dieser Arbeit mit Fokus auf die VSMC-Makrophagen-Interaktion genauer untersucht werden.

## 2. Zusammenfassung und Fragestellung

Die Atherosklerose ist mit ihren vielfältigen klinischen Erscheinungsbildern und ihren weitreichenden Konsequenzen die häufigste Ursache für die weltweite Mortalität und Morbidität. Viele der bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren führen kausal zu einer Aktivierung und Exazerbation der chronischen Inflammation in der Gefäßwand [2]. Neben der direkten Adressierung dieser Risikofaktoren durch medikamentöse und nicht-medikamentöse Maßnahmen scheint die Inhibition der Inflammation ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zu sein. Andererseits treten als Folge der systemischen immunmodulierenden Therapie eine Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen auf [9, 11-13].

Deswegen ist ein umfangreiches Verständnis der inflammatorischen Signalwege in der Atherogenese eine wesentliche und grundlegende Voraussetzung, um in der Zukunft gezielt schädliche Signalwege hemmen zu können [15].

Konzeptionell hat sich die Aktivierung von Endothelzellen durch atherogene Stimuli und die konsekutive Rekrutierung von Leukozyten über Chemokine und Zytokine als zentraler Pathomechanismus der frühen Atherogenese herausgestellt [2].

Humane Läsionen bestehen zu Beginn der Atherosklerose hauptsächlich aus VSMCs [158]. Diese können immunologische Funktionen übernehmen, indem sie DAMPs erkennen, Lipide aufnehmen und inflammatorische Signalmoleküle wie CCL2 sezernieren [46, 185, 190, 191]. In der Mikrozirkulation interagieren NG2<sup>+</sup> Perizyten mit Immunzellen über Adhäsions- und Signalmoleküle und beeinflussen so deren Verhalten während einer sterilen Inflammation [200]. Auch in der Atherosklerose können Interaktionen zwischen NG2<sup>+</sup> VSMCs und Immunzellen nachgewiesen werden [202].

Im Verlauf der Atheroprogression sind Makrophagen die häufigsten Immunzellen in den Läsionen [49-52]. Über wichtige Funktionen wie die Efferozytose können Makrophagen die lokale Homöostase regulieren. Ein Defekt dieser regulierenden Funktionen führt zu einer Exazerbation der chronischen Inflammation [70]. Signalmoleküle wie Chemokine im unmittelbaren Umfeld der Makrophagen scheinen dabei den Phänotyp der Makrophagen und damit auch die Funktion der Makrophagen entscheidend beeinflussen zu können [64].

In verschiedenen Experimenten konnte die fundamentale Rolle der CCL2-CCR2 Achse in der Atherogenese bewiesen werden [116, 130, 132, 137, 139-141]. Dabei scheint CCL2

insbesondere über die Mobilisierung und Rekrutierung von Monozyten zur Progression der atherosklerotischen Läsionen beizutragen [130]. Interessanterweise kann CCL2 neben seiner chemotaktischen Wirkung das Proliferations- und Apoptoseverhalten, die Polarisierung und den funktionellen Phänotyp der Immunzellen im Rahmen einer Inflammation beeinflussen [120].

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass CCL2 in NG2<sup>+</sup> VSMCs im Rahmen der Atherogenese vermehrt gebildet wird. Gleichzeitig wurde eine relevante Kommunikation zwischen lokalen wandständigen Zellen und Zellen des Immunsystems nachgewiesen [202]. NG2 wird jedoch nicht nur von VSMCs exprimiert, sondern auch von Oligodendrozyten, Chondroblasten, Perizyten und Kardiomyozyten [204-206].

Ziel dieser Doktorarbeit ist es deshalb, die Kommunikation zwischen VSMCs und Makrophagen in der Gefäßwand detailliert zu beleuchten und dabei die Mechanismen hinter dieser Interaktion besser zu verstehen. Aufgrund der hohen Plastizität von VSMCs und der daraus resultierenden Unklarheit des zellulären Ursprungs soll der Effekt von CCL2 aus VSMCs auf die lokale Inflammation in der Gefäßwand mit Hilfe eines hochspezifischen etablierten Cre-abhängigen, konditionellen, VSMC-spezifischen Knockout-Modells (*Myh11<sup>cre-ERT2</sup>; CCL2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup>*) untersucht werden.

Folgende Fragen sollen in dieser Doktorarbeit adressiert werden:

1. Welche Rolle spielt die CCL2-CCR2 Achse für die Kommunikation von VSMCs mit Makrophagen in der Atherosklerose?
2. Wie beeinflusst die genetische Manipulation dieser Achse das Verhalten der Makrophagen in der Atherosklerose?
3. Welche Auswirkungen hat die genetische Manipulation der CCL2 Expression in VSMCs auf die lokale Inflammation?



### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Versuchstiere

Um die Relevanz der Expression von CCL2 in VSMCs während der Atherogenese analysieren zu können, wurde auf das Mausmodell zurückgegriffen.

Alle hier gelisteten Tierversuche wurden von der Regierung Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: ROB-55.2-2532.Vet\_02-19-42) und gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes (Fassung vom 18.05.2006, letzte Änderung am 10.08.2021 durch Artikel 105) durchgeführt. Im Folgenden sollen die einzelnen Mauslinien, welche zur Beantwortung der spezifischen Fragestellungen verwendet wurden, vorgestellt werden.

##### 3.1.1. Mauslinien

###### Myh11<sup>cre-ERT2</sup> (Stock No.: 019079)

Myh11 gilt als einer der spezifischsten Marker für glatte Muskelzellen [207]. Bei dem transgenen Mausmodell Myh11<sup>CreERT2</sup> wird ein Fusionsprotein, bestehend aus einer induzierbaren Cre-Rekombinase und einer modifizierten rezeptorbindenden Domäne des humanen Östrogenrezeptors, unter Kontrolle des Promotors Myh11 exprimiert. Durch die konsekutive Applikation von Tamoxifen, einem selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulator, kommt es zu einer Konformationsänderung des Cre-ER<sup>T2</sup> Fusionsproteins, welche zur Folge hat, dass Cre-ER<sup>T2</sup> in den Zellkern transloziert, wo die Rekombination durchgeführt werden kann. Initial wurde das Myh11<sup>CreERT2</sup> Transgen nach der Vorkerninjektion zufällig in das Y-Chromosom integriert, weshalb ausschließlich männliche Mäuse die induzierbare Cre-Rekombinase exprimieren [208-210].

###### Ccl2-RFP<sup>flox</sup> (Stock No.: 016849)

Die Exone 2 und 3 des CCL2-Gens werden von loxP Sequenzen in gleicher Orientierung flankiert. Die Cre-Rekombinase bindet mit hoher Affinität an die loxP Sequenz und führt zu einer Exzision der Exone im Zielgen. Durch Expression der Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Promotors, der in bestimmten Zellen aktiv ist, kann das Zielgen spezifisch in den gewünschten Zellen ausgeschaltet werden, während es in allen anderen Zelltypen/-reihen weiterhin exprimiert wird. Das rot fluoreszierende Protein (RFP) wird in Cre-positiven Zellen

mittels Cre-vermittelter Rekombination entfernt, weshalb die Linie im Weiteren als Ccl2<sup>flox</sup> bezeichnet wird [211-213].

#### ApoE<sup>-/-</sup> (Stock No.: 002052)

ApoE ist entscheidend an der Aufnahme von Lipoproteinen durch Rezeptoren aus der LDL-Rezeptor-Gen-Familie beteiligt [214]. Mäuse, die ApoE nicht exprimieren, entwickeln bereits unter normaler Fütterung erhöhte Blutwerte für Cholesterol. Durch zusätzliche Fütterung einer WTD kann eine ausgeprägte Hyperlipidämie induziert werden, sodass die Mäuse innerhalb kürzester Zeit atherosklerotische Läsionen entwickeln. Dabei weisen die Läsionen in der Maus bezüglich der zellulären Zusammensetzung und der Lokalisation große Ähnlichkeiten zu humanen Plaques auf, weshalb das ApoE Modell sich zur Untersuchung der Atherosklerose besonders eignet [215-218].

#### ROSA26<sup>tdTomato</sup> (Stock No.: 007914)

In diesem Mausmodell erfolgt die Expression des rotfluoreszierenden Proteins „tandem dimer Tomato (tdTomato)“ unter der Kontrolle des ubiquitär und konstitutiv transkribierenden ROSA26-Promotors. Durch gezielte Induktion der Cre-vermittelten Rekombination wird eine gefloxtete STOP-Kassette, welche als transkriptioneller „Roadblock“ fungiert, vor dem kodierenden Bereich des tdTomato-Gens entfernt, über welche die Transkription eines rot fluoreszierenden Proteins (tdTomato) reguliert werden kann. Durch die Entfernung der STOP-Kassette wird die Transkription des Reporterproteins ermöglicht, sodass alle Zellen, welche die Cre-Rekombinase exprimieren, und deren Nachkommen über das rot fluoreszierende tdTomato identifizierbar sind [219, 220].

#### Cx3Cr1<sup>GFP/+</sup> (Stock No.: 005582)

Der Fraktalinrezeptor CX3CR1 wird unter anderem von myeloiden Zellen (insbesondere durch Monozyten sowie von dendritischen Zellen) exprimiert. Durch die Kopplung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) mit dem Cx3cr1-Promotor können CX3CR1 positive Makrophagen visualisiert werden und spezifisch im Rahmen der Atherosklerose untersucht werden. Da es sich in diesem Model um einen Knock-in in den endogenen Cx3Cr1-Lokus handelt, kommt es bei homozygoten Tieren zu einem Fraktalinrezeptor-Knockout, weshalb ausschließlich heterozygote Tiere in den Versuchen verwendet wurden [221].

ApoE<sup>-/-</sup>, Myh11<sup>cre-ERT2</sup>, ROSA26<sup>tdTomato</sup>, CCL2<sup>RFP-fl/fl</sup> und Cx3Cr1<sup>GFP/+</sup> wurden von Charles River bzw. Jackson Laboratories bestellt. Alle Mauslinien stammen aus den Originalpublikationen und sind mindestens über sieben Generationen auf einen C57BL/6 Hintergrundstamm zurückgekreuzt [208, 211, 219, 221, 222].

### 3.1.2. Zucht der Mauslinien

Durch Kreuzung der beschriebenen Linien konnten folgende experimentale Mauslinien gezüchtet werden:

Myh11<sup>cre-ERT2</sup>; ROSA26<sup>tdTomato</sup>; Cx3Cr1<sup>GFP/+</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> (im Folgenden als VSMC-tdT<sup>in</sup> Cx3cr1-MΦ<sup>GFP-rep</sup> Mäuse bezeichnet)

In dieser Linie führt die Tamoxifen-vermittelte Aktivierung der Cre-Rekombinase in Myh11<sup>+</sup> VSMCs dazu, dass das rot fluoreszierende Protein tdTomato zellspezifisch exprimiert werden kann. Zusätzlich wird in dieser Linie das grün fluoreszierende Protein GFP in Makrophagen konstitutiv unter der Kontrolle des Cx3cr1-Promotors exprimiert. Der ApoE<sup>-/-</sup> Hintergrund ermöglicht in Kombination mit dem Anfüttern einer WTD die Induktion und Akzeleration der Atherogenese. Es wurden ausschließlich männliche Mäuse in die Versuche inkludiert.

Somit können mit Hilfe dieser Linie CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen durch das grün fluoreszierende Protein GFP sowie Myh11<sup>+</sup> VSMCs und deren Nachkommen durch das rot fluoreszierende Protein tdTomato identifiziert und in der Atherogenese visualisiert werden.

Myh11<sup>cre-ERT2</sup>; CCL2<sup>fl/fl</sup> oder CCL2<sup>+/+</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> (im Folgenden als Ccl2<sup>SMC<sup>+/+</sup></sup> oder Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäuse bezeichnet)

Für die Untersuchung der Funktion und der Relevanz von CCL2 in VSMCs, kann CCL2 mit dieser Linie zellspezifisch und zu einem definierten Zeitpunkt durch die konsekutive Tamoxifen-Injektion in Myh11<sup>+</sup> VSMCs ausgeschaltet werden. Da die Cre-Rekombinase ausschließlich unter dem Promotor Myh11 exprimiert wird, wird das gefloxtete CCL2 spezifisch in Myh11<sup>+</sup> VSMCs ausgeschaltet. Der ApoE<sup>-/-</sup> Hintergrund ermöglicht in Kombination mit dem Anfüttern einer WTD die Induktion und Akzeleration der Atherogenese. Es wurden ausschließlich männliche Mäuse in die Versuche inkludiert. Bei einem Plasmaspiegel der LDL/VLDL Lipoprotein-Fraktion unter 250mg/dl und/oder der fehlenden Entwicklung

atherosklerotischer Läsionen sowohl auf Ebene der Arteria brachiocephalica (BCA), als auch auf Ebene der Aortenklappe, wurden die Mäuse aus den Versuchen ausgeschlossen. Insgesamt wurden drei Mäuse, davon zwei  $Ccl2^{SMC+/+}$  und eine  $Ccl2^{SMCA/\Delta}$  Maus aus den Versuchen ausgeschlossen.

### 3.1.3. Kennzeichnung der Mäuse und Genotypisierung

Um die eindeutige Identifizierung der Mäuse gewährleisten zu können, wurden die Versuchstiere am Ohr mittels Ohrloch entsprechend der jeweiligen Zuordnungsnummer gekennzeichnet. Das so gewonnene Gewebe wurde zur weiteren Genotypisierung mittels PCR verwendet. Die DNA-Isolation erfolgte mittels Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit entsprechend den Herstellerangaben. Im Anschluss erfolgte die Amplifizierung und Analyse der transgenen bzw. mittels homologer Rekombination eingebrachten Gensequenzen mittels PCR und Gelelektrophorese.

### 3.1.4. Zucht und Haltung der Tiere im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung

Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte im Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (ZNP) in „specific pathogen free“ (SPF) Tierhaltungen. Der SPF-Status der Tiere wurde regelmäßig mit Hilfe von Sentinel Mäusen überprüft, ebenso ist ein geschlossenes Barriersystem mit Personalschleuse, Materialschleuse und Überdruckbelüftung zur Gewährleistung einer Keimbarriere eingerichtet.

Maximal fünf Mäuse wurden in THKB-M2V-M Polysulfonkäfigen (Typ M II, verlängert) mit einem Luftfilter (IVC-System) und einer Größe von 530 cm<sup>2</sup> bei einer Raumtemperatur von 21 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 % gehalten. Zur Gewährleistung eines geregelten Tag-Nacht Zyklus ist ein automatisierter 12h-Zeitschalter für die Beleuchtung eingerichtet. Die Tiere wurden mit Standardfutter für Labornager (Haltungsfutter V 1536) und Wasser versorgt.

### 3.1.5. Haltung der Tiere im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin

Alle an der Maus durchgeführten Experimente erfolgten im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin. Im Alter von sechs Wochen wurden die Mäuse vor Beginn der Tamoxifen-Injektion aus dem ZNP ins Walter-Brendel-Zentrum transferiert. Im Walter-Brendel-Zentrum erfolgte die Haltung in Tierhaltungsschränken (Uniprotect, Bioscope GmbH). Die Mäuse wurden mit einer maximalen Anzahl von fünf Mäusen in Standard Makrolon-

Käfigen (Käfig Typ II long) mit einer Größe von 530 cm<sup>2</sup> bei einer Raumtemperatur von 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 % gehalten. Die Tierhaltung des Walter-Brendel-Zentrums verfügt ebenso über eine automatisierte Zeitschaltuhr zur Aufrechterhaltung eines natürlichen Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden. Zur weiteren Ausstattung der Käfige (enrichment) gehörten frische und saugstarke Einstreu (Abbed Nestbaumaterial B E-011, Faserbreite 3,5 mm, E-012, Faserbreite 4 mm und NBU E014, Faserbreite 120 mm), Maushäuser (Ebeco) sowie Nestmaterial (NES3600 Nestlets).

### 3.1.6. Verarbeitung von Tamoxifen zur intraperitonealen Injektion

20 mg Tamoxifen (T5648-1G von Sigma-Aldrich Chemie GmbH) wurden in ein Gemisch bestehend aus 1 ml Korn-Öl (C8267 von Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und 50 µl Ethanol absolut/reinst dazugegeben. Im Anschluss wurde das Tamoxifen in dem Gemisch für fünf Minuten mit einem Vortexer (Vortex Genie II, Scientific Industries) gründlich gemischt und über Nacht unter Lichtschutz bei 37 °C und einer Drehzahl von 400 rpm mit einem Schüttelinkubator (Eppendorf ThermoMixer® C) aufgelöst. Das aufgelöste Tamoxifen wurde unter Lichtschutz bei 4 °C für maximal fünf Tage bis zur Injektion gelagert.

### 3.1.7. Induktion der Cre-Rekombinase mit Tamoxifen und Beginn einer cholesterinhaltigen Diät („western type diet“)

Im Alter von sechs Wochen wurden die Mäuse in die Experimente eingeschlossen. Zur Induktion der Cre-Rekombinase erhielten die Mäuse an fünf konsekutiven Tagen eine intraperitoneale Injektion mit 2 mg Tamoxifen. Eine Woche nach der ersten Tamoxifen-Injektion wurde die Diät der Tiere zur Induktion von Atherosklerose von normaler „chow diet“ auf WTD umgestellt (Sniff EF D12079). Ccl2<sup>SMC<sup>+/+</sup></sup> und Ccl2<sup>SMC<sup>Δ/Δ</sup></sup> Tiere erhielten für 14 Wochen eine WTD, bevor sie in die Experimente eingeschlossen wurden. VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-MΦ<sup>GFP-rep</sup> Mäuse wurden für 22-24 Wochen mit einer WTD angefüttert.

## 3.2. Eingriffe an der Maus

### 3.2.1. Narkose

Für die operativen Eingriffe wurde für die Allgemeinanästhesie auf die sogenannte MMF-Narkose zurückgegriffen. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Sedierung, Analgesie und Muskelrelaxierung wurde dabei Medetomidin (α2-Adrenorezeptor-Agonist), Midazolam (Benzodiazepin) und Fentanyl (Opiat) in folgender Kombination angewendet: Eine Dosis MMF

beinhaltete 90 µl verdünntes Midazolam-hameln® (Hameln Phamaceuticals GmbH, Hamelin, 1:3 in NaCl verdünnt), 15 µl Dorbene® (Pfizer GmbH, Berlin), sowie 90 µl verdünntes Fentanyl HEXAL® (Hexal AG, Holzkirchen, 1:3 in NaCl verdünnt). Die Applikation der Vollnarkose erfolgte intraperitoneal. Im Verlauf wurde der Zwischenzeh-Reflex zur Evaluation des Schmerzempfindens überprüft und bei Bedarf eine bis mehrere Dosen nachinjiziert.

### 3.2.2. Gewichtsbestimmung von Maus und Organen

Vor Beginn der Operation wurde das Gewicht der Mäuse in Narkose mit einer cs200-Waage bestimmt. Weiterhin wurde das Gewicht von Herz, Leber, Milz und Niere mit einer Präzisionswaage (Kern EW 3000-2M) gemessen.

### 3.2.3. Intrakardiale Blutentnahme und Euthanasie

Nach Ausschluss des Schmerzempfindens durch den erloschenen Zwischenzeh-Reflex in ausreichender MMF-Narkose folgte die intrakardiale Blutentnahme mit konsekutiver Euthanasie. Hierfür wurde das Fell über dem Brustkorb mit einer Schere ovalförmig geöffnet, um Einsicht auf die Interkostalräume zu erlangen. Eine 26G Kanüle (BD Microlance 3, Becton Dickinson and Company Limited, Drogheda) wurde mit Heparin (Heparin-Natrium-25000 IE., ratiopharm GmbH, Ulm) in 1:10 Verdünnung mit PBS (Dulbecco's Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) benetzt. Unter Aspiration wurde die Nadel links parasternal zwischen der ersten und zweiten Rippe in einem Winkel von 45 °C eingeführt, bis sich ungefähr 1 ml Blut im Spritzenzylinder befanden. Anschließend wurde das Blut in einem Eppendorf-Tube® (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling) eisgekühlt zwischengelagert. Der intrakardialen Blutentnahme folgte eine Sternotomie sowie eine Rippenteilresektion der rechten Thoraxhälfte. Die Euthanasie erfolgte durch Entfernung des rechten Vorhofs mit einer Mikroschere und Applikation von 20 ml eisgekühltem PBS in den linken Ventrikel.

### 3.2.4. Entnahme der Organe

Das Herz, der Aortenbogen inklusive der abgehenden BCA, sowie die restliche Aorta bis zur Bifurcatio aortae wurden vorsichtig vom perivaskulären Gewebe und den abgehenden Gefäßen getrennt und dann entnommen. Weiterhin wurden die Milz, die Leber, die Niere, sowie das linke Femur entnommen.

### 3.3. Blutanalysen

#### 3.3.1. Bestimmung der Leukozytenpopulationen und Plasmaseparation

100 µl Vollblut wurden in eine EDTA-Küvette (Microvette 100 K3E, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) gegeben und mit Hilfe eines IDEXX ProCyte DX cell counter Geräts ausgewertet. Das restliche Vollblut wurde bei 2000 g für 20 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert (Zentrifuge 5424R, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling). Das Plasma wurde in ein neues Eppendorf-Tube übertragen und bei -80 °C gelagert. Der korpuskuläre Anteil des Bluts wurde verworfen.

#### 3.3.2. Durchflusszytometrische Bestimmung der Leukozyten-Subpopulationen in Milz, Knochenmark und Blut

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, bei dem sehr viele Zellen innerhalb kürzester Zeit über die Expression verschiedener, größtenteils zelltypspezifischer Marker identifiziert und charakterisiert werden können. Extrazelluläre Oberflächenmoleküle sowie intrazelluläre Moleküle werden dabei antikörpervermittelt über gekoppelte Fluorophore unterschiedlichster spektraler Eigenschaften markiert. Im Durchflusszytometer „fließen“ einzelne Zellen an spezifischen Detektoren vorbei, die in der Lage sind, die antikörpergebundenen Fluorophore auf Einzelzellebene zu messen und zu quantifizieren [223]. Für die durchflusszytometrische Bestimmung der Leukozyten-Subpopulationen wurden die jeweiligen Organe zunächst zu einer Einzelzell-Suspension verarbeitet. Dafür wurde die Milz mit einer Schere halbiert. Im Anschluss wurde die apikale Organhälfte mit 6 ml PBS durch ein 70 µm Zellsieb (Corning® 70µm Cell Strainer, Corning) in eine Zellsuspension gebracht. Das Femur wurde jeweils proximal und distal mit einer Schere geöffnet. Daraufhin wurde das Knochenmark mit 6 ml gekühltem PBS aus dem Knochen gespült und ebenfalls durch ein 70 µm Zellsieb in eine Zellsuspension gebracht. Die Zellen von Milz und Knochenmark wurden bei 370 g und 4 °C für sieben Minuten abzentrifugiert (Zentrifuge 5810R, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling). Die Überstände wurden abgesaugt und verworfen. Die Zellpellets von Knochenmark und Milz sowie 200 µl Vollblut wurden jeweils zur Zellyse der Erythrozyten in 3 ml hypotonen Ammonium-Chlorid-Kalium-Lysepuffer (Herstellung siehe Tabelle 1) resuspendiert. Nach fünf Minuten wurde die Erythrozytolysen mit 7 ml PBS gestoppt, die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Um eine effiziente

Erythrozytolyse des Bluts zu gewährleisten, wurde für das Blut ein zweiter Durchgang der Erythrozytolyse mit Waschschrift durchgeführt.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Ammonium-Chlorid-Kalium-Lysepuffer Stocklösung (10x konzentriert)**

Reagens	Katalognummer	Molare Endkonzentration in Stocklösung (verdünnt in Reinstwasser)
<b>Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl)</b>	Sigma-Aldrich #09718-250G	1,5 M
<b>Kaliumhydrogencarbonat (KHCO<sub>3</sub>)</b>	Appllichem #A2375,0500	100 mM
<b>Ethylenediaminetetraacetic acid solution (EDTA)</b>	Sigma-Aldrich #03690-100	10 mM
<b>Für den Versuch wurde die Stocklösung (10x) zu einer einfach konzentrierten Suspension mit Reinstwasser verdünnt (150mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 1mM EDTA)</b>		

Um die unspezifische Bindung des Fc-Teils der Antikörper an Fc-Rezeptoren, welche sich beispielsweise auf B-Lymphozyten, Monozyten und dendritischen Zellen befinden [224], zu vermeiden, wurde vor der eigentlichen Färbung der Zellen ein Fc-Block durchgeführt. Dafür wurden die Zellpellets in ein Gemisch, bestehend aus 49 µl PBS mit 0,5 % BSA (Albumin Fraction V ≥98 %, powdered, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und 2 mM EDTA und 1 µl Fc-Rezeptorblocker (CD16/32, FcR III/II, 93, eBioscience), resuspendiert und in einer 96-Well Platte (Falcon® 96-well, U-Bottom, Non-Tissue Culture Treated Plate, Corning) für zehn Minuten eisgekühlt inkubiert. Direkt im Anschluss an die Fc-Rezeptorblockade wurden die Antikörper zur Markierung der spezifischen Oberflächenproteine ohne Waschschrift dazugegeben. Dazu wurde jeweils 1 µl des jeweiligen Antikörpers in 44 µl PBS mit 0,5 % BSA und 2 mM EDTA verdünnt. 50 µl der folgenden verdünnten Antikörper wurden dann zu den 50 µl Fc-Block dazugegeben und damit in einer finalen Konzentration von 1:100 verwendet:

- CD45.2 APC Cy7 (#560694, BD Biosciences)
- CD19 FITC (#152404 BioLegend)
- CD3 FITC (#553062 BD Biosciences)
- CD115 BV421 (#135513 BioLegend)



- Ly6C PERCP Cy5.5 (#128012 *BioLegend*)
- Ly6G PE (#127608 *BioLegend*)

Die Zellproben wurden für 20 Minuten mit der Antikörpermischung eiskühlt inkubiert, anschließend wurden die Zellen bei 370 g für sieben Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS mit 0,5 % BSA und 2 mM EDTA resuspendiert. Die Zellproben wurden im Anschluss bis zur durchflusszytometrischen Analyse eiskühlt gelagert.

Zur Kompensation der Fluoreszenz wurden BD™ CompBeads Anti-Maus Ig, κ sowie BD™ CompBeads Anti-Rat/Hamster Ig, κ (Becton Dickson and Company, Franklin Lakes) mit den Antikörpern der entsprechenden Spezies markiert. Dafür wurden je ein Tropfen der BD™ CompBeads mit 199 µl PBS mit 0,5 % BSA und 2 mM EDTA und 1 µl des jeweiligen Antikörpers vermischt. Weiterhin wurde zur Negativkontrolle je ein Tropfen BD™ CompBeads Anti-Mouse Ig, κ/Negative Control dazugegeben. Nach zehn Minuten Inkubationszeit wurden die Beads bei 1000 g für fünf Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in 200 µl PBS mit 0,5 % BSA und 2 mM EDTA resuspendiert. Die Milz und das Knochenmark wurden direkt vor der durchflusszytometrischen Analyse noch einmal durch ein 50 µm Sieb (Cell Trics 50 µm, Sysmex Partec, Görlitz) filtriert. Die Kompensation und die Durchflusszytometrie erfolgte mit einem BD LSR Fortessa Cell Analyzer. Zur Markierung von toten Zellen wurde direkt vor der durchflusszytometrischen Analyse SYTOX™ Red (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham) in einer finalen Konzentration von 1:1000 in die Zellproben pipettiert und mit einem Vortexer gut vermischt. Dadurch konnten tote Zellen, welche in der Lage sind, Antikörper unspezifisch zu binden, aus den Analysen der Zellpopulationen ausgeschlossen werden. Die Datenauswertung erfolgte mit FlowJo V10.

### 3.4. Verarbeitung der Aorten

Für die Transkriptom-Analyse der Zellen der Media und der Intima wurde die gesamte Aorta, inklusive Aorta ascendens und Aorta descendens, bis zur Aortenbifurkation verwendet. Hierfür wurden die Aorten im Bereich der Aorta ascendens vom Herz getrennt. Weiterhin wurde die BCA am Abgang aus dem Aortenbogen konusförmig herausgeschnitten. Alle Seitenäste der Aorta wurden am Abgang von der Aorta abgetrennt. Zunächst wurde die Tunica adventitia in einem Enzym-Mix teilweise verdaut, um im Anschluss von der gesamten Aorta

entfernt werden zu können. Hierfür wurde die Aorta in den Enzym-Mix 1 (siehe Tabelle 2) gebracht und bei 37 °C und 400 rpm auf einen Schüttelinkubator (Eppendorf ThermoMixer®C) für zehn Minuten inkubiert.

**Tabelle 2: Enzym-Mix 1 Aortenverdau**

Reagens	Katalognummer	Konzentration der Stocklösung	Volumen Enzymmix 1	Konzentration in Enzymmix 1
<b>Collagenase II</b>	Worthington Biochemical LS004174	6200 U/ml	95 µl	590 U/ml
<b>Elastase</b>	Worthington Biochemical LS002292	85 U/ml	30 µl	2,5 U/ml
<b>PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup></b>	Merck L1815	1x	875 µl	
<b>Gesamt</b>			1000 µl	

Nach zehn Minuten wurde die Enzymreaktion gestoppt, indem die Aorten aus dem Enzym-Mix 1 in calcium- und magnesiumfreies PBS auf Eis gelegt wurden. Die Tunica adventitia wurde vorsichtig von der Tunica media getrennt und verworfen. Um die Aorta weiter zu verdauen und die Zellen voneinander lösen zu können, wurde die übriggebliebene Gefäßwand, bestehend aus Tunica media und Tunica intima, in den Enzym-Mix 2 (siehe Tabelle 3) gebracht und für 40 Minuten im Schüttelinkubator bei 37 °C und 400 rpm inkubiert.

**Tabelle 3: Enzym-Mix 2 Aortenverdau**

Reagens	Katalognummer	Konzentration in Stocklösung	Volumen in Enzymmix 2	Konzentration in Enzymmix 2
<b>Collagenase I</b>	Sigma-Aldrich C0130	1250 U/ml	450 µl	750 U/ml
<b>Collagenase XI</b>	Sigma-Aldrich C7657	12000 U/ml	125 µl	2000 U/ml
<b>DNase I</b>	Sigma-Aldrich D4527	2478 U/ml	30 µl	100 U/ml
<b>Hyaluronidase</b>	Sigma-Aldrich H3506	5000 U/ml	15 µl	100 U/ml
<b>PBS mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup></b>	Merck L1815	1x	130 µl	
<b>Gesamt</b>			750 µl	

Erneut wurde die Enzymreaktion in 6 ml eisgekühltem PBS (magnesium- und calciumfrei) gestoppt. Dabei wurden die Aorten in ein 70 µm Sieb, welches sich in einem mit 6 ml eisgekühltem PBS Well einer 6-Well Platte (Costar 6 Well Plate, flat bottom, Corning) befand, hineingelegt. Die Zellen wurden durch das 70 µm Sieb in eine Zellsuspension gebracht. Im Anschluss erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei +4 °C, 370 g für sieben Minuten. Der Überstand wurde im Anschluss abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in Trockeneis schockgefroren und bei -80 °C zwischengelagert.

### 3.5. Bulk-RNA Sequenzierung der intimalen und medialen Zellen der Aorta

Die schockgefrorenen Zellpellets wurden an eine externe Firma (IMGM laboratories, Planegg) zur Erstellung einer RNA-Bibliothek sowie zur Sequenzierung geschickt. Zusammengefasst wurde die RNA der Zellpellets mit einem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellerprotokolls isoliert. Die Quantifizierung und Reinheitskontrolle der gesamten RNA erfolgte mit dem NanoDrop ND-1000 spectral photometer (Thermo Fisher Scientific). Die anschließende Integritätskontrolle wurde mit dem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) analysiert, dabei wurde das RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies) verwendet. Für die Erstellung der RNA-Sequenzierungs-Bibliothek wurde die mRNA mit der TruSeq® Stranded mRNA LP technology nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die Qualität der Bibliothek wurde mit einem DNA 1000 LabChip kit über den 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) validiert. Die Bibliotheken der einzelnen Proben wurden in eine Sequenzierungs-Bibliothek mit gleichem DNA-Gehalt der jeweiligen Bibliotheken zusammengeführt (Pooling). Die vorbereitete Bibliothek wurde in das NextSeq® 500 Sequenziersystem (Illumina) geladen, wobei ein High Output Single-Read-Lauf mit 75 Zyklen (1x75bp SR) unter der Kontrolle der NextSeq Control Software (NCS) durchgeführt wurde.

### 3.6. Bioinformatische Analyse

Die bioinformatische Analyse der sequenzierten Datensätze zu den Aorten der  $Ccl2^{SMC^{+/+}}$  und  $Ccl2^{SMC^{\Delta/\Delta}}$  Mäuse (bulk-RNA Sequenzierung) sowie zur humanen und murinen Atherosklerose, welche von Wirka und Kollegen erhoben wurden [187], erfolgte freundlicherweise durch Markus Joppich am Institut für Informatik (Lehr- und Forschungseinheit Bioinformatik) der Fakultät für Mathematik, Informatik und Statistik der Ludwig-Maximilians-Universität München.

### 3.6.1. Analyse der bulk-RNA sequenzierten Daten

Die Nukleotidsequenzen („reads“) wurden mit Hilfe von Hisat2 (Version 2.1.0) auf das Referenzgenom *Mus musculus* (Ensemble *Mus musculus* release 91, GRcm38) aligniert [225]. Die Quantifizierung der Gen-Expression („reads“ pro Gen) erfolgte unter Verwendung von featureCounts [226]. Eine Probe wurde aufgrund des hohen mitochondrialen Anteils unter den am häufigsten exprimierten Genen ausgeschlossen. Die differentielle Genexpressions-Analyse erfolgte durch DESeq2 (Version 1.30.0) im Rahmen der poreSTAT differential expression analysis pipeline (Markus Joppich, persönliche Kommunikation, 2022; <https://github.com/mjoppich/poreSTAT/>).

### 3.6.2. Datensätze von Wirka und Kollegen

Die Transkriptom-Datensätze zur humanen und murinen Atherosklerose wurden über die NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) Zugriffsnummer GSE131780 heruntergeladen und in R 3.5.3 mit Seurat v.3.1.1 prozessiert [227]. Gene, die in weniger als drei Zellen exprimiert wurden und Zellen, die weniger als 200 Gene exprimierten, wurden herausgefiltert.

### 3.6.3. Chemokin-Interaktom Analyse

Die genaue Vorgehensweise zur Auswertung der Interaktion zwischen den identifizierten Populationen über Chemokine aus den Datensätzen von Wirka und Kollegen [187] wird an anderer Stelle ausführlich beschrieben (Markus Joppich, persönliche Kommunikation, 2022; [https://github.com/mjoppich/chemokine\\_interactionmap](https://github.com/mjoppich/chemokine_interactionmap)). Zusammengefasst wurden bekannte Chemokin-Rezeptoren und deren Liganden bewertet. Für jedes mögliche Ligand-Rezeptor-Paar wurde die Genexpression des Liganden in einem spezifischen Cluster mit der Genexpression des Rezeptors in einem anderen Cluster multipliziert, um die darüber mögliche Kommunikation zwischen den beiden Clustern zu approximieren. Durch die Aufsummierung aller Chemokin-Ligand-Rezeptor-Interaktionen zwischen zwei Populationen kann die gesamte Interaktion zwischen den einzelnen Clustern des Datensatzes interpopulationsspezifisch quantifiziert werden. Um die über die CCL2-CCR2 Achse vermittelte Interaktion zu analysieren, wurde der maximale Punktwert dieser spezifischen Interaktion in allen Populationen bestimmt. Zu diesem Punktwert wurden die einzelnen Punktwerte der CCL2-CCR2 Interaktion in Relation gesetzt und in einem Sehnendiagramm veranschaulicht.

### 3.7. Histologische Auswertungen

#### 3.7.1. Verarbeitung der Organe

Die entnommenen Organe wurden für die histologische Analyse in einer vierprozentigen neutralgepufferten Formaldehyd-Lösung (Formaldehyde Solution Methanol-free, Thermo Fisher Scientific, Rockford) für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem Waschschrift in PBS wurden die Organe in einer 30-prozentigen Sucrose-Lösung (Sucrose in Aqua destillata, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, s9378) über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Es erfolgte die Einbettung der Organe in Tissue Tek® (OCT cryo tissue embedding compound, Sakura Finetek Europe) mit der anschließenden Lagerung bei -80 °C.

Die histologischen Schnitte wurden an einem Kryotom (CryoStar NX70 Kryostat, ThermoFisher Scientific) auf die Objektträger (Menzel Gläser Superfrost Plus, Gerhard Menzel, Braunschweig) übertragen. Die Schnitte der BCA erfolgten im Querschnitt von proximal nach distal bei einer Schnitttiefe von 10 µm. Um drei verschiedene Lokalisationen auf einem Objektträger analysieren zu können, wurden die Schnitte nacheinander auf neun Objektträger übertragen. Dabei wurde jeder zweite Schnitt verworfen, sodass der Abstand zwischen den Schnitten zweier aufeinanderfolgender Lokalisationen auf dem Objektträger (zwischen proximal und intermediär und zwischen intermediär und distal), 180 µm auf der BCA betrug. Die Aorta wurde von distal nach proximal geschnitten und konsekutiv auf die Objektträger übertragen. Im Anschluss wurden die Schnitte bei -20 °C gelagert und für die folgenden histologischen Färbungen verwendet. Für die entsprechenden Färbungen wurde jeweils ein Schnitt pro Lokalisation ausgewertet.

#### 3.7.2. Immunfluoreszenz-Färbung für ACTA2, LGALS3, ki67 und PDGFβR

Die Immunfluoreszenz-Färbung basiert auf einer antikörpervermittelten Markierung spezifischer Epitope, die direkt (primär konjugierter Antikörper) oder indirekt (sekundär konjugierter Antikörper) über fluoreszierende Moleküle in einem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können [228].

Zunächst wurden die zuvor angefertigten Kryoschnitte mit 200 µl einer vierprozentigen Formaldehyd-Lösung gleichmäßig bedeckt. Nach 15 Minuten erfolgten drei Waschschriffe für jeweils fünf Minuten in einer Waschlösung in Glasküvetten auf einem Schwenkinkubator. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Schnitte der Objektträger mit einem Fettstift (Liquid Blocker, Science Service, Japan) umrandet. Um eine unspezifische Bindung zu

vermeiden, erfolgte die Blockade unspezifisch bindender Epitope durch die Block-Lösung (200 µl/Objektträger). Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurde die Block-Lösung vom Objektträger entfernt. Die primären Antikörper wurden im gewünschten Verhältnis in der Block-Lösung verdünnt und dann in einem Volumen von 200 µl auf dem Objektträger gleichmäßig verteilt. Die Inkubation der primären Antikörper erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag erfolgten erneut drei Waschschriffe für jeweils fünf Minuten. Nach dem letzten Waschschriff wurden die sekundären Antikörper, verdünnt in einem Verhältnis von 1:200 in 200 µl Stocklösung, auf die Objektträger übertragen. Zu den sekundären Antikörpern wurde Hoechst 33342 (Invitrogen, H3570) in einer Konzentration von 1:1000 für die Kernfärbung dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit der sekundären Antikörper und Hoechst 33342 von einer Stunde erfolgten drei Waschschriffe. Danach wurden die Objektträger mit einem Tropfen eines Eindeck-Mediums (Dako Fluorescence Mounting Medium, GM304) und mit einem Deckglas (Menzel Gläser, Thermo Scientific) bedeckt. Die Schnitte wurden zum Trocknen im Kühlschrank bei +4 °C gelagert.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für die Immunfluoreszenz-Färbung**

Lösung	Zusammensetzung
<b>Formaldehyd 4 %</b>	16 % Formaldehyd (Thermo Fisher Scientific, 28908) wurde mit Aqua destillata verdünnt
<b>Waschlösung</b>	100 ml einer 10x konzentrierten PBS-Lösung (gibco phosphate buffered saline, 70011-036) wurden mit 900 ml Aqua destillata und 1 ml Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P1379) verdünnt
<b>Stocklösung</b>	0,5 g Bovines Serumalbumin (Albumin Fraction V, Carl Roth GmbH, 8076.4) und 0,25 g Saponin (Carl Roth GmbH, 4185.1) wurden in 50 ml PBS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D8537-500ml) aufgelöst. Die Lösung wurde fünf Minuten mit einem magnetischen Rührfisch gemischt und anschließend durch ein 0,2 µm Siebnetz (Rotilabo® Spritzenfilter, Carl Roth GmbH, P668.1) gefiltert
<b>Block-Lösung</b>	4,5 ml der Stocklösung wurde mit 0,5 ml Goat Serum (Sigma-Aldrich) verdünnt

**Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz-Färbung**

<b>Primär</b>	<b><u>Verdünnung</u></b>	<b><u>Sekundär</u></b>	<b><u>Verdünnung</u></b>
<b>ACTA2</b> <b>Primär mit FITC</b> <b>konjugierter Antikörper</b> <b>Mouse anti-mouse ACTA2</b> <b>#F3777, Sigma-Aldrich</b>	<u>1:400</u>	-	=
<b>LGALS3</b> <b>Rat-anti-mouse LGALS3</b> <b>#CL8942AP, Cedarlane</b>	<u>1:200</u>	Cy5-conjugated AffiniPure, Goat Anti-Rat IgG (H+L), #112-175-143, Jackson ImmunoResearch,	<u>1:200</u>
<b>Ki-67</b> <b>Rabbit anti-mouse ki67</b> <b>#ab15580, abcam</b>	<u>1:200</u>	Cy3-conjugated AffiniPure, Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), #111-165-003, Jackson ImmunoResearch	<u>1:200</u>
<b>PDGFβR</b> <b>Rabbit anti-mouse PDGFβR</b> <b>#ab32570, abcam</b>	<u>1:100</u>	Cy5-conjugated AffiniPure, Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) #111-175-144, Jackson ImmunoResearch	<u>1:200</u>

### 3.7.3. TUNEL-Färbung

Die Markierung apoptotischer Zellen erfolgte über die indirekte TUNEL-Methode mit dem ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, S7165). Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen für die TUNEL-Färbung werden in Tabelle 6 im Detail beschrieben. Die Schnitte wurden mit einer Formaldehyd-Lösung (1 %) für zehn Minuten fixiert. Im Anschluss wurden die Schnitte in PBS dreimal hintereinander für fünf Minuten auf einem Schwenkinkubator gewaschen. Es erfolgte die Permeabilisation der Proben bei -20 °C für fünf Minuten in einem Gemisch aus Ethanol und Essigsäure (2:1, v/v). Nach zwei weiteren Waschschritten in PBS wurden 75 µl des „equilibration buffer“ auf die Objektträger pipettiert und nach zehn Sekunden wieder vorsichtig abgeklopft. Es erfolgte die Inkubation mit der „working strength TdT solution“ zur Markierung der 3'OH Enden der DNA-Fragmente bei 37 °C in einem Inkubationsschrank. Damit die Proben nicht austrocknen konnten, wurden die Objektträger mit Deckfolien bedeckt. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch die Hinzugabe der Proben in einen speziellen Puffer („working strength stop/wash buffer“) für zehn Minuten gestoppt. Es erfolgten drei kurze Waschschrritte in PBS für jeweils eine Minute. Zur Markierung der TUNEL<sup>+</sup> Zellkerne sowie von ACTA2 und LGALS3

durch Antikörper wurden die Objektträger mit einer modifizierten „working strength rhodamine antibody solution“ für eine Stunde bedeckt. Es erfolgten vier Waschschriffe in PBS für jeweils zwei Minuten. Danach erfolgte die Inkubation der Proben mit den sekundären Antikörpern und Hoechst 33342. Nach drei weiteren Waschschriffen in PBS wurden die Objektträger mit einem Tropfen eines Eindeck-Mediums (Dako Fluorescence Mounting Medium, GM304) und mit einem Deckglas (Menzel Gläser, Thermo Scientific) bedeckt.

**Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für die TUNEL-Färbung**

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Formaldehyd 1 %</b>	16 % Formaldehyd wurde in Aqua destillata verdünnt
<b>Gemisch zur Permeabilisierung der Zellen</b>	66 ml Ethanol absolut/reinst (Merck, 8.18760.2500) und 33 ml Essigsäure absolut/reinst (Carl Roth GmbH, 3738.1)
<b>„Equilibration Buffer“</b>	75 µl Equilibration Buffer (90416)
<b>„Working strength TdT Enzymmix“</b>	77 µl Reaction Buffer (90417) 33 µl TdT Enzyme (90418)
<b>„Working strength Stop/Wash Buffer“</b>	Stop/Wash Buffer (90419) 34 ml Aqua destillata
<b>Modifizierte „working strength Rhodamine Antibody Solution“</b>	68 µl Blocking Solution (90425) 62 µl Anti-Digoxigenin Conjugate (90429) ACTA2, 1:400 verdünnt LGALS3 1:200 verdünnt
<b>Sekundäre Antikörper</b>	200 µl Stocklösung (Tabelle 4) Cy5-goat-anti-rat, 1:200 verdünnt Hoechst33342, 1:1000 verdünnt

#### 3.7.4. Aufnahmen und Auswertungen der Immunfluoreszenz-Färbungen und der TUNEL-Färbung

Die Immunfluoreszenz-Schnitte wurden mit einem Zeiss Axio imager microscope mit AxioCam abfotografiert. Mit ZEN (blue edition, Zeiss) wurden die Plaques manuell umrandet, um die Fläche der Läsionen bestimmen zu können. Die restliche Auswertung erfolgte mittels Fiji. Zur Vermessung der ACTA2<sup>+</sup> und LGALS3<sup>+</sup> Fläche wurden diese in den jeweiligen Kanälen standardisiert mit der Threshold-Funktion markiert und gemessen. Zur Evaluation der Proliferation und Apoptose wurden alle Ki67<sup>+</sup> und TUNEL<sup>+</sup> Zellen mit der Threshold-Funktion im Ki67/TUNEL-spezifischen Kanal standardisiert markiert und als Schablone (ROI: region of interest) verwendet, um danach die außerhalb dieser ROI liegenden Regionen in allen Kanälen



entfernen zu können. Im Anschluss wurden alle Hoechst33342<sup>+</sup> Zellkerne mit der Threshold-Funktion innerhalb der ROI markiert und automatisiert gezählt, sodass ausschließlich doppelt positive Zellkerne (TUNEL<sup>+</sup>Hoechst33342<sup>+</sup>/ki67<sup>+</sup>Hoechst33342<sup>+</sup>) in die Auswertung der proliferierenden/apoptotischen Zellen miteinbezogen wurden. Für die Evaluation der zellspezifischen Proliferation/Apoptose wurde vor der Bestimmung der doppeltpositiven Zellkerne die jeweilige LGALS3<sup>+</sup> Fläche/ACTA2<sup>+</sup> Fläche als ROI markiert und die außerhalb der ROI liegenden Bereiche exkludiert.

### 3.7.5. Konfokale Aufnahmen der Läsionen von VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-MΦ<sup>GFP-rep</sup> Mäusen

Die konfokalen Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 880 mit Airyscan Modul angefertigt. Mit der Bitplane Imaris Software (Version 8.4.1) wurde die En-Face Z-Stack Aufnahme der Aorta zu einem 3D Bild rekonstruiert.

### 3.7.6. Masson-Trichrom-Färbung

Zur Quantifizierung der Fibrose sowie zur Analyse des nekrotischen Kerns in den Läsionen wurde eine modifizierte Masson-Trichrom-Färbung (Trichrome stain kit, modified Massons, ScyTek Laboratories, Logan) durchgeführt. Die Proben wurden in Aqua destillata gewaschen, es erfolgte die Fixierung in einer Bouins solution bei 60 °C. Nach einer Stunde wurden die Proben bei Raumtemperatur für zehn Minuten stehen gelassen. Im Anschluss wurden die Proben in einer Küvette in fließendem Leitungswasser für mindestens zehn Minuten gewaschen. Zur Kernfärbung wurden die Objektträger für zehn Minuten mit Eisenhämatoxylin nach Weigert (Weigert A+B Lösung im Verhältnis von 1:1) bedeckt. Danach wurden die Proben erneut in fließendem Leitungswasser für zehn Minuten gewaschen. Es erfolgte die Färbung azidophiler Gewebselemente durch die Biebricher Scharlach-Säurefuchsin Lösung für zehn Minuten. Nach einem Waschschrift in Aqua destillata wurden die Kollagenfasern zunächst mit Phosphomolybdänsäure für 15 Minuten entfärbt und im Anschluss ohne Waschschrift mit Anilinblau für zehn Minuten blau gefärbt. Nach einem Waschschrift in Aqua destillata wurden die Objektträger für fünf Minuten in Essigsäure gegeben. Es erfolgte die Dehydrierung der Proben in einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe mit der anschließenden Inkubation in Xylen und der Abdeckung mit einem Deckglas. Die Schnitte wurden mit einem Leica DM6B Mikroskop abfotografiert, die Auswertung erfolgte mit Fiji. Dabei wurde die Fläche der blauen Kollagenfasern mittels Colour Threshold standardisiert und automatisiert markiert und gemessen. Die azellulären und gewebssarmen Areale (in der Masson-Trichrom-

Färbung weiße Areale) wurden als nekrotisches Areal definiert und ebenso mittels Colour Threshold automatisiert und standardisiert vermessen.

### 3.7.7. Oil-Red-Färbung

Die Lipide in den Läsionen wurden mit einer Oil-Red-O-Färbung gefärbt. Dazu wurden die Proben für fünf Minuten in PBS inkubiert und im Anschluss 10-mal in 2-Propanol (60 %) eingetaucht. Es erfolgte die Inkubation in Oil-Red-O (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, O1391 Oil-red-O solution). Erneut wurden die Proben 10-mal in 2-Propanol (60 %) eingetaucht und anschließend in fließendem Leitungswasser gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit Mayer's Hämalaun Lösung (Carl Roth GmbH, T865.2) für 30 Sekunden gefärbt und erneut in fließendem Leitungswasser für fünf Minuten gewaschen. Die Proben wurden mit Fluorescence Mounting Medium und einem Deckglas bedeckt und im Anschluss mit einem Leica DM6B Mikroskop abfotografiert. Die Vermessung der Oil-Red<sup>+</sup> Fläche erfolgte mit Fiji mittels Colour Threshold.

## 3.8. CCL2 ELISA und Cholesterin-Assay

Die Bestimmung von CCL2, Gesamt-Cholesterin, VLDL- und HDL-Cholesterin erfolgte in den Plasmaproben, welche durch die intrakardiale Blutentnahme nach 14 Wochen WTD gesammelt wurden. Der CCL2 ELISA (IBL international, BE45241) sowie der Cholesterin-Assay (abcam, ab65390) wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Es erfolgte die photometrische Bestimmung der optical density (OD) mit den entsprechenden Filterwellenlängen. Die Auswertung und Berechnung der Konzentrationen erfolgte mit Microsoft Excel.

## 3.9. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse sowie die Gestaltung der Graphen erfolgte mit GraphPad Prism 9. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde die Normalverteilung überprüft. Bei Annahme einer Normalverteilung wurde der ungepaarte t-Test angewandt. Bei nicht-parametrischen Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test zur Berechnung der statistischen Signifikanz durchgeführt. Zur Berechnung der Signifikanz auf Ebene der BCA wurde eine gemischte zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen („mixed-effects model“, implementiert ab GraphPad Prism 8.0) mit Geisser-Greenhouse Korrektur angewandt. Die Abbildungen im Ergebnisteil wurden mit Adobe Illustrator (26.0.1) erstellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. VSMCs interagieren mit Makrophagen über CCL2 in der Atherosklerose

In früheren Versuchen dieser Arbeitsgruppe konnte das Zusammenspiel von NG2<sup>+</sup> wandständigen Zellen und Cx3Cr1<sup>+</sup> Makrophagen in Atherosklerose demonstriert und quantifiziert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Expression von CCL2 in NG2<sup>+</sup> Zellen während der Atherogenese zunimmt. Der zellspezifische Knockout von CCL2 in NG2<sup>+</sup> VSMCs führte zu einer Abnahme der Zell-Zell-Kontakte zwischen LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen und ACTA2<sup>+</sup> VSMCs [202]. Während NG2 nicht ausschließlich von VSMCs exprimiert wird [204-206], gilt Myh11 als einer der spezifischsten Marker für VSMCs [207]. Um VSMCs in der Atherosklerose eindeutig identifizieren zu können, hat sich in der Literatur das Tamoxifen-induzierbare Myh11<sup>CreERT2</sup> Modell als Fate-Mapping Ansatz etabliert [159, 185, 187, 188]. In diesen „VSMC lineage tracing“ Mäusen (VSMC<sup>lin</sup> Mäuse) führt die Tamoxifen-Injektion zu einer spezifischen Aktivierung der Cre-Rekombinase in Myh11<sup>+</sup> Zellen, welche die Rekombination mit anschließender Transkription eines Reporterproteins zur Folge hat. Über dessen Expression können Myh11<sup>+</sup> VSMCs und deren Nachkommen unabhängig von einer möglichen Dedifferenzierung und dem daraus entstandenen Phänotyp hochspezifisch identifiziert werden [185].

#### 4.1.1. Robuste Interaktionen zwischen VSMCs und deren Nachkommen mit CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen in den Läsionen der VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-MΦ<sup>GFP-rep</sup> Mäuse

Mit den VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-MΦ<sup>GFP-rep</sup> Mäusen ist die Identifizierung von Myh11<sup>+</sup> VSMCs und deren Nachkommen über die Expression des rot fluoreszierenden Proteins „tdTomato“ und von CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen über die Expression des grün fluoreszierenden Proteins „GFP“ möglich. Durch den zusätzlichen ApoE-Knockout können gemeinsame Interaktionen von VSMCs und deren Nachkommen mit Makrophagen im Plaque visualisiert werden und deren Relevanz in der Atherogenese untersucht werden. Gleichzeitig kann zur Etablierung der Methodik überprüft werden, ob die Cre-Rekombinase durch die fünffache konsekutive Tamoxifen-Injektion effizient aktiviert wird und ob eine robuste Rekombination stattfindet. Im Anschluss an die Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen wurden die Tiere zur Induktion der Atherogenese 22-24 Wochen mit einer WTD angefüttert. Konfokale ex-vivo Aufnahmen von Läsionen auf Ebene der Aortenklappe von VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-MΦ<sup>GFP-rep</sup>

Mäusen bestätigten zunächst eine effiziente Rekombination durch die robuste Expression von tdTomato in Myh11<sup>+</sup> VSMCs und deren Nachkommen. Weiterhin zeigten sich ausgeprägte Interaktionen von VSMCs mit Makrophagen im Plaque (Abbildung 3a). In dreidimensionalen En-Face Aufnahmen der Aorta konnten ebenso zahlreiche Kontakte zwischen VSMCs und Makrophagen in den entzündlich veränderten Gefäßwänden nachgewiesen werden. Dabei befanden sich fast alle Makrophagen im direkten Umfeld von VSMCs. Interessanterweise waren die Interaktionen von VSMCs und Makrophagen hauptsächlich an der Oberfläche der Läsionen zu finden (Abbildung 3b).

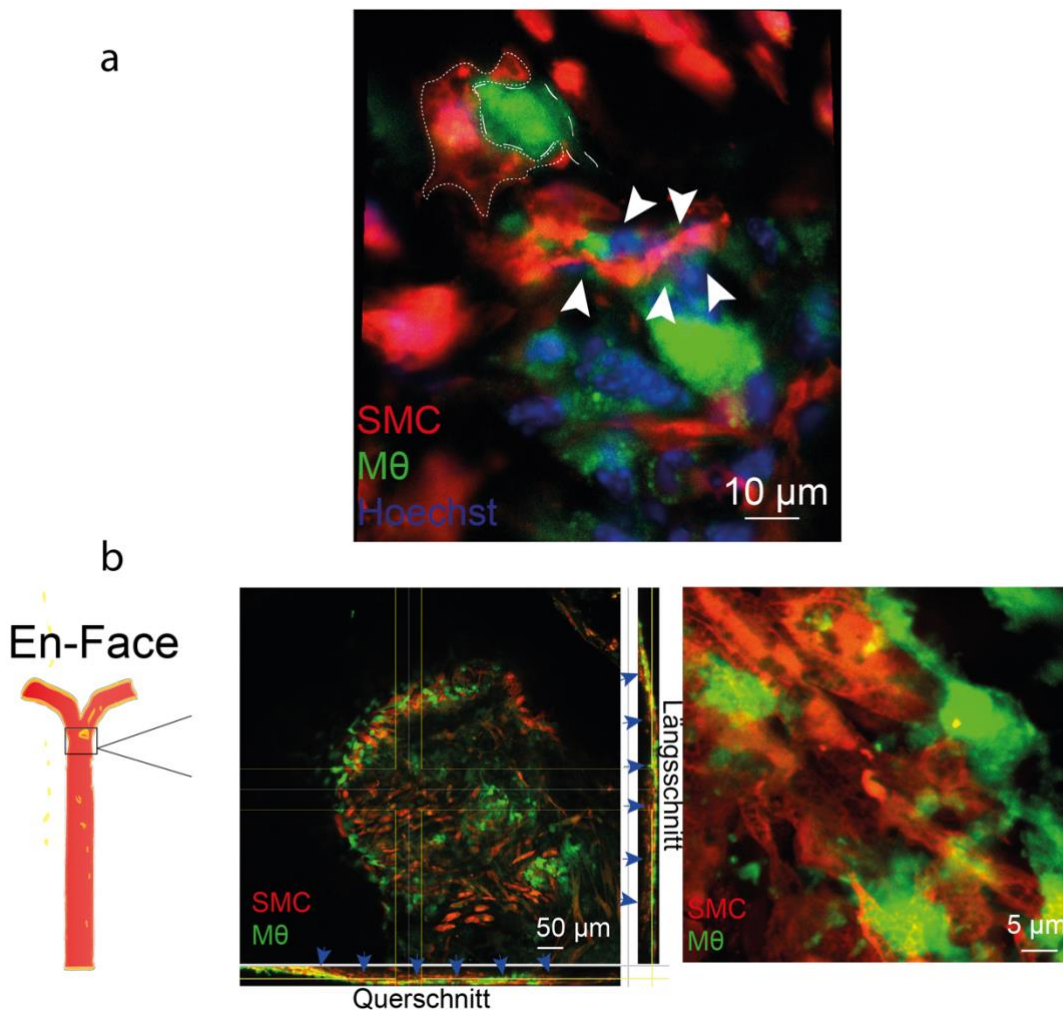


Abbildung 3: Interaktionen von Myh11<sup>+</sup> VSMCs und deren Nachkommen mit CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen

**(a)-(b)** Konfokale Aufnahmen atherosklerotischer Läsionen in den Gefäßen von VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-MΦ<sup>GFP-rep</sup> Mäusen nach 22-24 Wochen WTD. **(a)** Konfokale Aufnahme eines Plaques auf Ebene der Aortenklappe einer VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-MΦ<sup>GFP-rep</sup> Maus. Die Pfeile weisen auf die Kontakte zwischen VSMCs (rot) und CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen (grün). Zusätzlich wurde eine Kernfärbung (blau) durchgeführt. Im linken oberen Quadranten ist eine glatte Muskelzelle zu erkennen, die einen CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen umhüllt (gestrichelte Linie). Maßstab 10 µm. **(b)** Konfokale En-Face Z-stack

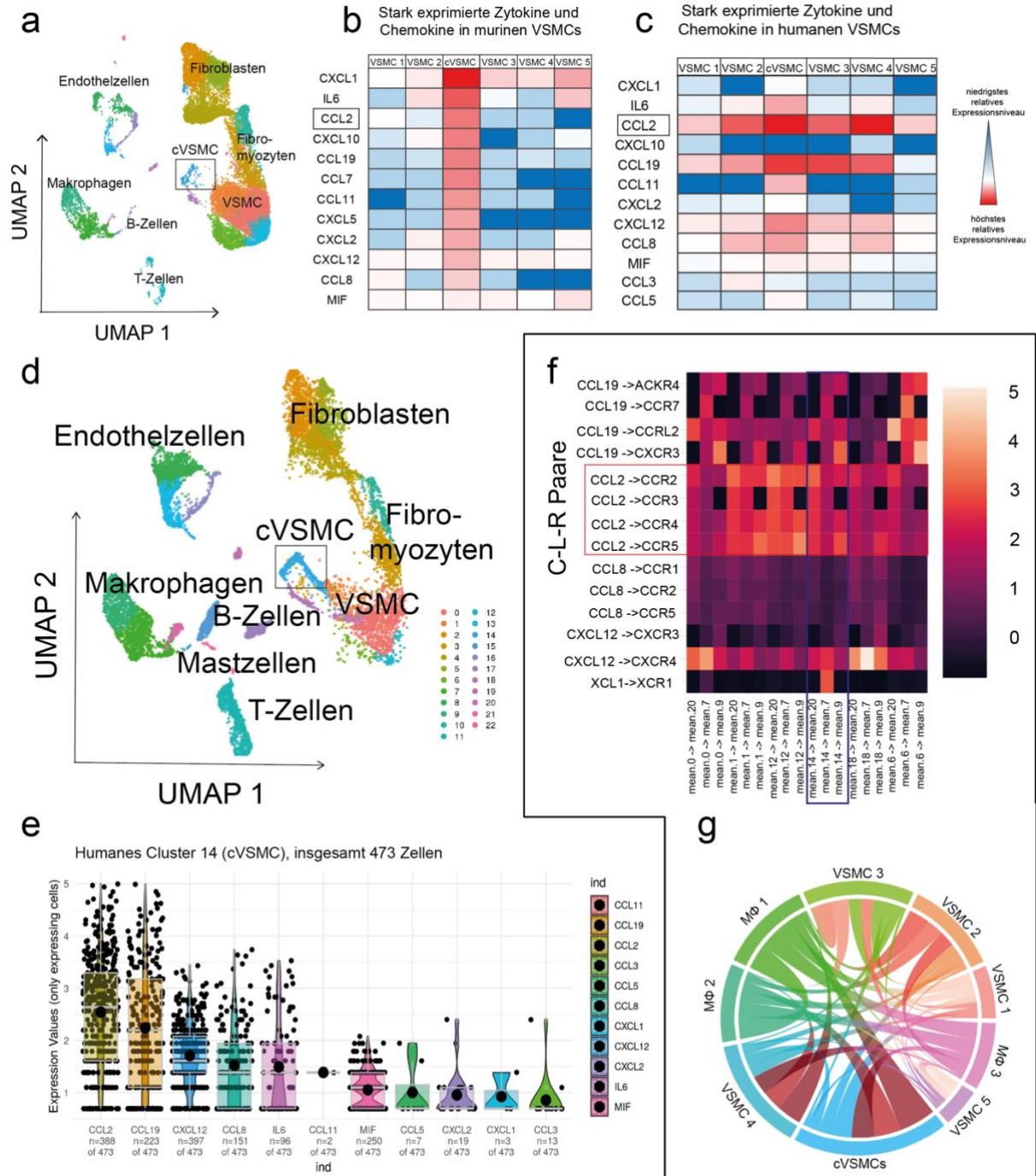
Aufnahme (ex vivo) einer Läsion in der Aorta einer VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-MΦ<sup>GFP-rep</sup> Maus. Zu sehen sind multiple Interaktionen zwischen CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen (grün) und VSMCs (rot). Die blauen Pfeile zeigen auf die Kontakte zwischen VSMCs und CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen, welche im Längs- und im Querschnitt des Z-stacks zu sehen sind. Maßstab 50 µm (links), 5 µm (rechts).

#### 4.1.2. VSMCs exprimieren CCL2 in der Atherosklerose und können über die CCL2-CCR2 Achse mit Makrophagen kommunizieren

Um die Relevanz der Expression von CCL2 in VSMCs während der Atherogenese zu untersuchen, wurden Daten zur Transkriptom-Analyse auf Einzelzellebene von Zellen aus humanen Läsionen der Koronargefäße und Läsionen auf Ebene der Aortenwurzel (scRNA seq Daten) von VSMC<sup>lin</sup> Mäusen, die von Wirka und Kollegen erhoben wurden [187], neu analysiert. In dem Datensatz konnten sechs charakteristische VSMC-Cluster in den humanen atherosklerotischen Läsionen anhand des Transkriptom-Profiles identifiziert werden (Abbildung 4d). Dabei zeigte sich eine prominente Expression von CCL2 durch alle VSMC-Subcluster (Abbildung 4c). Die Expression verschiedener Chemokine und Zytokine war in einer der Populationen sehr ausgeprägt, weshalb wir diese Population als chemotaktische VSMCs (cVSMCs) beschrieben. Unter all den von cVSMCs exprimierten Chemokinen war CCL2 das am stärksten exprimierte Chemokin (Abbildung 4c und 4e). Um darüber hinaus die Bedeutung der CCL2-CCR2 Achse für die Interaktion von VSMCs mit Makrophagen in der humanen Atherosklerose einordnen zu können, wurden die verschiedenen Kommunikationswege der zuvor identifizierten Makrophagen und VSMCs in einem Chemokin-Interaktom analysiert (Abbildung 4f und 4g). Vereinfacht dargestellt wurde dabei die Interaktion zwischen zwei Clustern durch die Bildung von Expressionsprodukten quantifiziert, welche über die Expression eines spezifischen Chemokin-Liganden auf der einen Seite und dem entsprechenden Chemokin-Rezeptor auf der anderen Seite berechnet wurden. CCL2 war in der Tat das Chemokin, das hauptsächlich für die Interaktion von VSMCs mit Makrophagen und dabei insbesondere von cVSMCs mit Makrophagen in der Atherosklerose verantwortlich sein könnte (Abbildung 4f und 4g).

Auch in den Transkriptom-Datensätzen zu den murinen Läsionen [187] konnten cVSMCs identifiziert werden (Abbildung 4a und 4b). Die Analyse auf spezifische Markergene ergab eine erhöhte Expression von PDGFRβ in murinen cVSMCs. Um die räumliche Verteilung dieser cVSMCs im Plaque untersuchen zu können, wurden Läsionen der VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-MΦ<sup>GFP-rep</sup> Mäuse in einer Immunfluoreszenz-Färbung für PDGFRβ analysiert. Interessanterweise

exprimierten insbesondere VSMCs, die an der Plaque-Oberfläche mit Makrophagen kommunizierten, PDGFR $\beta$  (Abbildung 4h).



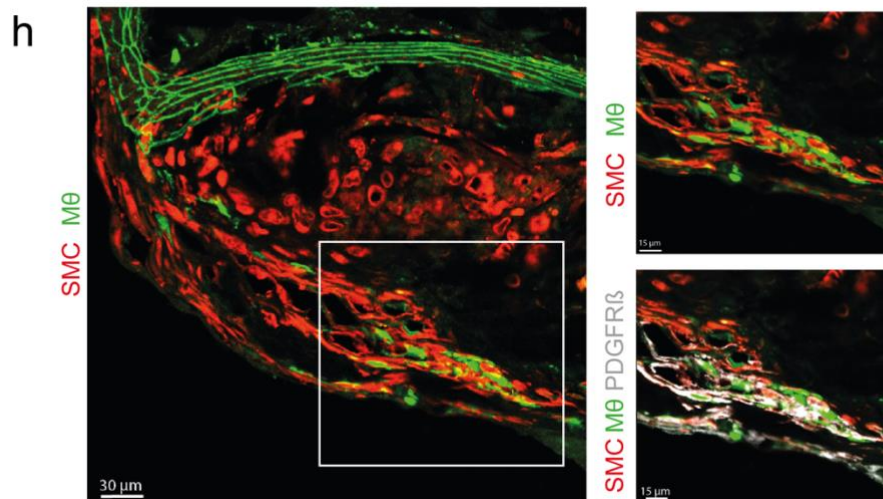


Abbildung 4: VSMCs können über die CCL2-CCR2 Achse mit Makrophagen kommunizieren

**(a)-(b)** Neu analysierte Daten aus Einzelzell-RNA Sequenzierungen von murinen atherosklerotischen Aortenwurzeln, erhoben von Wirka et al., GSE accession number: GSE131780 [187]. **(a)** UMAP basierte Dimensionsreduktion der Daten zur Einzelzell-Genexpression in murinen Läsionen.

**(b)** Darstellung unterschiedlich stark exprimierter Zytokine und Chemokine durch die verschiedenen murinen VSMC-Subpopulationen in einer heatmap. **(c)-(e)** Neu analysierte Daten aus Einzelzell-RNA Sequenzierungen von humanen Koronararterien, erhoben von Wirka et al., GSE accession number: GSE131780 [187]. **(c)** Darstellung unterschiedlich stark exprimierter Zytokine und Chemokine durch die verschiedenen humanen VSMC-Subpopulationen in einer heatmap. **(d)** UMAP basierte Dimensionalitätsreduktion der Daten zur Einzelzell-Genexpression in humanen Läsionen. **(e)** Violin plot mit der Darstellung stark exprimierter Zytokine und Chemokine durch die chemotaktischen VSMCs. Die Punkte repräsentieren Zellen mit unterschiedlich stark detektierbarer Expression des jeweiligen Gens. **(f)** Darstellung der Interaktionen zwischen Makrophagen und VSMCs durch Chemokin-Ligand Chemokin-Rezeptor Interaktionen in einer heatmap. In der roten Box sind Interaktionen, die von CCL2 vermittelt werden, hervorgehoben. Die blaue Box beinhaltet die Interaktionen durch chemotaktische VSMCs. **(g)** Darstellung der durch Chemokine vermittelten Zell-Zell Interaktionen zwischen den einzelnen Populationen der Makrophagen und VSMCs in einem Sehnendiagramm. Durch CCL2 vermittelte Interaktionen sind in rot dargestellt. Die Intensität der roten Farbe repräsentiert den Anteil der CCL2-CCR2 Achse an der jeweiligen Interaktion zwischen den Populationen. **(h)** Konfokale Aufnahme einer Immunfluoreszenz-Färbung für das Markergen PDGFR $\beta$  (weiß) von cVSMCs in den Läsionen auf Ebene der Aortenklappe in SMC<sup>lin</sup>; Cx3cr1-M $\Phi$ <sup>GFP-rep</sup> Mäusen nach 22-24 Wochen WTD. VSMC<sup>lin</sup> Zellen in rot, CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen in grün.

Zusammengefasst konnten aus den Transkriptom-Datensätzen von Wirka und Kollegen [187] VSMCs mit einer ausgeprägten chemotaktischen Signatur identifiziert werden. Unter den exprimierten Chemokinen dieser cVSMCs war CCL2 das am stärksten exprimierte Chemokin. Die Analyse der Chemokin-Kommunikationswege zwischen VSMCs und Makrophagen ergab, dass eine ausgeprägte Interaktion von cVSMCs mit Makrophagen über CCL2 möglich ist. In einer Immunfluoreszenz-Färbung für PDGFR $\beta$ , welches zuvor als Markergen der cVSMCs in murinen Läsionen identifiziert worden war, konnten cVSMCs an der Plaque-Oberfläche

lokalisiert werden. Dort hatten sich auch die meisten Interaktionen zwischen VSMCs und Makrophagen in Läsionen von VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-MΦ<sup>GFP-rep</sup> Mäusen gezeigt.

#### 4.2. Die Expression von CCL2 in VSMCs ist relevant für die Positionierung der Makrophagen in den Läsionen

Um zu überprüfen, wie das Verhalten von Makrophagen in Atherosklerose durch CCL2 aus VSMCs beeinflusst wird, wurde CCL2 in Myh11<sup>+</sup> VSMCs in Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Tieren über die Induktion der Cre-Rekombinase im Alter von sechs Wochen spezifisch ausgeknockt. Da murine Läsionen auf Ebene der Arteria brachiocephalica (BCA) in der Literatur als Surrogat für Läsionen humaner Koronararterien beschrieben werden [183], wurden die Läsionen in der BCA von männlichen Ccl2<sup>SMC+/+</sup> oder Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Wurfgeschwistern nach 14-wöchiger WTD in einer Immunfluoreszenz-Färbung für ACTA2<sup>+</sup> VSMCs, LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen und einer Kernfärbung (Hoechst) verglichen (Abbildung 6a). Ebenso wurden Läsionen auf Ebene der Aortenklappe in einer Immunfluoreszenz-Färbung für ACTA2<sup>+</sup> VSMCs, LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen und einer Kernfärbung (Hoechst) verglichen, da sich Gefäßzellen aus unterschiedlicher embryonaler Abstammung unterscheiden (Abbildung 6b) [170]. In Abbildung 5 sind die im Folgenden untersuchten Kompartimente des atherosklerotischen Plaques schematisch dargestellt.

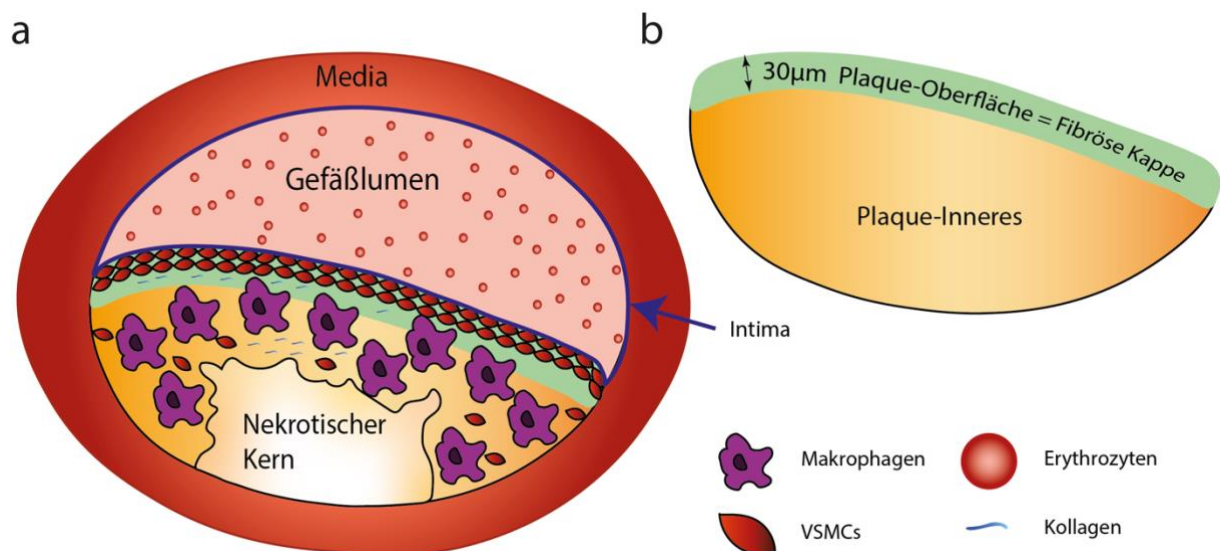


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Plaque-Komposition

a) Vereinfachte schematische Darstellung eines stenotisierten arteriellen Gefäßes. Zu sehen ist das durch die wachsende Läsion innerhalb der Intima eingeengte Gefäßlumen. An das Lumen grenzt die fibröse Kappe des Plaques, die hauptsächlich aus VSMCs und Kollagen gebildet wird. Das Plaque-Innere besteht unter anderem aus Makrophagen, VSMCs, extrazellulärer Matrix (EZM), sowie dem



---

nekrotischen Kern. b) Unterteilung des Plaques in fibröse Kappe (30 µm Plaque-Oberfläche) und Plaque-Inneres.

#### 4.2.1. Der genetische Knockout von CCL2 in VSMCs hat in den Läsionen auf Ebene der BCA eine Abnahme von Makrophagen an der Plaque-Oberfläche zur Folge

Zunächst wurde der relative Anteil der LGALS3<sup>+</sup> Fläche, bezogen auf die Fläche der gesamten Läsion sowie auf die Fläche der fibrösen Kappe, quantifiziert. Die Plaque-Fläche der Läsionen wurde ausgehend von der Lamina elastica interna bis zur luminalen Plaque-Oberfläche vermessen (Abbildung 6a und 6b). Die Plaque-Oberfläche, die von luminal betrachtet innerhalb eines 30 µm großen Diameter liegt, wurde entsprechend der anerkannten Literatur als fibröse Kappe definiert (Abbildung 5a und 5b, 6c) [196]. Die einzelnen Läsionen der BCA wurden an drei spezifischen Lokalisationen standardisiert untersucht. Analysiert wurde jeweils ein proximaler Schnitt direkt am Abgang der BCA aus dem Aortenbogen (0 µm), ein intermediärer Schnitt (180 µm vom proximalen Schnitt entfernt) und ein distaler Schnitt (360 µm vom proximalen Schnitt entfernt) pro Maus. Auf Ebene der Aortenklappe wurden die Läsionen in den drei Taschen der Klappe untersucht (1 Schnitt pro Maus, Abbildung 6b).

In den Läsionen auf Ebene der BCA ergab die Quantifizierung der relativen LGALS3<sup>+</sup> Fläche, bezogen auf die gesamte Plaque-Fläche, keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 6d). Dagegen führte der spezifische Knockout von CCL2 in VSMCs zu einer Abnahme von LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen an der Plaque-Oberfläche. Dies zeigte sich durch eine signifikante Abnahme der relativen LGALS3<sup>+</sup> Fläche innerhalb der fibrösen Kappe, bezogen auf die gesamte Fläche der fibrösen Kappe in den Läsionen von Ccl2<sup>SMC $\Delta$ / $\Delta$</sup>  Mäusen auf Ebene der BCA (Abbildung 6e). Der relative Anteil der LGALS3<sup>+</sup> Fläche von der gesamten Plaque-Fläche sowie von der Plaque-Oberfläche blieb in den Läsionen von Ccl2<sup>SMC $\Delta$ / $\Delta$</sup>  Mäusen im Vergleich zu Ccl2<sup>SMC<sup>+/+</sup></sup> Mäusen auf Ebene der Aortenklappe unverändert (Abbildung 6f und 6g).

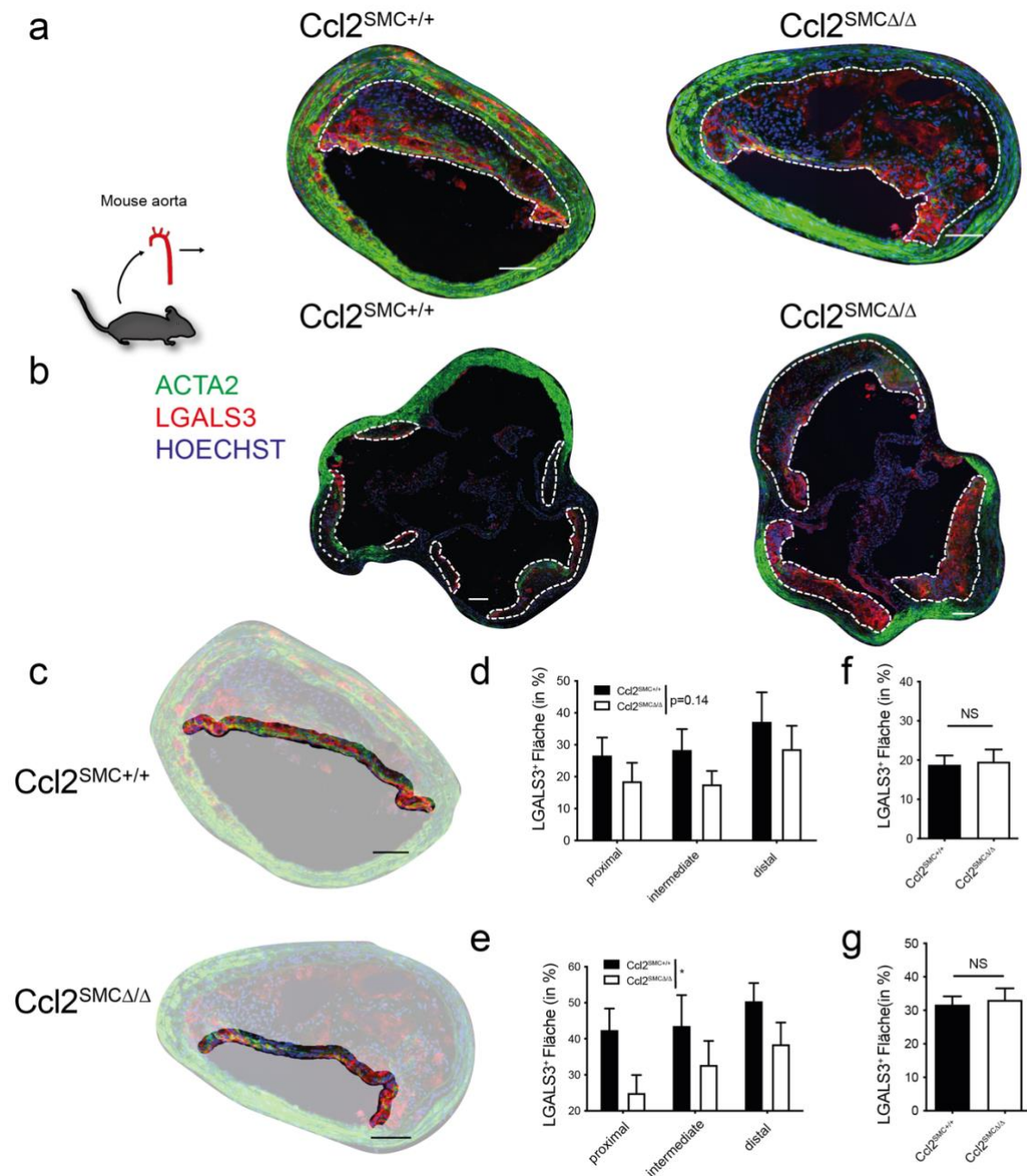


Abbildung 6: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Abnahme der Makrophagen an der Plaque-Oberfläche

**(a)** Beispielhafte Bilder einer Immunfluoreszenz-Färbung für LGALS3 (rot) und ACTA2 (grün) inklusive Kernfärbung (blau) auf Ebene der BCA von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die absolute Fläche der Läsionen in der Intima. Maßstab: 100  $\mu$ m. **(b)** Beispielhafte Bilder einer Immunfluoreszenz-Färbung für LGALS3 (rot) und ACTA2 (grün) inklusive Kernfärbung (blau) auf Ebene der Aortenklappe von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die absolute Fläche der Läsionen in der Intima. Maßstab: 100  $\mu$ m. **(c)** Beispielhafte Bilder einer Immunfluoreszenz-Färbung für LGALS3 (rot) und ACTA2 (grün) inklusive Kernfärbung (blau) auf Ebene der BCA von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD. Die Plaque-Oberfläche (luminale 30  $\mu$ m der Läsionen), in welcher sich die fibröse Kappe befindet, ist farblich hervorgehoben. **(d)-(e)** Analyse der Makrophagen in den Läsionen auf Ebene der BCA an drei spezifischen Lokalisationen durch die Quantifizierung der LGALS3<sup>+</sup> Fläche, angegeben in Prozent von der gesamten Fläche der Läsionen **(d)**, sowie in Prozent von der gesamten

Fläche der fibrösen Kappe (luminale 30  $\mu\text{m}$  der Läsionen) **(e)** in  $\text{Ccl2}^{\text{SMC}+/+}$  oder  $\text{Ccl2}^{\text{SMC}\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD (n = 10 pro Gruppe). **(f)-(g)** Analyse der Makrophagen in den Läsionen auf Ebene der Aortenklappe durch die Quantifizierung der  $\text{LGALS3}^+$  Fläche, angegeben in Prozent von der gesamten Fläche der Läsionen **(f)**, sowie in Prozent von der gesamten Fläche der fibrösen Kappe (luminale 30  $\mu\text{m}$  der Läsionen) **(g)** in  $\text{Ccl2}^{\text{SMC}+/+}$  oder  $\text{Ccl2}^{\text{SMC}\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD (n = 10-11 pro Gruppe). Für die Graphen **(d)-(e)** wurde eine gemischte zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen („mixed-effects model“) verwendet. Die Daten in den Graphen **(f)-(g)** sind normalverteilt, es wurde der Student's t-Test angewandt. \* kennzeichnet einen p-Wert von  $< 0,05$ . NS steht für nicht signifikant. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

#### 4.2.2. Läsionen von $\text{Ccl2}^{\text{SMC}\Delta/\Delta}$ Mäusen zeigen eine unterschiedliche Verteilung der Makrophagen mit einer Akkumulation der Makrophagen im Plaque-Inneren

Da es in den Läsionen von  $\text{Ccl2}^{\text{SMC}\Delta/\Delta}$  Mäusen spezifisch im Bereich der fibrösen Kappe zu einer signifikanten Abnahme von  $\text{LGALS3}^+$  Makrophagen bei gleichbleibendem Gehalt von  $\text{LGALS3}^+$  Makrophagen im gesamten Plaque kam, wurde die räumliche Verteilung der Makrophagen in den Läsionen der Kontrollgruppe und Experimentalgruppe ausführlicher analysiert. Hierfür wurde der Plaque in zwei Kompartimente bestehend aus Plaque-Oberfläche (fibröse Kappe) und Plaque-Innerem (Fläche unterhalb der fibrösen Kappe) unterteilt und der relative Anteil aller Makrophagen im Plaque, die sich an der Plaque-Oberfläche befanden (in der fibrösen Kappe), quantifiziert (Abbildung 7a).

Es war eine unterschiedliche Verteilung der Makrophagen in den Läsionen von  $\text{Ccl2}^{\text{SMC}\Delta/\Delta}$  Tieren zu beobachten.  $\text{LGALS3}^+$  Makrophagen waren in den Läsionen von  $\text{Ccl2}^{\text{SMC}\Delta/\Delta}$  Mäusen im Vergleich zu  $\text{Ccl2}^{\text{SMC}+/+}$  Mäusen vermehrt im Plaque-Inneren und weniger an der Plaque-Oberfläche zu finden. Dies zeigte sich in einer signifikanten Abnahme der relativen  $\text{LGALS3}^+$  Fläche an der Plaque-Oberfläche, bezogen auf die Gesamt- $\text{LGALS3}^+$  Fläche in den Läsionen auf Ebene der BCA von  $\text{Ccl2}^{\text{SMC}\Delta/\Delta}$  Mäusen (Abbildung 7b). Auf Klappenebene zeigte sich kein Unterschied in der Verteilung der Makrophagen (Abbildung 7c).

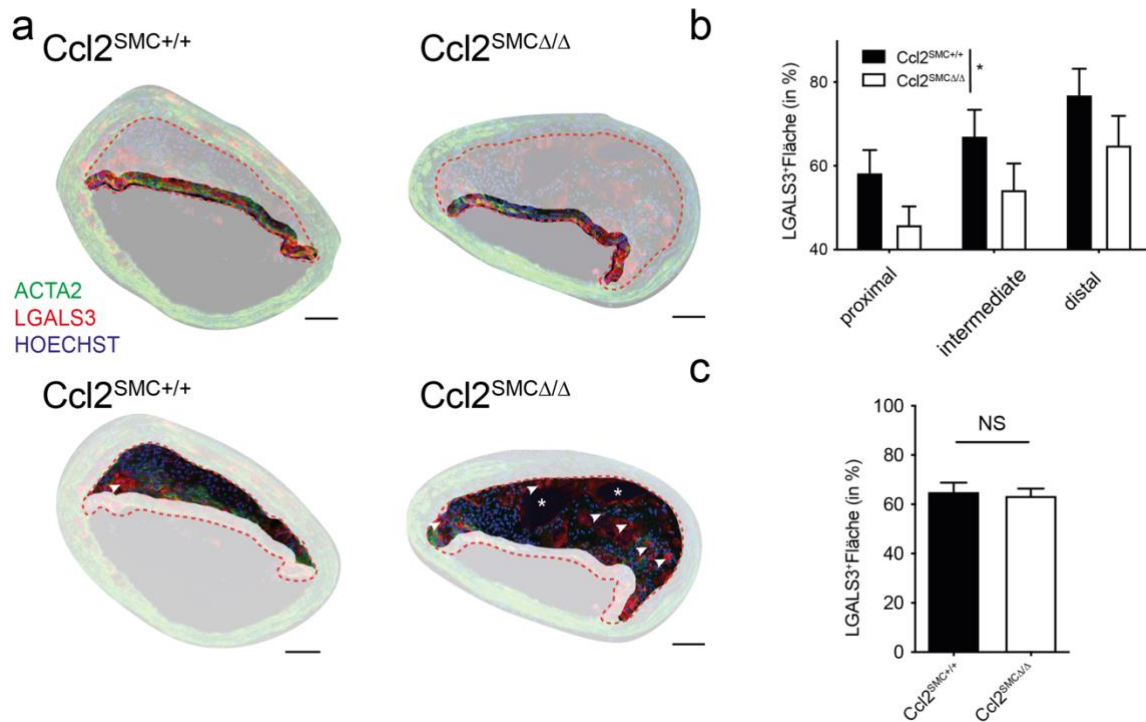


Abbildung 7: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Akkumulation der Makrophagen im Bereich des nekrotischen Kerns

**(a)** Beispielhafte Bilder einer Immunfluoreszenz-Färbung für LGALS3 (rot) und ACTA2 (grün) inklusive Kernfärbung (blau) auf Ebene der BCA von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD. In den oberen Bildern ist die Plaque-Oberfläche (luminale 30  $\mu$ m der Läsionen), in welcher sich die fibröse Kappe befindet, farblich hervorgehoben. In den unteren Bildern ist das Innere der Läsionen farblich hervorgehoben. Die rot gestrichelte Linie verdeutlicht jeweils die Begrenzungen der Läsionen in der Intima. Die Pfeile zeigen auf LGALS3+ Makrophagen im Inneren des Plaques. Der nekrotische Kern ist mit Sternchen gekennzeichnet. Zu sehen ist eine unterschiedliche Verteilung der LGALS3+ Makrophagen zwischen  $Ccl2^{SMC+/+}$  und  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen mit einer vermehrten Akkumulation von LGALS3+ Makrophagen im Inneren der Läsionen der BCA von  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen. Maßstab 100  $\mu$ m.

**(b)** Analyse der Verteilung von LGALS3+ Makrophagen in den Läsionen auf Ebene der BCA von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD durch die Quantifizierung der relativen LGALS3+ Fläche an der Plaque-Oberfläche (luminale 30  $\mu$ m der Läsionen) in Prozent von der gesamten LGALS3+ Fläche der Läsionen (n = 10 pro Gruppe). **(c)** Quantifizierung der relativen LGALS3+ Fläche an der Plaque-Oberfläche (luminale 30  $\mu$ m der Läsionen) in Prozent von der gesamten LGALS3+ Fläche der Läsionen auf Ebene der Aortenklappe von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD (n = 10-11 pro Gruppe). Für den Graphen **(b)** wurde eine gemischte zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen („mixed-effects model“) verwendet. Die Daten im Graphen **(c)** sind normalverteilt, es wurde der Student's t-Test angewandt. \* kennzeichnet einen p-Wert von  $< 0,05$ . NS steht für nicht signifikant. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

Zusammengefasst führte der genetische Knockout von CCL2 in VSMCs zu einer signifikanten Abnahme der LGALS3+ Makrophagen an der Plaque-Oberfläche. Bei gleichbleibendem Gehalt an LGALS3+ Makrophagen im gesamten Plaque zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung der Makrophagen mit einer signifikanten Abnahme des relativen Anteils der

LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen (bezogen auf alle LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen im Plaque) an der Plaque-Oberfläche und einer Zunahme im Plaque-Inneren.

#### 4.3. Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Zunahme der Apoptose und Nekrose in fortgeschrittenen Läsionen

Zur weiteren Abklärung des Einflusses von CCL2 aus VSMCs auf das Verhalten von Makrophagen in der Atherosklerose wurde die Zellproliferation und das Apoptoseverhalten von LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen in fortgeschrittenen Läsionen von Ccl2<sup>SMC<sup>+/+</sup></sup> Mäusen und Ccl2<sup>SMC<sup>Δ/Δ</sup></sup> Mäusen analysiert. Apoptotische Zellen durchlaufen einen programmierten Zelltod, bei dem es zur Fragmentierung der DNA kommt. Diese Fragmente können über die sogenannte TUNEL-Färbung visualisiert werden [229]. Die Apoptose wurde in einer Immunfluoreszenz-Färbung für ACTA2, LGALS3 und TUNEL inklusive Kernfärbung quantifiziert (Abbildung 8a). Zur Analyse der Zell-Proliferation in den Läsionen wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung für ACTA2, LGALS3 und den Proliferationsmarker ki67 inklusive Kernfärbung (Hoechst) durchgeführt (Abbildung 9a). Da insbesondere Ccl2<sup>SMC<sup>+/+</sup></sup> Mäuse an den distalen Lokalisationen sehr kleine Läsionen mit einer sehr geringen Zellzahl zeigten, wurden für die Quantifizierung der Apoptose und Zellproliferation auf Ebene der BCA ausschließlich fortgeschrittene Läsionen der proximalen und intermediären Lokalisationen berücksichtigt.

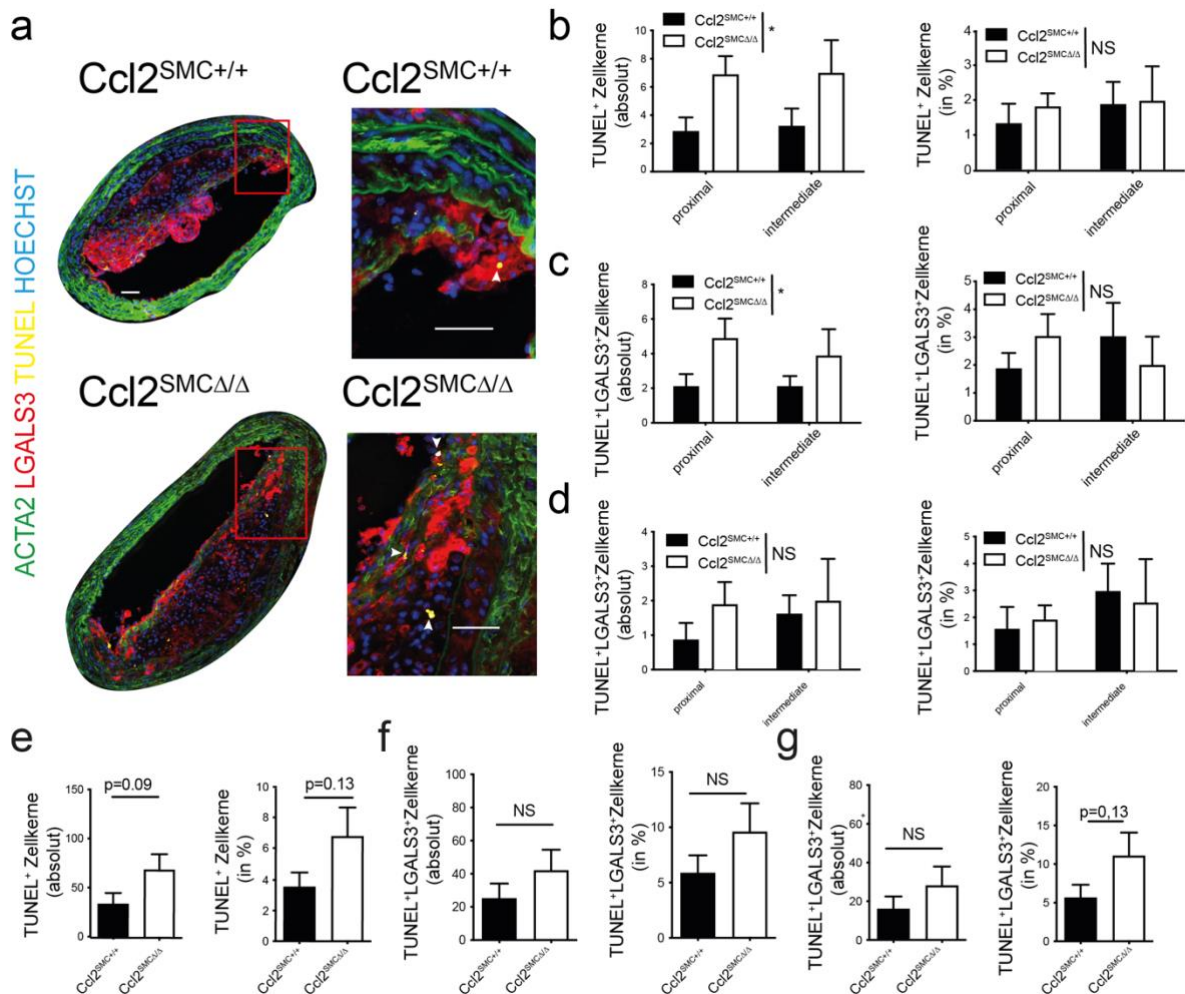


Abbildung 8: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Zunahme der Apoptose von Makrophagen im Plaque

**(a)** Beispielhafte Bilder einer Immunfluoreszenz-Färbung für LGALS3 (rot), ACTA2 (grün) und TUNEL (gelb) inklusive Kernfärbung (blau) auf Ebene der BCA von Ccl2<sup>SMC+/+</sup> oder Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD. Das rote Viereck zeigt den vergrößerten Bereich, der jeweils direkt daneben abgebildet ist. Die Pfeile zeigen auf apoptotische Zellen. Maßstab 100 µm. **(b)** Quantifizierung der Apoptose aller Zellen in den fortgeschrittenen Läsionen der BCA von Ccl2<sup>SMC+/+</sup> oder Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD, angegeben als absolute Anzahl der TUNEL<sup>+</sup> Zellkerne (**links**) und als relative Anzahl der TUNEL<sup>+</sup> Zellkerne in Prozent aller Zellkerne (**rechts**) (n = 9-10 pro Gruppe). **(c)** Quantifizierung der Apoptose von LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen in den fortgeschrittenen Läsionen der BCA von Ccl2<sup>SMC+/+</sup> oder Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD, angegeben als absolute Anzahl der TUNEL<sup>+</sup> LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne (**links**) und als relative Anzahl der TUNEL<sup>+</sup> LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne in Prozent aller LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne (**rechts**) (n = 9-10 pro Gruppe). **(d)** Quantifizierung der Apoptose von LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen an der Plaque-Oberfläche (luminale 30 µm der Läsionen) in den fortgeschrittenen Läsionen der BCA von Ccl2<sup>SMC+/+</sup> oder Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD, angegeben als absolute Anzahl der TUNEL<sup>+</sup> LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne (**links**) und als relative Anzahl der TUNEL<sup>+</sup> LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne in Prozent aller LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne (**rechts**) (n = 9-10 pro Gruppe). **(e)** Quantifizierung der Apoptose aller Zellen in den Läsionen auf Ebene der Aortenklappe von Ccl2<sup>SMC+/+</sup> oder Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD, angegeben als absolute Anzahl der TUNEL<sup>+</sup> Zellkerne (**links**) und als relative Anzahl der TUNEL<sup>+</sup> Zellkerne in Prozent aller Zellkerne (**rechts**) (n = 10 pro Gruppe). **(f)** Quantifizierung der Apoptose von LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen in den Läsionen auf Ebene der Aortenklappe von Ccl2<sup>SMC+/+</sup> oder Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD, angegeben als absolute

Anzahl der TUNEL<sup>+</sup> LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne (**links**) und als relative Anzahl der TUNEL<sup>+</sup> LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne in Prozent aller LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne (**rechts**) (n = 10 pro Gruppe). (**g**) Quantifizierung der Apoptose von LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen an der Plaque-Oberfläche (luminale 30 µm der Läsionen) auf Ebene der Aortenklappe von Ccl2<sup>SMC<sup>+/+</sup></sup> oder Ccl2<sup>SMC<sup>Δ/Δ</sup></sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD, angegeben als absolute Anzahl der TUNEL<sup>+</sup> LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne (**links**) und als relative Anzahl der TUNEL<sup>+</sup> LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne in Prozent aller LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne (**rechts**) (n=10 pro Gruppe). Für die Graphen (**b**)-(d) wurde eine gemischte zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen („mixed-effects model“) verwendet. Die Daten in den Graphen (**e**), (**f rechts**) und (**g rechts**) sind normalverteilt, es wurde der Student's t-Test angewandt. Die Daten in den Graphen (**f links**), (**g links**) sind nicht normalverteilt, es wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt \* kennzeichnet einen p-Wert von < 0,05. NS steht für nicht signifikant. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

#### 4.3.1. Zunahme der Apoptose bei unverändertem Proliferationsverhalten der Makrophagen in Ccl2<sup>SMC<sup>Δ/Δ</sup></sup> Tieren

Der Verlust der Expression von CCL2 in VSMCs führte zur vermehrten Apoptose in fortgeschrittenen Läsionen auf Ebene der BCA. Dies zeigte sich in einer signifikanten Zunahme der absoluten Anzahl TUNEL<sup>+</sup> Zellen in den Läsionen von Ccl2<sup>SMC<sup>Δ/Δ</sup></sup> Tieren (Abbildung 8b links). Die zellspezifische Untersuchung der LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen auf TUNEL<sup>+</sup> Zellkerne ergab darüber hinaus eine signifikante Zunahme der absoluten Anzahl apoptotischer LGALS3<sup>+</sup> TUNEL<sup>+</sup> Makrophagen in den Läsionen auf Ebene der BCA von Ccl2<sup>SMC<sup>Δ/Δ</sup></sup> Tieren (Abbildung 8c links). Der relative Anteil der TUNEL<sup>+</sup> Kerne, bezogen auf alle Zellkerne, sowie der relative Anteil der LGALS3<sup>+</sup> TUNEL<sup>+</sup> Zellkerne, bezogen auf die Gesamtheit der Zellkerne von LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen, blieb jeweils unverändert (Abbildung 8b und 8c, jeweils rechts). Da in der fibrösen Kappe eine Abnahme des Makrophagen-Gehalts beobachtet werden konnte, wurden LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen lokalisationspezifisch an der Plaque-Oberfläche auf ein unterschiedliches Apoptoseverhalten überprüft. Die relative und absolute Quantifizierung der Apoptose von LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen in der fibrösen Kappe der Läsionen von Ccl2<sup>SMC<sup>+/+</sup></sup> und Ccl2<sup>SMC<sup>Δ/Δ</sup></sup> Tieren zeigte keine signifikanten Unterschiede auf Ebene der BCA (Abbildung 8d).

Auf Ebene der Aortenklappe konnte ein Trend zur Zunahme der absoluten und relativen Anzahl von TUNEL<sup>+</sup> Zellkernen beobachtet werden, dieser war jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 8e). Die zellspezifische Quantifizierung der relativen und absoluten Anzahl apoptotischer Makrophagen zeigte, bezogen auf den gesamten Plaque und auf die fibröse Kappe, in den Läsionen auf Ebene der Aortenklappe keine Unterschiede zwischen Ccl2<sup>SMC<sup>+/+</sup></sup> und Ccl2<sup>SMC<sup>Δ/Δ</sup></sup> Tieren (Abbildung 8f und 8g). Sowohl auf Ebene der BCA als auch auf Ebene der Aortenklappe ergab die relative und absolute Analyse aller proliferierenden Zellen

sowie zellspezifisch aller proliferierenden Makrophagen kein verändertes Proliferationsverhalten zwischen  $Ccl2^{SMC+/+}$  und  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren (Abbildung 9b-g).

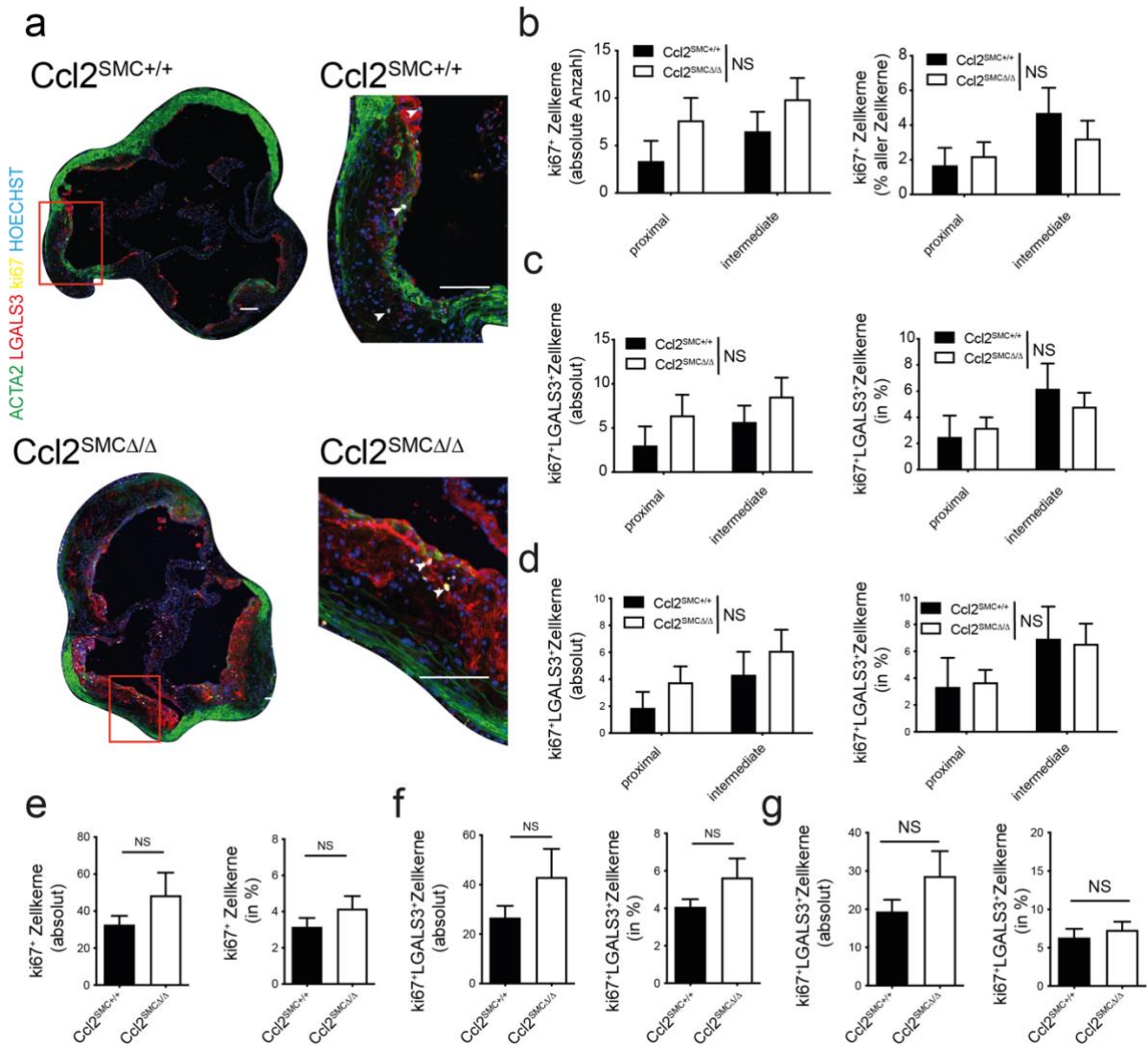


Abbildung 9: Der Knockout von CCL2 in VSMCs hat keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Makrophagen im Plaque

**(a)** Beispielhafte Bilder einer Immunfluoreszenz-Färbung für LGALS3 (rot), ACTA2 (grün) und ki67 (gelb) inklusive Kernfärbung (blau) auf Ebene der Aortenklappe von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD. Das rote Viereck zeigt den vergrößerten Bereich, der jeweils direkt daneben abgebildet ist. Die Pfeile zeigen auf proliferierende Zellen. Maßstab 100  $\mu$ m. **(b)** Quantifizierung der Zellproliferation in den fortgeschrittenen Läsionen der BCA von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD, angegeben als absolute Anzahl der ki67<sup>+</sup> Zellkerne (**links**) und als relative Anzahl der ki67<sup>+</sup> Zellkerne in Prozent aller Zellkerne (**rechts**) (n = 8-9 pro Gruppe). **(c)** Quantifizierung der Zellproliferation von LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen in den fortgeschrittenen Läsionen der BCA von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD, angegeben als absolute Anzahl der ki67<sup>+</sup> LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne (**links**) und als relative Anzahl der ki67<sup>+</sup> LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne in Prozent aller LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne (**rechts**) (n = 8-9 pro Gruppe). **(d)** Quantifizierung der Zellproliferation von LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen an der Plaque-Oberfläche (luminale 30  $\mu$ m der Läsionen) in den fortgeschrittenen Läsionen der BCA von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD, angegeben als absolute Anzahl der ki67<sup>+</sup> LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne (**links**) und als relative Anzahl der ki67<sup>+</sup> LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne in Prozent aller LGALS3<sup>+</sup> Zellkerne (**rechts**) (n = 8-9 pro Gruppe). **(e)**



Quantifizierung der Zellproliferation in den Läsionen auf Ebene der Aortenklappe von  $Ccl2^{SMC^{+/+}}$  oder  $Ccl2^{SMC^{\Delta/\Delta}}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD, angegeben als absolute Anzahl der  $ki67^+$  Zellkerne (**links**) und als relative Anzahl der  $ki67^+$  Zellkerne in Prozent aller Zellkerne (**rechts**) ( $n = 9-10$  pro Gruppe). **(f)** Quantifizierung der Zellproliferation von  $LGALS3^+$  Makrophagen in den Läsionen auf Ebene der Aortenklappe von  $Ccl2^{SMC^{+/+}}$  oder  $Ccl2^{SMC^{\Delta/\Delta}}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD, angegeben als absolute Anzahl der  $ki67^+$   $LGALS3^+$  Zellkerne (**links**) und als relative Anzahl der  $ki67^+$   $LGALS3^+$  Zellkerne in Prozent aller  $LGALS3^+$  Zellkerne (**rechts**) ( $n = 9-10$  pro Gruppe). **(g)** Quantifizierung der Zellproliferation von  $LGALS3^+$  Makrophagen an der Plaque-Oberfläche (luminale  $30\ \mu m$  der Läsionen) auf Ebene der Aortenklappe von  $Ccl2^{SMC^{+/+}}$  oder  $Ccl2^{SMC^{\Delta/\Delta}}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD, angegeben als absolute Anzahl der  $ki67^+$   $LGALS3^+$  Zellkerne (**links**) und als relative Anzahl der  $ki67^+$   $LGALS3^+$  Zellkerne in Prozent aller  $LGALS3^+$  Zellkerne (**rechts**) ( $n = 9-10$  pro Gruppe). Für die Graphen **(b)-(d)** wurde eine gemischte zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen („mixed-effects model“) verwendet. Die Daten in den Graphen **(e), (f)** und **(g links)** sind normalverteilt, es wurde der Student's t-Test angewandt. Die Daten im Graphen **(g rechts)** sind nicht normalverteilt, es wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. NS steht für nicht signifikant. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

#### 4.3.2. Zunahme des nekrotischen Kerns in den Läsionen von $Ccl2^{SMC^{\Delta/\Delta}}$ Tieren

Apoptotische Zellen werden im Verlauf sekundär nekrotisch und führen konsekutiv zu einer Zunahme der Nekrose im Plaque [230]. Die Auswirkungen einer gestörten CCL2 Produktion in VSMCs auf den nekrotischen Kern wurden mittels Masson-Trichrom-Färbung analysiert (Abbildung 10a). Die vergleichende quantitative Analyse des nekrotischen Kerns in Läsionen auf Ebene der BCA ergab, relativ und absolut berechnet, keine Unterschiede zwischen  $Ccl2^{SMC^{+/+}}$  und  $Ccl2^{SMC^{\Delta/\Delta}}$  Tieren (Abbildung 10b und 10c). Dagegen führte der Verlust der Expression von CCL2 in VSMCs zu einer signifikanten Zunahme der Nekrose in den fortgeschrittenen Läsionen auf Ebene der Aortenklappe. Sowohl die Quantifizierung der absoluten nekrotischen Fläche als auch die Analyse der relativen nekrotischen Fläche, bezogen auf die Plaque-Fläche, ergab eine signifikante Zunahme des nekrotischen Kerns in den Läsionen von  $Ccl2^{SMC^{\Delta/\Delta}}$  Tieren auf Ebene der Aortenklappe (Abbildung 10d und 10e).

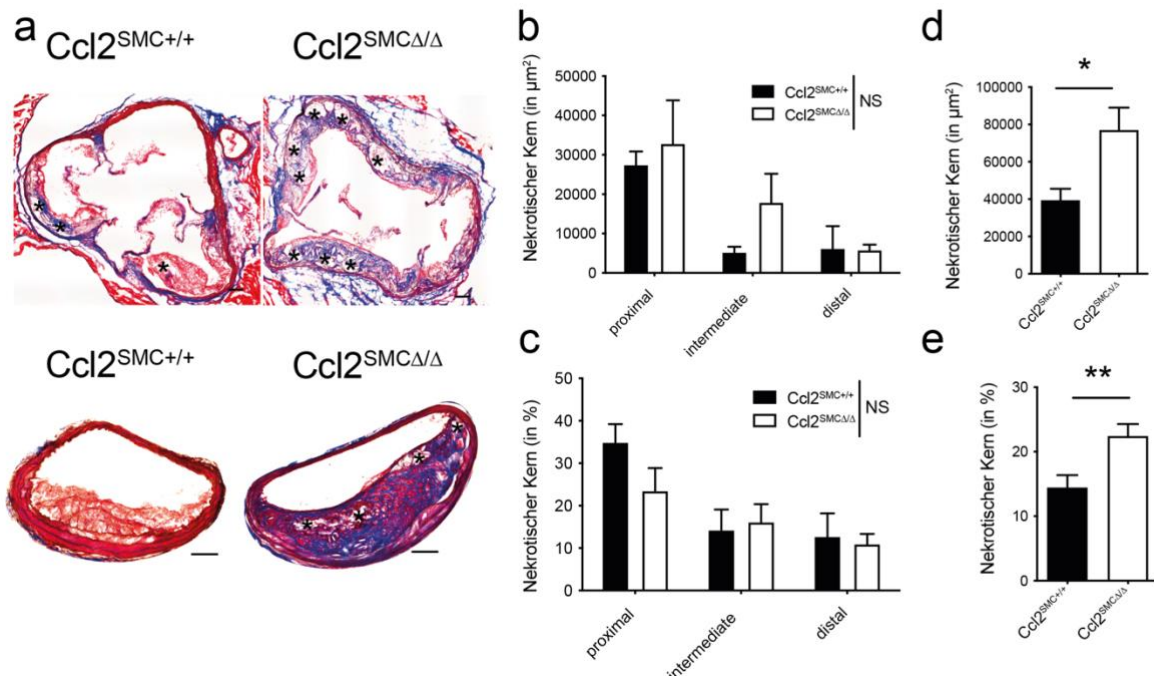


Abbildung 10: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer vermehrten Nekrose im Plaque

(a) Beispielhafte Bilder einer Masson-Trichrom-Färbung auf Ebene der Aortenklappe (oben) und auf Ebene der BCA (unten) von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD. Die Kollagenfasern färben sich blau, Muskelfasern färben sich rot und Zellkerne färben sich schwarz. Die Sternchen kennzeichnen nekrotische Areale. (b)-(c) Quantifizierung des nekrotischen Kerns, angegeben als absolute nekrotische Fläche in  $\mu m^2$  (b) und als nekrotische Fläche in Prozent von der gesamten Fläche der Läsionen (c) an drei spezifischen Lokalisationen der BCA von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD (n = 7-10 pro Gruppe). (d)-(e) Quantifizierung des nekrotischen Kerns, angegeben als absolute nekrotische Fläche in  $\mu m^2$  (d) und als relative nekrotische Fläche in Prozent von der gesamten Fläche der Läsionen (e) auf Ebene der Aortenklappe von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD (n = 9-10 pro Gruppe). Für die Graphen (b)-(c) wurde eine gemischte zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen („mixed-effects model“) verwendet. Die Daten in den Graphen (d)-(e) sind normalverteilt, es wurde der Student's t-Test angewandt. \* kennzeichnet einen p-Wert von  $< 0,05$ . \*\* kennzeichnet einen p-Wert von  $< 0,01$ . NS steht für nicht signifikant. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

Zusammengefasst zeigte sich in den Läsionen von  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren im Vergleich zu  $Ccl2^{SMC+/+}$  Tieren eine signifikante Zunahme der Apoptose und Nekrose. Das Proliferationsverhalten der Zellen blieb in den Läsionen von  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren unverändert.

#### 4.4. Der genetische Knockout von CCL2 führt zu einer Exazerbation der lokalen Inflammation in den Gefäßwänden

Um zu überprüfen, wie sich das veränderte Verhalten von Makrophagen in  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren auf die lokale Inflammation in den Gefäßwänden auswirkt, wurde die Größe und die Stabilität der Läsionen untersucht. Hierfür wurden neben dem nekrotischen Kern weitere für die Stabilität der Läsionen wichtige Eigenschaften wie das Ausmaß der Lipidablagerungen im

Plaques, die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, sowie die Komposition der fibrösen Kappe quantifiziert und analysiert [16]. Die Fläche sowie die zelluläre Komposition der Läsionen wurde in einer Immunfluoreszenz-Färbung für ACTA<sup>+</sup> VSMCs, LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen und einer Kernfärbung (Hoechst) analysiert (Abbildung 6a und 6b). Um die Lipidablagerung in den Läsionen der BCA von Ccl2<sup>SMC<sup>+/+</sup></sup> und Ccl2<sup>SMC<sup>Δ/Δ</sup></sup> Tieren vergleichen zu können, wurden die lipidhaltigen Flächen der Läsionen mittels Oil-Red-Färbung untersucht (Abbildung 11a). VSMCs sind nicht nur ein wichtiger Bestandteil der fibrösen Kappe, sondern tragen auch maßgeblich zur Ausbildung der extrazellulären Matrix im Plaque bei, die hauptsächlich aus Kollagen besteht [231]. Die Kollagenfasern wurden mittels Masson-Trichrom-Färbung quantifiziert (Abbildung 10a). Zusätzlich wurde das Transkriptom aller Zellen der Media und Intima in einem bulk-RNA Sequenzierungsansatz charakterisiert (Abbildung 13a).

#### 4.4.1. Zunahme der atherosklerotischen Krankheitslast in Ccl2<sup>SMC<sup>Δ/Δ</sup></sup> Tieren

Die Exazerbation der Atherosklerose, die bereits in Ng2-Cre<sup>+</sup>; Ccl2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> Tieren beobachtet worden war [202], zeigte sich ebenfalls in der Analyse der Läsionen von Myh11<sup>cre-ERT2</sup>; CCL2<sup>fl/fl</sup>; ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen. Im Vergleich zu Ccl2<sup>SMC<sup>+/+</sup></sup> Wurfgeschwistern konnte auf Ebene der BCA eine signifikante Zunahme der absoluten Läsionsgröße in Ccl2<sup>SMC<sup>Δ/Δ</sup></sup> Mäusen nach 14-wöchiger WTD beobachtet werden (Abbildung 11b). Klinische Komplikationen der Atherosklerose entstehen unter anderem durch die zunehmende Stenosierung des Gefäßlumens und der daraus resultierenden Abnahme einer suffizienten Blutversorgung im distal der Stenose gelegenen Stromgebiet. Über reaktive vaskuläre Umbauprozesse (outward remodeling) kann die Fläche des Gefäßlumens und damit der Blutfluss trotz der konsekutiven Expansion der Läsionen aufrechterhalten werden [232]. Neben der signifikanten Zunahme der absoluten Läsionsgröße führte der genetische Knockout von CCL2 in VSMCs zu einer Abnahme der Gefäßlumina auf Ebene der BCA. Dies zeigte sich in einer hochsignifikanten Zunahme der prozentualen Plaque-Größe, bezogen auf die gesamte innere Gefäßfläche (Fläche innerhalb der Lamina elastica interna, bestehend aus Gefäßläsion und Gefäßlumen). Damit kann von einer Stenosierung der BCA von zunehmender hämodynamischer Relevanz in Ccl2<sup>SMC<sup>Δ/Δ</sup></sup> Mäusen ausgegangen werden (Abbildung 11c). Die Quantifizierung der absoluten und relativen Lipidfläche ergab keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 11d und 11e). Auf Ebene der Aortenklappe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Analyse der absoluten Plaque-Größe zwischen Ccl2<sup>SMC<sup>+/+</sup></sup> und Ccl2<sup>SMC<sup>Δ/Δ</sup></sup> Tieren (Abbildung 11f).

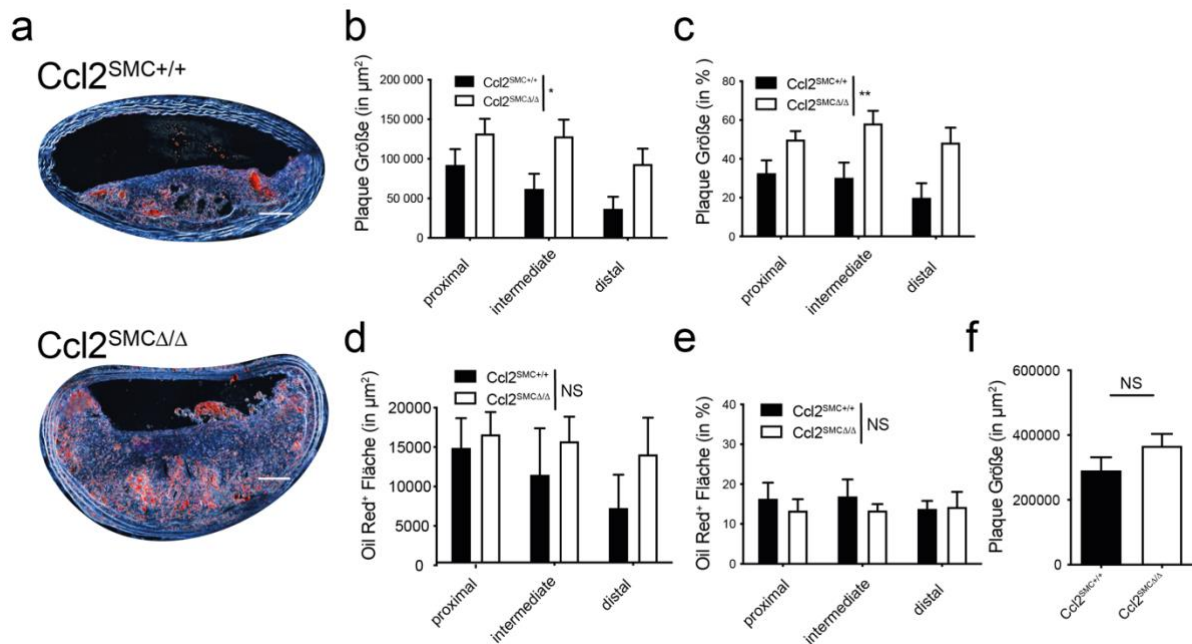


Abbildung 11: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Zunahme der Plaque-Größe bei gleichbleibendem Lipid-Gehalt

(a) Repräsentative Bilder einer Oil-Red-Färbung (orange) auf Ebene der BCA von *Ccl2*<sup>SMC+/+</sup> oder *Ccl2*<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD. Maßstab: 100 µm. (b) Quantifizierung der absoluten Fläche der Läsionen in µm<sup>2</sup> an den drei spezifischen Lokalisationen der BCA von *Ccl2*<sup>SMC+/+</sup> oder *Ccl2*<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD (n = 10-11 pro Gruppe). (c) Quantifizierung der relativen Plaque-Größe, angegeben in Prozent von der inneren Gefäßfläche (begrenzt durch die Lamina elastica interna), an drei spezifischen Lokalisationen der BCA von *Ccl2*<sup>SMC+/+</sup> oder *Ccl2*<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD (n = 10-11 pro Gruppe). (d)-(e) Quantifizierung der absoluten (d) und relativen (e) Oil-Red<sup>+</sup> Fläche, angegeben in µm<sup>2</sup> (absolut) und in Prozent von der gesamten Plaque-Fläche (relativ), an drei spezifischen Lokalisationen der BCA von *Ccl2*<sup>SMC+/+</sup> oder *Ccl2*<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD (n = 8-10 pro Gruppe). (f) Quantifizierung der absoluten Plaque Größe in µm<sup>2</sup> auf Ebene der Aortenklappe von *Ccl2*<sup>SMC+/+</sup> oder *Ccl2*<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD (n = 10-11 pro Gruppe). Für die Graphen (b)-(e) wurde eine gemischte zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen („mixed-effects model“) verwendet. Die Daten im Graphen (f) sind normalverteilt, es wurde der Students t-Test angewandt. \* kennzeichnet einen p-Wert von < 0,05. \*\* kennzeichnet einen p-Wert von < 0,01. NS steht für nicht signifikant. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

#### 4.4.2. Verminderte Plaque-Stabilität durch Verlust der Expression von Ccl2 in VSMCs

In den Läsionen von *Ccl2*<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen fiel auf Ebene der Aortenklappe im Vergleich zu *Ccl2*<sup>SMC+/+</sup> Mäusen eine unterschiedliche zelluläre Komposition der fibrösen Kappe auf. Die Quantifizierung der relativen ACTA2<sup>+</sup> Fläche, bezogen auf die Fläche der fibrösen Kappe, ergab eine signifikante Abnahme der kontraktilen ACTA2<sup>+</sup> VSMCs in der fibrösen Kappe der Läsionen von *Ccl2*<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen, was auf eine instabilere fibröse Kappe hinweist (Abbildung 12d). Die Quantifizierung der relativen ACTA2<sup>+</sup> Fläche, bezogen auf die gesamte Plaque-Fläche, zeigte auf Ebene der Aortenklappe keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 12c). Auf Ebene

der BCA blieb die relative ACTA2<sup>+</sup> Fläche, bezogen auf die gesamte Plaque-Fläche und auf die fibröse Kappe, unverändert (Abbildung 12a und 12b). Die spezifische genetische Ausschaltung von CCL2 in VSMCs hatte sowohl auf Ebene der Aortenklappe als auch auf Ebene der BCA keinen signifikanten Einfluss auf den Gehalt der Kollagenfasern in den Läsionen. Die relative Fläche der in der Masson-Trichrom-Färbung sichtbaren Kollagenfasern, bezogen auf die Plaque-Fläche, war jeweils ohne signifikante Unterschiede zwischen Ccl2<sup>SMC+/+</sup> und Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen (Abbildung 12e und 12f).

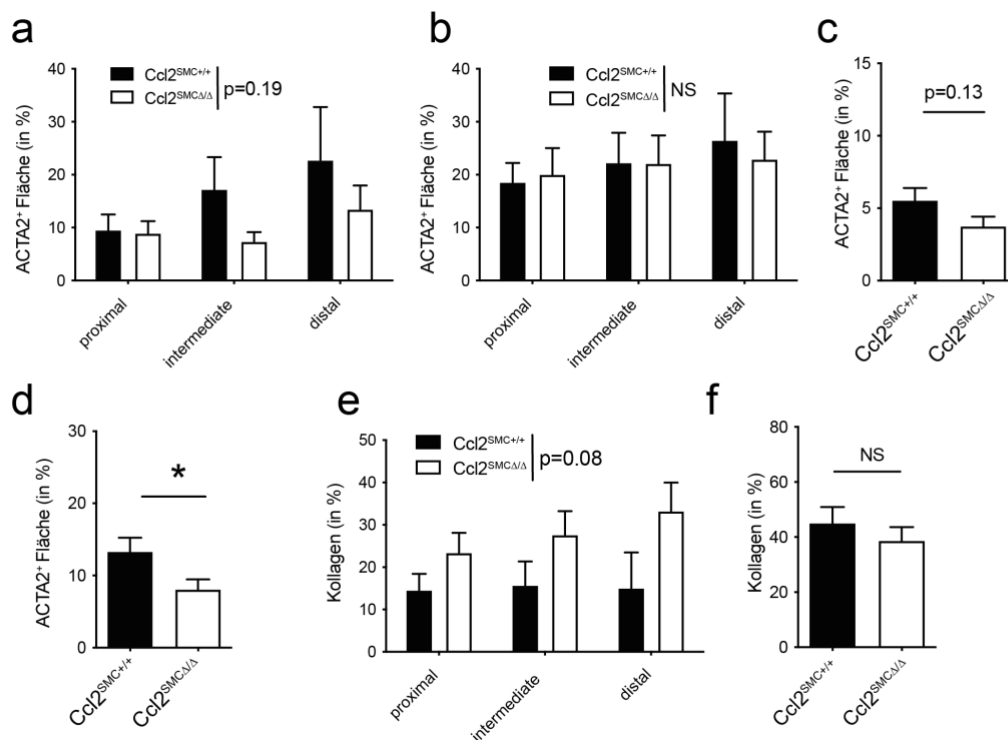


Abbildung 12: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Abnahme der Plaque-Stabilität

**(a)-(b)** Analyse der kontraktilen ACTA2<sup>+</sup> VSMCs in den Läsionen auf Ebene der BCA an drei spezifischen Lokalisationen durch die Quantifizierung der ACTA2<sup>+</sup> Fläche, angegeben in Prozent von der gesamten Fläche der Läsionen **(a)**, sowie in Prozent von der gesamten Fläche der fibrösen Kappe (luminale 30 μm der Läsionen) **(b)** in Ccl2<sup>SMC+/+</sup> oder Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD (n = 10 pro Gruppe). **(c)-(d)** Analyse der kontraktilen ACTA2<sup>+</sup> VSMCs in den Läsionen auf Ebene der Aortenklappe durch die Quantifizierung der ACTA2<sup>+</sup> Fläche, angegeben in Prozent von der gesamten Fläche der Läsionen **(c)**, sowie in Prozent von der gesamten Fläche der fibrösen Kappe (luminale 30 μm der Läsionen) **(d)** in Ccl2<sup>SMC+/+</sup> oder Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD (n = 10-11 pro Gruppe). **(e)** Analyse der Kollagenfasern in den Läsionen auf Ebene der BCA durch die Quantifizierung der Fläche der Kollagenfasern, angegeben in Prozent von der gesamten Fläche der Läsionen, in Ccl2<sup>SMC+/+</sup> oder Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD (n = 7-10 pro Gruppe). **(f)** Analyse der Kollagenfasern in den Läsionen auf Ebene der Aortenklappe durch die Quantifizierung der Fläche der Kollagenfasern, angegeben in Prozent von der gesamten Fläche der Läsionen, in Ccl2<sup>SMC+/+</sup> oder Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen nach 14 Wochen WTD (n = 9-10 pro Gruppe). Für die Graphen **(a)**, **(b)**, **(e)** wurde eine gemischte zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen („mixed-effects model“) verwendet. Die Daten in den Graphen **(c)**, **(d)**, **(f)** sind normalverteilt, es wurde der Student's t-Test angewandt. \*

kennzeichnet einen p-Wert von  $< 0,05$ . NS steht für nicht signifikant. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

#### 4.4.3. Exazerbation der lokalen Inflammation in Aorten von $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$ Tieren

Um das Ausmaß der Inflammation in den Gefäßwänden detaillierter bestimmen zu können, wurde das gesamte Transkriptom von Zellen der Media und Intima der Aorta in einem bulk-RNA Sequenzierungsansatz untersucht (Abbildung 13a). Die Analyse der differentiell regulierten Gene der medialen und intimalen Zellen aus Aorten von  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren ergab eine Zunahme der lokalen Inflammation in der Gefäßwand im Vergleich zu  $Ccl2^{SMC+/+}$  Tieren. Unter den signifikant hochregulierten Genen waren insbesondere pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine wie *Il1a*, *Il1b*, *Ccl3* und *Ccl5* (Abbildung 13b und 13c).

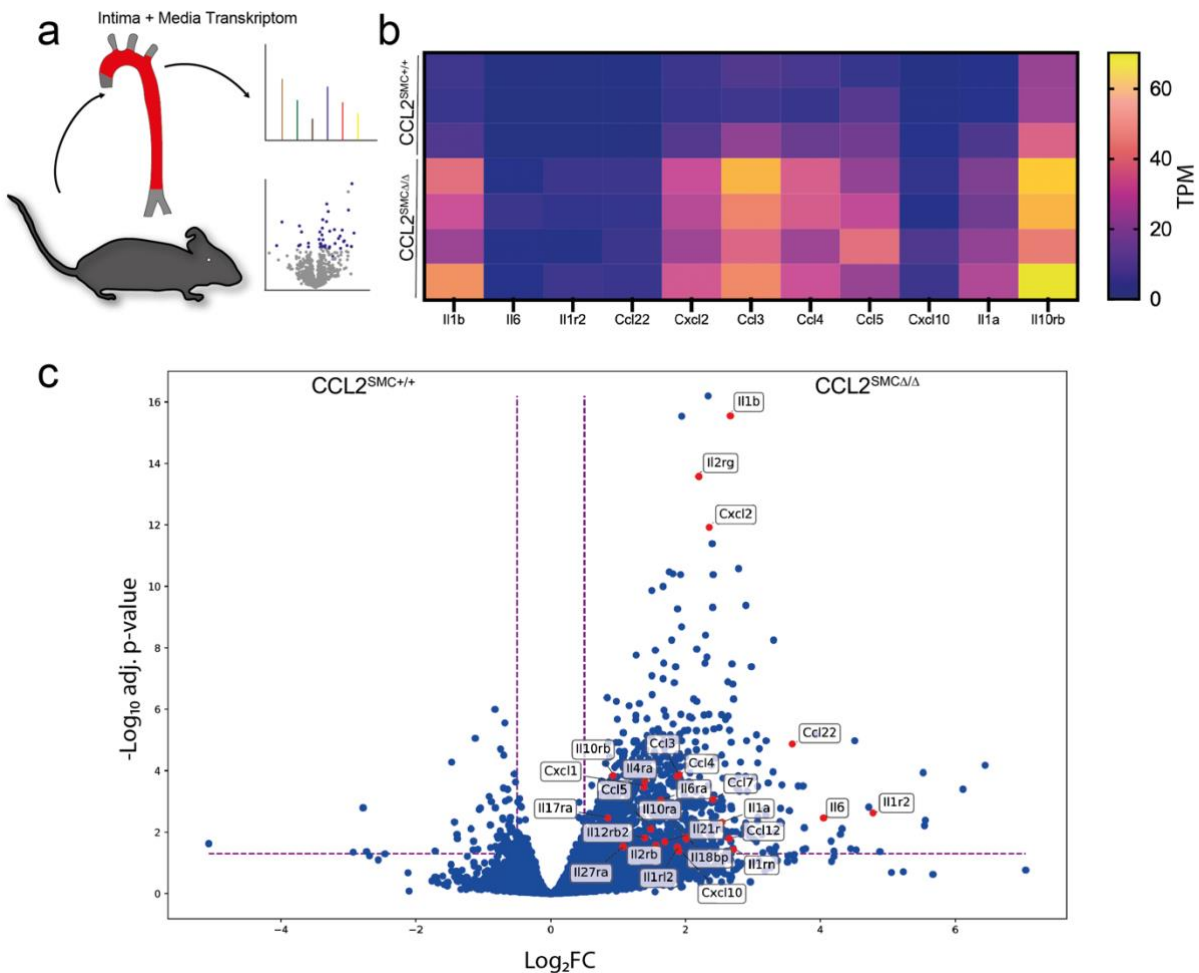


Abbildung 13: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Exazerbation der lokalen Inflammation

**a)** Schematische Darstellung der Verarbeitung der Media und Intima aus den Aorten von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD zu Einzelzellensuspensionen für die Analyse der exprimierten Gene in einem bulk-RNA Sequenzierungsansatz. Der in rot markierte Anteil der Aorta wurde dabei verwendet. **(b)** Heatmap mit der Darstellung der Expression differentiell regulierter Gene (transcripts per million, TPM) aus den Transkriptom-Daten der bulk-RNA Sequenzierung von Zellen der Intima und

Media von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD. In den Säulen sind die differentiell regulierten Gene für die jeweiligen biologischen Replikate dargestellt, welche in den Reihen illustriert werden ( $n = 3-4$  pro Gruppe). **(c)** Volcano plot mit der Darstellung differentiell regulierter Gene der Media und Intima von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen. Die horizontal gestrichelte Linie zeigt das gewählte Signifikanzniveau auf dem adjustierten p-Wert von 0,05 an. Die differentielle Genexpressions-Analyse erfolgte durch DESeq2 (Version 1.30.0).

Zusammengefasst nahm die Atherosklerose-Last in  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen auf Ebene der BCA signifikant zu. Zusätzlich führte der genetische Knockout von CCL2 in VSMCs auf Ebene der Aortenklappe zu einer ausgeprägteren Plaque-Vulnerabilität mit Abnahme einer stabilisierenden ACTA2<sup>+</sup> fibrösen Kappe, bei gleichzeitiger Zunahme des nekrotischen Kerns. Die Exazerbation der Inflammation konnte durch die Analyse des Transkriptomts der vaskulären Zellen in den Gefäßwänden von  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen bestätigt werden.

#### 4.5. Kein Nachweis systemischer Auswirkungen durch den spezifischen Knockout von CCL2 in VSMCs

Um die beobachteten Ergebnisse eindeutig auf lokale Mechanismen in den Gefäßwänden begrenzen zu können, wurden relevante systemische Veränderungen als mögliche Reaktionen auf die Ausschaltung von CCL2 in VSMCs ausgeschlossen.

##### 4.5.1. Keine signifikanten systemischen Auswirkungen auf den Lipid-Metabolismus durch CCL2 aus VSMCs

Nach 14 Wochen WTD wurden die Plasmaspiegel des Cholesterins sowie der Lipoprotein-Fractionen VLDL- und HDL-Cholesterins bei  $Ccl2^{SMC+/+}$  und  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen bestimmt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen  $Ccl2^{SMC+/+}$  und  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren (Abbildung 14a-c). Die genetische Ausschaltung von CCL2 in VSMCs hatte ebenso keinen Einfluss auf das Körpergewicht der Mäuse (Abbildung 14d).

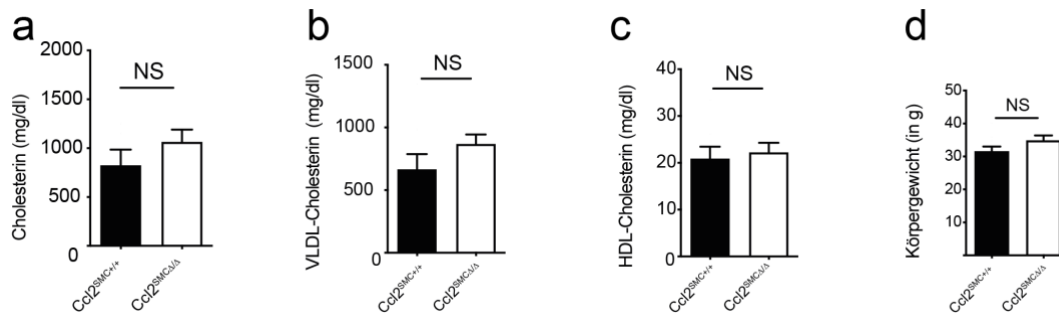


Abbildung 14: Der Knockout von CCL2 in VSMCs hat keine Auswirkungen auf den Lipid-Metabolismus oder das Körpergewicht der Mäuse

**(a)-(c)** Quantifizierung der absoluten Cholesterinwerte **(a)**, der VLDL-Cholesterin-Fraktion **(b)** und der HDL-Cholesterin-Fraktion **(c)** im Plasma von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD ( $n = 8-10$  pro Gruppe). **(d)** Körpergewicht von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD ( $n = 9-11$  pro Gruppe). Die Daten in den Graphen **(a)-(e)** sind normalverteilt, es wurde der Student's t-Test angewandt. NS steht für nicht signifikant. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

#### 4.5.2. Keine signifikanten Auswirkungen auf die Verteilung der Leukozyten durch CCL2 aus VSMCs in Blut, Milz und Knochenmark

Systemisch vermittelt die CCL2-CCR2 Achse insbesondere die Mobilisierung von Leukozyten aus dem Knochenmark und der Milz [54, 128-131]. Zunächst wurde die Plasmakonzentration von CCL2 bei allen Mäusen nach 14 Wochen WTD bestimmt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der CCL2 Konzentration in  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen (Abbildung 15a). Als nächstes wurde die absolute Leukozytenzahl im Blut von  $Ccl2^{SMC+/+}$  und  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren nach 14 Wochen WTD bestimmt, welche sich nicht signifikant unterschied (Abbildung 15b).



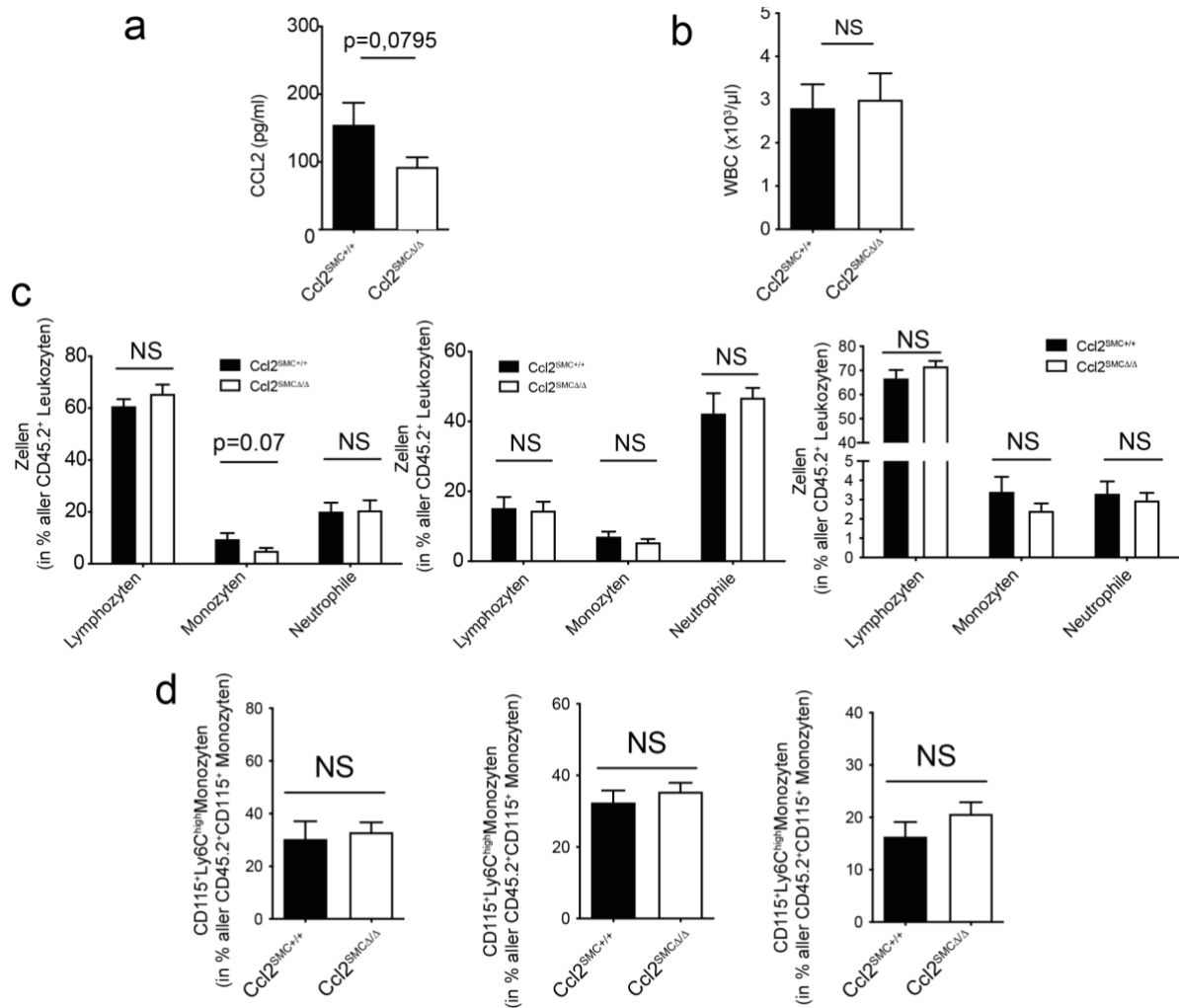
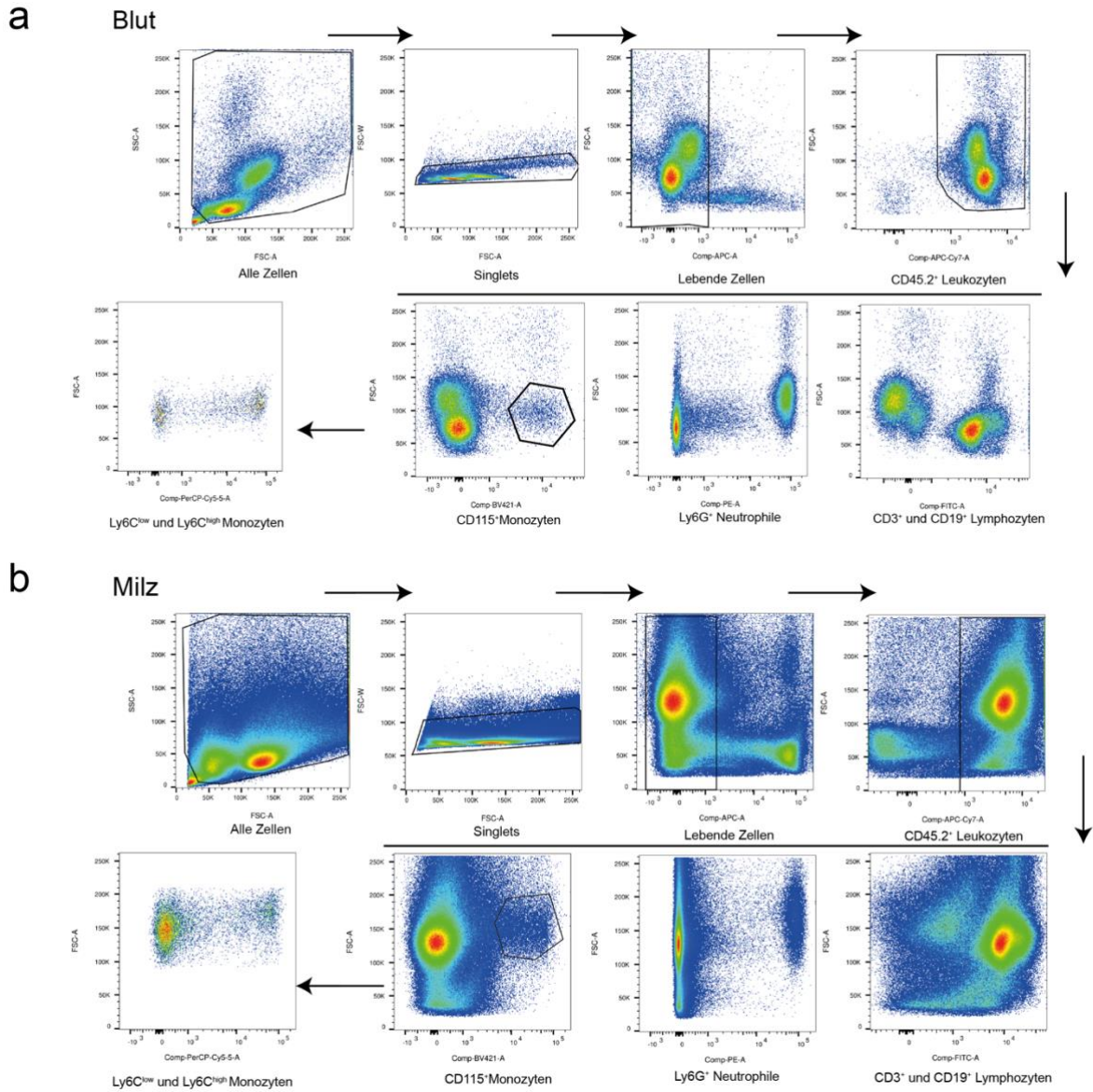


Abbildung 15: Der Knockout von CCL2 in VSMCs hat keine systemischen Auswirkungen auf die Leukozyten

**(a)** Plasmawerte für CCL2 bei  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMCΔ/Δ}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD ( $n = 5-7$  pro Gruppe). **(b)** Absolute Anzahl der Leukozyten im Blut von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMCΔ/Δ}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD ( $n = 5-6$  pro Gruppe). **(c)** Quantifizierung der relativen Anzahl der  $Ly6G^+$  Neutrophilen,  $CD115^+$  Monozyten und  $CD3^+ CD19^+$  Lymphozyten, angegeben in Prozent der  $CD45.2^+$  Leukozyten im Blut (**links**), Knochenmark (**Mitte**) und in der Milz (**rechts**) von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMCΔ/Δ}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD ( $n = 9$  pro Gruppe). **(d)** Quantifizierung des relativen Anteils der klassischen  $Ly6C^{high}$  Monozyten, angegeben in Prozent aller  $CD45.2^+ CD115^+$  Monozyten im Blut (**links**), Knochenmark (**Mitte**) und in der Milz (**rechts**) von  $Ccl2^{SMC+/+}$  oder  $Ccl2^{SMCΔ/Δ}$  Mäusen nach 14 Wochen WTD ( $n = 9$  pro Gruppe). Die Daten in den Graphen **(a)-(d)** sind mit einer Ausnahme (s.u.) normalverteilt, es wurde der Student's t-Test angewandt. Die Daten in dem Graphen **(c Neutrophile im Knochenmark)** sind nicht normalverteilt, es wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. NS steht für nicht signifikant. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler.

Die Leukozyten-Subpopulationen wurden für das Blut, die Milz und das Knochenmark durchflusszytometrisch quantifiziert. Dafür wurden  $CD3^+$  und  $CD19^+$  Lymphozyten,  $Ly6G^+$  Neutrophile und  $CD115^+$  Monozyten bestimmt. Zusätzlich wurde der Anteil der klassischen Monozyten von allen Monozyten über die Expression von  $Ly6C$  analysiert

(Abbildung 15c-d, 16a-c). Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Leukozyten-Subpopulationen zwischen  $Ccl2^{SMC+/+}$  und  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren in allen untersuchten Organen nach 14 Wochen WTD festgestellt werden (Abbildung 15c). Die Quantifizierung des Anteils der  $Ly6C^{high}$  Monozyten von allen Monozyten ergab ebenso keine signifikanten Unterschiede in Blut, Milz und Knochenmark (Abbildung 15d).



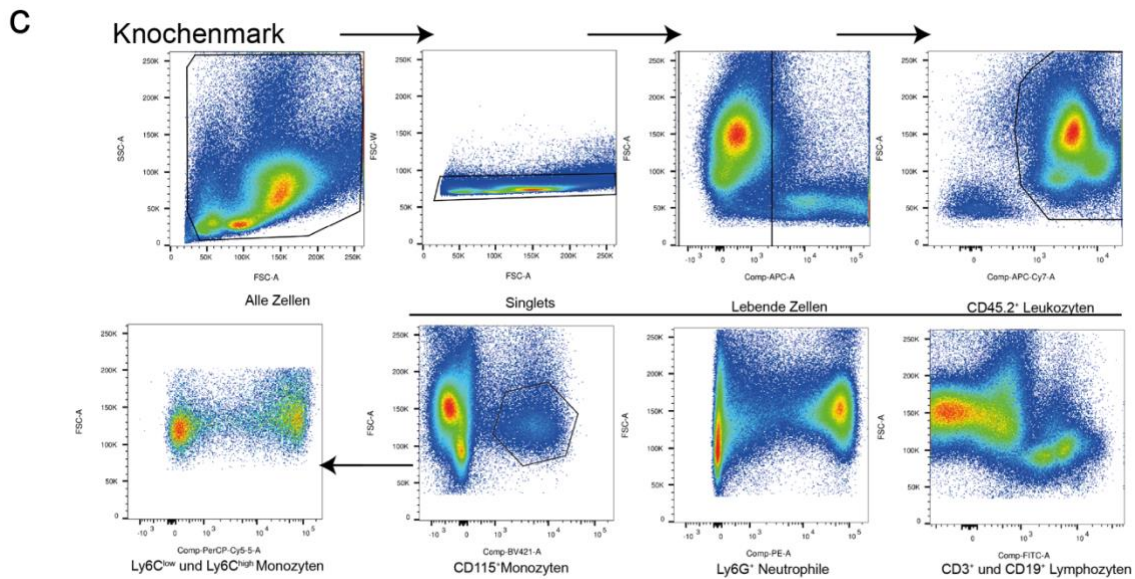


Abbildung 16: Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Bestimmung der Leukozyten-Subpopulationen

**(a)-(c)** Beispielhafte Darstellung der Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Bestimmung der Leukozyten-Subpopulationen im Blut **(a)**, Milz **(b)** und Knochenmark **(c)**. Aus allen Zellen wurden zunächst ausschließlich Singlets sowie lebende Zellen eingeschlossen. Im Anschluss wurden die CD45.2<sup>+</sup> Leukozyten definiert, aus welchen die Ly6G<sup>+</sup> Neutrophilen, CD115<sup>+</sup> Monozyten und CD3<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> Lymphozyten identifiziert wurden. Aus den CD45.2<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> Monozyten wurden klassische Monozyten über den Marker Ly6C identifiziert.

## 5. Diskussion und Ausblick

### 5.1. Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Kommunikation von VSMCs mit Makrophagen in der Atherosklerose und der Einfluss von CCL2 aus VSMCs auf das Verhalten der Immunzellen sowie die lokale Inflammation in der arteriellen Gefäßwand analysiert. Interaktionen zwischen Makrophagen und VSMCs in der Atherosklerose wurden im Mausmodell mit einem etablierten Fate-Mapping Ansatz visualisiert [159, 185, 187, 188]. In den Läsionen der vierfach transgenen VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-M $\Phi$ <sup>GFP-rep</sup> Mäuse konnten multiple Kontakte zwischen Myh11<sup>+</sup> VSMCs und deren Nachkommen mit CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen beobachtet werden. Durch die Reanalyse humaner und muriner Transkriptom-Datensätze auf Einzelzellebene von Wirka und Kollegen [187] konnte eine ausgeprägte Expression von CCL2 durch VSMCs bestätigt und die Relevanz der CCL2-CCR2 Achse für die Kommunikation der VSMCs mit Makrophagen demonstriert werden.

Die spezifische genetische Deletion der CCL2 Expression in VSMCs in einem konditionellen und induzierbaren, Cre-abhängigen, VSMC-spezifischen Knockout-Modell führte zu einem veränderten Verhalten der Makrophagen mit einer Akkumulation der Immunzellen im Plaque-Inneren sowie zu einer Exazerbation der Atherosklerose mit einer Zunahme der Plaque-Größe und einer Abnahme der Plaque-Stabilität.

#### 5.1.1. Intensive Interaktion von Makrophagen und VSMCs über die CCL2-CCR2 Achse in Atherosklerose

Während humane Läsionen zu Beginn der Atherogenese hauptsächlich aus VSMCs bestehen, kommt es im Verlauf der Atherogenese zu einer progredienten Akkumulation von Makrophagen im Plaque [49-52, 158]. Dabei kann von einer für die lokale Inflammation relevanten Kommunikation der Makrophagen und der Immunzellen ausgegangen werden [194]. In Versuchen dieser Arbeitsgruppe konnten bereits dynamische und statische Interaktionen zwischen NG2<sup>+</sup> wandständigen Zellen und Immunzellen in der Atherosklerose visualisiert werden [202]. Da NG2 auch von Perizyten und extravaskulären Zellen exprimiert wird [204-206] und VSMCs eine ausgeprägte Plastizität in der Atherosklerose zeigen, die zur Folge hat, dass ein Großteil der VSMCs in fortgeschrittenen Läsionen nicht mehr identifiziert werden kann [161], wurde in dieser Arbeit auf das in der Literatur etablierte Tamoxifen-

induzierbare Myh11<sup>CreERT2</sup> Modell zurückgegriffen [159, 185, 187, 188]. Mit dem gewählten Fate-Mapping Ansatz konnten Interaktionen zwischen Myh11<sup>+</sup> VSMCs und deren Nachkommen mit CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen visualisiert und analysiert werden. In den fortgeschrittenen Läsionen der VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-MΦ<sup>GFP-rep</sup> Mäuse fanden sich multiple Kontakte zwischen VSMCs und CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen. Diese Beobachtungen können in den Zusammenhang neuer Erkenntnisse der letzten Jahre eingeordnet werden, in welchem eine gegenseitige Beeinflussung zwischen wandständigen nicht-leukozytären Zellen und Immunzellen während der Atherogenese mehrfach beschrieben wurde [162, 194, 196, 197, 202]. So nehmen Monozyten und Makrophagen beispielsweise über Signalmoleküle wie IL-1β oder Integrin β3 Einfluss auf das Verhalten von VSMCs [162, 194, 196]. Während ein entscheidender Einfluss der Kommunikation von VSMCs und Immunzellen auf das Verhalten der VSMCs in Atherosklerose demonstriert werden konnte, bleiben die Mechanismen, über die VSMCs umgekehrt Makrophagen und die lokale Inflammation beeinflussen, sowie die Relevanz verschiedener Signalmoleküle für diese Interaktion unklar [194].

Chemotaktische Signalmoleküle wie MIF und Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 vermitteln die Kommunikation zwischen Perizyten und myeloiden Leukozyten während einer sterilen Inflammation in der Mikrozirkulation [200]. In frühen humanen atherosklerotischen Läsionen sind VSMCs die überwiegende Zellpopulation und damit schon sehr früh an der Organisation der Inflammation in der Gefäßwand beteiligt [158]. Über verschiedene PRRs, können VSMCs DAMPs früh in der Atherogenese detektieren [46, 189, 190]. *In vitro* führt die Aufnahme von Cholesterol durch VSMCs zu einer gesteigerten Expression von CCL2 [185]. Auch *in vivo* konnte eine Zunahme der CCL2 Expression durch wandständige nicht-leukozytäre Zellen während der Atherogenese demonstriert werden [202, 203]. Da VSMCs früh in der Atherogenese mit DAMPs in Kontakt kommen und als Reaktion darauf das chemotaktische Signalmolekül CCL2 sezernieren, welches eine starke chemotaktische Wirkung auf Monozyten und Makrophagen hat [117], erscheint es plausibel, dass VSMCs in der Atherogenese mit Makrophagen über CCL2 kommunizieren. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Transkriptom-Daten auf Einzelzellebene zur humanen und murinen Atherosklerose, die von Wirka und Kollegen erhoben wurden [187], neu analysiert.

In der humanen Atherosklerose konnten zunächst sechs charakteristische VSMC-Populationen identifiziert werden, was sich mit der bereits mehrfach beschriebenen Plastizität von VSMCs in der Atherogenese erklären lässt [158, 183]. Interessanterweise zeigte sich in

---

den Auswertungen der Transkriptom-Daten von Wirka und Kollegen [187] eine ubiquitäre Expression von CCL2 durch die verschiedenen VSMC-Subpopulationen in der humanen Atherosklerose. Bei der detaillierten Analyse der einzelnen Subpopulationen fiel eine Population mit einer besonders ausgeprägten Expression von Chemokinen und Zytokinen auf, weshalb wir diese Population als chemotaktische VSMCs beschrieben. CCL2 war das am stärksten exprimierte Chemokin dieser cVSMCs. Auch in den Einzelzell-Transkriptom-Daten zur murinen Atherosklerose von Wirka und Kollegen [187] konnten cVSMCs mit einer prominenten CCL2-Expression identifiziert werden. Über die Immunfluoreszenz-Färbung des zuvor als Markergen der cVSMCs identifizierten PDGFR $\beta$  in den Läsionen von VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-M $\Phi$ <sup>GFP-rep</sup> Mäusen, wurden cVSMCs an der Plaque-Oberfläche lokalisiert. In diesem Bereich der Läsionen ließen sich in VSMC-tdT<sup>lin</sup> Cx3cr1-M $\Phi$ <sup>GFP-rep</sup> Mäusen auch die meisten Kontakte zwischen Makrophagen und VSMCs nachweisen, weshalb eine relevante Rolle von CCL2 aus VSMCs für die Kommunikation mit Makrophagen vermutet werden kann. Über die Quantifizierung verschiedener Kommunikationswege zwischen den zuvor identifizierten Makrophagen und VSMCs in der humanen Atherosklerose konnte gezeigt werden, dass die CCL2-CCR2 Achse in der Tat wichtig für die Interaktion von Makrophagen und VSMCs ist.

#### 5.1.2. VSMCs beeinflussen die Positionierung von Makrophagen im Plaque über CCL2

Um den Mechanismus der Kommunikation zwischen VSMCs und Makrophagen über die CCL2-CCR2 Achse und deren Einfluss auf das Verhalten der Makrophagen in der Atherosklerose untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit CCL2 spezifisch in My11<sup>+</sup> VSMCs ausgeknockt. Interessanterweise führte der genetische Knockout von CCL2 in VSMCs zu einer Abnahme von LGALS3<sup>+</sup> Makrophagen an der Plaque-Oberfläche und damit in dem Bereich der Läsionen, wo die meisten Interaktionen zwischen VSMCs und Makrophagen beobachtet werden konnten. Gründe für die Abnahme von Makrophagen in Atherosklerose können eine reduzierte Rekrutierung von Monozyten in den Plaque, ein vermehrtes Apoptose- sowie ein vermindertes Proliferationsverhalten der Makrophagen im Plaque und eine vermehrte Emigration von Makrophagen aus dem Plaque sein [62, 87].

Im Rahmen der Atherogenese ist die CCL2-CCR2 Achse für die Mobilisierung der Immunzellen aus dem Knochenmark und der Milz in das Blut relevant, bevor die Immunzellen in die Läsionen rekrutiert werden [54, 128-131]. Der vollständige Knockout von CCL2 hatte bei

Combadière und Kollegen zu einer Abnahme der Anzahl zirkulierender Monozyten im Blut geführt, welche mit der Abnahme der Atherosklerose-Last korrelierte [130]. Paradoxe Weise führte sowohl der heterozygote Knockout als auch der homozygote Knockout von CCL2 in Myh11<sup>+</sup> VSMCs bei Owsiany und Kollegen zu einem Anstieg von Ly6C<sup>high</sup> Monozyten im Blut. Bei Mäusen mit heterozygotem Myh11-spezifischem CCL2-Knockout war zudem eine Zunahme der Makrophagen-Akkumulation in den Läsionen zu beobachten [203].

Im Plasma von Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Tieren zeigten sich in den Testreihen dieser Arbeit im Vergleich zu Ccl2<sup>SMC+/+</sup> Tieren keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von CCL2. Passend dazu zeigten sich keine signifikanten systemischen Auswirkungen auf die Leukozyten. So blieben die absolute Leukozytenzahl sowie die Anteile der Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten an allen CD45.2<sup>+</sup> Leukozyten im Blut unverändert. Auch in der Milz und im Knochenmark waren die relativen Anteile der jeweiligen Leukozyten-Subpopulation an allen CD45.2<sup>+</sup> Leukozyten zwischen Ccl2<sup>SMC+/+</sup> und Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> ohne signifikante Unterschiede. In Zusammenschau dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Abnahme der Makrophagen an der Plaque-Oberfläche nicht durch eine veränderte Mobilisierung von Immunzellen aus dem Knochenmark zustande kam.

Während der Atherogenese trägt die Rekrutierung von Monozyten durch aktivierte Endothelzellen an die inflammatorisch veränderten Gefäßabschnitte sowie die Transmigration der Immunzellen in das subendotheliale Kompartiment mit anschließender Differenzierung maßgeblich zur Akkumulation von Makrophagen und damit zum Wachstum der Läsionen bei [2, 54, 58, 59, 87]. Der vollständige genetische Knockout von CCL2 oder CCR2 in allen Zellen beeinflusst diese wichtigen Schritte in der Atherogenese und führt erwartungsgemäß zu einem geringerem Plaque-Wachstum mit einer Abnahme der Makrophagen in den Läsionen [116, 130, 139-141]. Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell ermöglicht die spezifische genetische Ausschaltung von CCL2 in Myh11<sup>+</sup> VSMCs und erlaubt somit die Analyse der Auswirkungen von CCL2 im lokalen Milieu auf die Makrophagen der atherosklerotischen Läsionen. Die Expression von CCL2 in Endothelzellen wird nicht beeinflusst, weshalb von einer normalen Rekrutierung von Immunzellen durch aktivierte Endothelzellen in die Läsionen von Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Mäusen ausgegangen werden kann [87, 106]. Die Transmigration der Monozyten in das subendotheliale Kompartiment wird dagegen durch Chemokine beeinflusst, die nicht nur von aktivierten Endothelzellen, sondern auch von Makrophagen und VSMCs aus dem Plaque

abstammen [87]. Dadurch lässt sich mit den Versuchen dieser Arbeit nicht eindeutig nachweisen, ob die Transmigration von Monozyten in die Läsionen von  $Ccl2^{SMCA/\Delta}$  Tieren beeinflusst wird. Da sich in den Plaques auf Ebene der BCA und der Aortenklappe keine signifikanten Unterschiede im Makrophagen-Gehalt, bezogen auf die gesamte Läsion, zeigten, kann jedoch eine normale Rekrutierung und Transmigration von Monozyten vermutet werden. Bemerkenswerterweise finden sich Hinweise in der Literatur, dass der homozygote Knockout von CCL2 in  $Myh11^+$  VSMCs nicht zu einer veränderten Rekrutierung von Monozyten in die intimalen Läsionen führt [203]. Gleichzeitig scheint eine vermehrte Emigration von Makrophagen aus den Läsionen von  $Ccl2^{SMCA/\Delta}$  Mäusen bei gleichbleibendem Makrophagen-Anteil im Plaque im Vergleich zu  $Ccl2^{SMC+/+}$  Mäusen unwahrscheinlich zu sein.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass CCL2 das Apoptose- und Proliferationsverhalten von myeloiden Zellen und Makrophagen beeinflussen kann [120, 148-150]. Tatsächlich findet sich in den Läsionen von  $Ccl2^{SMCA/\Delta}$  Mäusen auf Ebene der BCA eine Zunahme der absoluten Anzahl apoptotischer Makrophagen. Dieses Ergebnis erklärt jedoch nicht die spezifische Abnahme von Makrophagen an der Plaque-Oberfläche. Eine reduzierte Zell-Proliferation oder eine vermehrte Apoptose von Makrophagen lokalisationsspezifisch in der fibrösen Kappe der Läsionen von  $Ccl2^{SMCA/\Delta}$  Tieren konnte ausgeschlossen werden.

Die Abnahme der Makrophagen an der Plaque-Oberfläche auf Ebene der BCA von  $Ccl2^{SMCA/\Delta}$  Tieren schien Folge einer veränderten Verteilung der  $LGALS3^+$  Makrophagen im Plaque zu sein. In den Läsionen von  $Ccl2^{SMCA/\Delta}$  konnte dabei eine Abnahme des prozentualen Anteils der Makrophagen an der Plaque-Oberfläche bei gleichzeitiger Zunahme im Plaque-Inneren verzeichnet werden. An der Plaque-Oberfläche hatten sich zuvor cVSMCs mit einer ausgeprägten Expression von CCL2 sowie die meisten Interaktionen zwischen Makrophagen und VSMCs lokalisieren lassen. Die Tatsache, dass der genetische Knockout von CCL2 in VSMCs zu einer Abnahme der Makrophagen an der Plaque-Oberfläche mit gleichzeitiger Exazerbation der Atherosklerose führte, lässt einen wichtigen Einfluss von VSMCs auf die Positionierung der Makrophagen im Plaque vermuten, welcher durch das stark chemotaktisch wirksame Chemokin CCL2 vermittelt wird. Die konsekutive Zunahme der Apoptose und Nekrose im Plaque mit Exazerbation der lokalen Inflammation und Zunahme der Läsionsgröße sowie die



Abnahme der Plaque-Stabilität deuten darüber hinaus auf ein dysfunktionales Verhalten der Makrophagen in den Läsionen von  $Ccl2^{SMCA/\Delta}$  Mäusen hin [71, 72, 87, 233].

### 5.1.3. Kennzeichen einer Makrophagen-Dysfunktion in den Läsionen der $Ccl2^{SMCA/\Delta}$ Mäuse

Makrophagen sind die am häufigsten vorkommenden Immunzellen im Plaque [49-52]. Über wichtige Prozesse wie die Efferozytose, die Sekretion anti-inflammatorischer Mediatoren und die Aufnahme und adäquate Verarbeitung der Lipide im Plaque können Makrophagen die Inflammation regulieren und eingrenzen [52, 70]. Im Umkehrschluss kommt es zur Exazerbation der Inflammation bei einem dysfunktionalen Verhalten dieser Immunzellen [87, 233]. Dabei können pro-inflammatorische Makrophagen die Stabilität der atherosklerotischen Läsionen kompromittieren, indem sie maßgeblich zur Formation des nekrotischen Kerns beitragen sowie über die Sekretion von Metalloproteasen die fibröse Kappe destabilisieren [71, 72].

VSMCs könnten über CCL2 zu einer strategisch wichtigen Positionierung der Makrophagen an der Plaque-Oberfläche führen und damit indirekt Einfluss auf die Funktionalität der Makrophagen nehmen, indem verhindert wird, dass sich Makrophagen im Plaque-Inneren und damit im Bereich des nekrotischen Kerns ansammeln. Im Inneren der Läsionen sind die Makrophagen in der Nähe des nekrotischen Kerns einem äußerst inflammatorischen Milieu ausgesetzt, was zu einer vermehrten Apoptose und Nekrose der Makrophagen führt [233]. Tatsächlich konnte in den Läsionen auf Ebene der BCA von  $Ccl2^{SMCA/\Delta}$  Tieren eine Zunahme der Apoptose aller Zellen sowie spezifisch der  $LGALS3^+$  Makrophagen beobachtet werden. Werden apoptotische Zellen nicht mehr ausreichend über Efferozytose entfernt, kommt es zur Akkumulation apoptotischer Zellen, die im Verlauf sekundär nekrotisch werden und zur Formierung eines nekrotischen Kerns sowie zur Exazerbation der Inflammation beitragen [75-77]. Während in den Läsionen auf Ebene der BCA eine Zunahme der apoptotischen Makrophagen dokumentiert wurde, konnte in den Läsionen auf Ebene der Aortenklappe von  $Ccl2^{SMCA/\Delta}$  Tieren eine Zunahme des nekrotischen Kerns beobachtet werden. Die Zunahme der Nekrose könnte in einem zeitlichen Kontext auf die vermehrte Apoptose von Makrophagen folgen und damit erst in den fortgeschrittenen Läsionen der Aortenklappe signifikant verändert sein [234]. Im  $ApoE^{-/-}$  Mausmodell entwickeln sich Läsionen auf Ebene der Aortenklappe früher als auf Ebene der BCA, was die Unterschiede zwischen den analysierten Gefäßen erklären könnte [235]. Folge der vermehrten Apoptose sowie der sekundären

---

Nekrose von Makrophagen im Plaque von  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  sind eine Exazerbation der Inflammation in den atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden.

#### 5.1.4. Exazerbation der Atherosklerose mit Zunahme der lokalen Inflammation und der Plaque-Größe sowie Abnahme der Plaque-Stabilität in $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$ Tieren

In multiplen tierexperimentellen Studien wurde CCL2 als ein proatherogenes Chemokin beschrieben, welches zur Exazerbation der Atherosklerose und Instabilität der Läsionen führt [116, 130, 132, 137, 139-141]. In klinischen Studien konnte zudem eine Korrelation zwischen hohen Plasmawerten für CCL2 und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse beobachtet werden, weshalb eine proatherogene Wirkung von CCL2 auch für die humane Atherosklerose angenommen wird [142, 143]. Klinische Studien, in denen die CCL2-CCR2 Achse gehemmt wurde, blieben bisher jedoch meist hinter den Erwartungen zurück [108, 120]. Passend dazu finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass CCL2 neben den bekannten pro-inflammatorischen Effekten auch wichtige anti-inflammatorische Funktionen in der Organisation einer Inflammation übernehmen könnte [120, 148-150, 152, 153, 157]. Die Akkumulation der Makrophagen im Plaque-Inneren mit Zunahme der Apoptose und Nekrose könnte Ursache für die in den Gefäßwänden von  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren beobachtete Exazerbation der lokalen Inflammation sein. Neben der Zunahme der Läsionsgröße nach Ausschaltung von CCL2 in  $Myh11^+$  VSMCs konnte in  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren ein protektives vaskuläres Remodeling auf Ebene der BCA ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte in den Läsionen von  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren eine erhöhte Plaque-Vulnerabilität mit einem größeren nekrotischen Kern und einer instabileren fibrösen Kappe auf Ebene der Aortenklappe nachgewiesen werden. Da klinisch manifeste atherothrombotische Ereignisse vor allem mit der Plaque-Vulnerabilität und weniger mit der Plaque-Größe assoziiert sind, sind diese Erkenntnisse von besonderer Relevanz [73]. Zusätzlich zeigte sich in der Gefäßwand der gesamten Aorta von  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren eine ausgeprägte Exazerbation der Inflammation. Die Analyse der differentiell exprimierten Gene aus den Transkriptom-Daten der Media und Intima (bulk-RNA-seq) von  $CCL2^{SMC+/+}$  und  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren ergab eine signifikante Zunahme der Expression mehrerer inflammatorischer Gene wie *Il1a*, *Il1b*, *Ccl3* und *Ccl5* bei  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren.

### 5.1.5. Direkter Einfluss auf die Funktionalität von Makrophagen durch CCL2 aus VSMCs

Neben dem beschriebenen indirekten Einfluss auf die Funktionalität der Makrophagen durch CCL2 aus VSMCs könnte auch ein direkter Einfluss auf die Makrophagen zu den beobachteten Ergebnissen führen. So könnte die Zunahme apoptotischer Zellen auch durch eine reduzierte Efferozytose-Kapazität von Makrophagen in  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren erklärt werden. In der Literatur wird eine relevante Rolle von CCL2 für die effiziente Durchführung der Efferozytose durch Makrophagen diskutiert [153]. Während apoptotische Zellen in frühen atherosklerotischen Läsionen durch Makrophagen über Efferozytose effizient entfernt werden, scheint die Efferozytose in fortgeschrittenen Plaques bereits eingeschränkt zu sein [76, 78]. Eine zusätzliche Abnahme der Efferozytose-Kapazität von Makrophagen durch den genetischen Knockout von CCL2 in VSMCs würde die vermehrte Apoptose und Nekrose in den Läsionen von  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren gleichermaßen erklären.

*In vitro* und *in vivo* Studien lassen weiterhin eine Rolle von CCL2 in der Polarisierung von Makrophagen vermuten [120]. Sierra-Filardi und Kollegen zeigten dabei in mehreren Ansätzen, dass CCL2 kontextabhängig sowohl in humanen als auch in murinen Makrophagen einen anti-inflammatorischen M2 Phänotyp induzieren kann und demonstrierten damit eine wichtige regulierende Wirkung der CCL2-CCR2 Achse auf Makrophagen, die dazu beitragen könnte, eine überschießende inflammatorische Reaktion zu verhindern [152]. Die vermehrte Expression inflammatorischer Mediatoren in der Intima und Media der gesamten Aorta, könnte auch auf einen veränderten Phänotyp der Makrophagen hinweisen. So könnte es zu einer Zunahme pro-inflammatorischer Makrophagen in den Läsionen von  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Mäusen kommen, die über die Zunahme des nekrotischen Kerns und die Destabilisierung der fibrösen Kappe die Plaque-Vulnerabilität erhöhen [71, 72].

In der Literatur wird eine kontextabhängige regulatorische Rolle von CCL2 im Lipid-Metabolismus diskutiert [154]. Mit der Oil-Red-Färbung konnten in dieser Arbeit lokale Effekte auf die Lipidablagerung in den Läsionen durch CCL2 von VSMCs ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde das Plasma der Mäuse nach 14 Wochen WTD auf unterschiedliche Plasma-Cholesterinwerte untersucht. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen  $Ccl2^{SMC+/+}$  und  $Ccl2^{SMC\Delta/\Delta}$  Tieren. Auch die Analyse der Lipoprotein-Fractionen VLDL und HDL ergab nach 14 Wochen WTD keine Unterschiede, sodass von keiner relevanten Beeinflussung des Lipidstoffwechsels durch CCL2 aus VSMCs ausgegangen werden kann.

---

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine bisher unbekannte Beeinflussung von Makrophagen durch VSMCs über die Expression von CCL2 in der Atherosklerose. Über die Reanalyse von Transkriptom-Daten von Wirka und Kollegen [187] konnte eine ubiquitäre Expression von CCL2 durch VSMCs verdeutlicht werden und die Relevanz der CCL2-CCR2 Achse für die Kommunikation zwischen VSMCs und Makrophagen demonstriert werden. Die genetische Deletion von CCL2 in Myh11<sup>+</sup> VSMCs führte im Mausmodell zu einer Akkumulation der Makrophagen im Plaque-Inneren. Die Zunahme der Apoptose und Nekrose in den Läsionen von Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Tieren könnte durch den Wegfall einer strategisch wichtigen Positionierung der Makrophagen in der fibrösen Kappe erklärt werden, welche durch das stark chemotaktisch wirksame Chemokin CCL2 aus VSMCs aufrechterhalten wird. Die vermehrte Nekrose und Apoptose könnte im Anschluss an den Wegfall dieser wichtigen Positionierung zu der beobachteten Exazerbation der lokalen Inflammation mit Zunahme der Plaque-Größe auf Ebene der BCA sowie Abnahme der Plaque-Stabilität auf Ebene der Aortenklappe führen. Owsiany und Kollegen konnten in Mäusen mit heterozygotem Myh11-spezifischem CCL2-Knockout eine Zunahme der Läsionsgröße und Abnahme der Plaque-Stabilität beobachten, welche sich durch eine sequentielle Abfolge, bestehend aus Monozytose, vermehrter Rekrutierung von Monozyten und konsekutiver Akkumulation von Makrophagen in den Läsionen, erklären ließ [203]. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen dagegen bei fehlendem Hinweis auf eine unterschiedliche Mobilisierung und Rekrutierung von Monozyten und gleichbleibenden intimalen Makrophagen-Gehalt, ein verändertes Verhalten der Makrophagen in den Läsionen von Mäusen mit einem homozygoten Knockout von CCL2 in Myh11<sup>+</sup> VSMCs vermuten. Eine direkte Beeinflussung der Makrophagen durch CCL2 aus VSMCs scheint dabei auch möglich zu sein. So könnte eine veränderte Polarisierung der Makrophagen mit einer Zunahme des pro-inflammatorischen Phänotyps sowie eine reduzierte Efferozytose-Kapazität durch die genetische Ausschaltung von CCL2 in VSMCs zusätzlich zu der beobachteten Exazerbation der Inflammation beitragen. Um diese Hypothesen untersuchen zu können, könnte neben einer histologischen Färbung für M1/M2-typische Makrophagen-Marker eine Transkriptom-Analyse auf Einzelzellebene von Zellen der Läsionen von Ccl2<sup>SMC+/+</sup> und Ccl2<sup>SMCΔ/Δ</sup> Tieren für weiteren Aufschluss sorgen. *In vitro* Versuche könnten in der Zukunft zudem zeigen, wie VSMCs und CCL2 zusammen Einfluss auf wichtige Funktionen der Makrophagen, wie beispielsweise die Efferozytose, nehmen.

## 5.2. Ausblick

Um die Versorgung der zunehmenden Zahl an Atherosklerose erkrankten Patienten durch neue Therapiekonzepte verbessern zu können, müssen die inflammatorischen Prozesse der Atherogenese besser verstanden werden. Erst dadurch kann es gelingen, pro-inflammatorische und schädliche Signalwege in der Atherogenese spezifisch zu hemmen, ohne gleichzeitig wichtige protektive Komponenten negativ zu beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Arbeit können in eine Reihe neuartiger Erkenntnisse über die Komplexität der Organisation der chronischen Inflammation durch Chemokine wie CCL2 eingeordnet werden. Über verschiedene Ebenen, wie die Mobilisierung von Immunzellen aus dem Knochenmark, die Rekrutierung dieser in die Läsionen und die Programmierung der Immunzellen, können Chemokine den Verlauf der Atherogenese beeinflussen und dabei – in Abhängigkeit von der jeweiligen Ebene – atheroprotektiv oder atheroprogessiv wirken. Die Bedeutung der VSMCs für die Organisation der Inflammation scheint dabei weit über die lange Zeit ausschließlich angenommene protektive Funktion zur Stabilisierung der fibrösen Kappe hinauszugehen. Da VSMCs numerisch die häufigsten Zellen in den Läsionen sind, frühzeitig mit DAMPs in Kontakt kommen und daraufhin Zytokine und Chemokine sezernieren, sollte in zukünftigen Studien der Einfluss durch VSMCs auf die Inflammation und das Verhalten der Immunzellen in den Läsionen detailliert weiteruntersucht werden. Die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren, dass die Inflammation durch klassische pro-inflammatorische Faktoren wie CCL2 im Rahmen der Atherosklerose abhängig vom Kompartiment und deren zellulären Ursprung auch protektiv sein kann. Erst durch die exakte und detaillierte Kenntnis der inflammatorischen Vorgänge und deren Komplexität in der Entwicklung der Atherosklerose wird es möglich sein, pharmakologische Wege zur Eindämmung dieser Volkskrankheit zu finden.

## 6. Zusammenfassung

Trotz intensiver Erforschung ist die Atherosklerose mit ihren klinischen Konsequenzen die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität weltweit, weshalb der Prävention und Therapie der Erkrankung eine immense Bedeutung zukommt [2, 4, 5]. Verschiedene klinische Studien konnten das Konzept der Inflammation als wichtige Komponente der Atherosklerose demonstrieren und das Potential anti-inflammatorischer Medikamente sowohl in der Behandlung akuter kardiovaskulärer Komplikationen als auch in der Behandlung der chronischen kardialen Herzerkrankung eindrücklich unter Beweis stellen [11-13]. Eine systemische immunmodulatorische Therapie erhöht jedoch das Risiko für das Auftreten zahlreicher Nebenwirkungen, weshalb auf der Suche nach neuen Therapiekonzepten inflammatorische Signalwege in den Gefäßwänden gefunden werden müssen, die spezifisch inhibiert werden können [15]. Chemokine organisieren die Inflammation in den Gefäßwänden auf verschiedenen Ebenen und sind als potenzieller Angriffspunkt anti-inflammatorischer Therapien in das Zentrum der Aufmerksamkeit vieler klinischen Studien geraten [109].

VSMCs und Makrophagen sind die häufigsten Zelltypen in den intimalen Läsionen atherosklerotisch veränderter Gefäßwände [49-52, 158]. In der Literatur wird eine Kommunikation zwischen wandständigen Zellen und Makrophagen während der Atherogenese diskutiert [162, 194, 196, 197, 202]. Dabei konnte gezeigt werden, dass Immunzellen das Verhalten von VSMCs beeinflussen können [162, 194, 196]. Welchen Einfluss VSMCs umgekehrt auf das Verhalten der Immunzellen in der Atherogenese haben, bleibt darüber hinaus jedoch unklar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Erkenntnisse über eine protektive funktionelle Einheit zwischen VSMCs und Makrophagen in der Atherosklerose, welche über die Expression des allgemein als proatherogen anerkannten Chemokins CCL2 in VSMCs vermittelt wird [116, 130, 132, 137, 139-141]. Es konnte eine ubiquitäre Expression von CCL2 durch VSMCs in humaner und muriner Atherosklerose gezeigt werden und die Relevanz der CCL2-CCR2 Achse für die Kommunikation zwischen VSMCs und Makrophagen demonstriert werden. In VSMC spezifischen „lineage tracing“ Mäusen wurden Interaktionen zwischen Makrophagen und VSMCs insbesondere an der Plaque-Oberfläche fortgeschrittener Läsionen beobachtet. Der konditionelle, zellspezifische Knockout von CCL2 in Myh11<sup>+</sup> VSMCs führte zu einer Abnahme

der Makrophagen an der Plaque-Oberfläche. Neben der Akkumulation der Makrophagen im Plaque-Inneren konnte zudem eine Zunahme der Apoptose und Nekrose im Plaque beobachtet werden. Diese Erkenntnisse deuten auf eine wichtige protektive Positionierung der Makrophagen an der Plaque-Oberfläche hin, welche durch VSMCs aufrechterhalten wird. Weiterhin führte der Myh11 spezifische Knockout von CCL2 zu einer Exazerbation der lokalen Inflammation sowie zu einer Zunahme der Plaque-Größe auf Ebene der BCA und einer Abnahme der Plaque-Stabilität auf Ebene der Aortenklappe. Systemische Auswirkungen auf den Cholesterin-Metabolismus sowie auf die Leukozyten-Subpopulationen in Blut, Milz und Knochenmark konnten ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine bisher unbekannte protektive funktionelle Einheit zwischen Makrophagen und VSMCs in der Atherosklerose, die über die Expression von CCL2 in VSMCs aufrechterhalten wird. Die Beeinträchtigung dieser funktionellen Einheit führte zu einer Exazerbation der chronischen Inflammation mit einer Zunahme der Plaque-Größe und der Plaque-Vulnerabilität. In zukünftigen Studien sollte das Zusammenspiel zwischen VSMCs und Makrophagen in der Atherosklerose intensiver untersucht werden und über CCL2 hinaus weitere Chemokine und Zytokine analysiert werden, die für die interzelluläre Kommunikation wichtig sein könnten. Ein besseres Verständnis dieser funktionellen Einheit könnte klären, welche potenziellen pharmakologischen Angriffspunkte inhibiert werden sollten, ohne wichtige protektive inflammatorische Signalwege zu beeinflussen.

## 7. Summary

Despite intensive research, atherosclerosis with its clinical complications accounts for the majority of morbidity and mortality worldwide, which is why its prevention and therapy is of immense importance [2, 4, 5]. Several clinical studies have confirmed a pivotal role for inflammation in atherosclerosis by demonstrating the great potential of antiinflammatory drugs in the treatment of both acute coronary syndrome and chronic cardiac disease [11-13]. Because of a variety of severe side effects associated with systemic immunotherapies, therapeutic approaches targeting specific inflammatory pathways are promising [15]. Chemokines orchestrate the inflammation in atherosclerosis at different stages, making them an interesting target for antiinflammatory therapies in clinical trials [109]. VSMCs and macrophages are the most abundant cell types in atherosclerotic lesions [49-52, 158]. Recently, a growing body of evidence has suggested that mural cells communicate with macrophages during atherogenesis [162, 194, 196, 197, 202] and that immune cells can influence the behaviour of VSMCs [162, 194, 196]. Conversely, the impact of VSMCs on immune cell behaviour in atherogenesis remains unclear.

The results of this work provide evidence for a protective functional unit between VSMCs and macrophages in atherosclerosis, mediated by the VSMC-derived chemokine CCL2, generally recognized as proatherogenic [116, 130, 132, 137, 139-141]. CCL2 was shown to be expressed by VSMCs in both human and murine atherosclerosis and a significant relevance of the CCL2-CCR2 axis for the interaction of VSMCs with macrophages was demonstrated. Using VSMC specific lineage tracing mice, interactions between macrophages and VSMCs were delineated particularly at the plaque surface of advanced lesions. The conditional, cell-specific knockout of CCL2 in Myh11<sup>+</sup> VSMCs resulted in a decrease in macrophages at the plaque surface. In addition to the accumulation of macrophages in the plaque interior, increased intraplaque apoptosis and necrosis were observed. These findings suggest a protective strategic positioning of macrophages at the plaque surface which is preserved by VSMCs. Furthermore, Myh11 specific deletion of CCL2 caused an exacerbation of local inflammation with increased lesions at the level of the BCA and decreased plaque stability at the level of the aortic valve. Systemic effects on cholesterol metabolism and on leukocyte subpopulations in blood, spleen, and bone marrow were excluded.



In summary, the results of this work unravel a previously unknown protective functional unit between VSMCs and macrophages in atherosclerosis which is maintained by VSMC-derived CCL2. Disruption of this functional unit led to an exacerbation of inflammation with both an increase in lesion size and lesion vulnerability. Future studies should further investigate the interplay between VSMCs and macrophages in atherosclerosis and analyse cytokines as well as chemokines beyond CCL2 that are important for the intercellular communication. A profound knowledge of this functional unit might point to specific pharmacological targets that can be inhibited without disturbing important protective inflammatory pathways.

## 8. Danksagung

Diese Arbeit wäre in Umfang und Größe nicht ohne die großartige Unterstützung zahlreicher Personen möglich gewesen, bei denen ich mich im Folgenden bedanken möchte.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Konstantin Stark für die herausragende Supervision, seine dauerhafte Unterstützung im Labor sowie seine jederzeit motivierende Art bedanken. Ebenso möchte ich mich bei ihm herzlich für die Organisation eines Stipendiums während der Vollzeitbeschäftigung im Labor bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg danke ich für die Möglichkeit, in seiner wissenschaftlich erfolgreichen und zielstrebigem Forschungsgruppe arbeiten zu können.

Meine Zeit im Labor wurde durch niemanden so geprägt wie durch Dr. med. Kami Pekayvaz, der mich von Beginn an für das Projekt begeistern konnte, mir innerhalb kürzester Zeit die Methodik beibrachte und - egal zu welcher Uhrzeit – ein kompetenter Ansprechpartner für mich war. Sein wissenschaftlicher Enthusiasmus, sein Optimismus, sein problemorientiertes Vorgehen sowie seine fachliche Kompetenz haben mich stets inspirierend durch das Projekt begleitet.

Auch den weiteren an diesem Projekt beteiligten Personen möchte ich meinen herzlichsten Dank aussprechen. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Markus Joppich für die Durchführung der bioinformatischen Analysen bedanken. Michael Lorenz danke ich für die vielen motivierenden Gespräche sowie die großartige Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente. Ebenso möchte ich mich bei Ana Titova für die Unterstützung in zahlreichen Experimenten bedanken. Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit, die gegenseitige Unterstützung sowie die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zuletzt gilt mein größter Dank den Menschen, die mir am nächsten stehen: Meiner Freundin Nathalie Bleidißel, die mich während der gesamten Zeit im Labor unterstützt hat und mich dabei dauerhaft motivieren konnte. Den Dank für meine Eltern Dr. med. Reinhard Gold und Sabine Gold kann ich nicht in Worte fassen. Beide halten mir mit ihrer liebevollen Art und Hingabe immer den Rücken frei und haben mir das Medizinstudium ermöglicht. Ebenso bedanke ich mich bei meinen beiden großartigen Geschwistern Constantin und Dr. Carolin Gold für den bedingungslosen Zusammenhalt. Ihnen widme ich diese Arbeit.

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Ammonium-Chlorid-Kalium-Lysepuffer Stocklösung (10x konzentriert)

Tabelle 2: Enzym-Mix 1 Aortenverdau

Tabelle 3: Enzym-Mix 2 Aortenverdau

Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für die Immunfluoreszenz-Färbung

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz-Färbung

Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen für die TUNEL-Färbung

## 10. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Das Mikromilieu beeinflusst den Phänotyp von Makrophagen in Atherosklerose
- Abbildung 2: Die Vielseitigkeit von CCL2
- Abbildung 3: Interaktionen von Myh11<sup>+</sup> VSMCs und deren Nachkommen mit CX3CR1<sup>+</sup> Makrophagen
- Abbildung 4: VSMCs können über die CCL2-CCR2 Achse mit Makrophagen kommunizieren
- Abbildung 5: Schematische Darstellung der Plaque-Komposition
- Abbildung 6: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Abnahme der Makrophagen an der Plaque-Oberfläche
- Abbildung 7: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Akkumulation der Makrophagen im Bereich des nekrotischen Kerns
- Abbildung 8: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Zunahme der Apoptose von Makrophagen im Plaque
- Abbildung 9: Der Knockout von CCL2 in VSMCs hat keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Makrophagen im Plaque
- Abbildung 10: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer vermehrten Nekrose im Plaque
- Abbildung 11: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Zunahme der Plaque-Größe bei gleichbleibendem Lipid-Gehalt
- Abbildung 12: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Abnahme der Plaque-Stabilität
- Abbildung 13: Der Knockout von CCL2 in VSMCs führt zu einer Exazerbation der lokalen Inflammation
- Abbildung 14: Der Knockout von CCL2 in VSMCs hat keine Auswirkungen auf den Lipid-Metabolismus oder das Körpergewicht der Mäuse
- Abbildung 15: Der Knockout von CCL2 in VSMCs hat keine systemischen Auswirkungen auf die Leukozyten
- Abbildung 16: Gating-Strategie für die durchflusszytometrische Bestimmung der Leukozyten-Subpopulationen

## 11. Abkürzungsverzeichnis

ABC Transporter	ATP-binding cassette transporter
ACTA2	Actin alpha 2
ADMA	Asymmetric dimethylarginine
APOA1	Apolipoprotein A1
ApoE	Apolipoprotein E
ATRA	All-trans retinoic acid
BCA	Arteria brachiocephalica
BSA	Bovine serum albumin
CANTOS	Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcome Study
CCL2	C-C- motif chemokine ligand 2
CCL7	C-C motif chemokine ligand 7
CCR1	C-C motif chemokine receptor 1
CCR2	C-C motif chemokine receptor 2
CCR4	C-C motif chemokine receptor 4
CCR5	C-C motif chemokine receptor 5
cDNA	Complementary DNA
CIRT	Cardiovascular Inflammation Reduction Trial
COLCOT	Colchicine Cardiovascular Outcomes Trial
cVSMC	Chemotaktische VSMC
CX3CR1	C-X3-C motif chemokine receptor 1
CXCR2	C-X-C motif chemokine receptor 2
DAMPs	Damage associated molecular patterns
DIT	Diffuse intimal thickening
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EZM	Extrazelluläre Matrix
GFP	Green fluorescent protein

---

GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HDL	High-density lipoprotein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-1R1	Interleukin 1 receptor, type I
Itgb3	Integrin $\beta$ 3
IVC-System	Individually ventilated caging system
KHK	Koronare Herzerkrankung
KLF4	Krüppel-like factor 4
LDL	Low-density lipoprotein
LDLR	LDL-receptor
LDTFs	Lineage-determining transcription factors
LGALS3	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3
LoDoCo2	Low-Dose Colchicine 2 Trial
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MACE	Major adverse cardiovascular event
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
mRNA	Messenger RNA
MYH11	Myosin heavy chain 11
M $\Phi$	Macrophage
NET	Neutrophil extracellular trap
NG2	Neural-glial antigen 2
NLRP3-Inflammasom	Nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat family, pyrin domain-containing 3-Inflammasom
NO	Stickstoffmonoxid
NS	Nicht signifikant
OCT4	Octamer-binding transcriptional factor 4
OD	Optical density
oxLDL	Oxidized LDL
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline

---

PCI	Percutaneous coronary intervention
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF $\beta$ R	Platelet-derived growth factor $\beta$ receptor
PIT	Pathological intimal thickening
PRR	Pattern recognition receptor
RFP	Red fluorescent protein
RNA	Ribonucleic acid
ROI	Region of interest
ROS	Reactive oxygen species
ROSA26	Reverse oriented splice acceptor, clone 26
rpm	Revolutions per minute
Sca1	Stem cells antigen-1
scRNA seq	Single-cell RNA sequencing
SDTFs	Signal-dependent-transcription-factors
siRNA	Short interfering RNA
SMMHC	Smooth muscle myosin heavy chain
SPF	Specific pathogen free
SR-A	Class A scavenger receptor
Tcf21	Transcription factor 21
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
tdTomato	Tandem dimer Tomato
Th1/2-Zellen	T-helper cells 1/2
TLR	Toll-like receptor
TPM	Transcripts per million
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UMAP	Uniform manifold approximation and projection
VLDL	Very-low-density lipoprotein
VSMC	Vascular smooth muscle cell
WTD	Western type diet
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
$\alpha$ SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin



## 12. Literaturverzeichnis

1. Weber, C. and H. Noels, *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1410-22.
2. Libby, P., *The changing landscape of atherosclerosis*. Nature, 2021. **592**(7855): p. 524-533.
3. Townsend, N., et al., *Epidemiology of cardiovascular disease in Europe*. Nat Rev Cardiol, 2021.
4. McClellan, M., et al., *Call to Action: Urgent Challenges in Cardiovascular Disease: A Presidential Advisory From the American Heart Association*. Circulation, 2019. **139**(9): p. e44-e54.
5. Thomas, H., et al., *Global Atlas of Cardiovascular Disease 2000-2016: The Path to Prevention and Control*. Glob Heart, 2018. **13**(3): p. 143-163.
6. Mahmood, S.S., et al., *The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective*. Lancet, 2014. **383**(9921): p. 999-1008.
7. Virani, S.S., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2021. **143**(8): p. e254-e743.
8. Hansson, G.K., *Inflammation and Atherosclerosis: The End of a Controversy*. Circulation, 2017. **136**(20): p. 1875-1877.
9. Soehnlein, O. and P. Libby, *Targeting inflammation in atherosclerosis - from experimental insights to the clinic*. Nat Rev Drug Discov, 2021. **20**(8): p. 589-610.
10. Ray, K.K. and C.P. Cannon, *The potential relevance of the multiple lipid-independent (pleiotropic) effects of statins in the management of acute coronary syndromes*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(8): p. 1425-33.
11. Ridker, P.M., et al., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. N Engl J Med, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.
12. Tardif, J.C., et al., *Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction*. N Engl J Med, 2019. **381**(26): p. 2497-2505.
13. Nidorf, S.M., et al., *Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease*. N Engl J Med, 2020. **383**(19): p. 1838-1847.
14. Ridker, P.M., et al., *Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events*. N Engl J Med, 2019. **380**(8): p. 752-762.
15. Stark, K. and S. Massberg, *Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology*. Nat Rev Cardiol, 2021: p. 1-17.
16. Harman, J.L. and H.F. Jørgensen, *The role of smooth muscle cells in plaque stability: Therapeutic targeting potential*. Br J Pharmacol, 2019. **176**(19): p. 3741-3753.
17. Williams, K.J. and I. Tabas, *The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(5): p. 551-61.
18. Ross, R., J. Glomset, and L. Harker, *Response to injury and atherogenesis*. Am J Pathol, 1977. **86**(3): p. 675-84.
19. Tabas, I., G. García-Cardena, and G.K. Owens, *Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis*. J Cell Biol, 2015. **209**(1): p. 13-22.
20. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. Iii27-32.

21. Pober, J.S. and W.C. Sessa, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 803-15.
22. Vanhoutte, P.M., et al., *Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update*. Acta Physiol (Oxf), 2017. **219**(1): p. 22-96.
23. Moncada, S. and A. Higgs, *The L-arginine-nitric oxide pathway*. N Engl J Med, 1993. **329**(27): p. 2002-12.
24. Knowles, J.W., et al., *Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment*. J Clin Invest, 2000. **105**(4): p. 451-8.
25. Miyazaki, H., et al., *Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis*. Circulation, 1999. **99**(9): p. 1141-6.
26. Fleming, I., *Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS*. Pflugers Arch, 2010. **459**(6): p. 793-806.
27. Vallance, P., et al., *Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure*. Lancet, 1992. **339**(8793): p. 572-5.
28. Surdacki, A., et al., *Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **33**(4): p. 652-8.
29. Perticone, F., et al., *Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(3): p. 518-23.
30. Altinova, A.E., et al., *Uncomplicated type 1 diabetes is associated with increased asymmetric dimethylarginine concentrations*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(5): p. 1881-5.
31. Abbasi, F., et al., *Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus*. Am J Cardiol, 2001. **88**(10): p. 1201-3.
32. Palm, F., et al., *Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(6): p. H3227-45.
33. Wilcox, C.S., *Asymmetric dimethylarginine and reactive oxygen species: unwelcome twin visitors to the cardiovascular and kidney disease tables*. Hypertension, 2012. **59**(2): p. 375-81.
34. Fry, D.L., E.E. Herderick, and D.K. Johnson, *Local intimal-medial uptakes of 125I-albumin, 125I-LDL, and parenteral Evans blue dye protein complex along the aortas of normocholesterolemic minipigs as predictors of subsequent hypercholesterolemic atherogenesis*. Arterioscler Thromb, 1993. **13**(8): p. 1193-204.
35. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
36. Moore, K.J. and I. Tabas, *Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis*. Cell, 2011. **145**(3): p. 341-55.
37. Bäck, M., et al., *Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities*. Nat Rev Cardiol, 2019. **16**(7): p. 389-406.
38. Tabas, I., K.J. Williams, and J. Borén, *Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications*. Circulation, 2007. **116**(16): p. 1832-44.
39. Skålén, K., et al., *Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis*. Nature, 2002. **417**(6890): p. 750-4.

40. Khalil, M.F., W.D. Wagner, and I.J. Goldberg, *Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(12): p. 2211-8.
41. Oörni, K., et al., *Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions*. *J Lipid Res*, 2000. **41**(11): p. 1703-14.
42. Soto, Y., et al., *Antiatherosclerotic effect of an antibody that binds to extracellular matrix glycosaminoglycans*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(3): p. 595-604.
43. Miller, Y.I., et al., *Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity*. *Circ Res*, 2011. **108**(2): p. 235-48.
44. Rhoads, J.P. and A.S. Major, *How Oxidized Low-Density Lipoprotein Activates Inflammatory Responses*. *Crit Rev Immunol*, 2018. **38**(4): p. 333-342.
45. Quinn, M.T., et al., *Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(9): p. 2995-8.
46. Schnack, L., et al., *Mechanisms of Trained Innate Immunity in oxLDL Primed Human Coronary Smooth Muscle Cells*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 13.
47. Napoli, C., et al., *Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(11): p. 2680-90.
48. Winkels, H., et al., *Atherosclerosis in the single-cell era*. *Curr Opin Lipidol*, 2018. **29**(5): p. 389-396.
49. Swirski, F.K. and M. Nahrendorf, *Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure*. *Science*, 2013. **339**(6116): p. 161-6.
50. Winkels, H., et al., *Atlas of the Immune Cell Repertoire in Mouse Atherosclerosis Defined by Single-Cell RNA-Sequencing and Mass Cytometry*. *Circ Res*, 2018. **122**(12): p. 1675-1688.
51. Cochain, C., et al., *Single-Cell RNA-Seq Reveals the Transcriptional Landscape and Heterogeneity of Aortic Macrophages in Murine Atherosclerosis*. *Circ Res*, 2018. **122**(12): p. 1661-1674.
52. Kim, K., et al., *Transcriptome Analysis Reveals Nonfoamy Rather Than Foamy Plaque Macrophages Are Proinflammatory in Atherosclerotic Murine Models*. *Circ Res*, 2018. **123**(10): p. 1127-1142.
53. Ensan, S., et al., *Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth*. *Nat Immunol*, 2016. **17**(2): p. 159-68.
54. Swirski, F.K., et al., *Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytopoiesis and give rise to macrophages in atheromata*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 195-205.
55. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. *Science*, 2010. **327**(5966): p. 656-61.
56. Quintar, A., et al., *Endothelial Protective Monocyte Patrolling in Large Arteries Intensified by Western Diet and Atherosclerosis*. *Circ Res*, 2017. **120**(11): p. 1789-1799.
57. Robbins, C.S., et al., *Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions*. *Circulation*, 2012. **125**(2): p. 364-74.

58. Tacke, F., et al., *Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 185-94.
59. Swirski, F.K., et al., *Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(27): p. 10340-10345.
60. Williams, J.W., et al., *Limited proliferation capacity of aortic intima resident macrophages requires monocyte recruitment for atherosclerotic plaque progression*. Nat Immunol, 2020. **21**(10): p. 1194-1204.
61. Robbins, C.S., et al., *Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis*. Nat Med, 2013. **19**(9): p. 1166-72.
62. Tang, J., et al., *Inhibiting macrophage proliferation suppresses atherosclerotic plaque inflammation*. Sci Adv, 2015. **1**(3).
63. Chinetti-Gbaguidi, G., S. Colin, and B. Staels, *Macrophage subsets in atherosclerosis*. Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(1): p. 10-7.
64. Tabas, I. and K.E. Bornfeldt, *Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 653-67.
65. Nahrendorf, M. and F.K. Swirski, *Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function*. Circ Res, 2016. **119**(3): p. 414-7.
66. Colin, S., G. Chinetti-Gbaguidi, and B. Staels, *Macrophage phenotypes in atherosclerosis*. Immunol Rev, 2014. **262**(1): p. 153-66.
67. Wolfs, I.M., M.M. Donners, and M.P. de Winther, *Differentiation factors and cytokines in the atherosclerotic plaque micro-environment as a trigger for macrophage polarisation*. Thromb Haemost, 2011. **106**(5): p. 763-71.
68. Moore, K.J., et al., *Macrophage Trafficking, Inflammatory Resolution, and Genomics in Atherosclerosis: JACC Macrophage in CVD Series (Part 2)*. J Am Coll Cardiol, 2018. **72**(18): p. 2181-2197.
69. Willemsen, L. and M.P. de Winther, *Macrophage subsets in atherosclerosis as defined by single-cell technologies*. J Pathol, 2020. **250**(5): p. 705-714.
70. Tabas, I. and A.H. Lichtman, *Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis*. Immunity, 2017. **47**(4): p. 621-634.
71. Peled, M. and E.A. Fisher, *Dynamic Aspects of Macrophage Polarization during Atherosclerosis Progression and Regression*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 579.
72. Huang, W.C., et al., *Classical macrophage activation up-regulates several matrix metalloproteinases through mitogen activated protein kinases and nuclear factor- $\kappa$ B*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42507.
73. Finn, A.V., et al., *Concept of vulnerable/unstable plaque*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(7): p. 1282-92.
74. Kojima, Y., I.L. Weissman, and N.J. Leeper, *The Role of Efferocytosis in Atherosclerosis*. Circulation, 2017. **135**(5): p. 476-489.
75. Ait-Oufella, H., et al., *Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice*. Circulation, 2007. **115**(16): p. 2168-77.
76. Thorp, E. and I. Tabas, *Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(5): p. 1089-95.
77. Fadok, V.A., et al., *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, and PAF*. J Clin Invest, 1998. **101**(4): p. 890-8.
78. Schrijvers, D.M., et al., *Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1256-61.

79. Arai, S., et al., *A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpa/Api6 in atherosclerosis development*. Cell Metab, 2005. **1**(3): p. 201-13.
80. Thorp, E., et al., *Brief report: increased apoptosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe<sup>-/-</sup> mice lacking macrophage Bcl-2*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(2): p. 169-72.
81. Khallou-Laschet, J., et al., *Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8852.
82. Feig, J.E., et al., *Reversal of hyperlipidemia with a genetic switch favorably affects the content and inflammatory state of macrophages in atherosclerotic plaques*. Circulation, 2011. **123**(9): p. 989-98.
83. Rahman, K., et al., *Inflammatory Ly6Chi monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression*. J Clin Invest, 2017. **127**(8): p. 2904-2915.
84. Stöger, J.L., et al., *Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2012. **225**(2): p. 461-8.
85. Lin, J.D., et al., *Single-cell analysis of fate-mapped macrophages reveals heterogeneity, including stem-like properties, during atherosclerosis progression and regression*. JCI Insight, 2019. **4**(4).
86. Kuznetsova, T., et al., *Transcriptional and epigenetic regulation of macrophages in atherosclerosis*. Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(4): p. 216-228.
87. Moore, K.J., F.J. Sheedy, and E.A. Fisher, *Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(10): p. 709-21.
88. Goldstein, J.L., et al., *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(1): p. 333-7.
89. Brown, M.S., et al., *The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages*. J Supramol Struct, 1980. **13**(1): p. 67-81.
90. Endemann, G., et al., *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11811-6.
91. Kunjathoor, V.V., et al., *Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49982-8.
92. Chistiakov, D.A., et al., *Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis*. J Mol Med (Berl), 2017. **95**(11): p. 1153-1165.
93. Yvan-Charvet, L., et al., *Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions*. Circulation, 2008. **118**(18): p. 1837-47.
94. Tall, A.R. and L. Yvan-Charvet, *Cholesterol, inflammation and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(2): p. 104-16.
95. Björkbacka, H., et al., *Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways*. Nat Med, 2004. **10**(4): p. 416-21.
96. Kruth, H.S., *Receptor-independent fluid-phase pinocytosis mechanisms for induction of foam cell formation with native low-density lipoprotein particles*. Curr Opin Lipidol, 2011. **22**(5): p. 386-93.

97. Kruth, H.S., et al., *Macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 34573-80.
98. Sorci-Thomas, M.G. and M.J. Thomas, *Microdomains, Inflammation, and Atherosclerosis*. Circ Res, 2016. **118**(4): p. 679-91.
99. Duewell, P., et al., *NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1357-61.
100. Broz, P. and V.M. Dixit, *Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(7): p. 407-20.
101. Sheedy, F.J., et al., *CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation*. Nat Immunol, 2013. **14**(8): p. 812-20.
102. Yvan-Charvet, L., et al., *Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3900-8.
103. Westerterp, M., et al., *Deficiency of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in macrophages increases inflammation and accelerates atherosclerosis in mice*. Circ Res, 2013. **112**(11): p. 1456-65.
104. Allen, S.J., S.E. Crown, and T.M. Handel, *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 787-820.
105. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
106. Gerhardt, T. and K. Ley, *Monocyte trafficking across the vessel wall*. Cardiovasc Res, 2015. **107**(3): p. 321-30.
107. Zernecke, A. and C. Weber, *Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(4): p. 742-50.
108. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(6): p. 313-26.
109. Noels, H., C. Weber, and R.R. Koenen, *Chemokines as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019. **39**(4): p. 583-592.
110. Lin, J., V. Kakkar, and X. Lu, *Impact of MCP-1 in atherosclerosis*. Curr Pharm Des, 2014. **20**(28): p. 4580-8.
111. Rollins, B.J., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): p. 909-28.
112. Zernecke, A. and C. Weber, *Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis*. Cardiovasc Res, 2010. **86**(2): p. 192-201.
113. Gencer, S., et al., *Inflammatory Chemokines in Atherosclerosis*. Cells, 2021. **10**(2).
114. Gautier, E.L., C. Jakubzick, and G.J. Randolph, *Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(10): p. 1412-8.
115. Hartmann, P., A. Schober, and C. Weber, *Chemokines and microRNAs in atherosclerosis*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(17): p. 3253-66.
116. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 894-7.
117. Leonard, E.J. and T. Yoshimura, *Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)*. Immunol Today, 1990. **11**(3): p. 97-101.
118. Ford, L.B., et al., *Characterization of conventional and atypical receptors for the chemokine CCL2 on mouse leukocytes*. J Immunol, 2014. **193**(1): p. 400-11.
119. Needham, M., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1: receptor interactions and calcium signaling mechanisms*. J Leukoc Biol, 1996. **60**(6): p. 793-803.

120. Gschwandtner, M., R. Derler, and K.S. Midwood, *More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 2759.
121. Georgakis, M.K., et al., *Targeting the CCL2-CCR2 axis for atheroprotection*. *Eur Heart J*, 2022.
122. Yoshimura, T., et al., *Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE*. *FEBS Lett*, 1989. **244**(2): p. 487-93.
123. Rollins, B.J., et al., *Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE*. *Am J Pathol*, 1990. **136**(6): p. 1229-33.
124. Valente, A.J., et al., *Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture*. *Biochemistry*, 1988. **27**(11): p. 4162-8.
125. Nelken, N.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques*. *J Clin Invest*, 1991. **88**(4): p. 1121-7.
126. Liao, F., et al., *Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice*. *J Clin Invest*, 1991. **87**(6): p. 2253-7.
127. Reddy, S., et al., *Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 activity is necessary for oxidized phospholipids to induce monocyte chemotactic activity in human aortic endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(20): p. 17030-5.
128. Serbina, N.V. and E.G. Pamer, *Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(3): p. 311-7.
129. Tsou, C.L., et al., *Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(4): p. 902-9.
130. Combadiere, C., et al., *Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice*. *Circulation*, 2008. **117**(13): p. 1649-57.
131. Krohn-Grimberghe, M., et al., *Nanoparticle-encapsulated siRNAs for gene silencing in the haematopoietic stem-cell niche*. *Nat Biomed Eng*, 2020. **4**(11): p. 1076-1089.
132. Leuschner, F., et al., *Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice*. *Nat Biotechnol*, 2011. **29**(11): p. 1005-10.
133. Majmudar, M.D., et al., *Monocyte-directed RNAi targeting CCR2 improves infarct healing in atherosclerosis-prone mice*. *Circulation*, 2013. **127**(20): p. 2038-46.
134. Drechsler, M., et al., *Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis*. *Circulation*, 2010. **122**(18): p. 1837-45.
135. Maus, U., et al., *Role of endothelial MCP-1 in monocyte adhesion to inflamed human endothelium under physiological flow*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **283**(6): p. H2584-91.
136. Gerszten, R.E., et al., *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions*. *Nature*, 1999. **398**(6729): p. 718-23.
137. Winter, C., et al., *Chrono-pharmacological Targeting of the CCL2-CCR2 Axis Ameliorates Atherosclerosis*. *Cell Metab*, 2018. **28**(1): p. 175-182.e5.
138. Soehnlein, O., et al., *Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes*. *EMBO Mol Med*, 2013. **5**(3): p. 471-81.

139. Gu, L., et al., *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 275-81.
140. Dawson, T.C., et al., *Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Atherosclerosis, 1999. **143**(1): p. 205-11.
141. Gosling, J., et al., *MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 773-8.
142. Georgakis, M.K., et al., *Association of Circulating Monocyte Chemoattractant Protein-1 Levels With Cardiovascular Mortality: A Meta-analysis of Population-Based Studies*. JAMA Cardiol, 2021. **6**(5): p. 587-592.
143. Georgakis, M.K., et al., *Circulating Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Risk of Stroke: Meta-Analysis of Population-Based Studies Involving 17 180 Individuals*. Circ Res, 2019. **125**(8): p. 773-782.
144. Georgakis, M.K., et al., *Monocyte-Chemoattractant Protein-1 Levels in Human Atherosclerotic Lesions Associate With Plaque Vulnerability*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021. **41**(6): p. 2038-2048.
145. Colombo, A., et al., *A double-blind randomised study to evaluate the efficacy and safety of bindarit in preventing coronary stent restenosis*. EuroIntervention, 2016. **12**(11): p. e1385-e1394.
146. Covino, D.A., M. Sabbatucci, and L. Fantuzzi, *The CCL2/CCR2 Axis in the Pathogenesis of HIV-1 Infection: A New Cellular Target for Therapy?* Curr Drug Targets, 2016. **17**(1): p. 76-110.
147. Solari, R., J.E. Pease, and M. Begg, *"Chemokine receptors as therapeutic targets: Why aren't there more drugs?"*. Eur J Pharmacol, 2015. **746**: p. 363-7.
148. Roca, H., et al., *CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization*. J Biol Chem, 2009. **284**(49): p. 34342-54.
149. Choi, S., et al., *Transcription factor NFAT5 promotes macrophage survival in rheumatoid arthritis*. J Clin Invest, 2017. **127**(3): p. 954-969.
150. Amano, S.U., et al., *Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation*. Cell Metab, 2014. **19**(1): p. 162-171.
151. Lumeng, C.N., J.L. Bodzin, and A.R. Saltiel, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 175-84.
152. Sierra-Filardi, E., et al., *CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile*. J Immunol, 2014. **192**(8): p. 3858-67.
153. Tanaka, T., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 enhances apoptotic cell removal by macrophages through Rac1 activation*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **399**(4): p. 677-82.
154. Rull, A., et al., *Deficiency in monocyte chemoattractant protein-1 modifies lipid and glucose metabolism*. Exp Mol Pathol, 2007. **83**(3): p. 361-6.
155. Bernelot Moens, S.J., et al., *PCSK9 monoclonal antibodies reverse the pro-inflammatory profile of monocytes in familial hypercholesterolaemia*. Eur Heart J, 2017. **38**(20): p. 1584-1593.
156. Han, K.H., et al., *Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(12): p. 1983-91.



157. Tabata, T., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 induces scavenger receptor expression and monocyte differentiation into foam cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **305**(2): p. 380-5.
158. Basatemur, G.L., et al., *Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis*. *Nat Rev Cardiol*, 2019. **16**(12): p. 727-744.
159. 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.
160. Bentzon, J.F., et al., *Mechanisms of plaque formation and rupture*. *Circ Res*, 2014. **114**(12): p. 1852-66.
161. Allahverdian, S., et al., *Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis*. *Cardiovasc Res*, 2018. **114**(4): p. 540-550.
162. Misra, A., et al., *Integrin beta3 regulates clonality and fate of smooth muscle-derived atherosclerotic plaque cells*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 2073.
163. Chappell, J., et al., *Extensive Proliferation of a Subset of Differentiated, yet Plastic, Medial Vascular Smooth Muscle Cells Contributes to Neointimal Formation in Mouse Injury and Atherosclerosis Models*. *Circ Res*, 2016. **119**(12): p. 1313-1323.
164. Wang, Y., et al., *Clonally expanding smooth muscle cells promote atherosclerosis by escaping efferocytosis and activating the complement cascade*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. **117**(27): p. 15818-15826.
165. Benditt, E.P. and J.M. Benditt, *Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973. **70**(6): p. 1753-6.
166. Espinosa-Diez, C., et al., *Smooth muscle cells in atherosclerosis: clones but not carbon copies*. *JVS Vasc Sci*, 2021. **2**: p. 136-148.
167. 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.
168. Gomez, D. and G.K. Owens, *Reconciling Smooth Muscle Cell Oligoclonality and Proliferative Capacity in Experimental Atherosclerosis*. *Circ Res*, 2016. **119**(12): p. 1262-1264.
169. Wang, G., et al., *Origin and differentiation of vascular smooth muscle cells*. *J Physiol*, 2015. **593**(14): p. 3013-30.
170. Majesky, M.W., *Developmental basis of vascular smooth muscle diversity*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(6): p. 1248-58.
171. Jiang, X., et al., *Fate of the mammalian cardiac neural crest*. *Development*, 2000. **127**(8): p. 1607-16.
172. Mikawa, T. and R.G. Gourdie, *Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ*. *Dev Biol*, 1996. **174**(2): p. 221-32.
173. Wasteson, P., et al., *Developmental origin of smooth muscle cells in the descending aorta in mice*. *Development*, 2008. **135**(10): p. 1823-32.
174. Waldo, K.L., et al., *Secondary heart field contributes myocardium and smooth muscle to the arterial pole of the developing heart*. *Dev Biol*, 2005. **281**(1): p. 78-90.
175. Van Assche, T., et al., *Transcription profiles of aortic smooth muscle cells from atherosclerosis-prone and -resistant regions in young apolipoprotein E-deficient mice before plaque development*. *J Vasc Res*, 2011. **48**(1): p. 31-42.
176. Topouzis, S. and M.W. Majesky, *Smooth Muscle Lineage Diversity in the Chick Embryo*. *Dev Biol*, 1996. **178**(2): p. 430-45.

177. 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.
178. Haimovici, H. and N. Maier, *Experimental canine atherosclerosis in autogenous abdominal aortic grafts implanted into the jugular vein*. *Atherosclerosis*, 1971. **13**(3): p. 375-84.
179. Haimovici, H. and N. Maier, *FATE OF AORTIC HOMOGRAPHS IN CANINE ATHEROSCLEROSIS. 3. STUDY OF FRESH ABDOMINAL AND THORACIC AORTIC IMPLANTS INTO THORACIC AORTA: ROLE OF TISSUE SUSCEPTIBILITY IN ATHEROGENESIS*. *Arch Surg*, 1964. **89**: p. 961-9.
180. Haimovici, H., N. Maier, and L. Strauss, *Fate of aortic homografts in experimental canine atherosclerosis; study of fresh thoracic implants into abdominal aorta*. *AMA Arch Surg*, 1958. **76**(2): p. 282-8.
181. Haimovici, H., N. Maier, and L. Strauss, *Fate of aortic homografts in experimental canine atherosclerosis. II. Study of fresh abdominal aortic implants into abdominal aorta*. *AMA Arch Surg*, 1959. **78**(2): p. 239-45.
182. Bennett, M.R., S. Sinha, and G.K. Owens, *Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis*. *Circ Res*, 2016. **118**(4): p. 692-702.
183. Miano, J.M., E.A. Fisher, and M.W. Majesky, *Fate and State of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis*. *Circulation*, 2021. **143**(21): p. 2110-2116.
184. Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff, *Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(3): p. 767-801.
185. 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.
186. Alencar, G.F., et al., *Stem Cell Pluripotency Genes Klf4 and Oct4 Regulate Complex SMC Phenotypic Changes Critical in Late-Stage Atherosclerotic Lesion Pathogenesis*. *Circulation*, 2020. **142**(21): p. 2045-2059.
187. 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.
188. 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. **142**(21): p. 2060-2075.
189. Mietus-Snyder, M., M.S. Gowri, and R.E. Pitas, *Class A scavenger receptor up-regulation in smooth muscle cells by oxidized low density lipoprotein. Enhancement by calcium flux and concurrent cyclooxygenase-2 up-regulation*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(23): p. 17661-70.
190. Song, Y., et al., *TLR4/NF- $\kappa$ B/Ceramide signaling contributes to Ox-LDL-induced calcification of human vascular smooth muscle cells*. *Eur J Pharmacol*, 2017. **794**: p. 45-51.
191. 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.
192. Clarke, M.C., et al., *Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis*. *Nat Med*, 2006. **12**(9): p. 1075-80.

193. Clarke, M.C., et al., *Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin-1-directed inflammation: effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis*. *Circ Res*, 2010. **106**(2): p. 363-72.
194. Ramel, D., et al., *Immune and Smooth Muscle Cells Interactions in Atherosclerosis: How to Target a Breaking Bad Dialogue?* *Front Pharmacol*, 2019. **10**: p. 1276.
195. Ohtsuka, M., Y. Miyashita, and K. Shirai, *Lipids deposited in human atheromatous lesions induce apoptosis of human vascular smooth muscle cells*. *J Atheroscler Thromb*, 2006. **13**(5): p. 256-62.
196. Gomez, D., et al., *Interleukin-1 $\beta$  has atheroprotective effects in advanced atherosclerotic lesions of mice*. *Nat Med*, 2018. **24**(9): p. 1418-1429.
197. Silvestre-Roig, C., et al., *Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death*. *Nature*, 2019. **569**(7755): p. 236-240.
198. Grootaert, M.O.J. and M.R. Bennett, *Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment*. *Cardiovasc Res*, 2021. **117**(11): p. 2326-2339.
199. Ozerdem, U., et al., *NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis*. *Dev Dyn*, 2001. **222**(2): p. 218-27.
200. Stark, K., et al., *Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(1): p. 41-51.
201. Stark, K., K. Pekayvaz, and S. Massberg, *Role of pericytes in vascular immunosurveillance*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018. **23**: p. 767-781.
202. Pekayvaz, K.A., *Die Rolle von CCL2 aus Gefäßwandzellen in der Atherosklerose*, in *Medizinische Fakultät*. 2020, Ludwig-Maximilians-Universität München
203. Owsiany, K.M., et al., *Dichotomous Roles of Smooth Muscle Cell-Derived MCP1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) in Development of Atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2022. **42**(8): p. 942-956.
204. Stallcup, W.B., *The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects*. *J Neurocytol*, 2002. **31**(6-7): p. 423-35.
205. Levine, J.M. and J.P. Card, *Light and electron microscopic localization of a cell surface antigen (NG2) in the rat cerebellum: association with smooth protoplasmic astrocytes*. *J Neurosci*, 1987. **7**(9): p. 2711-20.
206. Nishiyama, A., et al., *The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan*. *J Cell Biol*, 1991. **114**(2): p. 359-71.
207. Chakraborty, R., et al., *Promoters to Study Vascular Smooth Muscle*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019. **39**(4): p. 603-612.
208. 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.
209. Feil, R., et al., *Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **237**(3): p. 752-7.
210. Indra, A.K., et al., *Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases*. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(22): p. 4324-7.
211. Shi, C., et al., *Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands*. *Immunity*, 2011. **34**(4): p. 590-601.
212. Hoess, R.H. and K. Abremski, *Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system*. *J Mol Biol*, 1985. **181**(3): p. 351-62.

- 
213. Guo, F., D.N. Gopaul, and G.D. van Duyne, *Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse*. *Nature*, 1997. **389**(6646): p. 40-6.
214. Plump, A.S. and J.L. Breslow, *Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse*. *Annu Rev Nutr*, 1995. **15**: p. 495-518.
215. 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.
216. Zhang, S.H., et al., *Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E*. *Science*, 1992. **258**(5081): p. 468-71.
217. Nakashima, Y., et al., *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree*. *Arterioscler Thromb*, 1994. **14**(1): p. 133-40.
218. Smith, J.D. and J.L. Breslow, *The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research*. *J Intern Med*, 1997. **242**(2): p. 99-109.
219. Luche, H., et al., *Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in "knock-in" Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(1): p. 43-53.
220. Bouabe, H. and K. Okkenhaug, *Gene targeting in mice: a review*. *Methods Mol Biol*, 2013. **1064**: p. 315-36.
221. Jung, S., et al., *Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(11): p. 4106-14.
222. Piedrahita, J.A., et al., *Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(10): p. 4471-5.
223. Adan, A., et al., *Flow cytometry: basic principles and applications*. *Crit Rev Biotechnol*, 2017. **37**(2): p. 163-176.
224. Daëron, M., *Fc receptor biology*. *Annu Rev Immunol*, 1997. **15**: p. 203-34.
225. Kim, D., et al., *Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype*. *Nat Biotechnol*, 2019. **37**(8): p. 907-915.
226. Liao, Y., G.K. Smyth, and W. Shi, *featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features*. *Bioinformatics*, 2014. **30**(7): p. 923-30.
227. Stuart, T., et al., *Comprehensive Integration of Single-Cell Data*. *Cell*, 2019. **177**(7): p. 1888-1902.e21.
228. Im, K., et al., *An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1897**: p. 299-311.
229. Loo, D.T., *TUNEL assay. An overview of techniques*. *Methods Mol Biol*, 2002. **203**: p. 21-30.
230. Tabas, I., *Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(11): p. 2255-64.
231. Holm Nielsen, S., et al., *Exploring the role of extracellular matrix proteins to develop biomarkers of plaque vulnerability and outcome*. *J Intern Med*, 2020. **287**(5): p. 493-513.
232. Alexander, M.R., et al., *Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(1): p. 70-9.

233. Gonzalez, L. and B.L. Trigatti, *Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy*. Can J Cardiol, 2017. **33**(3): p. 303-312.
234. Lim, W.S., et al., *Signal transducer and activator of transcription-1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress in vitro and in advanced atherosclerotic lesions in vivo*. Circulation, 2008. **117**(7): p. 940-51.
235. Getz, G.S. and C.A. Reardon, *ApoE knockout and knockin mice: the history of their contribution to the understanding of atherogenesis*. J Lipid Res, 2016. **57**(5): p. 758-66.